

# Untersuchung der Konformation und Dynamik von RNA mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffmoleküle

DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN

Vorgelegt beim Fachbereich Physik  
der Johann Wolfgang Goethe -Universität  
in Frankfurt am Main

Ute Katrin Förster  
aus Homburg/Saar

Frankfurt, 2010  
(D30)

Vom Fachbereich Physik  
der Goethe-Universität Frankfurt als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Dirk-Hermann Rischke  
1. Gutachter: Prof. Dr. Josef Wachtveitl  
2. Gutachter: Prof. Dr. Beatrix Süß

Datum der Disputation:

*Nur wer erwachsen wird und ein Kind bleibt, ist ein Mensch*  
*– Erich Kästner –*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>Publikationen</b> .....	5
<b>1 Einleitung</b> .....	7
1.1 RNA .....	8
1.2 Aufbau der Arbeit .....	10
<b>2 Grundlagen der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie</b> .	13
2.1 Einführung .....	13
2.1.1 Theorie der Absorption .....	14
2.1.2 Theorie der Fluoreszenz .....	16
2.2 Anregungs-Abtast-Spektroskopie .....	17
2.3 Grundlagen der Nichtlinearen Optik .....	17
2.3.1 Polarisierung des Mediums .....	18
2.3.2 Doppelbrechung .....	23
2.3.3 Phasenanpassung .....	23
2.3.4 Gruppengeschwindigkeitsdispersion .....	25
2.4 Femtosekundenlaser .....	25
2.4.1 Modenkopplung .....	26
2.4.2 Chirped Pulse Amplification .....	27
2.4.3 Das Spectra-Physics Tsunami-Spitfire-System .....	27
2.5 Reaktionskinetiken .....	28
2.5.1 Reaktionsordnungen .....	29
2.5.2 Kinetische Studien von Bindungsreaktionen .....	31
<b>3 Zeitaufgelöste Spektroskopie im Sichtbaren</b> .....	35
3.1 Spektroskopie mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur .....	35
3.1.1 Funktionsprinzip .....	35
3.1.2 Experimentelle Details des Messaufbaus .....	37
3.2 Generierung von Anregungswellenlängen im sichtbaren und im UV-Bereich .....	37
3.2.1 Frequenzverdopplung .....	38
3.2.2 NOPA - Noncollinear Optical Parametrical Amplifier ..	38
3.2.3 SFG - Sum Frequency Generation .....	40

3.3	Transiente Absorption im sichtbaren Spektralbereich . . . . .	41
3.4	Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen . . . . .	43
3.4.1	Funktionsprinzip . . . . .	43
3.4.2	Charakterisierung des Messaufbaus . . . . .	44
3.4.3	Ein Beispiel: Ethidiumbromid als fluoreszierendes Substrat für das Transportprotein TbSMR . . . . .	46
3.5	Fluoreszenzaufkonvertierung . . . . .	49
3.5.1	Funktionsprinzip . . . . .	49
3.5.2	Charakterisierung des Messaufbaus . . . . .	50
3.5.3	Beispiel 1: Fluoreszenz des Pigment Yellow 101 . . . . .	53
3.5.4	Beispiel 2: Ultraschnelle Fluoreszenz des Channelrhodopsin II . . . . .	58
3.5.5	Beispiel 3: Lebensdauer des Radikalkations von Astaxanthin . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Pyrenmodifizierte RNA . . . . .</b>	<b>67</b>
4.1	Der Farbstoff Pyren . . . . .	68
4.2	Pyrenmodifizierte Nukleobasen . . . . .	69
4.2.1	Synthese . . . . .	70
4.2.2	Vorcharakterisierung der Modell-RNA . . . . .	71
4.3	Spektroskopie des modifizierten Nukleosids . . . . .	74
4.3.1	Lösemittelabhängigkeiten . . . . .	76
4.3.2	Zeitaufgelöste Spektroskopie . . . . .	80
4.4	Spektroskopie der modifizierten RNA . . . . .	88
4.4.1	Spektroskopische Untersuchung der Einzelstränge . . . . .	88
4.4.2	Spektroskopische Untersuchung der Duplexe . . . . .	90
4.4.3	Schmelzverhalten . . . . .	93
4.4.4	Zeitaufgelöste Spektroskopie . . . . .	106
4.5	Zusammenfassung . . . . .	112
<b>5</b>	<b>Ein Tetrazyklin bindendes Aptamer . . . . .</b>	<b>115</b>
5.1	Einführung: Genregulation . . . . .	115
5.1.1	Riboschalter . . . . .	116
5.1.2	Das Tetrazyklin bindende Aptamer . . . . .	119
5.1.3	Identifikation und Herstellung des Tetrazyklin bindenden Aptamers . . . . .	122
5.2	Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen . . . . .	124
5.3	Stopped-Flow-Messungen . . . . .	127
5.3.1	Bindungskinetik des Wildtyps . . . . .	128
5.3.2	Bindungskinetik der Mutante A50U . . . . .	135
5.3.3	Bindungskinetik der Mutante A13U . . . . .	138
5.3.4	Bindungskinetik der Mutante A9G . . . . .	140
5.3.5	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse . . . . .	144

**A Steuerung des Messaufbaus** ..... 147

**B Datenauswertung** ..... 151

    B.1 TCSPCfit ..... 151

    B.2 Globales Fitten mit IDL ..... 151

    B.3 Generelle Fehlerabschätzung transienter  
         Absorptionsmessungen und ihrer Fits ..... 153

    B.4 Fitten von Kinetiken mit Dynafit ..... 154

**Literatur** ..... 157

**Danksagung** ..... 175

**Erklärung** ..... 179

**Lebenslauf** ..... 181





## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der konformationellen und elektronischen Eigenschaften sowie der Dynamik verschiedener RNA-Systeme. Die Beobachtung der genannten Eigenschaften erfolgt dabei durch statische und zeitaufgelöste optische Spektroskopie an verschiedenen an RNA-gebundenen fluoreszierenden Chromophoren, über deren Verhalten Rückschlüsse auf die Eigenschaften der RNA gezogen werden können.

Zur Durchführung dieser Experimente wird auf eine Reihe kommerzieller und selbstgebaute Spektrometer zurückgegriffen. Zusätzlich zu der bereits vorhandenen, verwendeten Apparatur zur Beobachtung der transienten Absorption im Femtosekundenbereich sowie verschiedener statischer Spektrometer wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Apparatur zur Messung von Fluoreszenzlebensdauern entwickelt, die über einen weiten Zeitbereich von 9 Größenordnungen (100 fs - 100  $\mu$ s) operiert, was eine variable Verwendung auf eine Vielzahl an Systemen ermöglicht. Die Abdeckung dieses weiten Zeitbereichs wird durch die integrative Verwendung zweier verschiedener, etablierter Technologien möglich gemacht. Der Aufbau fußt auf einer Elektronik, die für das zeitaufgelöste Einzelphotonenzählen (*time correlated single photon counting, TCSPC*) entwickelt wurde, jedoch ebenso in der Lage ist, durch Hinzufügen eines ultrakurzen Torpulses sowie andere Datenbehandlung als Fluoreszenzaufkonvertierungs-Apparatur zu funktionieren und somit die schnelleren Zeitbereiche abzudecken.

Mit diesem Aufbau konnten neben den RNA-Studien wichtige Beiträge zu weiteren Projekten gewonnen werden. So wird bei dem Transport von Ethidiumbromid durch das Membrantransportprotein TbSMR mit Hilfe von TCSPC-Messungen ein einziger stabiler Zustand als Intermediatzustand des transportierten Chromophors identifiziert, in dem sich die Lebensdauer des Chromophors von 2,1 ns in Puffer auf 9,6 ns erhöht. Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer des Retinalproteins Channelrhodopsin II kann nachweisen, dass die Isomerisierung des Retinals als erster Schritt des Retinal-Photozyklus bereits mit einer Lebensdauer von 400 fs abgeschlossen ist. Des Weiteren erweist sich die Fluoreszenzaufkonvertierung insbesondere bei der Beobachtung von Fluoreszenz im nahinfraroten Spektralbereich als nützlich, da durch den bei dieser Technik involvierten Prozess der Summenfrequenzmischung in diesem Spektralbereich liegende Fluoreszenz in den sichtbaren Bereich konvertiert und so leichter der Detektion zugänglich gemacht wird. Dies findet Anwendung bei der zuvor noch nicht nachgewiesenen, um 1400 nm liegenden Fluoreszenz des Radikalkations des Karotinoids Astaxanthin, dessen Fluoreszenzlebensdauer als biexponentiell mit Lebensdauern von 5 ps und 40 ps bestimmt wurde.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt jedoch auf der Untersuchung verschiedener RNA-Systeme. So werden die optischen Eigenschaften einer durch den Farbstoff

1-Ethynylpyren modifizierten Adeninbase allein und im Verbund mit Oligonukleotiden. Die Anbindung des Farbstoffs erfolgt mit Hilfe der Ethinylbrücke an die 2-Position einer RNA-Adeninbase, die im Folgenden zur Studie der optischen Eigenschaften des Markers und seiner Wechselwirkung mit der RNA in einer Reihe von Modellsträngen eingebunden wird.

Das so synthetisierte Pyrenadenin wird einer gründlichen spektroskopischen Untersuchung in einer Reihe von Lösungsmitteln unterzogen. Statische Fluoreszenzmessungen zeigen einen ausgeprägten Ladungstransfercharakter des Chromophors insbesondere in der Gegenwart von Wasserstoffbrücken und eine generell große Wechselwirkung zwischen Ethinylpyren und Adenin, die in einer substanziellen Änderung der optischen Eigenschaften des Pyrens resultiert. Insbesondere tritt eine ausgeprägte Rotverschiebung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren von etwa 50 nm im Vergleich zu reinem Pyren auf, die mit einem ausgeprägten Strukturverlust der Banden einhergeht. Der Grund hierfür ist in der Wechselwirkung von Pyren und Adenin über die Ethinylbrücke zu suchen, da weder in reinem Ethinylpyren noch bei einer Verbindung von Pyren und Adenin über eine C-C-Brücke ähnliches beobachtet werden kann.

Die Untersuchung der schnellen Photodynamik von Pyrenadenin mit Hilfe zeitaufgelöster Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie im Femto- bis Pikosekundenbereich weist zudem eine Verringerung der Lebensdauer von Pyren um etwa 2 Größenordnungen nach. Pyrenadenin zeigt zwei Fluoreszenzkanäle, die einer Fluoreszenz des neutralen, sowie des Ladungstransferzustands zugeordnet werden können. Ersterer zeigt eine lösungsmittelabhängige Lebensdauer zwischen 100 und 200 ps, während die Lebensdauer des Ladungstransferzustandes etwa 10x höher ist. Die Formationszeit des Ladungstransferzustandes ist sehr stark lösungsmittelabhängig und fällt mit steigender Polarität des Lösemittels. Im Rahmen dieser Arbeit kann mit der entwickelten Apparatur anhand von Fluoreszenzaufkonvertierungs-Messungen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge nachgewiesen werden, dass ein Teil der Moleküle direkt in den energetisch tiefer liegenden Ladungstransferzustand überführt wird und die Zahl der aus dem angeregten neutralen in den Ladungstransferzustand überführten Moleküle abhängig von der Energie der anregenden Photonen ist.

Eingebunden in Modell-RNA-Stränge mit einem oder zwei Pyrenen erweist sich die Fluoreszenz des Labels als empfindlicher Sensor für die Konformation des entsprechenden RNA-Strangs. Mit Hilfe verschiedener Sequenzen von einfachmodifizierten Duplexen ist es möglich nachzuweisen, dass die Fluoreszenzquantenausbeute des Chromophors ein deutlicher Indikator für die Interkalation des Pyrens innerhalb des Duplex ist. Systematische Variation der Sequenz lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Wahrscheinlichkeit der Interkalation von Pyren in den RNA-Duplex sequenzspezifisch ist. Nur in der stabileren Umgebung von GC-Basenpaaren ist das Pyren in der Lage, sich dauerhaft innerhalb des Duplex aufzuhalten, während in einer flexibleren AU-Umgebung eine Position außerhalb des RNA-Duplex präferiert wird.

Mit Hilfe transientser Absorptionsmessungen kann gezeigt werden, dass die Photophysik des in RNA eingebundenen Pyrenadenins nur kleine Variationen im Vergleich zur Photophysik des Labels allein aufweist. Der Ladungstransfer wird innerhalb eines RNA-Strangs beschleunigt, wobei die Beschleunigung in Einzelsträngen größer als in Doppelsträngen ist. Die deutliche Abnahme der Quantenausbeute des interkalierten Pyrens geht hauptsächlich auf Kosten der langlebigeren Ladungstransferfluoreszenz, so

dass interkaliertes Pyrenadenin insgesamt schneller in den Grundzustand zurückkehrt als nichtinterkaliertes. Ein signifikanter Einfluss der Interkalation auf die Bildung des Ladungstransferzustandes kann hingegen – möglicherweise aufgrund der relativen konformationellen Stabilität der Umgebung – nicht beobachtet werden.

Mit Hilfe eines doppelt pyrenmodifizierten Duplex, bei dem sich jeweils ein Farbstoff an einem der beiden Stränge befindet, kann nachgewiesen werden, dass aufgrund von Exzimerwechselwirkungen zwischen gefaltetem und ungefaltetem Duplex eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 35 nm auftritt, die mit bloßem Auge sichtbar ist und zur Beobachtung der Hybridisierung verwendet werden kann. Kurzzeitspektroskopische Messungen zeigen Signale, die als Superposition von Monomeren, deren Photophysik mit der zuvor bestimmten übereinstimmt, und Exzimeren interpretiert werden können. Deren Formation läuft aufgrund der großen räumlichen Nähe der beiden Pyrene unterhalb der Zeitauflösung der Messung von 200 fs ab und die Fluoreszenzlebensdauer übertrifft mit 18,5 ns die der Monomerkomponente um ein Vielfaches.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer Studie zur Bindung des fluoreszenten Liganden Tetrazyklin an das Tetrazyklin bindende Aptamer. Hier wird auf Basis verschiedener Mutanten an für die Bindung wichtigen Stellen eine Analyse der Stabilität der Bindetasche sowie des Bindungsprozesses durchgeführt. Erstere wird mit Hilfe von Tetrazyklinlebensdauerermessungen durchgeführt, für letztere wird in Bindungsstudien mit Hilfe der Stopped-Flow-Methode die Fluoreszenz des Tetrazyklins zeitaufgelöst vermessen.

Insgesamt folgt die Bindung des Tetrazyklins an das Aptamer einer zweistufigen Kinetik, deren zweiter Schritt irreversibel ist. Die Bindung läuft, verglichen mit anderen Aptameren, sehr schnell ab. Für den ersten Schritt ergibt sich eine Gleichgewichtskonstante von  $k_{eq} = 1,9 \mu\text{M}$ , während bei dem zweiten Schritt eine Umordnungsrate von  $168 \text{ s}^{-1}$  beobachtet wird. Die Mutation der Base A50, die einen Kontakt zum Gegenion des Tetrazyklins herstellt, beeinflusst vor allen Dingen den ersten Schritt der Bindung, während ein signifikanter Einfluss auf den zweiten Reaktionsschritt nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden kann. Die Mutation der Base A13, die über einen direkten Kontakt mit der OH-Gruppe des Tetrazyklins an  $R_{6\beta}$  verbunden ist, hingegen stört beide Schritte der Tetrazyklinbindung signifikant. Die Base A9, die insbesondere für die Präformation des Aptamers von großer Bedeutung ist, weist den größten Einfluss auf die Bindung auf. Während die Mutationen von A13 und A50 in den verwendeten Konzentrationsbereichen nur einen leichten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Bindung ausüben, führt eine Mutation von A9 zu einer Verlangsamung des Bindungsprozesses um mehr als einen Faktor 20. Dies ist vor allem in der immens gesteigerten Rückreaktionsrate des ersten Bindungsschritts begründet. Hieraus lässt sich schließen, dass bei fehlender Präformation des Aptamers nur wenige Tetrazyklinmoleküle ein für vollständige Bindung geeignetes Aptamer vorfinden. Dieses Resultat unterstreicht die Bedeutung der Präformation für die Bindungseigenschaften des Tetrazyklin bindenden Aptamers.

Ferner konnte anhand von Lebensdauerermessungen gezeigt werden, dass nach dem Wildtyp die Mutante A9G die stabilste Bindetasche aufwies. Das Fehlen von A50 führt zu der instabilsten Bindetasche. Somit kann gefolgert werden, dass auch in Abwesenheit von A9 aufgrund der zwei vorhandenen Kontakte des Tetrazyklins an das Aptamer eine sehr stabile Konfiguration erreicht werden kann. Das Fehlen einer der beiden Bindungen zwischen Tetrazyklin und Aptamer wirkt sich deutlich stärker auf die Stabilität aus,

wobei insbesondere eine Fixierung des Gegenions von großer Bedeutung ist.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, ist die zeitaufgelöste optische Spektroskopie insbesondere in Verbindung mit der Verwendung von fluoreszierenden Molekülen ein ausgezeichnetes Mittel zur Beobachtung von Struktur und Dynamik von RNA. Die Empfindlichkeit von Fluoreszenz auf die Veränderung der Umgebung des Chromophors erlaubt es, zwischen verschiedenen Konformeren zu unterscheiden, Konformationsdynamik in Echtzeit zu beobachten und mit Hilfe zeitaufgelöster Spektroskopie auch Rückschlüsse auf die elektronische Konfiguration der Basenwechselwirkung zu ziehen.

## Publikationen

*C. Grünewald, T. Kwon, N. Piton, U. Förster, J. Wachtveitl und J. W. Engels;*  
RNA as scaffold for pyrene excited complexes;  
*Bioorganic and Medicinal Chemistry* (2008), 16, 19-26

*U. Förster, N. Goldenhoff, C. Grünewald, J. W. Engels und J. Wachtveitl;*  
Photophysics of 1-ethynylpyrene modified RNA base adenine;  
*Journal of Luminescence* (2009), 129, 1454-1458

*U. Förster, K. Lommel, D. Sauter, C. Grünewald, J. W. Engels und J. Wachtveitl;*  
2-(1-Ethynylpyrene)-Adenosine as a Folding Probe for RNA - Pyrene in or out;  
*ChemBioChem* (2010), 11, 664-672

*S. Amarie, U. Förster, N. Goldenhoff, A. Dreuw und J. Wachtveitl;*  
Excited state dynamics of the astaxanthin radical cation;  
*Chemical Physics* (2010), in press

*M.-K. Verhoeven, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg und J. Wachtveitl;*  
The photocycle of Channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and extended characterization of the subsequent reaction steps;  
(2010), under review

*U. Förster, C. Grünewald, J. W. Engels und J. Wachtveitl;*  
Ultrafast dynamics of 1-ethynylpyrene-modified RNA - a photophysical probe of intercalation;  
(2010), submitted

*U. Förster, J. E. Weigand, B. Süß und J. Wachtveitl;*  
A stopped flow transient kinetic analysis of substrate binding of the tetracycline binding aptamer;  
manuscript in preparation



# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der zeitaufgelösten, spektroskopischen Untersuchung verschiedener RNA-Systeme. Die zeitaufgelöste, optische Spektroskopie, insbesondere die Ultrakurzzeitspektroskopie, deren Beobachtungsfenster bis in den Femtosekundenbereich hinunter reicht, erlaubt es, tiefe Einblicke in die elektronische Struktur, die Konformationsdynamik und die Zerfallspfade innerhalb biologischer Moleküle zu erlangen. Insbesondere bei Systemen, deren Funktion durch die Absorption von Licht bestimmt wird (beispielsweise Retinalproteine [1] oder Lichtsammelkomplexe [2]) kann mit Hilfe dieser Techniken eine weitgehende Aufklärung der Funktion des Systems erlangt werden.

Jenseits dieser Biosysteme ist es jedoch auch möglich, zeitaufgelöste, optische Spektroskopie auf andere biologische Systeme anzuwenden. Insbesondere weisen die meisten Makromoleküle Absorptionsbanden in einem Bereich auf, der der optischen Spektroskopie zugänglich ist, so dass über Dissipationspfade und Energiezustände Studien über intramolekulare Wechselwirkungen durchgeführt werden können. Zudem eröffnet die Wechselwirkung von biologischen Makromolekülen mit fluoreszierenden Chromophoren, die teilweise auch natürlich vorkommen, weitere Möglichkeiten für die zeitaufgelöste optische Spektroskopie.

Insgesamt zeigt RNA eine große Variabilität und Vielzahl von Funktionen, die insbesondere auf der Struktur und den internen Wechselwirkungen der Nukleobasen untereinander und mit anderen Molekülen beruhen. Ein tieferes Verständnis der chemischen und biophysikalischen Gegebenheiten ist also wünschenswert. Die Zeitskalen der auftretenden dynamischen Prozesse reichen für RNA von Femtosekunden bis hin in den Sekundenbereich und decken ein breites Spektrum an Interaktionen ab [3]. Reaktionen im Femtosekundenbereich können nur in Systemen ohne nennenswerte Energiebarriere ablaufen, die Deaktivierung angeregter Nukleobasen bewegt sich normalerweise in diesem Zeitbereich [4], da eine schnelle Dissipation von Anregungsenergie maßgeblich am Schutz der RNA und DNA vor Photoschaden beteiligt ist. Energietransfer zwischen Basen findet innerhalb von Picosekunden statt [5, 6], langlebige Exzitonenzustände können sich bis zu einer Lebensdauer von Nanosekunden erstrecken [7]. Erste funktionelle Reorganisationen können sich ebenfalls in diesem Zeitbereich bewegen [8]. Die Bildung von Sekundärstrukturen kann normalerweise in Mikrosekunden bis Millisekunden beobachtet werden [9], während Bildung und Umbildung von Tertiärstrukturen in Millisekunden und darüber hinaus ablaufen [10–12]. Ein guter Überblick über zeitaufgelöste Prozesse innerhalb von RNA und ihre Beobachtung findet sich in den Referenzen [5] und [10] wobei letztere sich vor allem mit der Konformationsdynamik auf langsameren Zeiten befasst, und erstere auch auf die kürzeren Zeitbereiche eingeht.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand zweier unterschiedlicher Systeme, die exemplarisch für unterschiedliche RNA-Formen stehen, mit Hilfe zeitaufgelöster optischer Spektroskopie Informationen über elektronische und konformationelle Struktur der RNA sowie ihrer Dynamik zu erhalten. Hierbei wird unter anderem auch das in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Instrumentarium durch Messtechniken erweitert, die es erlauben, Fluoreszenzlebensdauern über einen weiten Zeitbereich von Femtosekunden bis Mikrosekunden zu bestimmen.

## 1.1 RNA

Nukleinsäuren sind einer der prominentesten Vertreter biologischer Bausteine, da sie auf allen Ebenen des Lebens involviert sind. Polynukleotide speichern die genetische Information, sind an der Expression von Proteinen beteiligt und werden bei einer Vielzahl regulatorischer Mechanismen innerhalb eines Organismus verwendet. Nukleinsäuren sind Makromoleküle, die sich aus einzelnen Bausteinen, den Nukleotiden zusammensetzen. Jedes Nukleotid besteht aus drei verschiedenen Bausteinen [13, 14]:

- Einer heterozyklischen Base, der sogenannten *Nukleobase*. Die am häufigsten in den bekanntesten Nukleinsäurevertretern DNA und RNA auftauchenden Nukleobasen sind Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T) und Uracil (U). Sie werden in Pyrimidine, die einen sechsgliedrigen Ring mit 2 Stickstoffatomen aufweisen (C, T, U) und Purine, die aus einem Pyrimidin mit zusätzlichem Imidazolring bestehen (A, G), unterteilt
- Einer Zuckergruppe, die als Pentose vorliegt
- Einem Monophosphatrest, über den Polymerisierung zwischen der 5'-Position des Nukleotids und der 3'-Position des nächsten Nukleotids erfolgen kann.

Nukleinsäuren liegen als Oligonukleotide vor allem in zwei verschiedenen Formen vor. DNA (*Desoxyribonucleic acid*, auf deutsch DNS), die vor allem als Speicher der genetischen Information auftritt, während RNA (*Ribonucleic acid*, auf deutsch RNS) in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Expression oder Regulation involviert ist. Der Unterschied zwischen beiden Oligonukleotidarten liegt in einer OH-Gruppe an der 2'-Position des Zuckers, die bei RNA vorhanden ist, in DNA jedoch fehlt. Dies führt zu einer geringeren Stabilität von RNA, da durch Hydrolyse des Phosphorsäurediesters unter Beteiligung der 2'-OH-Gruppe der Strang gebrochen werden kann. Zudem besteht DNA aus den Nukleotiden A, C, G und T, während in RNA T durch U ersetzt wird. In RNA treten in seltenen Fällen auch zusätzliche Basen auf [15].

Sowohl DNA als auch RNA sind in der Lage, doppelsträngige Helices mit paarweise verbundenen Basen zu bilden [16]. Hierbei formen für gewöhnlich ein Pyrimidin und ein Purin ein über Wasserstoffbrückenbindungen verbundenes Paar, das die beiden Nukleobasen miteinander verbindet. In DNA entstehen Basenpaarungen mit zwei Wasserstoffbrücken zwischen A und T, in RNA wird U an der Stelle von T verwendet. Zwischen G und C werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet, es entsteht somit ein stabileres Basenpaar als zwischen A und U/T. Während DNA hauptsächlich in der erwähnten Doppelhelix auftritt, ist RNA nur teilweise doppelsträngig und weist eine Vielzahl weiterer möglicher Strukturen auf. Diese Eigenschaft erlaubt es ihr, eine deutlich größere Zahl an Sekundärstrukturen einzunehmen. Insbesondere bilden sich jenseits von helikalen Abschnitten Endschleifen, die entstehen, wenn ein Einzelstrang mit sich selbst



eine Helix bildet, interne Schleifen, die Unterbrechungen in einer Doppelhelix darstellen und entweder symmetrisch (mit derselben Basenzahl in beiden Strängen) oder asymmetrisch sein können. Ein Spezialfall einer asymmetrischen Schleife ist ein *Bulge*, bei dem nur in einem der beiden Stänge ungepaarte Basen auftreten. Ein Zusammentreffen von mehr als 2 Strängen wird Kreuzung genannt. Die einzelsträngigen Sequenzen schließlich formen häufig zusätzliche Sekundärstrukturmotive [17, 18]. Zur Bildung dieser Vielzahl möglicher Strukturen entstehen auch Basenpaarungen, die von denen der Watson-Crick-Basenpaarung abweichen und eine Vielzahl zusätzlicher Verbindungspunkte innerhalb der RNA ermöglichen [19, 20].

Auf Basis dieser Sekundärstruktur schließlich bilden sich, ähnlich wie bei Proteinen, auch in RNA häufig Tertiärstrukturen aus, deren genaue Form mit ihrer Funktion korreliert ist [18, 21, 22]. Oft spielen in die Struktur eingebundene Metallionen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung einer bestimmten Konformation [23]. RNA kann aufgrund ihrer Variabilität eine Vielzahl von Funktionen innerhalb eines Organismus annehmen und tritt in verschiedenen Erscheinungsformen auf [24]:

- **mRNA** (*messenger RNA*) ist Kernbestandteil der Proteinsynthese. Die in der DNA enthaltene Information wird mit Hilfe der RNA-Polymerase auf einen komplementären RNA-Strang übertragen (transkribiert). Hierbei bilden jeweils drei Nukleobasen ein Codon, das einer bestimmten Aminosäure entspricht [25]. Die mRNA assoziiert schließlich temporär mit dem Ribosom (siehe unten), das anhand der in der mRNA enthaltenen Information die Proteinsynthese vornimmt. Vor und hinter der die Proteininformation enthaltenden Region befinden sich zwei nicht kodierende Abschnitte (5'-NTR, 3'-NTR). In Prokaryoten ist die Erstellung von mRNA nach Transkription überwiegend abgeschlossen. In Eukaryoten liefert Transkription jedoch zunächst *prä-mRNA*, die vor der Weiterleitung an das Ribosom noch eine Verarbeitung erfährt. So erhält das 5'-Ende der mRNA eine Kappenstruktur in Form eines modifizierten Guanosins, am 3'-Ende wird eine Polyadenylierung vorgenommen, bei der eine große Zahl Adenine an die mRNA angehängt wird. Des Weiteren wird die prä-mRNA gespleißt, was bedeutet, dass die nicht kodierenden Introns von den die genetische Information enthaltenden Exons getrennt und letztere miteinander verbunden werden. Dieser Prozess erlaubt es in Eukaryoten, verschiedene Proteine auf demselben Gen zu kodieren. [24]
- **tRNA** (*transfer RNA*) ist ebenfalls an der Proteinsynthese beteiligt. Sie wird je nach ihrer Sequenz spezifisch mit einer Aminosäure beladen. Sie tragen ein Anticodon, das zu der spezifisch gebundenen Aminosäure gehört. Dies wird vom Ribosom in der Proteinsynthese verwendet. Passt das Codon der mRNA zu dem Anticodon der tRNA, so kann sich die tRNA anlagern und die gebundene Aminosäure an die im Ribosom erstellte Peptidkette angehängt werden. tRNA enthält einen bemerkenswert hohen Anteil an modifizierten Basen und besteht aus 60 bis 95 Nukleotiden [24].
- **rRNA** (*ribosomal RNA*) kommt im Ribosom von Organismen vor. Das Ribosom ist in der Zelle für die Synthese von Peptiden und Proteinen verantwortlich und ist ein Komplex, der zu etwa zwei Dritteln aus rRNA und zu einem Drittel aus ribosomalen Proteinen besteht. Hierbei sind die Proteine vor allen Dingen für den Zusammenhalt des Komplexes verantwortlich, während die rRNA die eigentliche Reaktion katalysiert. [24]
- **tmRNA** (*transfer-messenger RNA*) vereinigt Eigenschaften von tRNA und mRNA in sich. Sie besitzt sowohl eine Anticodon-Domäne, eine Anbindungsstelle für Aminosäuren und eine kleine Region von Codons. Die Aufgabe von tmRNA, die nur

in Prokaryoten vorkommt, besteht darin, aufgrund beispielsweise eines fehlenden Stop-Codons unvollständig gelesene mRNAs aus dem Ribosom zu entfernen und das unvollständige Protein mit einer spezifischen Peptidkette für den Abbau zu markieren. [26, 27]

- **miRNA** (*micro RNA*) sind kleine Nukleotidstränge, die mit Hilfe von Dicer aus einem zu einer Hairpinstruktur geformten pre-miRNA-Strang geschnitten werden. Sie bestehen aus 21-23 Nukleotiden und sind ein wichtiger Faktor der Genregulation. Die zunächst doppelsträngigen Stücke werden wieder entfaltet, und es entstehen kurze miRNA-Stränge, die sich an Ribonukleoproteine anlagern. Die einzelnen miRNAs erlauben dann die Erkennung spezifischer Sequenzen innerhalb der mRNA und können so, je nach Übereinstimmungsgrad mit der entsprechenden Sequenz, die Translation der mRNA inhibieren oder sogar in Einzelfällen den Abbau der mRNA einleiten. [28]
- **siRNA** (*small interfering RNA*) ähneln in ihrer Funktionsweise den miRNAs. Sie werden mit Hilfe von Dicer aus doppelsträngiger RNA geschnitten und in den RISC (RNA-induced-silencing complex) eingebaut. Dort induzieren sie komplementäre Bindung an mRNA, die durch den RISC-Komplex entwunden und gespalten wird. Dies wird sowohl für den Abbau von Fremd-RNA, als auch für den Abbau nicht mehr benötigter, eigener mRNA verwendet. siRNAs und miRNAs weisen ebenfalls großes Potential bei der künstlichen Kontrolle von Genen auf. [29]
- **Ribozyme** sind katalytisch aktive RNA-Moleküle [30]. Ähnlich wie Enzyme unterstützen sie biologische Reaktionen. Hauptsächlich katalysieren sie Reaktionen an anderen RNAs, sie können jedoch auch andere Funktionen übernehmen. Im Laufe der Jahre entwickelten sich Ribozyme auch zu einer wichtigen Möglichkeit zur Kontrolle und Erstellung synthetischer biologischer Systeme. [24]

Zusätzlich hierzu gibt es noch eine Reihe weiterer, in die Transkription oder die Kontrolle von Genexpression involvierte RNAs, für deren genaue Eigenschaften auf die entsprechende Literatur verwiesen wird [31]. Erwähnenswert ist ebenfalls, dass RNA in Viren auch als Träger genetischer Information auftreten kann [24].

## 1.2 Aufbau der Arbeit

Im folgenden soll ein kurzer Überblick über den Aufbau dieser Arbeit gegeben werden. Generell werden die einzelnen, im Verlauf der Dissertation bearbeiteten Aspekte in einzelne Kapitel aufgeteilt.

Kapitel 2 stellt die theoretischen Grundlagen zum Betrieb von Kurzzeitfluoreszenzapparaturen kurz dar. Dies schließt allgemeine Betrachtungen zur Nichtlinearen Optik ebenso wie eine kurze Darlegung des Prinzips der im weiteren verwendeten Kurzpulslaser ein. Des Weiteren wird, zum besseren Verständnis der in Kapitel 5 dargelegten Vorgänge, auch ein Überblick über die Klassifizierung und Bestimmung chemischer Kinetiken gegeben.

In Kapitel 3 schließt sich die Beschreibung des in dieser Arbeit aufgebauten kombinierten TCSPC- und Fluoreszenzkonvertierungsaufbaus an, wobei die breiten Anwendungsmöglichkeiten des Systems an einer Reihe in dieser Arbeit durchgeführten Studien biologischer und chemischer Systeme dargelegt werden. Des Weiteren wird auch kurz

ein Überblick über die weiteren, im Rahmen der Arbeit verwendeten Messtechniken gegeben.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit Modell-RNA-Strängen, die mit Hilfe des Farbstoffs Pyren untersucht werden, der hierbei sowohl als Elektroneninjektor als auch als Marker für die Hybridisierung von Doppelsträngen gilt. Die optischen Eigenschaften des Chromophors erlauben eine Untersuchung seiner Photophysik, die maßgeblich durch die umgebende RNA bestimmt und beeinflusst wird und somit auch über sie Auskunft geben kann.

Kapitel 5 befasst sich mit der Untersuchung eines künstlich erstellten, regulatorisch aktiven RNA-Aptamers, dessen Ligand Tetrazyklin Fluoreszenz aufweist, die spektroskopische Studien genutzt werden kann. Somit ist es möglich, über die Eigenfluoreszenz des Liganden Informationen über den Bindungsprozess ebenso wie über die Form der Bindetasche zu erhalten.

Somit wendet diese Arbeit die Möglichkeiten zeitaufgelöster optischer Spektroskopie über einen weiten Zeitbereich von Millisekunden bis hin zu Femtosekunden an, um mit Hilfe physikalischer Techniken eine genauere Untersuchung von Konformation, Dynamik und Photophysik von RNA-Molekülen zu erhalten.



## 2 Grundlagen der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie

### 2.1 Einführung

Wie bereits in Kapitel 1 angedeutet konzentriert sich diese Arbeit auf die Beobachtung von RNA-Dynamik über fluoreszierende Moleküle mit Hilfe zeitaufgelöster optischer Spektroskopie. Im Folgenden soll zunächst ein Überblick über die beobachtbaren Prozesse und zugehörigen Methoden gegeben werden, von denen die in dieser Arbeit verwendeten in Kapitel 3 näher beschrieben werden.

Durch die in der zeitaufgelösten optischen Spektroskopie angewendete direkte Beobachtung der optischen Eigenschaften des zu untersuchenden Materials werden dynamische Prozesse wie Lebensdauern, Konversionen, sowie Elektronen- und Energietransfer der direkten Beobachtung zugänglich gemacht und erlauben ein differenziertes Bild der elektronischen Struktur eines Moleküls sowie der involvierten Übergänge.

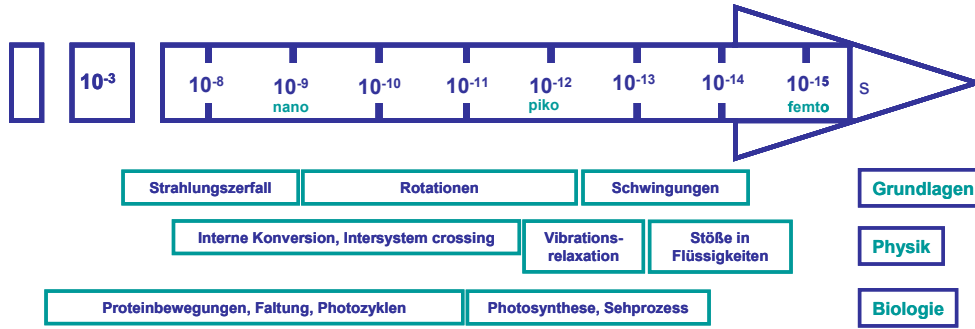
Die Zeitskalen, auf denen sich optisch aktive Prozesse abspielen können, reichen hier von einstelligen Femtosekunden ( $10^{-15}$  s) bis hin zu Sekunden. Abbildung 2.1 zeigt eine Zusammenstellung möglicher Prozesse mit den Zeitskalen, auf denen sie auftreten (basierend auf [32]).

Wie deutlich ersichtlich ist, ist es zur vollständigen dynamischen Charakterisierung eines Systems nötig, einen weiten Zeitbereich beobachten zu können. Um den Datenaufwand in Grenzen zu halten und durch Mittelung das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, ist es zweckmäßig, je nach beobachtetem Zeitbereich auch unterschiedliche Zeitauflösungen zu verwenden. Dies ist nicht mit einer einzigen spektroskopischen Technik erreichbar, sondern verlangt das Zusammenspiel verschiedener Messanordnungen, die unterschiedliche Zeitbereiche abdecken.

Abbildung 2.2 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen Messmethoden und der möglichen Observablen. Grundlegend lassen sich die Techniken in zwei verschiedene Gruppen einteilen. Bis zu einer Zeitauflösung von etwa einer Nanosekunde ist es möglich, elektronische Spektroskopie zu verwenden, deren Zeitauflösung im wesentlichen durch die Anstiegszeit der verwendeten Detektoren gegeben ist.

Um Absorptionen in diesem Bereich zu messen wird meist ein Flash-Photolyse-Aufbau [33, 34] verwendet, während sich zur Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern die Technik des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen (TCSPC, siehe Kapitel 3.4) eignet.

Um höhere Zeitauflösungen zu erreichen, wird auf die Technik der Pump-Probe-Spektroskopie zurückgegriffen, auf die in Abschnitt 2.2 näher eingegangen wird.



**Abbildung 2.1.** Übersicht über die verschiedenen physikalisch und biologisch relevanten Prozesse in Molekülen und die zugehörigen Zeitskalen: Der für spektroskopische Beobachtungen interessante Bereich erstreckt sich über mehr als 14 Größenordnungen, von Sekunden bis hinunter zu einigen 10 Femtosekunden. Der gesamte für biologische Systeme interessante Zeitbereich läßt sich nicht mit Hilfe einer einzigen Technik abdecken, sondern es muss für verschiedene Prozessdauern auf verschiedene Beobachtungsapparaturen zurückgegriffen werden.

### 2.1.1 Theorie der Absorption

Unter Absorption wird in der optischen Spektroskopie der Vorgang verstanden, bei dem eine Aufnahme von Energie aus einem elektromagnetischen Strahlungsfeld durch Materie erfolgt. Sie kann bei Molekülen zur Anregung verschiedener Prozesse führen. Die im allgemeinen niederenergetischste Gruppe von Prozessen ist die Rotation (im fernen Infrarotbereich), gefolgt von den Schwingungen (meist im mittleren Infrarotbereich) des angeregten Moleküls bis hin zur Anregung von Elektronen (im nahen Ultraviolettbereich, im sichtbaren und im nahen Infrarotbereich).

Phänomenologisch ist die Schwächung eines Lichtstrahls durch ein Medium der Dicke des entsprechenden Mediums  $l$  sowie der Konzentration  $c$  des absorbierenden Mediums proportional. Hieraus folgt das Lambert-Beersche Gesetz [35]

$$A = \log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon(\lambda)cl, \quad (2.1)$$

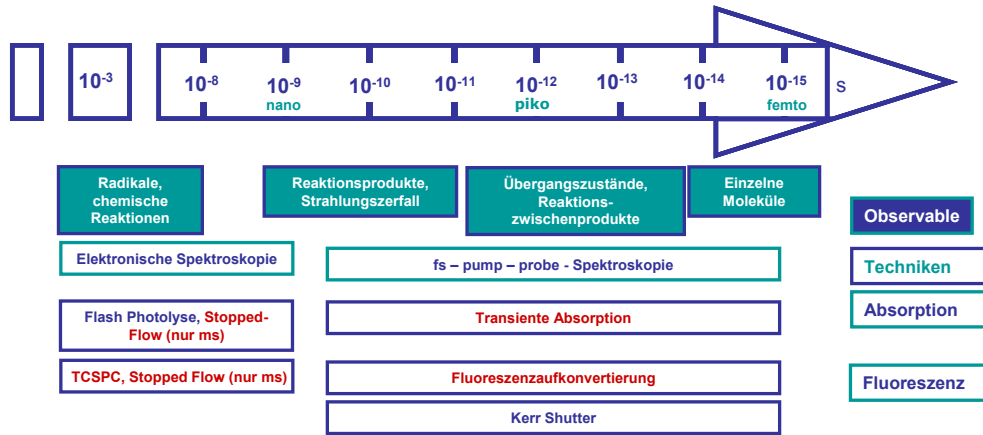
wobei  $\epsilon$  der molare dekadische Absorptionskoeffizient ist, der als Materialkonstante die Eigenschaften des absorbierenden Mediums bei der eingestrahnten Wellenlänge beschreibt.

Zwingend für die Absorption von Licht ist das Erfüllen der sogenannten Resonanzbedingung, die besagt, dass

$$h\nu = E_n - E_m, \quad (2.2)$$

wobei  $E_m$  und  $E_n$  die Energien von Anfangs- und Endzustand darstellen und sich als Eigenzustände aus der Schrödingergleichung des Systems ergeben. Unter Erfüllung dieser Bedingung ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül im Zustand  $n$  zu finden:

$$p = \frac{1}{4\hbar^2} E_0^2 R_{nm}^2 t \quad (2.3)$$



**Abbildung 2.2.** Übersicht über die Techniken linearer zeitaufgelöster, optischer Spektroskopie und die zugehörigen Observablen: Generell erfolgt eine Unterteilung in elektronische Techniken, die eine mehr oder minder direkte Beobachtung des Prozesses ermöglichen. Limitierend sind in diesem Bereich die Eigenschaften des Detektors (siehe auch Kapitel 3.4). Bei gepulsten Techniken ist es möglich, bis in den Subnanosekundenbereich vorzustoßen, die Anstiegszeit von in diesem Bereich verwendeten Photomultipliern verhindert jedoch Messungen unterhalb einiger zehn Pikosekunden. Unterhalb dieses Zeitbereichs wird für gewöhnlich auf Pump-Probe-Spektroskopie zurück gegriffen, deren Zeitauflösung durch optische Weglängen erstellt und durch die Breite der verwendeten Laserpulse limitiert wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Techniken sind in roter Schrift angegeben.

Hierbei ist  $E_0$  die Energie des eingestrahnten Feldes,  $t$  die Einstrahlzeit, und  $R_{nm}$  das Übergangsmoment, das sich aus

$$R_{nm} = \int \Psi_n^*(x) \mu_{mn} \Psi_m(x) dx \tag{2.4}$$

mit  $\Psi_{m,n}(x)$  den Wellenfunktionen des Anfangs- und Endzustandes, sowie dem Übergangoperator  $\mu_m$  ergibt, und das nur von Null verschieden ist, wenn bestimmte Symmetriebedingungen erfüllt sind. Für elektronische Übergänge, mit denen sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, sind im Allgemeinen nur Übergänge erlaubt, bei denen für die Drehimpulsquantenzahl  $S$  gilt, dass  $\Delta S = 0, \pm 1$ , wobei jene mit  $\Delta S = \pm 1$  nur aufgrund der Existenz der Spin-Bahnkopplung auftreten und somit deutlich weniger ausgeprägt sind. Hieraus folgt, dass Übergänge vor allem zwischen Zuständen gleicher Gesamtdrehimpulszahl auftreten. Zusätzlich müssen die Wellenfunktionen von Anfangs- und Endzustand einen nichtverschwindenden Überlapp aufweisen, so dass vor allem Zustände ähnlicher Symmetrien starke erlaubte Übergänge bilden [35].

Das so entstehende Spektrum ist durch die Existenz mehrerer Schwingungs- sowie Rotationszustände bei gleichem elektronischen Zustand entartet, für die wiederum separate Auswahlregeln gelten und durch Wechselwirkungen mit dem Lösemittel deutlich verbreitet. Das Zusammenspiel aus Entartung und Lösemittelleffekten kann je nach Größe und Form des vorliegenden Moleküls sehr ausgeprägt sein, so dass statt diskreter Spektrallinien breite, oft ineinander übergehende Banden von mehreren 10-100 nm Breite entstehen.

### 2.1.2 Theorie der Fluoreszenz

Ein Molekül ist in der Lage, die durch Absorption aufgenommene Energie auf verschiedenste Arten zu dissipieren. Einer der am häufigsten auftretenden Deexcitationspfade ist die Fluoreszenz, bei der ein Großteil der aufgenommenen Energie in Form von Strahlung spontan wieder abgegeben wird. Generell ist Fluoreszenz von Molekülen gegenüber ihrer Absorption rotverschoben, zeigt jedoch in vielen Fällen eine ähnliche Feinstruktur, die gespiegelt auftritt. Der Grund für die Rotverschiebung liegt darin, dass für gewöhnlich ein Teil der aufgenommenen Energie in Form von Vibrationsenergie dissipiert wird, bevor Strahlung auftritt. Dem liegt folgende Überlegung zugrunde, die als Franck-Condon-Prinzip bezeichnet wird [36]:

Da eine Änderung des Elektronenzustandes deutlich schneller erfolgt, als die Änderung des Kernabstandes, befindet sich das Elektron nach senkrechter Anregung (also ohne Änderung des Kernabstandes) am wahrscheinlichsten in dem Zustand, der bei dem vorliegenden Kernabstand den größten Wert für  $\Psi^2$  aufweist. Aus der quantenmechanischen Behandlung des anharmonischen Oszillators folgt, dass die Wahrscheinlichkeitsdichte für unterschiedliche Schwingungszustände entlang einer Reaktionskoordinate sehr unterschiedliche Formen annehmen kann und dass für unterschiedliche elektronische Zustände im allgemeinen unterschiedliche Gleichgewichtsabstände vorherrschen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass eine senkrechte Anregung des Moleküls nur selten im niedrigsten vibronischen Zustand des elektronisch angeregten Zustandes endet. Diese Schwingungsenergie kann nun in Lösung durch Stöße mit umgebenden Molekülen wieder abgegeben werden. Die Lebensdauer angeregter Schwingungszustände ist im allgemeinen kleiner als die elektronisch angeregter Zustände, so dass in einer Mehrzahl der Fälle das Molekül in den niedrigsten Vibrationszustand der angeregten Zustandsfläche zerfällt. Von hier kann das Atom nun unter Abstrahlung von Energie wieder in den Grundzustand übergehen. Bei diesem Prozess gilt wiederum das Franck-Condon-Prinzip, so dass die Feinstruktur der Fluoreszenz im wesentlichen durch die Lage der Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustands bestimmt wird. Hierin liegt der Grund für die oft dem Absorptionsspektrum spiegelbildliche Feinstruktur der Fluoreszenz. Die Lebensdauer eines fluoreszenten Zustandes liegt für die meisten Chromophore im Nanosekundenbereich. Fluoreszenz ist im allgemeinen sehr empfindlich gegenüber der Umgebung des Moleküls, so dass sie sich in einer Vielzahl von Anwendungen als Beobachtungsgröße bewährt hat [36, 37].

Eine weitere Form der Emission ist die Phosphoreszenz, bei der die Photonenabgabe nicht aus einem angeregten Singulett, sondern stattdessen aus einem angeregten Triplettzustand erfolgt. Dem vorausgegangen sein muss ein als *intersystem crossing* bezeichneter Vorgang, bei dem eine Spinumkehr stattfindet und sich somit die Multiplizität des elektronischen Zustandes ändert. Dieser Vorgang ist nur aufgrund von starker Spin-Bahn-Kopplung erlaubt und tritt nicht in allen Molekülen auf. Da zum Übergang in den Grundzustand wiederum eine Spinumkehr erfolgen muss, sind phosphoreszente Zustände im allgemeinen deutlich längerlebig als fluoreszente, die Lebensdauer kann bis zu Stunden betragen.

Zusätzlich zu Absorption und Fluoreszenz können eine Mannigfaltigkeit weiterer Prozesse wie Ladungstransfer, Energietransfer, oder interne Konversion (oft begleitet von konformationeller Änderung des Moleküls) zur Dissipation von Anregungsenergie beitragen und somit konkurrierende Prozesse zur Fluoreszenz darstellen. Die Fluores-



zenzlebensdauer, die also nicht nur Aufschluss über den Prozess der Fluoreszenz an sich, sondern auch über die konkurrierenden Prozesse gibt, ist hieraus folgend ein sehr sensibles Mittel zur Aufklärung der elektronischen und - in limitiertem Rahmen - Schwingungsstruktur eines Moleküls. Im Rahmen dieser Arbeit wird sie über weite Strecken zur Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Chromophoren und RNA, sowie als Marker für Vorgänge innerhalb der RNA herangezogen.

## 2.2 Anregungs-Abtast-Spektroskopie

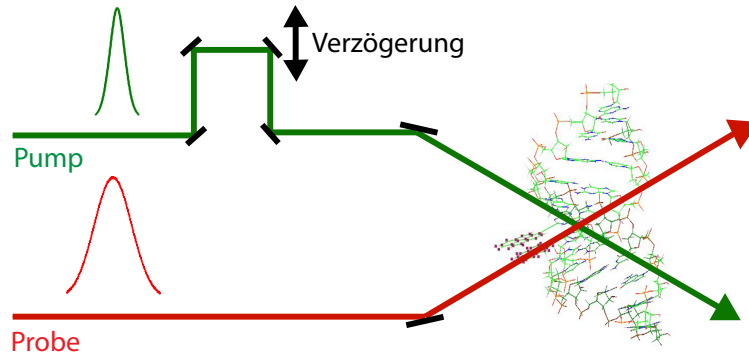
Zur Beobachtung ultraschneller optischer Effekte mit einer Zeitauflösung, die weit unterhalb einer Nanosekunde liegt, reicht die Auflösung kommerziell erhältlicher Detektoren nicht aus. Die Beobachtung solcher schneller Prozesse muss also mit Hilfe einer anderen Technik erreicht werden, die nicht durch die Be- und Entladung von Kondensatoren limitiert ist. Eine weit verbreitete Möglichkeit hierzu liegt in der optischen Anregungs-Abtastungs-Spektroskopie (Pump-Probe-Spektroskopie), die auf der Benutzung unterschiedlicher Lichtwege beruht und durch die Entwicklung von Pulslasern mit Pulsbreiten von deutlich unter einer Pikosekunde möglich gemacht wurde [38].

Ein intensiver, ultrakurzer Laserpuls startet die Reaktion (Anregung), ein zweiter tastet die zu beobachtende optische Eigenschaft (Absorption, Fluoreszenz) nach einer definierten Verzögerung gegenüber der Anregung ab. Diese zeitliche Verzögerung wird mit Hilfe unterschiedlicher Lichtwege für Anregung und Abtastung erreicht (siehe schematische Veranschaulichung in Abbildung 2.3). Wird diese Messung nun für verschiedene Verzögerungszeiten wiederholt, so ergibt sich bei ausreichender Reproduzierbarkeit des zu beobachtenden Vorganges die Dynamik der Probe als Funktion der Zeit. Auf diese Weise ist es möglich, die Evolution eines Systems im Femtosekunden- und Pikosekundenbereich zu beobachten. Die Zeitauflösung eines solchen Messaufbaus ist durch eine Reihe von Faktoren gegeben. Limitierend wirken die zeitliche Pulsbreite der verwendeten Laserpulse, die Genauigkeit der Bestimmung der optischen Verzögerung zwischen Anregung und Abtastung sowie der Grad an Dispersion innerhalb der Laserpulse. Die maximale Beobachtungsdauer ist zum einen durch die Länge der verwendeten Verzögerungsstrecke, zum anderen auch durch den Grad räumlicher Kohärenz des verwendeten Laserpulses bestimmt.

Durch die Verwendung der Techniken ultraschneller Spektroskopie werden bisher nur indirekt messbare Effekte wie Stokes' Shifts, schnelle Ladungstransferreaktionen oder Energietransfers unmittelbar beobachtbar. Die Verwendung der Pump-Probe-Methode erstreckt sich sowohl auf Absorptions- [39] als auch auf Fluoreszenzexperimente. Bei letzteren wird zwischen dem spektral breit arbeitenden Kerr-Shutter [40], sowie der auf einzelnen Wellenlängen arbeitenden Fluoreszenzaufkonvertierung [41, 42] unterschieden. Beide Techniken beobachten unterschiedliche Aspekte molekularer Prozesse auf angeregten Zustandsflächen.

## 2.3 Grundlagen der Nichtlinearen Optik

Um die hohe verlangte Zeitauflösung zu erreichen, wird in der Anregungs- und Abtastspektroskopie sowohl im Detektionsprinzip als auch zur Erzeugung der gewünschten Anregungswellenlänge auf die Prinzipien der Nichtlinearen Optik zurückgegriffen. Um



**Abbildung 2.3.** Schematischer Aufbau eines Pump-Probe-Experimentes: Die Zeitachse wird durch den Unterschied in den optischen Wegstrecken zwischen dem Pump- und Probe-Strahl bestimmt. Die Zeitauflösung eines solchen Aufbaus ist durch die Genauigkeit der Verschiebung der optischen Wegstrecke sowie durch die Breite der verwendeten Pulse limitiert. Molekülabbildung zur Verfügung gestellt von Christian Grünewald.

das Verständnis der in dieser Arbeit aufgebauten und verwendeten Apparaturen zu erleichtern, folgt im nächsten Abschnitt eine kurze Zusammenstellung der hierzu gehörigen Effekte und ihrer Wirkweise.

### 2.3.1 Polarisation des Mediums

Die Ausbreitung von Licht in Materie wird durch die Wechselwirkung des elektromagnetischen Schwingungsfeldes mit den Elektronenhüllen der im Material vorhandenen Atome oder Moleküle bestimmt. Makroskopischer Ausdruck dieser mikroskopischen Größen ist der wellenlängenabhängige Brechungsindex, der sich in den Realteil  $n$  und den Imaginärteil  $\alpha$  aufteilt, der als Absorption bezeichnet wird. Die lineare Optik basiert, ausgehend von einer harmonischen Schwingungsantwort des Materials auf das eingestrahelte Feld, auf drei grundlegenden Prinzipien.

- Weder  $n$  noch  $\alpha$  sind intensitätsabhängig.
- Es werden keine neuen Lichtfrequenzen beim Durchgang durch das Material erzeugt.
- Es gilt das Superpositionsprinzip, das besagt, dass Lichtwellen sich gegenseitig nicht beeinflussen.

Mathematisch findet diese Betrachtungsweise Ausdruck in einem linearen Zusammenhang zwischen Polarisation und elektrischem Feld.

$$P(\omega) = \epsilon_0 \chi E(\omega) \quad (2.5)$$

Die Materialkonstante  $\chi$  wird als Suszeptibilität bezeichnet und hat aufgrund der komplexen Vektorform von  $E$  und  $P$  die Form eines ebenfalls komplexen Tensors, aus dem sich im Falle linearer Optik für die Hauptachsenrichtung  $i$

$$N_i = \sqrt{1 + \chi_{ii}} \quad (2.6)$$

ergibt. Im Falle höherer Intensitäten des eingestrahelten Lichtes müssen obige Relationen um Effekte höherer Ordnung erweitert werden. Die nichtlineare Antwort des Materials

**Tabelle 2.1.** Übersicht über quadratische nichtlineare optische Effekte (entnommen aus Referenz [43] und erweitert)

Quadratische Effekte	$\chi^{(2)}$	Effekt
Frequenzverdopplung	reell	Erzeugung der zweiten Harmonischen
Pockels-Effekt	reell	Anlegen eines statischen elektrischen Feldes an das Material erzeugt eine Brechungsindexänderung.
Linearer Stark-Effekt	imaginär	Verschiebung der atomaren Energieniveaus durch ein äusseres statisches Feld. Daraus folgt eine Änderung der Absorptionseigenschaften des Materials.
Frequenzmischung	reell	Überlagerung zweier Felder mit unterschiedlichen Frequenzen führt zur Erzeugung von Summen- und Differenzfrequenzen.
Faraday-Effekt	komplex	Ein statisches magnetisches Feld verschiebt die atomaren Energieniveaus und führt so zu Doppelbrechung und Dichroismus im Material.
Optische Gleichrichtung	reell	Als Nebenprodukt der Frequenzverdopplung entsteht im Material ein statisches elektrisches Feld.

auf die starke Auslenkung lässt sich über eine Taylorentwicklung der Polarisation beschreiben.

$$P(\omega) = \epsilon_0 \left( \chi^{(1)} E(\omega) + \left( \chi^{(2)} E \right) E + \left( \left( \chi^{(3)} E \right) E \right) E + \dots \right) \quad (2.7)$$

Da  $\chi^{(i)}$  mit steigendem  $i$  deutlich kleinere Werte annimmt, sind selbst bei sehr hohen Feldern meist nur  $\chi^{(2)}$  und  $\chi^{(3)}$  von Bedeutung. Aus Gleichung 2.7 folgt je nach Struktur der Suszeptibilität eine Vielzahl an möglichen Prozessen, wobei prinzipiell die Aussage getroffen werden kann, dass der Imaginärteil von  $\chi$  Verluste oder Verstärkungen kennzeichnet, während der Realteil Phasenverschiebungen oder Frequenzänderungen verursacht. Tabellen 2.1 und 2.2 zeigt eine Zusammenstellung möglicher Prozesse mit kurzen Erklärungen. Auf die im weiteren Verlauf der Arbeit relevanten Prozesse wird im Weiteren näher eingegangen. Im weiteren sollte erwähnt werden, dass für das effiziente Ablaufen eines nichtlinearen optischen Prozesses auch Phasenanpassung und der Ausgleich der Gruppengeschwindigkeitsdispersion erforderlich sind. Hierauf wird in Abschnitt 2.3.3 näher eingegangen.

### Frequenzverdopplung

Frequenzverdopplung ist ein nichtlinearer optischer Effekt zweiter Ordnung und tritt als solcher nur in Kristallen ohne Inversionssymmetrie auf [43]. Sie entsteht bei der

**Tabelle 2.2.** Übersicht über kubische, nichtlineare optische Effekte (entnommen aus Referenz [43] und erweitert)

Kubische Effekte	$\chi^{(3)}$	Effekt
Frequenzverdreifachung	reell	Erzeugung der dritten Harmonischen
Selbstfokussierung	reell	Der Brechungsindex des Materials in Richtung der elektrischen Feldstärke ändert sich mit steigender Intensität. Das hierdurch im Material entstehende Brechungsindexmuster wirkt wie eine Linse.
Selbstphasenmodulation	reell	Eine zeitliche Struktur des Strahlungsfelds führt zu zeitlicher Veränderung des Brechungsindex und somit zu zeitlicher Kompression des Strahlungsfelds.
Sättigbarer Absorber	imaginär	Die Absorption sinkt mit steigender Intensität, da die Besetzungszahl des unteren Energieniveaus sinkt.
Sättigbarer Verstärker	negativ, imaginär	Mit steigender Intensität des Strahlungsfeldes steigt auch die Verstärkung des Materials.
Zweiphotonenabsorption	imaginär positiv	Absorption zweier Photonen, deren Summe genau der Absorptionsbande entspricht.
Quadratischer Stark-Effekt	imaginär	Quadratisch zum Feld proportionale Verschiebung der atomaren Energieniveaus.
Elektrischer Kerr-Effekt	reell	Quadratisch zum Feld proportionale Änderung des Brechungsindex.
Frequenzverdopplung im äußeren Feld	reell	Ein angelegtes elektrisches Feld erzeugt die für Frequenzverdopplung nötige Doppelbrechung.
Cotton-Mouton-Effekt	reell	Quadratische Änderung des Brechungsindex durch ein angelegtes magnetisches Feld.
Raman, Brillouin, Rayleigh	negativ	(Inelastische) induzierte Streuung an Atomen oder Molekülen.

Überlagerung eines Strahlungsfeldes mit sich selbst, wobei die Feldstärke der Welle groß genug sein muss, daß die nichtlineare Suszeptibilität zweiter Ordnung  $\chi^{(2)}$  von Bedeutung wird. Dann gilt für den nichtlinearen Anteil der Polarisation

$$P(\omega) = \epsilon_0 \left( \chi^{(2)} E \right) E. \quad (2.8)$$

Hierbei wird von nichtabsorptiven Materialien und somit einem realen  $\chi^{(2)}$  ausgegangen. Mit  $E = E_0 e^{i(\omega t + kx)} + E_0 e^{-i(\omega t + kx)}$  (c.c.: komplex konjugiert) ergibt sich

$$P(\omega) = 2\epsilon_0 \chi^{(2)} \left( E_0^2 + E_0^2 e^{i(2\omega t + 2kx)} + E_0^2 e^{-i(2\omega t + 2kx)} \right) \quad (2.9)$$

und somit ein elektrisches Feld mit  $f = 2\omega$  sowie ein statischer Term, der unter dem Begriff optische Gleichrichtung bekannt ist. Auf diese Weise ist es also möglich, die zweite Harmonische eines Strahlungsfeldes zu erzeugen.

### Frequenzmischung

Frequenzmischung ist, ebenso wie Frequenzverdopplung, ein nichtlinearer optischer Effekt zweiter Ordnung und unterliegt denselben Beschränkungen. Hierbei werden zwei Strahlungsfelder  $E_1$  und  $E_2$ , von denen mindestens eines hohe Intensität aufweisen muss, in einem Material überlagert. Analog zum vorherigen Abschnitt ergibt sich für den nichtlinearen Anteil der Polarisation, da sich Feldstärken und nicht Intensitäten addieren:

$$P(\omega) = 2\epsilon_0\chi^{(2)}(E_1 + E_2)^2 \quad (2.10)$$

$$\begin{aligned} &= 2\epsilon_0\chi^{(2)}(2(E_1^2 + E_2^2) + E_1^2e^{i(2\omega_1t+2k_1x)} + E_2^2e^{i(2\omega_2t+2k_2x)} \\ &\quad + E_1E_2e^{i((\omega_1+\omega_2)t+(k_1+k_2)x)} + E_1E_2e^{i((\omega_1-\omega_2)t+(k_1-k_2)x)} + c.c.). \end{aligned} \quad (2.11)$$

Neben der Frequenzverdoppelten beider Strahlungsfelder ergeben sich also auch Additions- und Differenzterme beider Frequenzen. Wird Licht der Frequenz  $\omega_1 + \omega_2$  erzeugt, so spricht man von Summenfrequenzmischung, während der Prozess zur Erzeugung von  $\omega_1 - \omega_2$  als Differenzfrequenzmischung bezeichnet wird. Welcher Prozess im Medium präferiert wird, hängt vor allen Dingen von der Phasenanpassung ab. Auf diesen Aspekt wird im Abschnitt 2.3.3 genauer eingegangen.

### Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation

Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation zählen zu den nichtlinearen Effekten dritter Ordnung und basieren auf einer Brechungsindexänderung des Materials aufgrund von hohen Intensitäten. Anders als bei den oben beschriebenen Effekten zweiter Ordnung würde eine exakte mathematische Betrachtung der Verhältnisse aufgrund der Nichtlinearität der Wellengleichungen den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Ausführliche Betrachtungen lassen sich z.B. in Referenz [44] finden. Um einen groben Überblick über die Wirkungsweise beider Effekte zu geben folgt eine Abschätzung der Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation eines Gauß'schen Strahles in einem isotropen Medium.

Für verlustfreie, kubische isotrope Kristalle ist nur der erste Term  $e_{11}$  des Tensors  $\chi^{(3)}$  von Null verschieden [43] und somit verkürzt sich der kubische Teil von 2.7 zu

$$P_{NL}^{(3)} = \epsilon_0 e_{11} E \langle EE \rangle. \quad (2.12)$$

Gemeinsam mit  $P^{(2)} = 0$  für isotrope Medien ergibt sich für die Polarisation einschließlich der dritten Ordnung bei Einstrahlung von linear polarisiertem Licht

$$P = \epsilon_0 E \left( \chi^{(1)} + \frac{3}{4} e_{11} |E^2| \right) = \epsilon_0 \chi_{NL} E. \quad (2.13)$$

Mit Hilfe von  $n = \sqrt{1 + \chi_{NL}}$  folgt schließlich

$$n = \sqrt{1 + \chi + \frac{3}{4} e_{11} |E^2|}. \quad (2.14)$$

Es ergibt sich also im Material abhängig von der Feldstärke ein anderer Brechungsindex. Sind diese Änderungen klein, so vereinfacht sich Gleichung 2.13 zu

$$n_{ges} = n_0 + \frac{3e_{11}}{4n_0}|E^2|. \quad (2.15)$$

Dies hat auf das propagierende Strahlungsfeld sowohl in der räumlichen als auch in der zeitlichen Form Konsequenzen. Zunächst soll die räumliche Modifikation eines gaußförmigen Strahlungsfeldes, auch als Selbstfokussierung bezeichnet, untersucht werden. Bei einer räumlichen Gaußmode hat die Brechzahl des Mediums am Rande des Strahls somit annähernd den Wert von  $n_0$ , während sie im Intensitätsmaximum  $E_0$  den Wert  $n = n_0 + \frac{3e_{11}}{4n_0}|E_0^2|$  annimmt. Hierdurch wird im Medium eine Art Wellenleiter erzeugt, bei dem die intensiveren räumlichen Teile des Strahlungsfeldes durch Totalreflexion am optisch dünneren Medium geführt werden, so lange der Öffnungswinkel kleiner als der Winkel der Totalreflexion ist, der sich durch

$$\cos \theta < \cos \theta_{tot} = \frac{n_a}{n_i} = \frac{n_0}{n_0 + \frac{3e_{11}}{4n_0}|E^2|} \quad (2.16)$$

ergibt. Der Brechzahlssprung ist stetig und folgt ebenfalls einer Gauß-Verteilung und ähnelt den in der Wellenleiteroptik benutzten *multimode graded index fibers* [45]. Dies ändert die Art der Reflexion, die nun in einem Bogen erfolgt, die prinzipiellen Prozesse bleiben jedoch gleich. Mit Hilfe der Reihenentwicklung des Cosinus lässt sich Gleichung 2.15 in

$$\frac{\theta^2}{2} < \frac{3e_{11}}{4n_0}|E^2| \quad (2.17)$$

umformen. Aus dieser Abschätzung wird ersichtlich, dass alle Strahlen, deren Energie die für die Totalreflexion nötige übersteigt, zum Schwerpunkt des Strahles hin gebeugt werden, niederenergetische Strahlen hingegen werden vom Schwerpunkt weg gebeugt. Das Medium funktioniert wie eine Sammellinse. Die Selbstphasenmodulation beschreibt die in ähnlicher Weise wie die Selbstfokussierung vonstatten gehende Modulation der transversalen örtlichen Struktur eines Strahlenfeldes. Wiederum wird als Modell ein gaußförmiger Puls angenommen. Je nach Intensität des momentanen elektrischen Feldes lautet die Phase des elektrischen Feldes nach durchquertem Medium

$$\phi = \omega_0 \left( t - \frac{ln_L}{c_0} \right), \quad (2.18)$$

mit der Vakuumfrequenz  $\omega_0$  und der Mediumslänge  $l$ . Die momentane Frequenz  $\omega_m(E)$  des Lichtes, die durch die momentane Intensität des Strahlungsfeldes beeinflusst wird, ergibt sich aus der zeitlichen Ableitung von  $\phi$ . Unter Annahme gaußförmiger Pulse folgt mit  $I_0$  als maximaler Intensität des Pulses,  $\Delta t$  der zeitlichen Pulsbreite und der Materialkonstanten  $\delta(e_{11}, n)$

$$\omega_m(E) = \omega_0 \left( 1 + I_0 \frac{4l\delta}{c_0} \left( \frac{t - \frac{ln_L}{c_0}}{\Delta t^2} \right) \exp \left[ -2 \left( \frac{t - \frac{ln_L}{c_0}}{\Delta t^2} \right)^2 \right] \right). \quad (2.19)$$

Hieraus folgt die Phänomenologie der Selbstphasenmodulation, die bisweilen auch als transversaler Kerr-Effekt bezeichnet wird. Beim Durchgang durch ein Medium erhöht sich die spektrale Bandbreite eines Pulses der Frequenz  $\omega_0$  um

$$\Delta\omega = \omega_0 \frac{4l\delta}{\sqrt{\epsilon}c_0\Delta t} I_0. \quad (2.20)$$

Die Bandbreitenvergrößerung hängt also quadratisch von der anliegenden Feldstärke ab. Aufgrund der für gewöhnlich niedrigen Werte von  $\delta$  (im Bereich von  $10^{-20} \frac{\text{m}^2}{\text{W}}$ ) sind hohe Feldstärken nötig, um eine signifikante spektrale Verbreiterung des Pulses zu erlangen.

Zusätzlich zu diesem Effekt der Bandbreitenvergrößerung wird dem Puls nach Gleichung 2.19 ein Zeitprofil aufgezwungen, bei dem kürzere Wellenlängen zu früheren Zeiten und längere zu späteren auftreten, dies wird als negativer Chirp bezeichnet.

### 2.3.2 Doppelbrechung

Der in der linearen Optik als Materialkonstante eingeführte Brechungsindex  $n$  [46] ist nur in optisch isotropen Medien unabhängig von der Polarisationsrichtung des einfallenden Lichtes. Dies ist in vielen Kristallen, deren Elementarzellen in sich räumlich wiederholenden Anordnungen vorliegen, nicht der Fall. Ein einfaches mechanisches Modell zur Erklärung dieses Phänomens liegt in der Beschreibung eines Gitters als Ansammlung von miteinander durch Federn verbundener Kugeln, deren angeregte Schwingungen die Polarisationsantwort des Mediums (siehe Abschnitt 2.3.1) auf das einfallende Licht darstellen. Sind diese Federkonstanten nun in unterschiedlichen Gitterrichtungen unterschiedlich stark, so zeigt das Material auf verschiedenen Symmetrieachsen des Kristalles unterschiedliche Brechungsindizes  $n_i$ , die sich mitunter deutlich voneinander unterscheiden können.

Ein Spezialfall dieser allgemeinen optischen Anisotropie ist die Doppelbrechung, bei der eine Symmetrieachse des Kristalles einen anderen Brechungsindex aufweist als die anderen. Man unterscheidet zwischen dem außerordentlichen Brechungsindex  $n_e$ , der in einer Richtung des Kristalles auftritt und dem ordentlichen Brechungsindex  $n_o$ . Die sogenannte optische Achse eines Kristalls ist als die Ausbreitungsrichtung des Lichtes definiert, bei der der Brechungsindex unabhängig von der Polarisation der Strahlung ist [46].

Die Doppelbrechung findet in der Optik in vielen Gebieten Verwendung, sei es zur Manipulation von Lichtpolarisationen (wie im  $\lambda/2$ -Plättchen, dem  $\lambda/4$ -Plättchen oder dem Glan-Thompson-Prisma [46]), zur Filterung von Licht oder der Erzeugung optischer Effekte wie z.B. Doppelbildern. Auch die effiziente Nutzung nichtlinearer Effekte zweiter Ordnung (siehe Abschnitt 2.3.1) wird, wie im folgenden Kapitel dargestellt, durch die Doppelbrechung erst möglich gemacht.

### 2.3.3 Phasenanpassung

Für zwei nichtlinear miteinander interagierende Lichtwellen müssen sowohl Energie- als auch Impulserhaltung erfüllt sein. Aus ersterem ergibt sich die Frequenzbedingung für die resultierende Welle, die Erfüllung der Impulserhaltung verlangt jedoch eine weitere, genauere Betrachtung. Es gilt

$$\mathbf{k}_3 = \mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2. \quad (2.21)$$

wobei  $\mathbf{k}_1$  und  $\mathbf{k}_2$  die Wellenvektoren der einfallenden Wellen und  $\mathbf{k}_3$  den Wellenvektor der resultierenden Welle beschreibt. Kann diese Bedingung nicht vollkommen erfüllt werden, tritt ein Fehlerterm

$$\Delta \mathbf{k} = \mathbf{k}_3 - (\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2) \quad (2.22)$$

auf, der als Phasenfehlanpassung bezeichnet wird, und den es für maximale Konversionseffizienz zu minimieren gilt. Zwar ist auch bei geringer Verletzung von Gleichung 2.21 noch ein Auftreten des nichtlinearen Prozesses möglich, da die Phasenfehlanpassung in Kristallen vom Gitter als Schwingung aufgenommen werden kann, hierdurch sinkt die Konversionseffizienz jedoch signifikant und somit ist  $\Delta k \rightarrow 0$  wünschenswert. Anschaulich lässt sich die Phasenanpassung dadurch erklären, dass über eine möglichst lange Strecke im Kristall konstruktive Interferenz zwischen den an verschiedenen Punkten erzeugten Wellen herrschen sollte. Da der Brechungsindex  $n(\omega_i)$  abhängig von der Wellenlänge des eingestrahlt Lichtes  $\lambda_i$  ist, ist dies nur in optisch anisotropen Materialien möglich. Bei kollinear Einstrahlung folgt aus Gleichung 2.21 als Bedingung

$$\frac{n(\omega_3)}{\lambda_3} = \frac{n(\omega_2)}{\lambda_2} + \frac{n(\omega_1)}{\lambda_1}. \quad (2.23)$$

Über weite Bereiche folgt  $n(\lambda)$  der Sellmeier-Gleichung [46]

$$n^2 = A + \frac{B_1}{\lambda^2 - B_2} - \frac{C_1}{C_2 - \lambda^2}, \quad (2.24)$$

wobei die Konstanten für die wichtigsten nichtlinearen optischen Kristalle bekannt sind und sich zum Beispiel in Referenz [47] finden lassen. Der Abgleich der Brechungsindices kann dadurch erreicht werden, dass  $\mathbf{E}_1$  und  $\mathbf{E}_2$  unter einem definierten Winkel  $\theta$  zur optischen Achse eingestrahlt werden. Für den außerordentlichen Strahl, dessen elektrisches Feld eine Komponente in Richtung des außerordentlichen Brechungsindex aufweist ist  $n_e$  direkt abhängig von  $\theta$ , während  $n_o$  unverändert bleibt. Hierdurch lässt sich in vielen Fällen die Phasenanpassung erreichen. Man unterscheidet

- Phasenanpassung erster Ordnung, bei der zwei ordentliche Strahlen miteinander zu einem außerordentlichen Strahl vermischt werden:

$$\mathbf{k}_{o1} + \mathbf{k}_{o2} = \mathbf{k}_e$$

- Phasenanpassung zweiter Ordnung, bei der ein ordentlicher und ein außerordentlicher Strahl miteinander zu einem außerordentlichen Strahl vermischt werden:

$$\mathbf{k}_o + \mathbf{k}_{e1} = \mathbf{k}_{e2}$$

Die Phasenanpassung zweiter Ordnung zeigt eine höhere Winkelakzeptanz als die Phasenanpassung 1. Ordnung [43], ist also weniger winkelsensitiv als die Phasenanpassung erster Ordnung. Die Konversionseffizienz ist definiert als der Quotient aus der Leistung beider eingestrahlt Felder zu dem resultierenden Feld und ergibt sich unter der Annahme ebener Wellen nach Referenz [48] zu

$$\frac{P_3}{P_1 P_2} = \frac{8\pi d_{eff} L^2}{\epsilon_0 c n_1 n_2 n_3 \lambda_3^2 A} \frac{\sin^2(|\Delta k L|/2)}{|\Delta k L|/2}. \quad (2.25)$$

Hierbei ist  $d_{eff}$  die effektive Nichtlinearität des Kristalls, A der effektive Querschnitt des Lasers und L die Kristalllänge. Eine höhere Kristalllänge führt also zu besserer Konversion, gleichzeitig jedoch wird die Phasenanpassung wellenlängenselektiver und die verstärkte Bandbreite kleiner. Zudem ist gerade bei Femtosekundenpulsen zu bedenken, dass das Durchlaufen eines Mediums stets zu Dispersion führt, deren Größe von der Weglänge innerhalb des Materials abhängig ist. Hierdurch wird ein kurzer Puls verlängert und somit die Zeitauflösung des Systems verschlechtert.



Die Gleichungen 2.23 und 2.25 gelten stets für kollinearen Einfall der beiden Ausgangsstrahlen. Durch nichtkollineare Einstrahlung wird das System um einen Freiheitsgrad erweitert, die Rechnung der Konversionseffizienz wird jedoch ungleich schwieriger, so dass keine allgemeine Aussage getroffen werden kann, sondern die Effizienz von Fall zu Fall neu bestimmt werden muss. Experimentell kann diese Option jedoch durchaus sinnvoll und leichter als eine kollineare Anordnung zu realisieren sein.

### 2.3.4 Gruppengeschwindigkeitsdispersion

Bei Propagation eines nicht monochromatischen, zeitlich variablen Lichtfeldes durch ein Medium kommt es zu einer frequenzabhängigen Phasenverschiebung der spektralen Einzelteile des Lichtfeldes zueinander. Diese lässt sich am besten durch eine Taylorentwicklung der Phase  $\Phi(\omega)$  nach  $\omega$  beschreiben.

$$\Phi(\omega) = \Phi(\omega_0) + \frac{d\Phi}{d\omega}(\omega - \omega_0) + \frac{1}{2} \frac{d^2\Phi}{d\omega^2}(\omega - \omega_0)^2 + \dots \quad (2.26)$$

Dies führt bei Berücksichtigung der Phase in  $E(t) = E_0 e^{i(\omega t + kz + \Phi(\omega))}$  dazu, dass ein Puls nach Transmission durch ein Medium einen positiven Chirp aufweist, bei dem die spektralen Anteile auch zeitlich getrennt werden. Der erste Term von Gleichung 2.26 ist für die lineare Dispersion verantwortlich, der quadratische Term der erst bei Pulsdauern unterhalb von 100 fs von Bedeutung wird, wird Gruppengeschwindigkeitsdispersion genannt. Höhere Ordnungen werden erst bei Pulsbreiten unter 10 fs relevant und sind somit für diese Arbeit ohne Belang. Medien normaler Dispersion verursachen einen positiven Chirp, bei dem die niederenergetische Spektralanteile den höherenergetischen vorausgehen. Medien mit negativer, anomaler Dispersion rufen den umgekehrten Effekt hervor.

Je nach Anwendung wird die Dispersion mit Hilfe von Gitter- oder Prismenkompressoren korrigiert, wie es beispielsweise in Referenz [49] dargelegt wird.

Kurz gefasst wird das Licht zunächst spektral räumlich aufgespalten, um dann verschiedene Lichtwege je nach Wellenlänge zu durchlaufen. Hierdurch wird der Chirp teilweise aufgehoben. Anschließend wird der Puls in einer symmetrischen Anordnung ein weiteres Mal komprimiert. Es entsteht ein zeitlich deutlich kürzerer Puls als zuvor, dessen Pulsdauer bis auf einige 10 fs sinken kann.

## 2.4 Femtosekundenlaser

Grundvoraussetzung für den Aufbau eines ultraschnellen Spektrographen ist die Erzeugung von Pulsen im Femtosekundenbereich. Die Heisenbergsche Unschärferelation [50] ist für das Bandbreitelimit entscheidend. In diesem Kontext hat sich die Verwendung eines Titan-Saphir-Kristalls (Ti:Sa) bewährt, dessen Fluoreszenz breitbandig zwischen 700 nm und 850 nm auftritt. Ein weiterer Vorteil des Ti:Sa Lasers liegt in der Absorption, die zwischen 450 nm und 600 nm liegt und somit gut für Argonlaser, frequenzverdoppelte Nd:YAG, Nd:YVO<sub>4</sub> und Nd:YLF Laser als Pumpquellen zugänglich ist. Ein dritter Vorteil des Ti:Sa liegt darin, dass hier bereits das Lasermedium ein geeignetes Material zur passiven Modenkopplung ist (siehe Kapitel 2.4.1).

Ti:Sa ist ein kristallines Material. Es wird durch die Zugabe von  $\text{Ti}_2\text{O}_3$  in geschmolzenes  $\text{Al}_2\text{O}_3$  hergestellt. Ein kleiner Teil der  $\text{Al}^{3+}$  - Ionen wird durch  $\text{Ti}^{3+}$  - Ionen ersetzt, die für die Lasertätigkeit im Kristall verantwortlich sind. Das das Titan umgebende Gitter ist für die vibronische Aufspaltung verantwortlich, die zu den breiten Absorptions- und Fluoreszenzspektren führt [51].

#### 2.4.1 Modenkopplung

Modenkopplung ist die Grundvoraussetzung für die Erzeugung ultrakurzer Laserpulse. Man versteht darunter die kohärente Überlagerung der einzelnen Resonatormoden innerhalb eines Lasers durch optische Kopplung. Generell wird zwischen aktiver und passiver Modenkopplung unterschieden.

##### Aktive Modenkopplung

Aktive Modenkopplung beruht auf der Modulation der Transmission des im Resonator vorhandenen Dauerstrich (*continuous wave*: cw)-Laserlichts mit einer Frequenz, die der Umlaufzeit in der Kavität entspricht. Es ergibt sich

$$T = T_0 [1 - \delta (1 - \cos \Omega t)], \quad (2.27)$$

wobei  $\delta \ll 0.5$  der Modulationsgrad und  $f = \frac{\Omega}{2\pi} = \frac{c}{2L}$  (mit  $L$  als Resonatorlänge) die Modulationsfrequenz ist. Die modulierte Amplitude des im Resonator propagierenden elektromagnetischen Lichts ergibt sich damit zu

$$A(t) = A_0 \cos \omega_0 t T = A_0 \cos \omega_0 t T_0 [1 - \delta (1 - \cos \Omega t)]. \quad (2.28)$$

Aus den Additionstheoremen für trigonometrische Funktionen folgt schließlich

$$A(t) = A_0 T_0 \left( (1 - \delta) \cos \Omega t + \frac{\delta}{2} [\cos (\omega_0 + \Omega)t + \cos (\omega_0 - \Omega)t] \right). \quad (2.29)$$

Es entstehen also Seitenbänder als Summen- und Differenzfrequenz zwischen der Modulationsfrequenz und der Lasermode. Die Präsenz dieser Seitenbänder erzeugt wiederum weitere Seitenbänder, bis das gesamte Modenspektrum zueinander in Phase schwingt. Dieser Prozess setzt sich fort, solange die erzeugte Frequenz in der Verstärkungsbandbreite des Lasermediums liegt. Für die zeitabhängige Gesamtamplitude ergibt sich dann

$$A(t) = A_0 \sum_n \cos (\omega_0 + n\Omega)t, \quad (2.30)$$

wobei  $n$  über alle  $N$  erlaubten Moden des Oszillators läuft. Für die Intensität  $I = A^2$  ergibt sich schließlich

$$I(t) \propto \frac{\sin^2 \frac{N\Omega t}{2}}{\sin^2 \frac{\Omega t}{2}}. \quad (2.31)$$

Hieraus ist ersichtlich, dass bei zunehmender Zahl gekoppelter Moden die Maximalintensität des Pulses ansteigt, die Breite der Funktion jedoch abnimmt. Es entstehen also im Abstand von

$$T = \frac{c}{2L} \quad (2.32)$$

Pulse innerhalb des Resonators, deren Pulsbreite bis zu 1 ps reichen kann.

## Passive Modenkopplung

Um Pulslängen zu erreichen, die noch kürzer als die durch aktive Modenkopplung erzeugten sind, wird statt aktiver passive Modenkopplung verwendet, die ohne eine externe Steuerung des Systems auskommt. Sie beruht auf dem Zusammenspiel nichtlinearer optischer Effekte, die eine größere Kompression der Pulse erlauben. Aus diesem Grund wird passive meist mit aktiver Modenkopplung kombiniert, da zum Starten der nichtlinearen Prozesse hohe Energien und somit kurze Pulse vonnöten sind.

In heutigen Ti:Sa-Lasern am weitesten verbreitet ist eine Kombination aus Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulation (siehe Abschnitt 2.3). Durch Selbstfokussierung wird der intensivere, zentrale Teil des Laserpulses kollimiert, während die energetisch schwächeren Flanken der räumlichen Gaußmode das Medium divergent verlassen. Durch Platzierung einer Modenblende hinter das selbstfokussierende Material lässt sich so der stärkere vom schwächeren Teil des Pulses trennen.

Gleichzeitig findet aufgrund des zeitlichen Intensitätsprofils des Pulses eine spektrale Verbreiterung des Lichtfeldes in Verbindung mit dem Entstehen eines negativen Chirps statt. Dies erlaubt, der Heisenbergschen Umschärferelation folgend, eine weitere zeitliche Kompression in einem Prismenkompressor (siehe Kapitel 2.3.4). Hierdurch werden Pulsdauern bis knapp unter 100 fs erreicht.

### 2.4.2 Chirped Pulse Amplification

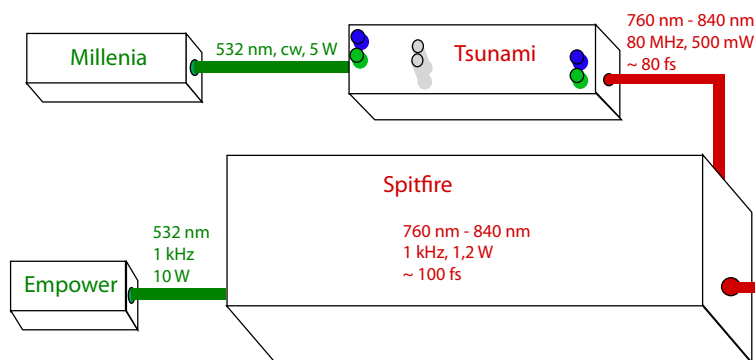
Bei der Erzeugung hochenergetischer ultrakurzer Pulse stellt sich das Problem, dass die Spitzenintensitäten der meist im Femtosekundenbereich liegenden Pulse weit über der Zerstörschwelle vieler Verstärkermedien liegen. Um dennoch Verstärkung erreichen zu können wird die Methode der Chirped Pulse Amplification (CPA) eingesetzt. Hierbei wird dem kurzen Puls künstlich mit Hilfe eines sogenannten Streckers ein Chirp aufgezwungen. Dieses Verfahren verlängert die Gesamtdauer des Pulses und senkt somit signifikant die Spitzenintensität, so dass sie nun unterhalb der Zerstörschwelle des Verstärkermediums liegt. Mit Hilfe eines auf gleiche Weise aufgebauten Kompressors, wie er beispielsweise in Abschnitt 2.3.4 beschrieben ist, kann dann nach der Verstärkung der Puls wieder auf seine ursprüngliche Dauer verkürzt werden.

Das Verfahren findet in den meisten Kurzpulslasern Anwendung, wo ein durch aktive und passive Modenkopplung entstandener kurzer Puls auf höhere Energien verstärkt werden muss.

### 2.4.3 Das Spectra-Physics Tsunami-Spitfire-System

Als Pulsquelle für den in dieser Arbeit aufgebauten kombinierten Fluoreszenz-Lebensdauer-Aufbau wurde das Spectra-Physics Tsunami-Spitfire-System<sup>1</sup> verwendet. Es ist ein klassisches Verstärkersystem, bei dem die kurzen Pulse aus dem Oszillator mit Hilfe eines Ti:Sa-Kristalls unter Zuhilfenahme der CPA weiter verstärkt werden. Eine schematische Darstellung des Lasersystems findet sich in Abbildung 2.4.

<sup>1</sup> <http://www.newport.com>



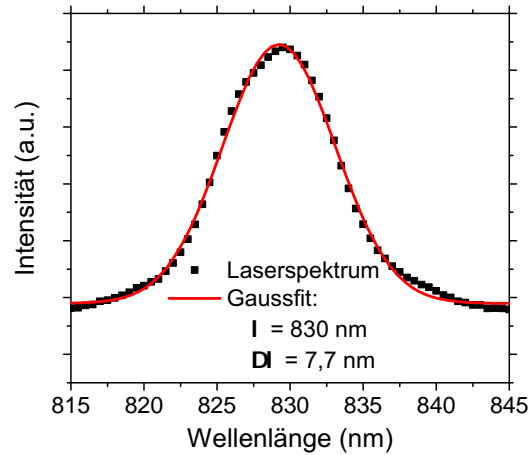
**Abbildung 2.4.** Schematischer Aufbau des verwendeten Lasers: Ein Pumplaser (Millenia) stellt die Energie für ein Titan-Saphir-Oszillatorsystem (Tsunami) bereit, das mit Hilfe aktiven (AOM) und passiven Modelockings Kurzzeitpulse im Femtosekundenbereich erzeugt. Diese werden mit Hilfe eines weiteren Pumplasers (Empower) im Verstärker (Spitfire) bis auf eine Pulsenergie von 1,2 mJ pro Puls gebracht, wobei Pulse von 100 fs Dauer bei 1 kHz erzeugt werden. Die im Bild genannten Ausgangsleistungen für gepulste Laser beziehen sich immer auf die mittlere Ausgangsleistung.

Der Ti:Sa Laseroszillator wird mit Hilfe eines frequenzverdoppelten Nd:YVO<sub>4</sub> Lasers (Millenia: cw, 532 nm) gepumpt. Durch eine Kombination aus aktiver und passiver Modenkopplung bei gleichzeitiger Kompensation der Gruppengeschwindigkeitsdispersion entstehen Pulse im Femtosekundenbereich mit einer Repetitionsfrequenz von 80 MHz und einer Pulsenergie von etwa 7 nJ. Die Besonderheit des hier verwendeten Lasersystems besteht darin, dass in den internen Prismenkompressor ein Spalt eingebaut ist, so dass der Laser innerhalb eines Wellenlängenbereichs zwischen 760 nm und 840 nm durchstimmbare ist.

Die den Oszillator verlassenden Pulse werden im Spitfire Verstärker zunächst nach dem Prinzip der CPA verlängert und spektral aufgespalten, bevor sie mit Hilfe einer Pockelszelle im Verstärker gefangen werden. Hier wird die Energie des umlaufenden Pulses durch einen von einem weiteren Pumplaser (Empower: Q-switch gepulster Nd:YLF, 527 nm, Repetitionsrate 1 kHz, 10 W) mit Energie versorgten Ti:Sa-Kristall auf etwa 1,2 mJ pro Puls erhöht. Eine weitere Pockelszelle regelt die Auskopplung nach maximaler Verstärkung und die Pulse werden in einem Pulskompressor wieder zeitlich komprimiert. Hierdurch lassen sich Pulse im Bereich von 100 fs mit einer Energie von 1,2 mJ bei einer Repetitionsrate von 1 kHz erzeugen. Abbildung 2.5 zeigt ein typisches Laserspektrum bei einer Zentralwellenlänge von 830 nm. Beim spektralen Verstellen innerhalb der Spezifikationen des Laser- und Verstärkersystems ändern sich Form und Breite des Pulses nur unwesentlich.

## 2.5 Reaktionskinetiken

Jenseits der Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern auf kurzen Zeiten war es ebenso Ziel dieser Arbeit, die langsameren Umformungsdynamiken innerhalb von RNA-Strängen durch die Beobachtung der kontinuierlichen Fluoreszenz von Markermolekülen zu beobachten. In Kapitel 5 werden Bindungskinetiken eines Liganden an einen speziel-



**Abbildung 2.5.** Exemplarisches Spektrum des Spitfire Verstärkers bei einer Wellenlänge von 830 nm: Die Halbwertsbreite des Pulses betrug in diesem Fall 7,7 nm, kann jedoch nach Laserjustage und Zentralwellenlänge zwischen 7 nm und 8 nm variieren.

len RNA-Strang untersucht. Die dort benötigten Grundlagen werden im Folgenden kurz zusammengestellt.

### 2.5.1 Reaktionsordnungen

Bei festgehaltener Temperatur ist die Reaktionsgeschwindigkeit  $k$  eine Funktion der Konzentrationen einiger oder aller an der Reaktion beteiligten Komponenten des Systems. Viele Reaktionsgeschwindigkeiten sind nur von der Konzentration der Edukte abhängig. Autokatalytischen Reaktionen jedoch zeigen eine Abhängigkeit von einem der Produkte, während bei katalytischen Reaktionen ein weder zu Produkten noch zu Edukten gehörender Stoff Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt. Zur Bestimmung der Reaktionsordnung, die eine mathematische Behandlung des vorliegenden Prozesses erlaubt, wird die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung herangezogen [52]:

$$k = \frac{d[A]}{dt} = k[A]^{n_A}[B]^{n_B}[C]^{n_C} \dots \quad (2.33)$$

Hierbei sind  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[C]$ ... die Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer, die die Geschwindigkeit der Reaktion bestimmen, und die ganzen positiven Zahlen  $n_i$  die Ordnung der Reaktion mit Hinblick auf die Komponente  $i \in [A], [B][C]$ .... Ähnliche Gleichungen lassen sich für alle an der Reaktion beteiligten Komponenten aufstellen, so dass sich in der Realität ein Gleichungssystem aus Ratengleichungen ergibt. Die Gesamtordnung  $n$  einer Reaktion ist durch die Summe aller  $n_i$  gegeben:

$$n = \sum_i n_i. \quad (2.34)$$

Die Ordnung der Reaktion kann in vielen Fällen mit der Zahl der an der Reaktion beteiligten Partner in Verbindung gebracht werden. Dieses Gesetz gilt jedoch nicht allgemein und kann nur als generelle Richtlinie angesehen werden [52].

### Zeitverhalten von Reaktionen erster Ordnung

Reaktionen erster Ordnung sind nur von der Konzentration eines einzigen Reaktionspartners abhängig. Dieser Fall tritt ausgesprochen selten auf. Häufiger jedoch sind die Reaktionen sogenannter pseudo-erster Ordnung, bei der die zusätzlichen Reaktionspartner in großem Überschuss vorliegen und somit die Konzentration eines einzelnen Stoffes bestimmend für die Geschwindigkeit der vorliegenden Reaktionspartner wird, und die mathematisch wie Reaktionen erster Ordnung bezüglich einer der beiden Komponenten behandelt werden können.

Das allgemeine Zeitgesetz einer Reaktion erster Ordnung läßt sich, folgend Gleichung 2.33, mit

$$\frac{d[A]}{dt} = k[A] \quad (2.35)$$

beschreiben. Die Lösung dieser homogenen linearen Differentialgleichung erster Ordnung ist

$$[A] = [A_0]e^{-kt} \quad (2.36)$$

und für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  ergibt sich

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[A]_0}{[A]}. \quad (2.37)$$

Reaktionen erster Ordnung treten eher selten in chemischen Zusammenhängen auf. Beispiele sind der Zerfall radioaktiver Isotope oder die Zersetzung von Molekülen von mehr als drei Atomen [52].

### Zeitverhalten von Reaktionen zweiter Ordnung

Reaktionen zweiter Ordnung entstehen im allgemeinsten Fall, wenn aus Molekülen vom Typ A und Molekülen vom Typ B ein neues Molekül vom Typ P gebildet wird. In diesem Fall läßt sich für die Entstehung des Produktes folgende Differentialgleichung formulieren:

$$\frac{dP}{dt} = k[A][B]. \quad (2.38)$$

Es ist zweckmäßig, statt der Konzentration die umgesetzte Stoffmenge  $x$  als Variable zu verwenden. Mit  $P = x$ ,  $[A] = [A]_0 - x$  und  $[B] = [B]_0 - x$  ergibt sich

$$\frac{dx}{dt} = k([A]_0 - x)([B]_0 - x). \quad (2.39)$$

mit den Anfangskonzentrationen der Edukte  $[A]_0$  und  $[B]_0$ . Diese Gleichung kann integriert werden, und für das Zeitverhalten der Umsatzkonstante folgt der Zusammenhang [53]

$$x = [A]_0 \frac{1}{1 - \alpha}. \quad (2.40)$$

mit  $\alpha = \frac{[A]_0}{[B]_0}$ . Für die Reaktionsgeschwindigkeit ergibt sich aus der Integration

$$k = \frac{1}{t([A]_0 - [B]_0)} \ln \frac{[B]_0([A]_0 - x)}{[A]_0([B]_0 - x)}. \quad (2.41)$$

Für den Fall, dass einer der beiden Reaktionspartner in deutlichem Überschuss vorliegt, kann dessen Konzentration  $[B]$  über den gesamten Verlauf der Reaktion hin als nahezu konstant angenommen werden. In diesem Falle geht Gleichung 2.41 in Gleichung 2.37 über und man spricht von einer Reaktion von pseudo-erster Ordnung, da in diesem Falle die mathematische Beschreibung über die Zusammenhänge einer Reaktion erster Ordnung erfolgen kann, obwohl die eigentliche Reaktionsordnung eine andere ist.

### 2.5.2 Kinetische Studien von Bindungsreaktionen

Um ein genaueres Bild des hinter einer Reaktion stehenden Prozesses zu erlangen, ist eine gründlichere Untersuchung der Reaktionskonstanten vonnöten. Im Falle eines biologischen Bindungsprozesses eines Substrates an ein biologisch aktives Molekül, wie er in Kapitel 5 diskutiert wird, ist es zweckmäßig, die Zeitabhängigkeit der Reaktion unter verschiedenen Bedingungen zu beobachten. Ein sehr gut zu variierender Parameter ist die Konzentration des Substrates, der weiteren Aufschluss über den der Reaktion zugrunde liegenden Mechanismus geben kann.

Hierzu wird zunächst die experimentell erhaltene zeitliche Änderung eines der Reaktionspartner durch Exponentialfunktionen angepasst und die den momentanen Anfangsbedingungen zugehörigen Reaktionskonstanten  $k_{obs,i}$  bestimmt. Diese werden dann über der Substratkonzentration aufgetragen. Der so erhaltene Zusammenhang gibt Aufschluss über den vorliegenden Prozess [54]. Zum besseren späteren Verständnis von Kapitel 5 sollen nun im Folgenden einige Prozesse näher erläutert werden. Hierbei lassen sich die aus den Reaktionsschemata folgenden Ratengleichungen nur in den seltensten Fällen lösen oder zu einer in der Praxis leicht behandelbaren Gleichung zurück führen. Zusätzliche Annahmen sind nötig, um die Handhabbarkeit zu vereinfachen. Die am weitesten verbreitete, und oft in der Praxis verwendete Näherung ist die der Substratsättigung. Diese beinhaltet, dass die Konzentration des Liganden deutlich höher als die des bindenden Moleküls ist, und somit die Änderung der Substratkonzentration gegenüber allen anderen Prozessen vernachlässigt werden kann [55–58].

#### Einstufiger Prozess

Einstufige Bindungsprozesse zwischen dem biologisch aktiven Molekül M und dem Substrat S der Form



mit der Hinreaktionsrate  $k_1$  und der Rückreaktionsrate  $k_{-1}$  lassen sich durch die Ratengleichung

$$\frac{d[MS]}{dt} = k_1[M][S] - k_{-1}[MS] \quad (2.43)$$

beschreiben. Unter Annahme der Substratsättigung wird  $[S]$  zeitunabhängig und es gilt  $[S] \approx [S]_0$ . Die Zahl der bindenden Moleküle bleibt insgesamt konstant, es ergibt sich also  $[M] = [M]_0 - [MS]$ . Hieraus lässt sich folgern, dass

$$\frac{d[MS]}{dt} = -(k_1[S]_0 + k_{-1})[MS] + k_1[M]_0[S]_0. \quad (2.44)$$

Diese Gleichung lässt sich durch Separation der Variablen [59] lösen, und es ergibt sich mit der Anfangsbedingung  $[MS]_0 = 0$

$$[MS] = \frac{k_1[M]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1}} (e^{-(k_1[S]_0 + k_{-1})t} - 1). \quad (2.45)$$

Die Bildungsrate des Produktes ist der Zusammenhang zwischen der aus den Zeitverläufen erhaltenen Reaktionsrate  $k_{obs}$ , die sich als Geschwindigkeitskonstante im Exponenten von Gleichung 2.45 befindet, und der Substratkonzentration und folgt somit der Gesetzmäßigkeit

$$k_{obs} = k_1[S] + k_{-1}. \quad (2.46)$$

Durch diesen linearen Zusammenhang ist es möglich, durch eine Messung der Bindungskinetik bei verschiedenen Substratkonzentrationen die Reaktionskonstanten des Prozesses direkt zu bestimmen.

### Zweistufiger Prozess

Ein besonders bei Enzymkinetiken häufig auftretender Prozess ist der einer zweistufigen Kinetik, bei der der erste Schritt durch einen schnellen Equilibrierungsprozess zwischen einer gebundenen, sowie einer ungebundenen Form repräsentiert wird [58]. Die Reaktion folgt dem Schema



Analog zum vorherigen Abschnitt lassen sich auch hier Ratengleichungen für die an der Reaktion beteiligten Intermediate aufstellen:

$$\frac{d[M]}{dt} = k_{-1}[MS] - k_1[M][S], \quad (2.48)$$

$$\frac{d[MS]}{dt} = k_1[M][S] + k_{-2}[M^*S] - (k_{-1} + k_2)[MS] \text{ und} \quad (2.49)$$

$$\frac{d[M^*S]}{dt} = k_2[MS] - k_{-2}[M^*S]. \quad (2.50)$$

Unter der Annahme von Substratsättigung ( $[M]_0 \ll [S]_0$ ), eines stationären Übergangszustands ( $\frac{d[MS]}{dt} = 0$ ) sowie einer schnellen Assoziationsreaktion, die von einer langsamen Umordnung gefolgt wird ( $k_1[S]_0 + k_{-1} \gg k_2 + k_{-2}$ ) folgt, dass die Änderung der Konzentration des Produkts durch die Überlagerung von zwei Exponentialfunktionen beschrieben wird [60], aus denen sich zwei verschiedene Reaktionsgeschwindigkeiten  $k_{obs1}$  und  $k_{obs2}$  extrahieren lassen. Diese sind mit den mikroskopischen Reaktionskonstanten über

$$k_{obs1} = k_1[S] + k_{-1} \text{ und} \quad (2.51)$$

$$k_{obs2} = \frac{k_2[S]_0}{[S]_0 + K_D} + k_{-2} \quad (2.52)$$

verknüpft, wobei  $K_D = \frac{k_{-1}}{k_1}$  [61]. Die Gleichung 2.52 basiert auf dem Michaelis-Menten-Mechanismus [62] der oft zur Beschreibung von Enzymkinetiken herangezogen wird. In der klassischen Michaelis-Menten-Gleichung wird jedoch die Rückreaktion des zweiten Reaktionsschritts vernachlässigt. Diese Annahme ist in der Ligandenbindung nicht mehr



ohne weiteres haltbar.

Für viele Bindungsreaktionen befindet sich  $k_{obs1}$  jenseits der Zeitauflösung des Systems, so dass nur  $k_2$  beobachtet werden kann. Für den Fall, dass die Rückreaktion des zweiten Reaktionsschritts  $k_{-2}$  vernachlässigbar klein ist, kann Gleichung 2.52 in die Lineweaver-Burk-Gleichung umgewandelt werden:

$$\frac{1}{k_{obs2}} = \frac{K_D}{k_2} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{k_2} \quad (2.53)$$

die die Bestimmung der Reaktionskonstanten auf eine lineare Regression zurückführt und somit deutlich vereinfacht.



## 3 Zeitaufgelöste Spektroskopie im Sichtbaren

Im folgenden Kapitel werden die verschiedenen Techniken dargestellt, mit deren Hilfe eine Untersuchung der Dynamik von RNA auf verschiedenen Zeitbereichen erfolgen soll. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Messapparaturen implementiert, mit deren Hilfe die Detektion zeitabhängiger Fluoreszenz von Sekunden bis Femtosekunden erfolgen kann und die somit die Anwendbarkeit auf eine große Zahl an Systemen erlauben.

Für den Femtosekundenbereich wurde mit der Technik der Fluoreszenzaufkonvertierung (Kapitel 3.5) gearbeitet, die in einem integrierten Aufbau gemeinsam mit dem zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen (*Time Correlated Single Photon Counting*, TCSPC; Kapitel 3.4) betrieben wird. Letzteres deckt den Bereich von Nano- bis Millisekunden ab. Um langsame Prozesse zu beobachten wurde schließlich auf die Technik des Stopped-Flow (Kapitel 3.1) zurückgegriffen.

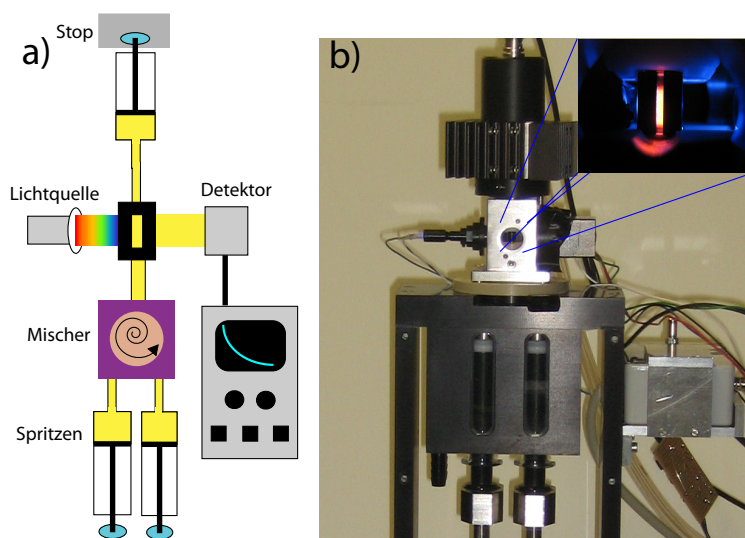
Im Folgenden werden die in dieser Arbeit implementierten drei Messapparaturen im Detail beschrieben und charakterisiert. Zusätzlich erfolgt bei den umfangreicheren Aufbauten des TCSPC und der Aufkonvertierung eine Darstellung der Funktionalität anhand einiger im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Teilprojekte. Mit Hilfe des TCSPC wird die Lebensdauer des fluoreszierenden Substrates Ethidiumbromid beim Transport durch das *small multidrug resistance protein* TbSMR untersucht (Kapitel 3.4.3). Die Fluoreszenzaufkonvertierung wurde zur Aufklärung der Lebensdauern des organischen Pigment Yellow 101 (Kapitel 3.5.3), des sensorischen Proteins Channelrhodopsin II (Kapitel 3.5.4), sowie des Radikalkations des in der Photosynthese wichtigen Astaxanthins (Kapitel 3.5.5) verwendet.

Zusätzlich zu diesen Techniken wird in diesem Kapitel auch eine kurze Einführung in die im Rahmen der Arbeit mehrfach verwendete transiente Absorption im Sichtbaren gegeben (Kapitel 3.3), mit deren Ergebnissen sich die Resultate der Kurzzeitfluoreszenzmessungen ergänzen und überlagern.

### 3.1 Spektroskopie mit Hilfe einer Stopped-Flow-Apparatur

#### 3.1.1 Funktionsprinzip

Die Stopped-Flow-Technik ist eine Abwandlung der Strömungsmethoden zur Beobachtung zeitlicher Reaktionsverläufe [63, 64]. Zur Untersuchung solcher Prozesse ist insbesondere die Bereitstellung definierter Anfangsbedingungen von Bedeutung, da besonders bei schnellen Reaktionen die Mischzeit leicht die Reaktionszeit überschreiten kann. Eine Kontrolle des Mischvorganges ist somit unerlässlich.



**Abbildung 3.1.** (a) Schematischer Aufbau einer Stopped-Flow-Apparatur in Absorptionskonfiguration: Die Edukte werden in Spritzen präpariert, die dann mit Hilfe eines Berger-Ball-Mixers [65] schnell miteinander vermischt werden. Ein mechanischer Stop präpariert einen stationären Zustand, innerhalb dessen sich die Reaktion ungestört entwickelt und mit Hilfe optisch-spektroskopischer Methoden beobachtet werden kann. Der linke Teil der Grafik zeigt eine Schemazeichnung einer Stopped-Flow. Im Abbildungsteil (b) ist ein Foto der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Stopped-Flow-Apparatur der Firma BioLogic mit selbst gebauter Optik zu sehen. Der Einschub zeigt ein Foto der Beobachtungskammer, die zu diesem Zeitpunkt mit Rhodamin 6G [66] gefüllt war, und mit einer Leuchtdiode bei 420 nm angeregt wurde.

Bei einem Strömungsrohr als einfachster Strömungsmethode nimmt die Menge der Edukte entlang des Strömungsweges ab. Ein definierter Ort kann also bei bekannter Strömungsgeschwindigkeit unzweifelhaft einer bestimmten Zeit zugeordnet werden. Durch Beobachtung einer Eigenschaft von Edukten oder Produkten (z.B. Absorption, Fluoreszenz) an verschiedenen Orten entlang des Rohrs kann somit ein Rückschluss auf den Verlauf der Reaktion gezogen werden. Diese Methode bietet jedoch gerade für biologische Proben eine Reihe von Nachteilen, angefangen von dem hohen Eduktverbrauch über die geringe erreichbare Zeitauflösung, bis zu der möglicherweise axialen Durchmischung der Edukte, die zu einem zusätzlichen, nur schwer zu beziffernden Nebeneffekt führen würde [63].

Bei einer Stopped-Flow-Apparatur, wird anders als beim Strömungsrohr, der Fluss der Edukte nach einer definierten Zeit durch ein Stopventil angehalten. Nach diesem Stop läuft am Beobachtungspunkt die Reaktion nahezu ungestört ab. Hier ist der Eduktverbrauch deutlich geringer und die axiale Durchmischung wird durch das Anhalten des Eduktflusses merklich verringert.

Abbildung 3.1 zeigt den schematischen Aufbau einer solchen Apparatur. In zwei Spritzen befinden sich die Edukte, die bei Start der Messung in einen Mischer gegeben werden. Sehr gebäuchlich ist hier der Berger-Ball-Mixer [65], bei dem die Flüssigkeiten über einen Ball geleitet werden. Die so entstehenden turbulenten Strömungen sorgen

für eine sehr gute Durchmischung der Edukte vor der Weiterleitung in die Beobachtungsküvette.

Nach einer definierten Mischzeit, bei der mindestens das gesamte Volumen der Mischapparatur und der Beobachtungsküvette ausgetauscht werden sollte, wird die Strömung der Edukte angehalten. Dies kann mit Hilfe eines einfachen Anschlags einer Spritze an einem Stop oder mit Hilfe eines schließenden Ventils geschehen.

Die Beobachtungsküvette selbst von allen Seiten aus zugänglich und erlaubt die Anwendung optischer Spektroskopie auf die reagierende Lösung. Während sich bei Absorptionsmessungen Lichtquelle, Probe und Detektor in Reihe befinden, wird Fluoreszenz zweckmäßigerweise im rechten Winkel zur Anregung detektiert, um minimale Störung der Messung durch Streuung zu gewährleisten.

Die heutige Detektortechnik erlaubt ohne weiteres das Erreichen von Zeitaufösungen im Mikrosekundenbereich. Limitierend für die Zeitauflösung einer Stopped-Flow-Apparatur ist somit weniger die Detektion an sich, sondern vielmehr die Dauer des Mischprozesses und somit die Strömungsdauer durch Mischer und Küvette. Somit ist es von Interesse, die Wege innerhalb des Mischers möglichst kurz und die Küvette möglichst klein zu halten, wobei letzteres auch zu einer Reduktion des detektierten Signals führt. Ein weiterer Einfluß entsteht durch die Strömungsgeschwindigkeit der Edukte, die möglichst hoch sein sollte und dennoch ein vollständiges Spülen der Küvette garantieren muss.

### 3.1.2 Experimentelle Details des Messaufbaus

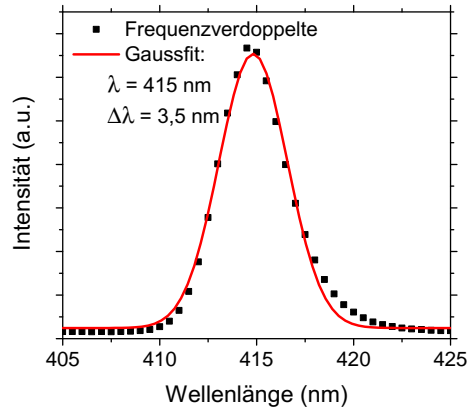
In dieser Arbeit wurde eine Biologic SFM 20<sup>1</sup> zusammen mit einem selbst gebauten Anregungs- und Detektionssystem (Detektor Hamamatsu PMT H9656-20<sup>2</sup>) verwendet. Die Stopped-Flow stellt zwei Eduktspritzen bereit, die unabhängig voneinander durch Schrittmotoren angesteuert werden können um das Mischverhältnis der Edukte variabel zu halten. Die Mischung wird mit einem Berger-Ball-Mixer erreicht. Zwei verschiedene Küvetten mit unterschiedlichem Volumen werden je nach Experiment verwendet. Die FC-08-Küvette mit einem Totvolumen von 15,6 µl verursacht Totzeiten von mindestens 1,6 ms. Durch das geringe Volumen ist jedoch die Signalausbeute auch deutlich geringer als bei der FC-20-Küvette, deren minimale Totzeit mit 6,6 ms etwas höher liegt [67]. Bei Nutzung der FC-08 liegt das minimal verwendbare Probenvolumen bei 66 µl. Dieses niedrige Volumen ist insbesondere bei Biomolekülen, die im allgemeinen nur in geringer Menge vorliegen, wünschenswert. Die Anregung der Probe erfolgt mit Hilfe aus verschiedenen Wellenlängenbereichen selektierter LEDs, die im Allgemeinen eine Bandbreite von etwa 10 nm aufweisen.

## 3.2 Generierung von Anregungswellenlängen im sichtbaren und im UV-Bereich

Um die kombinierte TCSPC-Aufkonvertierungs-Apparatur in ihrer Anwendung möglichst variabel zu halten, war es notwendig, Fluoreszenzanregung über einen weiten Spektralbereich zu ermöglichen. Hierbei wurde auf drei verschiedene nichtlineare Prozesse zurückgegriffen, die vom Sichtbaren bis ins UV hin eine nahezu lückenlose Einstellung der Anregungswellenlänge zur Verfügung stellen. Diese werden im folgenden nur kurz vorgestellt.

<sup>1</sup> BioLogic, 1 rue de l'Europe, Claix 38640, Frankreich, <http://www.bio-logic.info/>

<sup>2</sup> Hamamatsu Photonics, Arzbergerstr. 10, 82211 Herrsching am Ammersee, Deutschland, <http://www.hamamatsu.com>



**Abbildung 3.2.** Spektrum eines durch Frequenzverdopplung erzeugten Pulses bei 415 nm: Die Pulsbreite von 3,5 nm ist deutlich schmäler als die der Laserfundamentalen (siehe Abbildung 2.5). Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass hochenergetische Pulsteile eine deutlich bessere Konversionseffizienz aufweisen als niederenergetische und der Puls somit spektral komprimiert wird.

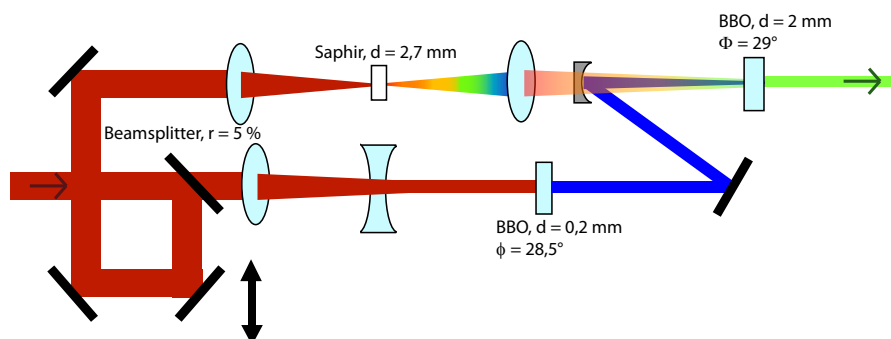
### 3.2.1 Frequenzverdopplung

Die sowohl für die Messung pyrenmodifizierter RNA (Kapitel 4) als auch für das tetrazyklin-bindende Aptamer (Kapitel 5) verwendete Anregung ist die der Frequenzverdopplung (*Second Harmonic Generation: SHG*), die auf dem gleichnamigen nicht-linearen optischen Prozess erster Ordnung beruht (siehe Kapitel 2.3). Hierbei wird die Laserfundamentale in einen  $\beta$ -Barium-Borat-Kristall (BBO) mit Anschnittwinkel  $28,5^\circ$  zur optischen Achse geführt. Dieser Winkel liegt nahe dem optimalen Phasenanpassungswinkel (siehe Kapitel 2.3.3), der nach Berechnung mit Hilfe des Programms SNLO<sup>3</sup> für die möglichen Laserwellenlängen zwischen  $27,9^\circ$  und  $30,8^\circ$  liegt [68]. Hierbei entsteht Licht doppelter Frequenz. Somit lässt sich hiermit aufgrund der Durchstimbarkeit des verwendeten Lasers Anregungslicht in der Region zwischen 380 nm und 420 nm erzeugen. Abbildung 3.2 zeigt das Spektrum der Frequenzverdoppelten bei einer Laserwellenlänge von 830 nm.

### 3.2.2 NOPA - Noncollinear Optical Parametrical Amplifier

Ein Noncollinear Optical Parametrical Amplifier (NOPA) ist ein Spezialfall der optisch-parametrischen Verstärker, deren Funktion darin besteht, aus einem kurzen, nahinfraroten Laserpuls Anregungspulse variabler Wellenlänge zu erzeugen. Grundlage ist zum einen ein umgekehrter Summenfrequenzprozess (siehe Kapitel 2.3.1), zum zweiten ein Seedprozess, der aus einer bisher unspezifischen Konversion die gewünschte Wellenlänge selektiert [49, 69, 70]. Aus dem Fermatschen Prinzip [43] folgt, dass der Lichtweg für einen beliebigen optischen Prozess umkehrbar sein muss. Somit ist es auch möglich, daß in einer Umkehrung des Summenfrequenzprozesses aus einem Photon der Energie

<sup>3</sup> AS-Photonics, LLC 8500 Menaul Blvd. NE Suite, B-335 Albuquerque, New Mexico 87112, USA, <http://www.as-photonics.com/SNLO>



**Abbildung 3.3.** Schematischer Aufbau eines NOPA: Durch einen Strahlteiler wird ein kleiner Teil des einfallenden Lichtes abgetrennt, mit Hilfe dessen in einem Saphirkristall von 2 mm Durchmesser gechirptes Weißlicht erzeugt wird. Der Hauptteil des einfallenden Lichtes wird zur Erzeugung der Frequenzverdoppelten in einem BBO-Kristall mit  $\theta = 28,5^\circ$  und  $d = 0,2\text{ mm}$  verwendet. In einem BBO-Kristall mit  $\theta = 29^\circ$  und  $d = 2\text{ mm}$  wird aus dem frequenzverdoppelten Strahl Superfluoreszenz erzeugt, die mit Hilfe des zeitlichen Überlapps mit dem gechirpten Weißlicht auf der gewünschten Wellenlänge betrieben wird.

$h\nu_1$  zwei Photonen der Energie  $h\nu_2$  und  $h\nu_3$  mit  $\nu_1 = \nu_2 + \nu_3$  erzeugt werden. Dieser Prozess wird als Superfluoreszenz bezeichnet und läuft für alle Wellenlängen, für die die Phasenanpassungsbedingungen (Siehe Kapitel 2.3.3) erfüllt sind, parallel ab. Unter Überlagerung des Strahls mit einem Seedstrahl definierter Wellenlänge ist es jedoch möglich, die Superfluoreszenz präferiert auf einer bestimmten Wellenlänge ablaufen zu lassen.

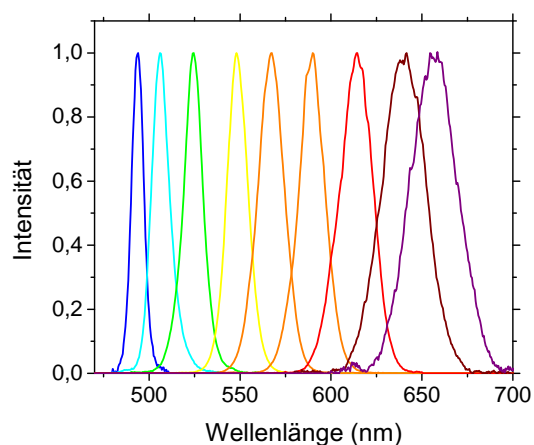
Die Besonderheit eines NOPA liegt darin, dass durch nichtkollinearen Einfall von Pump- und Seedstrahl Phasenanpassung für alle erzeugbaren Wellenlängen bei demselben Anpassungswinkel erfüllt ist. Dies erlaubt eine besonders einfache Durchstimmbarkeit. Abbildung 3.3 zeigt den schematischen Aufbau eines NOPA. Durch einen Strahlteiler wird das einfallende Licht auf zwei verschiedene Strahlen aufgeteilt. Der Hauptanteil (c.a. 95 %) wird zur Generierung der Superfluoreszenz verwendet. Zunächst wird der Durchmesser des Strahls über ein Teleskopsystem verkleinert und dann mit Hilfe eines BBO-Kristalls ( $\theta = 28,5^\circ$ ,  $d = 0,2\text{ mm}$ ) frequenzverdoppelt.

Der frequenzverdoppelte Strahl wird dann schräg in den NOPA-Kristall (BBO,  $\theta = 29^\circ$ ,  $d = 2\text{ mm}$ ) geführt, wo Superfluoreszenz erzeugt wird.

Die verbliebenen 5 % des einfallenden Lichtes werden über eine verstellbare Verzögerungsstrecke geleitet und nach dem Durchgang durch eine Blende in einen Saphirkristall ( $d = 2\text{ mm}$ ) fokussiert. Durch ein Zusammenwirken von Selbstphasenmodulation, Selbstfokussierung und Vierwellenmischen (siehe Kapitel 2.3) bildet sich bei passenden Intensitäts- und Modenvoraussetzungen sogenanntes Monofilamentweißlicht aus [71–73]. Es zeichnet sich durch ein mehrere 100 nm breites spektrales Profil aus und besitzt eine Pulsdauer im Picosekundenbereich. Zudem weist das Weißlicht einen positiven Chirp auf.

Dieses Weißlicht wird nun im BBO Kristall mit dem frequenzverdoppelten Strahl räumlich und zeitlich überlagert. Da das Weißlicht eine wesentlich längere Pulsdauer als der frequenzverdoppelte Strahl besitzt, kann immer nur ein Teil des Weißlichtes mit dem Pumpimpuls interagieren. Aufgrund des positiven Chirps ist dieser Teil auch spektral deutlich schmaler.

Durch die Überlagerung des Pumpimpulses mit einem Seed wird Superfluoreszenzgenerie-



**Abbildung 3.4.** Aufstellung exemplarischer NOPA-Pulse: In Richtung des roten Ende des Spektrums werden die Pulsbreiten im Vergleich zur optimalen Operation im grünen Bereich deutlich größer. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Intensitäten aller Pulse auf 1 normiert. Es lassen sich im bei der verwendeten Konfiguration im grünen Spektralbereich die besten NOPA-Intensitäten erreichen.

zung auf der Seedwellenlänge deutlich präferiert. Durch Verlängerung oder Verkürzung der Wegstrecke des Weißlichtes ist es nun möglich, verschiedene Anteile des Seedpulses mit dem Pumpuls zu überlagern. Je nach spektraler Charakteristik der zeitlichen Überlagerung kann so über die gesamte Bandbreite des Weißlichts hochintensives Anregungslicht erzeugt werden. Abbildung 3.4 zeigt die spektralen Charakteristika einer Reihe von Anregungspulsen, die im Rahmen dieser Arbeit in unserem Labor erzeugt wurden, die Pulsbreite und Anregungsenergie können je nach Justage in einem gewissen Bereich variiert werden. Nach der Erzeugung wird der immer noch mit einem Chirp behaftete NOPA-Puls durch einen Prismenkompressor (siehe Kapitel 2.3.4) zeitlich zusammengeschoben. Da es in der Fluoreszenzspektroskopie von großer Bedeutung ist, Anregung und Detektionssignal spektral voneinander zu trennen, werden Überreste von Superfluoreszenz und Weißlicht im NOPA-Signal im Kompressor selbst durch eine Modenblende abgeblockt, um eine größere spektrale Reinheit des Pulses zu garantieren.

### 3.2.3 SFG - Sum Frequency Generation

Um Anregungsenergien im ultravioletten Spektralbereich zu erreichen, muss die aus dem NOPA erhaltene Wellenlänge noch weiter konvertiert werden. Dies ist mit Hilfe der Summenfrequenzgenerierung möglich, die später auch bei der Fluoreszenzaufkonvertierung Verwendung findet (siehe Kapitel 2.3.1). Das NOPA-Licht wird mit der Laserfundamentalen in einem BBO-Kristall ( $\theta = 51^\circ$ ,  $d = 0,1 \text{ mm}$ ) überlagert, es entsteht Licht der Summenfrequenz. In anbetracht der möglichen Bandbreite des NOPA-Lichts ergibt dies mögliche Anregungswellenlängen von etwa 300 nm bis 360 nm.



### 3.3 Transiente Absorption im sichtbaren Spektralbereich

Zusätzlich zu den oben und im nächsten Abschnitt beschriebenen, im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten, zeitaufgelösten Fluoreszenztechniken wurden als Grundlage und Ergänzung zu den Emissionsmessungen auch zeitaufgelöste Absorptionsmessungen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine klassische Pump-Probe-Technik, bei der die Probe zunächst angeregt, und die Absorption des angeregten Zustandes dann zu verschiedenen Verzögerungszeiten abgetastet wird [32, 74].

In diesem Fall diente ein bei 775 nm operierendes Clark CPA 2001 Femtosekundenlaser-System<sup>4</sup> als Pulsquelle. Die Anregung erfolgte wie bei der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie mit Hilfe nichtlinearer Techniken. Zur Abtastung wurde ein Teil der Fundamentalen in eine Saphir- oder CaF<sub>2</sub>-Scheibe fokussiert, um Weißlicht zu erzeugen (siehe Kapitel 3.2.2). Hierbei bietet in einem Saphir generiertes Weißlicht die Möglichkeit, ab etwa 400 nm messen zu können, während mit CaF<sub>2</sub> bereits Weißlicht um 350 nm vorhanden ist.

Detektion von Proben- und Referenzsignal erfolgte mit zwei baugleichen Spektrographen (Hamamatsu S4114-46Q, 42 Kanäle<sup>5</sup>), die eine Wellenlängenauflösung von 8 nm bieten. Mit einem Chopper wurde jeder zweite Anregungspuls abgedeckt, um das Differenzsignal zwischen angeregter und unangeregter Probe zu bestimmen. Genauere Beschreibungen des Aufbaus sind nicht Gegenstand dieser Arbeit und finden sich zum Beispiel in den Doktorarbeiten von Sergiu Amarie [75] oder Martin Lenz [76]. Abbildung 3.5 zeigt eine Zusammenstellung möglicher, im transienten Absorptionssignal auftauchenden Signale, die hier zum späteren, leichteren Verständnis der Spektren kurz erklärt werden sollen. Im Abbildungsteil a) ist das sogenannte Grundzustandsbleichen (*Ground state bleach*: GSB) dargestellt, das dadurch entsteht, daß sich durch die Anregung deutlich weniger Moleküle im Grundzustand befinden, als in der unangeregten Probe. Somit ist das Absorptionssignal in dieser Bande geringer und taucht als negatives Signal im Spektrum auf. Das Signal verschwindet im Zeitverlauf mit der Geschwindigkeit, mit der der Grundzustand durch die natürliche Dynamik des Systems wieder aufgepopuliert wird. Geht ein Teil der Population durch Zerfall Photoprodukte verloren, so erholt sich das Differenzsignal nicht vollständig.

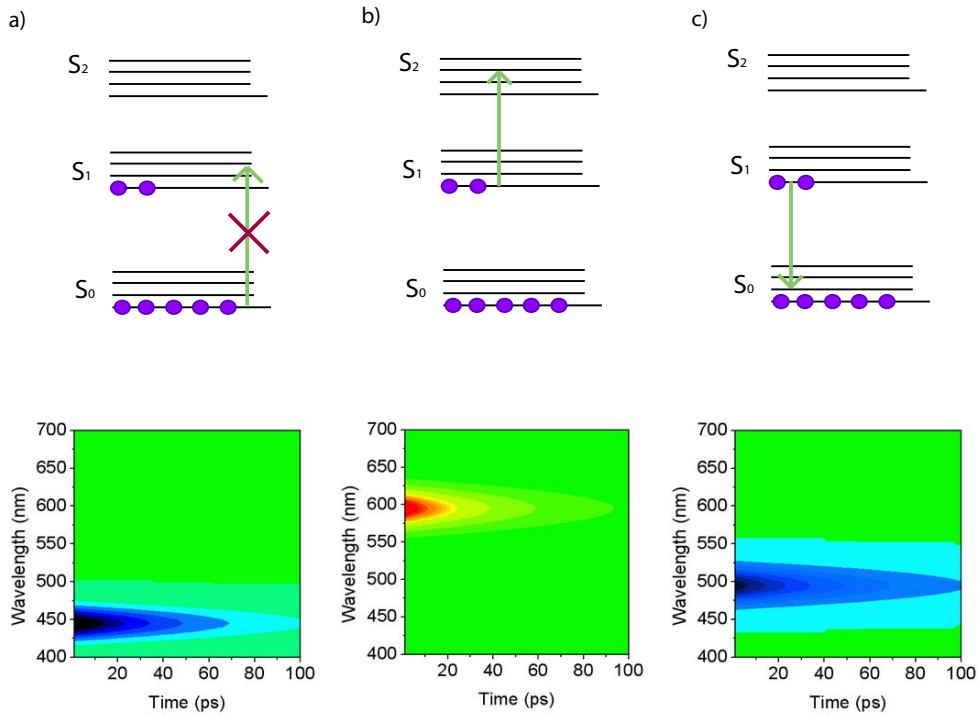
Gleichzeitig ist, wie in Abbildungsteil b) dargestellt in der angeregten Probe im Gegensatz zur unangeregten nun ein Übergang aus dem  $S_1$  in höher angeregte Zustände möglich. Die so entstehende positive Bande wird als Absorption des angeregten Zustandes (*Excited State Absorption*: ESA) bezeichnet. Sie ist oft durch eine dynamische Verschiebung überlagert, die durch den vibratorischen Zerfall auf der ersten angeregten Zustandsfläche verursacht wird. Das Signal zerfällt mit der Lebensdauer des ersten angeregten Zustandes und die Dynamik des Zerfalls gibt Hinweise auf die Zahl der möglichen Zerfallswege und -produkte.

Ein drittes häufig auftretendes Signal ist die in Abbildungsteil c) dargestellte stimulierte Emission (SE), das auf der Fluoreszenzwellenlänge auftritt, wie im rechten Teil von Abbildung 3.5 dargelegt. Ihre Dynamik entspricht der der Fluoreszenz.

Zusätzlich zu diesen besonders häufig auftretenden Signalen werden oft dynamische Shifts (Verschiebung einer ESA-Bande), die Entstehung von Photoprodukten (keine vollständige Erholung des GSB, Auftreten einer zusätzlichen, mit der Absorption des

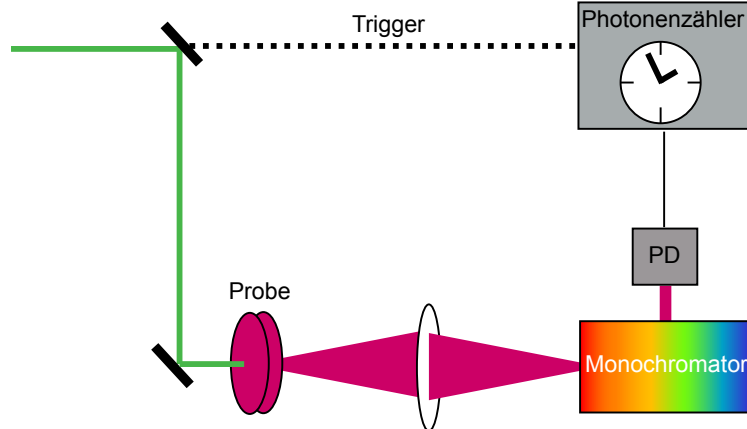
<sup>4</sup> Clark-MXR, Inc., 7300 W. Huron River Dr., Dexter, 48130 Missouri, USA, <http://www.cmxr.com/>

<sup>5</sup> Hamamatsu Photonics, Arzbergerstr. 10, 82211 Herrsching am Ammersee, Deutschland, <http://www.hamamatsu.com>



**Abbildung 3.5.** Erläuterung möglicher in der transienten Absorption auftauchender Signale anhand simulierter transienter Absorptionsspektren für die einzelnen auftretenden Effekte (Die Spektren sind farbcodiert, wobei rot positive Absorptionsänderung gegenüber der unangeregten Probe und blau negative Absorptionsänderung darstellen): a) Die Anregung führt zu einer deutlichen Schwächung des Grundzustandsübergangs im Vergleich zur unangeregten Probe, da sich ein signifikanter Teil der Probe in diesem Falle nicht mehr im Grundzustand befindet. Dies führt zu einem negativen Differenzsignal in der Absorptionsmessung. b) Durch die Anregung des Moleküls befindet sich eine signifikante Population im ersten angeregten Zustand. Von dort aus sind nun Übergänge in höher angeregte Zustände möglich. Dies taucht in den Spektren als positives Differenzsignal auf, da in diesem Spektralbereich die Absorption im Vergleich zu der unangeregten Probe erhöht ist. c) Die Anregung in den ersten angeregten Zustand ermöglicht das Auftreten stimulierter Emission in den Grundzustand. Da bei stimulierter Emission im Vergleich zu der unangeregten Probe mehr Photonen auf den Detektor auftreffen, wird dieser Effekt ebenfalls als negatives Differenzsignal interpretiert. Zusätzlich treten noch andere Beiträge wie z.B. dynamische Bandverschiebungen, die Entstehung neuer Spezies oder die Population durch Absorption nicht zugänglicher Zustände auf und die einzelnen Spektralbereiche überlappen sich zum Teil signifikant.

Photoprodukts assoziierten Differenzbande) oder die transiente Population von Intermediaten (als zunächst positives Differenzsignal, das bei späteren Zeiten wieder zerfällt) beobachtet. In komplexen Systemen überlagern sich die einzelnen transienten Absorptionsbanden oft, so dass eine sehr sorgfältige mathematische Auswertung der Daten mit Hilfe einer globalen Fitroutine wie in Kapitel B.2 beschrieben und eine Zuordnung der zu den Zerfallskonstanten gehörigen erhaltenen Amplitudenspektren (*decay associated spectra*: DAS) unerlässlich ist.



**Abbildung 3.6.** Schematischer Aufbau eines TCSPC-Experiments: Gleichzeitig mit der Anregung der fluoreszierenden Probe wird ein Startsignal an eine Zählelektronik gesendet. Die Fluoreszenz der Probe wird durch einen Monochromator vom Anregungslicht separiert und dann in Form von Einzelereignissen als Stoppsignal an die Zählelektronik weiter gegeben. Vielfache Wiederholung dieser Messung ergibt ein Histogramm, aus dessen Verlauf die Lebensdauer der Fluoreszenz der Probe extrahiert werden kann.

## 3.4 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

### 3.4.1 Funktionsprinzip

Die Technik des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählen (*Time Correlated Single Photon Counting*: TCSPC) ermöglicht die Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern im Nanosekundenbereich [77–80]. Sie fußt auf der Bestimmung der Zeitdifferenz zwischen der Anregung einer Probe und der Emission eines Fluoreszenzphotons mit Hilfe eines elektronischen Zählers. Abbildung 3.6 zeigt ein typisches Schema eines TCSPC-Experiments. Die Probe wird durch einen Laserpuls in den angeregten Zustand versetzt. Zugleich wird das Signal des Laserpulses über eine Photodiode registriert und als Startsignal an eine Zählelektronik weiter gegeben. Die entstehende Fluoreszenz wird über einen Monochromator spektral von der Anregung getrennt und dann mit Hilfe eines Einzelphotonen-Photomultipliers detektiert. Das Einzelphotonenereignis gibt dann der Elektronik das Stoppsignal, die Zeitdifferenz zwischen Start und Stop wird registriert. Das mehrfache Wiederholen dieser Messung lässt schließlich ein Histogramm entstehen, das der Fluoreszenzabklingkurve der untersuchten Probe entspricht.

Da es sich bei TCSPC um eine Einzelphotonentechnik handelt, ist es von hoher Wichtigkeit, das Fluoreszenzsignal nicht zu hoch werden zu lassen. Der Detektor unterscheidet nicht zwischen einem und zwei registrierten Photonen und benötigt eine gewisse Erholungszeit, bevor er ein weiteres Mal in der Lage ist, ein Photon zu registrieren. Die Wahrscheinlichkeit, ein Fluoreszenzphoton pro Anregung zu registrieren sollte also sehr gering (1%) sein. Unterhalb dieses Schwellenwertes ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein zweites Photon im gleichen Zeitfenster registriert wird und somit verloren geht, unter 0,01% und somit im allgemeinen vernachlässigbar. Deswegen wird in der Praxis oft ein reversierter TCSPC-Aufbau verwendet, bei dem das ankommende Fluoreszenzphoton als Startsignal und der nächste Laserpuls als Stoppsignal registriert wird [81].

Limitierend für die Zeitauflösung eines TCSPC-Aufbaus ist die zeitliche Breite des Laserpulses - was in Zeiten von Femtosekundenlasern jedoch nicht mehr die eigentliche

Beschränkung darstellt - und die Geschwindigkeit der verwendeten Elektronik. Insbesondere gilt es zu beachten, dass die Anstiegszeit eines Detektors immer endlich ist und somit der Zeitpunkt des eintreffenden Ereignisses um das Rauschen dieses Anstieges verschmiert ist. Zeitaufösungen im zweistelligen Picosekundenbereich sind möglich, stellen jedoch hohe Anforderungen an die Elektronik und die Stabilität der Meßbedingungen [82]. Zusätzlich muss bei der Auswertung beachtet werden, daß eine Entfaltung der Instrumentenantwort (*Instrument Response Function*: IRF) von der eigentlichen Kinetik erfolgen muss (Abschnitt B im Anhang dieser Arbeit geht näher auf diese Thematik ein.).

### 3.4.2 Charakterisierung des Messaufbaus

Die in dieser Arbeit aufgebaute TCSPC-Anlage wurde in einer Kombination zusammen mit der Technik der Fluoreszenzaufkonvertierung betrieben. Somit ist es notwendig, dass sämtliche Hardware den Anforderungen für beide Methoden genügen muss. Die Anregung erfolgte mit Hilfe des frequenzkonvertierten Spectra-Physics Tsunami-Spitfire Systems (siehe Kapitel 2.4.3 und 3.2) das bei Wellenlängen zwischen 760 nm und 840 nm betrieben werden kann. Die Pulsbreite beträgt zwischen 100 fs und 120 fs bei einer Gesamtleistung von 1,2 W und einer Repetitionsrate von 1 kHz. Dies ist eine für TCSPC eher niedrige Repetitionsrate - meist wird eher eine Lichtquelle mit Repetitionsraten im Mhz-Bereich verwendet [81] - stellt aber bei stabilen Proben kein prinzipielles Problem dar, sondern verlängert nur die Gesamtdauer der Messung.

Nach Transmission durch die Probe wird das Anregungslicht durch einen Strahlblocker aufgefangen, das Streulicht aus der Probe durch einen passenden Farbglasfilter (Schott<sup>6</sup>) von der Fluoreszenz getrennt, und die Fluoreszenz mit Hilfe eines Off-Axis Paraboloidspiegels (Janos Technologies, A8037-205<sup>7</sup>) aufammelt. Zum genaueren Strahlengang sei auf Kapitel 3.5.2, und insbesondere Abbildung 3.13 verwiesen, wo der gesamte Aufbau der Probenkammer im Detail dargestellt ist und die Veränderungen für die TCSPC-Konfiguration erklärt werden.

Letztlich passiert das Fluoreszenzlicht einen Doppelmonochromator (Jobin-Yvon D3-180 Gemini, Gitter 530 22 XXX, 330 nm holographic blaze<sup>8</sup>) und fällt danach auf einen im Einzelphotonenmodus betriebenen Photomultiplier (Becker & Hickl PMC 100-4<sup>9</sup>). Dieser gibt das Signal an die an einem Computer angeschlossene kommerzielle TCSPC-Karte (Becker & Hickl, MSA-1000<sup>10</sup>) weiter, die dann die Aufnahme der TCSPC-Transiente übernimmt.

Die TCSPC-Karte stellt eine nominelle Zeitauflösung von maximal 1 ns bei einer maximalen Kanalzahl von 1024 Kanälen zur Verfügung und funktioniert im Vorwärtsmodus, nimmt also das Lasersignal als Start- und das Fluoreszenzsignal als Stop-Punkt. Sie bietet darüber hinaus die Möglichkeit, mehrere Kanäle zu einem zusammen zu fassen und somit zu einer maximalen Beobachtungsdauer von 131  $\mu$ s zu kommen. Darüber hinaus

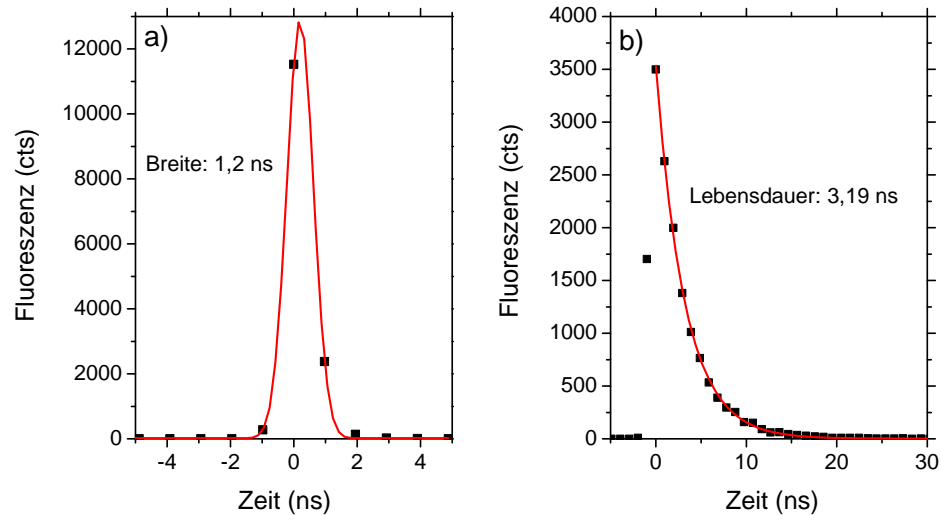
<sup>6</sup> SCHOTT AG, Hattenbergstrasse 10, 55122 Mainz, Deutschland, <http://www.schott.com>

<sup>7</sup> Janos Technology Inc., 55 Black Brook Rd., Keene, New Hampshire 03431-5044, USA, <http://www.janostech.com/>

<sup>8</sup> HORIBA Jobin Yvon GmbH, Hauptstr. 1, 82008 Unterhaching, Deutschland, <http://www.jobinyvon.de>

<sup>9</sup> Becker & Hickl GmbH, Nahmitzer Damm 30, 12277 Berlin, Deutschland, <http://www.becker-hickl.com>

<sup>10</sup> Becker & Hickl GmbH, Nahmitzer Damm 30, 12277 Berlin, Deutschland, <http://www.becker-hickl.com>



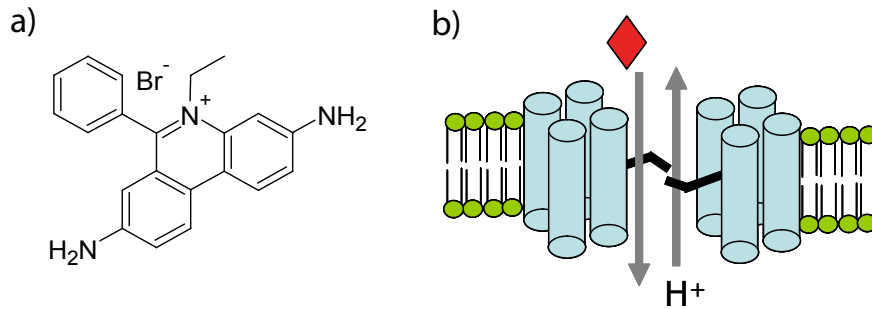
**Abbildung 3.7.** a) Instrumentenantwort des TCSPC-Experiments: Da die Anregung im Vergleich mit der Kanalgröße der Messelektronik als instantan angesehen werden kann, repräsentiert die Instrumentenantwort die Zeitauflösung der Apparatur. Ein Gaußfit ergibt eine Halbwertsbreite von 1,2 ns, was als grobe Richtlinie gelten kann, auch wenn es keine konkreten Hinweise darauf gibt, dass die Instrumentenantwort tatsächlich einer Gaußcharakteristik folgt. b) Fluoreszenzabklingkurve von 20 µm Riboflavin in DMSO. Ein exponentieller Fit ergibt eine Lebensdauer von  $3,19 \pm 0,025$  ns.

funktioniert die Karte nicht in einem einfachen, wie im vorherigen Abschnitt beschriebenen Start-Stop-Modus, sondern ist über die gesamte Messdauer hin zur Signalaufnahme bereit. Lediglich die Totzeit des PMC 100-4 von 4 ns muss als Randbedingung berücksichtigt werden.

Die generelle Steuerung des Aufbaus erfolgt durch ein selbstgeschriebenes LabView-Programm, das im Anhang A beschrieben wird.

Um das aufgebaute Instrument genauer zu charakterisieren, wurde die Instrumentenantwort (IRF) vermessen. Um diese werden die gemessenen Kurven dann später in der Auswertung korrigiert. Unter der IRF wird die Reaktion der Apparatur auf ein instantanes Signal, in diesem Falle zum Beispiel das Anregungssignal selbst verstanden. Abbildung 3.7a zeigt die gemessene Instrumentenantwort für eine Anregung bei 400 nm. Das Ausschmieren des ursprünglich instantanen Signals beruht auf der endlichen Anstiegszeit des Detektors. Um eine Abschätzung über die Genauigkeit der Messapparatur zu erlangen, wurde die Instrumentenantwort mit einer Gaußfunktion gefittet. Es ergab sich eine Halbwertsbreite von 1,2 ns. Je nach Auswertungsmethode wird entweder die IRF direkt eingerechnet oder durch den Gaußfit angenähert, um die Kinetik von der Instrumentenantwort zu trennen. Welche Auswertungsvariante gewählt wurde, ist im Folgenden bei den jeweiligen Messungen angegeben.

Zur Charakterisierung der Anlage wurden verschiedene Farbstoffe bekannter Abklingzeit gemessen. Abbildung 3.7b zeigt die Fluoreszenzabklingkurve von Riboflavin in



**Abbildung 3.8.** (a) Strukturformel des fluoreszierenden Substrates Ethidiumbromid. (b) Modell des Transportvorgangs. Das dimerisierte Protein transportiert mit Hilfe der kritischen Aminosäure Glu-14 ein Substrat bei gleichzeitigem Protonenantiport. Der Prozeß benötigt, um effektiv ablaufen zu können, einen Protonengradienten an der Membran.

DMSO. Die Fluoreszenzlebensdauer wurde nach Entfaltung der IRF nach Anhang B.1 mit  $3,19 \pm 0,025$  ns bestimmt. In der Literatur wird ein Wert von  $3,18 \pm 0,005$  ns angegeben [83], der bestimmte Wert liegt somit gut im Rahmen.

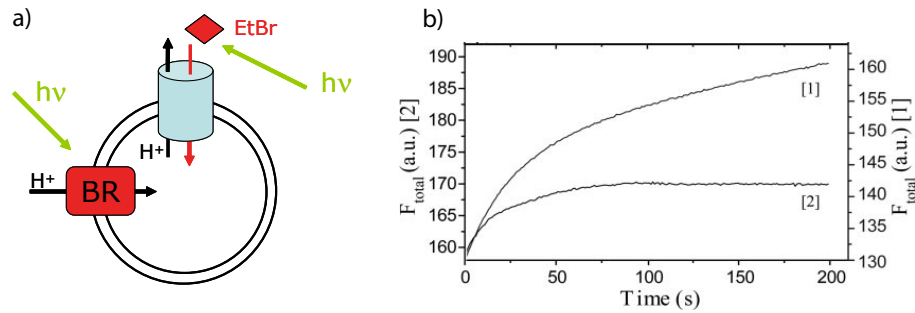
### 3.4.3 Ein Beispiel: Ethidiumbromid als fluoreszierendes Substrat für das Transportprotein TbSMR

#### TbSMR

Das Protein TbSMR gehört zur Familie der *Small Multidrug Resistance* (SMR) Proteine, die in Archäen ebenso wie in Bakterien gefunden werden. Aufgrund ihrer relativ geringen Größe von nur vier transmembranen Helices gelten sie als passendes Modellsystem zur Untersuchung typischer Substrat-Protonen-Antiporter. In der Zelle besteht ihre physiologische Funktion darin, für die Zelle schädliche Substanzen aus der Zelle hinaus zu transportieren und somit ein Überleben der Zelle zu ermöglichen [84]. Die Antibiotikaresistenz einiger Bakterien fußt zum Teil auf der Präsenz von solchen Multidrug Resistance Proteinen [85]. Somit ist es von großer Bedeutung, den Transportmechanismus dieser Proteinklasse aufzuklären.

Alle SMR-Proteine besitzen eine ähnliche Größe im Bereich zwischen 11 - 12 kDa, vier transmembrane Helices und eine Schlüsselaminosäure Glutamin 14 (Glu-14), die für den Transportprozess relevant ist [86].

TbSMR entstammt dem *Mycobacterium tuberculosis* und besitzt eine hohe Ähnlichkeit (70 % Ähnlichkeit, 43 % Identität) zu dem am besten untersuchten SMR Escherichia coli multidrug resistance protein E (EmrE) [87]. EmrE transportiert eine Reihe aromatischer, positiv geladener Substrate und kommt als Dimer vor [88]. Ebenso wie TbSMR transportiert es 2,4,6-Triphenylpyrylium-Ionen ( $\text{TPP}^+$ ), Acriflavin, Ethidiumbromid, Benzalkonium und Methylviologen, TbSMR transportiert zusätzlich noch Safranin O, Pyronin Y und Erythromycin [87]. Das aufgestellte Transportmodell sieht vor, dass zunächst das Substrat gebunden, dann unter Konformationsänderung des Moleküls transportiert wird. Die Abgabe des Substrates wird durch die Bindung eines Protons ausgelöst und der Gegentransport dieses Protons führt das Protein in seine ursprüngliche Konfiguration zurück [89]. Es muss auf Basis dieser Hypothese einen Übergangszustand geben, während dem das Molekül an das Protein gebunden transportiert wird. Abbildung 3.8b verdeutlicht die Verhältnisse.



**Abbildung 3.9.** a) Schema des kombinierten BR-TbSMR-Experiments: Lichtangeregtes BR baut einen Protonengradienten über die Membran auf, gegen die TbSMR das fluoreszierende Substrat Ethidiumbromid transportiert. b) Kurve [1] zeigt die Veränderung der Ethidiumbromidfluoreszenz bei außerhalb der Vesikel gequenchter Fluoreszenz, Kurve [2] zeigt den Anstieg der Gesamtfluoreszenz. Abbildung b) entnommen aus Referenz [84].

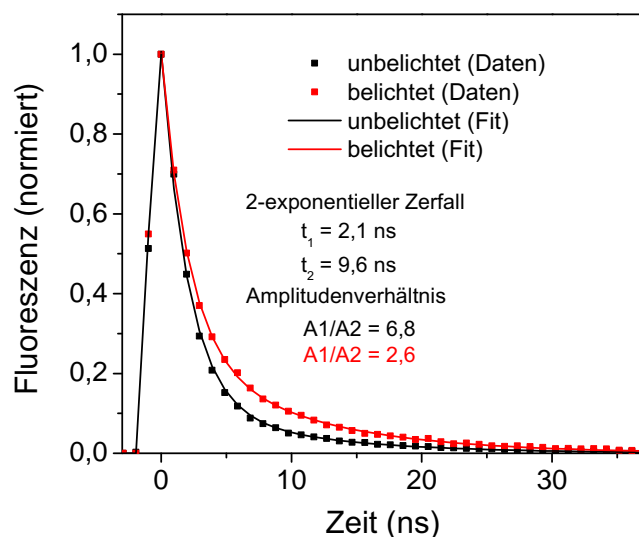
Zur genaueren Charakterisierung dieses Zwischenzustands wurde das Substrat Ethidiumbromid gewählt (Abbildung 3.8a), da es eine umgebungsabhängige Eigenfluoreszenz besitzt. Es ändert seine Fluoreszenz bei unterschiedlichen Polaritäten der Umgebung und ist somit durchaus geeignet, einen Unterschied zwischen einem Zustand polarer Umgebung in Wasser und unpolare Umgebung im Protein zu erkennen. Da der Transport des Substrates nur gegen einen pH-Gradienten funktioniert, wurde in einem Transportassay im Arbeitskreis Glaubitz<sup>11</sup> TbSMR gemeinsam mit dem Membranprotein Bakteriorhodopsin (BR) rekonstituiert [84]. BR fungiert als lichtgesteuerte Protonenpumpe [90] und kann so bei geeigneter Lichteinstrahlung und gerichteter Inkorporation in die Membran einen stabilen Protonengradienten aufbauen [91] wie in Abbildung 3.9a erläutert. Teil b) dieser Abbildung zeigt das Ergebnis des Experiments. Die mit [2] betitelte Kurve zeigt den Anstieg der Ethidiumbromidfluoreszenz mit der Zeit. Dieser lässt sich durch ein sukzessives Aufbauen des pH-Gradienten durch das Bakteriorhodopsin erklären, das nach einer gewissen Zeit in einen stationären Zustand übergeht, bei dem der Protonengradient gleichermassen stark auf- wie abgebaut wird. Bei dem mit [1] bezeichneten Experiment wurde die Fluoreszenz außerhalb der Vesikel mit Hilfe von KI gequenchet. Man erkennt nach einiger Zeit einen linearen Anstieg der Fluoreszenz, was für eine gleichmäßigen Aufnahme des Substrates in die Vesikel spricht.

### Messung der Lebensdauern in transportiertem und nicht transportiertem Zustand

Nach dem Nachweis der Funktionalität des TbSMR-BR-Essays war es nun Ziel, die Lebensdauern des freien sowie des gebundenen Ethidiumbromid mit Hilfe eines TCSPC-Experiments zu bestimmen um eindeutig nachzuweisen, dass es sich bei dem Fluoreszenzanstieg um einen Effekt zweier verschiedener Umgebungen des Ethidiumbromides handelt. Die Zahl der bestimmten Lebensdauern läßt einen Rückschluß auf die Zahl intermediärer Zustände während des Transports zu.

Hierzu wurde die Ethidiumbromidfluoreszenz mit Hilfe des NOPAs bei 500 nm und einer Anregungsenergie von 250 nJ pro Puls angeregt, während die Bestrahlung des BR

<sup>11</sup> Institut für Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt



**Abbildung 3.10.** Messung der Lebensdauern des belichteten und unbelichteten Proteins: Es sind zwei verschiedene Populationen zu erkennen, deren Verhältnis sich bei aktivem BR deutlich verändert.

breitbandig mit Hilfe einer Weißlichtlampe (Hamamatsu Lightningcure LC<sup>12</sup>) erfolgte. Für die unbelichtete wie die belichtete Probe wurden Transienten bei 610 nm mit insgesamt  $10^5$  Wiederholungen aufgenommen. Beide Messungen wurden um das Streulicht der Anregung korrigiert. Die Messung der belichteten Probe wurde zudem noch um das Streulicht der Belichtungslampe korrigiert. Datenanpassung erfolgte mit Hilfe des IDL-z20-Programmes (Kapitel B.2).

Die auf Maximalintensität normierten Messungen und ihre Fitkurven finden sich in Abbildung 3.10. Deutlich lassen sich zwei verschiedene Lebensdauern in den Datensätzen erkennen. Die kürzere Lebensdauer von 2,1 ns überwiegt bei unbelichtetem BR, während die längere Lebensdauer von 9,6 ns bei Belichtung von BR deutlich an Gewicht gewinnt. Das Amplitudenverhältnis von 6,8 zugunsten der kürzeren Lebensdauer im unbelichteten Fall sinkt bei aktivem BR auf 2,6. Somit lässt sich eine Zuordnung der beiden Lebensdauern zu den zwei in der Probe vorhandenen Zuständen des Ethidiumbromids treffen. Die kürzere Lebensdauer lässt sich also mit freiem Ethidiumbromid in Lösung assoziieren. Sie ist etwas länger als die in der Literatur angegebene Lebensdauer von Ethidiumbromid in Wasser, die mit 1,7 ns beziffert wird [92]. Die hier dargestellte Messung wurde jedoch nicht in reinem Wasser, sondern in Phosphatpuffer bei physiologischem pH durchgeführt, was zu einer Verlängerung der Lebensdauer führen kann. Weitere Abweichungen sind möglicherweise durch eine nicht vollständig mögliche Korrektur der Streuhintergründe entstanden, die sich besonders bei kurzen Zeiten auswirkt. Die längere Lebensdauer entspricht dem gebundenen Ethidiumbromid-Zustand. Die Verlängerung der Lebensdauer spricht, ebenso wie die Erhöhung der Quantenausbeute, für eine stärkere

<sup>12</sup> Hamamatsu Photonics, Arzbergerstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Deutschland, <http://www.hamamatsu.com>



konformationelle Einschränkung des Substrates im Protein, da auf diese Weise vibratorische Deaktivierung teilweise verhindert wird. Dies äußert sich in einem Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute ebenso wie in einem Anstieg der Lebensdauer des angeregten Zustandes.

Das Vorhandensein beider Zustände auch im Falle inaktiven BRs lässt sich mit unspezifischem Transport aufgrund von in der Lösung vorhandenen Protonen erklären. Die Rate der transportierten Moleküle ist jedoch deutlich geringer als im Falle eines künstlich erstellten Protonengradienten.

Es treten also zwei voneinander klar trennbare Fluoreszenzzustände auf. Beiden Zuständen konnten klar voneinander verschiedene Lebensdauern zugewiesen werden, die auf deutlich unterschiedliche Molekülumgebungen schließen lassen. Dem gebundenen Zustand, dessen relative Amplitude im Vergleich zur ungebundenen bei aktivem BR deutlich steigt, wird die längere Lebensdauer zugeordnet. Diese Beobachtung ist in Einklang mit dem Anstieg der Quantenausbeute bei transportiertem Ethidiumbromid, ebenso wie mit der Überlegung, dass das Substrat innerhalb des Proteins eine substantiell geringere Beweglichkeit als außerhalb des TbSMR aufweist.

Aus dem Auftreten von nur zwei klar voneinander trennbaren Fluoreszenzzuständen lässt sich folgern, dass der Transport des Ethidiumbromids durch die Membran entweder in einem einzigen Schritt erfolgt, oder die einzelnen Schritte keine wesentlichen Auswirkungen auf die direkte Umgebung des Chromophors haben. Als dritte Erklärung ist es ebenfalls möglich, dass zusätzliche Bindungsschritte deutlich schneller als der Haupttransportschritt ablaufen und somit eine Gleichgewichtspopulation besitzen, die vernachlässigbar klein ist.

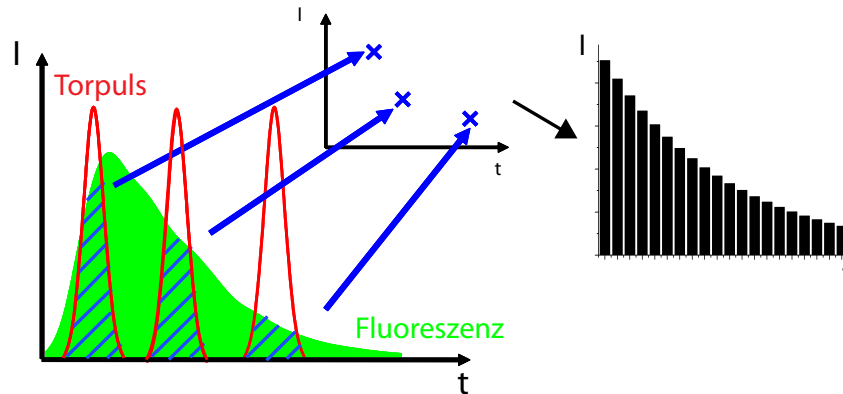
Die Diskriminierung zwischen diesen verschiedenen Möglichkeiten ist mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer messung nicht ohne weiteres möglich. Alternativ kann der Bindungsprozess mit Hilfe beispielsweise der Stopped-Flow-Technik untersucht werden, wo es leichter möglich ist, auch transiente Zustände aufzulösen. Ebenso werden NMR-Messungen in Zukunft ein deutlicheres Licht auf die Mechanistik des TbSMR werfen.

## 3.5 Fluoreszenzaufkonvertierung

### 3.5.1 Funktionsprinzip

Die Technik der Fluoreszenzaufkonvertierung ermöglicht die Bestimmung von Fluoreszenzlebensdauern im Femto- bis Picosekundenbereich [93–96]. Dem Prinzip der Pump-Probe Spektroskopie folgend wird hier die Zeitauflösung durch Verzögerung und Verkürzung von Lichtwegen ermöglicht.

Die Grundidee beruht auf der Summenfrequenzbildung zwischen der Fluoreszenz und einem ultrakurzen, intensiven Laserpuls (Torpuls) in einem nichtlinearen optischen Kristall. Abbildung 3.11 verdeutlicht den Prozess. Nach der Anregung wird die Fluoreszenz in einen Kristall fokussiert. Hier erfolgt die Überlagerung mit dem Torpuls, der üblicherweise im Femtosekundenbereich liegt. Bei geeignetem gewähltem Winkel der optischen Achse des Kristalls zum einfallenden Licht kann Phasenanpassung für den Prozess der Summenfrequenzgenerierung (Kapitel 2.3.1) eingestellt werden. Das erzeugte Summenfrequenzlicht ist der Intensität der Fluoreszenz proportional. Durch diesen Prozess wird ein kleiner, zeitlich definierter Teil des Fluoreszenzlichts spektral vom Rest der Fluoreszenz getrennt und kann so durch einen Monochromator vom restlichen Licht abgetrennt und detektiert werden. Zum Beispiel ergibt sich bei einer Fluoreszenz von 500 nm und einem Gatepuls von 800 nm über  $\frac{1}{\lambda_3} = \frac{1}{\lambda_1} + \frac{1}{\lambda_2}$  eine Summenfrequenz von 307,7 nm.



**Abbildung 3.11.** Prinzip der Fluoreszenzaufkonvertierung: Die Fluoreszenz wird in einem doppelbrechenden Kristall mit einem kurzen, intensiven Laserpuls (Torpuls) überlagert (links). Aus dem zeitlichen Überlappbereich, in dieser Abbildung schraffiert dargelegt, wird Summenfrequenzlicht (siehe Kapitel 2.3.1) erzeugt, das als eigentliches Signal detektiert wird. Durch Verzögerung des Gatepulses gegenüber der Fluoreszenzanregung kann nun eine Zeitauflösung erreicht werden (oben). Mehrfache Wiederholung der Messung über den gesamten Zeitbereich ergibt ein Histogramm, aus dem sich die Lebensdauer der Fluoreszenz extrahieren lässt.

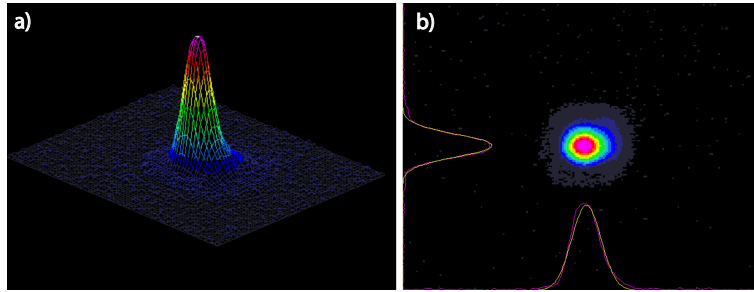
Die Zeitauflösung des Aufbaus ist durch die Kreuzkorrelation zwischen Anregung und Gatepuls gegeben und lässt sich leicht durch Messung des aufkonvertierten Signals der Anregung bestimmen. Dies wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

### 3.5.2 Charakterisierung des Messaufbaus

Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte Fluoreszenzaufkonvertierungs-Aufbau wurde mit den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Geräten zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung betrieben. Eine Schemazeichnung des gesamten Aufbaus findet sich in 3.13. Die Anregung erfolgt wie oben bereits beschrieben je nach Probe mit Hilfe eines NOPA, der Frequenzverdoppelten des Laserpulses oder der Summenfrequenz aus NOPA und Laserfundamentaler.

Wie bei dem TCSPC-Experiment wird der Anregungspuls bei einer Energie von 100-500 nJ in die Probe fokussiert. Es entsteht ein Fokus mit einem Durchmesser von etwa  $200\ \mu\text{m}$ , der eine leicht elliptische Form annimmt (siehe Abbildung 3.12), die auch die Charakteristik des räumlichen Laserprofils widerspiegelt. Mit Hilfe zweier Motoren wird die in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm befindliche Probe in zwei Dimensionen senkrecht zum einfallenden Anregungslicht bewegt, um für jede neue Anregung frisches Probenvolumen zu garantieren. Die geringe räumliche Dicke der Probe ist notwendig, da eine insbesondere zeitlich gleichmäßige Anregung der Probe wünschenswert ist und Dispersionseffekte möglichst vermieden werden sollen. Zudem ist die Qualität des Fokus von entscheidender Bedeutung für die Effektivität des Prozesses der Aufkonvertierung und somit für die Funktionalität des gesamten Aufbaus, so dass ein räumliches Ausschmieren des Fokus ebenfalls möglichst vermieden werden sollte.

Das die Probe durchlaufende Anregungslicht wird hinter der Probe mit einem Strahlstopper abgefangen, und je nach Probe wird das Streulicht der Anregungswellenlänge



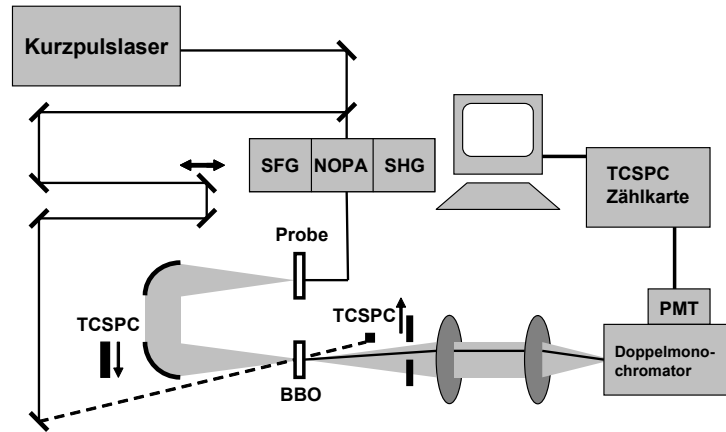
**Abbildung 3.12.** Strahlprofil des Fokus eines NOPA-Pulses von 615 nm in der Probe: a) 3-dimensionales Profil. Der Fokus zeigt leicht elliptische Form und ist zur linken Seite hin asymmetrisch verschoben. b) Zweidimensionales Falschfarbenbild des Fokus. Die Annäherung des Strahlprofils durch Gaußfunktionen (TEM00-Mode) ergibt eine elliptische Ausdehnung mit den Hauptachsen von 230  $\mu\text{m}$  und 180  $\mu\text{m}$ .

mit einem Farbglasfilter (Schott<sup>13</sup>) abgeblockt. Die Fluoreszenz wird durch einen Off-Axis-Paraboloiden aufgefangen (Janos Technologies, A8037-205<sup>14</sup>) und durch einen weiteren baugleichen Paraboloiden in einen Aufkonvertierungskristall fokussiert (BBO, z.B.  $\Theta = 51^\circ$ ,  $d = 0,1 \text{ mm}$ , je nach Anwendung variierend). Hier wird die Fluoreszenz mit dem mit langer Brennweite fokussierten Torpuls (Laserfundamentale, meist 800 nm, 120  $\mu\text{J}$  pro Puls) unter einem Winkel von  $13,5^\circ$  überlappt, da für diesen Winkel bei nichtkollinearem Einfall von Fluoreszenz und Torpuls die Konversionseffizienz maximal wird [96]. Nach der Aufkonvertierung wird das Signal durch eine UV-Linse (Quarzglas,  $f = 5 \text{ cm}$ ) parallelisiert und durch eine Modenblende räumlich von den anderen, den Kristall verlassenden Strahlen wie Resten von Anregung und Torpuls, sowie dessen Harmonischen, getrennt. Eine letzte Linse von 12,5 cm Brennweite fokussiert das Licht in den Monochromator, an dessen Ende mit Hilfe eines Photomultipliers einzelne Fluoreszenzphotonen detektiert werden. Da TCSPC und Aufkonvertierung mit derselben Elektronik betrieben werden, erhält man hier nach längerem Messen ein Signal, das in zeitlicher Charakteristik der der Instrumentenantwort des TCSPC-Experiments gleicht. Integration über dieses Signal ergibt dann die aufkonvertierte Fluoreszenzintensität bei den entsprechend gewählten Einstellungen. Die zeitliche Position des Torpulses relativ zum Anregungspuls wird nun durch Verstellen eines Linearverschiebetisches (Physik Instrumente, M 531 DD<sup>15</sup>, relative Genauigkeit 0,1  $\mu\text{m}$ ) variiert, um somit das zeitliche Profil des zu untersuchenden Signals aufzunehmen. Hierbei wird der erste Teil der Dynamik im linearen Scanmodus aufgenommen, bei dem die Schrittweite zwischen zwei Messpunkten konstant bleibt. Der auf längeren Verzögerungszeiten angewandte exponentielle Scanmodus variiert die Schrittweite von Messpunkt zu Messpunkt um einen konstanten Faktor  $\alpha$ . Die lineare Schrittweite, die Zahl der linearen Punkte, die Zahl der exponentiellen Punkte sowie  $\alpha$  sind frei wählbar, als Rahmenbedingung bleibt lediglich die maximale Verfahrenlänge des Verschiebetisches von 30 cm, die hierbei einer Verzögerung von 2 ns entspricht, bestehen. Eine ausführliche Beschreibung der Steuerung des Programms findet sich in Anhang A.

<sup>13</sup> SCHOTT AG, Hattenbergstrasse 10, 55122 Mainz, Deutschland, <http://www.schott.com>

<sup>14</sup> Janos Technology Inc., 55 Black Brook Rd., Keene, New Hampshire 03431-5044, USA, <http://www.janostech.com/>

<sup>15</sup> Physik Instrumente GmbH & Co. KG, Auf der Römerstr. 1, 76228 Karlsruhe/Palmbach, Deutschland, <http://www.physikinstrumente.de/de/index.php>



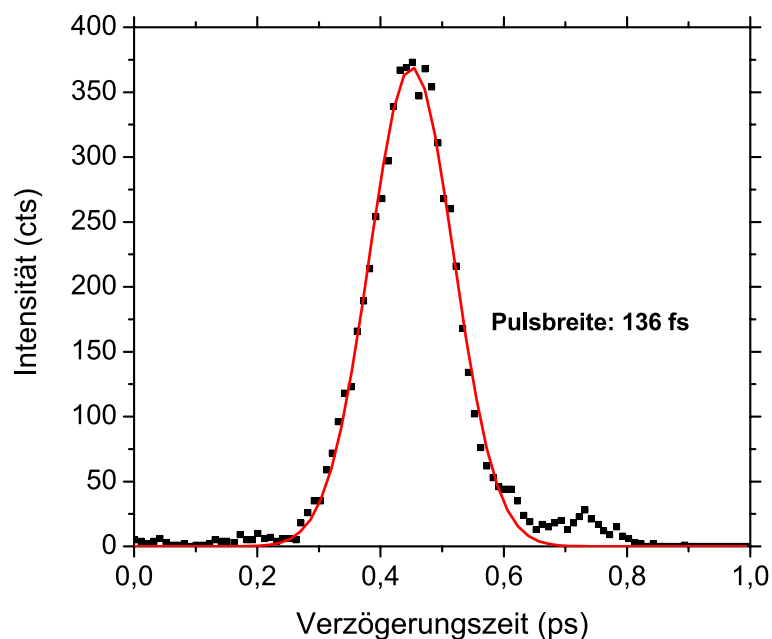
**Abbildung 3.13.** Schemazeichnung des in dieser Arbeit aufgebauten kombinierten TCSPC/Aufkonvertierungs-Aufbaus: Er kombiniert Merkmale beider Techniken. Für TCSPC-Messungen wurde der Torpuls abgeblockt und die Modenblende hinter dem Kristall entfernt.

Abbildung 3.13 zeigt die Schemazeichnung des gesamten Experiments. Da TCSPC und Aufkonvertierung auf den gleichen Geräten beruhen, ist es zum Wechsel zwischen beiden Techniken lediglich notwendig, den Torpuls abzublocken und die Modenblende hinter dem Kristall zu entfernen. Die für die Aufkonvertierung zusätzlich nötige Optik (Linsen, BBO-Kristall) sind für das Fluoreszenzlicht in Abwesenheit des Torpulses nicht störend und können somit am Ort verbleiben. Der große Vorteil des kombinierten Experimentes liegt vor allen Dingen darin, dass durch exakt gleiche Anregungsbedingungen und gleiche Strahlgeometrien absolut vergleichbare Versuchsbedingungen geschaffen werden, und somit die Unterschiedlichkeit verschiedener Apparaturen als Fehlerquelle im Vergleich ausscheidet.

Die Zeitauflösung eines Aufkonvertierungsexperiments ist durch die Kreuzkorrelation zwischen Anregung und Torpuls gegeben. Sie ist gleichzeitig ein guter Hinweis auf die Qualität von Justage und Strahlprofil. Die Korrelation zweier annähernd gaussförmiger Moden ergibt wiederum eine Gausskurve, da die Gaussfunktion invariant gegenüber der Fouriertransformation ist. Somit ergibt sich die Pulsbreite der Resultierenden durch

$$\tau_3 = \sqrt{\tau_1^2 + \tau_2^2}. \quad (3.1)$$

Bei einem gut kollimierten NOPA sind Pulsbreiten von 30 fs möglich [75], was unter Einbeziehung einer Torpulsbreite von 100 fs zu einer minimal möglichen Kreuzkorrelation von 104 fs führt. Die Frequenzverdoppelte ist für gewöhnlich etwas länger als der NOPA-Puls, da sich ihre Länge aus der Korrelation zweier Fundamentalpulse mit  $\tau = 100$  fs nach Gleichung 3.1 ergibt. In der Praxis kommt eine Verbreiterung des Pulses durch dispersive Optiken (z.B. die Küvette und den Kristall selbst) hinzu, so dass die zu erwartenden Pulse etwas länger sind. Abbildung 3.14 zeigt eine Kreuzkorrelation, die bei Anregung mit der Frequenzverdoppelten des Laserpulses gemessen wurde. Die Pulsbreite wurde mit 136 fs bestimmt. Dies wird auch als die Zeitauflösung des Aufbaus betrachtet.



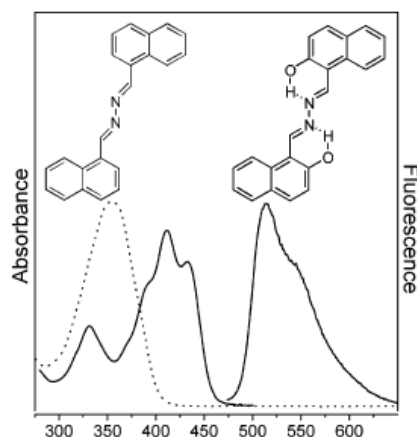
**Abbildung 3.14.** Kreuzkorrelation des frequenzverdoppelten Pulses (400 nm) mit dem Torpuls (800 nm): Ein Gaussfit ergibt eine optimale Anpassung mit einer Pulsbreite von 136 fs. Der kleine Nachpuls, der bei einer Verzögerungszeit von etwa 0,75 ps entsteht, ist vom Schwerpunkt der Kreuzkorrelation etwa 0,3 ps entfernt, was einer optischen Weglänge von 90  $\mu\text{m}$  entspricht. Vermutlich wird er durch eine Reflexion an einem Coating erzeugt und entstammt dem Anregungspuls, da er bei einer simultanen Messung der Autokorrelation des Torpulses nicht zu sehen war.

### 3.5.3 Beispiel 1: Fluoreszenz des Pigment Yellow 101

Ein erstes, mit der in dieser Arbeit erstellten Anlage untersuchtes Molekül war das in unserer Arbeitsgruppe studierte Pigment Yellow 101 (PY101) [97], dessen Photodynamik insbesondere im Rahmen der Doktorarbeit von Lisa Lorenz [98] und der Diplomarbeit von Heike Staudt [99] untersucht wurde. Experimentell eignete es sich als Modellsystem insbesondere dadurch, dass es in großer Quantität vorhanden war und eine Fluoreszenzdynamik im zweistelligen Picosekundenbereich erwarten ließ, ein Zeitbereich, der der Aufkonvertierung sehr gut zugänglich ist. Zudem besitzt das Molekül eine akzeptabel hohe Quantenausbeute im Bereich von etwa  $10^{-2}$  [100], die ein ausgeprägtes Signal erwarten lässt.

#### Das Pigment Yellow 101: Kein völlig gewöhnliches Pigment

PY101 (2,2'-Dihydroxy-1,1'-naphthalazin) ist ein organisches Pigment, das seit mehr als hundert Jahren bekannt ist und bereits seit langer Zeit in industrieller Produktion hergestellt wird. Aufgrund seiner intensiv gelben Farbe und der hohen Photostabilität wird es als Farbmittel sehr geschätzt und findet vor allem in Druckfarben oder Malerfarben Anwendung [97]. Es ist das bis heute einzige bekannte Pigment, das seine Fluoreszenzfähigkeit im Feststoff beibehält. In unserer Gruppe, sowie in den Arbeitsgruppen



**Abbildung 3.15.** Strukturformeln von PY101 (rechts) des nichtfluoreszierenden Pyrenderivats 1,1'-Naphthalazin (links). Die durchgezogenen Linien zeigen das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von PY101, wobei die Fluoreszenz rotverschoben im Vergleich zur Absorption ist. Die gepunktete Linie entspricht der Absorption des nichtfluoreszierenden Derivats 1,1'-Naphthalazin (entnommen aus Referenz [100]).

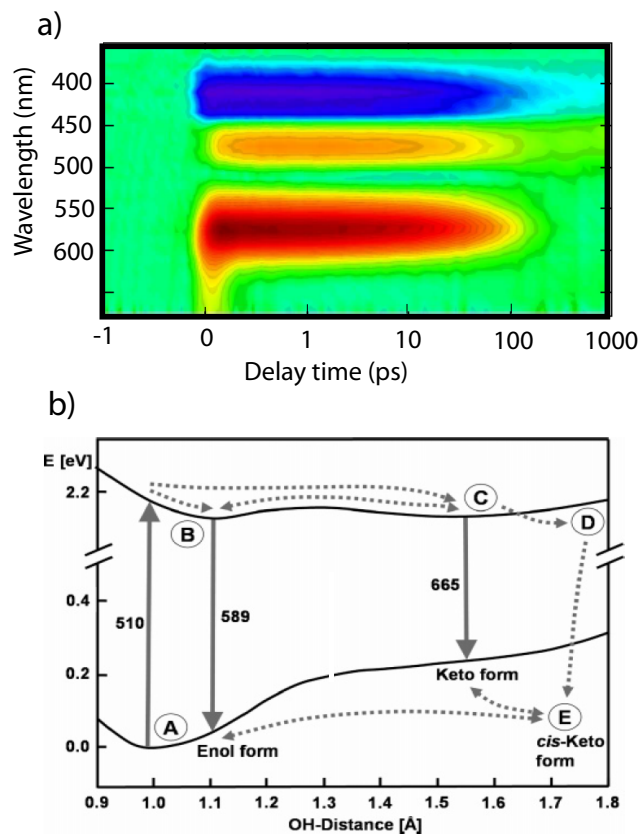
Schmidt<sup>16</sup> und Dreuw<sup>17</sup> war dieses Phänomen Gegenstand theoretischer und zeitaufgelöst spektroskopischer Untersuchungen [100–102].

Eine Untersuchung verschiedener PY101-Derivate zeigte, dass die OH-Gruppen des Moleküls für die Fluoreszenzquantenausbeute von zentraler Bedeutung sind [101]. Der Grund dafür wurde mit Hilfe *time dependent density function theory* (TDDFT)-basierter Rechnungen in einer Verschiebung der elektronisch angeregten Zustände bestimmt. Der verbotene  $n\pi^*$ -Übergang, der in Abwesenheit der OH-Gruppen den niedrigsten angeregten Zustand darstellt, verschiebt sich in PY101 zu deutlich höheren Energien, so dass der niedrigste Übergang nun ein  $\pi\pi^*$ -Zustand ist. Es konnte in der Theorie nachgewiesen werden, dass die Deaktivierung der Anregungsenergie in den nicht fluoreszenten Derivaten über die CNN-Beugeschwingung stattfindet [101].

Zur genaueren Untersuchung der Photophysik von PY101 und entsprechenden Derivaten, sowie der Verifizierung und Klärung des Deexcitationsmechanismus wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Lisa Lorenz, sowie der Diplomarbeit von Heike Staudt kurzspektrale Messungen unternommen [98–100, 102]. In unserer Arbeitsgruppe ausgeführte transiente Absorptionsmessungen im Sichtbaren zeigten eine komplexe Photophysik des untersuchten Pigments (siehe Abbildung 3.16). In Teil a) der Abbildung ist ein 2-d Spektrum der transienten Absorptionsmessung an PY101 gezeigt. Es lassen sich innerhalb des Spektrums verschiedene Bereiche erkennen. Das instantane Ausbleichen des Grundzustands ist als blaue Bande zwischen 370 nm und 430 nm zu erkennen. Ab etwa 450 nm bis weit in den roten Bereich hinein, ist die angeregte Zustandsabsorption zu erkennen, die bei etwa 510 nm von der stimulierten Emission durchbrochen wird. Eine globale Fitanalyse der vorliegenden Daten zeigte zusätzlich zur Fluoreszenz Verschiebungen innerhalb des angeregten Zustandes sowie die Akkumulierung eines über den Beobachtungsbereich von 1 ns hinaus stabilen Photoproduktes (siehe Schema Abbildung 3.16b). Mit Hilfe der theoretischen Berechnungen möglicher

<sup>16</sup> Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt

<sup>17</sup> Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt



**Abbildung 3.16.** a) 2-d Spektrum des transienten Absorptionsspektrums von PY101. Die Spektren sind farbcodiert, wobei rot für positive Absorptionsänderung, blau für negative Absorptionsänderung im Vergleich zur unangeregten Probe steht. Die x-Achse ist zwischen  $-1$  ps und  $1$  ps linear und danach logarithmisch. Das Ausbleichen des Grundzustands ist zwischen  $370$  nm und  $430$  nm zu sehen, ab  $450$  nm taucht eine breite, von der stimulierten Emission bei  $510$  nm durchbrochene ESA auf. Ein globaler Fit der Daten zeigt eine komplexe Photophysik auf, die sich nicht allein durch ein fluoreszierendes Chromophor erklären lässt [100]. b) Aus den Daten gefolgertes Modell mit einer Enol-Keto-Umwandlung (Enol: Zustände A, B; Keto: Zustände C, E) sowie einem weiteren durch trans-cis-Isomerisierung entstehenden Zustand (D). Details zur Datenanalyse und dem System finden sich in der Doktorarbeit von Lisa Lorenz [98] (Abbildung entnommen aus Referenz [100]).

Molekülkonformationen wurde auf die Existenz eines Keto-Zustandes (Buchstabe C, E in Abbildung 3.16b) geschlossen, der sich auch in zeitaufgelösten infrarotspektroskopischen Messungen nachweisen ließ [102]. Die gesamte Photophysik des Pigments ist komplex und würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, weswegen für Details dieser Untersuchungen auf die zitierte Literatur verwiesen wird.

Die globale Fitanalyse der gewonnenen transienten Absorptionsdaten zeigte einen einzelnen Fluoreszenzzustand, der mit einer Lebensdauer von  $63$  ps zerfällt. Dem Modell folgend ist es jedoch durchaus möglich, dass sowohl Enol- als auch Keto-Zustand

des Pigments in Lösung fluoreszieren. Da jedoch die transiente Absorptionsmessung eine Überlagerung aller im sichtbaren befindlichen Signale darstellt, ist eine Identifizierung der zugehörigen Fluoreszenzzeiten ebenso wie ein Nachweis ihrer Existenz schwierig. Hierin liegt die Stärke der Aufkonvertierungsmessung, die selektiv die Fluoreszenz betrachtet und somit Überlagerungseffekte ausschließt. Ziel der Messung der Lebensdauer des PY101 war demnach, die Zahl der fluoreszierenden Zustände, sowie deren Lebensdauern zu identifizieren, um eine eindeutige Interpretation der bisher erlangten Ergebnisse zu ermöglichen.

### Messung der Lebensdauer

PY101 wurde in einer Konzentration von etwa 1 mM in Dichlormethan (DCM) gelöst. Das Pigment weist nur eine mäßige Löslichkeit auf, bei der verwendeten Konzentration traten jedoch keine nennenswerten Störungen wie durch starkes Streulicht erkennbare Mikropartikel oder sichtbares Ausfallen des PY 101 auf. Der Farbstoff wurde aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. U. Schmidt<sup>18</sup> erhalten und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Das Lösungsmittel lag in analytischer Reinheit vor.

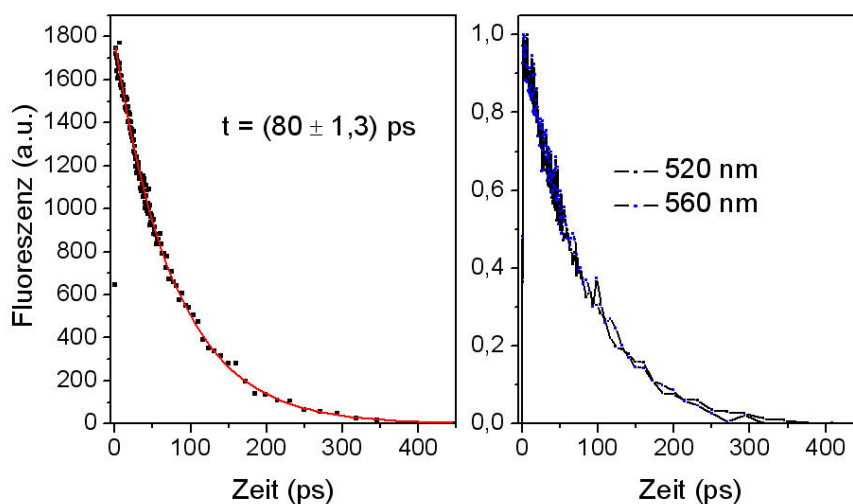
Die Anregung der Probe für die Messung der Aufkonvertierung erfolgte mit der frequenzverdoppelten Laserfundamentalen bei 400 nm und einer Anregungsenergie von etwa 500 nJ. Für den Torpuls wurde eine Energie von 150  $\mu$ J eingestellt. Grundzustandsabsorptionsspektren zur Überprüfung des Probenzustands vor und nach der Messung wurden aufgenommen und zeigten keinerlei Auffälligkeiten, die ein deutliches Degradieren der Probe hätten anzeigen können.

Anhand des Fluoreszenzspektrums wurden die Wellenlängen 520 nm und 560 nm ausgewählt, um das Verhalten der Emission an zwei verschiedenen Punkten des Spektrums zu analysieren. Bei 520 nm wäre eher eine Fluoreszenz der Enol-Form (also von Zustand B nach Zustand A in Abbildung 3.16b) zu erwarten, während um 550 nm der Übergang des Keto (von Zustand C nach Zustand E) vermutet wird [103]. Es wurde eine lineare Schrittweite von 0,5 ps (50 Punkte) sowie  $\alpha = 1,1$  (55 Punkte) für die logarithmischen Schritte verwendet. Die Messung wurde um das ebenfalls gemessene Hintergrundsignal korrigiert.

Auf der linken Seite von Abbildung 3.17 ist die Kinetik des PY101 bei einer Wellenlänge von 520 nm dargestellt. Unter der Annahme exponentieller Zerfälle wird die Kinetik gut durch einen einzelnen Prozess beschrieben. Als Zerfallszeit wurde eine Lebensdauer von  $80 \pm 1,3$  ps bestimmt. Diese Zeit ist geringfügig länger als die aus einem globalen Fit der transienten Absorptionsmessung erhaltene Zerfallszeit von 63 ps, liegt aber in derselben Größenordnung. Diskrepanzen können sich beispielsweise durch deutlich unterschiedliche Probenkonzentrationen, die die Lebensdauer des angeregten Zustands durch Reabsorption unter Umständen leicht verlängern, ergeben. Obwohl der spektrale Überlapp wie in Abbildung 3.15 gezeigt nur gering ist, ist er nichtverschwindend und groß genug um bei hohen verwendeten Probenkonzentrationen einen sichtbaren Effekt zu produzierend. Zudem weisen beide Messungen deutlich unterschiedlich starkes Rauschen auf. Zudem ist der Fehler eines globalen Fits der transienten Absorptionsmessung, wie in Kapitel B.2 diskutiert, nicht einfach zu beziffern so dass die bestimmten 63 ps möglicherweise durch die Überlappung verschiedener Banden verfälscht wurde. In bezug

<sup>18</sup> Institut für anorganische und analytische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt





**Abbildung 3.17.** Links: Fluoreszenzaufkonvertierung von PY101 bei einer Wellenlänge von 520 nm. Ein monoexponentieller Fit (rote Linie) ergab eine Lebensdauer des angeregten Zustands von  $80 \pm 1,3$  ps. Rechts: Fluoreszenzaufkonvertierung von PY101 bei 520 nm und 560 nm, normiert im Maximum. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist kein Unterschied in den beiden Transienten zu erkennen.

auf die Genauigkeit des Fits liegt der Vorteil eher auf der Seite der Aufkonvertierung, da diese keine weiteren Signale neben der Fluoreszenz aufweist und aufgrund der gewählten Einstellungen im relevanten Zeitbereich mehr Punkte aufnimmt.

Rechts in Abbildung 3.17 ist ein Vergleich der Transienten von 520 nm und 560 nm gezeigt. Die Spektren wurden im Zeitnullpunkt auf 1 normiert, wie nach dem Fluoreszenzspektrum zu erwarten, ist das ursprüngliche Signal bei 560 nm leicht geringer als das Signal bei 520 nm. Die Kinetik ist auf beiden Wellenlängen im Rahmen der Messgenauigkeit nicht voneinander zu unterscheiden, ein Fit der Transiente bei 560 nm ergibt eine einstufige Lebensdauer des angeregten Zustandes von  $92 \pm 3,2$  ps, die leicht höher als die der Transiente bei 520 nm liegt. Der Unterschied zwischen beiden Lebensdauern ist jedoch verhältnismäßig gering, so dass es sich bei dem um 560 nm emittierenden Zustand nicht um einen anderen Zustand als dem bei 520 nm emittierenden handeln sollte.

Eine weitere Messung bei 650 nm auf der Suche nach einer möglichen Keto-Fluoreszenz auf anderen Wellenlängen blieb ergebnislos, somit konnte das Vorhandensein eines weiteren, niederenergetischeren Fluoreszenzzustandes nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich hieraus folgern, dass die Fluoreszenz von P.Y.101 aus einem einzigen Zustand gespeist wird. Die erhaltene Lebensdauer ist gut mit der aus den Absorptionmessungen erhaltenen Lebensdauer der stimulierten Emission in Einklang zu bringen und zeigt keine signifikante Wellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenz. Vermutlich handelt es sich bei dem fluoreszierenden Zustand um das in Abbildung 3.16 gezeigte Enol-Konformer. Ein fluoreszierender Keto-Zustand konnte nicht nachgewiesen

werden. Somit muss die Deaktivierung des aus Infrarotmessungen bekannten Ketoform auf strahlungslosen Pfaden erfolgen, die der Aufkonvertierung nicht zugänglich sind.

### 3.5.4 Beispiel 2: Ultraschnelle Fluoreszenz des Channelrhodopsin II

Als weitere Musterprobe zur Demonstration der Funktion des Fluoreszenzaufkonvertierungsaufbaus und seiner Möglichkeiten wurde das aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* stammende Channelrhodopsin II ausgewählt. Bei diesem Ionenkanal wird aufgrund von Vormessungen eine sehr kurze Lebensdauer ( $< 1$  ps) bei sehr geringer Quantenausbeute ( $< 10^{-5}$ ) erwartet.

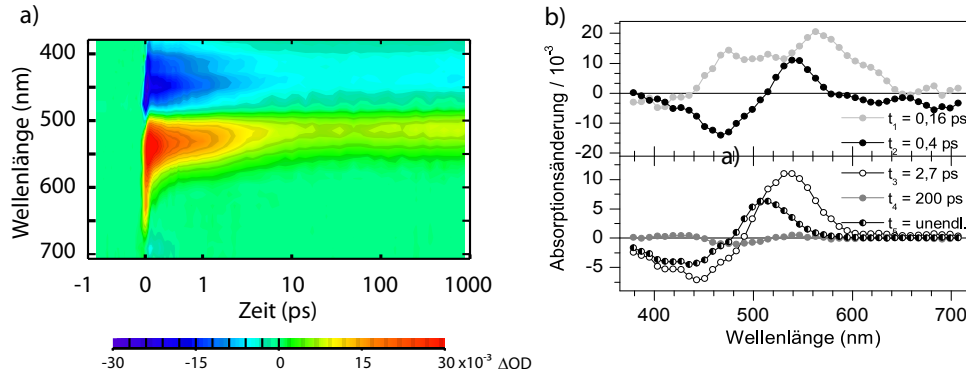
#### Channelrhodopsin II - ein Beispiel für einen photosensitiven Ionenkanal

Rhodopsine sind lichtempfindliche Proteine, die mit verschiedenen Funktionen in einer breiten Zahl von Organismen auftreten. Ihnen gemeinsam ist ein lichtinduzierter Photozyklus. Sie können als Protonen- oder Ionenpumpe dienen oder in der Sehkaskade höherer Wirbeltiere involviert sein. Zusätzlich sind mit Channelrhodopsin I und Channelrhodopsin II in letzter Zeit zwei Ionenkanäle mit Rhodopsincharakter entdeckt worden [104, 105]. Allen Rhodopsinen gemeinsam sind sieben transmembrane Helices sowie ein farbgebendes Retinal, das durch seine Isomerisierung die Funktion des Proteins steuert.

In unserer Gruppe, insbesondere im Rahmen der Doktorarbeit von Mirka-Kristin Verhoeven [106], fanden weitreichende Studien des Channelrhodopsin II statt, das sich im Augenpunkt der *Chlamydomonas reinhardtii* befindet [106]. Channelrhodopsin II ist ein Ionenkanal, der sowohl Protonen als auch  $Na^+$ ,  $Li^+$  sowie  $Ca^{2+}$ -Ionen transportieren kann [107]. Aufgrund der schnellen Reaktionszeit eignet es sich gut zur Kontrolle neuronaler Aktivitäten [108–110].

Der Photozyklus von Channelrhodopsin II ist bereits seit einiger Zeit Ziel einer großen Reihe von Studien [111–113]. Er ist neben der Elektrophysiologie insbesondere durch zeitaufgelöste optische Spektroskopie zugänglich, da sich die verschiedenen Intermediate des Proteins sowohl auf das im sichtbaren Spektralbereich absorbierende Retinal als auch auf die im Infrarotbereich zugängliche Gesamtstruktur des Proteins auswirken. Der abzudeckende Zeitbereich reicht hierbei von hunderten Femtosekunden, innerhalb derer sich insbesondere die Isomerisierung des Retinals abspielt, bis hin zu Sekunden zum erneuten Schließen des Ionenkanals. Durch eine Kombination von transienter zeitaufgelöster Spektroskopie, Flash-Photolyse und Fluoreszenzaufkonvertierung wurde der Photozyklus in unserer Arbeitsgruppe intensiver Studien unterzogen [106, 114].

Abbildung 3.18a) zeigt die gesamte transiente Absorptionsmessung des Channelrhodopsin II bei einer Anregungswellenlänge von 482 nm. Um die Dynamik des Systems zu beschreiben, sind, wie in Abbildung 3.18b) gezeigt, fünf Zeitkonstanten nötig. Die Zuordnung dieser fünf Zeitkonstanten lässt sich in Analogie zu anderen Rhodopsinen durchführen. Die mit *unendl.* bezeichnete Zeit, die ein auf im Vergleich zur Beobachtungszeit langen Zeiten stabiles Photoprodukt beschreibt, ist am leichtesten zuzuordnen. Die spektrale Signatur lässt sich dem Endzustand der Isomerisierungsreaktion zuordnen, der im allgemeinen bei Rhodopsinen als K-Intermediat bezeichnet wird [39, 115].



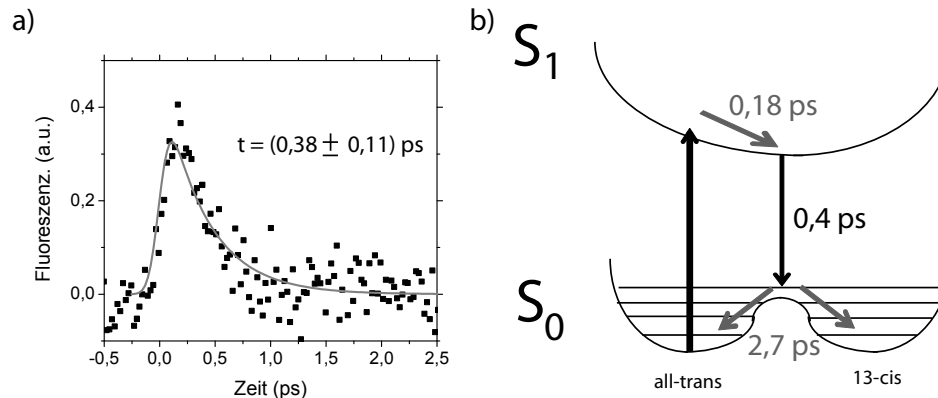
**Abbildung 3.18.** (a) 2-d Spektrum der transienten Absorption von Channelrhodopsin II. Die Spektren zeigen eine komplexe Dynamik auf kurzen Zeiten, einen Zerfall des angeregten Zustandes unter 1 ps, sowie die Entstehung eines langlebigen Photoproduktes. (b) Zerfallsassoziierte Spektren des globalen Fits der Messung von Channelrhodopsin II. Fünf Zeitkonstanten sind nötig, um die Dynamik der Probe ausreichend zu beschreiben [106].

Aus Proteorhodopsin und Bakteriorhodopsin ist bekannt, dass die Isomerisierung des Retinals in zwei Schritten erfolgt. Der erste besteht in einer Streckung des im Retinal vorhandenen Systems von C=C-Bindungen, gefolgt von einer Isomerisierung des Retinals von all-trans zu 13-cis [39, 116, 117]. Diese Reaktion erfolgt auf sehr schnellen Zeitskalen und muss somit mit den drei kürzesten Zeiten in Verbindung gebracht werden. Die mit 200 ps bezifferte Zeit besitzt nur eine verhältnismäßig kleine Amplitude (siehe Abbildung 3.18 rechts), ist jedoch signifikant und kann mit ersten Restrukturierungen der Bindungstasche erklärt werden. Eine solche Umordnung ist nachvollziehbar, da *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)-Messungen bei 80 K zeigen, dass bereits im K-Intermediat größere Umordnungen im Protein stattgefunden haben [111], die sich auch in den sichtbaren Absorptionsspektren niederschlagen sollten.

Die genaue Zuordnung der drei kurzen Zeiten ist aufgrund ihrer spektralen Signatur nicht ganz klar. Sicher ist, dass nach der Isomerisierung des Retinals keine Fluoreszenz mehr zu beobachten sein sollte. Die Fluoreszenz ist im 2-d Spektrum in Abbildung 3.18a) nur als schwaches Signal am langwelligen Ende des Spektrums zu beobachten, da sie größtenteils von der Absorption des angeregten Zustandes überlagert wird. In den zerfallsassoziierten Spektren taucht die spektrale Signatur der Fluoreszenz vor allem als Beitrag zu  $\tau_4 = 0,4$  ps auf. Eine genaue Zuordnung ist jedoch mit Hilfe der Fluoreszenzaufkonvertierung einfacher, da diese selektiv nur den Prozess der Fluoreszenz beobachtet und somit, ähnlich wie auch im vorherigen Abschnitt erläutert, der Problematik der Überlagerung aus dem Weg geht. Im Folgenden soll also eine Bestimmung der Lebensdauer mit Hilfe der Aufkonvertierungsanlage erfolgen.

### Messung der Lebensdauer

Channelrhodopsin II wurde bei einer optischen Dichte von etwa 0,8 auf 1 mm Probendicke präpariert. Der Laser wurde für diese Messung auf eine Wellenlänge von 830 nm eingestellt. Anregung erfolgte über die frequenzverdoppelte Laserfundamentale bei 415 nm mit einer Energie von 300 nJ pro Puls. Es ergab sich eine Kreuzkorrelation von etwa 120 fs. Die aufkonvertierte Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm (auf-



**Abbildung 3.19.** a) Messung der aufkonvertierten Fluoreszenz von Channelrhodopsin II bei 520 nm. Die Punkte zeigen die einzelnen Datenpunkte an, die durchgezogene Linie einen monoexponentiellen Fit unter Berücksichtigung eines gaussförmigen Anregungspulses. b) Aus transienter Absorption und Fluoreszenzaufkonvertierung gefolgertes Modell. Der Anregung des Retinals folgt zunächst die Streckung des Moleküls entlang des C=C-Systems. Anschließend erfolgt der Zerfall des angeregten Zustands in 0,38 ps in einem vibrationsangeregten Grundzustand. Der Zerfall in den Grundzustand des all-trans- sowie des 13-cis-Isomers erfolgt schließlich in 2,7 ps.

konvertiert zu 320 nm) gemessen. Zur Aufkonvertierung wurde ein BBO-Kristall mit einem Anschnittwinkel von  $51^\circ$  und einer Dicke von 0,1 mm verwendet. Es wurden nur lineare Schritte mit einer Schrittweite von 25 fs abgefahren. Die aufgrund der erwarteten Lebensdauer relativ große Schrittdauer stellt einen Kompromiss zwischen einer möglichst genauen Messung und der Vermeidung des Bleichens

Die Messung der Fluoreszenz (Abbildung 3.19a) ergab einen monoexponentiellen Zerfall, der mit  $0,38 \pm 0,11$  ps beziffert werden konnte. Dies ist in Übereinstimmung mit der aus der sichtbaren transienten Absorption bestimmten Zeit von 0,4 ps, die ebenfalls eine Fluoreszenzkomponente aufwies. Ein zusätzlicher, längerer Beitrag konnte nicht bestimmt werden, somit erfolgt der Zerfall aus dem angeregten Zustand des Retinals bereits nach spätestens 0,4 ps. Die aus der transienten Absorption bestimmte Zeit von 2,7 ps muss somit einem Grundzustandsprozess zugeordnet werden, der einem vibratorischen Deaktivierungsprozess sowohl in den all-trans- als auch in den 13-cis Grundzustand entspricht.

Die in diesem Versuch für Channelrhodopsin II gefundene, ultraschnelle Dynamik ist der in Proteorhodopsin oder Bakteriorhodopsin gefundenen so ähnlich, dass sich eine Zuordnung der Prozesse analog zu diesen Proteinen durchführen lässt [39, 116]. Somit kann die kurze Zeit von 0,18 fs dynamischen Prozessen auf der angeregten Zustandsfläche (Stokes' Shift) zugeordnet werden. Die primäre Reaktionskoordinate des Systems ist die C=C-Streckschwingung des Retinals, entlang der über eine konische Durchschneidung in einer Zeit von 0,4 fs der Grundzustand wieder erreicht werden kann. Aus dem vibratorisch angeregten Grundzustand erfolgt dann eine Deaktivierung sowohl in den Grundzustand des Retinals, als auch in den des Photoproduktes. Eine Zusammenfassung der ablaufenden Prozesse findet sich in Abbildung 3.19b.

Frühere Messungen zeigen, dass sich die schnelle Reaktion auf der angeregten Zustandsfläche nur im breiten spektralen Bild aus der Fluoreszenzdynamik extrahieren lässt und somit in einer wie in diesem Fall einzeln aufgenommenen Transiente nicht zu beobachten ist [39]. Nichtsdestotrotz konnte mit Hilfe der Fluoreszenzaufkonvertierung die Lebensdauer des angeregten Zustandes von Channelrhodopsin zweifelsfrei ermittelt und nachgewiesen werden, dass die Isomerisierung als erster Schritt des retinalen Photozyklus bereits nach 400 fs abgeschlossen ist.

### 3.5.5 Beispiel 3: Lebensdauer des Radikalkations von Astaxanthin

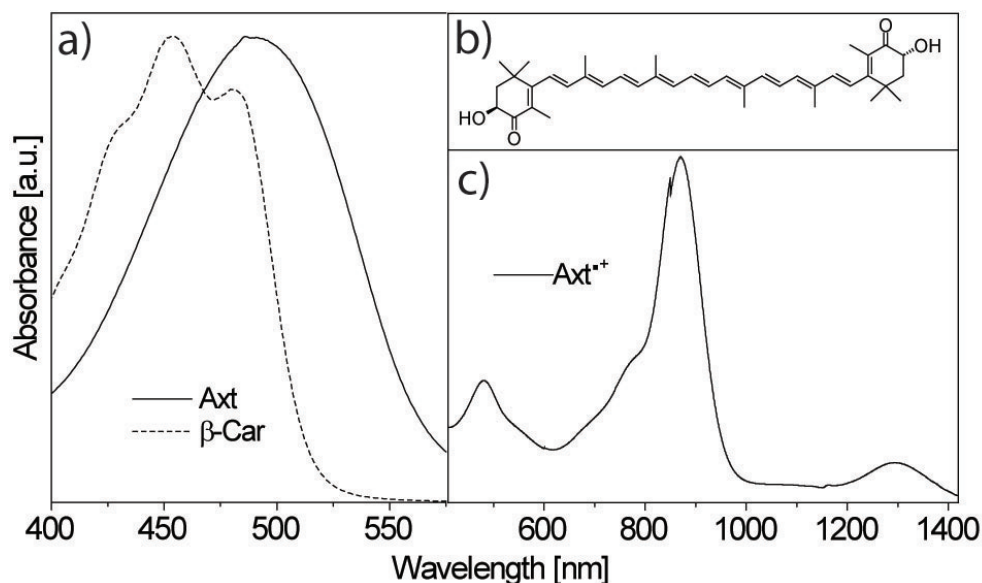
Ein weiterer Vorteil der Fluoreszenzaufkonvertierung ist die Tatsache, dass durch die Frequenzkonversion nahinfrarote Wellenlängenbereiche, deren Detektion im Allgemeinen eher schwierig ist, in einen leichter zu beobachtenden Spektralbereich konvertiert werden können. Dies erwies sich im Rahmen der Untersuchungen am Radikalkation von Astaxanthin ( $\text{Axt}^+$ ) als nützlich, da hier eine Fluoreszenz im Bereich von 1500-1600 nm erwartet wurde. Dieser Spektralbereich ist mit kommerziellen Fluoreszenzspektrometern selten zugänglich, da die dort verwendeten Siliziumdetektoren nicht mehr ansprechen<sup>19</sup>, und auf Germaniumdetektoren ausgewichen werden muss. In der Regel sind diese gekühlt zu betreiben und weisen keine allzu hohe Quantenausbeute auf. Durch Fluoreszenzaufkonvertierung wird dieser Wellenlängenbereich jedoch zu sichtbaren Wellenlängen hin verschoben, was die Detektion mit Standardsystemen deutlich vereinfacht. Hierbei wird auch ein Fluoreszenzbereich zugänglich, der langsameren Techniken wie dem TCSPC oder auf anderen Prinzipien beruhenden Apparaturen wie dem Kerr-Schalter verschlossen bleibt.

### Astaxanthin und seine Bedeutung für die Photosynthese

Karotinoide werden in Pflanzen und Bakterien hergestellt, wo sie in der Photosynthese eine wichtige Rolle sowohl für die Lichtsammlung wie auch den Schutz des Photosystems spielen. In letzterer Funktion sind sie in der Lage, potentiell gefährliche Singletsauerstoffmoleküle zu beseitigen und im Falle zu hoher Anregungsenergie die angeregten Singlett- und Triplettzustände der Chlorophylle zu löschen [118–120]. Die Radikalkationen verschiedener Karotinoide wurden in diversen photosynthetischen Komplexen nachgewiesen, sowohl in bakteriellen Lichtsammelkomplexen [121, 122], als auch in Lichtsammelkomplexen von Pflanzen [123, 124]. Zusätzlich zu ihrer Rolle im Photosynthesystem gelangen Karotinoide über die Nahrungskette auch in tierische Organismen, wo sie wiederum freie Radikale fangen und somit unschädlich machen [125, 126]. Sie sind in der Lage, effektive Unterdrückung freier Radikale in Liposomen [127], Lipoproteinen [128], Zellen [129] oder Membranen [130] auszuführen, wodurch sie auch medizinischen Wert aufweisen [131, 132].

Die optischen Eigenschaften von Karotinoiden werden primär durch die Länge des konjugierten Systems entlang ihres Isoprenskeletts bestimmt [133]. Weitere Einflüsse entstehen durch verschiedene funktionelle Gruppen, Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls sowie die Polarität und Polarisierbarkeit der Umgebung [134]. Die Photophysik von Radikalkationen ist bisher jedoch nur wenig untersucht. Zeitaufgelöste Absorptionsexperimente an den Radikalkationen von  $\beta$ -Karotin und Lutein konnten

<sup>19</sup> Hamamatsu Photonics, Arzbergerstr. 10, 82211 Herrsching am Ammersee, Deutschland, <http://www.hamamatsu.com>



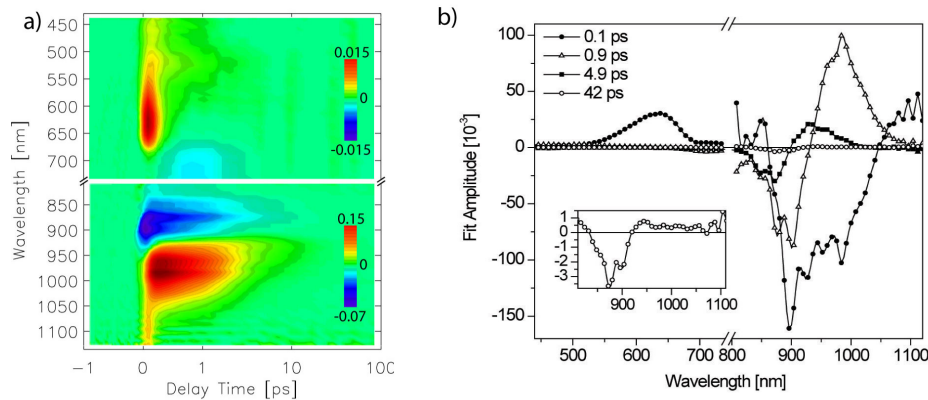
**Abbildung 3.20.** (a) Absorptionsspektren von Astaxanthin (durchgezogene Linie) und  $\beta$ -Karotin (gepunktete Linie). (b) Molekulare Struktur von Astaxanthin. (c) Absorptionsspektrum des radikalen Kations von Astaxanthin. Abbildung entnommen aus Referenz [138]

einen zusätzlichen angeregten Zustand zwischen den gut untersuchten Zuständen  $D_1$  und  $D_3$  nachweisen, dessen Absorption im infraroten Bereich liegt [135].

Astaxanthin wird in Mikroalgen hergestellt [136], kommt jedoch auch in Lachsen, Shrimps, Krabben und in den Federn einiger Vögel vor. Seine antioxidativen Fähigkeiten sind etwa eine Größenordnung stärker als die anderer untersuchter Karotinoide [137].

Abbildung 3.20 zeigt eine Kurzcharakteristik von Astaxanthin und dem dazugehörigen Radikalkation. In Teil a) sind die Absorptionen von  $\beta$ -Karotin und Astaxanthin gegenüber gestellt. Deutlich ist zu sehen, dass das Astaxanthinspektrum gegenüber dem von  $\beta$ -Karotin um etwa 50 nm verschoben ist und signifikant an Feinstruktur verliert. Der Grund hierfür findet sich in der Erweiterung der Konjugation auf den abschließenden Ionylidenering und der Präsenz der Keto- und Hydroxylgruppen (siehe Abbildung 3.20b). Beides führt zu einer größeren Zahl möglicher Konformere und somit zu einer Verbreiterung des Spektrums.

Abbildung 3.20c zeigt das Absorptionsspektrum des durch chemische Generierung erstellten Radikalkations von Astaxanthin in Chloroform. Drei verschiedene spektrale Komponenten sind deutlich zu erkennen. Wie bereits in Referenz [135] für Lutein und  $\beta$ -Karotin diskutiert, kann die starke Absorptionsbande zwischen 800 nm und 950 nm dem Radikalkation von Astaxanthin zugeordnet werden. Durch TDDFT-Rechnungen konnte diese Bande mit einem  $D_0$ - $D_3$ -Übergang assoziiert werden [139]. Zwischen 1200 nm und 1400 nm ist eine weitere, dem  $Axt^+$  zuordbare Bande zu erkennen, die mit dem  $D_0$ - $D_1$ -Übergang in Verbindung gebracht werden kann, da der  $D_1$ -Zustand eine geringe Oszillatorstärke aufweist, während der  $D_2$ -Zustand beinahe vollständig symmetriever-



**Abbildung 3.21.** (a) 2-D Spektren der transienten Absorption von  $\text{Axt}^+$ . Zwei verschiedene, strukturierte Absorptionen des angeregten Zustandes finden sich zwischen 400 nm-700 nm beziehungsweise oberhalb von 950 nm (b) Zerfallsassoziierte Spektren für  $\text{Axt}^+$ . Vier Zeitkonstanten sind nötig um die Dynamik des Systems vollständig zu beschreiben. Die eingeschobene Grafik zeigt vergrößert die vergleichsweise kleine Amplitude der längsten Zeitkonstante. Abbildung entnommen aus Referenz [138]

boten ist [139].

Die Gegenwart der Bande bei 470 nm, die zu dem neutralen Astaxanthin gehört, deutet darauf hin, dass noch eine signifikante Population an neutralem Astaxanthin in der Probe vorhanden ist. Für die zeitaufgelösten Messungen jedoch ist dies nicht von Belang, da in die  $D_0$ - $D_3$ -Bande des radikalen Kations angeregt wird. Abbildung 3.21a zeigt das in unserer Arbeitsgruppe von Sergiu Amarie gemessene 2-D-Spektrum der transienten Absorption für  $\text{Axt}^+$  (siehe auch Referenzen [75, 138]). Verschiedene, deutlich getrennte Regionen mit unterschiedlichem Zeitverhalten lassen sich erkennen. Im sichtbaren Spektralbereich (oberer Teil des Graphen) ist eine strukturierte Absorption des angeregten Zustandes zu erkennen. Bei hohen und niedrigen Wellenlängen zeigt sich eine kurze Lebensdauer von etwa hundert Femtosekunden ( $\text{ESA}_2$ ), während bei 510 nm eine weitere Komponente mit Picosekundenlebensdauer auftritt ( $\text{ESA}_1$ ). Das Grundzustandssignal ist um 870 nm zentriert und verschwindet innerhalb weniger Pikosekunden. Darüber ist eine starke Absorption eines angeregten Zustandes um 1000 nm zu sehen. Das Signal ist strukturiert und zerfällt mit zwei verschiedene Lebensdauern. Bei höheren Energien dominierte eine langlebigere Komponente ( $\text{ESA}_3$ ) das Spektrum, während bei niedrigeren Energien der Einfluss eines kurzlebigen Zerfallspfad an Einfluss gewinnt ( $\text{ESA}_4$ ). Oberhalb von 1050 nm ist ein sehr breites, kurzlebige, positives Signal zu sehen.

Eine globale Fitanalyse führte zu vier Zerfallskomponenten, die in Abbildung 3.21b dargestellt sind, und die, soweit möglich, analog zu Referenz [135] interpretiert werden.

- Die kürzeste Lebensdauer  $\tau_1 = 100$  fs zeigt zwei positive Beiträge um 630 nm ( $\text{ESA}_2$ ) und 1050 nm ( $\text{ESA}_5$ ). Dazwischen befindet sich ein starker negativer Beitrag, der Charakteristika des gebleichten Grundzustands sowie der breiteren, langlebigeren, positiven Absorption im Nahinfraroten zeigt. Diese Zeitkonstante beschreibt also den Zerfall des anfänglich populierte  $D_3$ -Zustands.

- Der zweite Zerfallsprozess ist mit einer Lebensdauer von  $\tau_2 = 0,9$  fs assoziiert. Die zugehörige Amplitude zeigt einen schwachen positiven Beitrag bei 510 nm (ESA<sub>1</sub>) und einen starken positiven Beitrag bei 980 nm (ESA<sub>4</sub>). Die negative Amplitude dieser Zerfallszeit ist im Vergleich zur Amplitude von  $\tau_1$  blauverschoben. Diese Zeitkonstante beschreibt den Zerfall des zuvor populierte  $D_2$ .
- Der dritte Beitrag besitzt eine Zeitkonstante von  $\tau_3 = 4,9$  fs und zeigt einen positiven Beitrag um 980 nm und einen negativen bei 870 nm. Diese Form ist typisch für eine Erholung des Grundzustands aus dem  $D_1$  heraus.
- Die vierte Zeitkonstante besitzt nur eine sehr geringe Amplitude (Im Einschub vergrößert dargestellt) und eine Lebensdauer von  $\tau_4 = 42$  fs. Sie zeigt einen negativen Beitrag in der Region der Grundzustandsabsorption und einen schwachen positiven Beitrag in der Region der angeregten Zustandsabsorption im Nahinfraroten. Es muss also angenommen werden, dass der  $D_1$ -Zustand strukturiert ist und zwei metastabile Zustände erlaubt. Der Zerfallspfad von  $\tau_3$  zeigt eine deutlich höhere Amplitude als der Zerfallspfad von  $\tau_4$ . Hieraus lässt sich schließen, dass die zu der längeren Zeit gehörige Population sehr klein ist.

Insgesamt muss jedoch beachtet werden, dass obige Betrachtung von der Tatsache ausgeht, dass sich die vorherrschenden Prozesse allein durch die Summe exponentieller Zerfälle beschreiben lassen. Dies ist für eine Reihe nichtlinearer Vorgänge, insbesondere solche, die mit der Kühlung von Banden zusammenhängen, nicht der Fall. Insbesondere die Form der angeregten Zustandsbande im Nahinfraroten legt die Gegenwart eines Kühlprozesses nahe, so dass nicht ganz sicher gesagt werden kann, ob es sich bei ESA<sub>3</sub> bis ESA<sub>5</sub> wirklich um drei voneinander getrennte Absorptionsprozesse handelt.

Die im folgenden dargestellten, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, verfolgte Ziel lag in der Klärung der Dynamik des ersten angeregten Zustands  $D_1$ , von dem vermutet wird, dass er eine schwache Fluoreszenz im Nahinfraroten aufweist.

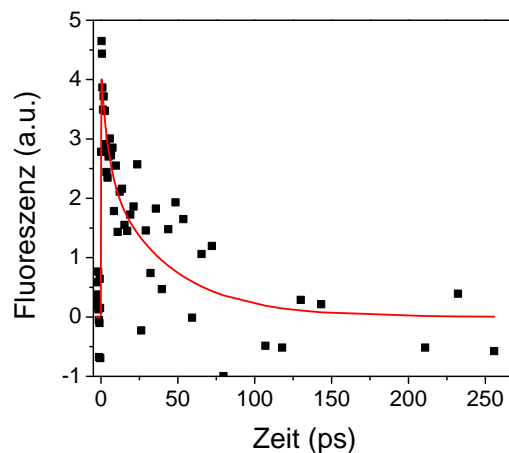
### Fluoreszenzlebensdauermessung

Astaxanthin wurde von der Firma Sigma erworben und ohne weitere Behandlung in Chloroform gelöst. Radikalkationen wurden durch Zugabe von 0,5 M  $FeCl_3$  zu einer 1 M Karotenoidlösung erzeugt. Für die zeitaufgelösten Messungen wurde eine OD von  $0,6 \text{ mm}^{-1}$  bei 890 nm eingestellt. Vor und nach der Messung wurden Absorptionsspektren aufgenommen, um die Probenstabilität zu überprüfen.

Anregung erfolgte über einen durch die Nutzung des Idlers auf 890 nm eingestellten NOPA mit einer Energie von 80 nJ in den  $D_3$ -Zustand des Radikalkations. Die Energie des Torpulses betrug 110  $\mu$ J. Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 1600 nm beobachtet, Aufkonvertierung mit 800 nm ergab eine Detektion bei 533 nm. Die Kreuzkorrelation betrug 190 fs.

Abbildung 3.22 zeigt die bei 1600 nm gemessene Transiente. Die Daten lassen sich gut durch einen biexponentiellen Zerfall beschreiben. Die kurze Zeitkonstante von  $5 \pm 1$  ps beschreibt denselben Prozess wie die aus der transienten Absorption erhaltene Zeit von 4,9 ps für den Hauptzerfallskanal des ersten angeregten Zustands. Zusätzlich dazu wurde eine zweite Zeitkonstante von  $40 \pm 12$  ps beobachtet, die gut mit der kleineren  $D_1$ -Population übereinstimmt. Das Amplitudenverhältnis zwischen diesen beiden Populationen beträgt ungefähr 3:2, wobei die Amplitude der längeren Lebensdauer höher

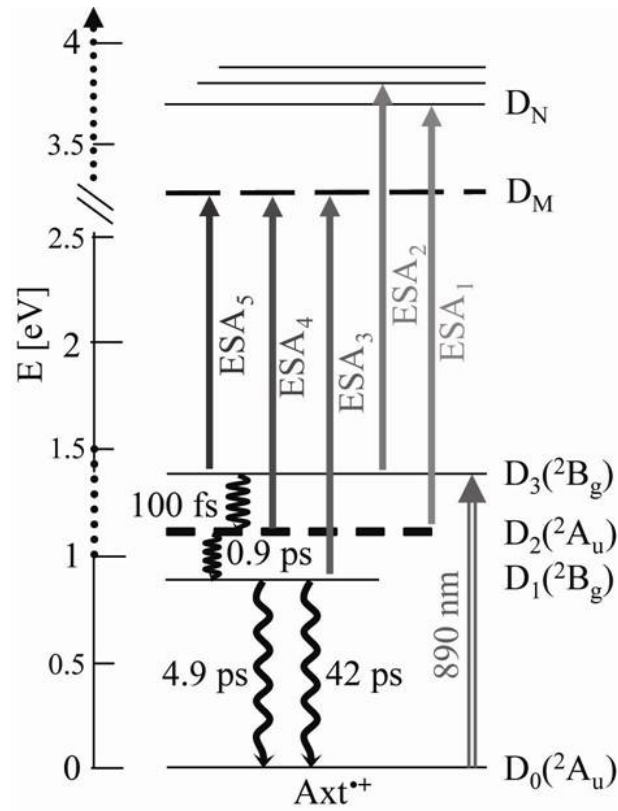




**Abbildung 3.22.** Messung der Fluoreszenz des chemisch generierten Radikalkations von Astaxanthin bei 1600 nm. Ein zweixponentieller Fit liefert Zeitkonstanten von  $5 \pm 1$  ps und  $40 \pm 12$  ps für den Zerfall des ersten angeregten Zustandes.

ist. Hieraus lässt sich schließen, dass die Quantenausbeute des langlebigen  $D_1$ -Zustands deutlich höher als die des Hauptzerfallskanals sein muss.

Eine Kombination aus Absorptions- und Fluoreszenzmessung erlaubt es schließlich, ein Modell der angeregten Zustandsdynamik zu erstellen, das in Abbildung 3.23 gezeigt ist. Nach Anregung befindet sich das Molekül in dem dritten angeregten Zustand  $D_3$ . Dieser zerfällt über interne Konversion innerhalb von 100 fs in den energetisch niedrigeren  $D_2$ -Zustand. Dieser zeigt eine Lebensdauer von 0,9 ps und zerfällt in den  $D_1$ -Zustand. Von hier kann die angeregte Population des Radikalkations auf zwei Wegen in den Grundzustand zurückkehren: Über den Hauptzerfallskanal, der eine Lebensdauer von 4,9 ps aufweist, sowie über einen Nebenzfallskanal mit einer Lebensdauer von 42 ps. Beide Übergänge zeigen bei 1600 nm schwache Fluoreszenz, wobei die des langlebigen Zustandes stärker als die des kurzlebigeren ist.



**Abbildung 3.23.** Modell der angeregten Zustandsdynamik des Radikalkations von Astaxanthin. Nach der Anregung gelangt das System zunächst in den  $D_3$ -Zustand, aus dem es nichtstrahlend innerhalb von 100 fs in den  $D_2$ -Zustand zerfällt.  $D_2$  zerfällt nach 0,9 ps zu  $D_1$ , der seinerseits zwei Zerfallskanäle aufweist. Der Hauptzerfallskanal zeigt eine Lebensdauer von 4,9 ps, der Nebenzfallskanal eine Lebensdauer von  $42 \pm 12$  ps. Abbildung entnommen aus Referenz [138]

## 4 Pyrenmodifizierte RNA

Wie im vorigen Kapitel dargelegt stellt die optische Spektroskopie ein verbreitetes Mittel zur Aufklärung von Struktur und Dynamik von Biomolekülen dar. Für die Untersuchung von DNA und RNA ist jedoch die weit im UV-Bereich um 260 nm liegende Absorption der Nucleobasen [64] ein signifikantes Hindernis. In diesem Bereich überlagert sich die Absorption der Nucleobasen mit der vieler Lösemittel und die Höhe der Photonenenergie führt leichter zu nichtlinearen Prozessen in optischen Komponenten. Zudem ist die Lebensdauer des angeregten Zustands der Nucleobasen mit einigen Pikosekunden sehr gering und sie weisen, daraus resultierend, kaum Fluoreszenz auf [4, 140–144]. Die Photophysik der Nucleobasen ist somit nur im Rahmen kurzlebiger Prozesse wie Energietransfer oder Delokalisation der Anregungsenergie als Observable geeignet [142, 145–147]. Zur Beobachtung längerlebiger Prozesse wie der Strukturänderung und Dynamik von Oligonucleotiden wird zweckmäßigerweise häufig entweder auf das stärker fluoreszente Adeninderivat 2-Aminopurin [148–150] oder auf ortsspezifisch eingebrachte Fluorophore zurückgegriffen.

Die empfindliche Reaktion der Fluoreszenz auf Veränderungen der Molekülumgebung (siehe auch Kapitel 2.1.2) erlaubt es beispielsweise, zwischen verschiedenen Konformationszuständen zu diskriminieren. Dies kann entweder mit Hilfe einzelner Chromophore [146, 151], mit Hilfe von Chromophorenpaaren auf Basis des Förstertransfers [152–157] oder der Formation von Exzimeren [158] geschehen [159, 160]. Auch bei der Studie der Leitfähigkeit von Oligonucleotiden kann auf geeignete Chromophore als Elektronendonoren und - akzeptoren zurückgegriffen werden [161, 162]. Eine weitere Anwendung des Zusammenspiels von Oligonucleotiden und Farbstoffen findet sich in der Möglichkeit, Chromophore anhand der regelmäßigen Struktur von DNA und RNA zu einer bestimmten, erwünschten Konformation anzuordnen. So können die Wechselwirkungen der Farbstoffe untereinander (beispielsweise in Form von Exzimeren) kontrolliert werden [163, 164]. Auch bei der Sequenzierung von DNA-Strängen wird oft auf die Modifikation mit Chromophoren zurückgegriffen [165, 166].

Zum Verständnis der beobachtbaren Effekte ist eine gründliche Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Oligonucleotiden und verwendetem Chromophor unerlässlich. Diese können je nach Zusammenstellung von Chromophor, Nucleobase, Verbindungspunkt und Verbindungsart aufgrund der elektronischen Struktur der beteiligten Moleküle und der Beeinflussung der Photophysik durch die Verbindung sehr unterschiedlich sein. Ein in diesem Zusammenhang häufig verwendeter Farbstoff ist Pyren, das sich im Rahmen vielfacher Studien als passender Chromophor zur Untersuchung von Nucleobasen herausgestellt hat.

Im folgenden Kapitel wird zur Untersuchung von Struktur, Dynamik und Photophysik von Modell-RNA-Strängen eben jener Farbstoff Pyren verwendet, dessen Eigen-



**Abbildung 4.1.** Molekülmodell des Farbstoffs Pyren ( $C_{16}H_{10}$ ).

schaften und Besonderheiten im Folgenden kurz dargestellt werden sollen. Im Anschluss daran folgt eine Untersuchung einer mit 1-Ethynylpyren an der 2-Position modifizierten Adeninbase, die als fluoreszierendes Element zur Beobachtung ausgewählter Modell-RNA-Stränge verwendet wurde.

## 4.1 Der Farbstoff Pyren

Unter den zur Modifizierung von DNA und RNA verwendeten Farbstoffen ist Pyren einer der am weitest verbreiteten. Pyren ( $C_{16}H_{10}$ , siehe Abbildung 4.1) gehört zu den polycyclischen Aromaten und wird in wissenschaftlichen Anwendungen vor allem aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften geschätzt [167]. Es zeigt hohe Quantenausbeuten und eine für aromatische Fluorophore ungewöhnlich lange Fluoreszenzlebensdauer im Bereich mehrerer hundert Nanosekunden (z.B.  $\Phi_Q = 0,65$ ;  $\tau = 382$  ns in Cyclohexan [168]).

Das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum ist, wie später in Abbildung 4.3 im Vergleich zum pyrenmodifizierten Nukleosid gezeigt, stark strukturiert und weist eine Reihe charakteristischer Banden auf. Die Struktur des Fluoreszenzspektrums ist abhängig von der Polarität des verwendeten Lösungsmittels und dient als Basis für die *Py*-Polaritätsskala [167–171]. Hierbei wird zur Polaritätsbestimmung der Quotient der Peakintensitäten bei 375 nm ( $I_1$ , 0-0-Übergang) und 384 nm ( $I_3$ , 0-2-Übergang) herangezogen. Die *Py*-Polaritätsskala ist, im Vergleich zu anderen empirisch hergeleiteten Skalen, relativ unempfindlich gegenüber der Bildung von Wasserstoffbrücken, so dass sie vor allem Anwendung in protischen Lösungsmitteln findet [169].

Pyren ist ebenfalls einer der bekanntesten Vertreter fluoreszierender Moleküle, die zur Bindung von Exzimerkomplexen in der Lage sind [158]. Bei einem Exzimer bildet sich aus einem angeregten und einem im Grundzustand befindlichen Molekül ein Komplex, der nur im angeregten Zustand existiert und der eine charakteristische Fluoreszenz aufweist, die im Vergleich zur Monomerfluoreszenz rotverschoben und deutlich ärmer an vibratorischer Struktur ist. Dieser Vorgang benötigt eine Distanz zwischen beiden Molekülen, die sich im Å-Bereich befindet, und tritt so nur bei genügend hoher Konzentration an Chromophoren oder bei künstlicher Fixierung zweier Chromophore direkt nebeneinander auf.

Der erste angeregte Zustand von Pyren ( $S_1$ , Symmetrie  ${}^1B_{2u}$ ) [172] ist entlang der kürzeren Molekülachse polarisiert und weist aufgrund des nahezu verschwindenden Extinktionskoeffizienten [167] eine sehr geringe Linienstärke auf. Der Grund hierfür liegt nicht, wie bei ähnlich gelagerten Fällen (beispielsweise den Karotinoiden) in der Symmetrie der beiden Zustände  $S_0$  (Symmetrie  ${}^1A_g$  [173]) und  $S_1$ , sondern in einem Zusammenspiel der einzelnen Faktoren des Übergangsmoments, die in einer verschwindenden

Übergangswahrscheinlichkeit enden. Anregung von Pyren erfolgt also in Gasphase und gelöstem Zustand überwiegend in den  $S_2$ -Zustand, der eine entlang der langen Molekülachse polarisierte  $^1B_{1u}$ -Symmetrie zeigt [172]. Die beiden angeregten Zustände liegen, zum Beispiel mit einem Unterschied von  $2700\text{ cm}^{-1}$  in Kohlenwasserstoffen [174], sehr nah beieinander. Interne Konversion in den  $S_1$ -Zustand erfolgt aufgrund starker vibronischer Kopplung sehr schnell innerhalb von 150 fs [172, 175].

## 4.2 Pyrenmodifizierte Nucleobasen

Seit mehr als 20 Jahren wird Pyren als Reportergruppe für die Beobachtung der Hybridisierung und der allgemeinen Eigenschaften von Nucleobasen eingesetzt [176]. Die im vorherigen Abschnitt beschriebene, starke Umgebungsabhängigkeit der Pyrenfluoreszenz erlaubt es, strukturelle Änderungen der unmittelbaren Molekülumgebung statisch oder zeitaufgelöst zu beobachten.

Im Verlauf der Jahre wurden, den jeweiligen Anwendungen entsprechend, eine Vielzahl verschiedener Anknüpfungsmöglichkeiten und -punkte von Pyren an Nucleobasen verwendet. Der Chromophor erfährt in Verbindung mit DNA und RNA ein breites Spektrum an intramolekularen Wechselwirkungen. Die am häufigsten angeführte Verwendung von Pyren in Verbindung mit RNA und DNA liegt auf dem Gebiet der Hybridisierungsstudien. Hier zeigt sich in einer Reihe verschiedener Untersuchungen, dass sich die Quantenausbeute von an einem Oligonucleotidstrang befestigten Pyren bei Hybridisierung dieses Stranges deutlich ändert [177–182]. Der Grund hierfür ist, anders als bei der oben erwähnten *Py*-Skala, struktureller Natur. Die Fluoreszenz des Farbstoffs wird durch benachbarte Basen aufgrund von Ladungstransferprozessen gelöscht [182, 183]. Dies ist vor allem bei Interkalation von Pyren in den Basenstapel oder bei Stapelung mit den Abschlussbasen eines Stranges zu beobachten [177, 184, 185], wo auch Exziplexe mit Nucleobasen auftreten können [186]. Dies, ebenso wie die generelle Fähigkeit des Farbstoffs zur Exzimerformation ist insbesondere zur Nutzung als molekularer Reporter des Hybridisierungsprozesses [160, 187–191] und im Rahmen der Erkennung bestimmter Sequenzen von Nutzen [192–197].

Bei Verwendung einer Ethinylverbindung zwischen Nucleobase und Pyren konnte beobachtet werden, dass das Pyren bei Anknüpfung an eine nicht basengepaarte Stelle in den gegenüberliegenden Strang interkaliert und somit dieses System die Möglichkeit bietet, Fehlbasen an spezifischen Stellen in langen Oligonucleotidsträngen zu erkennen [192, 198, 199]. Interkalation des Pyrens führt darüber hinaus im allgemeinen aufgrund der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit den Nucleobasen zu einer Stabilisierung der Molekülstruktur [200].

Bei direkter Verbindung mit Hilfe einer einfachen C-C-Bindung oder einer Ethinylbrücke zeigen die spektroskopischen Eigenschaften des Chromophors oft deutliche Charakteristika eines Ladungstransferzustands [201, 202]. Die Wechselwirkung dieses ladungsgetrenten Zustands mit den Nachbarbasen des modifizierten Nucleosids [203, 204] innerhalb eines Oligonucleotidstrangs eröffnet die Möglichkeit der Untersuchung von Ladungstransportprozessen durch einen DNA-*Nanowire* mit Pyren als Elektronendonator [162, 205].

Die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs Pyren bei Strukturänderungen der umgebenden RNA erlaubt auch zeitaufgelöste Studien von Bindungs- und Umordnungsreaktionen. Beispielsweise konnte so die Bindung von Substraten an das Ribozym [206] oder die Bindung kleiner RNAs durch die Q $\beta$ -Replikase [207] beobachtet werden.

Jenseits der Änderung der Quantenausbeuten sind die Auswirkungen der umgebenden Nukleobasen auf die Photophysik von Pyren jedoch deutlich weniger gut untersucht. Generell zeigen längere Verbindungen zwischen Pyren und der Base nur einen geringen Einfluss der Base auf die Photophysik des Farbstoffs [181]. Ähnliches ist auch bei einer Anbindung des Pyrens an den Zucker eines Oligonukleotids zu beobachten, wo auch bei einer direkten Verbindung nur geringe Wechselwirkungen auftreten [208]. Bei direkten Linkern oder Ethinylbrücken zwischen Pyren und der Basengruppe hingegen wird oft direkt ein als einzelner Fluorophor agierender Ladungstransferkomplex gebildet [202, 209], dessen Kopplungsstärke jedoch von der Orientierung der  $\pi$ -Systeme von Pyren und Nukleobase zueinander abhängt [210].

Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen an den oben erwähnten oder artverwandten Systemen wurden jedoch noch nicht in ähnlichem Umfang durchgeführt. Grundlegende Arbeiten zeigen, dass Pyren bei kovalenter Anbindung an aromatische Systeme mit einer deutlichen Veränderung seiner Photophysik reagiert, die sehr stark von der Art der Bindung und den verknüpften Molekülen abhängt. Oft spielen in diesen Systemen Ladungstransferzustände eine entscheidende Rolle [211–213]. Im Rahmen der Elektroneninjektionsstudien der Arbeitskreise Fiebig<sup>1</sup> und Wagenknecht<sup>2</sup> wurde die Photophysik von 5-(1-Ethinylpyrenyl)-2'-deoxyuridine in verschiedenen DNA-Strängen untersucht [162]. Eine ausführliche Arbeit von Thomas Netzel beschäftigt sich mit der Ladungstransferdynamik einer Reihe von Pyren-Uracil-Molekülen, ebenfalls im Hinblick auf die Erzeugung langlebiger Ladungstransferzustände in DNA [203].

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Modifikation der RNA-Base (Adenin) an der selten verwendeten 2-Position mit Hilfe von 1-Ethinylpyren. Das so entstehende Derivat bietet einige Vorteile. Einerseits verspricht die Verwendung von 1-Ethinylpyren eine starke elektronische Kopplung zwischen Farbstoff und Base [200, 210], andererseits lassen sterische Überlegungen vermuten, dass das Pyren bei dieser Anbindung in einer doppelsträngigen RNA in der *Minor Groove* zu Liegen kommen sollte [214], und somit eine Interkalation des Farbstoffs weniger wahrscheinlich wird. Dies ist insbesondere wünschenswert, da Interkalation einen signifikanten Eingriff in das System darstellt, was eine Beobachtung einer ungestörten RNA-Dynamik deutlich erschwert.

#### 4.2.1 Synthese

Die Synthese des pyrenmodifizierten Adenosins sowie der RNA-Stränge erfolgte im Arbeitskreis Engels der Universität Frankfurt<sup>3</sup> [214]. Als Vorstufe des modifizierten Nucleosids selbst wurde das 2-Iodoadenosin in einer vierstufigen Synthese aus Guanosin dargestellt [215–217]. In weiteren 6 Stufen erfolgte dann die Synthese eines ACE-geschützten

<sup>1</sup> Chemistry Department, Boston College

<sup>2</sup> Institut für Organische Chemie, Universität Regensburg

<sup>3</sup> AK Engels, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt

Phosphoamidits [218].

Für das untersuchte Pyrenadenin wurde das modifizierte, 3', 5', N6-geschützte 2-Iodoadenosin unter Sonogashira-Kupplungsbedingungen mit 1-Ethynylpyren umgesetzt. Die Oligonukleotide hingegen wurden mit Hilfe von Festphasensynthese auf Basis der ACE-Chemie in einem automatisierten Prozess dargestellt. An Stelle der modifizierten Base wurde das vorher synthetisierte Phosphoamidid eingesetzt. Diese iodinierten Oligonukleotide wurden dann mit 1-Ethynylpyren analog der Basensynthese in einer Pd-katalysierten Sonogashira-Kupplungsreaktion unter Schutzgasatmosphäre in einer Festphasensynthese mit 1-Ethynylpyren zur Reaktion gebracht [219] und mit Hilfe von Anionenaustausch-HPLC aufgereinigt.

Die so erstellten Oligonukleotide wurden mit Hilfe von MALDI-Massenspektrometrie charakterisiert [220]. Die Doppelstränge wurden, um korrekte Hybridisierung zu gewährleisten, schnell auf 80 °C aufgeheizt und dann langsam auf Raumtemperatur wieder abgekühlt.

Alle RNA-Messungen wurden in Phosphatpuffer mit 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 140 mM NaCl bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt.

#### 4.2.2 Vorcharakterisierung der Modell-RNA

Zur Untersuchung der Tauglichkeit des pyrenmodifizierten Adenosins als Probe für das Schmelzverhalten und die innere Dynamik von RNA wurden im Arbeitskreis Engels der Universität Frankfurt eine Reihe verschiedener modifizierter und unmodifizierter RNA-Stränge synthetisiert, die im Folgenden untersucht werden. In Tabelle 4.1 findet sich eine Zusammenstellung aller hergestellten Oligonukleotide. Hierbei symbolisiert A die Modifikation des Strangs durch ein pyrenmodifiziertes Adenin, während der unmodifizierte Strang durch B gekennzeichnet wird. Die Stränge 1-4 zeichnen sich dadurch aus, dass die das Pyrenadenin flankierenden Basen verändert wurden. Die Stränge 5-8 formen vollständig basengepaarte Duplexe mit 1-4. Die Stränge 9 und 10 können miteinander einen vollständig basengepaarten Duplex formen und liegen sowohl modifiziert als auch unmodifiziert vor. Im weiteren werden Einzelstränge durch die entsprechende Nummer und den dazugehörigen Suffix (z.B. 1A), die Doppelstränge durch Aneinanderreihung der Einzelstrangbezeichnungen (z.B. 1A5B) dargestellt.

Um sicher zu stellen, dass die einander komplementären Stränge sowohl in Anwesenheit wie in Abwesenheit der Pyrenmodifikation Doppelhelices formen, wurden im Arbeitskreis Engels CD-Spektren (*Circular Dichroism*) aller modifizierten und unmodifizierten Stränge aufgenommen, die in Abbildung 4.2 dargestellt sind. Deutlich zeigt sich, dass die RNA-Stränge sowohl in modifizierter, als auch in unmodifizierter Form die Charakteristik einer A-Form annehmen [221, 222]. Kleinere Änderungen, durch die leicht unterschiedliche lokale Struktur der jeweiligen Duplexe bedingt, sind im Vergleich zu dem Gesamtsignal deutlich weniger ausgeprägt. Im weiteren kann also davon ausgegangen werden, dass auch die modifizierten RNA-Stränge mit kleinen Variationen in der A-Form vorliegen.

Der doppelt modifizierte RNA-Strang 9A10A zeigt zudem ein weiteres, auf helikale Struktur hindeutendes Signal in der Region der Absorption des pyrenmodifizierten Nucleosids. Es kann also geschlossen werden, dass die beiden Pyrene in der endgültigen

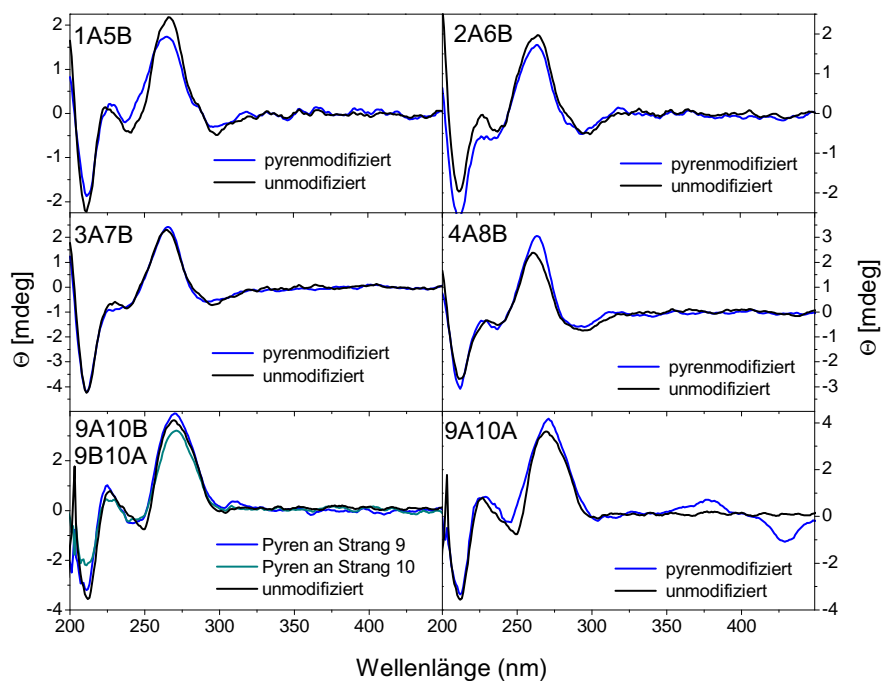
**Tabelle 4.1.** Liste der untersuchten RNA-Einzelstränge: A steht für die Modifikation des jeweiligen Stranges durch ein pyrenmodifiziertes Adenin, B steht für die unmodifizierten Stränge.

Code	Sequenz
<b>1A</b>	5'-UAC GCA AA <sup>Py</sup> A ACG CAU-3'
<b>2A</b>	5'-UAC GCA CA <sup>Py</sup> C ACG CAU-3'
<b>3A</b>	5'-UAC GCA GA <sup>Py</sup> G ACG CAU-3'
<b>4A</b>	5'-UAC GCA UA <sup>Py</sup> U ACG CAU-3'
<b>5B</b>	5'-AUG CGU UUU UGC GUA-3'
<b>6B</b>	5'-AUG CGU GUG UGC GUA-3'
<b>7B</b>	5'-AUG CGU CUC UGC GUA-3'
<b>8B</b>	5'-AUG CGU AUA UGC GUA-3'
<b>9A</b>	5'-CUU UUC A <sup>Py</sup> UU CUU-3'
<b>9B</b>	5'-CUU UUC AUU CUU-3'
<b>10A</b>	5'-AAG AA <sup>Py</sup> U GAA AAG-3'
<b>10B</b>	5'-AAG AAU GAA AAG-3'

Struktur nahe genug beieinander liegen, um bereits im elektronischen Grundzustand miteinander in Wechselwirkung zu treten und einen Komplex auszubilden, der der generellen helikalen Form der RNA folgt.

Eine erste Charakterisierung und Einstufung der Wechselwirkungen zwischen dem angehängten Pyren und den RNA-Duplexen kann durch einen Vergleich der Schmelzpunkte der unmodifizierten sowie der modifizierten RNA erreicht werden, die im Arbeitskreis Engels direkt nach der Synthese aufgenommen wurden. Ein üblicher und auch in dieser Arbeit verwendeter Marker für das Bestimmen der Schmelzpunkte von RNA ist die Änderung der Oszillatorstärke des 260 nm-Überganges der RNA-Basen, die innerhalb eines Duplex aufgrund der stärkeren  $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen der Basen untereinander eine deutliche Schwächung gegenüber dem Einzelstrang erfährt. Als Schmelztemperatur wird hierbei unter Annahme eines reinen Zweizustandssystems der Wendepunkt der Schmelzkurve definiert [223]. Tabelle 4.2 zeigt eine Zusammenstellung der aus der Beobachtung der 260 nm-Bande erhaltenen Schmelzpunkte. Es ist deutlich zu sehen, dass die Einführung des Farbstoffs in die Duplexe in allen einfach modifizierten Strängen eine Destabilisierung der RNA mit sich bringt, da die modifizierten Stränge insgesamt niedrigere Schmelztemperaturen im Vergleich zu den unmodifizierten Varianten aufwei-





**Abbildung 4.2.** CD-Spektren der modifizierten und unmodifizierten RNA-Duplexe: Durch die Modifikation mit Pyren wird die Struktur der RNA nur wenig verändert. Der doppelt modifizierte Duplex zeigt ein Signal im Bereich der Pyrenbande und deutet somit an, dass die beiden Pyrene an Strang 9A10A einer Kopplung unterliegen.

sen. Dies ist darauf zurück zu führen, dass durch das Pyren dem Duplex strukturelle Änderungen aufgezwungen werden, die die lokale Struktur der RNA um das Pyren herum deutlich ändern, ohne jedoch die übergeordnete Struktur einer A-Helix, wie sie in den CD-Spektren nachgewiesen wurde, nachhaltig zu beeinflussen. Der Vollständigkeit halber sollte jedoch erwähnt werden, dass mit Hilfe der CD-Spektren nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, dass Wasserstoffbrückungen der Basenpaarung des pyrenmodifizierten Adenins oder der Nachbarbase aufgrund der Modifikation durchbrochen wurden.

Die Destabilisierung der Stränge durch das Pyren ist jedoch je nach RNA-Sequenz durchaus verschieden stark. Dies zeigt sich insbesondere im Vergleich der beiden Duplexe 9A10B und 9B10A, die eine identische Sequenz besitzen und sich nur im Anknüpfungspunkt des Pyrens unterscheiden. 9A10B erfährt eine verhältnismäßig schwache Destabilisierung von  $\Delta T_m = -6,3^\circ\text{C}$ , während die Störung im Strang 9B10A nahezu doppelt so groß ist.

Hieraus lässt sich folgern, dass Pyren, je nach der es umgebenden Sequenz, unterschiedliche Positionen innerhalb des Duplex einnehmen kann. Eine genaue Spezifikation dieser Positionen kann jedoch mit der hier gezeigten Datenlage noch nicht erfolgen und

**Tabelle 4.2.** Vergleich der Schmelztemperaturen modifizierter und unmodifizierter RNA-Stränge, gemessen im Rahmen der Analyse im AK Engels (Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt): Generell bewirkt, wie an den sinkenden Schmelztemperaturen ersichtlich, das Einbringen eines Pyrens eine Destabilisierung des entsprechenden Duplex. Bei der Einbringung eines zweiten Pyrens entsteht jedoch ein stabilisierender Effekt aufgrund der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen der beiden Farbstoffe untereinander, die Schmelztemperatur steigt.

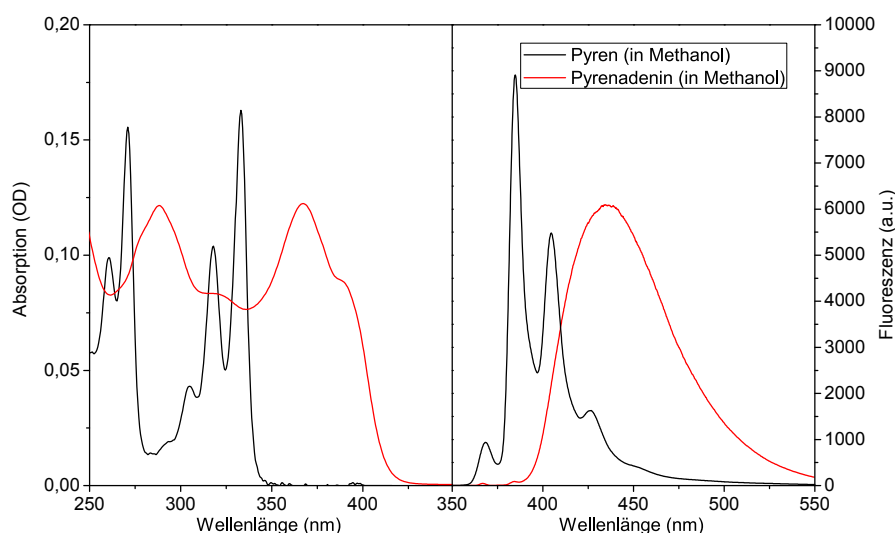
Duplex	$T_m/^\circ\text{C}$ (unmodifiziert)	$T_m/^\circ\text{C}$ (modifiziert)	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$
<b>1A5B</b>	68,9	59,8	-9,1
<b>2A6B</b>	73,2	62,1	-11,1
<b>3A7B</b>	73,1	67,4	-5,7
<b>4A8B</b>	61,3	57,1	-4,2
<b>9A10B</b>	42,2	35,9	-6,3
<b>9B10A</b>	42,2	30,0	-12,2
<b>9A10A</b>	42,2	45,4	3,3

wird ausführlich in Abschnitt 4.4.3 diskutiert.

Auffällig ist, dass der doppelt modifizierte Strang 9A10A im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Komplexen eine Stabilisierung erfährt ( $\Delta T_m = 3,3^\circ\text{C}$ ). Dies ist auf räumliche Nähe beider Pyrene zurückzuführen, die ebenfalls Stapelwechselwirkungen ausführen können und somit die Schmelztemperatur des Gesamtstrangs trotz der offensichtlich größeren Störung erhöhen [224, 225]. Möglich wäre beispielsweise auch die Bildung eines künstlichen Basenpaares innerhalb des RNA-Strangs, das zur Stabilisierung beiträgt.

### 4.3 Spektroskopie des modifizierten Nukleosids

Der Untersuchung der modifizierten RNA-Stränge muss eine gründliche Analyse der Spektren des modifizierten Nukleosids vorausgehen. Hierbei soll eine Analyse der Veränderung der Pyrenspektren im Vergleich zu denen des freien Farbstoffs ersten Aufschluss darüber geben, wie stark die Kopplung zwischen Pyren und Adeninbase ist, und wie sich die Wechselwirkungen zwischen den beiden Molekülteilen auf die optischen Eigenschaften des Pyrenadenins auswirken. Abbildung 4.3 zeigt im linken Abbildungsteil die Absorptionsspektren von Pyren (schwarz) und Pyrenadenin (rot) in Methanol. Die Unterschiede zwischen den beiden Proben sind deutlich zu erkennen.



**Abbildung 4.3.** Links: Absorptionsspektren von Pyren sowie von der pyrenmodifizierten Base in Methanol. Rechts: Monomerfluoreszenzspektrum von Pyren sowie der pyrenmodifizierten Base in Methanol.

Pyren selbst zeigt eine deutliche Struktur des Absorptionsspektrums mit drei Hauptbanden bei 305 nm, 320 nm und 335 nm. Diese sind dem  $S_0$ - $S_2$ -Übergang zuzuordnen, da der  $S_0$ - $S_1$ -Übergang von Pyren eine deutlich geringere Oszillatorstärke als die des  $S_0$ - $S_2$ -Übergangs [168] aufweist. Im Kontrast dazu zeigt die pyrenmodifizierte Adeninbase ein deutlich verändertes Spektrum mit großer Verbreiterung der einzelnen Linien und einer Veränderung der generellen Bandenstruktur, so dass es deutlich schwieriger ist, einzelne Übergänge zu unterscheiden.

Generell erfährt das Spektrum eine Rotverschiebung von etwa 50 nm, was in diesem Bereich einer Energieverschiebung von etwa 1,17 eV entspricht. Diese Rotverschiebung gemeinsam mit der Änderung der Form des Absorptionsspektrums deutet auf eine Delokalisation der Elektronendichte über das gesamte Pyrenadenin hin, wie sie in vergleichbarer Form auch bei pyrenmodifizierten DNA-Basen zu beobachten ist [162]. Sie entsteht durch die Präsenz sowohl der Base als auch der verwendeten Ethinylbrücke, da weder 1-Ethynylpyren, noch ein über eine einfache C-C-Bindung an eine Nucleobase gekoppeltes Pyren einen vergleichbaren Effekt zeigen [226].

Die Verschiebung der Absorptionsbande höher angeregter Zustände ist geringer und beträgt nur etwa 25 nm. Nichts desto trotz deutet das generelle Auftreten der Verschiebung auch höherenergetischer Banden darauf hin, dass es sich bei der niederenergetischen Absorptionsbande eher um eine verschobene  $S_2$ -Bande als um eine in ihrem Übergangsmoment verstärkte  $S_1$ -Bande handelt.

**Tabelle 4.3.** Lösemittel für die Untersuchung der Umgebungsabhängigkeit des pyrenmodifizierten Adenins

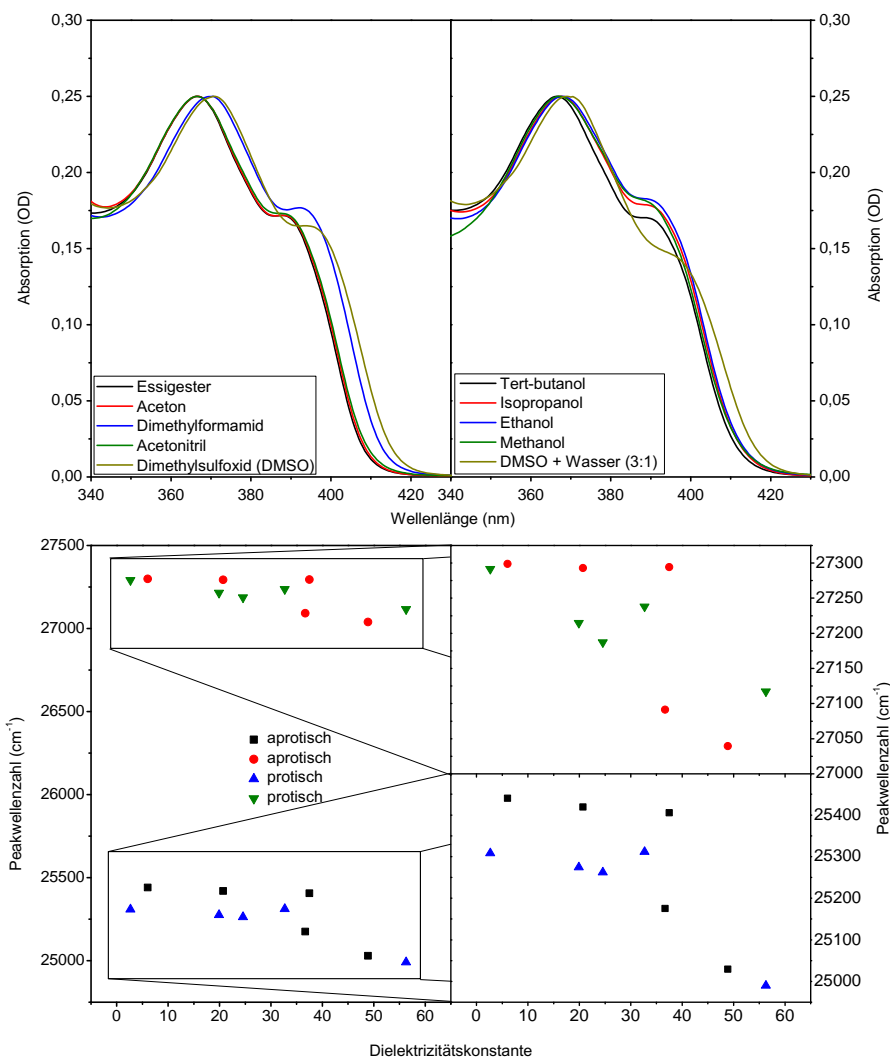
Lösemittel	Summenformel	Dielektrizitätskonstante	protisch
Tert-butanol	$C_4H_{10}O$	2,66	X
Essigester	$C_4H_8O_2$	6,02	
Isopropanol	$C_3H_8O$	19,92	X
Aceton	$C_3H_6O$	20,7	
Ethanol	$C_2H_6O$	24,55	X
Methanol	$CH_4O$	32,7	X
Dimethylformamid	$C_3H_7NO$	36,7	
Acetonitril	$C_2H_3N$	37,5	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$C_2H_6OS$	48,9	
DMSO + Wasser (3:1)	$C_2H_6OS, H_2O$	56,3	X

Es ist deutlich zu erkennen, dass aufgrund der Kopplung des Pyrens an die Adeninbase profunde Veränderungen in der elektronischen Struktur des Moleküls entstehen, die sich noch deutlicher im Fluoreszenzspektrum widerspiegeln. Letzteres weist keinerlei vibronische Struktur mehr auf und ist im Vergleich zu dem des Pyrens um etwa 50 nm rotverschoben. Auch hier zeigt sich die starke Wechselwirkung zwischen Pyren und der Adeninbase. Das Auftreten einer breiten, strukturlosen Fluoreszenzbande ist ein deutlicher Indikator für die Existenz eines Ladungstransferzustandes [202, 209].

Im folgenden wird nun eine genauere Untersuchung der Pyrenadeninspektren unter Zuhilfenahme verschiedener Lösemittel durchgeführt.

#### 4.3.1 Lösemittelabhängigkeiten

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Pyrenadenin mit verschiedenen Umgebungen wurde das Chromophor in insgesamt 10 verschiedene Lösemittel solvatisiert, die in Tabelle 4.3 aufgeführt sind. Wichtig hierbei war insbesondere, dass sowohl protische als auch aprotische Lösungsmittel vertreten sind, und der gesamte Polaritätsbereich, in dem sich Pyrenadenin löst, ausgenutzt wird.



**Abbildung 4.4.** Oben: Absorptionsspektrum von pyrenmodifiziertem Adenin in verschiedenen Lösemitteln bei einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$ . Zum besseren Vergleich der spektralen Charakteristika wurde die Absorption der höherenergetischen Bande auf eine Optische Dichte von 0,25 künstlich festgesetzt. Links: aprotische Lösemittel, rechts: protische Lösemittel. Unten: Zentralwellenlängen der beiden Absorptionspeaks unter der Annahme von Gaussprofilen in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstanten der verwendeten Lösemittel.

Untersuchungen an anderen pyrenmodifizierten Basen zeigen, dass die Ausbildung von Wasserstoffbrücken einen signifikanten Einfluss auf insbesondere das Fluoreszenzspektrum ausübt, da die entstehenden, ladungstrennten Zustände durch Wasserstoffbrücken deutlich stabilisiert werden können [226, 227]. Auf der anderen Seite ist eine Reaktion des Fluoreszenzspektrums auf die Polarität, und somit die Dielektrizitätskonstante, des Lösemittels charakteristisch für Ladungstransferzustände, da bei steigender

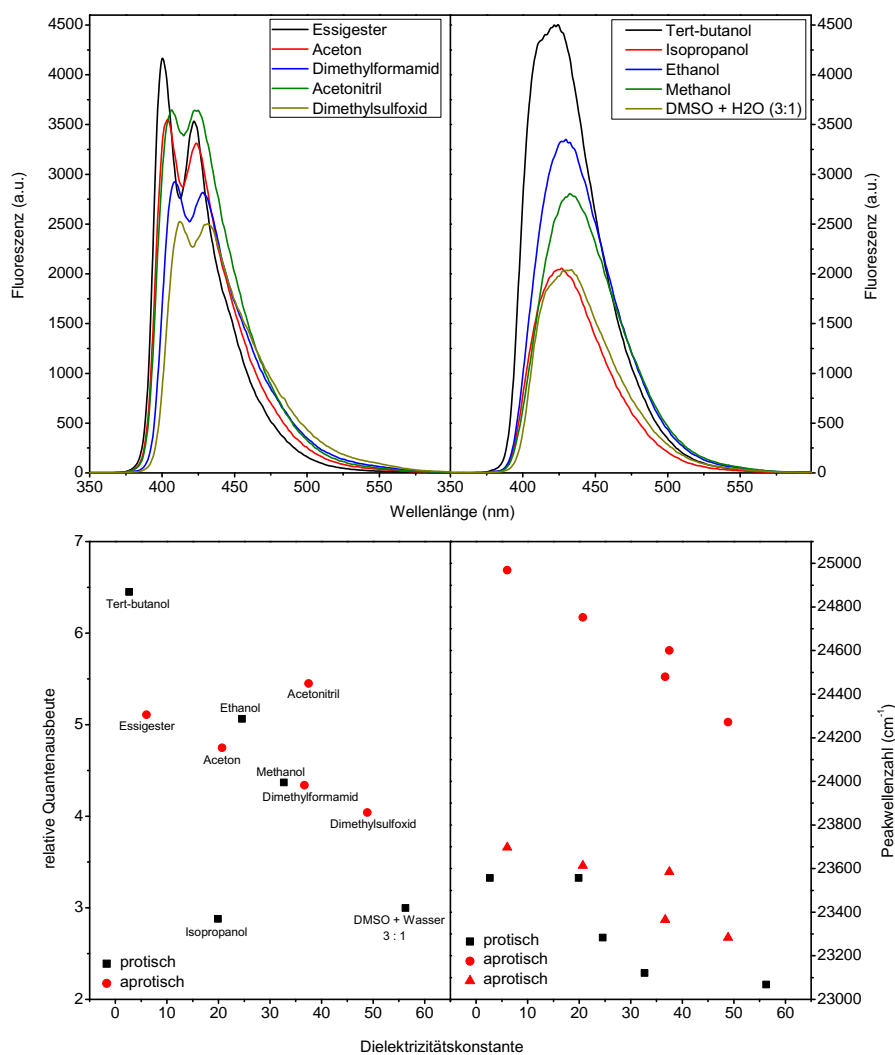
Polarität auch eine stärkere Stabilisierung ladungstrennter Zustände erfolgt.

Abbildung 4.4 oben zeigt die unterste Absorptionsbande des pyrenmodifizierten Adenins in verschiedenen Lösemitteln. Um einen leichteren Vergleich zu ermöglichen wurde die Intensität aller Spektren im Maximum des Peaks um 367 nm auf 0,25 festgesetzt. Auf der linken Seite sind die aprotischen, auf der rechten Seite die protischen Lösemittel dargestellt. Allen Spektren ist eine von zwei deutlich erkennbaren Banden mit einem Abstand von etwa  $1500\text{ cm}^{-1}$  zueinander dominierte Struktur zu eigen.

In aprotischen Lösemitteln lassen sich anhand der Spektren in Abbildung 4.4 zwei Gruppen ausmachen. Pyrenadenin zeigt in Essigester, Aceton und Acetonitril nahezu identische Absorptionsspektren, während sich die Spektren in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid deutlich davon unterscheiden. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei den protischen Lösemitteln zu sehen, wo in Tert-butanol, Ethanol und Methanol ähnliche Spektren auftreten, die sich allerdings untereinander deutlich stärker unterscheiden als es bei den aprotischen Lösemitteln beobachtet wurde. Die Unterschiede treten sowohl im Intensitätsverhältnis der beiden Peaks zueinander als auch in der Zentralwellenlänge der Banden auf. Zur Quantifizierung dieses Effekts wurden die im oberen Teil der Abbildung gezeigten Spektren mit einer Überlagerung zweier gaußförmiger Banden angepasst. Diese Annahme stellt sicherlich eine grobe Näherung der wirklichen Verhältnisse dar, liefert jedoch für die angestrebte Untersuchung zufriedenstellende Datenanpassungen. Die so erhaltenen Zentralwellenlängen sind im unteren Teil von Abbildung 4.4 aufgetragen. Bei steigender Dielektrizitätskonstante ist eine Tendenz zu niedrigeren Übergangsenergien hin zu erkennen. Es ist jedoch deutlich, dass die Polarität des Lösemittels insbesondere bei aprotischen Lösemitteln nicht der einzige Einfluss auf die Position der Absorptionsbanden ist. Wie auch schon in den Spektren zu sehen, zeigt Pyrenadenin insbesondere in Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, pur ebenso wie im Gemisch mit Wasser, eine deutlich größere Rotverschiebung der Spektren als in den anderen Lösemitteln, so dass hier möglicherweise zusätzliche Wechselwirkungen der elektronischen Systeme von Lösemittel und Pyrenadenin auftreten.

Abschließend kann aus den Absorptionsspektren nicht zweifelsfrei gefolgert werden, wie stark der Ladungstransfercharakter des Grundzustands ist, da die Evolution der Absorptionsbanden mit steigender Lösemittelpolarität mit hoher Wahrscheinlichkeit durch andere Effekte überlagert wird, deren genauere Natur in weiteren Untersuchungen quantifiziert werden muss.

In ähnlicher Weise sollen auch die Fluoreszenzspektren einer genaueren Betrachtung unterzogen werden. In Abbildung 4.5 oben sind links die Spektren in aprotischen, rechts die Spektren in protischen Lösemitteln zu erkennen. Hier ist der Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen deutlich zu sehen. Die Pyrenadeninspektren in aprotischen Lösemitteln zeigen eine Struktur mit zwei verschiedenen Banden, die etwa  $1300\text{ cm}^{-1}$  auseinanderliegen. Die Struktur ist ausgeprägter in Essigester und Aceton und wird, wie bei vielen Chromophoren üblich [36, 167, 228], bei steigender Polarität der Lösemittel weniger deutlich. Die Struktur ist in protischen Lösemitteln nicht mehr zu erkennen, zusätzlich erscheint das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zu aprotischen Lösemitteln rotverschoben. Dies ist im Einklang mit ähnlichen Effekten an 1-Ethynylpyren-Uracil-Komplexen [162, 203] sowie an Pyren-Uracil-Komplexen [203, 227]. Der Grund für die sich stark verändernden Fluoreszenzspektren liegt in dem Zusammenspiel aus der Fluoreszenz des lokal angeregten Pyrens und eines Ladungstransferzustandes. Die Präsenz



**Abbildung 4.5.** Oben: Fluoreszenzspektrum von pyrenmodifiziertem Adenin in verschiedenen Lösemitteln bei einer Konzentration von  $5 \mu\text{M}$ . Die Spektren wurden um die Absorption bei der Anregungswellenlänge von  $380 \text{ nm}$  korrigiert. Links: aprotische Lösemittel, rechts: protische Lösemittel. Unten links: Relative Quantenausbeute des Pyrenadenins in verschiedenen Lösemitteln, bestimmt durch Integration der Fluoreszenzspektren und Normierung auf die Absorption bei der Anregungswellenlänge. Unten rechts: Zentralwellenlängen der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Dielektrizitätskonstante.

von Wasserstoffbrücken erleichtert den Ladungstransfer und führt somit zu einer Dominanz des Ladungstransferzustandes im Spektrum. Studien an pyrenmodifiziertem Uracil weisen darauf hin, dass sich das Fluoreszenzspektrum dieses Zustandes über die gesamte Pyrenmonomerfluoreszenz erstreckt und somit bei effizientem Ladungstransfer die

gesamte Monomerfluoreszenz überdecken kann [203].

Genauere Informationen über die Natur der beobachteten Fluoreszenz liefert auch die Untersuchung der spektralen Position des Fluoreszenzmaximums in Abhängigkeit von der Polarität des verwendeten Lösemittels, wie es in Abbildung 4.5 unten rechts dargestellt ist. Bei steigender Lösemittelpolarität erfolgt eine Verringerung der Energie des Übergangs. Dies kann durch eine Stabilisierung des ladungsgetrennten fluoreszierenden Zustands aufgrund der Reorganisation des Lösemittels erklärt werden [229, 230]. Deutlich ist zu sehen, dass sowohl die einzelnen Fluoreszenzmaxima in protischen Lösemitteln (schwarze Quadrate) als auch beide Fluoreszenzmaxima in aprotischen Lösemitteln (rote Kreise, rote Dreiecke) in etwa derselben Polaritätsabhängigkeit folgen. Dies spricht dagegen, dass die Fluoreszenzmaxima von Pyrenadenin in aprotischen Lösemitteln einem reinen lokal angeregten und einem Ladungstransferzustand respektive zuzuordnen sind, da beide Zustände eine deutlich unterschiedliche Polaritätsabhängigkeit aufweisen sollten. Vielmehr lässt diese Datenlage die Vermutung zu, dass in den vorliegenden Fällen die Fluoreszenz des lokal angeregten Pyrens so stark von der Fluoreszenz des Ladungstransferzustandes überlagert wird, daß beide nicht getrennt voneinander beobachtet werden können und somit auch in aprotischen Lösemitteln ein signifikanter Teil der Fluoreszenz aus einem ladungsgetrennten Zustand emittiert wird.

Zusätzlich hierzu wurde auch die Entwicklung der Quantenausbeute  $q_e$  mit der Polarität des Lösemittels untersucht, wie in Abbildung 4.5 unten links zu sehen ist. Obwohl die angegebenen Werte nicht die direkte Quantenausbeute darstellen, da sie einzig durch Integration der Fluoreszenzspektren und Division durch die Absorption bei der jeweiligen Anregungswellenlänge erhalten wurden, stellen, sind sie als Vielfaches von  $q_e$  zu betrachten und können so untereinander verglichen werden.

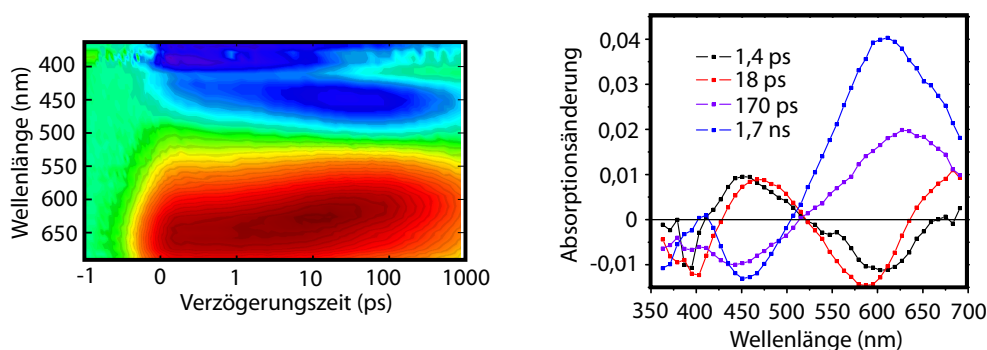
Bei steigender Polarität sinkt  $q_e$  insgesamt, wobei sowohl in Isopropanol als auch in Acetonitril zusätzliche Effekte zu einer deutlichen Veränderung von  $q_e$  führen. Insgesamt verläuft diese Absenkung in protischen Lösemitteln steiler als in aprotischen, was gemeinsam mit den zuvor gezogenen Folgerungen den Schluss nahe legt, dass die Quantenausbeute des Ladungstransferzustands durch die Polarität des Lösemittels stärker als die des lokal angeregten Zustands beeinflusst wird.

Zur genaueren Klärung der Wechselwirkungen zwischen Ladungstransfer- und lokal angeregtem Zustand soll nun in einem nächsten Schritt die schnelle angeregte Zustandsdynamik des pyrenmodifizierten Adenins in verschiedenen Lösemitteln einer genaueren Untersuchung unterzogen werden.

### 4.3.2 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Mit Hilfe zeitaufgelöster Spektroskopie lässt sich ein deutlicherer Einblick in die Photophysik des pyrenmodifizierten Adenins gewinnen. Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt transiente Absorptionsspektren des pyrenmodifizierten Nukleosids aufgenommen. Die Anregung erfolgte hierbei mit Hilfe der frequenzverdoppelten Laserfundamentalen bei 387,5 nm mit einer Energie von 100 nJ pro Puls. Zur Abtastung der transienten Absorption wurde Weißlicht in einer Ca<sub>2</sub>F-Scheibe erzeugt, mit Hilfe dessen dann 42 Transienten im Abstand von 8 nm beginnend bei 343 nm aufgenommen wurden. Die Probenkonzentration wurde auf 50  $\mu$ M eingestellt. Abbildung 4.6 zeigt im





**Abbildung 4.6.** Links: 2D-Spektrum des pyrenmodifizierten Adenins in Methanol. Rechts: Zerfallsassoziierte Spektren (DAS) der Messung der schnellen Photodynamik des pyrenmodifizierten Adenins in Methanol. Die Daten wurden mit dem Absorptionssignal des Lösemittels korrigiert und die Nullpunktkorrektur mit Hilfe einer zuvor durchgeführten Messung von Rhodamin 6G vorgenommen.

linken Abbildungsteil eine Übersicht über die erhaltene Photodynamik. Die gesamte angeregte Zustandsdynamik des Pyrenadenins unterscheidet sich sehr deutlich von der des ungebundenen Pyrens, das wie in Kapitel 4.1 angeführt eine Lebensdauer von mehr als 100 ns zeigt und unterstreicht so die bereits im vorigen Abschnitt angedeutete Stärke der Kopplung zwischen dem Farbstoff und der Base. Es lassen sich innerhalb des 2D-Spektrums drei verschiedene Bereiche ausmachen, deren Dynamik das System bestimmt. Unterhalb von 400 nm findet sich als negatives Signal die Grundzustandsabsorption, die eine ähnliche Charakteristik (eine Bande und eine ausgeprägte Schulter) wie das statische Absorptionsspektrum zeigt. Um 450 nm herum ist die stimulierte Emission zu erkennen, deren Wellenlängenbereich sich mit der der statischen Fluoreszenz in Verbindung bringen lässt. Diese Bande zeigt eine deutliche Rotverschiebung auf der Zeitskala mehrerer 10 ps und verschwindet erst gegen Ende des Beobachtungszeitraums. Korrespondierend dazu zeigt die angeregte Zustandsabsorption (ESA) oberhalb von 500 nm eine Blauverschiebung auf ähnlichen Zeitskalen und annähernd dieselbe Zerfallsdynamik wie die stimulierte Emission.

Der gegenläufige dynamische Shift, der sich in stimulierter Emission und ESA finden lässt, ist bereits aus den Messungen an 1-Ethynylpyrenmodifiziertem Uracil bekannt [162]. Er ist ein Anzeichen für die Formation des bereits mehrfach erwähnten Ladungstransferzustandes, der energetisch günstiger als der neutrale Zustand ist. Im rechten Abbildungsteil von Abbildung 4.6 sind die aus der globalen Fitanalyse (siehe Anhang B.2) resultierenden zerfallsassoziierten Amplitudenspektren (DAS) dargestellt. Vier Zeitkonstanten waren nötig, um die Dynamik der Probe ausreichend zu beschreiben. Um diese Prozessen zuzuordnen ist eine genauere Betrachtung der Wellenlängencharakteristik der DAS vonnöten.

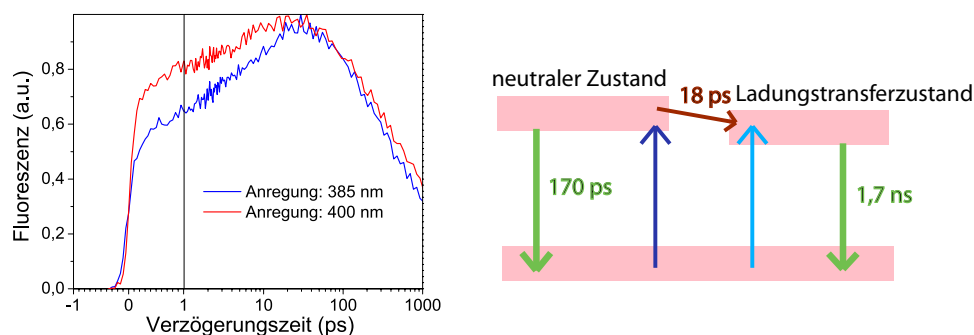
- Das DAS der kürzesten Zeitkonstante  $\tau_1$  mit einem Wert von 1,4 ps zeigt einen negativen Beitrag im Bereich der ESA, eine positive Komponente in der Region der stimulierten Emission und ein ebenfalls negatives Signal bei einem Teil der Grundzustandsabsorption. Den Betrachtungen aus Kapitel 3.3 folgend kann dies als Zunahme der Population des untersten angeregten Zustandes interpretiert werden. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass wie in Abschnitt 4.1 erwähnt, die Anregung von Pyren hauptsächlich in den  $S_2$ -Zustand erfolgt [167, 172, 175]. Erweiterungen

des aromatischen Systems von Pyren führen selbst bei deutlicher Änderung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren nicht zwangsläufig zu einer Stärkung des  $S_0$ - $S_1$ -Übergangs [172, 211, 212], so dass auch in dem vorliegenden System möglicherweise eine Anregung in den  $S_2$ -Zustand vorliegt. Weder die ermittelte Lebensdauer für diesen Prozess noch die spektralen Charakteristika können jedoch die Interpretation dieses Prozesses als dynamischen Shift innerhalb eines einzelnen angeregten Zustandes ausschließen. Dieser könnte je nach Form der angeregten Zustandsfläche zu ähnlichen DAS führen.

- Die zweite Zeitkonstante  $\tau_2 = 18$  ps kann mit der Blauverschiebung der ESA und der Rotverschiebung der stimulierten Emission in Verbindung gebracht werden. Sie zeigt einen negativen Beitrag im höherenergetischen Teil der ESA, der sich aus dem niederenergetischen Teil der ESA speist und bis jenseits des Beobachtungsfensters über 700 nm hinaus erstreckt. Dazu korrespondierend tritt eine positive Komponente im niederenergetischen Teil der Bande der stimulierten Emission auf. Diese Charakteristika können mit der Population eines niederenergetischeren Zustandes als der  $S_1$ -Zustand des Pyrenadenins erklärt werden. Sie werden im Einklang mit vorherigen Arbeiten [162, 172, 211, 212] und mit den zuvor durchgeführten statischen Fluoreszenzstudien als Population eines Ladungstransferzustandes interpretiert.
- Die dritte Zeitkonstante  $\tau_3 = 170$  ps weist ebenso wie die vierte Zeitkonstante  $\tau_4 = 1,7$  ns negative Beiträge im Bereich des Grundzustandsbleichens und der stimulierten Emission und positive Amplitudenbeiträge im Bereich der ESA auf. Beide Komponenten lassen sich somit gut als strahlende Zerfälle in den Grundzustand interpretieren.  $\tau_3$  und  $\tau_4$  weisen leicht unterschiedliche spektrale Charakteristika auf.  $\tau_3$  lässt sich aufgrund der niederenergetischeren ESA-Komponente und der höherenergetischeren Emissionskomponente als Zerfall eines energetisch im Vergleich zu  $\tau_4$  leicht höher liegenden Zustandes deuten. Es liegt somit nahe, dass  $\tau_4$  den Zerfall des Ladungstransferzustandes beschreibt, während sich die Lebensdauer  $\tau_3$  dem neutralen Zustand des Pyrenadenins zuordnen lässt.

Zusammenfassend zeigt die schnelle Photophysik des pyrenmodifizierten Nukleosids also zwei verschiedene fluoreszente Zustände, deren Population und Zerfall auf unterschiedlichen Zeitskalen beobachtet werden kann. Die Charakteristik der Fluoreszenz der Proben ebenso wie vorherige Studien an ähnlich gearteten Systemen deuten darauf hin, dass es sich bei den beiden Zuständen um einen angeregten Pyrenadeninzustand sowie einen Ladungstransferzustand handelt. Aus den vorliegenden Daten lässt sich jedoch noch nicht abschätzen, ob der Übergang in den Ladungstransferzustand direkt nach der Anregung oder zu einem späteren Zeitpunkt der Zerfallskaskade auftritt. Insbesondere die Natur der Zerfallszeit  $\tau_1$  ist nicht vollkommen geklärt. Hierzu wäre es nötig, die Photophysik des Pyrenadenins in Abhängigkeit von der Anregungsenergie zu beobachten.

Ein solches Experiment wurde mit Hilfe der Fluoreszenzaufkonvertierung durchgeführt. Die spektrale Abstimmbarkeit des verwendeten Lasers (siehe Kapitel 2.4.3) ermöglicht es, mit Hilfe der Frequenzverdopplung verschiedene Anregungswellenlängen innerhalb der Absorptionsbande des Pyrenadenins zu generieren. Es wurden also zwei Messreihen mit Anregungswellenlängen von 385 nm und 400 nm durchgeführt. In beiden Fällen wurde die Fluoreszenz bei 450 nm aufgenommen und über 50 Scans gemittelt. Abbildung 4.7 zeigt im linken Teil das Ergebnis der beiden Aufkonvertierungsmessungen. Die Transienten zeigen sehr ähnliches Zeitverhalten, das sich auch mit der beobachteten Dynamik der stimulierten Emission aus dem vorherigen Experiment in Verbindung bringen lässt. Bei beiden Anregungsenergien ist zunächst ein Anstieg der Fluoreszenz



**Abbildung 4.7.** Links: Fluoreszenz-Aufkonvertierung von Pyrenadenin in Methanol. Die Anregung erfolgte bei 385 nm (blau) und 400 nm (rot) mit einer Energie von 100 nJ pro Puls. Die Detektion der aufkonvertierten Fluoreszenz erfolgte in beiden Fällen bei 450 nm. Für jede Messung wurden 50 Mittelungen durchgeführt. Die Zeitauflösung lag bei 240 fs. Rechts: Teilmodell der Photophysik des pyrenmodifizierten Adenins. Nach Anregung geht ein Teil der Population mit einer Equilibrierungszeit von 18 ps in einen Ladungstransferzustand über. Bei höherenergetischer Anregung ist der Teil der Population, der aus dem neutralen in den Ladungstransferzustand übergeht, höher, während bei niederenergetischer Anregung sich mehr Moleküle von Beginn an im Ladungstransferzustand befinden.

zu beobachten, der biphasisch vonstatten geht und der bei höherenergetischer Anregung (385 nm) stärker ausgeprägt ist als bei niederenergetischer Anregung (400 nm). Die Zeitskalen, auf denen sich dieser Prozess abspielt, sind jedoch nahezu gleich.

Nach Populierung der fluoreszenten Zustände folgt der Zerfall in den Grundzustand. Dieser erfolgt, wie in den Transienten zu sehen, schneller bei höherer Anregungsenergie. Aus einem gemeinsamen Fit beider Transienten mit einem Datensatz basierend auf den aus der transienten Absorption erhaltenen Fitzeiten kann man auf eine Änderung des Verhältnisses zwischen dem Zerfall des angeregten Zustands und dem Zerfall des Ladungstransferzustandes schließen. Bei einer Anregungswellenlänge von 385 nm beträgt der Anteil der Amplitude des kurzlebigen Zerfalls an der Gesamtfluoreszenz etwa 46 %, während er bei einer Anregung von 400 nm auf 36 % fällt.

Diese Beobachtungen zusammengenommen sprechen dafür, dass die Aufteilung auf neutralen und Ladungstransferzustand direkt nach der Anregung geschieht. Der rechte Teil von Abbildung 4.7 verdeutlicht die Vorgänge in schematischer Weise. Die Anregung erfolgt in einen strukturierten angeregten Zustand, wobei das Verhältnis der Populationen der beiden Zustände abhängig von der Photonenenergie der Anregung ist. Bei höherenergetischer Anregung wird primär die Population des neutralen Zustandes aufgebaut. Da zwischen den beiden Zuständen des angeregten Zustands jedoch ein Übergang möglich ist, ist bei höherer Population des oberen Zustands die Zahl der Moleküle, die in den unteren Zustand übergehen höher als bei direkter Anregung in den unteren Zustand. Ebenso erklärt dieses Bild das sich verändernde Verhältnis zwischen den Fluoreszenzlebensdauern, da die kürzere Fluoreszenzlebensdauer aufgrund der spektralen Charakteristik dem höherenergetischen Zustand zugewiesen werden kann.

Dieses Bild steht jedoch teilweise im Widerspruch zu der Interpretation von  $\tau_1$  als Zerfall eines höher angeregten Zustands. Mit Hilfe der vorliegenden Daten ist es bisher nicht möglich, diesen Widerspruch vollständig aufzulösen. Hilfreich wäre in diesem

Zusammenhang insbesondere eine Wiederholung der Kurzzeitfluoreszenzmessungen in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge mit Hilfe eines Kerrschalters, der eine spektral breite Beobachtung der Fluoreszenz ermöglicht. Diese Messungen werden in naher Zukunft in unserer Arbeitsgruppe zu einer endgültigen Klärung der noch offenen Fragen bezüglich der Photophysik der pyrenmodifizierten Base durchgeführt werden.

Im weiteren sollen jedoch einige Teilaspekte der Photophysik des Pyrenadenins in verschiedenen Umgebungen näher beleuchtet werden. Die Fluoreszenzspektren legen nahe, dass Wasserstoffbrücken einen signifikanten Einfluss auf die Photophysik des pyrenmodifizierten Adenins ausüben. Im Folgenden wird also die schnelle Photodynamik von Pyrenadenin in Methanol mit der in Acetonitril verglichen. In Abbildung 4.8 findet sich eine Gegenüberstellung der erhaltenen Daten.

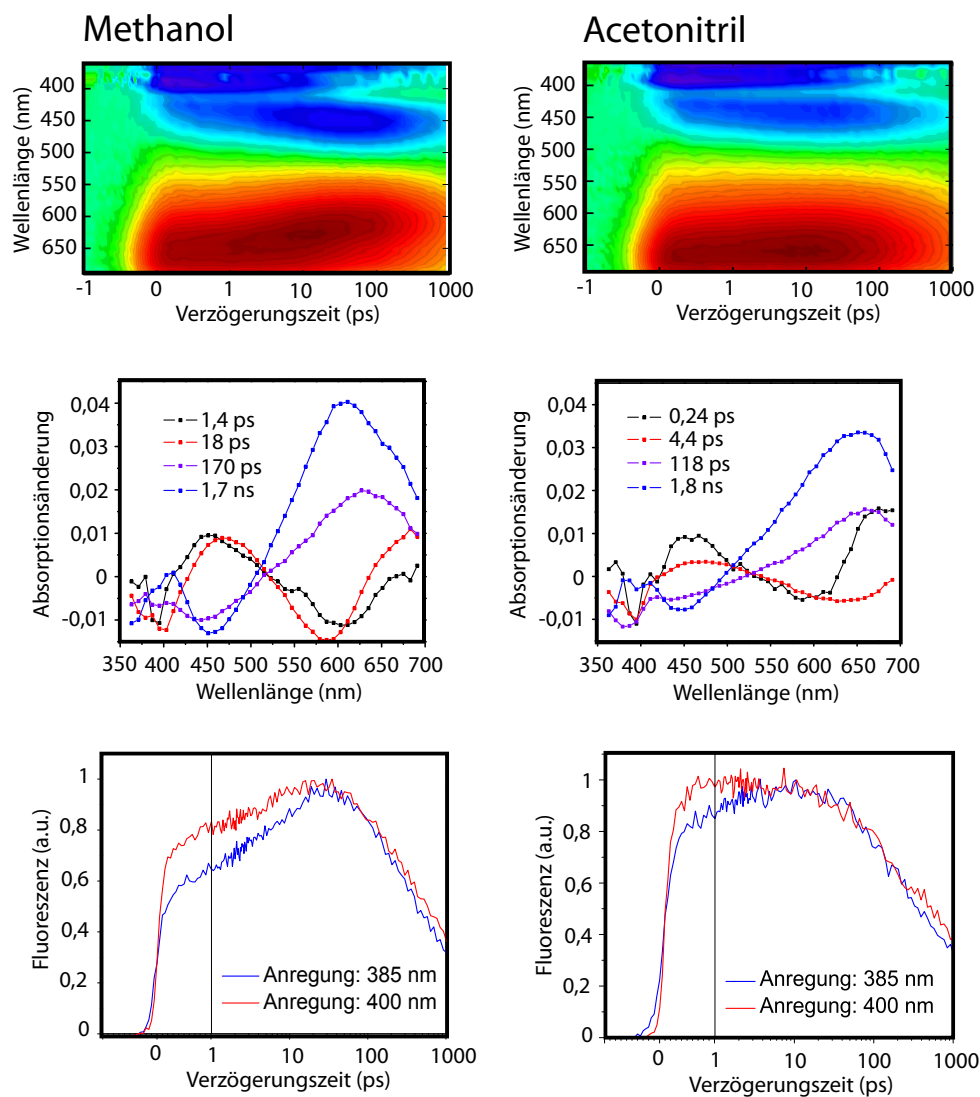
In beiden Lösemitteln zeigen die durchgeführten Messungen ähnliches Verhalten. Es ist jedoch sowohl in der transienten Absorption als auch in der Aufkonvertierungsmessung zu erkennen, dass die Bildung des Ladungstransferzustands in Acetonitril deutlich weniger stark zu beobachten ist. Die deutliche spektrale Verschiebung von stimulierter Emission und ESA in Methanol ist in Acetonitril kaum zu beobachten. Dies ist im Einklang mit den statischen Messungen, wo die Fluoreszenz von Pyrenadenin in Methanol niederenergetischer als die in Acetonitril ist. Eine Erklärung hierfür liegt in der bereits mehrfach erwähnten Tatsache, dass in protischen Lösemitteln Ladungstransferzustände häufiger und leichter auftreten [162, 203]. Die Geschwindigkeit der Bildung des Ladungstransfers ist jedoch in Acetonitril deutlich höher als in Methanol. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Gegenwart von Wasserstoffbrücken die elektronische Struktur des Moleküls selbst verändert, da diese Beschleunigung nicht zu einer größeren Populierung des Ladungstransferzustandes führt.

Auch die anregungswellenlängenabhängige Veränderung der Fluoreszenzzerfälle kann in Acetonitril in etwa gleicher Stärke wie bei Methanol beobachtet werden. Der Anteil der kurzlebigen Fluoreszenzzeit an der Gesamtfluoreszenzamplitude fällt von 40 % bei einer Anregung bei 385 nm auf 32 % bei 400 nm.

Abschließend wurde die Bildung des Ladungstransferzustandes in Abhängigkeit der Polarität des Lösemittels untersucht. Dazu wurden Aufkonvertierungsmessungen an Pyrenadenin in allen 10 bisher erwähnten Lösemitteln (siehe auch Tabelle 4.3) durchgeführt. In Abbildung 4.9 findet sich eine Zusammenstellung aller Messungen. Generell wird der bereits durch den Vergleich von Methanol und Acetonitril beobachtete Trend bestätigt, dass die Amplitude des Ladungstransfers und somit die Zahl der Moleküle, die von dem neutralen zu dem Ladungstransferzustand übergehen, in aprotischen Lösemitteln deutlich geringer ist. Insbesondere bei Anregung bei 400 nm ist nur noch sehr wenig Formation des Ladungstransferzustandes zu erkennen. Es bleibt zu bemerken, dass der Anteil des Ladungstransfers auch in dem DMSO-Wasser-Gemisch verhältnismäßig gering ist.

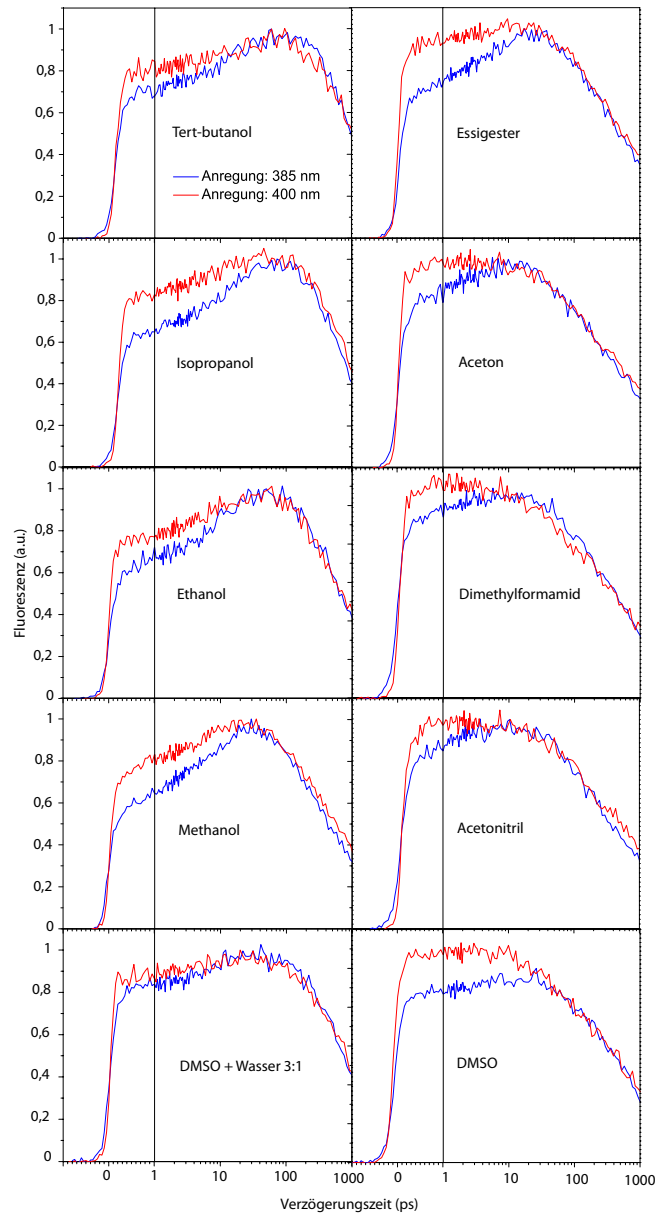
Die Bildungszeit des Ladungstransfers variiert von unter 10 ps bis zu etwa 30 ps. Eine Zusammenstellung der Ladungstransferzeiten in Abhängigkeit der Dielektrizitätskonstante ist in Abbildung 4.10 dargestellt.

Hieraus lässt sich erkennen, dass die Ladungstransferzeiten in protischen Lösemitteln deutlich weniger als in aprotischen variieren. Insbesondere in Dimethylformamid

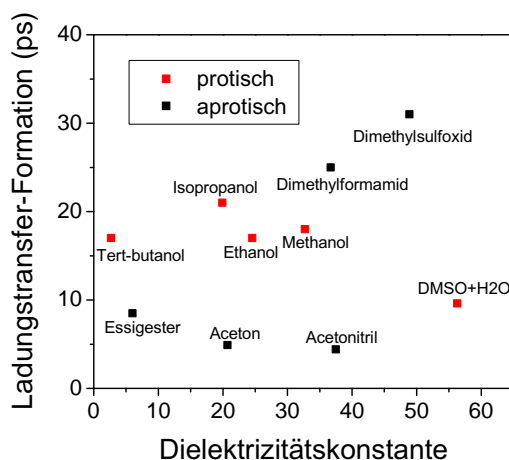


**Abbildung 4.8.** Messungen der schnellen Photophysik von Pyrenadenin in Methanol (linke Spalte) und Acetonitril (rechte Spalte). Die Bedingungen für beide Messungen waren nahezu identisch. Von oben nach unten finden sich: a) 2D-Spektrum der transienten Absorptionsmessung; b) aus den globalen Fits extrahierte DAS; c) Aufkonvertierungsmessungen bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge.

und Dimethylsulfoxid tritt eine deutlich höhere Bildungszeit des Ladungstransferzustands als in allen anderen aprotischen Lösemitteln auf. Diese Anomalie fällt mit der bereits zuvor erwähnten Rotverschiebung der Absorptionsspektren in beiden Lösemitteln zusammen, so dass an dieser Stelle die Vermutung nahe liegt, dass zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Pyrenadenin und dem jeweiligen Lösemittel auftreten, deren Natur im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden konnte. Zudem muß beachtet werden, dass für diese Messungen die Amplitude des Ladungstransferzustands einen der niedrigsten Werte aufwies. Eine Anpassung der Daten ist in diesem Fall also vermutlich



**Abbildung 4.9.** Fluoreszenzaufkonvertierungsmessungen in verschiedenen Lösungsmitteln nach Anregung bei 385 nm und 400 nm. Die linke Spalte zeigt protische, die rechte aprotische Lösemittel, die Polarität steigt von oben nach unten an.



**Abbildung 4.10.** Bildungszeit des Ladungstransferzustandes in Abhängigkeit der Polarität der Lösungsmittel.

insbesondere im Zeitbereich des Ladungstransfers mit größerem Fehler behaftet als bei den Messungen in anderen Lösemitteln. Es ist bemerkenswert, dass Pyrenadenin in dem DMSO-Wasser-Gemisch diese Auffälligkeit nicht zeigt. Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Wasserstoffbrücken für den Ladungstransferzustand.

Abgesehen von Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid zeigt Pyrenadenin bei steigender Lösemittelpolarität kürzere Formationszeiten des Ladungstransfers. Sowohl in protischen als auch in aprotischen Lösungsmitteln beträgt die Variation (unter Nichtbeachtung der beiden Sonderfälle Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid) in etwa einen Faktor 2, wobei die Spanne bei protischen Lösemitteln, auch aufgrund der geringeren abgedeckten Polaritätsspanne kleiner ist. Generell läuft der Ladungstransfer in protischen Lösemitteln langsamer ab, zeigt jedoch eine höhere Amplitude, was die Schlussfolgerung stützt, dass in aprotischen Lösemitteln der Ladungstransferzustand energetisch näher am neutralen Zustand liegt als in protischen.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede der Bildungszeiten bei aprotischen Lösemitteln, die auch in anderen Systemen beobachtet wurden [231, 232], jedoch nicht generalisiert werden können, ist eine Variation der Höhe der Barriere zwischen neutralem und Ladungstransferzustand aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Lösemittel.

Obwohl die vorherigen Untersuchungen die komplette Photophysik des pyrenmodifizierten Adenins nicht vollständig klären konnten, zeigen sie deutlich die Lösemittelempfindlichkeit des Chromophors auf. In unterschiedlichen Umgebungen ändert sich die Photophysik des Pyrenadenins deutlich. Dies läßt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um einen vielversprechenden Marker für die Struktur und Dynamik von RNA handelt, da deutliche Reaktionen insbesondere des Fluoreszenzverhaltens bei konformationeller oder energetischer Änderung der Molekülumgebung er-

wartet werden können.

Im Folgenden werden nun die spektroskopischen Charakteristika des pyrenmodifizierten Nukleosids im Verbund mit den in Abschnitt 4.2.2 vorgestellten Oligonukleotiden einer näheren Untersuchung unterzogen.

## 4.4 Spektroskopie der modifizierten RNA

### 4.4.1 Spektroskopische Untersuchung der Einzelstränge

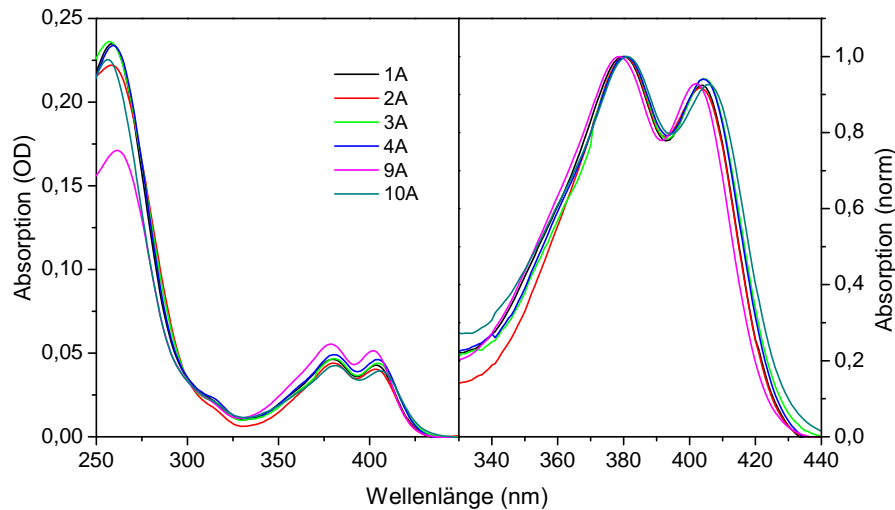
Zur Voruntersuchung wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren sämtlicher modifizierter, einzelsträngiger Oligonukleotide aufgenommen. Abbildung 4.11 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen Spektren. Die Konzentration der Oligonukleotide variierte von Probe zu Probe zwischen  $2 \mu\text{M}$  und  $7 \mu\text{M}$ . Mit Hilfe der bekannten Sequenzen und der optischen Dichte der jeweiligen Proben bei  $260 \text{ nm}$  wurden die Spektren jedoch auf eine gleiche nominelle Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  normiert [233, 234]. Hierbei wurde sowohl die Basenzusammensetzung als auch die Basensequenz berücksichtigt. In Abbildung 4.11 links sind die gesamten Spektren der modifizierten RNA zu sehen. Um  $260 \text{ nm}$  lässt sich die Absorption der Nukleobasen erkennen. Aufgrund der deutlich unterschiedlichen Extinktion der einzelnen Basen, sowie der unterschiedlichen Länge der untersuchten Oligonukleotide sind hier deutliche Unterschiede in der optischen Dichte festzustellen.

Zwischen  $350 \text{ nm}$  und  $420 \text{ nm}$  sind die hauptsächlichen Absorptionsbanden des Pyrens zu finden, wie sie im rechten Teil von Abbildung 4.11 noch einmal vergrößert dargestellt sind. Sie sind im Vergleich zu den Absorptionsspektren des modifizierten Nukleosids (siehe Kapitel 4.3) noch einmal um  $20 \text{ nm}$  rotverschoben, was auf deutliche Wechselwirkungen zwischen der modifizierten Base und den benachbarten Nukleotiden innerhalb des Strangs hindeutet. Ähnlich wie bei 1-ethinylpyrenmodifiziertem Uracil in DNA ist auch hier zu vermuten, dass zumindest ein Teil der durch den Ladungstransfer in den Basenstapel eingebrachten Anregungsenergie über mehrere Basen delokalisiert ist [162].

Die Spektren weisen zwei Hauptbanden um  $405 \text{ nm}$  und  $375 \text{ nm}$ , sowie eine Schulter bei etwa  $360 \text{ nm}$  auf. Zusätzlich ist bei etwa  $320 \text{ nm}$  noch eine weitere Schulter zu erkennen. Ein Vergleich mit den Anregungsspektren für die pyrenmodifizierten Einzelstränge, wie in Abbildung 4.12 exemplarisch für den Strang 3A gezeigt, weist darauf hin, dass es sich ebenso wie bei Pyrenadenin (siehe Abschnitt 4.3) hierbei um eine weitere, dem Pyren zugehörige Bande handelt. Sie ist von der Absorption der RNA-Basen stark überlagert, das Anregungsspektrum jedoch zeigt deutlich, dass dieser Zustand ebenso wie die Hauptabsorptionsbande des Pyrens strukturiert ist und bei geringerer Oszillatorstärke dennoch eine ähnliche Form aufweist. Ebenso ist zu erkennen (Abbildung 4.12), dass das Fluoreszenzspektrum annähernd unabhängig von der Anregung ist.

Verglichen mit den Absorptions- und Anregungsspektren des modifizierten Nukleosids ist bei der pyrenmodifizierten RNA eine deutliche Veränderung der Charakteristika zu erkennen. Die Hauptabsorptionsbande des Pyrens erfährt eine Verschiebung in ihrer Gewichtung, bei der insbesondere der niederenergetische Übergang deutlich gestärkt wird. In vorherigen Studien an ähnlichen Systemen wurde dieser Übergang als besonders sensibel gegenüber Basenstapelung identifiziert, so dass die deutlichen Änderungen in





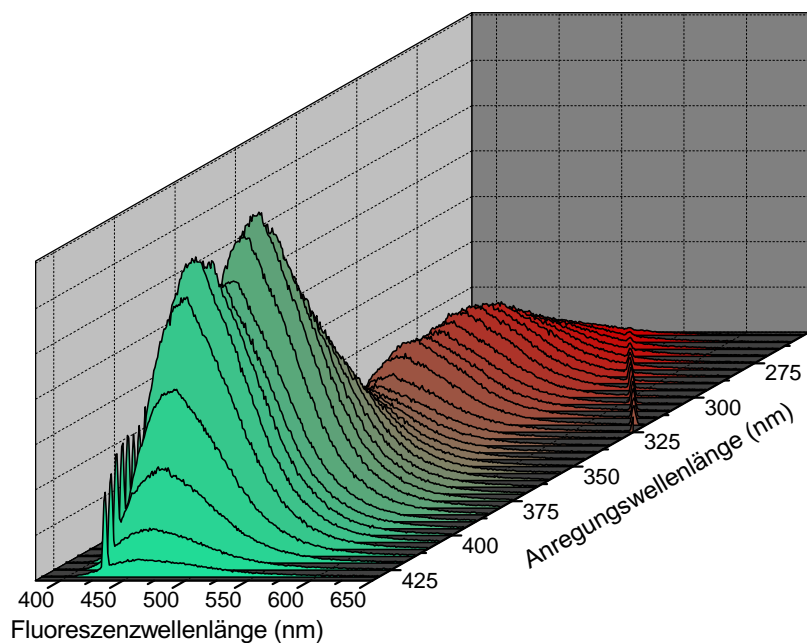
**Abbildung 4.11.** Links: Vergleich der Absorptionen aller untersuchter Einzelstränge. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde auf  $5 \mu\text{M}$  eingestellt. Die Absorption der RNA-Basen ist um  $260 \text{ nm}$  zu sehen. Zwischen  $350 \text{ nm}$  und  $420 \text{ nm}$  befindet sich die Hauptabsorptionsbande des Pyrens. Eine weitere schwache höherenergetische Pyrenbande ist um  $320 \text{ nm}$  zu erkennen. Rechts: Hauptpyrenbanden der verschiedenen einfach modifizierten RNA-Einzelstränge, normiert auf das Maximum der Bande. Die Proben wurden jeweils auf eine Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  normiert. Die tatsächlichen Konzentrationen lagen zwischen  $2 \mu\text{M}$  und  $7 \mu\text{M}$ .

diesem Bereich durchaus nachvollziehbar sind [202, 204].

Abbildung 4.11 rechts zeigt die auf ihr Maximum normierte Absorption der Hauptpyrenbande bei allen untersuchten Einzelsträngen. Es sind leichte Sequenzabhängigkeiten zu erkennen, die sich sowohl in einer minimalen Änderung der Zentralwellenlänge der beiden Übergänge als auch in deren Verhältnis zueinander manifestieren. Diese sind möglicherweise auf unterschiedliche Konformationen der Einzelstränge zurückzuführen. Das Ausbilden einer festen Struktur des Einzelstrangs ist jedoch schon allein aufgrund der verwendeten Sequenzen unwahrscheinlich. Untersuchungen mit *mfold*<sup>4</sup> [235] ergaben keine stabilen Strukturen. Die Absorptionsspektren der pyrenmodifizierten RNA ähneln denen, die in früheren Studien von Rist et al. für 1-Ethynylpyrenmodifiziertes Uracil in DNA gefunden wurden [204]. Auch in diesen Systemen traten Unterschiede in den beiden Hauptabsorptionsbanden abhängig von der DNA-Sequenz auf.

Abbildung 4.13 zeigt die Fluoreszenzspektren der untersuchten Einzelstränge. Sie wurden auf die jeweilige Probenabsorption normiert und repräsentieren die relative Quantenausbeute der jeweiligen Probe. Alle einfach modifizierten Stränge weisen eine sehr ähnliche spektrale Charakteristik auf. Die Zentralwellenlänge der Fluoreszenz liegt bei  $450 \text{ nm}$ . Das Spektrum ist, wie bereits von der pyrenmodifizierten Base bekannt, breit und unstrukturiert, jedoch ähnlich den Absorptionsspektren im Vergleich zu rei-

<sup>4</sup> <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>

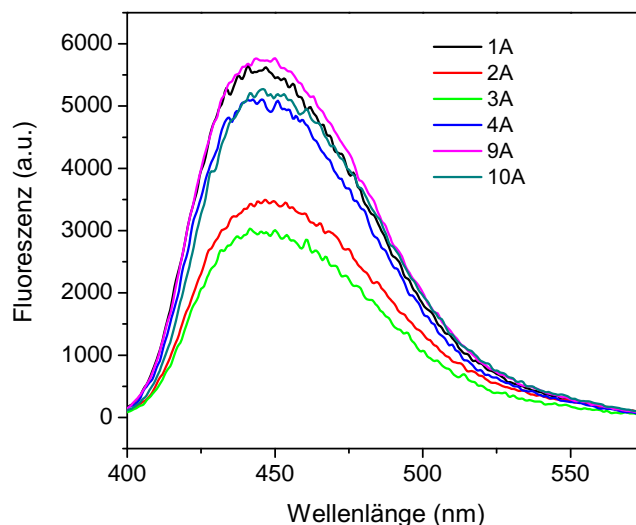


**Abbildung 4.12.** Anregungsspektrum von 3A exemplarisch für die Anregungsspektren aller Einzelstränge: Deutlich ist die aus den Absorptionsspektren bekannte Bandenstruktur des Überganges zu erkennen. Die Absorption des nächsthöheren angeregten Zustandes, die im Absorptionsspektrum unter der RNA-Bande verschwindet, weist dieselbe Struktur auf. Es gibt keinen Energietransfer bei Anregung des Adenins zum Pyren hin. Das spektral schmale Signal, das bei etwa 430 nm beginnt und bei steigender Anregungswellenlänge ins Rote verschoben wird, ist Streulicht des Anregungslichts. Es ist ab einer Anregungswellenlänge von 325 nm noch einmal zu sehen, wo die zweite Beugungsordnung des Streulichts mitbeobachtet wird.

nem Pyrenadenin um 20 nm rotverschoben. Auch dies ist bereits für pyrenmodifizierte DNA beobachtet worden [162]. Auch in den Fluoreszenzspektren sind die Ähnlichkeiten zu pyrenmodifizierter DNA aus vorherigen Studien groß [185, 202, 204]. Die Quantenausbeuten der Stränge 1A, 4A, 9A und 10A sind sehr ähnlich, während die der Stränge 2A und 3A um einen Faktor 2 geringer sind. Solche Variationen können durch schwache Stapel-effekte mit umgebenden Basen entstehen, die einen Einfluss auf die Fluoreszenz ausüben, jedoch mit Hilfe der vorliegenden Daten nicht näher quantifizierbar sind.

#### 4.4.2 Spektroskopische Untersuchung der Duplexe

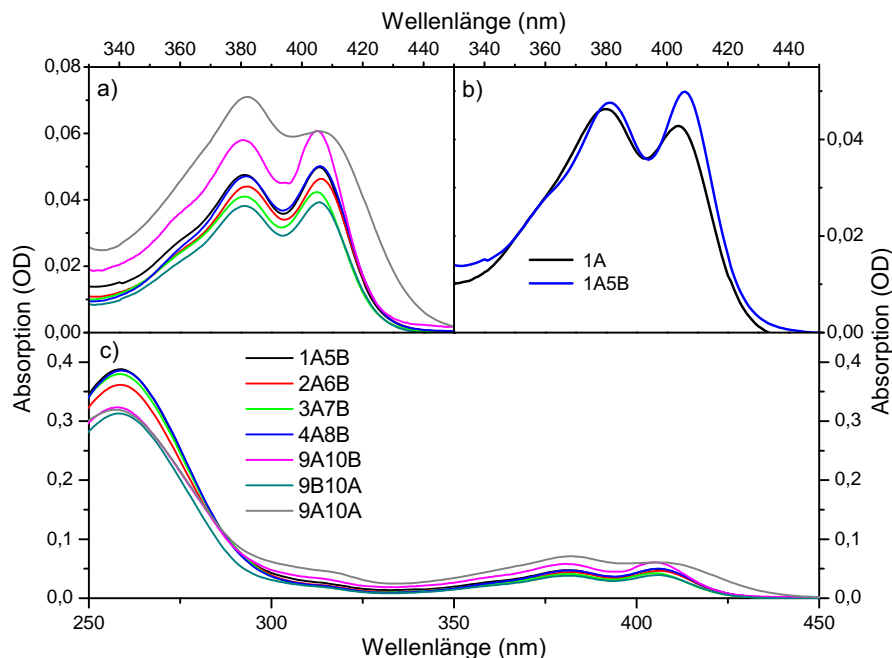
Um einen ersten Eindruck vom Einfluss der Hybridisierung auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Pyrens zu gewinnen, werden zunächst die Spektren einfach und doppelt modifizierter Duplexe miteinander und mit den einfach modifizier-



**Abbildung 4.13.** Fluoreszenz der Einzelstränge, normiert auf die Absorption bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm: Die spektrale Signatur der Fluoreszenz aller Einzelstränge ist annähernd gleich. Unterschiede tauchen jedoch in der Quantenausbeute auf und weisen auf unterschiedliche Konformationstendenzen der Einzelstränge in Lösung hin.

ten Strängen verglichen. Abbildung 4.14 zeigt eine Zusammenstellung der Absorptionsspektren. Wie bereits bei den Einzelsträngen variierte auch hier die Konzentration der Oligonukleotide von Probe zu Probe zwischen  $2,6 \mu\text{M}$  und  $12 \mu\text{M}$ . Mit Hilfe der bekannten Sequenzen, der optischen Dichte der jeweiligen Proben bei 260 nm und den zur Schmelzpunktbestimmung aufgenommenen Temperaturkurven der RNA-Bande wurden die Spektren jedoch auf eine gleiche scheinbare Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  normiert [233, 234]. In Abbildung 4.14c findet sich ein Überblick über die gesamten Absorptionsspektren. Es zeigen sich die schon von den Einzelsträngen bekannten Charakteristika der Pyren-Hauptbanden zwischen 350 nm und 420 nm, einer Nebenbande bei 320 nm sowie der RNA-Absorption bei 260 nm. Die Variationen in der RNA-Bande rühren von der unterschiedlichen Absorption der Basen, den unterschiedlichen Sequenzen sowie unterschiedlich starker Abnahme der Oszillatorstärke durch Hybridisierung her. Es ist deutlich zu erkennen, dass leichte Unterschiede in der Pyrenbande von Duplex zu Duplex bestehen. Abbildung 4.14a zeigt nur die Pyren-Hauptbande, um eine Quantifizierung dieser Unterschiede zu ermöglichen.

Die Form der Absorptionsspektren ist in allen einfach modifizierten Proben sehr ähnlich. Es treten zwei Hauptbanden und eine Schulter innerhalb des Spektrums auf, deren Verhältnisse sich bei allen einfach modifizierten Proben kaum unterscheiden. Die Oszillatorstärke des Übergangs ist in den einzelnen Duplexen leicht verschieden. Auffällig ist die relativ starke Oszillatorstärke des Strangs 9A10B. Wie aus Abbildung 4.11 ersichtlich, weist jedoch bereits der Einzelstrang 9A von allen Strängen die höchste Absorption auf. Dies ist möglicherweise ein Effekt der benachbarten Basen auf das modifizierte Nucleosid. Eine andere Erklärung wäre in Ungenauigkeiten innerhalb der Normierung zu



**Abbildung 4.14.** Absorption der modifizierten RNA-Duplexe: a) Vergrößerung der Pyrenhauptbanden aller modifizierter RNA-Duplexe. b) Vergleich der Pyrenbande eines Einzelstrangs mit einem Doppelstrang (1A, 1A5B). c) Gesamtabsorptionsspektren der pyrenmodifizierten Duplexe. Alle Spektren wurden auf eine Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  normiert. Die tatsächlichen Konzentrationen lagen zwischen  $2,6 \mu\text{M}$  und  $12 \mu\text{M}$

suchen. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten nach Referenzen [233, 234] weist einen Fehler von etwa 10 % auf. Hinzu kommt eine weitere Ungenauigkeit von etwa 5 % aufgrund des aus den Schmelzkurven ermittelten Intensitätseffekts. In jedem Falle sind die Unterschiede innerhalb der Pyrenabsorption insgesamt eher gering.

Der doppelt modifizierte Duplex 9A10A weist im Vergleich zu den einfach modifizierten Duplexen einen leichten Unterschied auf. Es ist eine Rotverschiebung der niederenergetischen Pyrenbande um etwa 4 nm von 406 nm zu 410 nm zu erkennen. Zudem findet eine relative Schwächung dieser Bande gegenüber der höherenergetischeren statt.

Die Absorption des doppelt modifizierten Strangs ist deutlich höher als die der Einzelstränge. Dies ist wenig überraschend, da sich die doppelte Menge Pyren in der Probe befindet. Sie ist jedoch, anders als zunächst zu erwarten, nicht bei dem Wert, die sich aus der Summe der Oszillatorstärken von 9A10B und 9B10A ergibt, sondern etwa 15-20 % darunter. Die Erklärung hierfür liegt in einer Abnahme der Oszillatorstärke aufgrund der Kopplung der  $\pi$ -Systeme der beiden Pyrene, und somit in einem Effekt, der dem der Abnahme der RNA-Absorption bei Hybridisierung sehr ähnlich ist [234]. Hieraus lässt sich folgern, dass bereits im Grundzustand eine nennenswerte Kopplung der beiden Pyrene miteinander besteht, die in einer Verschiebung der Absorptionsbande von Pyren,

sowie in einer Abnahme der Absorption resultiert.

Abbildung 4.14b zeigt einen Vergleich zwischen einem Einzelstrang und dem dazugehörigen Duplex (in diesem Fall 1A, sowie 1A5B). Die hier zu beobachtenden Effekte sind bei allen untersuchten Strängen sehr ähnlich.

Ein Unterschied der Absorptionsspektren findet sich vor allem in der niederenergetischen Bande um 405 nm. Sie ist in den Einzelsträngen im Vergleich zur Bande bei 380 nm deutlich weniger stark ausgeprägt. Frühere Untersuchungen an mit 1-ethinylpyrenmodifizierter DNA zeigen, dass sich diese Bande als Resultat der Grundzustandsinteraktion von pyrenmodifiziertem Uracil mit den benachbarten Basen des Basenstapels besonders stark ändert [204].

Zusätzlich zu diesem Effekt tritt generell eine leichte Rotverschiebung von 1- 2 nm bei Hybridisierung der Einzelstränge auf, die in Tabelle 4.4 für die einzelnen Stränge genauer aufgeschlüsselt ist. Eine solche bathochrome Verschiebung ist bei Farbstoffen ein genereller Indikator für den Wechsel in eine hydrophobere Umgebung [236]. Dies könnte bei dem vorliegenden System sowohl eine Platzierung des Pyrens in einer der beiden *Grooves* der RNA (aufgrund des Anknüpfungspunktes des Pyrens an der Base ist die *Minor Groove* wahrscheinlicher) als auch eine Interkalation des Farbstoffes bedeuten. Dieser Punkt wird ausführlich im nächsten Abschnitt diskutiert.

Deutlichere Unterschiede zwischen den einzelnen Duplexen lassen sich mit Hilfe der Pyren-Fluoreszenz finden. Abbildung 4.15 zeigt die Fluoreszenzspektren aller modifizierter Doppelstränge. Die einfach modifizierten Duplexe zeigen eine ähnliche spektrale Charakteristik, die sich auch von der der Einzelstränge kaum unterscheidet, es treten jedoch deutliche Unterschiede in der Quantenausbeute der Doppelstränge auf. Die Fluoreszenz von Pyren kann durch die Präsenz von Nukleobasen in mannigfaltiger Weise beeinflusst werden. Insbesondere spielen Umgebungen verschiedener Polaritäten [170] (siehe auch Kapitel 4.3) sowie die Wechselwirkungen mit den  $\pi$ -Systemen der umgebenden Basen [237] eine Rolle. Auf diese Vorgänge wird in Abschnitt 4.4.3 näher eingegangen. Der doppelt modifizierte Duplex zeigt eine deutliche Änderung der spektralen Charakteristik der Fluoreszenz im Vergleich zu den einfach modifizierten Doppelsträngen. Die Fluoreszenz ist um 35 nm rotverschoben und erfährt eine signifikante Verbreiterung. Beides ist charakteristisch für die Formation eines Exzimers zwischen den beiden Pyrenen, wie es in vielen ähnlichen Systemen bereits beobachtet wurde [160, 188, 191, 225, 238, 239].

#### 4.4.3 Schmelzverhalten

Um die Eignung des pyrenmodifizierten Adenosins als Marker und sein Verhalten innerhalb der RNA zu charakterisieren wurden von allen Strängen Schmelzkurven aufgenommen. Hierbei wurde neben der klassischen RNA-Bande bei 260 nm die temperaturabhängige Veränderung von Pyrenabsorption und -fluoreszenz beobachtet. Die Absorptionsspektren wurden auf einem Jasco V670-Absorptionsspektrometer<sup>5</sup> aufgenommen, dessen Küvettenhalter über ein computergesteuertes Peltierelement temperiert wurde. Die Fluoreszenzspektren wurden auf einem Jobin Yvon Fluorolog Spektrometer<sup>6</sup> aufgenommen, das ebenfalls über einen peltierbasierten Küvettenhalter verfügte. Es wurden für alle Messungen identischen Küvetten bei einer Heizrate von etwa 10 °C/h verwendet. Fluoreszenzspektren wurden stets um die Absorption bei der Anregungswellenlänge

<sup>5</sup> Jasco, Robert-Bosch-Strasse 11, 64823 Gross-Umstadt, <http://www.jasco.de>

<sup>6</sup> HORIBA Jobin Yvon GmbH, Hauptstr. 1, 82008 Unterhaching, <http://www.jobinyvon.com>

**Tabelle 4.4.** Vergleich der Peakwellenlängen der Pyrenbande modifizierter Einzel- und Doppelstränge: Die auftretenden Unterschiede sind nur gering und weisen keine erkennbare Systematik auf.

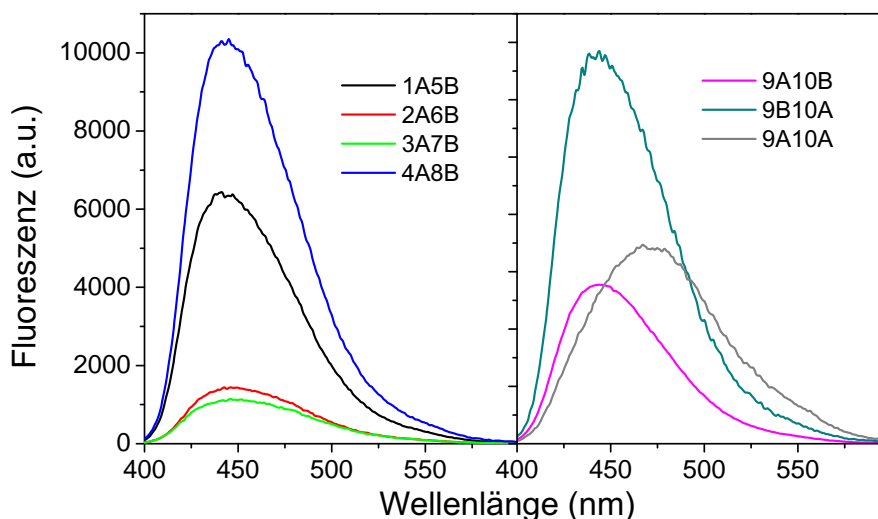
Strang	$\lambda_1/\text{nm}$	$\lambda_2/\text{nm}$
<b>1A</b>	380	404
<b>1A5B</b>	381	406
<b>2A</b>	380	404
<b>2A6B</b>	382	406
<b>3A</b>	381	404
<b>3A7B</b>	381	405
<b>4A</b>	381	403
<b>4A8B</b>	382	406
<b>9A</b>	379	402
<b>9A10B</b>	381	406
<b>10A</b>	381	404
<b>9B10A</b>	381	406
<b>9A10A</b>	383	410

korrigiert.

Zur Bestimmung der Schmelzkurven wurde nach dieser Korrektur über das gesamte Fluoreszenzspektrum integriert und die aus der Integration dieser Spektren resultierenden Gesamtintensitäten über der Temperatur aufgetragen. Anpassung der so erhaltenen Schmelzkurven erfolgte über ein modifiziertes Zweizustandsmodell, das eine linear veränderliche Basislinie mit einbezieht:

$$I(T) = \frac{(A_1 - A_2)}{1 + e^{\frac{T-T_m}{\Delta T}}} + mT + A_3. \quad (4.1)$$

Hierbei sind  $A_1$  und  $A_2$  die Anfangs- und Endamplitude des Schmelzprozesses,  $T_m$  die Schmelztemperatur und  $\Delta T$  die Breite der eigentlichen Schmelzkurve.  $m$  und  $A_3$  sind die Parameter der linear mit der Temperatur veränderlichen Basislinie.

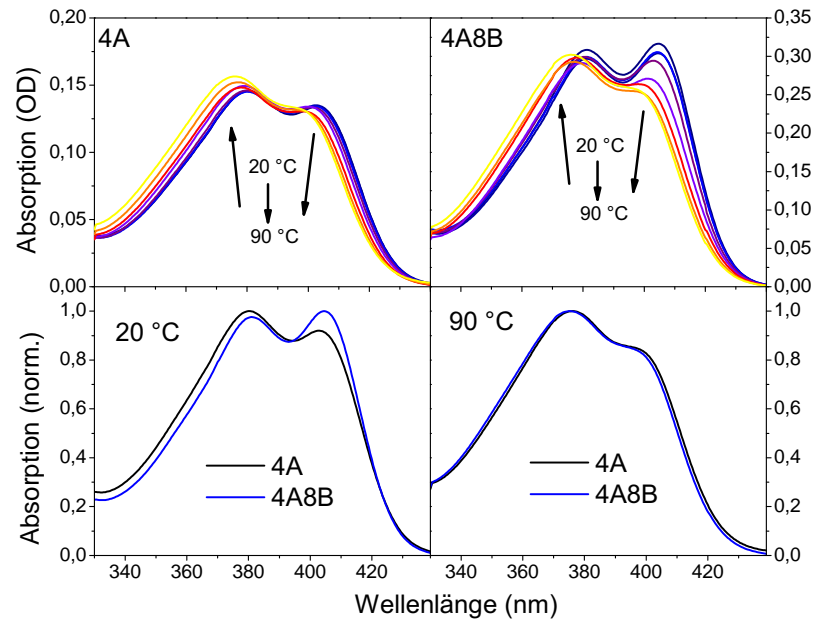


**Abbildung 4.15.** Fluoreszenz der modifizierten RNA-Duplexe, normiert auf die Absorption bei der Anregungswellenlänge von 380 nm: Die einfach modifizierten Duplexe weisen nahezu identische Signaturen auf, unterscheiden sich jedoch deutlich in der Quantenausbeute. Der doppelt modifizierte Duplex zeigt im Vergleich zu den einfach modifizierten Proben eine deutliche Rotverschiebung der Zentralwellenlänge um 35 nm, die der Pyren-Pyren-Wechselwirkung zugeschrieben werden kann.

### Temperaturverhalten einfach modifizierter RNA-Einzel- und Doppelstränge

Von allen einfach modifizierten Doppelsträngen wurden zwischen 20 °C und 90 °C im Abstand von 10 K Absorptionsspektren aufgenommen. Für alle einfach modifizierten Stränge zeigen sich sehr ähnliche Charakteristika. Die generellen Verhältnisse zeigt Abbildung 4.16, wo der Vergleich des Temperaturverhaltens der Pyrenabsorptionsbande eines exemplarischen Einzelstrangs (4A), sowie des zugehörigen Doppelstrangs (4A8B) zu finden sind. Insgesamt lässt sich in beiden Proben eine Blauverschiebung des Spektrums von etwa 5 nm mit steigender Temperatur erkennen, die beide Absorptionsbanden gleichermaßen betrifft. Weder bei den Einzelsträngen noch bei den Duplexen tritt ein isobestischer Punkt auf, so dass die Blauverschiebung keinem einfachen Zweizustandssystem zugeordnet werden kann. Vermutlich überlagert sich in den Spektren ein genereller Temperatureffekt der Absorption mit den strukturbasierenden Änderungen aufgrund der Hybridisierung.

Zusätzlich nimmt die Intensität der Bande bei 405 nm im Vergleich zur Intensität bei 380 nm zu. Dieser Effekt ist im Temperaturverhalten des Doppelstrangs deutlicher zu erkennen, da sich beim Entfalten der Duplexe das Absorptionsspektrum der Doppelstränge dem der Einzelstränge annähert (Abbildung 4.16 unten rechts), und in diesem Teil der Bande der Einfluss der Hybridisierung auf das Absorptionsspektrum zu finden ist (Abbildung 4.16 unten links, und siehe auch Kapitel 4.4.2).

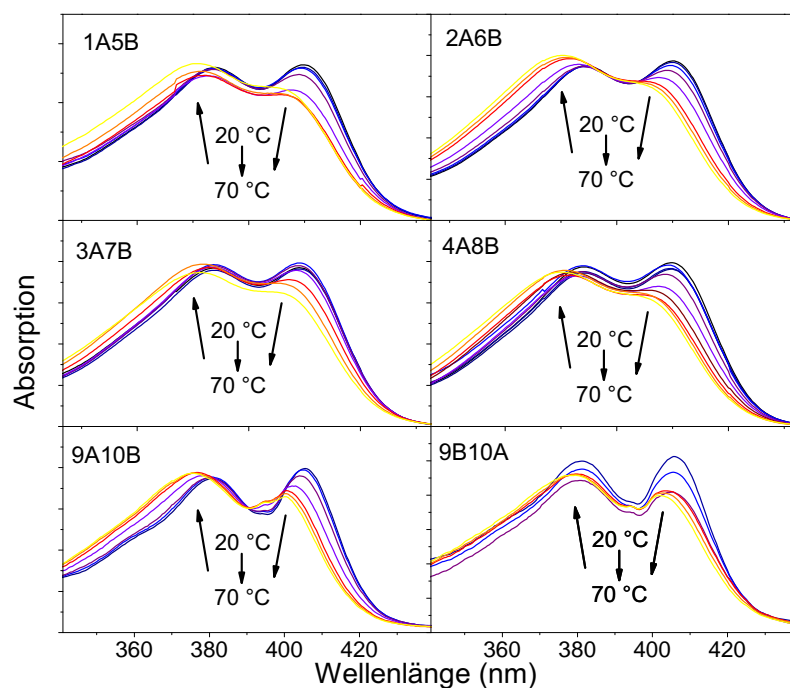


**Abbildung 4.16.** Oben: Temperaturabhängigkeit der Absorption des Einzelstrangs 4A bei etwa  $15 \mu\text{M}$  (links) und des korrespondierenden Doppelstrangs 4A8B bei etwa  $30 \mu\text{M}$  (rechts). Unten: Vergleich der Pyrenabsorption einzel- und doppelsträngiger RNA bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  (links) und  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  (rechts). Die Absorption weist eine leichte Blauverschiebung von etwa  $6 \text{ nm}$  auf und das Verhältnis der beiden Hauptabsorptionsbanden ändert sich zugunsten des blauen Anteils des Spektrums. Dieser Effekt tritt in doppelsträngigen Komponenten deutlich stärker auf.

Eine Zusammenstellung aller temperaturabhängigen Spektren der einfach modifizierten Doppelstränge findet sich in Abbildung 4.17. Alle Spektren weisen dieselbe Charakteristik auf. Am offensichtlichsten zu beobachten ist eine Blauverschiebung von etwa  $5 \text{ nm}$ , mit der Ausnahme des Doppelstrangs 9A10B, der eine kleinere Blauverschiebung von nur etwa  $2 \text{ nm}$  zeigt. Zudem zeigt der Vergleich der beiden Absorptionsbanden wie zu erwarten eine Schwächung der niederenergetischeren Bande um  $405 \text{ nm}$ . Zur Korrektur der im weiteren gezeigten Fluoreszenzspektren wurde die Absorption an der Stelle der Anregung ( $380 \text{ nm}$  bzw.  $400 \text{ nm}$ ) verwendet.

Abbildung 4.18 zeigt exemplarisch die temperaturabhängigen Spektren des Strangs 4A8B, anhand dessen die generelle Charakteristik der beobachteten Prozesse erläutert wird. Im linken Teil der Abbildung sind die ursprünglichen, auf die Absorption bei einer Anregungswellenlänge von  $380 \text{ nm}$  normierten Spektren zu sehen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Gesamtintensität der Fluoreszenz mit steigender Temperatur auf etwas mehr als ein Fünftel der ursprünglichen Intensität sinkt. Dies deutet auf eine deutliche Änderung der Pyrenumgebung beim Entfalten des Doppelstranges hin und eröffnet außerdem die Möglichkeit, durch eine Beobachtung der Intensitätsänderung der Fluoreszenz das Schmelzverhalten der RNA zu beobachten. Im rechten Teil der Abbildung sind dieselben Spektren dargestellt, die in diesem Fall jedoch auf 1 normiert wurden. An der Überlagerung der Spektren ist zu sehen, dass beim Aufheizen so gut wie keine



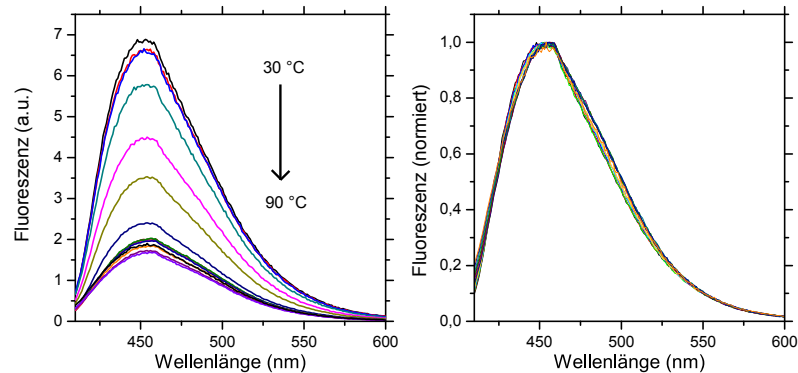


**Abbildung 4.17.** Temperaturabhängige Absorptionsspektren aller untersuchter einfach modifizierter Doppelstränge: Es lassen sich in allen Spektren gemeinsame Komponenten feststellen. Die Spektren erfahren bei Erwärmung eine Blauverschiebung von etwa 5 nm.

spektrale Verschiebung stattfindet. Die deutliche Änderung der Quantenausbeute weist auf starke Variationen in der direkten Umgebung des Pyrens hin. Es ist bekannt, dass Pyrenfluoreszenz durch die Präsenz geeigneter aromatischer Systeme ganz oder teilweise gelöscht werden kann [237, 240, 241]. Somit lässt sich naheliegendermaßen folgern, dass der beobachtete Effekt durch unterschiedliche Wechselwirkungen des Pyrens mit den Basen des zugehörigen RNA-Strangs im gefalteten und ungefalteten Zustand hervorgerufen wird.

Zur genaueren Untersuchung dieser Wechselwirkungen wurden Fluoreszenzschmelzkurven von allen einfach modifizierten Komponenten aufgenommen. Wie bei 4A8B zeigte sich auch bei den anderen untersuchten Komponenten keine spektrale Veränderung der Pyrenfluoreszenz bei steigender Temperatur. Aus diesem Grund konnte aus jedem der Spektrenverläufe eine Schmelzkurve basierend auf der relativen Quantenausbeute des Pyrens extrahiert werden. Eine Zusammenstellung sämtlicher aufgenommenen Schmelzkurven, jeweils normiert auf ihr Maximum, findet sich in Abbildung 4.19.

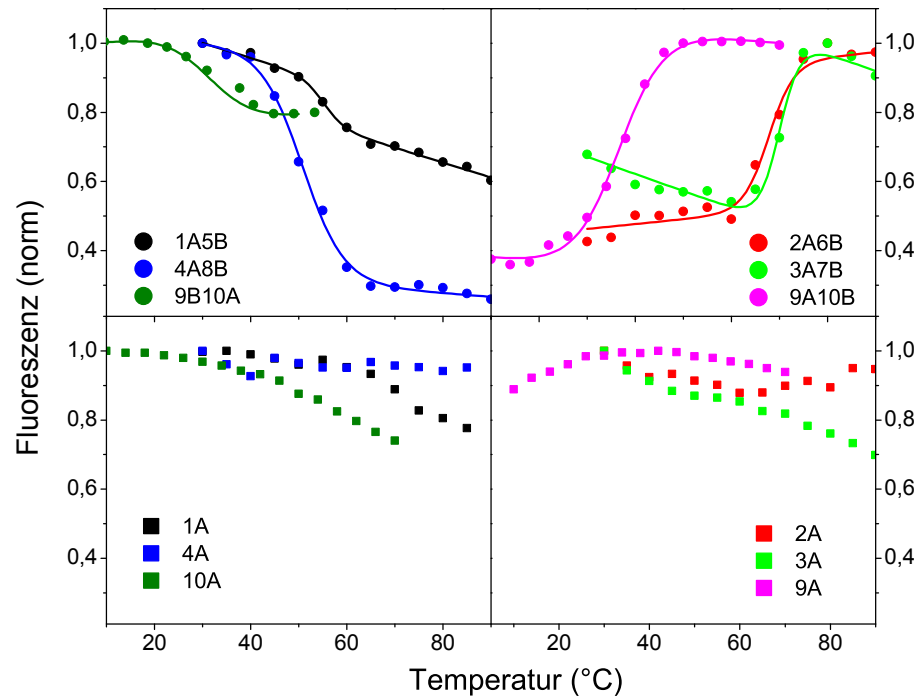
In der oberen Reihe ist die Temperaturentwicklung der Fluoreszenz der untersuchten einfach modifizierten Duplexe dargestellt. Es ergeben sich deutlich erkennbare Schmelzkurven mit klarem Wendepunkt, die auf ein Zweizustandssystem hindeuten, und denen durch Anpassung an Gleichung 4.1 ein Schmelzpunkt zugewiesen werden konnte.



**Abbildung 4.18.** Temperaturabhängige Fluoreszenzspektren von 4A8B: Links sind die ursprünglichen, auf die Absorption bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm normierten Spektren gezeigt, die einen Abfall der Fluoreszenzquantenausbeute bei steigender Temperatur zeigen. In der rechten Darstellung wurden alle Spektren im Maximum auf 1 normiert. Deutlich ist zu sehen, dass praktisch keine Veränderung des Fluoreszenzspektrums bei steigender Temperatur und somit bei Entfaltung der RNA-Helix zu sehen ist.

Abhängig von den Nachbarbasen kann das Vorzeichen der Fluoreszenzänderung positiv oder negativ sein. Die Stränge, in denen sich mindestens 1 G-C-Basenpaare neben der pyrenmodifizierten Base befindet (2A6B, 3A7B, 9A10B) zeigen einen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt tritt unabhängig davon auf, ob sich ein Purin oder ein Pyrimidin im selben Strang wie das modifizierte Adenin befindet. Befinden sich jedoch nur A-U-Basenpaare neben der modifizierten Base, so folgt daraus eine Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die Schmelztemperaturen sind in Duplexen mit das Pyrenadenin umgebenden A-U-Basenpaaren niedriger. Dies ist im Einklang mit der Tatsache, dass die A-U Basenpaarung durch zwei Wasserstoffbrücken gebildet wird, während die G-C Basenpaarung 3 Wasserstoffbrücken aufweist. Zudem ist die weniger stabilisierende Wirkung von A-U Basenpaaren im Vergleich zu G-C Basenpaaren in der Literatur bereits gut untersucht [242, 243].

Ein Vergleich mit der Temperaturabhängigkeit der Einzelstränge, die in der unteren Reihe dargestellt ist, offenbart, dass die Schmelzkurven tatsächlich mit dem Entfalten der Duplexe korrespondieren, da kein Schmelzverhalten in 1A-4A, 9A und 10A auftritt. Die Stränge 1A und 3A, in denen sich Purine neben dem modifizierten Adenin befinden, zeigen ebenso wie der Strang 10A, bei dem ein Purin und ein Pyrimidin die Nachbarbasen darstellen, eine generelle Abnahme der Fluoreszenz bei steigender Temperatur. Dies kann bei 1A5B und 3A7B auch bei Temperaturen weit über oder unter dem Schmelzpunkt beobachtet werden. Das Temperaturverhalten von 2A, 4A und 9A, bei dem sich nur Pyrimidine an das Pyrenadenin anschließen, zeigt eine weniger deutlich ausgeprägte Charakteristik, die sich auch nicht in den Schmelzkurven des Doppelstrangs erkennen lässt. Es lässt sich folgern, dass auch in den Einzelsträngen beim Aufheizen unspezifische Umordnungen vor sich gehen, die sich in der Fluoreszenz des Pyrens widerspiegeln. Die Basenstapel-Wechselwirkungen, die diesen Effekt verursachen, scheinen bei benachbar-



**Abbildung 4.19.** Schmelzkurven ermittelt anhand der Fluoreszenz von Pyren: Die obere Reihe zeigt die temperaturabhängige Fluoreszenz der Doppelstränge, die untere Reihe zeigt die Temperaturentwicklung der dazugehörigen Einzelstränge. Abhängig von den dem Pyrenadenin benachbarten Basen ist die Fluoreszenzänderung bei steigender Temperatur positiv oder negativ. Bei benachbarten G-C-Basenpaaren steigt die Fluoreszenz mit steigender Temperatur, während sie in Duplexen, bei denen die pyrenmodifizierte Base von A-U-Basenpaaren umgeben ist, sinkt. Die Einzelstränge zeigen keine typischen Schmelzkurven.

ten Purinen ausgeprägter zu sein als bei Pyrimidinen.

Eine Erklärung des Verhaltens der Pyrenfluoreszenz abhängig von den das Pyrenadenin umgebenden Basen kann mit Hilfe struktureller Betrachtungen gegeben werden. Aufgrund des deutlichen Effekts muss sich das Pyren je nach Nachbarbasen in sehr unterschiedlichen Umgebungen befinden. Es ist bekannt, dass  $\pi$ -Stacking mit DNA- und RNA-Basen - und somit auch Interkalation in den Basenstapel - zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität führt [182, 184, 185, 192, 194]. Auf der anderen Seite verursacht eine Pyrenposition außerhalb des hybridisierten Stranges einen Anstieg der Emissionsintensität [185, 192, 194] beim Schmelzen, da das Pyren außerhalb des Duplex weniger gequencht wird, als in einer möglicherweise teilweise geschützten Position innerhalb eines Einzelstrangs. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Interkalation des Pyrens stattfindet, wenn sich G-C-Basenpaare neben dem modifizierten Adenin befinden, während sie in Verbindungen mit A-U-Basenpaaren direkt um das Pyrenadenin eher unwahrscheinlich ist. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, die G und C stärkere

**Tabelle 4.5.** Quantenausbeuten  $q_e$  der pyrenmodifizierten Einzel- und Doppelstränge, bestimmt über einen Vergleich mit der Referenzsubstanz von Chininsulfat in 0,5 M Schwefelsäure.

<b>Strang</b>	1A	2A	3A	4A	9A	10A		
$q_e$	0,5	0,33	0,27	0,45	0,53	0,47		
<b>Strang</b>	1A5B	2A6B	3A7B	4A8B	9A10B	9B10A	9A10A	
$q_e$	0,55	0,13	0,11	0,88	0,25	0,58	0,37	

Fluoreszenzlöschigenschaften zuweisen als beispielsweise A [183, 244]. Die Messungen an den Strängen 9A10B und 9B10A weisen nach, dass ein einzelnes G-C-Basenpaar in der 5'-Richtung der modifizierten Base schon zur Interkalation des Pyrens führt.

Eine Erklärung für dieses Phänomen ist möglicherweise in der größeren Flexibilität einer A-U-reichen Umgebung im Vergleich zu einer G-C-reichen Umgebung zu suchen. Gestützt wird diese Hypothese dadurch, dass in einem ähnlich gearteten Experiment bei identischer Sequenz Pyren eher in einen DNA-Strang als in einen (flexibleren) RNA-Strang interkaliert [184].

Zur genaueren Untersuchung dieser Zusammenhänge wurden die Quantenausbeuten aller modifizierten RNA-Stränge über einen Vergleich mit einer Referenzsubstanz mit bekannter Quantenausbeute bestimmt. Aufgrund der hohen spektralen Ähnlichkeit seiner Fluoreszenz mit der hier vorgestellten Probe wurde in 0,5 M Schwefelsäure gelöstes Chininsulfat verwendet, das in dieser Konfiguration eine Quantenausbeute von 0,55 aufweist [245]. Die so erhaltenen Quantenausbeuten stellen nur eine grobe Abschätzung dar, die etwa auf 10 % genau ist, jedoch zum qualitativen Vergleich herangezogen werden kann. Eine Zusammenstellung der beobachteten Quantenausbeuten findet sich in Tabelle 4.5.

Die Quantenausbeuten folgen insgesamt dem in den Schmelzkurven beobachteten Trend. Wird die Temperaturabhängigkeit der Einzelstränge aus den Schmelzkurven der Duplexe herausgerechnet, so entsprechen die Unterschiede in den Quantenausbeuten in etwa den beobachteten Fluoreszenzänderungen und bestätigen somit die Beobachtungen.

Erwähnenswert ist, dass vollständige Interkalation häufig sehr schwierig nachzuweisen ist. Im Allgemeinen geht Interkalation mit einer Reihe weiterer charakteristischer, spektroskopisch untersuchter Eigenschaften einher. Dazu gehört beispielsweise eine hypsochrome Verschiebung der Absorptionsspektren mit steigender Temperatur bei interkalierter Probe, während bei nicht interkalierter Probe eine bathochrome Verschiebung auftreten sollte. Dies liegt in der Verschiebung von Absorptionsspektren aufgrund von hydrophober, beziehungsweise hydrophiler Umgebung des Pyrens begründet [184, 236]. Wie oben bereits erläutert, lässt sich in diesem System kein solcher Effekt nachweisen. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass die untersuchten Proben eine gewisse Heterogenität, also eine Mischung aus interkalierenden und nicht interkalierten Duplexen aufweist. Sollte die Änderung in der Fluoreszenz bei Interkalation sehr deutlich sein, während die Änderung der Absorptionsspektren

im selben Fall eher klein ist, so würde daraus genau die beschriebene Beobachtung einer starken Reaktion der Fluoreszenzspektren auf Interkalation, bei gleichzeitig nahezu unveränderten Absorptionsspektren folgen. Dies würde bedeuten, dass die Beobachtung der Fluoreszenzquantenausbeute das Verschieben von Gleichgewichten abhängig von der Sequenz widerspiegelt. Eine weitere Erklärung könnte darin liegen, dass die Positionierung des Pyrens im nicht interkalierten Fall in der *Minor Groove* erfolgt. Die dortige Umgebung ist hydrophober als die Position außerhalb des Duplex, ohne notwendigerweise zu einem Quenchen der Fluoreszenz aufgrund von Stapelungseffekten zwischen Pyren und den umgebenden Basen zu führen. Auch dies würde zu der beobachteten Verschiebung der Absorptionsspektren sowie zu einem Anstieg der Fluoreszenz aufgrund der geringeren Polarität der Umgebung (wie in Kapitel 4.3 beschrieben) führen.

Ein weiterer, oft beobachteter Marker für Interkalation ist das sogenannte induzierte zirkulardichroitische Signal (ICD), das durch die chirale Wechselwirkung der Pyrene mit der RNA entsteht [185, 246]. Seine Ausprägung und sein Vorzeichen lassen Rückschlüsse auf die Position des Pyrens innerhalb der Helix zu. Dies wurde bisher vor allem zur Beobachtung der Pyrenposition in DNA verwendet. In unserem Fall konnte jedoch kein ICD-Signal beobachtet werden, was möglicherweise unter anderem darin begründet liegt, dass die Struktur der RNA deutlich flexibler als die der DNA ist, und sich somit ein solches Signal nur sehr schwach ausbilden kann. Da das ICD-Signal im Vergleich zum gesamten CD-Signal der RNA sehr klein ist, liegt es möglicherweise unterhalb der Auflösungsgrenze und wird so nicht beobachtet.

Eine endgültige Aufklärung der strukturellen Verhältnisse wird in zukünftigen Arbeiten mit Hilfe von NMR-Spektroskopie erfolgen, die sich in ähnlichen Zusammenhängen schon als sehr nützlich erwiesen hat [184]. Die Änderung der Pyrenfluoreszenz ist jedoch so deutlich, dass durchaus von einer sequenzspezifischen Interkalation gesprochen und diese als Grundlage für weitere Beobachtungen verwendet werden kann.

Um Informationen über den genaueren Schmelzvorgang zu erhalten, wurden in Tabelle 4.6 alle durch Fluoreszenzspektroskopie und Absorptionsspektroskopie bestimmten Schmelzpunkte aufgetragen. Auffällig ist, dass die um 20% kürzeren Duplexe 9A10B und 9B10A eine deutlich bessere Übereinstimmung zwischen den auf verschiedene Arten bestimmten Schmelzkurven aufweisen als die Duplexe 1A5B-4A8B. Während in den Strängen 9A10B und 9B10A also das durch die Pyrenfluoreszenz beobachtete Schmelzverhalten gut dem des über Absorptionsspektroskopie bestimmten folgt, muss bei längeren Strängen in Betracht gezogen werden, dass das Schmelzverhalten nicht mehr im gesamten Strang gleich abläuft.

Zusammen mit der Beobachtung, dass die durch die Absorptionsänderung bei 260 nm gewonnenen Schmelzkurven einen leicht kooperativen Charakter aufweisen und somit auf die Überlagerung verschiedener Prozesse hindeuten, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die Änderung der Pyrenfluoreszenz in längeren Strängen nur einen Teil des Schmelzvorgangs beobachtet. Der aus der Absorption bestimmte Schmelzpunkt lässt sich somit mit der Entfaltung des gesamten RNA-Strangs in Verbindung bringen, während über die Pyrenfluoreszenz nur die lokale Pyrenumgebung betrachtet wird.

In Proben mit die pyrenmodifizierte Base umgebenden A-U-Basenpaaren ist die durch Fluoreszenzspektroskopie bestimmte Schmelztemperatur niedriger als die des gesamten Stranges, während es sich bei umgebenden G-C-Basenpaaren gerade anders her-

**Tabelle 4.6.** Vergleich der Schmelzpunkte  $T_m$ , bei Bestimmung über die Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute (mittlere Spalte) beziehungsweise der Absorptionsänderung bei 260 nm

Strang	$T_m/^\circ$	$T_m/^\circ$
	(Fluo)	(UV)
<b>1A5B</b>	55,1	59,8
<b>2A6B</b>	67,8	62,1
<b>3A7B</b>	70	67,4
<b>4A8B</b>	50,8	57,1
<b>9A10B</b>	36,7	35,9
<b>9B10A</b>	31,4	30,0

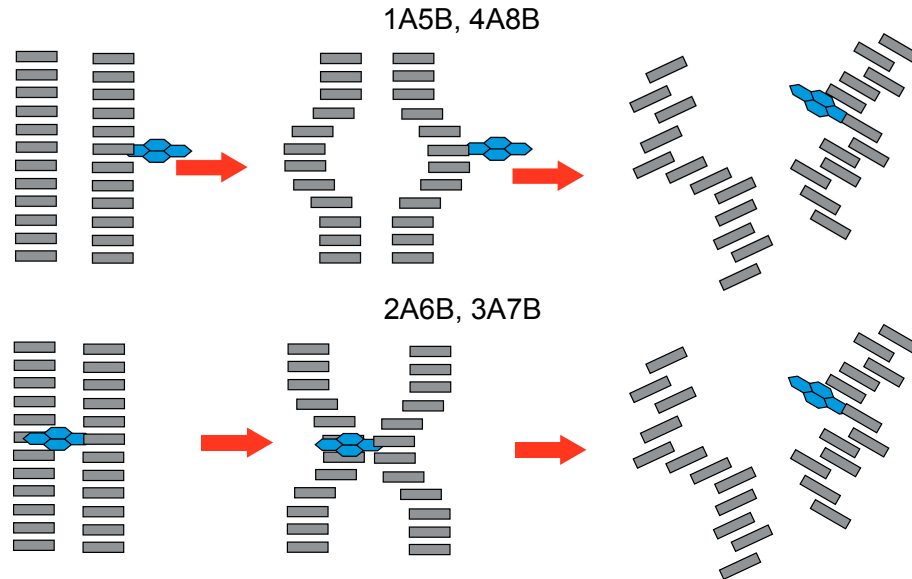
um verhält. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass in Duplexen, bei denen sich G-C-Basenpaare um die pyrenmodifizierte Base herum finden, eine Stabilisierung der Mitte des Duplex stattfindet, so dass die Entfaltung an den Enden beginnt. Dem folgend sollte der Entfaltungsprozess in Doppelsträngen mit A-U-Basenpaaren um das Pyrenadenin herum in der Nähe der modifizierten Base beginnen. Abbildung 4.20 illustriert die Vorgänge schematisch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier dargestellte Sequenzabhängigkeit besonders im Bereich der Markierung von Nukleinsäuren zur Beobachtung von Faltungs- und Reaktionskinetiken Potential aufweist. Die Änderung der Fluoreszenzintensität folgt scharfen Übergangsprofilen und ist stark genug, um deutlich zwischen gefalteten und ungefalteten RNA-Strängen unterscheiden zu können. Die Unterschiede in der Quantenausbeute beim Übergang von niedrigen zu hohen Temperaturen reicht von einer Fluoreszenzabnahme von 20 % für nichtinterkalierte Verbindungen bis hin zu einer Intensitätszunahme von mehr als 100 %, wenn das Pyren interkaliert vorliegt.

Aufgrund dieser starken Effekte und der insgesamt hohen Quantenausbeute ist pyrenmodifiziertes Adenin ein empfindlicher Marker für die Hybridisierung von RNA. Interkalation des Farbstoffs stellt eine substanzielle Störung des Systems dar. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass dies bei sorgfältiger Positionierung des Pyrenadenins an eine Stelle, die reich an A-U-Basenpaaren ist, vermieden werden kann. Ebenso ist es möglich, durch spezielle Wahl des Anknüpfungspunktes für das Pyren, Interkalation gezielt zu fördern.

### Schmelzverhalten eines doppelt modifizierten RNA-Doppelstrangs

Analog zum im vorigen Kapitel beschriebenen Schmelzverhalten der einfach modifizierten Stränge wurde auch der doppelt modifizierte Strang 9A10A untersucht. Die temperaturabhängigen Absorptionsspektren (Abbildung 4.21) weisen leichte Unterschiede zu



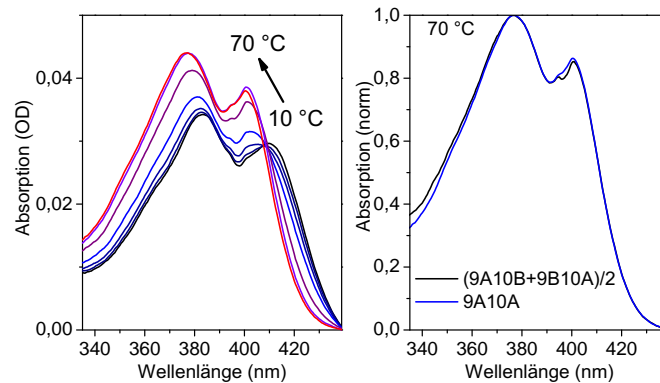
**Abbildung 4.20.** Illustration des Zusammenspiels des lokalen und globalen Schmelzverhaltens einfach modifizierter RNA-Stränge: Bei Interkalation schmilzt der RNA-Strang von den Enden her, während bei nicht interkaliertem Pyren der Schmelzvorgang in der Umgebung des Farbstoffs beginnt und sich dann bis zu den Enden fortsetzt.

denen der einfach modifizierten Duplexe auf. Der niederenergetische Peak, der sich bei Raumtemperatur bei 410 nm befindet, wird bei Erwärmung um 10 nm blau verschoben, während der bei 383 nm befindliche Peak eine Verschiebung von 6 nm erfährt.

Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Pyren-Pyren-Wechselwirkung insbesondere den niederenergetischen Absorptionsübergang des Pyrens beeinflusst und zu größeren Wellenlängen verschiebt. Dieser Prozess könnte zur Beobachtung von RNA-Faltung herangezogen werden, er ist jedoch schwierig zu quantifizieren, da der Effekt klein und von der generellen Verschiebung der Spektren überlagert ist.

Ein Vergleich der Spektren der entfalteten RNA zu denen der Summe der beiden entfalteten einfach modifizierten Stränge zeigt keine nennenswerten Unterschiede und bestätigt, dass nach dem Entfalten der Helix keine Pyren-Pyren-Wechselwirkung mehr vorliegt. Der Komplex ist vollständig entfaltet und die Pyrene liegen in denselben Zuständen wie in den isolierten einfach modifizierten Proben vor.

Abbildung 4.22 zeigt das Schmelzverhalten des doppelt modifizierten Duplex. Zwei verschiedene Prozesse können aus der Temperaturentwicklung der Fluoreszenzspektren extrahiert werden. Die Blauverschiebung des Emissionsmaximums der Fluoreszenz um 40 nm kann nur durch die Dissoziation des Pyren-Pyren-Komplexes verursacht werden. Gleichzeitig erfolgt eine Verschmälerung des Spektrums, die ihre Ursache ebenfalls im Verschwinden der Exzimerkomponente innerhalb der Pyrenfluoreszenz bei hohen Temperaturen hat. Zusätzlich zu diesen in der Pyren-Pyren-Interaktion begründeten liegenden Effekten steigt die Fluoreszenzintensität bei steigender Temperatur, was darauf hindeutet, dass sich in diesem Duplex mindestens ein Pyren im gefalteten Zustand ebenfalls innerhalb des Doppelstrangs befindet und dort möglicherweise ein zusätzliches künstli-



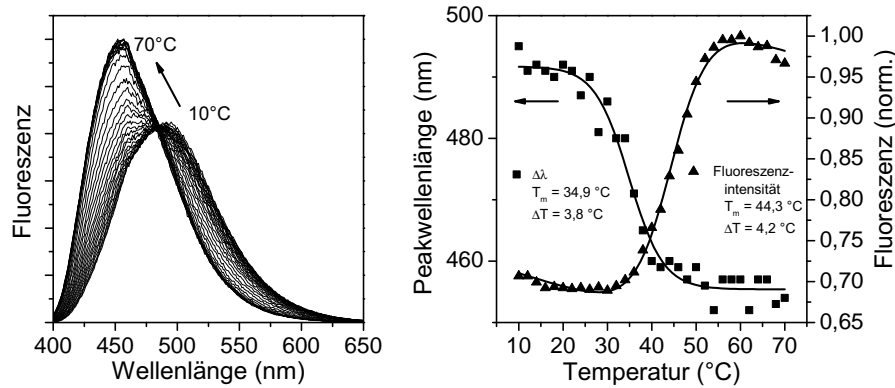
**Abbildung 4.21.** Temperaturabhängige Absorption des doppelt modifizierten Duplexes 9A10A: Beim Entfalten der RNA tritt eine Blauverschiebung der Spektren auf. Wie nach Betrachtung der Raumtemperaturspektren erwartet, zeigt der niederenergetische Teil des Spektrums eine stärkere Verschiebung als der höherenergetische, da die Grundzustandswechselwirkung zwischen den beiden Pyrenen verloren geht (siehe auch Kapitel 4.2.2). Der rechte Teil vergleicht die Spektren des entfaltenen, doppelt modifizierten Doppelstrang mit dem der Summe der Spektren beiden einfach modifizierten Doppelstränge. Es sind keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen.

ches Basenpaar bildet [239]. Dies würde auch die relativ hohe Schmelztemperatur des doppelt modifizierten Duplex erklären (siehe Tabelle 4.2).

Für die Veränderungen von Wellenlänge und maximaler Fluoreszenzintensität wurden Temperaturabhängigkeiten ermittelt (Abbildung 4.22). Es ist deutlich, dass beide Prozesse unterschiedliche Schmelzcharakteristika zeigen. Das Temperaturverhalten der maximalen Intensität, ist dem bei der Vorcharakterisierung durch UV-Spektroskopie erhaltenen sehr ähnlich. Der Schmelzpunkt, der sich aus der spektralen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums ergibt, liegt 10 K niedriger. Dies führt zu dem Schluss, dass der Schmelzprozess von 9A10A mindestens zwei Schritte beinhaltet, die sich in den verschiedenen Eigenschaften des Chromophors widerspiegeln. Die Dissoziation des Exzimers, die sich in der Wellenlängenverschiebung zeigt, tritt zuerst auf, gefolgt von der Entfaltung des gesamten Doppelstrangs, die die Fluoreszenzlöschung des Pyrens durch die benachbarten Basen abschwächt. Allgemeiner betrachtet, kann die Intensitätsentwicklung der Pyrenfluoreszenz mit dem globalen Schmelzprozess in Verbindung gebracht werden, während die Wellenlängenentwicklung eine lokale Probe der direkten Pyrenumgebung ist. Hieraus ließe sich schließen, dass in diesem Fall aufgrund des Anstiegs der Fluoreszenzintensität bei steigender Temperatur analog zu den einfach modifizierten Strängen auch hier wieder interkaliertes Pyren vorliegt. Also verliert, wie in Abbildung 4.23 gezeigt, zunächst die direkte Umgebung des Pyren-Pyren-Komplexes an Stabilität, bevor sich in einem zweiten Schritt der ganze Komplex entfaltet.

Diese Überlegung wird durch neuere Messungen gestützt, denen zufolge bei einem doppelt modifizierten Strang, bei dem beide Pyrene nur von A-U-Basenpaaren umgeben sind, die Gesamtfluoreszenz beim Entfalten sinkt [247]. Die relativ dicht gepackte Struktur der RNA-Doppelhelix lässt jedoch die Frage offen, ob eine komplette Inter-



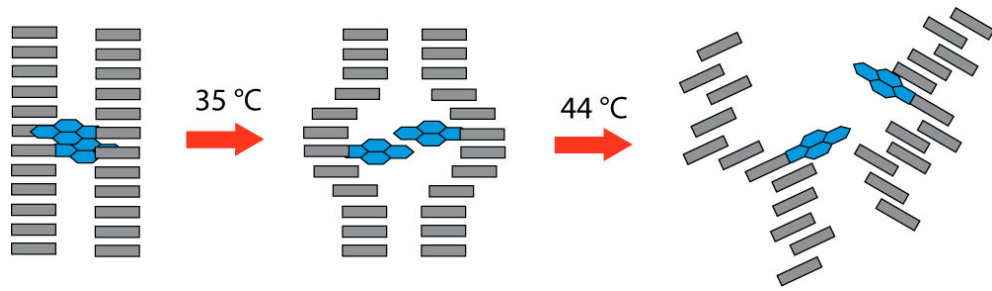


**Abbildung 4.22.** Links: Temperaturabhängige Fluoreszenzspektren für den Duplex 9A10A. Die Spektren weisen eine deutliche Blauverschiebung von etwa 40 nm bei Temperaturerhöhung auf, die mit einer Verschmälerung der Spektren einher geht. Zudem steigt die Intensität der detektierten Fluoreszenz bei Erhöhung der Temperatur. Aus der Temperaturentwicklung von Maximalintensität und zugehöriger Wellenlänge lassen sich zwei unterschiedliche Schmelzkurven extrahieren, aus denen zwei unterschiedliche Schmelzpunkte bestimmt werden können.

kalation beider Pyrene bei gleichzeitiger Exzimerbildung überhaupt möglich ist. Bisher wurde ähnliches vor allem in Systemen beobachtet, bei dem das Pyren als Ersatz für eine RNA-Base in den Strang eingefügt wurde [239], bei einem System wie dem hier untersuchten hätte eine Interkalation beider Pyrene vermutlich einen Bruch mehrerer Basenpaare innerhalb des Duplex zur Folge. Eine alternative Erklärung zu der hier gelieferten wäre möglicherweise über die Probenheterogenität zu geben, wo eine mögliche Quantenausbeutenänderung der als Exzimer auftretenden Pyrene von der Quantenausbeutenänderung der Pyrene mit Monomercharakteristik verdeckt wird. Letztere sollte dann den zuvor dargestellten Gesetzmäßigkeiten der Interkalation bei benachbartem G-C und Nichtinterkalation bei benachbartem A-U folgen.

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle noch erwähnt werden, dass die Interpretation der Fluoreszenzintensität als Probe des globalen Hybridisierungsprozesses aufgrund der im vorigen Abschnitt angestellten Überlegungen nur bei sehr kurzen RNA-Strängen gültig ist. Dennoch beruht das Löschen der Fluoreszenz aufgrund benachbarter Basen möglicherweise auf längerreichweitigen Wechselwirkungen als die Exzimerwechselwirkung, die nur im Bereich einiger Å effizient auftritt. Alternativ könnte die beobachtete Übereinstimmung zwischen dem durch die Fluoreszenzintensität ermittelten und dem durch die Basenabsorption bestimmten Schmelzpunkt auch nur aufgrund des verhältnismäßig kurzen Duplex zustande kommen. Eine Untersuchung eines doppelt modifizierten, längeren RNA-Strangs könnte diese Frage klären.

Die hier präsentierte Möglichkeit, aufgrund des Fluoreszenzverhaltens auf zwei verschiedene, voneinander zumindest partiell unabhängige Prozesse schließen zu können, macht das aus an zwei verschiedenen Strängen befestigten Pyrenen bestehende Dimer



**Abbildung 4.23.** Modell des Schmelzvorgangs des doppel modifizierten Doppelstrangs: In einem ersten Schritt bei 35 °C verliert zunächst die direkte Umgebung des Pyren-Komplexes an Stabilität, bevor in einem zweiten Schritt bei 44 °C der gesamte Strang entfaltet.

zu einem variabel einsetzbaren Label zur Untersuchung von RNA-Dynamik.

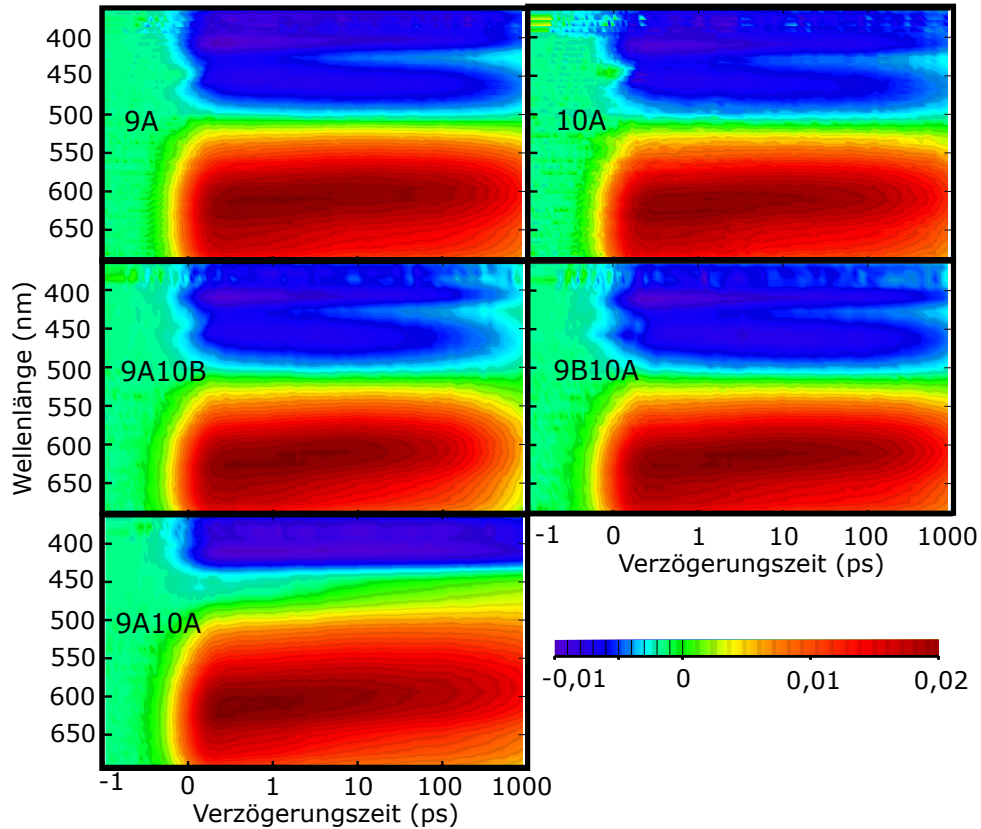
Insbesondere ist es in vielen Anwendungen gewünscht, statt einer Intensitätsänderung des Labels einen Prozess mit Hilfe einer spektralen Änderung zu beobachten, da dies eine Quantifizierung des Prozesses oft erleichtert. Die mit bloßem Auge beobachtbare spektrale Verschiebung zwischen 9A10A in gefaltetem und ungefaltetem Zustand stellt eine solche Möglichkeit dar.

#### 4.4.4 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Um die Auswirkungen von strukturellen Unterschieden wie Interkalation auf die Photophysik der pyrenmodifizierten Base zu untersuchen, wurden transiente Absorptionsspektren im Sichtbaren aufgenommen. Ebenso wie auch bei der pyrenmodifizierten Base wurde hier auf  $CaF_2$ -Weißlicht und Anregung mit Hilfe der Frequenzverdoppelten bei 387,5 nm zurückgegriffen. Die Probenkonzentrationen lagen bei 10  $\mu$ M. Abbildung 4.24 zeigt eine Zusammenstellung aller aufgenommenen Kinetiken. Die obere Reihe zeigt die Spektren der Einzelstränge 9A und 10A, die Reihe darunter zeigt die einfach modifizierten Duplexe und unten ist der doppel modifizierte Duplex zu sehen.

Insgesamt weisen alle fünf Proben sowohl untereinander, als auch im Vergleich mit den Untersuchungen des modifizierten Nucleosids (siehe Kapitel 4.3), große Ähnlichkeiten auf. Ein breites positives Absorptionssignal tritt ab 530 nm auf und erstreckt sich bis zum Ende des beobachteten Spektralbereiches. Er kann als die Absorption des angeregten Pyrenzustands interpretiert werden. In dem doppel modifizierten Duplex 9A10A ist sie im Vergleich zu den anderen Proben um ungefähr 20 nm blauverschoben. Dieser Effekt lässt sich mit der Gegenwart des exzimerartigen Zustands in der Probe erklären, der sich durch die Nähe der beiden Pyrenlabel ausbildet. Dies führt zu einer rotverschobenen Fluoreszenz und, da höher angeregte Zustände durch die Bildung des Exzimers deutlich weniger verändert werden, zu einer blauverschobenen ESA. Ein GSB-Signal, das mit zwei Maxima strukturiert vorliegt, ist vom blauen Ende des Spektrums bis etwa 420 nm sichtbar. Um 450 nm ist stimulierte Emission beobachtbar. In 9A10A ist diese Bande, wie bereits erwähnt, rotverschoben und verschwindet unter der ESA.

Vergleichbar den Ergebnissen für das pyrenmodifizierte Nucleosid (siehe Kapitel 4.3) ist in allen Proben eine dynamische Blauverschiebung der ESA von etwa 10 nm erkennbar, die sich innerhalb einiger Pikosekunden abspielt. Diese findet sich auch in einer

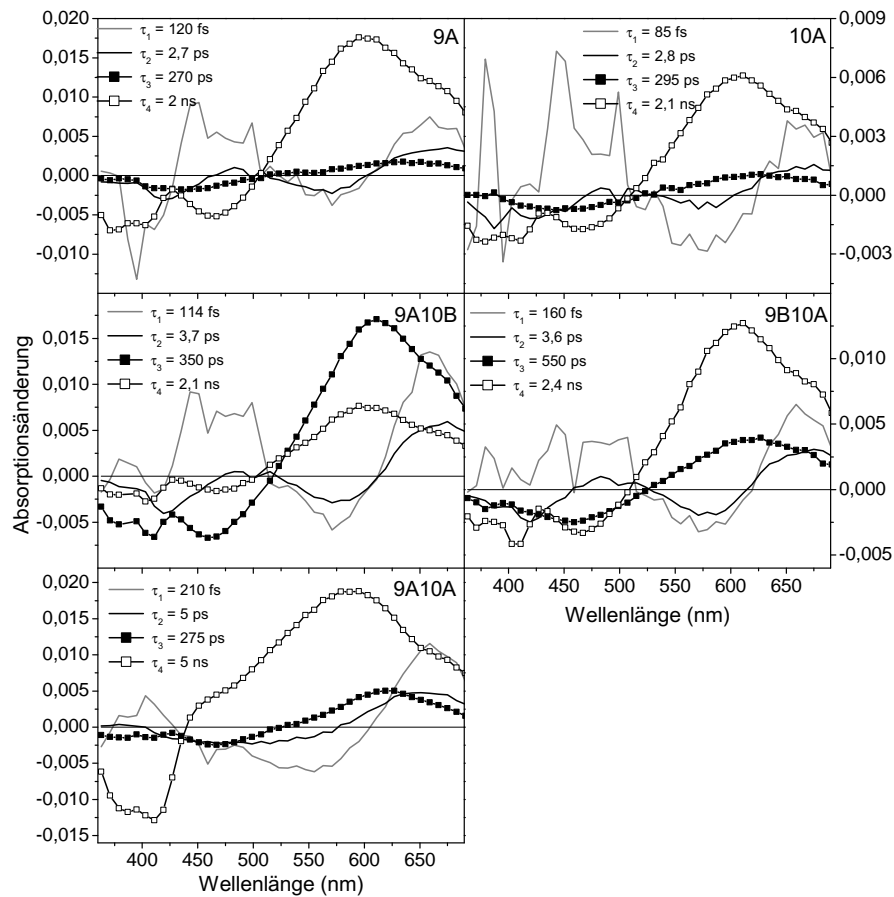


**Abbildung 4.24.** Transiente Absorptionsmessung aller untersuchter Einzel- und Doppelstränge. Die Spektren zeigen Absorptionsänderungen zwischen angeregter Probe, wobei rot positive Absorptionsänderungen und blau negative Absorptionsänderungen darstellt. Die Spektren zeigen mit Ausnahme des doppelt modifizierten Strangs 9A10A alle dieselbe Grundcharakteristik von GSB, ESA und SE, unterscheiden sich jedoch in Details. Im doppelt modifizierten Strang überlappen sich SE und ESA spektral, so dass die SE nicht als separate Bande zu erkennen ist.

zugehörigen Rotverschiebung der Region der SE wieder, und deutet an, dass hier ebenso wie im modifizierten Nukleosid eine Reorientierung im ersten angeregten Zustand stattfindet.

Alle Proben zeigen eine Zerfallszeit, die die Beobachtungsdauer übersteigt, bis auf 9A10B, deren Abklingzeit deutlich geringer zu sein scheint. Auf der anderen Seite deutet der Zeitverlauf von 9A10A eine Lebensdauer an, die das Beobachtungsfenster des Experiments um ein Vielfaches übersteigt.

Für jede der fünf Proben waren vier Zeitkonstanten nötig, um die Dynamik des Systems komplett zu beschreiben. Eine Zusammenstellung findet sich in der Tabelle 4.7. Die dazugehörigen DAS sind in Abbildung 4.25 gezeigt. Die Anordnung der Spektren erfolgt analog zu Abbildung 4.24. Die Zeitkonstanten ebenso wie die DAS ähneln denen des modifizierten Nukleosids (siehe Kapitel 4.3) und können analog dazu interpretiert werden. Die doppelt modifizierte Probe 9A10A zeigt leicht veränderte DAS, was auf



**Abbildung 4.25.** Ergebnisse der globalen Fitanalyse für 9A, 10A, 9A10B, 9B10A und 9A10A. Die Dynamik aller Proben ließ sich gut durch vier Zeitkonstanten beschreiben, die in allen Proben für ähnliche Prozesse stehen. Der größte Unterschied zwischen den Proben liegt im Verhältnis der beiden Fluoreszenzkomponenten  $\tau_3$  und  $\tau_4$ .

die spektrale Veränderung der Fluoreszenz und somit auch des angeregten Zustandes zurück zu führen ist.

Die kürzeste Zerfallszeit ( $\tau_1$ ) liegt zwischen 85 fs in 10A und 210 fs in 9A10A und liegt somit innerhalb der Zeitaufösung des Systems. Die generelle Charakteristik ist somit mit Sicherheit durch kohärente Effekte überlagert, insbesondere in der Region der Anregungswellenlänge aufgrund des Überlapps zwischen Pump- und Probepuls [248]. Dennoch ist eine vorsichtige Interpretation der langwelligen Bereiche der DAS möglich, die einige gemeinsame Charakteristika zeigen und sich auch mit der entsprechenden, kürzesten Zerfallszeit des modifizierten Nukleosids in Verbindung bringen lassen. Die DAS zeigen einen positiven Beitrag im langwelligen Bereich der ESA und einen negativen Beitrag im kurzwelligen Bereich der ESA. Zusätzlich taucht in den einfach modifi-

**Tabelle 4.7.** Zusammenstellung der aus der transienten Absorption bestimmten Zerfallszeiten.

	$\tau_1/\text{fs}$	$\tau_2/\text{ps}$	$\tau_3/\text{ps}$	$\tau_4/\text{ns}$
<b>9A</b>	120	2,7	270	2
<b>10A</b>	85	2,8	295	2,1
<b>9A10B</b>	114	3,7	350	2,1
<b>9B10A</b>	160	3,6	550	2,4
<b>9A10A</b>	210	5	275	5

zierten Proben ein positiver Beitrag im Bereich der stimulierten Emission auf. Analog zu den Schlußfolgerungen aus Kapitel 4.3 ist hier jedoch vermutlich auch eine Komponente zu finden, die, ähnlich wie beim pyrenmodifizierten Nukleosid Eigenschaften entweder eines Zerfalls aus höheren angeregten Zuständen oder einem heißen untersten angeregten Zustandes aufweist. Die Zerfallszeit ist im allgemeinen schneller als die bei dem reinen Pyrenadenin beobachtete. Für die doppelt modifizierte Probe zeigen die DAS leicht anderes Verhalten. Dies liegt insbesondere daran, dass der  $S_1$ - $S_n$ -Übergang im Pyrendimer rotverschoben ist. Zusätzlich dazu sollte auch nicht diffusionskontrollierte Exzimerbildung auf dieser Zeitskala erfolgen.

Analog zu den Beobachtungen am pyrenmodifizierten Adenin (siehe Kapitel 4.3) taucht auch hier mit  $\tau_2$  eine Ladungstransferkomponente auf, die zwischen 2,7 ps in 9A und 5 ps in 9A10A liegt. Dies ist ebenfalls deutlich schneller als in reinem Pyrenadenin. Die gefundene Beschleunigung des Ladungstrfers mit steigender Polarität (siehe Abbildung 4.5) legt jedoch nahe, dass in Wasser der Ladungstransfer schneller ablaufen sollte. Zudem verändert die Einbindung in einen RNA-Strang die Energieschwellen möglicherweise leicht und ermöglicht so einen schnelleren Ladungstransfer. Der Prozeß läuft in Duplexen generell langsamer ab. Möglicherweise liegt dies an den  $\pi$ -Stapelungen, die den Ladungstransfer in die RNA leicht erschweren. Der Übergang ist noch langsamer im doppelt modifizierten Duplex, wo die Gegenwart des zweiten Pyrens die Injektion des Elektrons weiter erschwert.

Die dritte und vierte Zerfallskonstante ( $\tau_3$  und  $\tau_4$ ), die von 270 ps bis 550 ps respektive von 2 ns bis 5 ns reicht, lässt sich mit der Fluoreszenz aus dem neutralen beziehungsweise dem Ladungstransferfluoreszenz verbinden. Hier finden sich die deutlichsten Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. Insbesondere das Verhältnis zwischen der längeren und der kürzeren Lebensdauer ändert sich von Probe zu Probe. Ein direkter, absoluter Vergleich der DAS ist aufgrund der leicht unterschiedlichen spektralen Charakteristika schwierig. Eine qualitative Diskussion kann dennoch zumindest für die einfach modifizierten Stränge mit Hilfe der maximalen ESA-Amplitude und einem Vergleich mit den entsprechenden Quantenausbeuten erfolgen (siehe Tabelle 4.8).

Bei Einzelsträngen ist ein deutliches Übergewicht der längeren Lebensdauer zu erkennen. Das Verhältnis zwischen  $A_3$  (lokal angeregt) und  $A_4$  (Ladungstransfer) ist in

**Tabelle 4.8.** Amplitudenverhältnisse der Fluoreszenzzeiten und zugehörige Quantenausbeuten

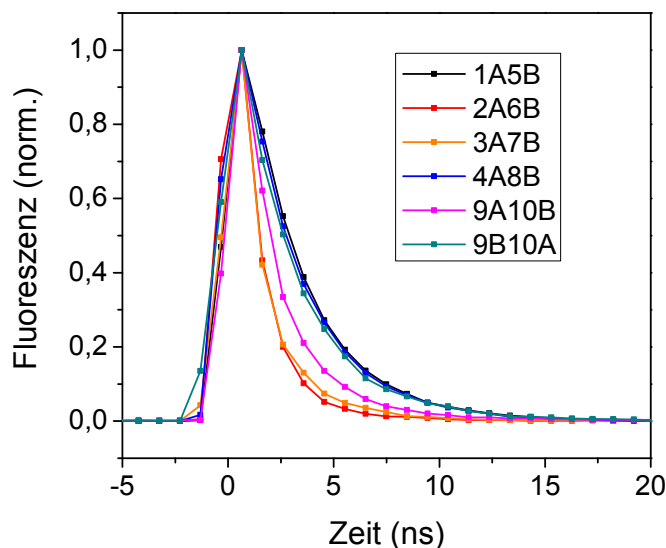
	$A_3/A_4$	$q_e$
<b>9A</b>	0,10	0,53
<b>10A</b>	0,18	0,47
<b>9A10B</b>	2,2	0,25
<b>9B10A</b>	0,31	0,58

9B10A größer als in den Einzelsträngen, kehrt sich in 9A10B jedoch um, so daß nun der Ladungstransferzustand den dominierenden Fluoreszenzkanal bildet.

Die instabile Konfiguration der Einzelstränge führt offensichtlich zu einer Favorisierung der Fluoreszenz des Ladungstransferzustandes. Durch Hybridisierung der Einzelstränge gewinnt der lokal angeregte Fluoreszenzkanal im Vergleich zum Ladungstransferkanal an Bedeutung, da das modifizierte Adenin nun in ein starrereres Netzwerk eingebunden ist. Der strukturelle Unterschied zwischen 9A10B und 9B10A liegt darin, dass das Pyren in 9A10B interkaliert vorliegt, während es sich in 9B10A außerhalb des Doppelstrangs befindet. Eine Position außerhalb des RNA-Stranges erlaubt also eine Stärkung des lokal angeregten Fluoreszenzanteils, während durch Interkalation ein selektives Löschen des Ladungstransferzustandes erfolgt. Diese Schlussfolgerung wird durch TCSPC-Messungen an diesen Strängen sowie an den Duplexen 1A5B-4A8B bestätigt.

Aus Abbildung 4.26 wird ersichtlich, dass alle Duplexe, die ein interkaliertes Pyren aufweisen, auch eine insgesamt kürzere Lebensdauer des angeregten Zustandes zeigen. Da die kürzere Lebensdauer sich deutlich unterhalb der Kanalgröße von 1 ns für die Messung befindet, ist eine exakte Bestimmung der einzelnen Zerfallskomponenten schwierig, die Tendenz ist dennoch deutlich zu erkennen.

Der doppelt modifizierte Duplex zeigt ein etwas anderes Verhalten als die einfach modifizierten Komponenten. Wie bereits erwähnt finden sich hier in  $\tau_1$  und  $\tau_2$  ebenfalls der beobachtete Zerfall aus höher angeregten Zuständen sowie der Ladungstransfer. Beide Zeiten sind hier deutlich verlängert, so daß gefolgert werden kann, daß das zweite Pyrenmolekül offenbar für die Dynamik des Pyrenadenin eine Störung darstellt. Es tritt, entgegen der Erwartung, keine Komponente auf, die klar die Bildung des Exzimers beschreibt. Dafür gibt es eine Reihe von Erklärungen. Zum einen sind sowohl  $A_1$  als auch  $A_2$  aufgrund des veränderten angeregten Zustandes im Vergleich zu den einfach modifizierten RNAs spektral verändert. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Bildung des Exzimers auf denselben Zeitskalen abspielt und somit nicht explizit als einzelne Amplitude auftaucht. Dies wäre eine deutlich kürzere Formationszeit als sie in anderen ordnenden Materialien beobachtet wurden [249–251]. Da eine Doppelhelix jedoch eine sehr hoch ordnende Struktur darstellt und in unserem Fall die Doppelhelix durch das Einbringen des Pyrens nicht wesentlich gestört wird, kann eine ultraschnelle Bildungszeit durchaus mit Hilfe der großen Nähe zwischen beiden Pyrenen erklärt werden. Zum



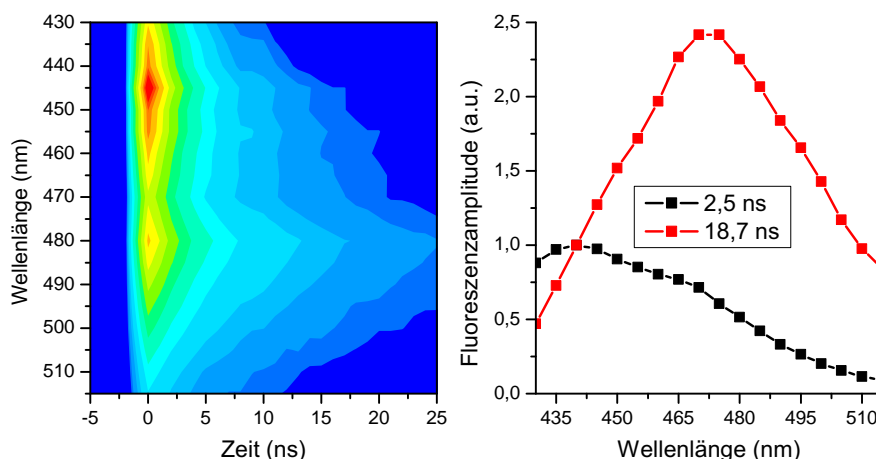
**Abbildung 4.26.** Lebensdauermessungen mit Hilfe des Zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC) an allen einfach modifizierten Duplexen bei 450 nm: Es wird deutlich, dass jene Proben, die ein interkalirtes Pyren besitzen, eine kürzere Lebensdauer als jene zeigen, bei denen sich das Pyren außerhalb des Duplex befindet.

zweiten ist ein Komplex zwischen den beiden Pyrenen bereits partiell im Grundzustand vorhanden, wie in Kapitel 4.4.2 erwähnt, so dass eine Bildung eines reinen Exzimers möglicherweise nur in eingeschränktem Maße stattfindet.

Wie in den einfach modifizierten Komponenten tauchen auch in 9A10A zwei Fluoreszenzlebensdauern mit  $\tau_3 = 275$  ps und  $\tau_4 = 5$  ns auf. Überraschenderweise ist die spektrale Charakteristik von  $A_3$  der in den einfach modifizierten Strängen beobachteten nahezu identisch. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass ein Teil der vorliegenden Probe weiterhin Monomercharakteristik aufweist.

$\tau_4$  befindet sich deutlich über der experimentellen Beobachtungsdauer und ist somit schwierig zu analysieren. Sie unterscheidet sich spektral deutlich von der in den Einzelsträngen beobachteten Ladungstransferfluoreszenz und kann somit zumindest teilweise dem Exzimerzustand des Pyrens zugewiesen werden. Eine weitere Analyse dieser Komponente erfolgt mit Hilfe des TCSPC, das für diesen Zeitbereich deutlich besser geeignet ist.

Abbildung 4.27 zeigt die TCSPC-Messung des doppelt modifizierten Duplex. Links ist ein 2D-Spektrum zu erkennen. Das Spektrum ist, wie die transienten Absorptionsmessungen auch, farblich markiert, wobei hier rot starke Fluoreszenz andeutet und dunkelblau für die Abwesenheit von Fluoreszenz steht. Es ist deutlich zu sehen, dass im niedrigen Wellenlängenbereich die Fluoreszenz deutlich schneller als bei höheren Wellenlängen zerfällt. Ein globaler Fit, der wie bei den transienten Absorptionsmessungen ausgeführt



**Abbildung 4.27.** Ergebnis des TCSPC-Experiments an 9A10A. Sowohl im 2-d-Spektrum (links) als auch in der Analyse von Lebensdauern und zugehörigen Amplituden (rechts) sind deutlich zwei Zerfallszeiten zu erkennen, die spektral sauber getrennt sind und sich somit als Monomer- und Exzimerkomponente beschreiben lassen.

wurde, liefert zwei verschiedene Zerfallskonstanten von 2,5 ns und 18,5 ns. Die DAS für beide Zeiten finden sich im rechten Teil von Abbildung 4.27. Die kleinere Zeitkonstante ist mit einer Amplitude assoziiert, die die spektrale Charakteristik einer Monomerfluoreszenz von Pyren aufweist, wie sie aus den einfach modifizierten Strängen bekannt ist. Zusätzlich taucht eine zweite Komponente von 18,7 ns auf, die weder in den Einzelsträngen noch in den einfach modifizierten Doppelsträngen beobachtet werden konnte, und somit mit dem Pyren-Exzimer in Verbindung gebracht werden kann. Der doppelt modifizierte Strang zeigt also insgesamt drei Fluoreszenzzerfallszeiten, von 275 ps (die in den TCSPC-Messungen nicht beobachtet werden kann, da die Kanalgröße 1 ns beträgt) sowie eine von 2,5 ns, die beide mit dem Monomerkomplex assoziiert werden können, und eine von 18,7 ns, die zu dem Pyrendimer gehört. In 9A10A liegt somit eine Koexistenz von Monomer- und Exzimerkomponenten vor.

## 4.5 Zusammenfassung

Das vorliegende Kapitel stellt eine ausführliche Analyse der Photophysik einer 1-ethinylpyrenmodifizierten Adeninbase und ihrer Wechselwirkungen mit RNA dar. Ebenso wie der zugrundeliegende Farbstoff Pyren selbst weist auch das hier verwendete Pyrenadenin eine deutliche Abhängigkeit insbesondere seiner Fluoreszenzeigenschaften von der direkten Molekülumgebung auf und ist somit sehr gut als Marker für die Konformation und Dynamik von Nukleobasen geeignet. Eine Untersuchung der Photophysik zeigt die Bildung eines fluoreszenten Ladungstransferzustands koexistent mit einem neutralen Zustand, der jedoch ebenfalls nicht reinem Pyren sondern vielmehr Pyrenadenin zuge-



ordnet werden muss.

Eingebunden in RNA-Modelldoppelstränge weist Pyrenadenin bei Interkalation in die RNA eine signifikante Verringerung seiner Fluoreszenz im Gegensatz zu dem nicht hybridisierten Strang auf. Im Gegensatz hierzu zeigt sich eine Fluoreszenzzunahme, wenn sich der Chromophor nach Hybridisierung außerhalb des Strangs befindet. Mit Hilfe dieses Effektes war es möglich, sequenzspezifische Interkalation des Pyrenfarbstoffs in Abhängigkeit der Nachbarbasen nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass Interkalation des Pyrens maßgeblich von der Stabilität der Umgebung abhängt und nur in stabilerer Umgebung - also in Nachbarschaft von G-C-Basenpaaren - auftritt. Transiente Absorptionmessungen weisen nach, dass diese Fluoreszenzlöschung maßgeblich auf Kosten der Fluoreszenz des Ladungstransferzustandes geschieht.

Untersuchungen an einem doppelt modifizierten Strang konnten zeigen, dass es möglich ist, das Schmelzen eines Stranges mit Hilfe der abnehmenden Exzimerfluoreszenz eines Pyrenpaars zu beobachten. Insbesondere lässt sich durch gleichzeitige Analyse des spektralen Verhaltens und der Intensität der Pyrenfluoreszenz schließen, dass das Schmelzen eines doppelt modifizierten Stranges in zwei Schritten geschieht und der Verlust der Pyren-Pyrenwechselwirkung bei signifikant niedrigeren Temperaturen als das Schmelzen des restlichen Stranges auftritt.

Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen des doppelt modifizierten Pyrens führten zu der Schlussfolgerung, dass eine Koexistenz von Monomer- und Exzimerzuständen in der Probe vorliegt und ein Übergang zwischen beiden Zuständen nicht beobachtet werden konnte. Entweder geschieht dieser also unterhalb der Zeitauflösung der Messung, oder er findet nach Photoanregung nicht statt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das hier untersuchte Pyrenadenin ein vielversprechender Sensor für Stabilität, Hybridisierung und Dynamik von Nukleobasen ist. Es bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten auf dem Gebiet der Biologie, wo Hybridisierungsmarker vielerlei Anwendungen finden. Ebenso ist Pyren hilfreich bei der Beobachtung der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Oligonukleotiden und der Wechselwirkung von RNA mit interkalierenden Farbstoffen und Elektroneninjektoren.



## 5 Ein Tetrazyklin bindendes Aptamer

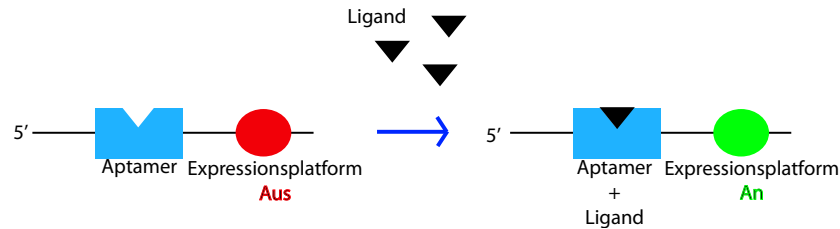
### 5.1 Einführung: Genregulation

Unabhängig von den jeweiligen Zelltypen ist die genetische Information in allen Zellen eines Organismus identisch. Die historische Annahme, dass eine direkte Verknüpfung zwischen der Sequenz der DNA und den in einer Zelle vorhandenen Proteinen besteht, ist aufgrund der deutlich unterschiedlichen Zusammensetzungen spezialisierter Zellen jedoch nicht haltbar.

Unterschiede in Morphologie und Aufgabenerfüllung innerhalb der einzelnen Zellen entstehen also nicht über die DNA an sich, sondern werden in der Entwicklung eines Organismus durch die Regulation der Genexpression gesteuert [252, 253]. Zudem wird über Regulation auch die Antwort der Zelle auf externe Stimuli organisiert. In der Entwicklung höherer Lebewesen wurden neben einem größeren Genom auch und insbesondere die Regulationsmechanismen verfeinert. Die Zellen von Säugetieren besitzen in etwa das Tausendfache der genetischen Information des Bakteriums *Escherichia coli*. Ein großer Teil dieser zusätzlichen Information beschäftigt sich mit der Regulation der Genexpression [252]. Daher ist das bessere Verständnis dieses Prozesses ebenso wie eine Kontrolle der Regulationskette von immenser wissenschaftlicher wie auch medizinischer Bedeutung.

Regulation greift sowohl auf DNA-, als auch auf RNA- und Proteinebene an. Auf DNA-Ebene findet Regulation in Eukaryoten hauptsächlich mit Hilfe von Histonen statt. Nach der Transkription kann mit einer Reihe von Mechanismen die Ausfuhr bestimmter Sequenzen aus dem Nukleus kontrolliert werden. Zudem besteht die Möglichkeit, bei den weiteren Verarbeitungsschritten der RNA wie dem Spleißen oder der Polyadenylierung anzusetzen. Steuerung der Translation hingegen erfolgt vor allem durch Eingreifen in die nicht translatierten Regionen an beiden Enden der mRNA (5'-NTR und 3'-NTR), wobei vor allem die spezifische Bindung von kleinen, nicht kodierenden RNAs (siRNAs, miRNAs [254]) sowie von RNA-bindenden Proteinen zu nennen ist [255]. Diese Regulationsmechanismen können nun, je nach Art der Interaktion, entweder die Degradation der mRNA begünstigen oder erschweren oder Translation unterdrücken [253].

Zusätzlich hierzu wurden gerade innerhalb der letzten Jahre eine Reihe von Regulationsmechanismen insbesondere in Prokaryoten entdeckt, bei denen das regulierende Element Teil der mRNA ist. Hierbei wird die große strukturelle Variabilität der RNA ausgenutzt, so dass ein externes Signal im nicht translatierten Teil der mRNA eine Konformationsänderung auslöst, die wiederum Translation fördert oder verhindert. Zu den externen Signalen zählen Proteine [256], inaktive Ribosomen [257], tRNAs [258], physikalische Signale wie die Temperatur [259] sowie die zellinterne Konzentration spezifischer kleiner Moleküle [260].



**Abbildung 5.1.** Schema eines Riboschalters (nach [261]): Die Aptamerdomäne bindet den Liganden und ist so in der Lage, zwei definierte Zustände einzunehmen (gebunden/ungebunden). Die Expressionsdomäne übersetzt diese Bindungszustände in zwei mögliche Zustände der mRNA (Genexpression erlaubt/inhibiert).

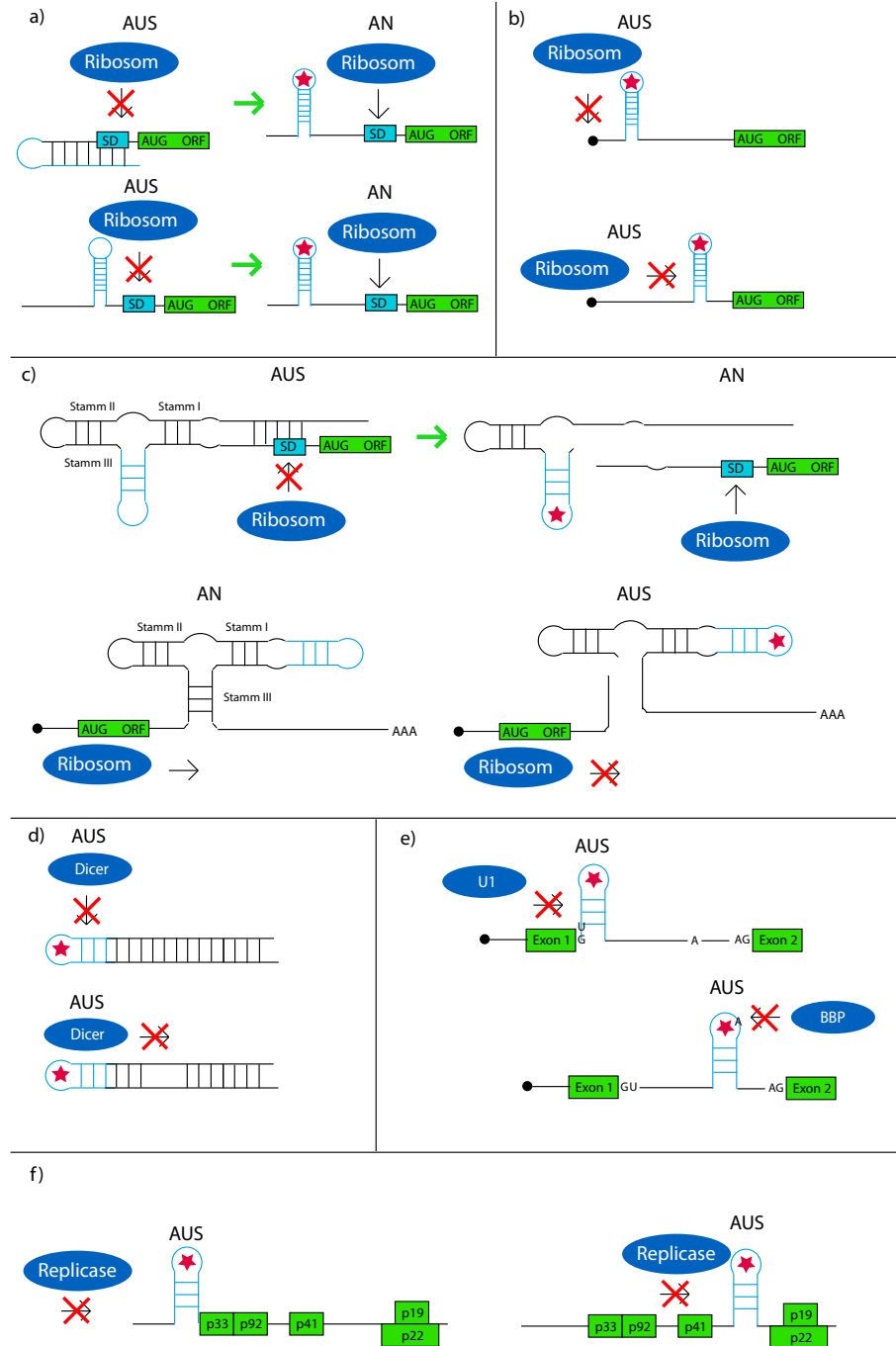
Im vorliegenden Kapitel wird die strukturelle Dynamik eines solchen regulatorisch aktiven Aptamers mit Hilfe zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Nach einigen einleitenden Betrachtungen über Riboschalter und ihre Funktionen wird das Tetrazyklin bindende Aptamer vorgestellt. Seine Bindungseigenschaften werden mit Hilfe des fluoreszierenden Liganden Tetrazyklin untersucht. Fluoreszenzlebensdauermessungen des Liganden bieten Aufschluss über die Stabilität der RNA-Bindetasche, und mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik wird der Verlauf des Bindevorgangs untersucht.

### 5.1.1 Riboschalter

Riboschalter (Riboswitches) befinden sich in den nicht translatierten Regionen einer mRNA und bestehen mit wenigen Ausnahmen aus zwei Domänen. Die Aptamerdomäne (auch Bindedomäne genannt) bindet spezifisch einen Liganden. Der Bindungszustand des Aptamers wird dann von der Expressionsplattform interpretiert, die wiederum die Genexpression beeinflusst. Es existieren für einen Riboschalter nur zwei klar definierte Zustände, zwischen denen mit Hilfe des Liganden ein Übergang besteht, aus denen ebenso zwei klar definierte Zustände für den translatierten Teil der mRNA folgen (siehe auch Abbildung 5.1) [261]. Die Kontrolle der Genexpression ist aus verschiedenen Gründen von großem Interesse. Zum einen kann durch die Unterdrückung eines spezifischen Gens dessen Rolle innerhalb des Organismus aufgeklärt werden. Zum anderen bieten Riboschalter auch die Möglichkeit, den Metabolismus einer Zelle bis zu einem gewissen Grad zu kontrollieren. Dies ist vor allem medizinisch relevant.

Das Eingreifen in die Genexpression auf RNA-Ebene bietet eine Reihe von Vorteilen. Im Gegensatz zur DNA ist bei Regulation der mRNA eine schnellere Antwort des Systems auf den externen Stimulus zu erwarten. Zum zweiten ist es möglich, Organismen anzugreifen, die keine DNA in sich tragen (Viren) oder bei denen Transkription nicht stattfindet (Oozyten). Drittens kann auch durch die begrenzte Lebensdauer von RNA innerhalb des Metabolismus die Dauer des Eingriffs limitiert und kontrolliert werden. Es ist also von Interesse, hochaffine Aptamere zu erstellen, die spezifisch an einen bestimmten Liganden binden, der nicht Teil des normalen Metabolismus des Zielorganismus ist.

Innerhalb der letzten anderthalb Jahrzehnte ist es gelungen, *in vivo* funktionelle Aptamere für eine große Zahl an Anwendungen zu finden. Ein guter Überblick über die bisher vorhandenen Aptamere und die Möglichkeiten ihrer Anwendung findet sich in den Referenzen [262–264]. Im Folgenden sollen nur eine Auswahl an Aptameren und Me-



**Abbildung 5.2.** Überblick über mögliche Funktionsmechanismen verschiedener Riboschalter (Grafik basierend aus Grafiken der Referenzen [262] und [263]): Nähere Erklärungen werden im Text unter den entsprechenden Buchstaben a) - f) gegeben.

chanismen kurz vorgestellt werden. Abbildung 5.2 zeigt einen Überblick über mögliche Funktionsmechanismen, die bisher *in vivo* nachgewiesen wurden.

- a.) **Regulation der Translationsinitiation in Prokaryoten:** Grundlegend gibt es zwei Möglichkeiten, die Initiation der Translation in Prokaryoten durch den Einsatz von Aptameren zu unterbinden. Beide Methoden basieren darauf, die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) für das Ribosom unzugänglich zu machen. Dies kann entweder durch Blockade der SD durch Basenpaarung (oben) oder durch sterische Störung aufgrund einer benachbarten Stammschleifenstruktur (unten) geschehen. Mit Hilfe des Theophyllin-Aptamers [265] gelang es, Genexpression in *Escheria coli* zu steuern, indem in Abwesenheit des Liganden ein Teil des Aptamers Basenpaarungen mit der SD-Domäne der mRNA einging [266–268]. In einer anderen Versuchsanordnung wurde dasselbe Aptamer in *Bacillus subtilis* verwendet. Hierbei war jedoch der Effekt der sterischen Störung der Ribosombindung entscheidend für die Regulation der Genexpression [269].
- b.) **Regulation der Translationsinitiation in Eukaryoten:** In Eukaryoten kann das Aptamer je nach Anbindungspunkt die Bindung des Ribosoms an die mRNA oder den Scanprozess selbst stören. Erste Arbeiten hierzu erfolgten mit Hilfe von Farbstoffliganden [270, 271], während insbesondere in den letzten Jahren auch das Tetrazyklin bindende sowie das Neomycin bindende Aptamer erfolversprechende Ergebnisse in Hefen erzielt haben [272, 273].
- c.) **Allosterisch regelbare Ribozyme:** Selbstspaltende Ribozyme sind eine weitere Möglichkeit, Genexpression zu regulieren. Um aus einem Ribozym einen Riboschalter zu machen, ist es jedoch nötig, allosterische Ribozyme zu verwenden, die einen deutlichen Aktivitätsunterschied in Gegenwart eines Liganden zeigen. Die besten Ergebnisse wurden hier mit verschiedenen Varianten des Hammerhead-Ribozyms [274] erzielt, das für seine selbstspaltenden Eigenschaften bekannt ist. Trotz einer großen Zahl allosterisch aktiver Ribozyme *in vitro* ist die Zahl *in vivo* aktiver Moleküle deutlich geringer. Die Möglichkeit der Verwendung dieser Methode wurde jedoch sowohl in Prokaryoten [275] als auch in Eukaryoten [276] nachgewiesen (oberes Schema). Ebenfalls erfolgreich war die Kombination der Struktur des Hammerhead-Ribozyms mit den allosterischen Eigenschaften bereits bekannter Aptamere. Hierbei wurde entweder an einen der Stämme des Hammerhead-Ribozyms ein bereits bekanntes Aptamer angebracht [277, 278] (oben) oder das Hammerhead-Ribozym durch eine vierte Helix erweitert, an der sich das Aptamer befand [279] (unten).
- d.) **Regelung der Erzeugung von siRNAs:** Das Theophyllin bindende Aptamer konnte dazu verwendet werden, die Endschleifenstruktur einer shRNA (small hairpin RNA) zu ersetzen und somit die Weiterverarbeitung der shRNA durch Dicer zu siRNA zu verhindern, um an dieser Stelle in die Genexpression einzugreifen [280, 281] (oben). In anderer Konfiguration wurde durch die Bindung des Liganden an Theophyllin und Xanthin bindende Aptamere die Basenpaarung der shRNAs gestört und somit die Funktion des Dicers unterbunden [282] (unten).
- e.) **Regelung des pre-mRNA-Spleißens:** Mit Hilfe verschiedener Aptamere (insbesondere des Theophyllin und des Tetrazyklin bindenden Aptamers) ist es möglich, das pre-mRNA-Spleißen zu unterdrücken. Hierbei werden durch Bindung des Liganden an die zuvor flexible Aptamerstruktur für das Spleißen wichtige Anknüpfungspunkte wie die *Branch Point Sequence* (unten) oder die 5'-Spleißstelle (oben) blockiert, so dass Spleißen nicht weiter möglich ist [283–286].
- f.) **Regelung der Viruspropagation:** Um die Replikation eines Virus zu kontrollieren, kann ein Aptamer so in die 5'-NTR der viralen RNA eingebracht werden, dass

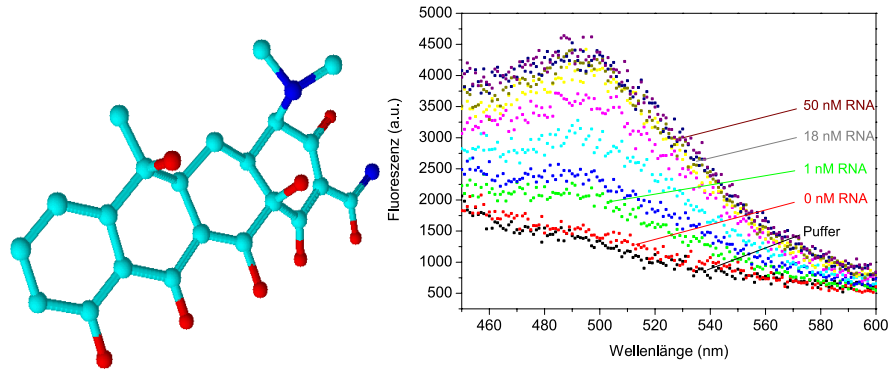
nur bei Präsenz des Liganden (in diesem Falle Theophyllin) Replikation initiiert werden kann [287] (links). Außerdem ist es möglich, das Theophyllin-Aptamer einzusetzen, um die Synthese subgenomischer mRNAs zu stoppen, die durch vorzeitiges Abbrechen des Transkriptionsvorgangs viraler RNA entsteht [288] (rechts).

In den letzten Jahren wurde die Faltungsdynamik von Aptameren und die Bindung der Aptamer-Liganden-Komplexe in verschiedenen Kontexten untersucht. Einen guten Überblick über die Entwicklung der letzten Jahre gibt zum Beispiel Referenz [10], wobei sich diese Betrachtung durchaus nicht auf Aptamere und Riboschalter beschränkt. An zeitaufgelösten Techniken zur Aufklärung der Strukturbildung von Aptameren sind vor allem NMR [289–292], auch in Kombination mit der ultraschnellen Freisetzung von geschützten Liganden (*caged ligands*) [293], Fluoreszenzlebensdauermessungen [294] und fluoreszenzbasierte Stopped-Flow [295–300] zu nennen. Bei letzterer wurde entweder mit fluoreszierenden Liganden [297–299] oder mit der Substitution von Adenin durch 2-Aminopurin [295, 296, 299, 300] gearbeitet, dessen Lebensdauer auch über den Konformationsraum von Aptameren Aufschluss geben kann [294]. Insbesondere letztere Methode erlaubt es, die Bindungskinetik eines Aptamers orts aufgelöst zu verfolgen und so eine Aussage über die Beteiligung verschiedener Teile des Aptamers an der Bindung zu machen [295, 300]. Ein direkter Vergleich ligandenbasierter und RNA-basierter Messung der Bindung macht zudem die Wichtigkeit des Beobachtungspunktes für die erhaltene Kinetik deutlich [299]. Insgesamt wurden bei der Beobachtung einer Eigenschaft des Liganden einstufige Bindungsprozesse abgeleitet, während die Fluoreszenz von strategisch platzierten Aminopurinen innerhalb der Aptamere einem zweistufigen Prozess folgt. Hieraus wurde gefolgert, dass in Abwesenheit des Liganden eine Superposition verschiedener Konformere der RNA vorliegt, von denen nur eine in der Lage ist, den Bindungsprozess einzuleiten. Dieser erfolgt dann in einem einzelnen Schritt, bei dem das Molekül die endgültige Konformation einnimmt.

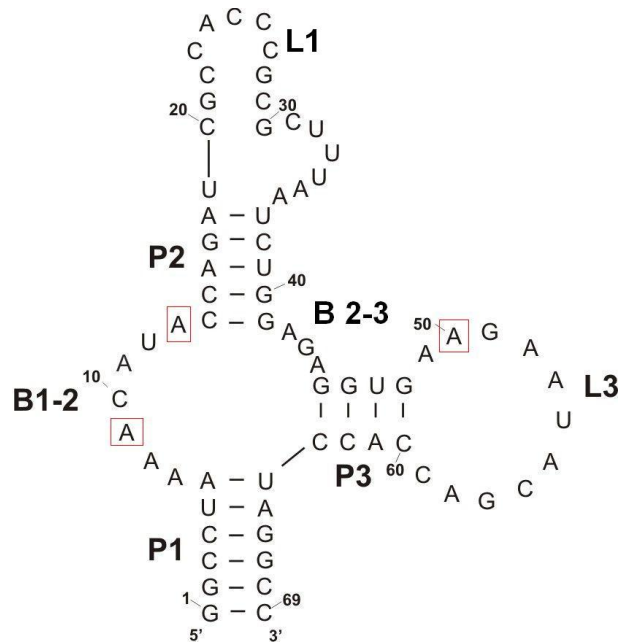
### 5.1.2 Das Tetrazyklin bindende Aptamer

Das 2001 zum ersten Mal vorgestellte Tetrazyklin bindende Aptamer [301, 302] zeigt eine Reihe vielversprechender regulatorischer Fähigkeiten. Als Resultat eines Selektionsprozesses (siehe Kapitel 5.1.3) stellte es sich als das Aptamer heraus, das von allen als hochaffin identifizierten Sequenzen die höchste Translationsregulation der Expression von *Green Fluorescent Protein* in Hefen aufwies. Dafür benötigt das Tetrazyklin bindende Aptamer keine separate Expressionsdomäne. Als Mechanismus für die regulatorische Eigenschaft des Aptamers wurde die sterische Hinderung der Bindung des Ribosoms an die mRNA bzw. des Scanningmechanismus identifiziert [303]. Insbesondere wurde eine Stabilisierung der Tertiärstruktur des Aptamers durch das Tetrazyklin als Grundlage für die Funktion postuliert [304]. In späteren Untersuchungen konnte auch die Regulation des pre-mRNA-Spleißens in Hefen mit Hilfe des Aptamers nachgewiesen werden [283]. Die Affinität des Aptamers befindet sich im sub-nanomolaren Bereich (770 pM) und ist damit um zwei Größenordnungen besser als die meisten vergleichbaren Systeme [305].

Eine Besonderheit des Liganden Tetrazyklin ( $C_{22}H_{24}N_2O_8$ , Abbildung 5.3 links), die ihn auch aus spektroskopischer Sicht besonders interessant macht, ist seine Eigenfluoreszenz, die sich bei Bindung an das Aptamer um ein Vielfaches erhöht [305] (siehe Abbildung 5.3 rechts). Dieser Effekt erlaubt es prinzipiell, die Bindung des Tetrazyklins an das Aptamer in Echtzeit mit Hilfe der Stopped-Flow-Technik (siehe Kapitel 3.1) zu beobachten.



**Abbildung 5.3.** Links: Struktur von Tetrazyklin. Rechts: Bei Bindung des Liganden Tetrazyklin an das Aptamer erhöht sich die Eigenfluoreszenz des Tetrazyklins um ein Vielfaches. (Messung durchgeführt von Julia Weigand in Analogie zu [305])

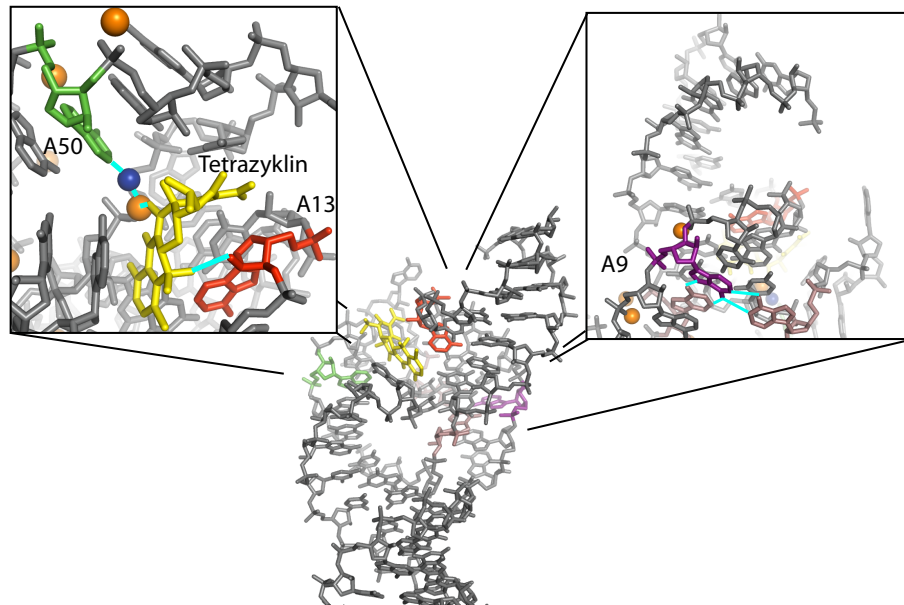


**Abbildung 5.4.** Sekundärstruktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers, basierend auf [273].

Abbildung 5.4 zeigt eine Darstellung der Sekundärstruktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers. Es besteht aus 69 Nukleotiden, die sich zu 3 *Helices* (P1-P3), 2 *Loops* (L1, L2) und zwei *Bulges* (B1-2, B2-3) formieren. Die Bindung des Tetrazyklins resultiert vermutlich in einer deutlichen Stabilisierung der Helix P1. In die Bindung direkt involviert sind jedoch nur der *Loop* L2, sowie die *Bulges* B1-2 und B2-3 [304].

Eine systematische Analyse des Aptamers auf Basis der Affinitäten verschiedener Mutanten sowie verschiedener Tetrazyklinderivate konnte weitere mechanistische Informationen über die Bindung liefern. Signifikante Unterschiede treten insbesondere bei Mutation der Basen A9, A13 und A50 auf (rot markiert in Abbildung 5.4). Die Untersuchung des tetrazyklinähnlichen Doxzyklins gab einen deutlichen Hinweis darauf,





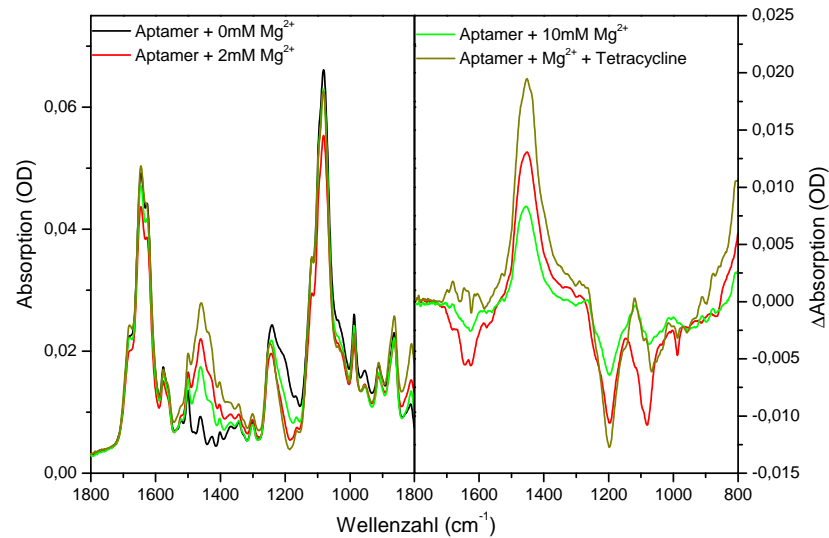
**Abbildung 5.5.** Auszüge aus der Kristallstruktur des Tetrazyklin bindenden Aptamers [306]: Mitte: Gesamtübersicht des Aptamers. Links: Gesamtübersicht über die Bindetasche des Aptamers. Base A13 bildet einen direkten Kontakt über die OH-Gruppe bei  $R_{6\beta}$  des Tetrazyklins, Base A50 ist mit dem Gegenion des Tetrazyklins ( $Mg^{2+}$ ) verbunden. Rechts: Base A9 ist essentiell für die Präformation der Bindetasche.

dass die OH-Gruppe bei  $R_{6\beta}$  des Tetrazyklins direkt an der Bindung des Liganden an das Aptamer beteiligt ist [305].

Die Resultate der thermodynamischen und mechanistischen Analyse wurden durch die in 2009 veröffentlichte Kristallstruktur des Aptamers bestätigt [306], deren wichtigste Ergebnisse in Abbildung 5.5 zusammengefasst sind. Die Kristallstruktur konkretisiert die essentiellen Rollen der vorher identifizierten Basen A9, A13 und A50. A9 ist maßgeblich an der Präformation des Aptamerkomplexes in sowohl Ab- als auch Anwesenheit des Liganden beteiligt. A13 und A50 binden den Liganden, wobei durch A13 eine direkte kovalente Bindung zur OH-Gruppe bei  $R_{6\beta}$  des Tetrazyklins aufgebaut wird, während A50 einen Kontakt zum Gegenion ( $Mg^{2+}$ ) ausbildet. Neuere NMR-Studien deuten darauf hin, dass das Tetrazyklin bindende Aptamer in Anwesenheit von Magnesium bereits präformiert vorliegt, und dass Bindung des Tetrazyklins nur noch kleinere strukturelle Änderungen nach sich zieht. Diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von ATR-Infrarotspektroskopie [307] gestützt werden.

Es wurden in Anwesenheit, sowie in Abwesenheit von Magnesium Messungen des in  $D_2O$  verbrachten Aptamers durchgeführt. Die Konzentration des Aptamers wurde hierbei auf 1 mMol eingestellt, die Magnesiumkonzentration wurde auf 2 mM, 10 mM und 15 mM (bei der Messung mit Tetrazyklin) eingestellt. Die anderen Puffersalze wurden analog zu den in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Konzentrationen zugegeben. Die Ergebnisse der Messung sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Im linken Teil der Grafik finden sich die Spektren, im rechten Teil die Differenzspektren zu der Probe ohne Magnesium.

Da eine genaue Bandenzuordnung zum gegenwärtigen Zeitpunkt den Rahmen der Ar-



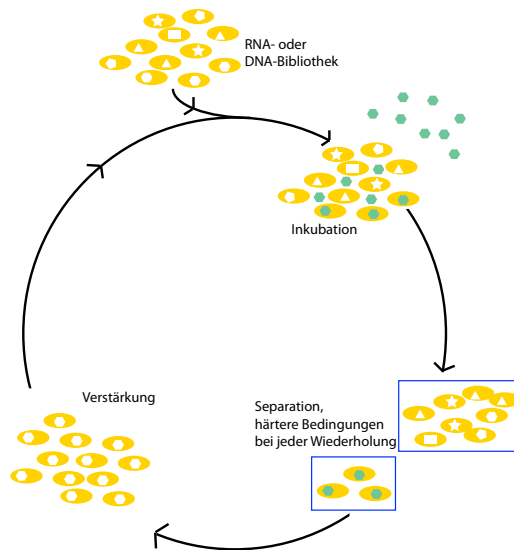
**Abbildung 5.6.** Links: Infrarotspektrum des Tetrazyklin bindenden Aptamers in Anwesenheit und Abwesenheit von Magnesium, sowie in Anwesenheit von Tetrazyklin bei einer RNA-Konzentration von 1 mM und einer Tetrazyklinkonzentration von 1,1 mM. Rechts: Differenzspektren der mit  $\text{MgCl}_2$  versetzten Proben und der Probe ohne Magnesium.

beit sprengen überschreiten würde, erfolgt im Folgenden nur eine quantitative Diskussion der Vorgänge. Bei Zugabe von Magnesium sind deutliche Änderungen im Spektrum zu erkennen, die auf eine große strukturelle Veränderung innerhalb der RNA hindeuten, da sie nicht dem Magnesium selbst zugeordnet werden können [308]. Bei Zugabe von Tetrazyklin werden die Signale verstärkt, ändern aber nur noch wenig ihre spektrale Signatur. Die Differenzspektren zeigen, dass vor allen Dingen die Breite der einzelnen Banden verringert wird. Hieraus lässt sich schließen, dass das Aptamer bereits bei Zugabe von Magnesium vorgeformt wird, und die Bindung des Tetrazyklins hauptsächlich eine Stabilisierung der Struktur verursacht, die bereits zuvor entstanden ist.

Die vorgestellten Erkenntnisse erlauben nun eine detaillierte kinetische Studie, bei der die Assoziation des Tetrazyklins an das Wildtypaptamer, ebenso wie an die relevanten Mutanten untersucht werden kann, um einen genaueren Überblick über den Bindungsprozess zu erhalten. Da die Struktur des Aptamers auf eine Präformation in Abwesenheit des Liganden hindeutet und die Affinität des Aptamers sehr hoch ist, sind für den Komplex eher schnellere Formationszeiten zu erwarten, die sich am Rande der Zeitauflösung einer Stopped-Flow-Apparatur befinden. Zudem erlaubt die Fluoreszenz des Tetrazyklins auch eine Untersuchung der Position des Tetrazyklins in der Bindetasche.

### 5.1.3 Identifikation und Herstellung des Tetrazyklin bindenden Aptamers

Wie die meisten anderen synthetisch hergestellten Aptamere wurde auch das Tetrazyklin bindende Aptamer im Rahmen eines SELEX-Prozesses (Systematic Evolution of Ligands



**Abbildung 5.7.** Schema des SELEX-Auswahlprozesses: Eine Bibliothek von RNA-Strängen wird mit einem Liganden inkubiert. Daraufhin werden die bindenden RNA-Stränge von den nicht bindenden getrennt und mit Hilfe von PCR und RT-PCR-Techniken vervielfacht. Die so erhaltenen Sequenzen werden ein weiteres Mal dem Selektionsprozess unterworfen, bis sich eine Reihe von hochaffin bindenden Sequenzen anreichert.

by EXponential enrichment) identifiziert [309, 310]. Abbildung 5.7 illustriert den Prozess in schematischer Weise. Eine randomisierte RNA-Bibliothek wird mit dem Liganden inkubiert. In einem nächsten Schritt werden die bindenden von den nicht bindenden Sequenzen, meist mit Hilfe von Affinitätschromatographie, getrennt. Die als bindend erkannten Sequenzen werden nun mit Hilfe von PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-Techniken vervielfältigt und dem Selektionsprozess ein weiteres Mal unterworfen. Mit Hilfe einer Reihe von Wiederholungen dieses Kreislaufs bei gleichzeitiger Verschärfung der Selektionsbedingungen lassen sich nun hochaffin an den Liganden bindende RNA-Sequenzen identifizieren. Im Falle des Tetrazyklin bindenden Aptamers wurde in der SELEX eine Serie von 14 geeigneten Sequenzen identifiziert [301], von denen jedoch nur die hier vorgestellte eine zufriedenstellende regulatorische Aktivität *in vivo* aufwies [302].

Das so identifizierte Aptamer wird für weitere Versuche aus einem in *E.coli* gewonnenen, linearisierten pSP64-Plasmid im Arbeitskreis Süß<sup>1</sup> hergestellt. Der Transkriptionsprozess erfolgt *in vitro* mit Hilfe eines T7-Promoters. Um ein klar definiertes 3'-Ende des Aptamers zu erreichen, wurde das eigentliche Aptamer mit einem selbstschneidenden Hammerhead-Ribozym kombiniert, dessen Stamm mit dem Stamm P1 des Aptamers eine Basenpaarung eingeht. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 2 ml mit 40 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) bei pH 8,0, 5 mM DDT, 1 mM Spermidine, 30 mM Mg-Azetat, 4 mM pro Nukleinsäuren-Triphosphat, 0,1 mg/ml HindIII-linearisiertem Plasmid und 15 mg/ml T7 RNA Polymerase für 16 h bei 37 °C inkubiert [311]. Die RNA-Bestandteile der Lösung wurden nun einer Ethanol-fällung unterzogen und auf einem 8 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Aptamerbestandteile wurden dann über Nacht in 300 mM Na-Acetat über Nacht bei Raum-

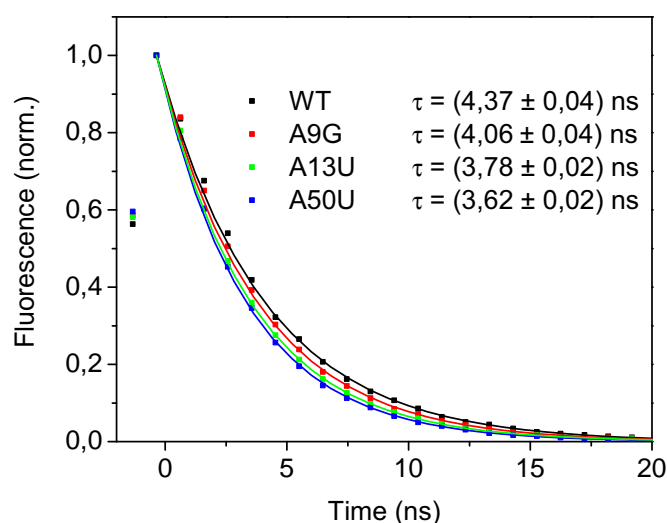
<sup>1</sup> Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt

temperatur aus dem Gel gelöst und erneut mit Ethanol gefällt. Das Aptamer wurde dann in Wasser erneut gelöst und bei  $-20^\circ$  gelagert.

Zur Vorbereitung der RNA auf die Messung wurde sie dann in einen wässrigen Phosphatpuffer mit 20 mM eines Gemischs aus  $K_2HPO_4$  und  $KH_2PO_4$ , 10 mM NaCl und 10 mM  $MgCl_2$  bei pH 7 überführt, um eine möglichst native Umgebung zu simulieren und eine mögliche Präformation des Aptamers zu erlauben.

## 5.2 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen

Mit Hilfe der in Kapitel 3.4 vorgestellten TCSPC-Apparatur wurden Untersuchungen über die Stabilität der Position des Tetrazyklin innerhalb der Bindetasche durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.4.3 und Kapitel 2.1.2 angedeutet, sowie in den Referenzen [36, 167] näher ausgeführt, ist die Lebensdauer eines Chromophors mit seiner Quantenausbeute verknüpft und beides oft von seiner Beweglichkeit abhängig. Der Grund hierfür findet sich darin, dass ein Teil der nichtstrahlenden Deaktivierungspfade eines Chromophors für gewöhnlich durch Konformationsänderungen des Moleküls bestimmt sind, die in einer Bindetasche blockiert werden können. Es ist zwar nicht möglich, ein allgemeines Gesetz zur Einschränkung der Beweglichkeit eines Chromophors und dessen Lebensdauer zu bestimmen, relative Aussagen, die durch Vergleich verschiedener Systeme gewonnen werden, können jedoch unter bestimmten Umständen getroffen werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass Fluoreszenz generell durch eine sehr große Zahl verschiedener Umgebungsfaktoren beeinflusst werden kann. Hierzu gehören Lösungspolaritäten ebenso wie beispielsweise das in Kapitel 4.4.3 erwähnte Fluoreszenzlöschen durch  $\pi$ -Stacking von Chromophoren mit umgebenden Aromaten. Die Fluoreszenz des Tetrazyklins selbst ist sehr stark von seinem möglichen Konformationsraum abhängig. So führt allein die Komplexbildung mit Gegenionen zu einer signifikanten Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer des Chromophors [312]. Zusätzlich kann die Lebensdauer auch von Effekten wie dem Fluoreszenzlöschen durch andere aromatische Systeme beeinflusst werden. Der deutliche Anstieg der Quantenausbeute des Tetrazyklins bei Bindung an das Aptamer deutet jedoch darauf hin, dass die konformationelle Einschränkung des Tetrazyklins der Haupteinfluss des Aptamers auf die Fluoreszenz des Tetrazyklins ist. Die Kristallstruktur des Aptamers deutet nicht auf sehr große, möglicherweise fluoreszenzlöschende Stapelwechselwirkungen hin. Unter der Voraussetzung, dass die Bindetasche in allen Mutanten prinzipiell auf dieselbe Art und Weise geformt ist, und somit Quenchingeffekte aufgrund unterschiedlicher Bindung ausgeschlossen werden können, lassen sich im Falle des Tetrazyklin bindenden Aptamers mit Hilfe der Fluoreszenzlebensdauer des Tetrazyklins Informationen über die verschiedenen Zustände der Bindetasche beim Wildtyp sowie den relevanten Mutanten A9G, A13U und A50U gewinnen. Die Dynamik des angeregten Zustands des isolierten gelösten Chromophors weist eine Reihe komplexer Vorgänge wie einen intramolekularen Protonentransfer und mehrkanalige Fluoreszenzzerfälle auf [312, 313], die Gesamtlebensdauer des Chromophors liegt jedoch weit unterhalb einer Nanosekunde. Die Bildung eines Komplexes mit einem Gegenion wie  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  verlängert die Lebensdauer [313], jedoch ist auch hier der Zerfall deutlich schneller als 1 ns und somit jenseits der Auflösungsgrenze der hier verwendeten TCSPC-Apparatur. Durch die Bindung des Tetrazyklins an das Aptamer jedoch steigt die Fluoreszenz um etwa das 20-fache, was auch eine deutliche Verlängerung der Lebensdauer erwarten lässt.



**Abbildung 5.8.** Vergleich der Lebensdauermessungen von Tetrazyklin, gebunden am Tetrazyklin bindenden Aptamer, sowie an 3 Mutanten (A9G, A13U, A50U): Die Messungen wurden bei einer Anregungswellenlänge von 385 nm durchgeführt. Die hier gezeigten Daten wurden bei 470 nm aufgenommen.

Zur Messung der Lebensdauer des an verschiedene Aptamervarianten gebundenen Tetrazyklins wurde der Laser, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, auf 770 nm eingestellt, so dass mit Hilfe der SHG (siehe Kapitel 3.2.1) eine Anregungswellenlänge von 385 nm erreicht werden konnte. Es wurde eine Anregungsenergie von 100 nJ pro Puls verwendet.

Die Proben wurden direkt vor der Messung in einem Verhältnis von 1:1 zwischen Tetrazyklin und RNA bei einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  hergestellt. Ein FGL435<sup>2</sup>-Filter wurde verwendet, um die Anregung von der Fluoreszenz zu trennen. Es wurden Messungen bei 25 verschiedenen Wellenlängen zwischen 460 nm und 580 nm im Abstand von 5 nm aufgenommen, wobei über  $6 \cdot 10^5$  Messungen gemittelt wurde.

Abbildung 5.8 zeigt die gemessenen Transienten bei 470 nm. Die beobachtete Dynamik lässt sich innerhalb des beobachteten Bereichs gut durch eine einexponentielle Kinetik beschreiben. Für alle Messungen erfolgte somit eine Anpassung der Messdaten an die Funktion  $y = y_0 + Ae^{-\frac{t}{\tau}}$  mit Hilfe des Programms Origin<sup>3</sup>. Anders als in vorherigen Studien [312, 313] ließ sich im Verlauf dieser Messungen keine komplexe Photophysik des Tetrazyklins auflösen. Da sich jedoch die postulierten Prozesse wie z.B. Ladungstransfer im Picosekundenbereich abspielen und die Zeitauflösung der verwendeten Apparatur 1 ns nur wenig unterschreitet, spielt sich der komplexere Teil der Photophysik des Tetrazyklins unterhalb der Zeitauflösung ab. Mit diesem Experiment konnte nur die Gesamtlebensdauer des niedrigsten angeregten Zustandes bestimmt wer-

<sup>2</sup> ThorLabs, Hans-Boeckler-Str. 6, 85221 Dachau/München, <http://www.thorlabs.de>

<sup>3</sup> OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Suite 303, Northampton, MA 01060, USA, <http://www.originlab.de>

**Tabelle 5.1.** Zusammenstellung der Lebensdauern von Tetrazyklin gebunden an verschiedene Derivate des Tetrazyklin bindenden Aptamers: Es lassen sich signifikante Lebensdauerunterschiede zwischen dem Wildtyp und den einzelnen Mutanten ausmachen, die den Fehler der Messung um ein Mehrfaches übersteigen.

RNA	$\tau$	$\Delta\tau$
<b>WT</b>	4,37 ns	0,04 ns
<b>A9G</b>	4,06 ns	0,04 ns
<b>A13U</b>	3,78 ns	0,02 ns
<b>A50U</b>	3,62 ns	0,02 ns

den, die jedoch bereits Aussagen über eine Tendenz der Stabilität der Bindungstasche des Tetrazyklins zulässt. In Tabelle 5.1 sind die Lebensdauern für alle untersuchten Proben zusammengestellt. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Stabilität der verschiedenen Komplexe ziehen.

Am stabilsten ist der Wildtyp, in dessen Bindetasche Tetrazyklin eine Lebensdauer von  $4,37 \text{ ns} \pm 0,04 \text{ ns}$  aufweist. Dies ist etwa einen Faktor 10 länger als die Lebensdauer von Tetrazyklin in Pufferlösung allein und demonstriert eine feste Einbindung des Chromophors innerhalb des Aptamers. Das an die Mutante A9G gebundene Tetrazyklin weist eine Lebensdauer von  $4,06 \text{ ns} \pm 0,04 \text{ ns}$  auf und ist somit von allen Mutanten die stabilste. Hieraus wird deutlich, dass die Base A9, die durch Verbinden des Loops L3 mit dem AGA-Element zwischen P2 und P3 eine Präformation der Bindetasche verursacht [306], von allen kritischen Basen den geringsten Einfluss auf die finale Stabilität der Bindetasche hat. Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass die Position des Tetrazyklins in der Bindetasche vor allem durch die direkten Kontakte an A13 und A50 bestimmt wird, und die Präformation durch A9 nur noch eine untergeordnete Rolle spielt, da die Bindetasche anstatt durch A9 somit durch das Tetrazyklin selbst geformt wird.

Mutationen an A13 und A50 führten zu deutlich größerer Destabilisierung der Tetrazyklinposition, da hier jeweils einer der direkten Kontakte zwischen Ligand und Aptamer fehlt und der Chromophor in der Bindetasche somit beweglicher ist. Insbesondere der Kontakt zu dem Gegenion, der durch A50 hergestellt wird, ist von herausragender Bedeutung. Das Gegenion selbst wirkt bereits deutlich stabilisierend auf das Tetrazyklin, so dass eine weitere Fixierung des Gegenions besonderen Einfluss auf das Chromophor hat.

Es lässt sich also sagen, dass eine Mutation der für die Präformation des Komplexes wichtigen Base A9 nach der Formation einer Bindung zwischen Tetrazyklin und RNA nur einen geringen Einfluss auf die Position des Chromophors innerhalb der Bindetasche hat. Der Verlust einer der direkten Anknüpfungspunkte des Farbstoffs an das Aptamer hat jedoch eine deutlich größere Beweglichkeit des Liganden in der Bindetasche zur Folge.

### 5.3 Stopped-Flow-Messungen

In einem nächsten Schritt soll nun ein genauerer Blick auf die Entstehung des Tetrazyklin-Aptamer-Komplexes geworfen werden. Ein tieferes Verständnis des Prozesses, der zur Bindung an das Aptamer führt, kann genauere Informationen über die Regulation sowie die Zeitkonstanten liefern als eine rein statische Bindungsanalyse. Insbesondere sollte es so möglich sein, genauere Informationen über den Einfluss der relevanten Mutationen an A9, A13 und A50 zu gewinnen.

Hierzu ist es nötig, den Bindungsprozess zeitaufgelöst zu beobachten. Als Beobachtungsgröße sollte eine Observable gewählt werden, die sich während der ablaufenden Kinetik deutlich ändert und deren Änderung verspricht, charakteristisch für den Gesamtprozess zu sein. Eine vielversprechende Variable ist die bereits in den Abschnitten 5.1.2 und 5.2 erwähnte Eigenfluoreszenz des Tetrazyklins. Da die Quantenausbeute des Chromophors mit seinen Freiheitsgraden und somit mit seiner Bindung an das Aptamer verknüpft ist, steht zu vermuten, dass sich die Vorgänge in der Bindungstasche direkt auf die Fluoreszenz des Tetrazyklins auswirken. Die zu erwartenden Kinetiken befinden sich im Millisekunden- bis Sekundenbereich, so dass sich eine Verwendung der Stopped-Flow-Technik (siehe Kapitel 3.1) anbietet. Hierbei wird in zwei Spritzen zum einen das Aptamer, zum anderen Tetrazyklin angeboten. Schnelle Mischung von beiden bei gleichzeitiger Beobachtung der Tetrazyklinfluoreszenz gibt dann Aufschluss über die Geschwindigkeit und den Verlauf des Bindungsprozesses.

Es steht zu erwarten, dass die Bindung sowohl von der Konzentration des Aptamers, als auch von der Konzentration des Tetrazyklins abhängt (es sich also mindestens um eine Kinetik zweiter Ordnung handelt). Für die Untersuchungen klassischer Assoziationsprobleme ist es zweckmäßig, in Substratüberschuß zu arbeiten. Es wird eine Reihe von Messungen mit konstant gehaltener Aptamerkonzentration und variierender Substratkonzentration für den Wildtyp sowie die drei relevanten Mutanten aufgenommen. Die Tetrazyklinkonzentrationen wurden mit Hilfe von Absorptionsspektren und dem molaren Extinktionskoeffizienten von  $14,15 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei  $366 \text{ nm}$  bestimmt [314]. Zur Anregung der Tetrazyklinfluoreszenz wurde eine LED<sup>4</sup> mit einer Zentralwellenlänge von  $375 \text{ nm}$  verwendet die durch eine Linse in die Beobachtungsküvette fokussiert wurde. Detektion erfolgte unter  $90^\circ$  mit Hilfe eines selbst entwickelten Adapters, der das aufgefangene Licht zunächst durch eine Linse bündelt. Das Streulicht der Anregung wurde durch zwei FGL435-Filter<sup>5</sup> von der Fluoreszenz getrennt und die übrige Fluoreszenz direkt auf einen Detektor (Hamamatsu H9696-20<sup>6</sup>) geleitet. Pro Transiente wurden je nach RNA-Konzentration zwischen 20 und 40 Mittelungen durchgeführt, die dann um das Signal des ungebundenen Tetrazyklins korrigiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Dynafit<sup>7</sup>, das, im Gegensatz zu den in Kapitel 2.5 vorgestellten mathematischen Betrachtungen, auf einer direkten Simulation der Transienten aus den Ratengleichungen des Systems beruht. Dies ist hier von Vorteil, da nicht bei

<sup>4</sup> PUR-LED GmbH & Co. KG, Bahnhofstr. 18, 55278 Selzen, Deutschland, <http://www.pur-led.de>

<sup>5</sup> ThorLabs GmbH, Hans-Boeckler-Str. 6, 85221 Dachau/Munich, Deutschland, <http://www.thorlabs.com>

<sup>6</sup> Hamamatsu Photonics, Arzbergerstr. 10, 82211 Herrsching am Ammersee, Deutschland, <http://www.hamamatsu.com>

<sup>7</sup> Biokin Ltd, 15 Main St, Suite 232, Watertown, MA 02472, USA, <http://www.biokin.com/dynafit/>

allen Konzentrationen von Substratsättigung ausgegangen werden kann und somit die in Kapitel 2.5 hergeleiteten Beziehungen nicht ohne weiteres verwendet werden können. Hierbei wird anhand eines postulierten Modells eine Anpassung der mikroskopischen Übergangsraten, sowie der relativen Fluoreszenzunterschiede der Anfangs- und End- sowie möglicher Zwischenzustände vorgenommen. Eine genauere Beschreibung des Programms und der zugrundeliegenden Algorithmen findet sich im Anhang B.4.

Zur besseren Anpassung der Daten und zur Korrektur von Langzeitdrifts der LED wurden alle Transienten vor der Anpassung bearbeitet. Das Fluoreszenzsignal des Aptamerkomplexes am Ende der beobachteten Kinetik wurde als konstanter Offset von allen Transienten abgezogen. In einem nächsten Schritt wurde davon ausgegangen, dass der Gesamtfluoreszenzanstieg aufgrund der gleichbleibenden Aptamerkonzentration in allen Proben vergleichbar ist und dies zur Normierung der Gesamtamplitude verwendet. Der innerhalb der Totzeit aufgetretene und somit nicht beobachtete Fluoreszenzanstieg wird durch ein Anpassen der Daten mit Exponentialfunktionen und ein Aufsummieren der einzelnen Amplitudenkomponenten abgeschätzt. Zuletzt erfolgt eine Multiplikation des gesamten Datensatzes mit  $-1$ . Es ergeben sich also Fluoreszenzkurven, bei denen die Anfangsintensität auf 1, die Endintensität auf 0 gesetzt wurde. Dies sollte prinzipiell die Kinetik nicht verändern, da mit Tetrazyklinüberschuss überhalb der Bindekonstante ( $k_D$ ) des Aptamers gearbeitet wurde. Somit bindet an jedes vorhandene Aptamer ein Tetrazyklin und es treten stets vergleichbare Anstiege der Fluoreszenz auf.

### 5.3.1 Bindungskinetik des Wildtyps

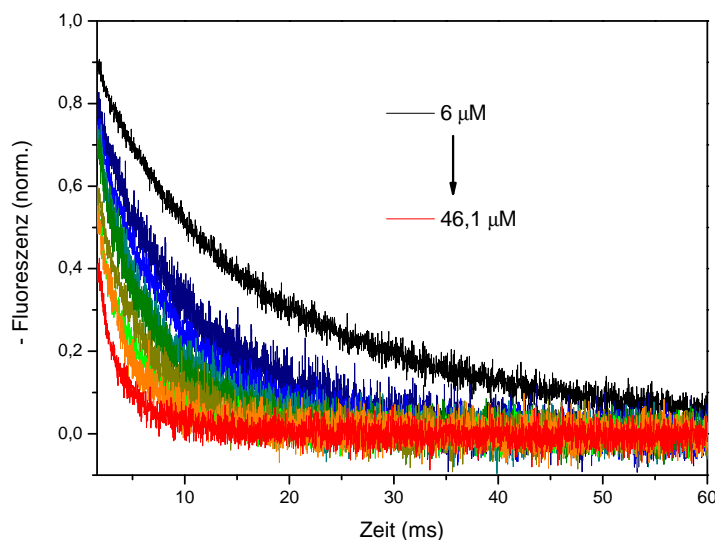
In einem ersten Versuch wurde die Bindungskinetik des Wildtyps untersucht. Hierzu wurde die RNA in einer Konzentration von  $1,8 \mu\text{M}$  in dem in Abschnitt 5.1.3 beschriebenen Puffer vorgelegt. Die Tetrazyklinkonzentration wurde zwischen  $6 \mu\text{M}$  und  $46,1 \mu\text{M}$  in 10 Schritten variiert und für jede Konzentration eine Stopped-Flow-Messung mit einer Schrittweite von  $20 \mu\text{s}$  und 40 Mittelungen durchgeführt.

In Abbildung 5.9 sind eine Reihe von Transienten dargestellt, die die Änderung der Tetrazyklinfluoreszenz in Gegenwart des Aptamers bei verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen zeigen. Das die Kurve überlagernde Rauschen ist etwa zu gleichen Teilen durch die Schwankungen der LED-Emission sowie durch Rauschen im Detektor begründet. Die Transiente ist jedoch frei von überlagerten Schwingungssignalen, so dass Beeinflussung der Messungen durch Störsignale wie Luftblasen oder Rückkopplung durch Start- und Stop-Signale ausgeschlossen werden können.

Bei steigender Substratkonzentration beschleunigt sich die Reaktion deutlich. Diese Beschleunigung nimmt jedoch merklich ab, wenn der Tetrazyklinüberschuss sehr hoch wird. Insgesamt sind die hier beobachteten Kinetiken deutlich schneller als die für andere Aptamere beobachteten Bindungsprozesse [297–300], was im Einklang mit dem außergewöhnlich niedrigen  $k_D$  des Tetrazyklin bindenden Aptamers ist.

Es erfolgte nun eine Datenanpassung an verschiedene Modelle. Eine Vorauswertung bei der die Reaktionsgeschwindigkeiten einzelner Transienten durch Anpassung von Exponentialfunktionen bestimmt wurden, deutet auf eine mehr als einstufige Kinetik hin. Dementsprechend wurden für die Simulation der Transienten mit Hilfe von Dynafit eine Reihe verschiedener möglicher Modelle untersucht, die in Tabelle 5.2 näher ausgeführt sind. RMS bezeichnet die Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate (*root mean square*





**Abbildung 5.9.** Änderung des Fluoreszenzsignals von Tetrazyklin bei Bindung an das Aptamer bei einer RNA-Konzentration von  $1,8 \mu\text{M}$  und verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen zwischen  $6 \mu\text{M}$  und  $46,1 \mu\text{M}$ : Bei steigender Konzentration des Tetrazyklins beschleunigt sich die Bindungsreaktion. Bei sehr hohem Tetrazyklinüberschuss nimmt die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit deutlich ab.

*deviation*) der Anpassung des entsprechenden Modells an den gesamten Datensatz,  $k_i$  bezeichnet die Reaktionsgeschwindigkeiten für den entsprechenden Fit. Von den verwendeten Modellen konvergierten nur jene, die auf einer einzigen bindenden Ausgangspopulation beruhten, so dass sich die weitere Auswertung auf diese Modelle beschränkt.

Als beste Anpassung an die Daten, wurde der dreistufige Prozess (Modell 3) identifiziert. Die Unterschiede in den Abweichungsquadraten zu den meisten anderen Modellen sind jedoch sehr gering, so dass eine genauere Prüfung der Datenanpassung erfolgen muss. In Abbildung 5.10 ist die Datenanpassung aller 6 Modelle an eine Reihe von zu verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen gehörigen Transienten dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Anpassung einer einstufigen Kinetik sowohl bei besonders niedrigen, als auch bei besonders hohen Tetrazyklinkonzentrationen eine deutlich weniger gute Beschreibung der Daten liefert als die Modelle 2-6. Dies gemeinsam mit dem deutlich höheren *RMS*-Wert für Modell 1 führt zu dem Schluss, dass es sich bei der vorliegenden Kinetik um keinen reinen einstufigen Prozess handeln kann. Dies widerspricht den bisher in anderen Aptameren beobachteten, auf einstufige Kinetiken hindeutenden Zusammenhängen zwischen Ligandenfluoreszenz und Ligandenkonzentration und deutet bereits auf eine Besonderheit des Tetrazyklin bindenden Aptamers im Vergleich zu anderen bisher untersuchten Aptameren hin [298, 299].

Zur Bestimmung des genauen Bindungsmechanismus muss jedoch eine weitere Analyse der Fits und die daraus erhaltenen Reaktionskonstanten erfolgen. Eine Zusammen-

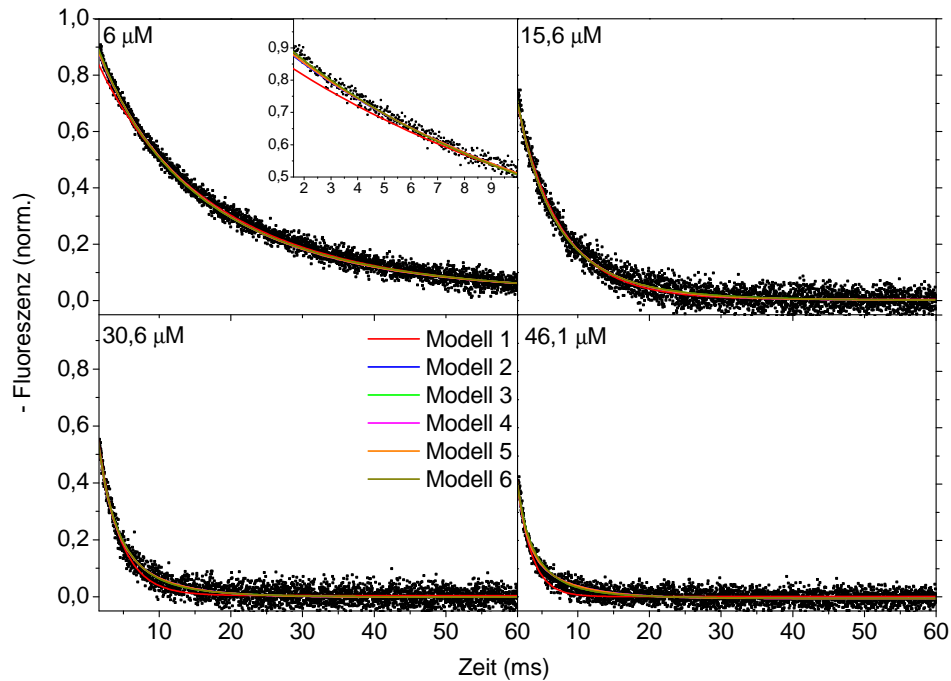
**Tabelle 5.2.** Zusammenstellung der untersuchten Modelle für die Simulation der Wildtyp-Bindungskinetik: T steht hier für Tetrazyklin, R für das Aptamer. Die hochgestellten Indices bezeichnen verschiedene Konformationen des Moleküls. Mit  $k_i$  werden die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Schritte bezeichnet. Die Auswahl der Modelle erfolgte anhand von Vergleichen zu ähnlichen Systemen und einer groben ersten Abschätzung der Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten. Die dritte Spalte (RMS) gibt die *root mean square deviation*, also die Wurzel der mittleren Abweichungsquadrate für die einzelnen Modelle, bezogen auf den gesamten Datensatz, an. Die mit n.k. bezeichneten Modelle konvergieren nicht.

Prozess	Reaktionsschema	RMS
1.) Einstufiger Prozess	$T + R \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} TR$	0,027 44
2.) Zweistufiger Prozess	$T + R \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} TR \xrightleftharpoons{k_2, k_{-2}} TR^*$	0,026 43
3.) Dreistufiger Prozess	$T + R \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} TR \xrightleftharpoons{k_2, k_{-2}} TR^* \xrightarrow{k_3} TR^{**}$	0,026 38
4.) Zweistufiger Prozess mit irreversiblen zweiten Schritt	$T + R \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} TR \xrightarrow{k_2} TR^*$	0,026 43
5.) Zweistufiger Prozess mit alternativem zweiten Schritt	$T + R \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} TR \xrightarrow{k_2, k_2'} TR^* + TR'^*$	0,026 43
6.) Dreistufiger Prozess mit reversiblen ersten Schritt	$T + R \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} TR \xrightarrow{k_2} TR^* \xrightarrow{k_3} TR^{**}$	0,026 38
7.) Zwei parallele einstufige Prozesse	$2T + R + R' \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}, k_1', k_{-1}'} TR + TR'$	n.k.
8.) Zwei zweistufige Prozesse verschiedener Populationen	$2T + R + R' \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}, k_1', k_{-1}'} TR + TR' \xrightarrow{k_2, k_2'} TR^* + TR'^*$	n.k.

stellungen der Ergebnisse für die relevanten Modelle findet sich in Tabelle 5.3, anhand derer nun eine weitere Analyse vorgenommen wird.

Die Modelle 2 und 4 beschreiben sehr ähnliche Prozesse, mit dem Unterschied, dass in Modell 2 noch eine zusätzliche Rückreaktion  $k_{-2}$  in den zweiten Reaktionsschritt mit einbezogen wird. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind im Rahmen der Fehler nahezu gleich, die zusätzliche Rückreaktionsrate ist um 9 Größenordnungen kleiner als die entsprechende Hinreaktion  $k_2$  und zusätzlich mit einem ausgesprochen großen Fehler behaftet. Somit kann die Rückreaktion des zweiten Schritts vernachlässigt werden und Modell 2 geht in Modell 4 über.

Modell 5 unterscheidet sich von Modell 4 dadurch, dass ein alternativer zweiter Schritt zu einer unterschiedlichen Endkonfiguration angenommen wird. Der Fit liefert für diesen zweiten Schritt zwei deutlich verschiedene Fluoreszenzanstiege  $\Delta F_{TR}$ . Auf Weg 1 tritt ein  $\Delta F_{TR^*}$  von 0,342 auf, während auf Weg 2 ein  $\Delta F_{TR'^*}$  von 1,67 bestimmt wurde. Zusätzlich sollte Weg 2 deutlich weniger beschritten werden, da die Reaktionsgeschwindigkeit etwa einen Faktor 6 niedriger als die von Weg 1 ist. Ein solch deutlicher Unterschied im Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeuten der beiden Wege sollte sich



**Abbildung 5.10.** Anpassung der Bindung von Tetrazyklin an das Aptamer bei verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen mit einer Reihe von Modellen: Deutlich ist zu erkennen, dass Modell 1 (einstufige Kinetik) eine wesentlich schlechtere Anpassung an die Daten erlaubt als 2-6. Der Einschub zeigt vergrößert den Anfang der Kinetik bei einer Tetrazyklinkonzentration von  $6 \mu\text{M}$ . Die RNA-Konzentration betrug bei allen Messungen  $1,8 \mu\text{M}$ .

jedoch, da die Lebensdauer eines Chromophors mit seiner Quantenausbeute verknüpft ist, auch in den Lebensdauern widerspiegeln. In diesem Falle sollte als Ergebnis der Lebensdauermessung ein zweiexponentieller Zerfall auftreten, bei dem jeder Zerfall mit einer Population assoziiert ist und somit die kürzere Lebensdauer insgesamt eine höhere Amplitude aufweisen sollte als die längere. Dies ist jedoch, wie in Abschnitt 5.2 gezeigt, nicht der Fall, so dass auf dieser Basis Modell 5 ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

Die Modelle 3 und 6 beschreiben dreistufige Prozesse, wobei Modell 3 eine Rückreaktionsrate zwischen den beiden Intermediatzuständen erlaubt. Modell 6 ist somit die Erweiterung von Modell 4 um einen weiteren Reaktionsschritt. Der Fit zeigt jedoch deutlich aufgrund des großen Fehlers, dass das Auftreten dieses zusätzlichen Reaktionsschritts ohne eine zusätzliche Rückreaktionsrate durch die Daten nicht gestützt wird. Die Reaktionsraten liegen in derselben Größenordnung wie bei Modell 4, wobei eine Abhängigkeit insbesondere zwischen  $k_{-1}$ ,  $k_2$  und  $k_3$  besteht, die zu einer signifikanten Instabilität des Fits führt und die Fehler dieser Reaktionskonstanten weiter erhöht. Somit kann Modell 6 ebenfalls auf Modell 4 zurückgeführt werden, so daß an relevanten Prozessen zur Beschreibung der Bindungskinetik des Tetrazyklins an das Aptamer nur

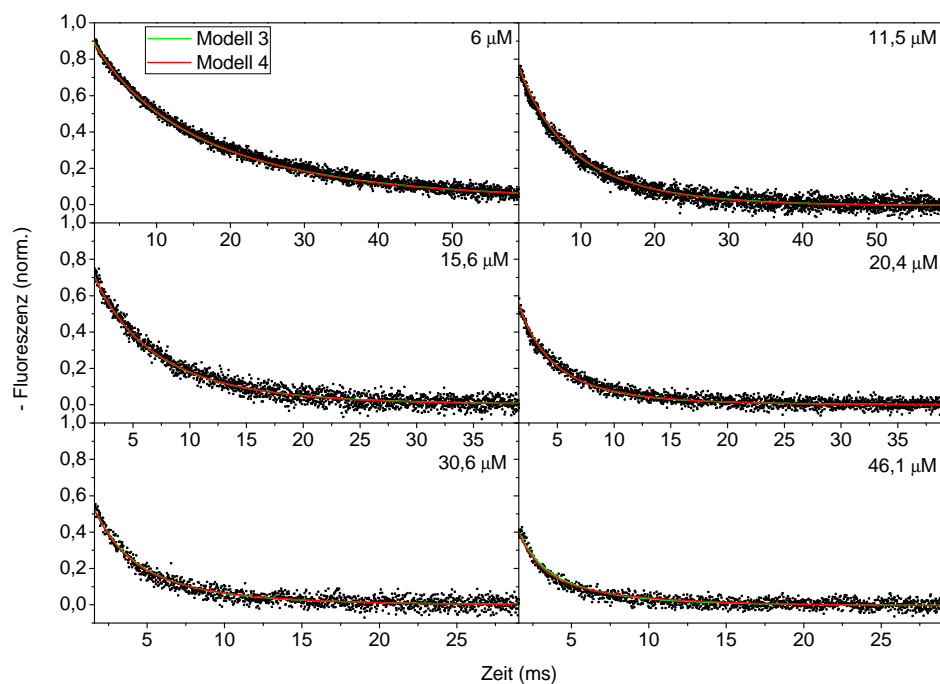
**Tabelle 5.3.** Zusammenstellung der aus der Datenanpassung erhaltenen Reaktionskonstanten für die in Tabelle 5.2 zusammengestellten Modelle:  $k_i$  beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeiten, während durch  $\Delta F_X$  die Änderungen des Fluoreszenzsignals für die einzelnen Zustände beschrieben wird. Aufgrund der Hintergrundkorrektur und Normierung der Daten beschreibt  $\Delta F_X$  keine direkten Quantenausbeutenunterschiede. Das Verhältnis der einzelnen Werte entspricht jedoch dem der ursprünglichen Quantenausbeuten, da es sich um eine populationsunabhängige Größe handelt. Anhand einer Analyse der Gemeinsamkeiten und Unterschiede der einzelnen Modelle können Rückschlüsse auf die tatsächlichen Vorgänge gezogen werden.

Modell 2		Modell 3		Modell 4	
$k_1$	$15 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$	$k_1$	$17,8 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 6\%$	$k_1$	$15 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$
$k_{-1}$	$24 \text{ }^1/\text{s} \pm 24\%$	$k_{-1}$	$80 \text{ }^1/\text{s} \pm 42\%$	$k_{-1}$	$28 \text{ }^1/\text{s} \pm 20\%$
$k_2$	$163 \text{ }^1/\text{s} \pm 7\%$	$k_2$	$300 \text{ }^1/\text{s} \pm 26\%$	$k_2$	$168 \text{ }^1/\text{s} \pm 6\%$
$k_{-2}$	$8 \times 10^{-7} \text{ }^1/\text{s} \pm 100\%$	$k_{-2}$	$33 \text{ }^1/\text{s} \pm 33\%$		
		$k_3$	$126 \text{ }^1/\text{s} \pm 24\%$		
$\Delta F_{TR}$	$0,46 \pm 1\%$	$\Delta F_{TR}$	$0,43 \pm 3\%$	$\Delta F_{TR}$	$0,462 \pm 1\%$
$\Delta F_{TR^*}$	$0,53 \pm 1\%$	$\Delta F_{TR^*}$	$0,55 \pm 2\%$	$\Delta F_{TR^*}$	$0,523 \pm 1\%$
		$\Delta F_{TR^{**}}$	$0,54 \pm 1\%$		
Modell 5		Modell 6			
$k_1$	$15 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 1\%$	$k_1$	$16 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 3\%$		
$k_{-1}$	$28 \text{ }^1/\text{s} \pm 3\%$	$k_{-1}$	$44 \text{ }^1/\text{s} \pm 28\%$		
$k_2$	$144 \text{ }^1/\text{s} \pm 1\%$	$k_2$	$224 \text{ }^1/\text{s} \pm 13\%$		
$k_{2'}$	$24 \text{ }^1/\text{s} \pm 0,1\%$	$k_3$	$11 \text{ }^1/\text{s} \pm 200\%$		
$\Delta F_{TR}$	$0,462 \pm 1\%$	$\Delta F_{TR}$	$0,451 \pm 1\%$		
$\Delta F_{TR^*}$	$0,342 \pm 0,1\%$	$\Delta F_{TR^*}$	$0,529 \pm 1\%$		
$\Delta F_{TR^{*'}}$	$1,67 \pm 0,1\%$	$\Delta F_{TR^{**}}$	$0,538 \pm 2\%$		

mehr Modell 3 und Modell 4 als mögliche Mechanismen übrig bleiben.

In Abbildung 5.11 werden beide Modelle miteinander verglichen. Es ist deutlich zu erkennen, dass trotz leicht unterschiedlicher RMS (Siehe Tabelle 5.2: 0.02638 für Modell 3 sowie 0.02643 für Modell 4) durch das dreistufige Modell 3 gegenüber dem zweistufigen keine wesentliche Verbesserung der Anpassung erreicht wird.

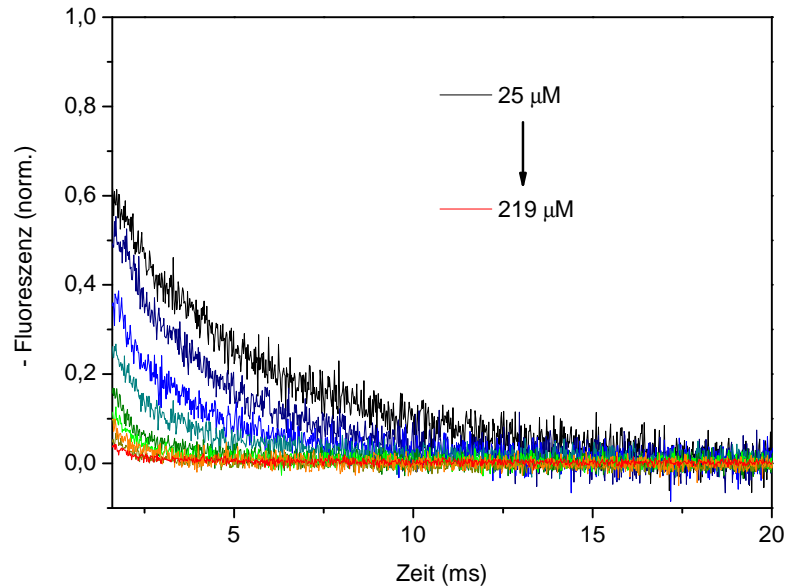
Somit kann die Bindung des Tetrazyklins an das Wildtypaptamer durch eine zweistufige Kinetik beschrieben werden, bei der der erste Schritt einem Gleichgewicht unterworfen ist, der zweite hingegen irreversibel ist. Eine zweistufige Kinetik mit irreversiblen zweiten Schritt tritt insbesondere bei Ligandenbindung an Proteine auf und wird dort als Bindungsschritt mit anschließender Umordnung des Proteins interpretiert [315, 316]. In allen bisher untersuchten Aptameren wurde bei Beobachtung der Ligandenfluores-



**Abbildung 5.11.** Vergleich der Fits nach Modell 3 und Modell 4 bei ausgewählten Transienten: Optisch lässt sich kein wesentlicher Unterschied erkennen, so dass für beide Prozesse eine nahezu gleich gute Anpassung vorliegt.

zenz eine einstufige Kinetik festgestellt [298, 299]. Der Grund für das hier beobachtete, davon abweichende Verhalten liegt in der deutlichen Präformation des Tetrazyklin bindenden Aptamers [317], in der es sich deutlich von den in den zitierten Studien untersuchten Purin-Riboschaltern unterscheidet. Hierbei führt eine Bindung des Liganden an die RNA aufgrund der großen konformationellen Einschränkung durch die Präformation bereits zu einem deutlichen Fluoreszenzeffekt, der etwas weniger als 50% des Gesamteffekts ausmacht. Es ergibt sich eine Formationsrate von  $15 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$  und eine Dissoziationsrate des Komplexes von  $28 \text{ }^1/\text{s} \pm 20\%$ . Beides zusammen führt zu einer Equilibrierungskonstante des ersten Schritts von  $k_{eq} = 1,9 \mu\text{M} \pm 22\%$ . In einem zweiten Umordnungsschritt wird der Ligand dann mit einer Rate von  $168 \text{ }^1/\text{s} \pm 6\%$  in der Bindetasche des Aptamers eingeschlossen. In offeneren Konfigurationen (z.B. dem Adenin bindenden Riboschalter) ist der erste Schritt der Bindung möglicherweise nicht mit einem direkten Effekt auf das Chromophor verbunden.

Auffällig ist, dass sich die Reaktionskonstanten des ersten Schritts nicht direkt mit dem aus den Gleichgewichtsmessungen bekannten  $k_D$  des Aptamers im picomolaren Bereich in Verbindung bringen lassen. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass bei Gleichgewichtsmessungen die Diffusion keine Rolle spielt, während sie in den hier durchgeführten Messungen durchaus einen Einfluss insbesondere auf  $k_1$  und somit auch auf

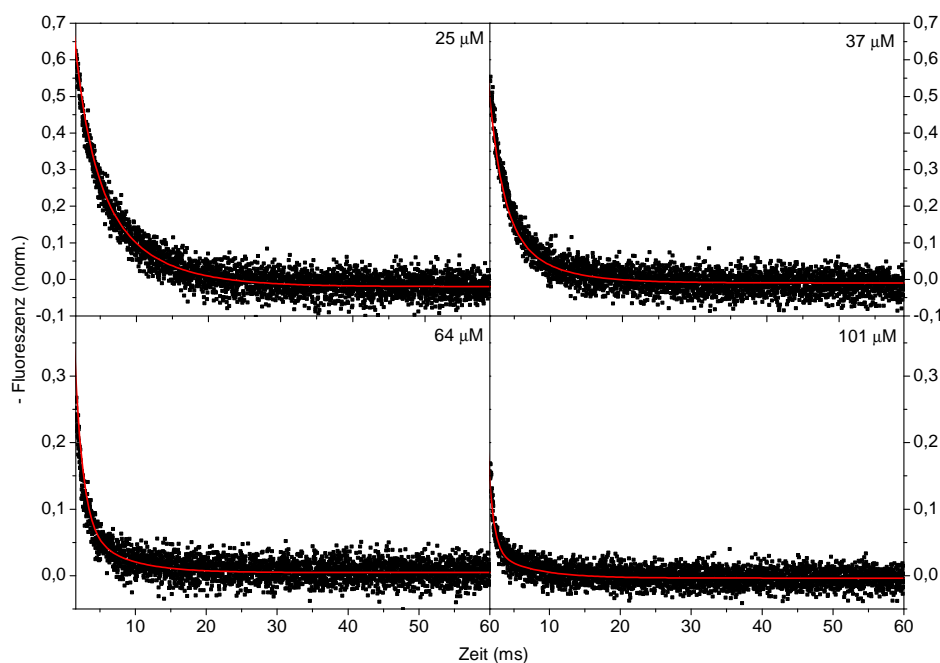


**Abbildung 5.12.** Änderung des Fluoreszenzsignals von Tetrazyklin bei Bindung an das Aptamer bei verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen und einer RNA-Konzentration von  $6,8 \mu\text{M}$ : Bei steigender Konzentration des Tetrazyklins beschleunigt sich die Bindungskinetik. Bei sehr hohem Tetrazyklinüberschuss nimmt die Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit deutlich ab, die Reaktionen sind insgesamt schneller als bei niedrigerer RNA-Konzentration.

den bestimmten  $k_D$  ausübt.

Die Abhängigkeit der Reaktion von der Tetrazyklinkonzentration wurde in obigem Experiment durch deren Variation untersucht. Ähnliches in systematischer Weise für den Einfluss des Aptamers durchzuführen, ist aufgrund der hohen benötigten Konzentrationen nicht praktikabel. Eine grobe Abschätzung erfolgt jedoch durch die Untersuchung der Bindungskinetik bei einer zweiten Konzentration, wie es im Folgenden dargestellt ist. Es wurde also dieselbe Messung wie zuvor beschrieben bei einer Aptamerkonzentration von  $6,8 \mu\text{M}$  durchgeführt. In gleichem Maße wurde auch die Tetrazyklinkonzentration erhöht, so dass Messungen zwischen  $25 \mu\text{M}$  und  $218 \mu\text{M}$  durchgeführt wurden. Ebenso wie bei der niedrigeren Tetrazyklinkonzentration wurde auch hier eine Schrittweite von  $20 \mu\text{s}$  gewählt. Aufgrund der höheren Signale und des gleichzeitig größeren Probenverbrauchs wurden pro Transiente 25 Mittelungen verwendet. Hier beschleunigt sich die Reaktion im Vergleich zu der Messung mit niedrigerer RNA-Konzentration von  $1,8 \mu\text{M}$ , wie in Abbildung 5.12 dargestellt. Dies entspricht dem Bild einer Reaktion zweiter Ordnung.

Trotz dieser beobachteten Beschleunigung sollte die Erhöhung der Aptamerkonzentration keine prinzipiellen Änderungen des Bindungsprozesses nach sich ziehen. Zudem kann angenommen werden, dass sich die Geschwindigkeit des zweiten Reaktionsschritts



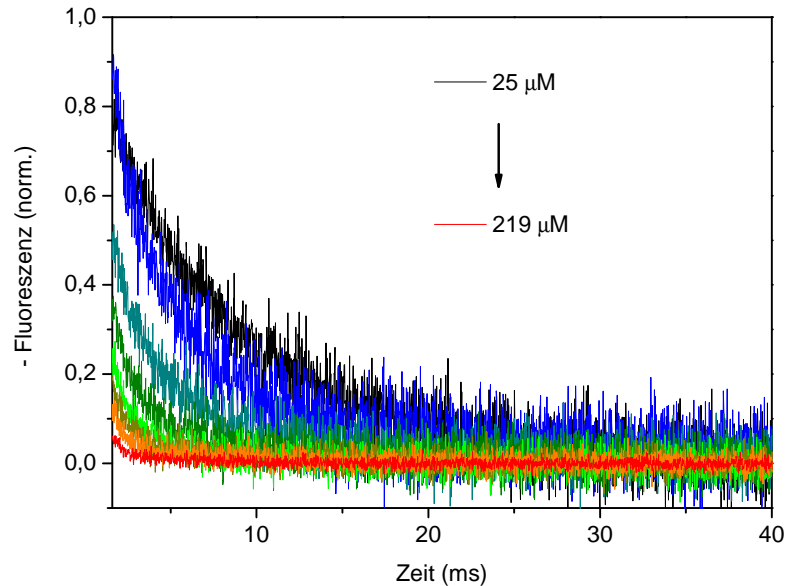
**Abbildung 5.13.** Anpassung der Messung der Bindung des Liganden an das Wildtyp-Aptamer bei einer RNA-Konzentration von  $6,8 \mu\text{M}$  mit einem zweistufigen Modell mit  $k_2 = 168 \text{ 1/s}$ .

nicht ändert, da sie nicht von der Konzentration der Reaktionsprodukte abhängen sollte. Es wird somit bei festgehaltenem  $k_2$  nur eine Anpassung von  $k_1$  und  $k_{-1}$  vorgenommen. Die resultierenden Fits sind in Abbildung 5.13 dargestellt. Es ergeben sich eine Assoziationskonstante von  $k_1 = 13,5 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 1 \%$  und eine Dissoziationskonstante von  $k_{-1} = 35,5 \text{ 1/s} \pm 6 \%$ . Die Assoziationskonstante ist leicht niedriger, die Dissoziationskonstante höher als bei der niedrigeren Konzentration von  $1,8 \mu\text{M}$ . Hieraus lässt sich folgern, dass bei hoher Konzentration zum einen die verschiedenen benachbarten Tetrazyklinmoleküle einander bei der Bindung behindern. Zum anderen wird die Dissoziation des Aptamer-Liganden-Komplexes dadurch erleichtert, dass schneller ein weiterer Bindungspartner zur Verfügung steht. Die Gleichgewichtskonstante erhöht sich somit auf  $k_{eq} = 2,6 \mu\text{M} \pm 7 \%$ . Diese Erhöhung gibt auch einen Hinweis darauf, warum bei diesen hohen Konzentrationen eine andere Gleichgewichtskonstante bestimmt wird als bei den im picomolaren Bereich durchgeführten  $k_D$ -Messungen.

In einem weiteren Schritt wurden in analoger Weise die Bindungsvorgänge der bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnten relevanten Mutanten untersucht, um den Einfluss der Basen A9, A13 und A50 auf die Kinetik ermitteln zu können.

### 5.3.2 Bindungskinetik der Mutante A50U

In diesem Abschnitt soll die Bindungskinetik einer Aptamervariante untersucht werden, bei der die Base A50, die an das Gegenion des Tetrazyklins bindet, durch ein Uracil



**Abbildung 5.14.** Änderung des Fluoreszenzsignals von Tetrazyklin bei Bindung an die Aptamermutante A50U bei verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen und einer RNA-Konzentration von  $6,9 \mu\text{M}$ : Die Geschwindigkeit der Bindung ist der des Wildtyps sehr ähnlich.

ersetzt wurde. Insbesondere ist interessant, an welchem Schritt der Bindung die Base A50 maßgeblich beteiligt ist, und wie groß die Auswirkung auf die Bindungskinetik ist. Die Messungen der Lebensdauer erlaubten die Interpretation, dass das Tetrazyklin bei dieser Mutante nach Bindung an das Aptamer die größte Beweglichkeit aufweist.

In Kontrast dazu zeigen die Bindungskinetiken in Abbildung 5.14, die bei einer RNA-Konzentration von  $6,9 \mu\text{M}$  aufgenommen wurden, keinen deutlichen Unterschied zu den Kinetiken des Wildtyps, wie sie in Abbildung 5.12 gezeigt wurden. Es wurde eine Aptamerkonzentration von  $6,9 \mu\text{M}$  angesetzt und die Kinetik bei neun Tetrazyklinkonzentrationen zwischen  $25 \mu\text{M}$  und  $219 \mu\text{M}$  vermessen. Es wurde eine Schrittweite von  $50 \mu\text{s}$  mit 8000 Punkten gewählt und für jede Transiente 21 Mittelungen vorgenommen.

Analog zu den Messungen der Kinetik des Wildtyps wurde auch für diese Mutante eine Analyse der Kinetiken auf Basis verschiedener Reaktionsmodelle mit Dynafit durchgeführt. Ähnlich wie auch bei den Betrachtungen der Wildtypkinetik erwies sich ein einstufiges Modell als ungeeignet, so dass auf Basis der vorliegenden Daten wiederum mit einem zweistufigen Modell zur Datenanpassung gearbeitet wurde. Die Ergebnisse der Datenanpassung sind in Abbildung 5.15 gezeigt. Es ergibt sich ein zweistufiges Modell mit leicht veränderten Reaktionskonstanten von  $k_1=8,4 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$ ,  $k_{-1}=46 \text{ 1/s} \pm 12\%$  und  $k_2=160 \text{ 1/s} \pm 9\%$ .



Zur Analyse der Relevanz der Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen der Kinetik der Mutante A50U und dem Wildtyp wurde nicht nur eine zweistufige Kinetik, bei der alle drei Parameter des Modells variabel sind, angesetzt, sondern zum Vergleich wurden auch Modelle untersucht, bei denen einzelne Reaktionskonstanten des Wildtyps übernommen und für einen Fit konstant gesetzt wurden. Durch eine Quantifizierung der Verschlechterung des jeweiligen Fits durch die Verringerung des Parameterraums läßt sich eine Abschätzung der Einflüsse treffen.

Tabelle 5.4 führt die Ergebnisse der Datenanpassung ebenso auf wie die mittlere quadratische Abweichung des Fits von den Daten (RMS), sowie den Akaike-Vergleichswert (siehe Anhang B.4) gegenüber dem Modell mit der besten Datenanpassung. Letzterer berechnet sich nach Gleichung B.2 und ist sowohl von der RMS, als auch von der Zahl der Freiheitsgrade des Systems abhängig. Die obere Zeile zeigt die Anpassung der Kinetik mit drei frei wählbaren Reaktionsgeschwindigkeiten, sowie, zum Vergleich, die Reaktionskonstanten des Wildtyps. In der unteren Zeile ist rechts die Anpassung aufgeführt, bei der nur die mit dem ersten Schritt assoziierten Reaktionsgeschwindigkeiten  $k_1$  und  $k_{-1}$  variiert wurden, unter der Annahme, dass die Base A50 nur am ersten Bindungsschritt beteiligt ist. In der unten links aufgeführten Anpassung wiederum wurde davon ausgegangen, dass nur der zweite Bindungsschritt durch die Abwesenheit der Base A50 verändert wird.

Die Reaktionskonstanten der Mutante A50U unterscheiden sich moderat von denen bei der Analyse der Kinetik des Wildtyps bestimmten. Insbesondere erfährt  $k_1$  eine Verringerung um 38 % und  $k_{-1}$  eine Beschleunigung von 30 %.  $k_2$  zeigt innerhalb der Fehlerbalken keine Veränderung zu der Wildtypkinetik, was bereits auf einen geringen Einfluss von A50 auf  $k_2$  hindeutet.

Es zeigt sich, dass die Anpassung bei fest vorgegebenem zweiten Schritt keine signifikant schlechtere Anpassung der Daten ergibt, als die Anpassung mit variablem  $k_2$ , so dass sich für das in Tabelle 5.4 unten rechts angegebene Modell aufgrund der geringeren Zahl der Freiheitsgrade sogar ein besserer Akaike-Vergleichswert als für das Ausgangsmodell ergibt. Letzteres ist mit einem  $\Delta\text{AIC}$  von 1,8 jedoch nur unwesentlich schlechter zu bewerten. Im Kontrast dazu führt ein festes Vorgeben der Geschwindigkeiten des ersten Schritts zu einem  $\Delta\text{AIC}$  von 1060, was auf eine deutlich schlechtere Übereinstimmung des Modells mit den Daten deutet. Der Austausch der Base A50 beeinflusst also insbesondere den ersten Bindungsschritt. Hieraus folgt, dass vermutlich bereits beim ersten Schritt die Bindung zwischen dem Gegenion des Liganden und dem Aptamer gebildet wird. Der Gesamteinfluss der Base auf den Bindungsprozess ist bei den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen jedoch nur moderat.

Insgesamt bietet eine Anpassung, bei der sich nur der erste Schritt gegenüber dem Wildtyp ändert, die beste Anpassung der Daten. Da für gewöhnlich bei einem  $\Delta\text{AIC} < 2$  von einem Fit gesprochen werden kann, dessen Qualität sich im Bereich des Referenzfits bewegt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in der Mutante A50U der zweite Schritt mit einer anderen Reaktionsrate als im Wildtyp abläuft, weswegen sich im Folgenden auf das alle Geschwindigkeitskonstanten variierende Modell bezogen wird. Für den ersten Reaktionsschritt der Mutante A50U ergibt sich also eine Hinreaktionsrate von  $8,4 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$  und eine Rückreaktionsrate von  $46 \text{ 1/s} \pm 12\%$ . Hieraus folgt eine Gleichgewichtskonstante von  $k_{eq} = 5,4 \mu\text{M} \pm 14\%$ , die etwa um einen Faktor 2 schlechter als die im Wildtyp bestimmte ist. Aufgrund der hohen Konzentrationen, die auch für die

**Tabelle 5.4.** Zusammenstellung der aus der Datenanpassung erhaltenen Reaktionskonstanten für die Anpassung der Bindungskinetik der Mutante A50U: Es wurden nur zweistufige Modelle mit irreversiblen zweiten Schritt betrachtet, da diese in einer vorherigen Studie als passendstes Modell bestimmt wurden.  $k_i$  beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Schritte. Mit \* sind diejenigen Größen bezeichnet, die für die jeweilige Datenanpassung als konstant gesetzt und im Verlauf des Fits nicht variiert wurden. Mit  $\Delta AIC$  werden die nach dem Akaike-Informationskriterium (siehe Anhang B.4) im Vergleich zu dem Fit der Daten ohne festgesetzte Parameter berechneten Gewichtungen dargestellt.

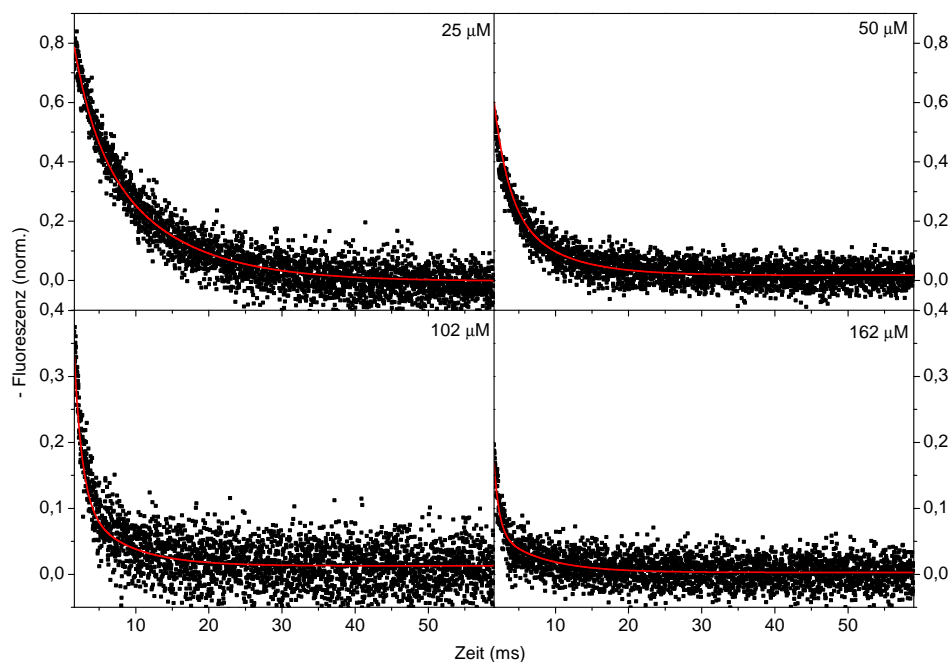
	WT	A50U
$k_1$	$13,5 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 1 \%$	$8,4 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2 \%$
$k_{-1}$	$35,5 \text{ }^1/\text{s} \pm 6 \%$	$46 \text{ }^1/\text{s} \pm 12 \%$
$k_2$	$168 \text{ }^1/\text{s}$	$160 \text{ }^1/\text{s} \pm 9 \%$
<i>RMS</i>	0,026 43	0,032 51
$\Delta AIC$	-	1,8
	A50U (1. Schritt fix)	A50U (2. Schritt fix)
$k_1$	* $13,5 (\mu\text{Ms})^{-1}$	$8,5 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2 \%$
$k_{-1}$	* $35,5 \text{ }^1/\text{s}$	$48 \text{ }^1/\text{s} \pm 8 \%$
$k_2$	$150 \text{ }^1/\text{s} \pm 4 \%$	* $168 \text{ }^1/\text{s}$
<i>RMS</i>	0,035 66	0,032 51
$\Delta AIC$	1060	0

schlechter bindenden Mutanten noch mindestens einen Faktor 5 oberhalb des statischen  $K_d$  liegen [305], ist jedoch auch dieser Wert nicht mit den aus statischen Messungen erhaltenen zu vergleichen. Der zweite Schritt, der mit einer Geschwindigkeit von  $160 \text{ }^1/\text{s} \pm 9 \%$  abläuft, ist nur wenig langsamer als die Kinetik des Wildtyps.

### 5.3.3 Bindungskinetik der Mutante A13U

In ähnlicher Art wurde ebenfalls die Bindungskinetik der Mutante A13U untersucht. Hier fehlt der direkte Kontakt des Aptamers über eine kovalente Bildung zum Tetrazyklin. Überdies wird vermutet, dass die Region bei A13 den ersten Anlagerungspunkt des Tetrazyklins an das Aptamer darstellt, da hier die Änderung der Bindungskonstante hauptsächlich enthalpische Anteile zeigt [305].

Die Messung der Kinetik des modifizierten Aptamers erfolgte bei neun verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen zwischen  $15 \mu\text{M}$  und  $207 \mu\text{M}$  sowie einer RNA-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ . Die Schrittweite lag bei  $50 \mu\text{s}$ , für eine Transiente wurden 30 Mittelungen vorgenommen. Ähnlich wie bei der Mutante A50U ist auch hier der Unterschied der Transienten zu denen des Wildtyps nicht besonders groß, wie Abbildung 5.16 zeigt. Es findet sich jedoch insgesamt eine leichte Verlangsamung der Transienten im Vergleich

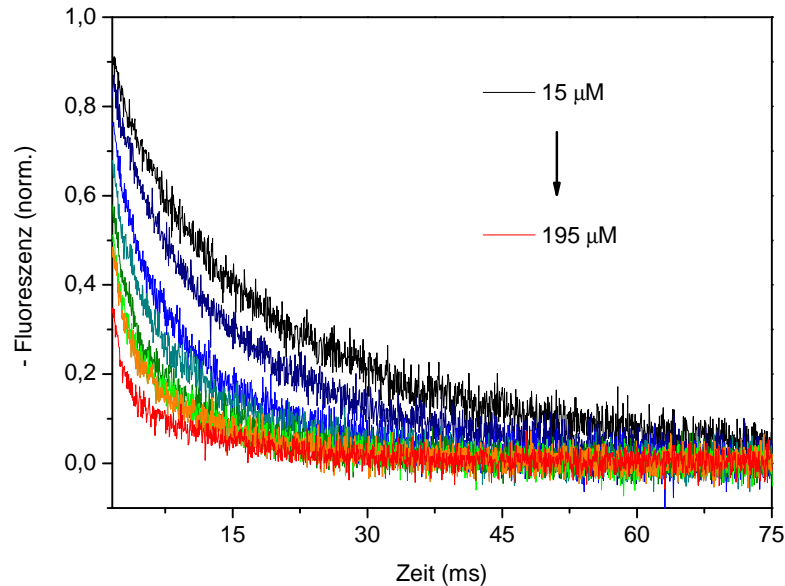


**Abbildung 5.15.** Messung der Bindung des Liganden an die Aptamermutante A50U bei einer RNA-Konzentration von  $6,9 \mu\text{M}$  und Anpassung mit einem zweistufigen Modell mit irreversiblen zweiten Schritt und  $k_1=8,4 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$ ,  $k_{-1}=46 \text{ s}^{-1} \pm 12\%$  und  $k_2=160 \text{ s}^{-1} \pm 9\%$ .

zu den vorher untersuchten Aptamervarianten.

Eine genauere Analyse der Bindungskinetik in Abwesenheit der Base A13 weist, wie bei den anderen bisher untersuchten Aptamervarianten, eine zweistufige Kinetik auf, deren Anpassung in Abbildung 5.17 dargestellt ist. Anders als bei der Mutante A50U ist der Einfluss dieser Mutation auf beide Reaktionsschritte signifikant. Bei einer wie im vorherigen Abschnitt beschriebenen Auswertung ergeben sich sowohl für eine Variation des ersten, als auch des zweiten Schritts sehr hohe  $\Delta\text{AIC}$ -Werte von 5960 respektive 720, so dass gefolgert werden muss, dass beide Schritte der Reaktion durch das Fehlen der Base A13 stark beeinflusst werden.

Es ergibt sich also, dass bei Fehlen der Base A13 eine Hinreaktionsrate von  $6,06 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$  und eine Rückreaktionsrate von  $55 \text{ s}^{-1} \pm 5\%$  beobachtet werden, aus denen sich eine Gleichgewichtskonstante von  $k_{eq} = 9,1 \mu\text{M} \pm 7\%$  ergibt. Dies ist etwas weniger als das Vierfache von  $k_{eq}$  des Wildtyps und etwas weniger als das Doppelte der Gleichgewichtskonstante von A50U. Dies weist darauf hin, dass das Fehlen des direkten Kontaktes zum Tetrazyklin eine deutlichere Störung der Bindungskinetik als das Fehlen des Kontaktes zum Tetrazyklin-Gegenion darstellt und steht im Einklang mit der Vermutung, dass A13 ein erster Anknüpfungspunkt des Tetrazyklins bei der Bindung ist. Der zweite Schritt wird durch das Fehlen von A13 zu  $106 \text{ s}^{-1} \pm 2\%$  verlangsamt, was eine Verringerung der

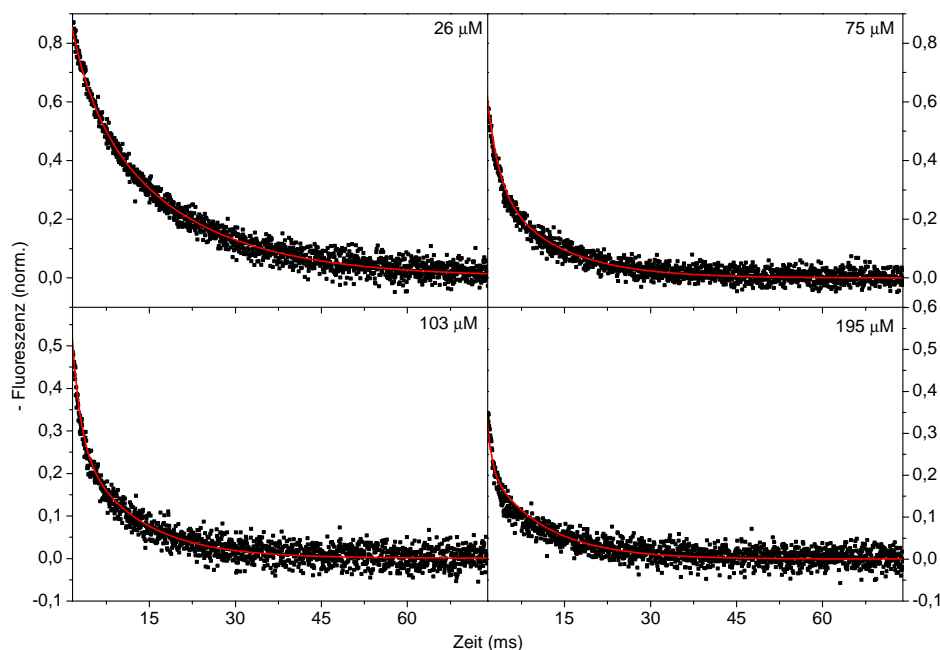


**Abbildung 5.16.** Änderung des Fluoreszenzsignals von Tetrazyklin bei Bindung an die Aptamermutante A13U bei verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen und einer RNA-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ : Die Geschwindigkeit der Bindung ist der des Wildtyps, sowie der Mutante A50U sehr ähnlich, verläuft jedoch etwas langsamer.

Reaktionsgeschwindigkeit um 36 % im Vergleich zum Wildtyp bedeutet. Diese Verlangsamung ist deutlich stärker als die bei der Mutante A50U, die keinen nennenswerten Einfluß auf den ersten Bindungsschritt aufweist.

### 5.3.4 Bindungskinetik der Mutante A9G

Bei der Mutante A9G wird die höchste Änderung der Bindungskinetik des Aptamers im Vergleich zum Wildtyp erwartet. Die Messung erfolgte bei einer RNA-Konzentration von  $9 \mu\text{M}$  und bei Tetrazyklinkonzentrationen zwischen  $22 \mu\text{M}$  und  $228 \mu\text{M}$ . Es wurden jeweils 21 Messungen pro Mittelung mit einer Schrittweite von  $0,5 \text{ ms}$  vorgenommen. Da die Base A9, wie bereits mehrfach erwähnt, insbesondere für die Präformation des Aptamers verantwortlich ist, führt ihr Fehlen zu einer deutlich flexibleren Konformation der RNA in Abwesenheit des Liganden. Hieraus folgt, dass das Tetrazyklin bei Bindung eine weniger präformierte Bindetasche vorfindet und es somit deutlich länger dauert, bis es seine finale Position eingenommen hat. Diese Überlegungen werden durch die in Abbildung 5.18 dargestellten Transienten bestätigt. Die Reaktion verlangsamt sich deutlich sichtbar um ein Vielfaches im Vergleich zum Wildtyp. In derselben Art und Weise wie oben beschrieben wurde auch hier eine Analyse verschiedener Reaktionsmodelle durchgeführt, die ebenfalls einen zweistufigen Prozess als wahrscheinlichstes Modell ergaben. Die dazugehörigen Datenanpassungen sind in Abbildung 5.19 dargestellt, die erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten sind in Tabelle 5.5 angeführt.

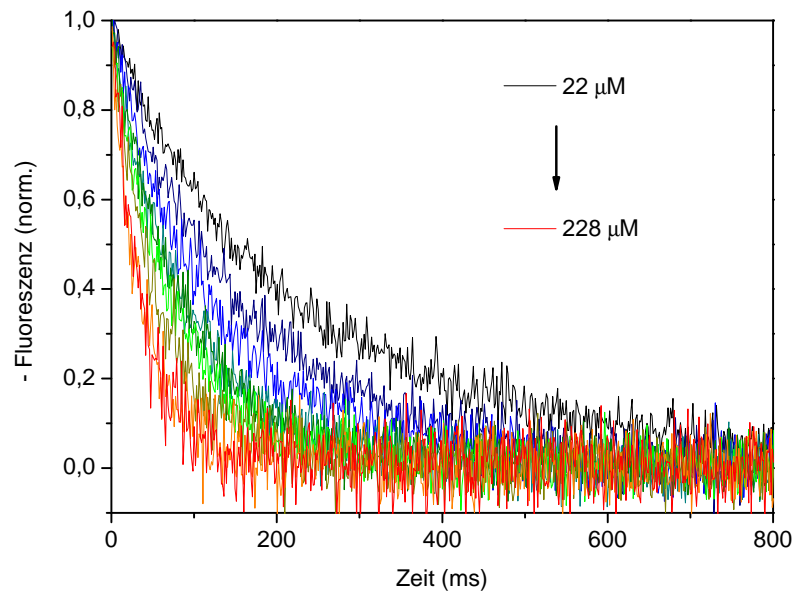


**Abbildung 5.17.** Anpassung der Messung der Bindung des Liganden an die Aptamermutante A13U bei einer RNA-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  mit einem zweistufigen Modell, irreversiblen zweiten Schritt und  $k_1=6,06 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 2\%$ ,  $k_{-1}=55 \text{ 1/s} \pm 5\%$  und  $k_2=106 \text{ 1/s} \pm 2\%$ .

**Tabelle 5.5.** Ergebnis der Datenanpassung der Kinetik der Mutante A9G mit einem zweistufigen Reaktionsmodell: Zum Vergleich ist ebenfalls das Ergebnis für den Wildtyp bei gleicher RNA-Konzentration von  $9 \mu\text{M}$  angeführt.

	A9G	Wildtyp
$k_1$	$63 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 31,4\%$	$13,5 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 1\%$
$k_{-1}$	$13,4 \times 10^3 \text{ 1/s} \pm 31,5\%$	$35,5 \text{ 1/s} \pm 6\%$
$k_2$	$51 \text{ 1/s} \pm 5,2\%$	$168 \text{ 1/s}$
$\frac{\Delta F_{TR}}{\Delta F}$	$0,07 \pm 40,4 \%$	$0,45 \pm 1,2\%$
$\frac{\Delta F_{TR^*}}{\Delta F}$	$0,93 \pm 10,4 \%$	$0,55 \pm 0,4\%$

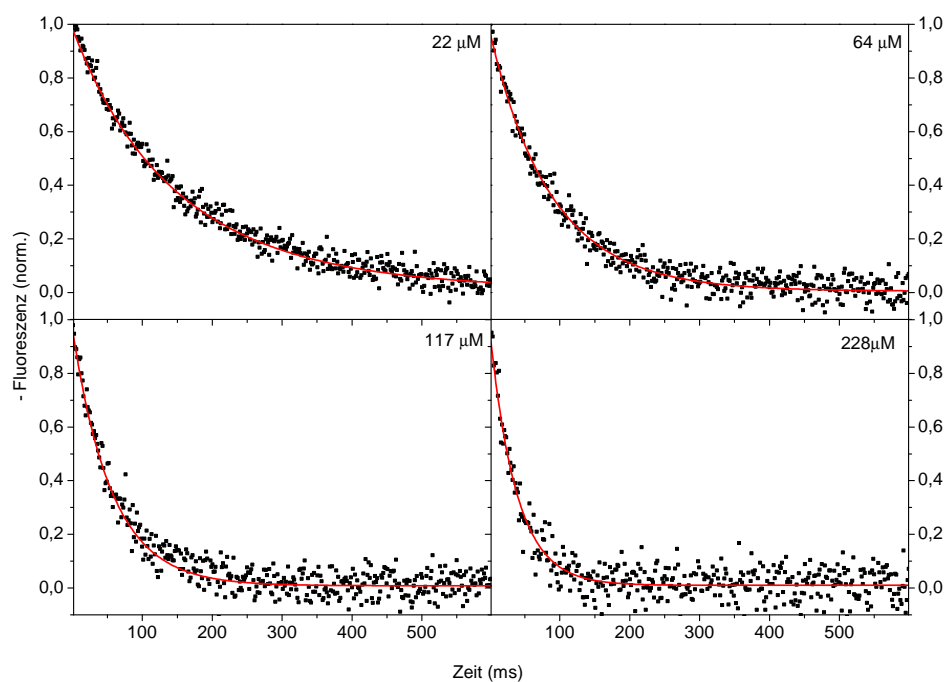
Der Gesamtprozess ist in der Mutante A9G im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamt. Der Hauptgrund hierfür liegt in der Rückreaktionsrate des ersten Schritts, die sich um mehrere Größenordnungen beschleunigt. Dies deutet entweder auf eine Maskierung der korrekten Bindestelle, oder auf eine große Zahl an Aptameren hin, die zwar fähig sind, einen Liganden in einem ersten Schritt zu binden, die jedoch keine korrekte Binde-



**Abbildung 5.18.** Änderung des Fluoreszenzsignals von Tetrazyklin bei Bindung an die Aptamermutante A9G bei einer RNA-Konzentration von  $9\ \mu\text{M}$  und verschiedenen Tetrazyklinkonzentrationen: Die beobachtete Kinetik ist insgesamt bei ähnlichen Substrat- und RNA-Konzentrationen deutlich langsamer als bei allen bisher untersuchten Proben.

tasche ausbilden können, bevor eine Dissoziation des Liganden stattfindet. Unterstützt wird dieses Bild von den zu den jeweiligen Schritten gehörenden Fluoreszenzanstiegen  $\Delta F_{TR}$  und  $\Delta F_{TR*}$  die ebenfalls mit Hilfe der Datenanpassungsroutine ermittelt wurden. In Tabelle 5.5 sind die auf den Gesamtfluoreszenzanstieg bezogenen Anteile von erstem und zweitem Schritt an der Fluoreszenzänderung aufgeführt. Auffällig ist, dass der erste Bindungsschritt in A9G nur etwa 7 % des Gesamtfluoreszenzanstiegs ausmacht, während er im Wildtyp mit 45 % für beinahe die Hälfte des Gesamtsignals verantwortlich ist (Ähnliches wie im Wildtyp ergibt sich mit geringen Variationen auch für die Mutanten A13U und A50U). Der erste Bindungsschritt führt also nur zu einer schwachen konformationellen Einschränkung des Liganden durch das Aptamer. Dies ist aufgrund der geringen Präformation von A9G durchaus plausibel.

In diesem Lichte ist auch die Beschleunigung der Assoziation des Chromophors an die RNA um etwa einen Faktor 4 zu sehen. Aufgrund der mangelnden Präformation des Aptamers sind die Bindestellen A13 und A50 einzeln möglicherweise leichter für den Liganden zugänglich. Die Bindung an eine der beiden Bindungsstellen reicht offenbar bereits für eine schwache Änderung der Tetrazyklinfluoreszenz, wie sie für  $\Delta F_{TR}$  bestimmt wurde, aus. Es ist jedoch deutlich unwahrscheinlicher, dass der Ligand auf eine Konformation des Aptamers trifft, die die Formation einer korrekten Bindetasche ermöglicht, so dass ein Großteil der temporär gebildeten Komplexe wieder dissoziiert,



**Abbildung 5.19.** Anpassung der Messung der Bindung des Liganden an die Aptamermutante A9G bei einer RNA-Konzentration von  $9 \mu\text{M}$  mit einem zweistufigen Modell mit irreversiblen zweiten Schritt und  $k_1=63 (\mu\text{Ms})^{-1} \pm 31,4\%$ ,  $k_{-1}=13,4 \times 10^3 \text{ 1/s} \pm 31,5\%$  und  $k_2=51 \text{ 1/s} \pm 5,2\%$ .

bevor eine vollständige Bindung erfolgen kann.

Es kann somit nur die Schlussfolgerung gezogen werden, dass nur Konformationen, die zufällig trotz der Abwesenheit von A9 eine der Wildtyppräformation ähnliche Struktur einnehmen, eine vollständige Bindung des Liganden ermöglichen. In Abwesenheit von A9 sind hierfür vermutlich sowohl die Bindung an A13, als auch an A50 vonnöten, um eine Stabilisierung der Tertiärstruktur der RNA einzuleiten.

Die Umordnung der RNA aus dieser Konformation zur Bindetasche wird um etwa einen Faktor 3,5 gegenüber dem Wildtyp verlangsamt. Dies ist, gemessen an der Tatsache, dass das Tetryklin keine sehr geordnete Bindetasche vorfindet, nur eine geringe Verlangsamung. Der Grund für die trotzdem relativ hohe Geschwindigkeit dieses Prozesses ist, dass nur wenige Konformationen in der Lage sind, diesen Schritt überhaupt durchzuführen. Diese Konformationen sind dann vermutlich in ihrer Tertiärstruktur nicht weit von der des Wildtyps entfernt. Ähnliche Effekte wurden bereits für andere, weniger präformierte Aptamere beobachtet und diskutiert [296, 299]. Ist eine solche bindende Konformation gefunden, so erfolgt die Formation des Liganden-RNA-Komplexes mit relativ hoher Geschwindigkeit.

**Tabelle 5.6.** Zusammenstellung der Fitkonstanten.

	WT	A9G	A13U	A50U
$k_1$	$13,5 (\mu\text{Ms})^{-1}$	$63 (\mu\text{Ms})^{-1}$	$6,06 (\mu\text{Ms})^{-1}$	$8,4 \mu\text{M}^{-1}/\text{s}$
$k_{-1}$	$35,5 \text{ }^1/\text{s}$	$13,4 \times 10^3 \text{ }^1/\text{s}$	$55 \text{ }^1/\text{s}$	$46 \text{ }^1/\text{s}$
$k_2$	$168 \text{ }^1/\text{s}$	$51 \text{ }^1/\text{s}$	$106 \text{ }^1/\text{s}$	$160 \text{ }^1/\text{s}$
$\tau$	4,37 ns	4,06 ns	3,78 ns	3,62 ns

### 5.3.5 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Es wurde das Tetrazyklin bindende Aptamer durch Messungen der Bindungskinetik des Wildtyps sowie dreier verschiedener Mutanten (A9G, A13U, A50U) untersucht. Der direkte Vergleich dieser Ergebnisse erlaubt eine Deutung, die Rückschlüsse auf den ablaufenden Mechanismus zulässt.

Für alle untersuchten Proben folgt, dass die Bindung in zwei Stufen abläuft. Der erste Schritt der Bindung ist reversibel, während der zweite keine nennenswerte Rückreaktionsrate aufweist. Dies ist ein Unterschied zu den bisher untersuchten, weniger präformierten Aptameren, wo bei Beobachtung des Liganden einstufige Kinetiken beobachtet wurden. Die Untersuchung von Aptameren mit Hilfe des Austauschs von Adeninen durch fluoreszente 1-Aminopurine gab allerdings schon deutliche Hinweise darauf, dass bei manchen Riboschaltern durchaus komplexere mehrstufige Reaktionsmechanismen auftreten [298].

Aus dem Einfluss der Mutationen auf die Bindungskonstanten lassen sich Rückschlüsse auf die Beteiligung der verschiedenen Segmente des Aptamers an der Bindung treffen. Ein zusätzlicher Vergleich der Lebensdauern gibt Aufschluss über den Endzustand der Bindung und die Stabilität der Bindetasche. In Tabelle 5.6 sind die wesentlichen Eigenschaften der einzelnen Proben zusammengestellt. Hierbei werden für den Wildtyp die Reaktionskonstanten bei  $6,8 \mu\text{M}$  Aptamerkonzentration verwendet, da diese Konzentration näher an der liegt, mit der die Messungen der Mutanten durchgeführt wurden.

Insgesamt lassen sich bei den verschiedenen Mutanten deutlich unterschiedliche Änderungen des Mechanismus feststellen. Die Abwesenheit eines der beiden direkten Kontakte führt nicht nur zu größeren Einflüssen in der Lebensdauer - und somit einer Destabilisierung der Bindungstasche - sondern auch zu einer Veränderung der Geschwindigkeit einer oder beider Schritte der Bindung. Insbesondere ist der Einfluss auf den ersten Bindungsschritt des Aptamers deutlich zu erkennen, da sowohl bei der Mutante A13U als auch bei A50U eine Reduktion der Geschwindigkeit  $k_1$  um etwa 40-50 % auftritt. Die Rückreaktion hingegen zeigt ähnliche, genau gegenläufige Variationen, die jedoch aufgrund des generell hohen Fitfehlers der Reaktionskonstante  $k_{-1}$  generell weniger aussagekräftig ist. Dies zeigt sich völlig anders bei der Mutante A9G, die sogar eine Beschleunigung von  $k_1$  zeigt, die jedoch von einer sehr hohen Rückreaktionsrate



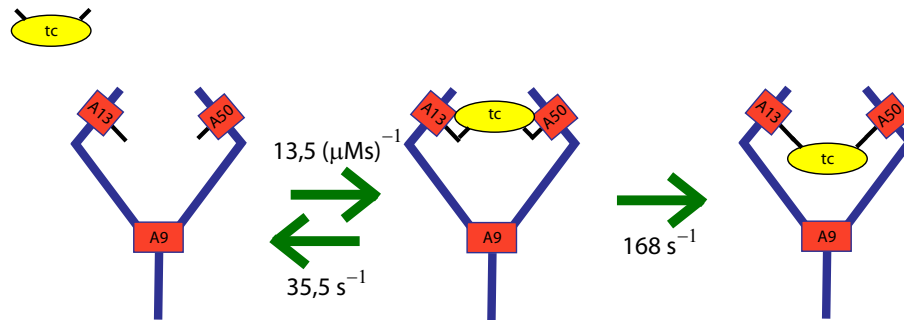
überlagert wird.

Der erste Schritt beinhaltet also bereits die Bindung an die Base A13 und A50. Die Kinetik der Mutante A9G, die eine deutlich geringere Präformation aufweist, deutet darauf hin, dass die Basen zumindest teilweise durch die Präformation maskiert sind, so dass die einzelnen Anknüpfungspunkte A13 und A50 bei Abwesenheit der Präformation sogar leichter zu erreichen sind. Alternativ kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund der hohen Konzentrationen, die auch bei den Mutanten die Gleichgewichtsbindungskonstante  $k_D$  des Aptamers um eine Größenordnungen übersteigen, eine Bindung an eine sehr eng geformte Bindungstasche durch die Präsenz weiterer möglicher Liganden im Vergleich zu einer eher offenen Bindetasche erschwert wird.

Die hohe Rückreaktionsrate der Mutante A9G, die um einen Faktor 500 höher als die aller anderen untersuchten Aptamere liegt und die der Hauptgrund für die deutliche Verlangsamung der Reaktion dieser Mutante gegenüber den anderen ist, deutet darauf hin, dass es aufgrund der deutlich geringeren Präformation dieses Aptamers zwar eine große Zahl von Konformationen gibt, die in der Lage sind, das Tetrazyklin temporär zu binden. Wenige davon jedoch sind in der Lage, von diesem Bindungszustand ausgehend eine reguläre Bindetasche zu formen oder das Tetrazyklin auf Dauer am Aptamer zu halten. Dies ist im Einklang mit der Untersuchung weniger präformierter Aptamere, bei denen durch Beobachtung der Fluoreszenz von in das Molekül verbrachten Aminopurinen in Verbindung mit NMR-Studien nachgewiesen werden konnte, dass dem Bindungsschritt eine Auswahl der bindenden Konformation aus einer Reihe verschiedener Aptamerkonfigurationen vorausgeht [289]. Eine mechanistisches Beispiel dies zu erklären, ist im Falle des Tetrazyklin bindenden Aptamers, dass bei Abwesenheit von A9, und somit nicht vorhandener Präformation der Bindetasche, nur wenige Konfigurationen die Bildung einer Bindetasche erlauben. Diese Konfigurationen ähneln vermutlich der des präformierten Wildtyps und ermöglichen eine Bindung sowohl an A13 als auch an A50. Bei einer größeren Mobilität des Gesamtaptamers ist es deutlich unwahrscheinlicher, dass diese beiden Basen einander nahe genug und im richtigen Winkel zueinander sind. Dies führt zu der großen Zahl an Dissoziationen von nicht korrekt geformten Aptameren.

Der geringe Unterschied der Lebensdauer des an die A9G-Mutante gebundenen Tetrazyklins zum Wildtyp zeigt jedoch, dass die auf diese Art geformte Bindungstasche der des Wildtyps entweder sehr ähnlich ist oder zumindest eine ähnlich starke konformationelle Einschränkung bietet. Die Erklärung hierfür wiederum liegt vermutlich darin, dass beide direkten Kontakte an das Aptamer vorhanden sind. Dies führt zu einer deutlich geringeren Mobilität als bei den Mutanten A13U und A50U, wo eine der beiden Bindungen fehlt.

Die Unterschiede innerhalb des zweiten Schritts, der als Umordnung des Aptamers um den Liganden und die endgültige Formung der Bindungstasche interpretiert werden kann, sind deutlich weniger ausgeprägt. In allen Mutanten findet die Umordnung langsamer statt als im Wildtyp, die Verlangsamung übersteigt jedoch in keinem Fall einen Faktor 3,5. Am geringsten ist der Einfluss der Mutation in A50U, wo der direkte Kontakt zum Tetrazyklin an A13 allein den Liganden genug fixiert, um die Umordnung der Bindungstasche zu erlauben. Das Tetrazyklin selbst ist in dieser Mutante möglicherweise zwar nicht exakt in der richtigen Position, um den zweiten Bindungsschritt einzuleiten, die kovalente Bindung erlaubt jedoch Rotation in der Bindungsachse. Dies



**Abbildung 5.20.** Aus den Stopped-Flow-Daten gefolgertes Schema der Ligandenbindung an das Tetrazyklin bindende Aptamer: In einem ersten Schritt entstehen zwischen Ligand und Aptamer Bindungen an A13 und A50. In einem zweiten Schritt erfolgt dann eine konformationelle Umordnung, bei der das Tetrazyklin in die Bindetasche integriert wird.

kann möglicherweise die etwas ungünstigere Position ausgleichen.

Das Fehlen dieser kovalenten Bindung wirkt sich deutlich stärker auf  $k_2$  aus, da die Bindung an A50 prinzipiell eine größere konformationelle Einschränkung des Tetrazyklins nach sich zieht. Diese ist möglicherweise bei nicht ganz korrekter Position des Tetrazyklins aufgrund des Fehlens der Bindung an A13 am Ende von Schritt 1 ein deutlich größeres Hindernis bei der Formation der endgültigen Bindetasche. Bei der Mutante A9G schließlich rührt die Verlangsamung von Schritt 2 von der größeren Beweglichkeit des Aptamers her, die die Einnahme der endgültigen Position aufgrund der größeren Zahl möglicher Konformationen erschwert.

Zusammenfassend kann der Mechanismus der Bindung des Liganden an das Tetrazyklin bindende Aptamer wie folgt erklärt werden: Die Bindung läuft in zwei aufeinander folgenden Schritten ab. In einem ersten Schritt erfolgt die Bindung des Tetrazyklins an die Basen A13 und A50, die durch die Präformation des Aptamers teilweise maskiert sind. Darauf folgt eine Umordnung des Aptamers, bei der die endgültige Bindetasche um das Tetrazyklin herum geformt wird. Ein Schema der Bindung ist in Abbildung 5.20 dargestellt.

## A Steuerung des Messaufbaus

Die Steuerung des kombinierten TCSPC-Aufkonvertierungs-Aufbaus (siehe Kapitel 3.4.2 und 3.5.2) erfolgte mit Hilfe eines selbst entwickelten Programms auf der Programmiersprache LabView. LabView bietet den generellen Vorteil, dass die meisten Hersteller von Geräten bereits vorgefertigte Routinen zur Ansteuerung auf dieser Programmierenebene anbieten. Dies kann entweder mit Hilfe von entsprechenden Unterprogrammen (VIs) oder mit Hilfe von Treiberdateien (DLLs) erfolgen, die dann über die Labviewroutine *Knoten zum Aufruf externer Bibliotheken* in das selbstgeschriebene Programm eingebunden werden können.

Die Kontrolle des in dieser Arbeit erstellten Aufbaus erforderte die Synchronisation und Ansteuerung vier verschiedener Komponenten. Der Linearverschiebetisch wird nur während dem Aufkonvertierungsbetrieb verwendet und ist für die zeitliche Verzögerung zwischen Anregung und Torpuls verantwortlich, der Monochromator selektiert die Detektionswellenlänge, die TCSPC-Zählkarte steuert die Datenerfassung selbst und ein Shutter blockiert das Anregungslicht, wenn keine Messung erfolgt, um eine minimale Strahlenbelastung der Probe zu ermöglichen. Die Ansteuerung von Verschiebetisch, Monochromator und Shutter erfolgte über die vom jeweiligen Hersteller bereitgestellten VIs, die Zählkarte wurde mit Hilfe mitgelieferter DLLs angesteuert.

Generell erfolgte die Ansteuerung des Aufbaus auf Basis ereignisorientierter Programmierung. Nach dem Ablauf verschiedener Initialisierungsroutinen, deren Ablauf vor allem durch die Anforderungen der verschiedenen verwendeten Geräte gegeben ist, reagiert das Programm auf die Eingabe des Benutzers und startet das zu der Eingabe passende Unterprogramm.

Abgesehen von einem Strahlblocker, der im TCSPC-Betrieb den Torpuls vor dem Kristall abblockt, erfolgt eine Diskriminierung zwischen den beiden Techniken des Aufbaus hauptsächlich auf Programmebene. Dementsprechend stellt die Steuerung zwei verschiedene Modi mit unterschiedlichen Bedienungsoberflächen bereit, die in Abbildung A.1 dargestellt sind.

Im rechten Teil der Programmoberfläche befinden sich allgemeine Statusangaben wie das Fehlerausgabefenster, eine Statusleuchte für die Öffnung des Shutters, sowie ein Drop-Down-Menu für die Wahl des Messmodus. Beide Experimente bieten die Möglichkeit eines Farbscans, die TCSPC-Ebene stellt zudem noch einen Modus bereit, bei dem ein weiter Zeitbereich mit kleinen Schritten zur Suche des Überlapps zwischen Anregungs- und Torpuls abgefahren wird. Anders als im Femtosekundenmodus wird hier nicht über das gesamte Spektrum integriert sondern die Zeitinformation der Zählkarte aus experimentellen Gründen behalten.

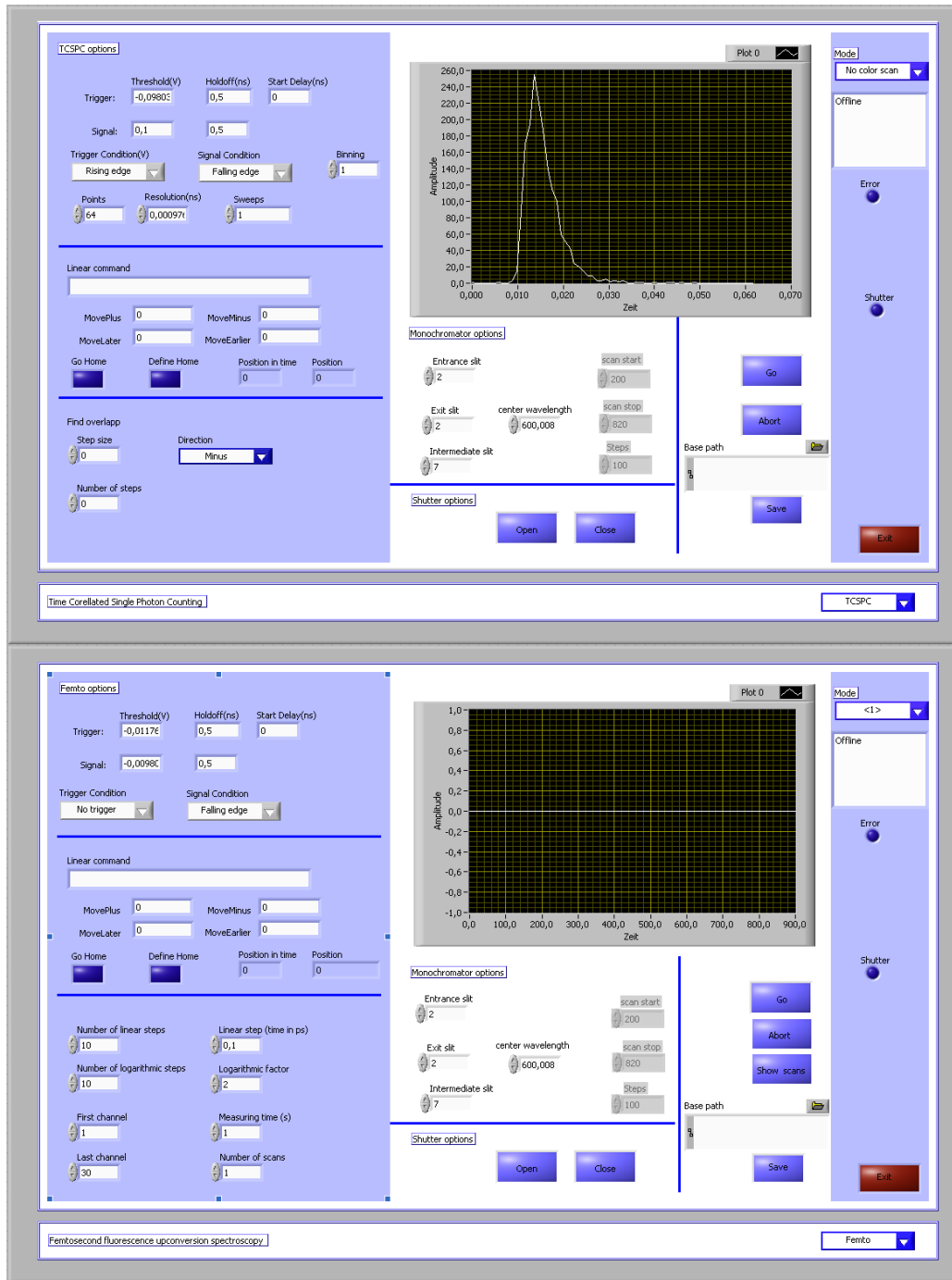


Abbildung A.1. Oben: Steuerungsoberfläche des TCSPC-Aufbaus. Unten: Steuerungsoberfläche des Aufkonvertierungs-Aufbaus.

Auf beiden Oberflächen finden sich im oberen linken Teil die zugänglichen Steuerungsparameter für die Zählkarte. Es können die Schwellen für Trigger- und Photonen-

signal eingestellt werden. Auf der Steuerungsseite des TCSPC-Experiments können hier auch die Messparameter wie Wiederholungszahl (*Sweeps*), Zeitauflösung (*Resolution \* binning*; minimal 1 ns) und die Zahl der Messpunkte (*Points*; zwischen 64 und 1000) eingestellt werden.

Unter diesem Fenster befindet sich das Steuerungsfenster für den Linearverschiebetisch, bei dem die Verzögerung manuell sowohl durch Angabe der zu verschiebenden *Counts* (kleinste verschiebbare Einheit:  $0,1 \mu\text{m}$  Verschiebestrecke  $\hat{=}$  0,66 fs) , als auch durch Angabe der gewünschten Zeitverzögerung angesteuert werden kann. Zudem ermöglicht ein Eingabefenster die Weiterleitung weiterer, seltener verwendeter Befehle an den Verschiebetisch.

Unter dem graphischen Ausgabefenster ist die Steuerung des Monochromators und die manuelle Anwahl des Shutters zu finden. Je nach Messmodus (Farbscan oder einzelne Transiente) sind verschiedene Bereiche des Steuerungsfelds für den Benutzer zugänglich.

Im TCSPC-Modus wird bei Anwahl des Startknopfes (*Go*) eine Messung auf der angewählten Wellenlänge, oder im Farbscanmodus Messungen nacheinander auf den verschiedenen Wellenlängen ausgeführt. Dabei wird die Steuerung größtenteils von der Messkarte übernommen, die selbst die Zahl der auszuführenden Wiederholungen kontrolliert und nach Ablauf der vollständigen Messung den Messvorgang anhält.

Abgespeichert werden die Daten in dem in **Base path** angegebenen Verzeichnis in zwei verschiedenen Dateien: **data.txt** enthält die Rohdaten als ascii-Tabelle, und **parameter.txt** enthält die Messparameter. Bei Farbscans wird noch eine zusätzliche Datei mit den unterschiedlichen Wellenlängen erstellt.

Im Aufkonvertierungsmodus können die Zahl linearer ( $x_n = kx_{n-1}$ ) und exponentieller ( $x_n = a^n x_{n-1}$ ) Schritte ebenso wie die Faktoren  $k$  und  $a$  variiert werden. Mit einer bestimmten Messzeit (*Measuring time*) wird dann für jede Verzögerungszeit ein TCSPC-Spektrum aufgenommen, dessen Form der der Instrumentenantwort des TCSPC-Experiments gleicht (siehe Abbildung 3.7), und dessen Integral proportional zu der Intensität des aufkonvertierten Lichts ist. Je nach Stärke und Form des Rauschens können die Kanäle, über die integriert wird, mit *First channel* und *Last channel* eingeschränkt werden. Die so entstehende komplette Transiente mit *Number of linear steps + Number of logarithmic steps* Schritten wird im ascii-Format abgespeichert, wobei die x-Achse aus den in Verzögerungszeiten umgerechneten Positionen des Linearverschiebetischs besteht. Dieser Vorgang wird nun mehrfach (*Scans*) wiederholt. Da der Linearverschiebetisch etwa 1 s benötigt, um zuverlässig die nächste Position einzunehmen, wird während dieser Zeit zur Schonung der Probe der Anregungsstrahl blockiert. Die einzelnen Scans werden zu einer Gesamttransiente aufsummiert, die wiederum abgespeichert werden kann. Ebenso wie im TCSPC-Modus wird auch hier zusätzlich eine Parameterdatei mit den wichtigsten Messparametern abgespeichert.

Es ergibt sich somit beispielhaft für eine TCSPC-Transiente mittlerer Auflösung (100 000 sweeps) eine Gesamtmesszeit von 100 s, während eine durchschnittliche Aufkonvertierungsmessung mit 100 Punkten, 60 Scans und einer Messzeit von 1 s pro Punkt eine Messzeit von etwa 3,25 h benötigt.

Mit Hilfe dieses Messprogramms war es möglich, vollautomatisierte, zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen durchzuführen und gleichzeitig eine maximale Variabilität des Programms zu gewährleisten. Die verschiedenen Messmodi und der direkte Zugriff auf die wichtigsten Instrumentenparameter erlauben es, jede Messung genau auf die Anforderungen des jeweiligen Experiments einzustellen.

## B Datenauswertung

Zur Auswertung der gemessenen zeitaufgelösten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe kommerzieller oder frei zugänglicher (*open source*) Programme verwendet, über deren Möglichkeiten und Limitierungen im Folgenden ein kurzer Überblick gegeben wird. Mit Hilfe des von Jörg Enderlein<sup>1</sup> und Rainer Erdmann<sup>2</sup> erstellten TCSPC-Fit-Programms war es möglich, eine Anpassung unter Miteinbeziehung der exakten Instrumentenantwort des TCSPC-Experiments durchzuführen. Zur Auswertung transientser Absorptionsmessungen wurde eine globale Fitroutine angewandt, die von Ingo Lutz und Sebastian Spörlein programmiert wurde und generell im AK Wachtveitl verwendet wird. Zur Auswertung von Stopped-Flow-Transienten wurde schließlich auf das kommerziell erhältliche Kinetikprogramm Dynafit von Petr Kuzmič zurück gegriffen, das mehrere Transienten verschiedener Konzentrationen an die Ratengleichungen eines vorgegebenen Reaktionsmodells anpasst.

### B.1 TCSPCfit

Das in Matlab programmierte TCSPCfit<sup>3</sup> beruht im wesentlichen auf den in Referenz [318] vorgestellten Prinzipien. Ein Nelder-Meade-Algorithmus [319] wird dazu verwendet, um eine Summe exponentieller Zerfälle, gefaltet mit der gemessenen Instrumentenantwort des Systems, an einen Satz realer Daten anzupassen. Auf diese Weise ist es möglich, Lebensdauern in der Größenordnung der Instrumentenantwort aus den vorliegenden Daten zu bestimmen.

Die Besonderheit des TCSPCfit-Programms liegt in der ausgefeilten Weise, in der die Startparameter für die Anpassungsroutine bestimmt werden, da die Qualität eines Fits aufgrund der Überbestimmung des Systems sehr stark von den Anfangsparametern abhängt. Die verwendeten Algorithmen beruhen auf der Linearisierung der Fitgleichungen, folgend den Argumentationen aus Referenz [320] unter Miteinbeziehung der statistischen Schwankungen, denen eine TCSPC-Transiente unterliegt.

### B.2 Globales Fitten mit IDL

Zur Auswertung von transienten Absorptionsmessungen, sowie von spektral breiten Fluoreszenzlebensdauer-messungen wurde das Programm z20 verwendet, das auf der Programmierumgebung IDL5.3 operiert und im Rahmen der Dissertationen von Ingo

---

<sup>1</sup> Drittes Physikalisches Institut, Universität Göttingen, Friedrich-Hund-Platz 1, 37077 Göttingen

<sup>2</sup> PicoQuandt GmbH, Rudower Chaussee 5, 12489 Berlin

<sup>3</sup> Quelle: <http://www.joerg-enderlein.de/?250>

Lutz [321] und Sebastian Spörlein [322] am Institut für Biomolekulare Optik der Ludwig-Maximilians-Universität entwickelt wurde. Es bietet die Möglichkeit der Datenaufbereitung mit Hilfe verschiedener, auf die Anforderungen einer transienten Absorptionsmessung angepassten Korrekturfunktionen und ermöglicht es, den gesamten Datensatz unter gewissen Voraussetzungen an ein globales Modell anzupassen. Hier soll nur ein Überblick über die verwendeten Korrekturen und die Möglichkeiten des Programms gegeben werden. Für Details wird auf die entsprechende Literatur verwiesen [321, 322].

Der erste Bearbeitungsschritt besteht bei transienten Absorptionsmessungen in der Mittelung der einzelnen Daten. Hier ist es möglich, einzelne Transienten aus der Mittelung zu entfernen und durch Vergleich früher und später Transienten bei gleicher Wellenlänge einen Überblick über Langzeiteffekte (z.B. Degradation der Proben) zu erhalten. Für Fluoreszenzlebensdauermessungen ist dieser Schritt, wie in Anhang A beschrieben, ins Messprogramm integriert und kann somit übersprungen werden.

In einem nächsten Schritt erfolgt, wenn nötig, eine Subtraktion einer Lösungsmittelmessung. Auch wenn die Absorption der meisten Lösungsmittel selbst auf den verwendeten Anregungswellenlängen über einen weiten spektralen Bereich minimal ist, treten aufgrund der Überlagerung von Anregungs- und Abtastpulsen auch in nichtabsorbierenden Proben Signale auf. Diese sind hauptsächlich durch elektronische Kohärenzeffekte begründet, können jedoch durch eine Subtraktion des Signals einer reinen Lösungsmittelmessung weitgehend aus den Daten eliminiert werden [248]. Eine Korrektur der Wellenlängenabhängigkeit des zeitlichen Nullpunkts, der sich aus dem Chirp des abtastenden Weißlichts ergibt, erfolgt mit Hilfe des Lösungsmittelsignals oder eines Farbstoffs mit möglichst instantaner Antwort auf ein Anregungssignal (beispielsweise Rhodamin 6G, DCM [66]). Hierbei wird zunächst die Verschiebung des Nullpunkts graphisch abgeschätzt und die so erhaltenen Datenpunkte unter Annahme der verwendeten Dicken der verwendeten Kristalle wie in Referenz [323] erläutert, angepasst.

Diesen Korrekturen folgend wird die Kinetik schließlich quantitativ mit Hilfe eines globalen Auswertungsalgorithmus analysiert. Nach der Methode eines Levenberg-Marquart-Algorithmus wird der Datensatz insgesamt an eine Modellfunktion angepasst. Hierbei werden einige der beobachteten Größen über den gesamten Spektralbereich als global, also für alle Wellenlängen gleich angesetzt.

In dem hier verwendeten Modell wird die Dynamik des Systems mit einer Summe von Exponentialfunktionen beschrieben, wobei die Zeiten über den gesamten Wellenlängenbereich als konstant, die Amplituden jedoch als variabel angesehen werden. Diese werden dann mit der zuvor bestimmten Kreuzkorrelation des Systems gefaltet, um eine korrekte Beschreibung der Daten zu erhalten. Es ergibt sich also für die Anpassungsfunktion

$$\Delta A(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n a_i(\lambda) \exp\left(\frac{t_{cc}(\lambda)^2}{4\tau_i^2} - \frac{t - t_0(\lambda)}{\tau_i}\right) \frac{1 + \operatorname{erf}\left(\frac{t - t_0(\lambda)}{t_{cc}} - \frac{t_{cc}(\lambda)}{2\tau_i}\right)}{2} \quad (\text{B.1})$$

mit der Kreuzkorrelation  $t_{cc}$ , dem wellenlängenabhängigen Nullpunkt  $t_0(\lambda)$  und  $n$  der Zahl der globalen Zerfallszeiten  $\tau_i$ . Die linearen Vorfaktoren  $a_i(\lambda)$  als Funktion der Wellenlänge ergeben die in Kapitel 3.3 erwähnten *decay associated spectra* (DAS), mit deren Hilfe eine Zuordnung von Prozessen zu den einzelnen Lebensdauern möglich ist.



### B.3 Generelle Fehlerabschätzung transientser Absorptionsmessungen und ihrer Fits

Anders als bei der Anpassung einzelner Transienten, die bei konstanter Schrittweite aufgenommen wurden, ist die Bestimmung der Fehler einer wie in Abschnitt 3.3 beschrieben aufgenommenen und nach Kapitel B.2 ausgewerteten transienten Absorptionsmessung deutlich schwieriger. Die Genauigkeit der erhaltenen Zerfallszeiten ist abhängig von der Wellenlänge und dem Zeitbereich, in dem sie liegen. Dennoch soll im Folgenden eine grobe Diskussion der zu erwartenden Genauigkeiten erfolgen, um eine Abschätzung der Zuverlässigkeit der Messungen zu liefern.

Abgesehen von der inhärenten Ungenauigkeit der aus der Anpassung resultierenden Zeiten gibt es um den Zeitnullpunkt aufgrund kohärenter Effekte und der Nullpunktskorrektur auch systematische Einflüsse, die zu Fehlern der Lebensdauerbestimmung führen können. Die Nullpunktskorrektur ist potentiell aufgrund der Tatsache, dass alle Kanäle hierzu mit einbezogen werden, sehr genau. Der Fehler des Nullpunkts ist mit  $\Delta t_{tot} = \frac{\Delta t_{\text{einzeln}}}{\sqrt{n}}$  (mit der Ungenauigkeit des Nullpunkts der Einzelkanäle  $\Delta t_{\text{einzeln}}$ ) aufgrund der Kanalzahl  $n = 42$  theoretisch weniger als 1 fs [323]. Dispersion innerhalb der Probe, sowie ein nicht chirpfreier Anregungspuls verbreitern den Nullpunkt jedoch beträchtlich, zumal absolut identische Probenbedingungen für Lösungsmittel und Probe, wie sie zu einer fehlerfreien Korrektur kohärenter Artefakte notwendig ist, experimentell schwer zu realisieren sind. Aus diesen Rahmenbedingungen lässt sich für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Messungen eine Genauigkeit des Nullpunkts von einigen 10 fs abschätzen. Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass kohärente Artefakte aufgrund der Länge der Anregungspulse, die über Frequenzverdopplung der Laserfundamentalen gewonnen wurden, bis in den Bereich von etwa 200 fs reichen. Aus diesem Grund sind in diesem Zeitbereich erhaltene Zeitkonstanten insbesondere in Bezug auf ihre DAS in der Region der Anregungswellenlänge nur bedingt aussagekräftig.

Generell unterliegen die mit Hilfe des globalen Fits gewonnenen Zeitkonstanten einer großen Abhängigkeit von den gewählten Startparametern. Es ist also im Zuge der Auswertung mit Hilfe des oben beschriebenen Programmes nötig, durch Variation der Anfangsparameter einen Überblick über die Stabilität des Parameterraums zu erhalten. Hieraus ergibt sich für die einzelne Messung eine grobe Abschätzung der Genauigkeit der Fitkonstanten. Zusätzlich hierzu lässt sich auch auf die einzelne Transiente bezogene Güte des Fits (dargestellt durch die Aufsummierung der Abweichungsquadrate) zur Fehlerabschätzung heranziehen. Da das Signal-Rausch-Verhältnis über den gesamten beobachteten Spektralbereich bei einer Messung um mehr als eine Größenordnung variieren kann, sind Zeitkonstanten mit großen Beiträgen in Kanälen mit verhältnismäßig niedrigem Signal generell mit höherem Fehler behaftet als Zeitkonstanten, deren Hauptkomponenten sich in einem Bereich mit hohem Signal befinden.

Letztendlich muss auch berücksichtigt werden, dass die Schrittweite der Messung zu langen Verzögerungszeiten immer größer wird, und somit der Bereich um 100 ps eine deutlich geringe Auflösung als der Bereich um 1 ps aufweist. Es sind also Zeitkonstanten von über 100 ps generell mit einem deutlich größeren Fehler behaftet als solche, die sich in Zeitbereichen mit besserer Auflösung befinden.

## B.4 Fitten von Kinetiken mit Dynafit

Dynafit ist ein von Petr Kuzmič entwickeltes und von der Firma Biokin<sup>4</sup> vertriebenes Programm zur nichtlinearen Datenanpassung von chemischen, enzymatischen oder bindungskinetischen Reaktionen, sowie von Gleichgewichtsbindungsmessungen [324]. Die durch Messung von Reaktionsparametern erhaltenen, charakteristischen Kurven werden an ein vorgegebenes kinetisches Reaktionsmodell angepasst, das auf einen Satz linearer Differentialgleichungen erster Ordnung führt.

Zur Lösung dieser Differentialgleichungen wird der *Livermore Solver of ODe Systems*, *LSODE* [325] verwendet. Zur Anpassung der aus dem Reaktionsmodell folgenden kinetischen Konstanten an die Messdaten wird auf einen Levenberg-Marquart-Algorithmus [326] zurückgegriffen.

Zur Steuerung des Programms sowie des Anpassungsverlaufs sind Skripte notwendig, in denen die genauen Parameter der jeweiligen Reaktion spezifiziert werden. Zur Veranschaulichung findet sich im Anschluss ein typisches Anpassungsskript, wie es zur Auswertung der kinetischen Daten der Bindung des tetrazyklin bindenden Aptamers geschrieben wurde:

```
[task]
  data = progress
  task = fit
  model = twostep ?

[mechanism]
  E + S <==> ES      : k1 k-1
  ES ---> ES*       : kr

[constants]

  k1 = 0.16 ?
  k-1 = 1.8 ?
  kr = 0.88 ?

[responses]
  ES* = -0.5 ?
  ES = -0.5 ?

[concentrations]
  E=1.8

[progress]
  directory ./examples/Temp/WT
  extension txt
  delay      0.0017
```

<sup>4</sup> BioKin, Ltd., 15 Main St., Suite 232, Watertown, MA 02472, U.S.A., <http://www.biokin.com/dynafit/>

```

file 1 | offset = 1 ? | conc S = 9
file 2 | offset = 1 ? | conc S = 11.5
file 3 | offset = 1 ? | conc S = 15.6
file 4 | offset = 1 ? | conc S = 17.5
file 5 | offset = 1 ? | conc S = 20.4
file 6 | offset = 1 ? | conc S = 23.7
file 7 | offset = 1 ? | conc S = 30.6
file 8 | offset = 1 ? | conc S = 36.1
file 9 | offset = 1 ? | conc S = 46.1

```

[output]

```

directory ./examples/Temp/WT/allinone
;-----

```

[task]

```

data = progress
task = fit
model = onestep ?

```

[mechanism]

```

E + S <=> ES : k1 k-1

```

[constants]

```

k1 = 0.32 ?
k-1 = 2.90?

```

[responses]

```

ES = -1 ?

```

[concentrations]

Mit Hilfe dieses Skripts werden beispielweise die sich im Verzeichnis `./examples/Temp/WT/` befindlichen Daten (benannt mit `1.txt-9.txt`) an zwei verschiedene Modelle angepasst und diese miteinander verglichen. Die beiden möglichen Modelle sind jeweils im Abschnitt `[mechanism]` aufgeführt, wobei es sich beim gezeigten Beispiel einmal um einen zweistufigen (*twostep*), einmal um einen einstufigen Prozess (*onestep*) handelt. Für die benötigten Reaktionskonstanten werden im Abschnitt `[constants]` passende Startwerte vorgeschlagen, die variiert oder als über den Fit konstant gesetzt werden können. Unter `[concentrations]` finden sich die über die Gesamtmessung konstanten Konzentrationen, während die einzelnen Tetrazyklinkonzentrationen bei den jeweiligen Dateien angegeben sind. Unter `[responses]` schließlich sind die Signaländerungen zu finden, die nach Start der Reaktion für die einzelnen an dem Mechanismus beteiligten Komponenten zu erwarten sind. Alle Parameter einschließlich der Konzentrationen sind potentiell variierbar. Für einen aussagekräftigen Fit sollte jedoch die Zahl der variierten Parameter eingeschränkt werden, da insbesondere Konzentrationen auf anderem Wege wie z.B. über Absorptionsmessungen genauer bestimmt werden können und

eine große Zahl an variablen Parametern die Gültigkeit des Fits deutlich einschränken kann.

Dynafit stellt eine große Zahl numerischer Auswertungen des angesetzten Fits bereit. Neben den mittleren Abweichungsquadraten und dem reduzierten  $\chi^2$  für den Gesamtfit wird auch eine statistische Auswertung für die einzelnen Fitparameter bereit gestellt, die neben der Verlässlichkeit auch Aufschluss darauf geben, an welcher Stelle das System überbestimmt sein könnte. Des weiteren zeigen graphische Analysen die Abweichungen über den gesamten beobachteten Zeitbereich, um systematische Abweichungen ausschließen zu können. Für Details wird an dieser Stelle auf die zitierte Literatur verwiesen [324].

Ein ebenfalls von Dynafit verwendetes, sehr griffiges Mittel zur Diskriminierung zwischen verschiedenen Modellen ist das Akaike-Informationskriterium [327, 328]. Es ist definiert als

$$AIC = 2k - 2 \ln(L) \tag{B.2}$$

mit der Zahl der freien Parameter  $k$  und  $L$ , dem maximierten Wert der Wahrscheinlichkeitsfunktion des verwendeten Modells. Hierbei erfolgt eine Gewichtung der Wahrscheinlichkeitsfunktion mit der Zahl der verwendeten Parameter, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass mehr Parameter in der Regel auch eine bessere Anpassung der Daten ermöglichen. Der AIC-Wert selbst ist nur von untergeordneter Bedeutung, es lässt sich sagen, dass der AIC-Wert je niedriger desto besser ist. Für die Diskriminierung zwischen verschiedenen Modellen wird insbesondere der Unterschied  $\Delta AIC$  gegenüber einem Referenzmodell verwendet. Generell gilt bei einem  $\Delta AIC \leq 2$ , dass das entsprechende Modell in ähnlich guter Weise wie das Referenzmodell die Daten beschreibt, und bei  $\Delta AIC \geq 10$  davon gesprochen werden kann, dass das Modell im Vergleich zur Referenz sehr unwahrscheinlich ist [327].

## Literatur

- [1] K. Neumann, M.-K. Verhoeven, I. Weber, C. Glaubitz, and J. Wachtveitl. The initial reaction dynamics of proteorhodopsin observed by femtosecond infrared and visible spectroscopy. *Biophysical Journal*, 94:4796–4807, 2008.
- [2] N. Goldenhoff, S. Amarie, K. Gundermann, A. Beer, C. Büchel, and J. Wachtveitl. Oligomerization and pigmentation dependent excitation energy transfer in fucoxanthin-chlorophyll proteins. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797:543–549, 2010.
- [3] D. M. Crothers, D. Soll, S. Nishimura, and P. B. Moore. *RNA*. Elsevier Science Ltd, Oxford, 2001.
- [4] H. Kang, K. T. Lee, B. Jung, Y. J. Ko, and S. K. Kim. Intrinsic lifetimes of the excited state of DNA and RNA bases. *Journal of the American Chemical Society*, 124:12958–12959, 2002.
- [5] T. Xia. Taking femtosecond snapshots of RNA conformational dynamics and complexity. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12:604–611, 2008.
- [6] L. Zhao and T. Xia. Direct revelation of multiple conformations in RNA by femtosecond dynamics. *Journal of the American Chemical Society*, 129:4118–4119, 2007.
- [7] B. Cohen, M. H. Larson, and B. Kohler. Ultrafast excited-state dynamics of RNA and DNA C tracts. *Chemical Physics*, 350:165–174, 2008.
- [8] M. M. Getz, A. J. Andrews, C. A. Fierke, and H. M. Al-Hashimi. Structural plasticity and  $Mg^{2+}$  binding properties of RNase P P4 from combined analysis of NMR residual dipolar couplings and motionally decoupled spin relaxation. *RNA*, 13:1–16, 2007.
- [9] E. B. Brauns und R. B. Dyer. Time-resolved infrared spectroscopy of RNA folding. *Biophysical Journal*, 89(5):3523–3530, 2005.
- [10] H. M. Al-Hashimi and N. G. Walter. RNA dynamics: it is about time. *Current Opinion in Structural Biology*, 18:321–329, 2008.
- [11] N. G. Walter, K. J. Hampel, K. M. Brown, and J. M. Burke. Tertiary structure formation in the hairpin ribozyme monitored by fluorescence resonance energy transfer. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 17:2378–2391, 1998.
- [12] P. T.X. Li, J. Vieregg, and I. Tinoco Jr. How RNA unfolds and refolds. *Annual Reviews of Biochemistry*, 77:77–100, 2008.
- [13] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers. *Organic Chemistry*. Oxford University Press, 2001.
- [14] P. Levene. The structure of yeast nucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 13:300–308, 2003.
- [15] H. R. Mahler and E. H. Cordes. *Biological Chemistry*. Harper, New York, 1971.
- [16] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171:737–738, 1953.

- [17] N. B. Leontis and E. Westhof. Analysis of RNA motifs. *Current Opinions in Structural Biology*, 13:300–308, 2003.
- [18] P. B. Moore. Structural motifs in RNA. *Annual Reviews of Biochemistry*, 68:287–300, 1999.
- [19] N. B. Leontis and E. Westhof. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*, 7:499–512, 2001.
- [20] N. B. Leontis, J. Stombaugh, and E. Westhof. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Research*, 30:3497–3531, 2002.
- [21] E. Westhof, P. Auffinger, and R. A. Meyers. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, Chichester.
- [22] H. F. Noller. RNA structure: reading the ribosome. *Science*, 309:1508–1514, 2005.
- [23] D. E. Draper. RNA folding: thermodynamic and molecular descriptions of the roles of ions. *Biophysical Journal*, 95:5489–5495, 2008.
- [24] D. Voet and J. G. Voet. *Biochemie*. Wiley, Weinheim, 1992.
- [25] M. W. Nirrenberg and J. H. Matthaei. Fast fitting of multi-exponential decay curves. *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides*, 47:1588–1602, 1961.
- [26] Y. Komine, M. Kitabatake, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and H. Inokuchi. A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academic Society*, 91(20):9223–9227, 1994.
- [27] K. P. Williams and D. P. Bartel. Phylogenetic analysis of tmRNA secondary structure. *RNA*, 2:1306–1310, 1996.
- [28] L. He and G. J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7):522–531, 2004.
- [29] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391:806–811, 1998.
- [30] S. Altman, M. F. Baer, M. Bartkiewicz, and H. Gold. Catalysis by the RNA subunit of RNase P—a minireview. *Gene*, 82:63–64, 1989.
- [31] Rolf Knippers. *Molekulare Genetik*. Thieme-Verlag, Stuttgart, 2001.
- [32] A. H. Zewail. Femtochemistry: atomic-scale dynamics of the chemical bond. *Journal of Physical Chemistry A*, 104:5660–5694, 2000.
- [33] R. G. W. Norrish and G. Porter. Chemical reactions produced by very high light intensities. *Nature*, 164:658–658, 1949.
- [34] R. G. W. Norrish. The kinetics and analysis of very fast chemical reactions. *Science*, 149(3691):1470–1482, 1965.
- [35] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1987.
- [36] Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Berlin, 1951.
- [37] T. Förster. *Fluoreszenz organischer Verbindungen*. Vandenhoeck and Ruprecht, Göttingen, 1951.
- [38] F. C. de Schryver, S. De Feyter, and G. Schweitzer (editors). *Femtochemistry*. Wiley, Weinheim, 2001.
- [39] M. O. Lenz, R. Huber, B. Schmidt, P. Gilch, R. Kalmbach, M. Engelhardt, and J. Wachtveitl. First steps of retinal photoisomerization in proteorhodopsin. *Biophysical Journal*, 91(1):255–262, 2006.
- [40] B. Schmidt, S. Laimgruber, W. Zinth, and P. Gilch. A broadband Kerr shutter for femtosecond fluorescence spectroscopy. *Applied Physics B*, 76:809–814, 2003.

- [41] I. Rubtsov, H. Shirota, and K. Yoshihara. Ultrafast photoinduced solute-solvent electron transfer: configuration dependence. *Journal of Physical Chemistry A*, 109:1801–1808, 1999.
- [42] H. Kandori and H. Sasabe. Excited state dynamics of a protonated Schiff base of all-trans retinal in methanol probed by femtosecond fluorescence measurement. *Chemical Physics Letters*, 216:126–172, 1993.
- [43] H. Niedrig (Herausg.). *Bergmann Schäfer, Lehrbuch der Experimentalphysik Band III*. de Gruyter, Berlin, 2004.
- [44] S.A. Akhmanov, A. P. Sukhorukov, and R. V. Khokhlov. Self-focusing and diffraction of light in a nonlinear medium. *Soviet Physics - Uspekhi*, 10:609–636, 1968.
- [45] D. R. Goff and K. S. Hansen. *Fiber Optic Reference Guide: A Practical Guide to Communications Technology*. Focal Press, Oxford, 2002.
- [46] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg Verlag, München, 2001.
- [47] M. L. Stitch and M. Bass(Editors). *Laser Handbook Vol. 3*. North Holland, Amsterdam, 1979.
- [48] V. G. Dmitriev, G. G. Gurzadyan, and D. N. Nikogosyan. *Handbook of Nonlinear Optical Crystals*. Springer, Berlin, 1997.
- [49] Matthias Roth. Aufbau eines nichtkollinear gepumpten optisch-parametrischen Verstärkers. Master's thesis, Friedrich-Schiller-Universität, Jena, 2000.
- [50] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu, and F. Laloe. *Quantum Mechanics BD 1*. Wiley, Weinheim, 1977.
- [51] Spectra Physics, Mountain View, California, USA. *Operation manual Tsunami*, 2002.
- [52] A. A. Frost and R. G. Pearson. *Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1964.
- [53] E. A. Moelwyn-Hughes. *Physikalische Chemie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 1970.
- [54] K. Johnson and D. Sigman. *The Enzymes*, volume 20. Academic Press, New York.
- [55] K. Olsen, B. Svensson, and U. Christensen. Stopped-flow fluorescence and steady-state kinetic studies of ligand-binding reactions of glucoamylase from *aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 209:777–784, 1992.
- [56] M. J. Rist and J. P. Marino. Association of an RNA kissing complex analyzed using 2-aminopurine fluorescence. *Nucleic Acids Research*, 29(11):2401–2408, 2001.
- [57] R. L. Burgon, J. W. Hanes, and G. A. Grant. A stopped-flow transient kinetic analysis of substrate binding and catalysis in *e. coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 209:777–784, 1992.
- [58] C.R. Cantor and P.R. Schimmel. *Biophysical Chemistry Part III*. W. H. Freeman and Company, New York, 1980.
- [59] I. N. Bronstein, K. A. Semendjajew, G. Musiol, and H. Mühlig. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harry Deutsch, Frankfurt/Main, 1998.
- [60] H. Nakatani and K. Hiromi. Analysis of signal amplitude in stopped-flow method for enzyme-ligand systems. *Journal of Biochemistry*, 87:1805–1810, 1980.
- [61] C. F. Bernasconi. *Relaxation kinetics*. Academic Press, New York, 1976.
- [62] L. Michaelis and M. L. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49:334–336, 1913.
- [63] A. Fersht. *Enzyme Structure and Mechanism*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1977.
- [64] G. Adam, P. Läger, and G. Stark. *Physikalische Chemie und Biophysik*. Springer, Berlin, 2003.

- [65] R.L. Berger, B. Balko, and H. F. Chapman. High resolution mixer for the study of the kinetics of rapid reactions in solution. *Reviews of scientific instruments*, 39:493–498, 1968.
- [66] U. Brackmann. *Lambdachrome Laser Dyes*. Lambda Physik, Göttingen, 2000.
- [67] Biologic, 38640 Claix, France. *SFM-20 User's Manual, Version 1.9*.
- [68] A.V. Smith, Sandia National Laboratories, Albuquerque, New Mexico, USA. *How to select nonlinear crystals and model their performance using SNLO software*.
- [69] Harald Studzinski. Aufbau und Charakterisierung eines nichtkollinearen optisch-parametrischen Verstärkers. Master's thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 2002.
- [70] R. Huber, H. Satzger, W. Zinth, and J. Wachtveitl. Noncollinear optical parametrical amplifiers with output parameters as improved by the application of a white light continuum generated in CaF<sub>2</sub>. *Optics Communications*, 194:443–448, 2001.
- [71] R. Alfano and S. Shapiro. Observation of self-phase modulation and small scale filaments in crystals and glasses. *Physical Review Letters*, 24(11):592–594, 1970.
- [72] A.K. Dharmadhikari, F. A. Rajagara, and D. Mathur. Systematic study of highly efficient white light generation in transparent materials using intense femtosecond laser pulses. *Applied Physics B*, 80:61–66, 2005.
- [73] A. Brodeur and S. L. Chin. Band-gap dependence of the ultrafast white-light continuum. *Physical Review Letters*, 80 (20):4406–4409, 1998.
- [74] H. Van Amerongen and R. Van Grondelle. Transient absorption spectroscopy in study of processes and dynamics in biology. *Methods of Enzymology*, 246:201–226, 1995.
- [75] Sergiu Amarie. *Photo-protective function of carotenoids in photosynthesis*. PhD thesis, Goethe-Universität, Frankfurt, 2009.
- [76] Martin Oliver Lenz. *Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen photoinduzierter Ladungstransferreaktionen*. PhD thesis, Goethe-Universität, Frankfurt, 2005.
- [77] L. Bollinger and G. Thomas. Measurement of the time dependence of scintillation intensity by a delayed-coincidence method. *Physical Review Letters*, 32(9):1044–1050, 1961.
- [78] D. O'Connor and D. Phillips. *Time Correlated Single Photon Counting*. Academic Press, London, 1984.
- [79] Franco Laeri. Time Correlated Single Photon Counting - A laboratory how-to report. *Technische Universität, Darmstadt*, 2002.
- [80] Jesper Mortensen. Probing micro-environments in molecular sieve laser materials with Time Correlated Single Photon Counting. Master's thesis, Technische Universität, Darmstadt, 2003.
- [81] W. Becker. *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*. Springer Verlag, Berlin, 2005.
- [82] A. Andreoni, M. Bondani, A. Brega, F. Paleari, A. Spinelli, and G. Zambra. Detection of nondelayed photons in the forward-scattering of picosecond pulses. *Applied Physics Letters*, 84(13):2457–2459, 2005.
- [83] P. Droessel, W. Holzer, A. Penzkofer, and P. Hegemann. Fluorescence quenching of riboflavin in aqueous solution by methionin and cystein. *Chemical Physics*, 286:409–420, 2003.
- [84] D. Basting, M. Lorch, I. Lehner, and C. Glaubitz. Transport cycle intermediate in small multidrug resistance protein is revealed by substrate fluorescence. *FASEB journal*, 22:365–373, 2008.



- [85] N. Noguchi, M. Hase, M. Kitta, M. Sasatsu, K. Deguchi, and M. Kono. Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *FEMS Microbiology letters*, 172:247–253, 1999.
- [86] M. Schwaiger, M. Lebendiker, H. Yerushalmi, M. Coles, A. Groeger, C. Schwarz, S. Schuldiner, and H. Kessler. NMR investigation of the multidrug transporter EmrE, an integral membrane protein. *European Journal of Biochemistry*, 254:610–619, 1998.
- [87] E. de Rossi, M. Branzoni, R. Cantoni, A. Milano, G. Riccardi, and O. Ciferri. mmr, a mycobacterium tuberculosis gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 180(22):6068–6071, 1998.
- [88] I. Ubarretxena-Belandia, J. Baldwin, S. Schuldiner, and C. Tate. Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO journal*, 22(23):6175–6181, 2003.
- [89] H. Yerushalmi and S. Schuldiner. A model for coupling of  $H^+$  and substrate fluxes based on time-sharing of a common binding site. *Biochemistry*, 39(48):14711–14719, 2000.
- [90] T. Kouyama, A. Kouyama, and A. Ikegami. Bacteriorhodopsin is a powerful light-driven proton pump. *Biophysical Journal*, 51:839–841, 1987.
- [91] E. Perozo and W. Hubbel. Voltage activation of reconstituted sodium channels: use of bacteriorhodopsin as a light-driven current source. *Biochemistry*, 32:10471–10478, 1993.
- [92] M. Collini, L. D’Alfonso, and G. Baldini. Trehalose-induced changes of the ethidium hydration shell detected by time-resolved fluorescence. *Photochemistry and Photobiology*, 74(4):376–382, 2003.
- [93] L. Halliday and M. Topp. Picosecond luminescence detection using type-II phase-matched frequency conversion. *Chemical Physics Letters*, 46(1):8–14, 1977.
- [94] M. Duguay and J. Hansen. Optical sampling of subnanosecond light pulses. *Applied Physics Letters*, 13(5):178–180, 1968.
- [95] H. Mahr and M. Hirsch. An optical upconversion light gate with picosecond resolution. *Optics Communications*, 13:96–99, 1975.
- [96] Thomas Pancur. *Untersuchung der Isomerisierungsdynamik von Azobenzolen und der strahlungslosen Desaktivierung von Nukleobasen mit Hilfe der Femtosekunden-Fluoreszenzspektroskopie*. PhD thesis, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 2004.
- [97] W. Herbst and G. Hunger. *Industrielle Organische Pigmente, Vol. 1*. VCH Weinheim, 1995.
- [98] Lisa Lorenz. *Untersuchung der Dynamik einfacher und komplexer Systeme mit zeitaufgelöster Spektroskopie*. PhD thesis, Goethe-Universität, Frankfurt, 2009.
- [99] Heike Staudt. *Femtosekunden-Infrarotspektroskopie an organischen Pigmenten*, 2007.
- [100] L. Lorenz, J. Plötner, V. Matylitsky, A. Dreuw, and J. Wachtveitl. Ultrafast photoinduced dynamics of Pigment Yellow 101: Fluorescence, excited-state intramolecular proton transfer, and isomerization. *Journal of Physical Chemistry A*, 111:10891–10898, 2007.
- [101] A. Dreuw, J. Plötner, L. Lorenz, J. Wachtveitl, J. Djanhan, J. Brüning, T. Metz, M. Bolte, and M. Schmidt. Molecular mechanism of the solid-state fluorescence behavior of the organic Pigment Yellow 101 and its derivatives. *Angewandte Chemie*, 44:7783–7786, 2005.
- [102] H. Staudt und T. Köhler und L. Lorenz und K. Neumann und M.-K. Verhoeven und J. Wachtveitl. Time resolved spectroscopy on Pigment Yellow 101 in solid state. *Chemical Physics*, 347:462–471, 2008.

- [103] J. Ploetner. personal communication.
- [104] K.W. Foster, J. Saranak, N. Patel, G. Zarilli, M. Okabe, T. Kline, and K. Nakanishi. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in unicellular *chlamydomonas*. *Nature*, 311:756–759, 1984.
- [105] O.A. Sineshchekov, K.H. Jung, and J.L. Spudich. Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academic Society of the USA*, 99:8689–8694, 2002.
- [106] M.-K. Verhoeven, C. Bamann, R. Blöcher, U. Förster, E. Bamberg, and J. Wachtveitl. The photocycle of channelrhodopsin-2: Ultrafast reaction dynamics and extended characterization of the subsequent reaction steps. *submitted*.
- [107] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, and E. Bamberg. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academic Society of the USA*, 100:13940–13945, 2003.
- [108] E.S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience*, 8:1263–1268, 2005.
- [109] F. Zhang, L.P. Wang, M. Brauner, J.F. Liewald, N. Watzke K. Kay, P.G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, and K. Deisseroth. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446:633–634, 2007.
- [110] F. Zhang, M. Prigge, F. Beyriere, S.P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nature Neuroscience*, 11:631–633, 2008.
- [111] I. Radu, C. Bamann, M. Nack, G. Nagel, E. Bamberg, and J. Heberle. Conformational changes of channelrhodopsin-2. *Journal of the American Chemical Society*, 131:7313–7319, 2009.
- [112] C. Bamann, T. Kirsch, G. Nagel, and E. Bamberg. Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *Journal of Molecular Biology*, 375:686–694, 2008.
- [113] K. Nikolic, N. Grossman, M.S. Grubb, J. Burrone, C. Toumazou, and P. Degenaar. Photocycles of channelrhodopsin-2. *Photochemistry and Photobiology*, 85:400–411, 2009.
- [114] Mirka-Kristin Verhoeven. *Funktionelle Dynamik des Retinalchromophors in verschiedenen Rhodopsinen*. PhD thesis, Goethe-Universität, Frankfurt, 2010.
- [115] J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterheld. Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 144:215–220, 1988.
- [116] H. Abramczyk. Femtosecond primary events in bacteriorhodopsin. *Journal of Chemical Physics*, 120:11120–11132, 2004.
- [117] B. Schmidt, C. Sobotta, B. Heinz, S. Laimgruber, M. Braun, and P. Gilch. Excited-state dynamics of bacteriorhodopsin probed by broadband femtosecond fluorescence spectroscopy. *Biochimica Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1706:165–173, 2005.
- [118] M. Griffiths, W.R. Sistrom, G. Cohenbazire, and R.Y. Stanier. Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, 176:1211–1214, 1955.
- [119] C.S. Foote. Mechanisms of photosensitized oxidation - there are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*, 162:963–970, 1968.
- [120] H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, and R.J. Cogdell. *Photochemistry and functions of carotenoids in photosynthesis*. Chapman & Hall, London, 1993.

- [121] T. Polivka, T. Pullerits, H.A. Frank, R.J. Cogdell, and V.J. Sundstrom. Ultrafast formation of a carotenoid radical in LH2 antenna complexes of purple bacteria. *Journal of Physical Chemistry B*, 108:15398–15407, 2004.
- [122] T. Polivka, D. Zigmantas, J.L. Herek, Z. He, T. Pascher, T. Pullerits, R.J. Cogdell, H.A. Frank, and V.J. Sundstrom. The carotenoid  $S_1$  state in LH2 complexes from purple bacteria *rhodobacter sphaeroides* and *rhodospseudomonas acidophila*:  $S_1$  energies, dynamics, and carotenoid radical formation. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:11016–11025, 2002.
- [123] T.K. Ahn, T.J. Avenson, M. Ballottari, Y.-C. Cheng, K.K. Niyogi, R. Bassi, and G. R. Fleming. Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science*, 320:794 – 797, 2008.
- [124] S. Amarie, J. Standfuss, T. Barros, W. Kühlbrandt, A. Dreuw, and J. Wachtveitl. Carotenoid radical cations as a probe for the molecular mechanism of nonphotochemical quenching in oxygenic photosynthesis. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(13):3481–3487, 2007.
- [125] B. Demmig-Adams and W. W. Adams III. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298:2149–2153, 2002.
- [126] R. Edge, D.J. McGarvey, and T.G. Truscott. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 41:189–200, 1997.
- [127] N. I. Krinsky and S. M. Deneke. Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 69:205–210, 1982.
- [128] I. Jialal, E. P. Norkus, L. Cristol, and S.M. Grundy. Beta-carotene inhibits the oxidative modification of low-density-lipoprotein. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1086:134–138, 1991.
- [129] O. Luxnewirth and T. J. Millar. Lipid soluble antioxidants preserve rabbit corneal cell-function. *Current Eye Research*, 9:103–109, 1990.
- [130] P. Palozza, S. Moualla, and N. I Krinski. Effects of beta-carotene and alphatocopherol on radical-initiated peroxidation of microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 13:127–136, 1992.
- [131] B. Leibovitz, M. L. Hu, and A. L. Tappel. Dietary-supplements of vitamin-E, beta-carotene, coenzyme-Q10 and selenium protect tissues against lipid-peroxidation in rat-tissue slices. *Journal of Nutrition*, 120:97–104, 1990.
- [132] R. Zamora, F. J. Hidalgo, and A. L. Tappel. Comparative antioxidant effectiveness of dietary beta-carotene, vitamin-E, selenium and coenzyme-Q10 in rat erythrocytes and plasma. *Journal of Nutrition*, 121:50–56, 1991.
- [133] O. Isler. *Carotenoids*. Ed. Birkhauser, Basel, 1971.
- [134] H. A. Frank. *The photochemistry of carotenoids, Vol. 8*. Kluwer, 1999.
- [135] S. Amarie, K. Arefe, J.H. Starcke, A. Dreuw, and J. Wachtveitl. Identification of an additional low-lying excited state of carotenoid radical cations. *Journal of Physical Chemistry B*, 112:14011–14017, 2008.
- [136] K. Toppo M. R. Suseela. *Haematococcus pluvialis* - a green alga, richest natural source of astaxanthin. *Current Science*, 90(12):1602–1603, 2006.
- [137] Y.M.A. Naguib. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural Chemicals*, 48:1150–1154, 2000.
- [138] S. Amarie, U. Förster, N. Gildenhoff, A. Dreuw, and J. Wachtveitl. Excited state dynamics of the astaxanthin radical cation. *Chemical Physics*, accepted.
- [139] A. Dreuw, J. H. Starcke, and J. Wachtveitl. Excited state properties of the astaxanthin radical cation: a quantum chemical study. *Chemical Physics*, accepted.
- [140] T. Haupl, C. Windolph, T. Jochum, O. Brede, and R. Hermann. Picosecond fluorescence of nucleic acid bases. *Chemical Physics Letters*, 280:520–524, 1997.

- [141] E. Nir, K. Kleinermanns, L. Grace, and M. S. de Vries. On the photochemistry of purine nucleobases. *Journal of Physical Chemistry A*, 105:5106–5110, 2001.
- [142] N. K. Schwalb and F. Temps. Base sequence and higher-order structure induce the complex excited-state dynamics in DNA. *Science*, 322(5899):243–245, 2008.
- [143] D. Onidas, D. Markovitsi, S. Marguet, A. Sharonov, and T. Gustavsson. Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides: A refined steady-state and femtosecond investigation. *Journal of Physical Chemistry B*, 106:11367–11374, 2002.
- [144] J. Peon and A. H. Zewail. DNA/RNA nucleotides and nucleosides: direct measurement of excited-state lifetimes by femtosecond fluorescence up-conversion. *Chemical Physics Letters*, 3-4:255–262, 2001.
- [145] E. Emanuele, K. Zakrzewska, D. Markovitsi, R. Lavery, and P. Millie. Exciton states of dynamic DNA double helices: alternating dCdG sequences. *Journal of Physical Chemistry B*, 109:16109–16118, 2005.
- [146] D. Markovitsi, T. Gustavsson, and F. Talbot. Perspective: Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 6(7):717–724, 2007.
- [147] I. Buchvarov, Q. Wang, M. Raytchev, A. Trifonov, and T. Fiebig. Electronic energy delocalization and dissipation in single- and double-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12):4794–4797, 2007.
- [148] A. Holmen, B. Norden, and B. Albinsson. Electronic transition moments of 2-aminopurine. *Journal of the American Chemical Society*, 199.
- [149] J. M. Jean and K. B. Hall. 2-aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: Role of base stacking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1):31–41, 2001.
- [150] M. Menger. *2-Aminopurin als Fluoreszenzindikator zur Analyse der Struktur und Dynamik von Oligoribonukleinsäuren und Hammerheadribozymen*. Hainholz, Göttingen, 1999.
- [151] W. G. Cox and V. L. Singer. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. *Biotechniques*, 36:114–122, 2004.
- [152] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437:55 – 75, 1948.
- [153] D. Klostermeier and D. P. Millar. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer: A versatile tool for the analysis of nucleic acids. *Biopolymers*, 61:159–179, 2002.
- [154] R. A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, and D. E. Wolf. Detection of nucleic-acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy-transfer. *Proceedings of the National Academic Society*, 85(23):8790–8794, 1988.
- [155] V. V. Didenko. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechnology*, 62(5):1106–1121, 2001.
- [156] M. Hengesbach, A. Kobitski, F. Voigts-Hoffmann, C. Frauer, U. Nienhaus, and M. Helm. RNA intramolecular dynamics by single-molecule FRET. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 11:12, 2008.
- [157] D. Klostermeier and D. P. Millar. RNA conformation and folding studied with fluorescence resonance energy transfer. *Methods*, 23(3):240–254, 2001.
- [158] T. Förster. Exzimere. *Angewandte Chemie*, 10:364–374, 1969.
- [159] K. Ebata, M. Masuko, H. Ohtani, and M. Kashiwasakejibu. Nucleic-acid hybridization accompanied with excimer formation from 2 pyrene-labeled probes. *Photochemistry and Photobiology*, 62(5):836–839, 1995.

- [160] P. Conlon, C. Y. J. Yang, Y. R. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. M. Kim, N. Stevens, A. A. Marti, S. Jockusch, N. J. Turro, and W. H. Tan. Pyrene excimer signaling molecular beacons for probing nucleic acids. *Journal of the American Chemical Society*, 130:336–342, 2008.
- [161] P. Aich, S. L. Labiuk, L. W. Tari, L. J. Delbaere, W. J. Roesler, K. J. Falk, R. P. Steer, and J. S. Lee. M-DNA: A complex between divalent metal ions and DNA which behaves as a molecular wire. *Journal of Molecular Biology*, 294(2):477–485, 1999.
- [162] A. Trifonov, M. Raytchev, H. A. Wagenknecht, and T. Fiebig. Ultrafast energy transfer and structural dynamics in DNA. *Journal of Physical Chemistry B*, 109:19490–19495, 2005.
- [163] G. Sanchez-Mosteiro, E. M. H. P. van Dijk, J. Hernando, M. Heilemann, P. Tinnefeld, M. Sauer, F. Koberlin, M. Patting, M. Wahl, R. Erdmann, N. F. van Hulst, and M. F. Garcia-Parajo. DNA-based molecular wires: Multiple emission pathways of individual constructs. *Journal of Physical Chemistry B*, 110:26349–26353, 2006.
- [164] K. Maie, M. Nakamura, and K. Yamana. Photocurrent responses from pyrene-modified RNA duplexes on gold surface. *Nucleic Acid Symposium Series*, 51:319–320, 2007.
- [165] L. M. Smith, S. Fung, M. W. Hunkapiller, T. J. Hunkapiller, and L. E. Hood. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 13(5):2399–2412, 1985.
- [166] M. Sauer, W. Ankenbauer, B. Angerer, Z. Földes-Papp, F. Göbel, K.-T. Han, R. Rigler, J. Wolfrum, and C. Zander. Single molecule DNA sequencing in submicrometer channels: State of the art and future prospects. *Journal of Biotechnology*, 86:181–201, 2001.
- [167] J. B. Birks. *Photophysics of Aromatic Molecules*. Wiley, Weinheim, 1970.
- [168] D. S. Karpovic and G. J. Blanchard. Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling achieving a fundamental understanding of the py polarity scale. *Journal of Physical Chemistry*, 99:3951–3958, 1995.
- [169] D. C. Dong and M. A. Winnik. The py scale of solvent polarities. *Canadian Journal of Chemistry*, 62:2560–2565, 1984.
- [170] K. Hara and W. R. Ware. Influence of solvent perturbation on the radiative transition probability from the  $^1B_{1u}$  state of pyrene. *Chemical Physics*, 51:61–68, 1980.
- [171] V. Glushko, M. S. R. Thaler, and C. D. Karp. Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: Behavior in model solvents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 210(1):33–42, 1981.
- [172] M. Raytchev, E. Pandurski, I. Buchvarov, C. Modrakowski, and T. Fiebig. Bichromophoric interactions and time-dependent excited state mixing in pyrene derivatives. a femtosecond broad-band pump-probe study. *Journal of Physical Chemistry A*, 107:4592–4600, 2003.
- [173] P. V. Zinoviev, A. A. Kalachev, A. A. Kalinkin, V. V. Samartsev, and N. B. Silaeva. Polarization features of optical superradiance in a pyrene-containing biphenyl crystal. *Laser Physics*, 14(7):996–1001, 2004.
- [174] G. Marconi and P. R. Salvi. Vibronic activity in the fluorescence and absorption spectrum of pyrene. *Chemical Physics Letters*, 123:254–260, 1986.
- [175] F. V. R. Neuwahl and P. Foggi. Direct observation of  $S_2$ - $S_1$  internal conversion in pyrene by femtosecond transient absorption. *Laser Chemistry*, 19:375–379, 1999.

- [176] J. Telser, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, and T. L. Netzel. Synthesis and characterization of DNA oligomers and duplexes containing covalently attached molecular labels: Comparison of biotin, fluorescein, and pyrene labels by thermodynamic and optical spectroscopic measurements. *Journal of the American Chemical Society*, 111(18):6976–6983, 1989.
- [177] J. S. Mann, Y. Shibata, and T. Meehan. Synthesis and properties of an oligodeoxynucleotide modified with a pyrene derivative at the 5'-phosphate. *Bioconjugate Chemistry*, 3:554–558, 1992.
- [178] K. Yamana, T. Gokota, H. Ozaki, H. Nakano, O. Sangen, and T. Shimidzu. Enhanced fluorescence in the binding of oligonucleotides with a pyrene group in the sugar fragment to complementary polynucleotides. *Nucleosides and Nucleotides*, 11:383–390, 1992.
- [179] R. Kierzek, Y. Li, D. H. Turner, and P. C. Bevilacqua. 5'-amino pyrene provides a sensitive, nonperturbing fluorescent probe of RNA secondary and tertiary structure formation. *Journal of the American Chemical Society*, 115:4985–4992, 1993.
- [180] G. Wang, G. V. Bobkov, S. N. Mikhailov, G. Schepers, A. Van Aerschot, J. Rozenski, M. Van der Auweraer, P. Herdewijn, and S. De Feyter. Detection of RNA hybridization by pyrene-labeled probes. *ChemBioChem*, 10(7):1175–1185, 2009.
- [181] S. K. Silverman and T. R. Cech. RNA tertiary folding monitored by fluorescence of covalently attached pyrene. *Biochemistry*, 26(23):14224–14237, 1999.
- [182] Y. J. Seo and B. H. Kim. Alkynylpyrenes as improved pyrene-based biomolecular probes with the advantages of high fluorescence quantum yields and long absorption/emission wavelengths. *Chemical Communications*, pages 150–152, 2006.
- [183] M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, and T. L. Netzel. Base-sequence dependence of emission lifetimes for DNA oligomers and duplexes covalently labeled with pyrene: relative electron-transfer quenching efficiencies of A, G, C, and T nucleosides toward pyrene. *Journal of Physical Chemistry*, 99:17461–17472, 1995.
- [184] M. Nakamura, Y. Fukunaga, K. Sasa, Y. Ohtoshi, K. Kanaori, H. Hayashi, H. Nakano, and K. Yamana. Pyrene is highly emissive when attached to the RNA duplex but not to the DNA duplex: the structural basis of this difference. *Nucleic Acids Research*, 33:5887–5895, 2005.
- [185] A. Mahara, R. Iwase, T. Sakamoto, T. Yamaoka, K. Yamana, and A. Murakami. Detection of acceptor sites for antisense oligonucleotides on native folded RNA by fluorescence spectroscopy. *Tetrahedron Letters*, 45:3543–3546, 2004.
- [186] J. W. Yi, Y. J. Seo, I. J. Lee and B. H. Kim. Probing the stable G-quadruplex transition using quencher-free endstacking ethynyl pyrene-adenosine. *Chemical Communication*, pages 2817–2819, 2007.
- [187] H. S. Jeong, Y. J. Seo, E.-K. Bang, G. T. Hwang, J. H. Jung, S. K. Jang, and B. H. Kim. Cholesterol-linked pyrene excimer molecular beacon with enhanced cell permeability. *Nucleic Acids Symposium Series*, 52(1):351–352, 2008.
- [188] P. L. Paris, J. M. Langenhan, and E. T. Kool. Probing DNA sequences in solution with a monomer excimer fluorescence color change. *Nucleic Acids Research*, 26:3789–3793, 1998.
- [189] G. Tong, J. M. Lawlor, G. W. Tregear, and J. Haralambidis. Oligonucleotide-polyamide hybrid molecules containing multiple pyrene residues exhibit significant excimer fluorescence. *Journal of the American Chemical Society*, 117:12151–12158, 1995.
- [190] M. K. Smalley and S. K. Silverman. Fluorescence of covalently attached pyrene as a general RNA folding probe. *Nucleic Acids Research*, 34(1):152–166, 2006.

- [191] H. Bittermann, D. Siegemund, V. L. Malinovskii, and R. Häner. Dialkynylpyrenes: Strongly fluorescent, environment-sensitive DNA building blocks. *Journal of the American Chemical Society*, 130:15285–15287, 2008.
- [192] A. Okamoto, K. Kanatani, and I. Saito. Pyrene-labeled base-discriminating fluorescent DNA probes for homogeneous SNP typing. *Journal of the American Chemical Society*, 126:4820–4827, 2004.
- [193] G. T. Hwang, Y. J. Seo, S. J. Kim, and B. H. Kim. Fluorescent oligonucleotide incorporating 5-(1-ethynylpyrenyl)-2'-deoxyuridine: sequence-specific fluorescence changes upon duplex formation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11:2783–2790, 2003.
- [194] I. van Daele, N. Bomholt, V. V. Filichev, S. van Calenberg, and E. B. Pedersen. Triplex formation by pyrene-labelled probes for nucleic acid detection in fluorescence assays. *ChemBioChem*, 9:791–801, 2008.
- [195] T. S. Kumar, A. S. Madsen, M. E. Ostergaard, S. P. Sau, J. Wengel, and P. J. Hrdlicka. Functionalized 2'-amino- $\alpha$ -L-LNA: Directed positioning of intercalators for DNA targeting. *Journal of Organic Chemistry*, 74(3):1070–1081, 2009.
- [196] T. Umemoto, P. J. Hrdlicka, B. R. Babu, and J. Wengel. Sensitive SNP dual-probe assays based on pyrene-functionalized 2-amino-LNA: Lessons to be learned. *ChemBioChem*, 8(18):2240–2248, 2007.
- [197] T. S. Kumar, J. Wengel, and P. J. Hrdlicka. 2'-N-(pyren-1-yl)acetyl-2'-amino- $\alpha$ -L-LNA. synthesis and detection of single nucleotide mismatches in DNA and RNA targets. *ChemBioChem*, 8:1122–1125, 2007.
- [198] Y. J. Seo, J. H. Ryu, and B. H. Kim. Quencher-free, end-stacking oligonucleotides for probing single-base mismatches in DNA. *Organic Letters*, 7(22):4931–4933, 2005.
- [199] D. Honcharenko, C. Zhou, and J. Chattopadhyaya. Modulation of pyrene fluorescence in DNA probes depends upon the nature of the conformationally restricted nucleotide. *Journal of Organic Chemistry*, 73:2829–2842, 2008.
- [200] V. Filichev, I. Astakhova, A. Malakov, V. Korshun, and E. Pedersen. 1-, 2-, and 4- ethynylpyrenes in the structure of twisted intercalating nucleic acids: Structure, thermal stability and fluorescence relationship. *Chemistry - A European Journal*, 14:9968–9980, 2008.
- [201] R. Huber, T. Fiebig, and H.-A. Wagenknecht. Pyrene as a fluorescent probe for DNA base radicals. *Chemical Communications*, 107:1878–1879, 2003.
- [202] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, and H. A. Wagenknecht. 1-ethynylpyrene as a tunable and versatile molecular beacon for DNA. *ChemBioChem*, 5:865–868, 2004.
- [203] T. L. Netzel. The spectroscopy, dynamics and electronic structure of pyrenyl-dU nucleosides. *Tetrahedron Letters*, 63:3491–3514, 2007.
- [204] M. Rist, N. Amman, and H.-A. Wagenknecht. Preparation of 1-ethynylpyrene-modified DNA via sonogashira-type solid-phase couplings and characterization of the fluorescence properties for electron transfer studies. *European Journal of Organic Chemistry*, 5:2498–2504, 2003.
- [205] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, and H.-A. Wagenknecht. Real-time spectroscopic and chemical probing of reductive electron transfer in DNA. *Angewandte Chemie International Edition*, 44:1636–1639, 2005.
- [206] P. C. Bevilacqua, R. Kierzek, K. A. Johnson, and D. H. Turner. Dynamics of ribozyme binding of substrate revealed by fluorescence-detected stopped-flow methods. *Science*, 258:1355, 1992.

- [207] R. Preuß, J. Dapprich, and N. G. Walter. Probing RNA-protein interactions using pyrene-labeled oligodeoxynucleotides: Q $\beta$  replicase efficiently binds small RNAs by recognizing pyrimidine residues. *Journal of Molecular Biology*, 273(3):600–613, 1997.
- [208] K. Yamana, R. Iwase, S. Furutani, H. Tsuchida, H. Zako, T. Yamaoka, and A. Murakami. 2-pyrene modified oligonucleotide provides a highly sensitive fluorescent probe of RNA. *Nucleic Acids Research*, 27(11):2387–2392, 1999.
- [209] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, and H.A. Wagenknecht. Preparation of pyrene-modified purine and pyrimidine nucleosides via suzuki-miyaura cross-couplings and characterisation of their fluorescent properties. *Synthesis*, 15:2335–2340, 2003.
- [210] C. Wanninger-Weiß and H.-A. Wagenknecht. Synthesis of 5-(2-pyrenyl)-2'-deoxyuridine as a DNA modification for electron-transfer studies: The critical role of the position of the chromophore attachment. *European Journal of Organic Chemistry*, pages 64–71, 2008.
- [211] T. Fiebig, K. Stock, S. Lochbrunner, and E. Riedle. Femtosecond charge transfer dynamics in artificial donor/acceptor systems: switching from adiabatic to nonadiabatic regimes by small structural changes. *Chemical Physics Letters*, 345:81–88, 2001.
- [212] T. Fiebig E. Pandurski. Femtosecond dynamics in directly linked pyrenyl donor-acceptor systems: orbital control of optical charge transfer in the excited state. *Chemical Physics Letters*, 357:272–278, 2002.
- [213] N. P. Gritsan, E. A. Pritchina, I. I. Barabanov, G. T. Burdzinski, and M. S. Platz. Excited-state dynamics in the covalently linked systems: pyrene-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-aryl azide. *Journal of Physical Chemistry C*, 113:11579–11589, 2009.
- [214] C. Grünwald, T. Kwon, N. Piton, U. Förster, J. Wachtveitl, and J. W. Engels. RNA as scaffold for pyrene excited complexes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16:19–26, 2008.
- [215] M. J. Robins and B. Uznanski. Conversions of adenosine and guanosine to 2,6-dichloro, 2-amino-6-chloro, and derived purine nucleosides. *Canadian Journal of Chemistry*, 59:2601–2607, 1981.
- [216] A. Matsuda, M. Shinozaki, T. Yamaguchi, H. Homma, R. Nomoto, T. Miyasaka, Y. Watanabe, and T. Abiru. 2-alkynyladenosines - a novel class of selective adenosine-A2 receptor agonists with potent antihypertensive effects. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35:241–252, 1992.
- [217] A. Matsuda, M. Shinozaki, M. Suzuki, K. Watanabe, and T. Miyasaka. A convenient method for the selective acylation of guanine nucleosides. *Synthesis*, 5:385–386, 1986.
- [218] S. A. Scaringe, F. E. Wincott, and M. H. Caruthers. Novel RNA synthesis method using 5'-o-silyl-2'-o-orthoester protecting groups. *Journal of the American Chemical Society*, 120(45):11820–11821, 1998.
- [219] S. I. Khan and M. W. Grinstaff. Palladium(0)-catalyzed modification of oligonucleotides during automated solid-phase synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 121:4704–4705, 1999.
- [220] M. H. Gey. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. Springer, Berlin, 2008.
- [221] M. Vorifckova. Conformational transitions of alternating purine-pyrimidine DNAs in perchlorate ethanol solutions. *Biophysical Journal*, 69:2033–2043, 1995.



- [222] D. S. Moore and T. E. Wagner. Double-helical DNA and RNA circular dichroism. calculations on base-sugar-phosphate helix interactions. *Biopolymers*, 13:977–986, 1974.
- [223] L. A. Marky and K. J. Breslauer. Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, 26:1601–1620, 1987.
- [224] T. S. Kumar, A. S. Madsen, M. E. Ostergaard, J. Wengel, and P. J. Hrdlicka. Nucleic acid structural engineering using pyrene-functionalized 2'-amino- $\alpha$ -r-L-LNA monomers and abasic sites. *Journal of Organic Chemistry*, 73:7060–7066, 2008.
- [225] M. Nakamura, Y. Murakami, K. Sasa, H. Hayashi, and K. Yamana. Pyrene-zipper array assembled via RNA duplex formation. *Journal of the American Chemical Society*, 130(22):6904–6905, 2008.
- [226] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, and H.-A. Wagenknecht. Electron injection into DNA: Synthesis and spectroscopic properties of pyrenyl-modified oligonucleotides. *Chemistry-a European Journal*, 8(21):4877–4883, 2002.
- [227] T. L. Netzel, K. Nafisi, J. Headrick, and B. E. Eaton. Direct observation of photoinduced electron transfer in pyrene-labeled dU nucleosides and evidence for protonated 2'-deoxyuridine anion, dU(H)', as a primary electron transfer product. *Journal of Physical Chemistry*, 99:17948–17955, 1995.
- [228] A. Kotaki and K. Yagi. Fluorescence properties of flavins in various solvents. *Japanese Biochemical Society*, 68:509–516, 1970.
- [229] U. Subuddhi, S. Halder, S. Sankararaman, and A. K. Mishra. Photophysical behaviour of 1-(4-n,n-dimethylaminophenylethynyl)pyrene (DMAPEPy) in homogeneous media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5:459–466, 2006.
- [230] M.A. Haidekker, T.P. Brady, D. Lichlyter, and E.A. Theodorakis. Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes. *Bioorganic Chemistry*, 33:415–425, 2005.
- [231] S.-G. Su and J. D. Simon. Solvent dynamics and twisted intramolecular charge transfer in bis(4-aminophenyl) sulfone. *Journal of Physical Chemistry*, 90:6475–6479, 1986.
- [232] R. G. Makitra, I. P. Polyuzhin, and I. P. Shevchuk. Generalization of data on solvent effect on formation of charge-transfer complexes using linear multiparameter equations. *Russian Journal of General Chemistry*, 75(2):177–180, 2005.
- [233] D.M. Gray, S. H. Hung, and K. H. Johnson. Absorption and circular dichroism spectroscopy of nucleic acid duplexes and triplexes. *Methods in Enzymology*, 246:19–34, 1995.
- [234] J. D. Puglisi and I. Tinoco Jr. Absorbance melting curves of RNA. *Methods in Enzymology*, 180:304–325, 1989.
- [235] M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31:3406–3415, 2003.
- [236] G. Dougherty and J. R. Pillbrow. Physico-chemical probes of intercalation. *International Journal of Biochemistry*, 16(12):179–192, 1984.
- [237] S. V. Kamyshan, S. V. Litvinchuk, V. V. Korolev, S. I. Eremenko, Yu. P. Tsentelovich, and N. P. Gritsan. Pyrene fluorescence quenching by aromatic azides. *Kinetics and Catalysis*, 47(1):75–82, 2006.
- [238] G. T. Hwang, Y. J. Seo, and B. H. Kim. Pyrene-labeled deoxyuridine and deoxyadenosine: fluorescent discriminating phenomena in their oligonucleotides. *Tetrahedron Letters*, 46:1475–1477, 2005.

- [239] S. M. Langenegger and R. Häner. Excimer formation by interstrand stacking pyrene. *Chemical Communications*, 24:2792–2793, 2004.
- [240] T. Okada, T. Mori, and N. Mataga. Hydrogen atom transfer in the quenching of pyrene fluorescence by amines. *Bulletin of the chemical society of Japan*, 49(12):3398–3402, 1976.
- [241] M. J. Rist and J. P. Marino. Fluorescent nucleotide base analogs as probes of nucleic acid structure, dynamics and interactions. *Current Organic Chemistry*, 6:775–793, 2002.
- [242] J. Marmur and P. Doty. Determination of the base composition of dioxynucleic acid from its thermal melting temperature. *Journal of Molecular Biology*, 5:109–118, 1962.
- [243] P. Yakovchuk, E. Protozanova, and M. D. Frank-Kamenetskii. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*, 34(2):564–574, 2006.
- [244] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, and B. E. Eaton. Photophysics of 2'-deoxyuridine (dU) nucleosides covalently substituted with either 1-pyrenyl or 1-pyrenonyl: Observation of pyrene-to-nucleoside charge-transfer emission in 5-(1-pyrenyl)-dU. *Journal of the American Chemical Society*, 117:9119–9128, 1995.
- [245] J. N. Demas and G. A. Crosby. The measurement of photoluminescence quantum yields. *Journal of Physical Chemistry*, 75:991–1024, 1971.
- [246] P. Pradhan, B. Jernström, A. Seidel, B. Norden, and A. Gräslund. Induced circular dichroism of benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol 9,10-epoxide stereoisomers covalently bound to deoxyribooligonucleotides used to probe equilibrium distribution between groove binding and intercalative adduct conformations. *Biochemistry*, 37:4664–4673, 1998.
- [247] P. Trojanowski. Unpublished measurements. 2010.
- [248] M. Lorenc, M. Ziolk, R. Naskrecki, J. Karolczak, J. Kubicki, and A. Maciejewski. Artifacts in femtosecond transient absorption spectroscopy. *Applied Physics B*, 74:19–27, 2002.
- [249] H. Port, R. Seyfang, and H. C. Wolf. Time-resolved excimer formation in pyrene crystals. *Journal de Physique*, 10(46):C7 391–C7 395, 1985.
- [250] L. Mohanambe and S. Vasudevan. Aromatic molecules in restricted geometries: Pyrene excimer formation in an anchored bilayer. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(29):14345–14354, 2006.
- [251] K. A. W. Y. Cheng, N. P. Schepp, and F. L. Cozens. Ultrafast dynamics of pyrene excimer formation in Y zeolites. *Journal of Physical Chemistry A*, 108:7132–7134, 2004.
- [252] D.W. Martin, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell. *Harper's Review of Biochemistry*. Lange Medical Publications, Los Altos, 1981.
- [253] J. E. Darnell, Paul Matsudaira, David Baltimore, James Darnell, Arnold Berk, and S. Lawrence Zipursky. *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum akademischer Verlag, 2001.
- [254] L. He and G. J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7):552–531, 2004.
- [255] P. Babitzke, C. S. Baker, and T. Romeo. Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annual Reviews of Microbiology*, 63:27–44, 2009.
- [256] P. Gollnick, P. Babitzke, A. Antson, and C. Yanofsky. Complexity in regulation of tryptophan biosynthesis in *bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, 39:47–68, 2005.

- [257] C. Yanofsky. Transcription attenuation: Once viewed as a novel regulatory strategy. *Journal of Bacteriology*, 182:1–8, 2000.
- [258] N. J. Green, F. J. Grundy, and T. M. Hinkin. The T box mechanism: tRNA as a regulatory molecule. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 584:318–324, 2010.
- [259] B. Klinkert and F. Narberhaus. Microbial thermosensors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66:2661–2676, 2009.
- [260] A. Roth and R. R. Breaker. The structural and functional diversity of metabolite binding riboswitches. *Annual Reviews of Biochemistry*, 78:305–334, 2009.
- [261] W. C. Winkler and R.R Breaker. Generic control by metabolite-binding riboswitches. *ChemBioChem*, 4:1024–1032, 2003.
- [262] B. Suess and J. E. Weigand. Engineered riboswitches: Overview, problems and trends. *RNA Biology*, 5:24–29, 2008.
- [263] J. E. Weigand and B. Suess. Aptamers and riboswitches: Perspectives in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:229–236, 2009.
- [264] Julia Weigand. *Identification, characterization and application of engineered riboswitches*. PhD thesis, Goethe-Universität, Frankfurt, 2009.
- [265] R. D. Jenison, S.C. Gill, A. Pardi, and B. Polisky. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263:1425–1429, 1994.
- [266] S. K. Desai and J. P. Gallivan. Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *Journal of the American Chemical Society*, 126:13247–13254, 2004.
- [267] S. A. Lynch, S. K. Desai, H. K. Sajja, and J. P. Gallivan. A high-throughput screen for synthetic riboswitches reveals mechanistic insights into their function. *Chemical Biology*, 14:173–184, 2007.
- [268] S. A. Lynch and J. P. Gallivan. A flow cytometry-based screen for synthetic riboswitches. *Nucleic Acids Research*, 37:184–192, 2009.
- [269] B. Suess, B. Fink, C. Berens, R. Stentz, and W. Hillen. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Research*, 32:1610–1614, 2004.
- [270] G. Werstuck and M. R. Green. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science*, 282:296–298, 1998.
- [271] D. Grate and C. Wilson. Inducible regulation of the *s. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 9:2565–70, 2001.
- [272] J. E. Weigand, M. Sanchez, E.-B. Gunnesch, S. Zeiher, R. Schroeder, and B. Suess. Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA*, 14:89–97, 2008.
- [273] P. Koetter, J. E. Weigand, B. Meyer, K.-D. Entian, and B. Suess. A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Research*, 37(18):1–7, 2009.
- [274] C. J. Hutchins, P. D. Rathjen, A. C. Forster, and R. H. Symons. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Research*, 14(9):3627–3640, 1986.
- [275] A. Ogawa and M: Maeda. An artificial aptazyme-based riboswitch and its cascading system in *e. coli*. *ChemBioChem*, 9:206–209, 2008.
- [276] L. Yen, J. Svendsen, J.-S. Lee, J. T. Gray, M. Magnier, T. Baba, R. J. D’Amato, and R. C. Mulligan. Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature*, 431:471–476, 2004.

- [277] M. Wieland, A. Benz, B. Klauser, and J. S. Hartig. Artificial ribozyme switches containing natural riboswitch aptamer domains. *Angewandte Chemie International Edition*, 48:2715–2718, 2009.
- [278] M. N. Win and C. D. Smolke. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proceedings of the National Society of the USA*, 104:14283–14288, 2007.
- [279] M. Wieland, M. Gfell, and J. S. Hartig. Expanded hammerhead ribozymes containing addressable three-way junctions. *RNA*, 15:968–976, 2009.
- [280] C. I. An, V. B. Trinh, and Y. Yokobayashi. Artificial control of gene expression in mammalian cells by modulating RNA interference through aptamer-small molecule interaction. *RNA*, 12:710–716, 2006.
- [281] N. Tuleuova, C. I. An, E. Ramanculov, A. Revzin, and Y. Yokobayashi. Modulating endogenous gene expression of mammalian cells via RNA-small molecule interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376:169–179, 2008.
- [282] C. L. Beisel, T. S. Bayer, K. G. Hoff, and C. D. Smolke. Model-guided design of ligand-regulated RNAi for programmable control of gene expression. *Molecular Systems Biology*, 4:224–237, 2008.
- [283] J. E. Weigand and B. Süss. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Research*, 35(12):4179–4185, 2007.
- [284] D. S. Kim, V. Gusti, S. G. Pillnai, and R. K. Gaur. An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA*, 11:1667–1677, 2005.
- [285] V. Gusti, D. S. Kim, and R. K. Gaur. Sequestering of the 3' splice site in a theophylline-responsive riboswitch allows ligand-dependent control of alternative splicing. *Oligonucleotides*, 18:93–99, 2008.
- [286] D. S. Kim, V. Gusti, K. J. Dery, and R. K. Gaur. Ligand-induced sequestering of branchpoint sequence allows conditional control of splicing. *BMC Molecular Biology*, 9:23–28, 2008.
- [287] S. Wang and K. A. White. Riboswitching on RNA virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:10406–10411, 2007.
- [288] S. Wang, L. Mortazavi, and K. A. White. Higher-order RNA structural requirements and smallmolecule induction of tombusvirus subgenomic mRNA transcription. *Journal of Virology*, 82:3864–3871, 2007.
- [289] J. Noeske, H. Schwalbe, and J. Wohnert. Metal-ion binding and metal-ion induced folding of the adenine-sensing riboswitch. *Nucleic Acids Research*, 35:5262–5273, 2007.
- [290] J. Noeske, J. Buck, B. Furtig, H. R. Nasiri, H. Schwalbe, and J. Wohnert. Interplay of induced fit and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch. *Nucleic Acids Research*, 35:572–583, 2007.
- [291] O. M. Ottink, S. M. Rampersad, M. Tessari, G. J. Zaman, H. A. Heus, and S. S. Wijmenga. Ligand-induced folding of the guanine-sensing riboswitch is controlled by a combined predetermined induced fit mechanism. *RNA*, 13:2202–2212, 2007.
- [292] M. P. Latham, G. R. Zimmermann, and A. Pardi. NMR chemical exchange as a probe for ligand-binding kinetics in a theophylline-binding RNA aptamer. *Journal of the American Chemical Society*, 131:5052–5053, 2009.
- [293] J. Buck, B. Furtig, J. Noeske, J. Wohnert, and H. Schwalbe. Timeresolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104:15699–15704, 2007.

- [294] S. W. Lee, L. Zhao, A. Pardi, and Tianbing Xia. Ultrafast dynamics show that the theophylline and 3-methylxanthine aptamers employ a conformational capture mechanism for binding their ligands. *Biochemistry*, 49:2943–2951, 2010.
- [295] J.-F. Lemay, C. Penedo, R. Tremblay, D. M. J. Lilley, and D. A. Lafontaine. Folding of the adenine riboswitch. *Chemistry and Biology*, 13:857–868, 2006.
- [296] F. M. Jucker, R. M. Phillips, S. A. McCallum, and A. Pardi. Role of a heterogeneous free state in the formation of a specific RNA-theophylline complex. *Biochemistry*, 42:2560–2567, 2003.
- [297] J. K. Wickiser, W. C. Winkler, R. R. Braker, and D. M. Crothers. The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch. *Molecular Cell*, 18:49–60, 2005.
- [298] J. K. Wickiser, M. T. Cheah, R. R. Braker, and D. M. Crothers. The kinetics of ligand binding by an adenine-sensing riboswitch. *Biochemistry*, 44:13404–13414, 2005.
- [299] S. D. Gilbert, C. D. Stoddart, S. J. Wise, and R. T. Batey. Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain. *Journal of Molecular Biology*, 359:754–768, 2006.
- [300] K. Lang, R. Rieder, and R. Micura. Ligand-induced folding of the thiM TPP riboswitch investigated by a structure-based fluorescence spectroscopic approach. *Nucleic Acids Research*, 35(16):5370–5378, 2007.
- [301] C. Berens, A. Thain, and R. Schroeder. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorganic and Medical Chemistry*, 9:2549–2556, 2001.
- [302] B. Suess, S. Hanson, C. Berens, B. Fink, R. Schroeder, and W. Hillen. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Research*, 31:1853–1858, 2003.
- [303] S. Hanson, K. Berthelot, B. Fink, J. E. McCarthy, and B. Suess. Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Molecular Microbiology*, 49:627–637, 2003.
- [304] S. Hanson, G. Bauer, B. Fink, and B. Suess. Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *RNA*, 11:503–511, 2005.
- [305] M. Mueller, J. E. Weigand, O. Weichenrieder, and B. Suess. Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Research*, 34(9):2607–2617, 2005.
- [306] H. Xiao, T. E. Edwards, and A. R. Ferré-D’Amaré. Structural basis for specific, high-affinity tetracycline binding by an in vitro evolved aptamer and artificial riboswitch. *Chemical Biology*, 15:1125–1137, 2008.
- [307] H. Günzler and H. Böck. *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley-VCH, 1983.
- [308] Stefan Lättig. *FTIR-Spektroskopische Untersuchungen zur Hydrathülle von methylierten Cyclodextrinen*. PhD thesis, Freie Universität Berlin, 2006.
- [309] A. D. Ellington and J. W. Szostak. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346:818–822, 1990.
- [310] C. Tuerk and L. Gold. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249:505–510, 1990.
- [311] P. Davanloo, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, and F. W. Studier. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 81:2035–2039, 1984.
- [312] S. Schneider, M. O. Schmitt, G. Brehm, M. Reiher, P. Matousek, and M. Towrie. Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ . *Photochemistry Photobiology*, 2:1107–1117, 2003.

- [313] H. Morrison, G. Olack, and C. Xiao. Photochemical and photophysical studies of tetracycline. *Journal of the American Chemical Society*, 113(21):8110–8118, 1991.
- [314] T. Hasan and A. U. Khan. Phototoxicity of the tetracyclines: Photosensitized emission of singlet delta dioxygen. *Proceedings of the American National Society*, 83:4604–4606, 1986.
- [315] K. Olsen, B. Svensson, and U. Christensen. Stopped-flow fluorescence and steady-state kinetic studies of ligand-binding reactions of glucoamylase from *aspergillus niger*. *European Journal of Biochemistry*, 209:777–784, 1992.
- [316] R. L. Burton, J. W. Hanes, and G. A. Grant. A stopped flow transient kinetic analysis of substrate binding and catalysis in *escherichia coli* D-3-phosphoglycerate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44):29706–29714, 2008.
- [317] Amir Hossein Nasiri. NMR-Untersuchungen von RNA-Aptamer-Ligand-Interaktionen. Master's thesis, Goethe-Universität Frankfurt, 2010.
- [318] J. Enderlein and R. Erdmann. Fast fitting of multi-exponential decay curves. *Optics Communications*, 137:371–378, 1997.
- [319] J. A. Nelder and R. A. Mead. A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, 7:308–313, 1965.
- [320] V. V. Apanasovich and E. G. Novikov. Identification of lifetime characteristics in fluorescence experiments. *Proceedings of the International Society for Optical Engineering*, 2388:387, 1995.
- [321] Ingo Lutz. Aufbau eines IR-Spektrometersystems zur Untersuchung von Konformationsänderungen von Polypeptiden auf der Nano- bis Mikrosekunden-Zeitskala. Master's thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1997.
- [322] Sebastian Spörlein. *Femtosekunden-Spektroskopie schnellster Strukturänderungen in Peptid-Chromophor-Komplexen*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2002.
- [323] Robert Huber. *Elektronentransfer an Farbstoff-Halbleiter-Grenzflächen*. PhD thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2002.
- [324] P. Kuzmic. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Analytical Biochemistry*, 237:260–273, 1996.
- [325] R. S. Stepleman and A. C. Hindemarsch.
- [326] G. A. F. Seber and C. J. Wild. *Nonlinear Regression*. Wiley, New York, 1989.
- [327] K. P. Burnham and D. R. Anderson. *Model Selection and Multi-Model Inference: A Practical Information-Theoretic Approach*. Springer Verlag, Berlin, 2004.
- [328] H. Akaike. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19:716–723, 1974.

## Danksagung

Keine Schuld ist dringender, als die, Danke zu sagen. Deshalb möchte ich an dieser Stelle all jene erwähnen, ohne die diese Arbeit niemals das hätte werden können, das sie heute ist.

Mein größter Dank gilt **Prof. Dr. Josef Wachtveitl**. Für die Vergabe des Themas, für das entgegengebrachte Vertrauen, die gute Betreuung und die große gedankliche Unabhängigkeit, die es mir ermöglicht hat, meinen eigenen Ideen Raum zu geben. Und auch nicht zuletzt für die Arbeitsatmosphäre, die ich zu jedem Augenblick als angenehm, konstruktiv und freundlich empfunden habe. Es war ganz sicher die lehrreichste Zeit in meinem Leben, die mich auch persönlich sehr viel weiter gebracht hat.

Ebenfalls zu Dank verpflichtet bin ich **Prof. Dr. Beatrix Süß**, durch die ich mit dem für mich zunächst sehr ungewohnten, aber doch sehr spannenden Gebiet der Aptamere in Berührung gekommen bin. Die Zusammenarbeit auf dem Aptamerprojekt habe ich immer als sehr angenehm und spannend empfunden. Auch bin ich dankbar für die Übernahme des Zweitgutachtens, das gerade aufgrund der großen Interdisziplinarität durchaus keine Selbstverständlichkeit ist.

Weiterhin geht mein Dank an **Nina Gildenhoff**, die über gut zwei Jahre mein *Partner in Crime* an der TCSPC/Upconversion-Anlage war (und der die Anlage auch ihren Laborspitznamen 'FUMPI' verdankt), und die die beste Bürokollegin war, die ich mir nur hätte wünschen können. Wir haben menschlich und fachlich sehr gut harmoniert, und ich habe in den letzten zwei Jahren wirklich vermisst, dass unsere gemeinsamen Zeiten im Labor doch deutlich weniger geworden sind.

**Christian Grünewald** und **Prof. Dr. Joachim W. Engels** bin ich insbesondere für das Pyrenprojekt zu Dank verpflichtet. Ich habe immer Spaß daran gehabt und jede nötige Unterstützung erfahren und insbesondere die sehr interdisziplinäre Ausrichtung des Projekts, das sich auf viele Gebiete erstreckte, als spannend empfunden. Im Verlauf der Jahre habe ich in dieser Kooperation unendlich viel auf nahezu unendlich vielen Gebieten gelernt - und eines davon war sicherlich, eine gemeinsame Sprache zu finden. Christian danke ich auch noch einmal für das Korrekturlesen der 'chemischeren' Abschnitte dieser Arbeit.

Dank geht auch an **Dr. Julia Weigand** aus dem AK Süß, die mich mit gefühlten Tonnen des Tetrazyklinaptamers in allen Variationen versorgt hat, und für die es offensichtlich den Ausspruch "geht nicht" nicht gibt. Ich habe aus jeder unserer Diskussionen etwas gelernt und ihre Hilfsbereitschaft immer zu schätzen gewusst. Ganz nebenbei möchte ich mich natürlich auch noch bei dem gesamten **AK Süß** für das großzügige temporäre zur Verfügung stellen des Fluorimeter-Mercedes bedanken, der

mir viele Unannehmlichkeiten beim Messen der Pyren-Schmelzkurven erspart hat.

Ich möchte mich auch bei **Karsten Mörs** aus dem **AK Glaubitz** bedanken, mit dem ich im Rahmen des TbSMR-Projekts zusammengearbeitet habe. Leider ist nicht ganz soviel herausgekommen, wie wir uns erhofft hatten, aber das, fürchte ich, ist ebenso Wissenschaft, und die Zusammenarbeit habe ich trotzdem geschätzt.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch **Dr. Georg Wille** aus dem AK Mäntele, der mir mit dem Hinweis auf das Programm Dynafit in bezug auf das Tetrazyklin-Projekt unglaublich viel Ärger erspart und mir auch bei der Erstellung des Tetra-Kristallstruktur-Bildchens sehr geholfen hat. Auch bin ich dankbar für das geduldige Beantworten aller Fragen, die mit 'du bist doch Biochemiker...' begonnen und für das Korrekturlesen der biochemischen Teile des Tetra-Kapitels.

Besonders in der Anfangsphase dieser Arbeit habe ich sehr viel Unterstützung von **Karsten Neumann** erfahren, der sicherlich der beste Tüftler ist, den ich kenne, und der für jedes, wirklich jedes experimentelle Problem eine Lösung kennt. Er hatte immer ein offenes Ohr, wenn es irgendwo klemmte und auch von der menschlichen Seite her hätte ich auf seine Unterstützung nicht verzichten mögen. Ebenso, an vielen Stellen, bin ich **Mirka-Kristin Verhoefen** zu Dank verpflichtet. Für viele kleine Unterstützungen, für viel Musik, und nicht zuletzt auch für etwas *Chanel No. 2* zur rechten Zeit. **Dr. Sergiu Amarie** verdanke ich die Zusammenarbeit auf dem Astaxanthin-Projekt, bei dem eine Messung heraus kam, die uns vermutlich beide überrascht hat. Ein weiterer Dank geht an **Dr. Lisa Lorenz**, deren gelbem Projekt ich meine ersten Upconversionmessungen überhaupt verdanke, und die lange Zeit gemeinsam mit Nina und mir die Biophysik des AK Wachtveitl war. **Peter Trojanowski** danke ich fürs Korrekturlesen und für das Stellen von Fragen, die mich immer auch noch mal gezwungen haben, etwas aus einem anderen Winkel zu betrachten. **Dr. Markus Braun** danke ich insbesondere für sehr fruchtbare Pyren-Diskussionen, die mir gerade, als ich nicht weiter kam, sehr weiter geholfen haben. **Lars Dworak** und **Heike Staudt** danke ich für Hilfe bei der Bedienung und Justage der transienten Absorptionsanlage.

**Andreas Roth**, **Jürgen Maurer**, **Annette Kopitz** und **Dr. Vitali Vogel** danke ich für die Hilfe und Unterstützung an diversen, dem Institut für Biophysik zugehörigen Spektrometern.

Meinen beiden 'Bachelors' **Katharina Lommel** und **Daniel Sauter** danke ich für die gute Zusammenarbeit. Sie haben mich beide insbesondere im Rahmen des Pyrenprojekts unterstützt. Ebenso geht Dank an meine Praktikanten im Verlauf der vergangenen fünf Jahre: **Gordon Keitl**, **Hannah Steinert**, **Friederike Danneberg**, **Claudia Ament**, **Jochen Zoller**, **Maximilian Hützler**, **Maren Pellowska**, **Marijana Pejic**, **Katharina Lommel** und **Bilge Varhan**. Jeder von ihnen hat zu dieser Arbeit beigetragen.

Meinen gesamten Kollegen aus dem AK Wachtveitl habe ich zu verdanken, dass die Promotion zu keiner Zeit *nur* ein Job war. Das Klima der Arbeitsgruppe war im beruflichen wie privaten sehr angenehm, und ich bin jeden Tag gerne in die Uni gekommen. Ebenfalls dazu beigetragen haben die Mitglieder der Kaffeerrunde (bestehend aus Mitgliedern der AKs Dreuw, Wachtveitl und Stock), deren fachliche und nicht fachliche



Diskussionen auf ihre Art einzigartig waren.

Auch im Institut für Biophysik möchte ich mich für die freundliche Aufnahme, die angenehme Atmosphäre und die vielen netten Unterhaltungen bedanken, die dazu geführt haben, dass ich mich auch als *Grenzgänger* in der Biophysik sehr willkommen gefühlt habe.

Für die Hilfe im täglichen Kampf mit den administrativen Feinheiten des Unibetriebs habe ich **Claudia v. Sulecki**, **Kirstin Grönitz** und **Karin Lill** zu danken.

Zu sehr großem Dank bin ich auch der **Feinmechanischen Werkstatt des Instituts für Physikalische und Theoretische Chemie** verpflichtet. Ohne ihre kompetente Beratung und die stets zügige Ausführung stünde bis heute vermutlich weder die Aufkonvertierung, noch die Optik für die Stopped-Flow-Anlage. Ebenso danke ich **Ernst Winter** für die Unterstützung bei allen Fragen, die die Laborinstallation betreffen, ebenso wie seine generell große Hilfsbereitschaft. **Viktor Schäfer** danke ich für die Unterstützung in allen Fragen der Elektronik.

Meinem Freund **Alexandru Popescu** danke ich dafür, dass er jeden Schritt dieses Weges mit mir gegangen ist. Deine Unterstützung auf diesem Weg kann man in Worten nicht messen und kaum beschreiben. Es wäre alles so unendlich viel schwerer ohne dich.

Der *Selbsthilfegruppe Promotion*, bestehend aus **Cornelia Lengler**, **Arno Kretschmer** und dem hospitierenden Mitglied **Alexander Heckmann** danke ich für die Unterstützung bei fachlichen Fragen, das gelegentliche Heraussuchen von mir nicht zugänglicher Literatur, das deutlich weniger gelegentliche Ertragen von Zornes- oder Resignationsausbrüchen, sowie den täglichen gemeinsamen Kampf gegen den Wahnsinn.

Auch bei meinen Freunden möchte ich mich für die Geduld meiner sicherlich bisweilen schwierig zu ertragenden Launen, das gelegentliche Aufmuntern, und das stets offene Ohr, das ich gefunden habe, bedanken.

Und, vielleicht am wichtigsten, danke ich meiner Familie. **Meinen Eltern**, **Astrid**, **Sarah** und **Curtis**. Dafür, dass ihr immer da seid, wenn ich euch brauche. Dafür, dass ihr mich auf jedem Schritt des Weges begleitet und mir manchmal auch den Kopf zurecht gerückt habt. Dafür, dass ich dank euch auch immer weiß, was letztendlich wirklich wichtig ist.



## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den .....  
(Unterschrift)

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

**Untersuchung der Konformation und Dynamik von RNA mit  
Hilfe fluoreszierender Farbstoffmoleküle**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben

Frankfurt am Main, den .....  
(Unterschrift)



# Lebenslauf

Name: Ute Förster  
Geburtsdatum: 03. September 1979  
Geburtsort: Homburg/Saar  
Nationalität: deutsch

06/2005 -	Doktorandin am Institut für Biophysik, Universität Frankfurt Thema: Untersuchung der Konformation und Dynamik von RNA mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffmoleküle Betreuer: Prof. J. Wachtveitl
10/1998 - 02/2005	Studium der Physik an der Technischen Universität Darmstadt Abschluß: Diplom, Note: sehr gut (1,1) Thema der Diplomarbeit: Photostabilität farbstoffdotierter $\text{AlPO}_4$ -Zeolith-Laserkristalle, Betreuer: Prof. Theo Tschudi, Dr. Franco Laeri
09/2001 - 07/2002	Studium der Physik am Institut National Polytechnique de Grenoble, Frankreich
11/2001 - 07/2002	Praktikum im Institut de Sciences Nucleaires, Betreuerin: Dr. Corinne Berat Thema: Radiative Transfer in the Atmosphere for the EUSO Project
05/1998	Abitur, Kaiserin-Friedrich-Schule, Bad Homburg, Note: 1,5