

# **Physikalische und zelluläre Einflussfaktoren auf das Konformationsgleichgewicht nicht- kanonischer DNS-Strukturen**

Dissertation

zur Erlangung des Titels

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Jim-Marcel Knop**

geboren am 27.02.1990 in Gütersloh

Eingereicht bei der

Fakultät für Chemie und chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

**Dortmund, 07.2021**



# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Knop, Jim-Marcel  
Name, Vorname  
(Surname, first name)

141985  
Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

## Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, §63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

## Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund,  
Ort, Datum  
(Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation (Title of the thesis):

**Physikalische und zelluläre Einflussfaktoren auf das Konformationsgleichgewicht nicht-kanonischer DNS-Strukturen**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

**\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Dortmund,  
Ort, Datum  
(Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift  
(Signature)

Diese Arbeit wurde an der Technischen Universität Dortmund im Lehrstuhl für Biophysikalische Chemie/Physikalische Chemie I unter Anleitung von Prof. Dr. Roland Winter durchgeführt.

Dissertation eingereicht am: 14.07.2021

Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2021

Prüfungskommission:

Prüfungsvorsitzende: Prof. Dr. Susanne Brakmann

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Claus Czeslik



*„Ein hartnäckiger Begleiter  
der Erkenntnis ist die Unwissenheit über die eigene  
Unwissenheit.“*

*Also sprach Golem; Stanisław Lem (\* 1921 - † 2006)*





## *Danksagung*

*An dieser Stelle möchte ich mich für die Ermöglichung und Unterstützung der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.*

*An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Roland Winter für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können, bedanken. Dankbar bin ich auch für die hilfreichen Diskussionen der Messergebnisse, sowie die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse im In- und Ausland vor internationalem Publikum zu präsentieren.*

*Bei Prof. Dr. Claus Czeslik möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats, sowie fachliche und technische Unterstützung bedanken.*

*Besonderen Dank gilt Andrea Jeworrek für die große organisatorische Unterstützung während der gesamten Promotion.*

*Bei Dr. Satyajit Patra möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit in mehreren wissenschaftlichen Projekten und insbesondere für die Einführung in die *single-molecule* FRET-Mikroskopie bedanken.*

*Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Sanjib Mukherjee, Simone Möbitz, Dr. Balasubramnian Harish und Dr. Rosario Oliva für die erfolgreiche Zusammenarbeit an verschiedenen gemeinsamen Forschungsprojekten.*

*Dr. Michel Jaworek danke ich für die gute Büro- und Arbeitsatmosphäre, viele fachliche Diskussionen und moralische Unterstützung.*

*Weiter gilt mein Dank allen Alumni, Kollegen und Kolleginnen der PC I, die für eine angenehme und ertragreiche Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.*

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1 Motivation.....	5
2 Nicht-kanonische DNS-Strukturen – Aufbau, Konformation und biologische Relevanz.....	7
2.1 Nicht-kanonische DNS-Strukturen.....	7
2.2 Vorkommen und Funktion <i>in vivo</i> .....	10
3 Physikalische und zelluläre Variablen.....	12
3.1 Druck und Temperatur.....	12
3.2 Osmolyte und <i>Crowder</i> .....	14
4 Verwendete Methoden und Geräte.....	18
4.1 Einzelmolekül-Fluoreszenz Methoden.....	18
4.1.1 Fluoreszenz.....	18
4.1.2 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET).....	19
4.1.3 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS).....	22
4.1.4 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie (smFRET-mic).....	25
4.2 Circular dichroismus-Spektroskopie.....	28
4.3 Auswertung.....	33
4.3.1 Auswertung der smFRET-Daten.....	33
4.3.2 Auswertung der CD-Daten.....	33
5 Probenpräparation.....	35
5.1 DNS-Sequenzen und Hybridisierung.....	35
5.1.1 smFRET-Mikroskopie.....	36
5.1.2 CD-Spektroskopie.....	37
5.2 NMR.....	38
5.3 $\alpha$ -Synuclein-Aggregate.....	38
5.4 Mikroskopiemesszellen für Hochdruck und Temperatur.....	39
5.5 Polysobat 80.....	40
6 Einfluss von TMAO, Harnstoff, Druck und Temperatur auf das Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplexes.....	41

# Inhaltsverzeichnis

6.1 Einleitung.....	41
6.2 Temperaturabhängige Messungen des telomerischen G-Quadruplex.....	43
6.2.1 Ergebnisse.....	43
6.2.2 Diskussion.....	46
6.3 Druckabhängigkeit.....	48
6.3.1 Ergebnisse.....	48
6.3.2 Diskussion.....	53
7 Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf das Konformationsgleichgewicht von G-Quadruplexen und i-Motiven am Beispiel telomerischer DNS-Sequenzen.....	57
7.1 Einleitung.....	57
7.2 Ergebnisse.....	58
7.3 Diskussion.....	72
8 Änderung der Konformationsdynamik eines DNS-Hairpins durch $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem.....	76
8.1 Einleitung.....	76
8.2 Ergebnisse.....	77
8.3 Diskussion.....	83
9 Fazit und Ausblick.....	86
10 Anhang.....	I
10.1 Weitere Abbildungen.....	I
10.2 Abkürzungsverzeichnis.....	IV
10.3 Chemikalien und Lieferanten/Hersteller.....	VI
10.4 Verwendete Geräte.....	VII
10.5 Literaturverzeichnis.....	VIII
10.6 Abbildungsverzeichnis.....	XIX
10.7 Publikationsliste.....	XXV
10.8 Vorträge und Präsentationen.....	XXVI

## Zusammenfassung

### Zusammenfassung

Neben der klassischen Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Doppelhelix bilden bestimmte DNS-Sequenzen auch *in vivo* verschiedene nicht-kanonische Konformationen aus. Beispiele hierfür sind Haarnadelstrukturen bei intramolekularer Komplementarität sowie Guanin (G)-Quadruplexe und i-Motive in Guanin- bzw. Cytosin-reichen Sequenzabschnitten. Diese nicht-kanonischen DNS-Strukturen spielen eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der Chromosomen und der Regulation der Genexpression. Der jeweilige dynamische Wechsel der Konformation beeinflusst maßgeblich weitere ablaufende Prozesse in lebenden Organismen und ist umgekehrt auch von diesen abhängig. Aufgrund der Verbreitung dieser Sequenzen in Promotorregionen und Telomeren werden insbesondere die Proteinbiosynthese, die Apoptose und die Tumorgenese beeinflusst. Umgekehrt kann die Expression oder Aggregation bestimmter Proteine sowie äußere Faktoren, wie Druck und Temperatur, das Konformationsgleichgewicht verändern. Aufgrund der hohen Verbreitung des Sequenzabschnitts (GGG TTA)<sub>3</sub>GGG als konservierte Repetitionseinheit der Telomere unter den Wirbeltieren, ist hier die Untersuchung verschiedenster Stressfaktoren von besonderem Interesse.

Tiefseeorganismen sind durchgängig einem hohen Druck von bis zu 1000 bar ausgesetzt und gleichen die Protein-entfaltende Wirkung durch Osmolyte wie Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) aus. In einer ersten Studie konnte mittels Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer-Mikroskopie gezeigt werden, dass auch die weitverbreitete G-Quadruplex-bildende Telomersequenz (GGG TTA)<sub>3</sub>GGG unter hohem Druck mehrerer Hektobar die Konformation ändert. Da die Triebkraft für Konformationsänderungen durch Druckerhöhung eine Volumenreduktion ist, konnten die beobachteten Effekte auf eine Änderung der Hydratation sowie eine Änderung der Packungsdichte der Quadruplexe zurückgeführt werden. Ähnlich wie im Fall der Proteine wirkt TMAO stabilisierend, hier auf die bei 1 bar dominante antiparallele G-Quadruplex-Konformation gegenüber Druckstress, während Harnstoff, ein chaotropes Denaturans, entfaltend wirkt. Die Effekte können ähnlich wie bei Proteinen durch einen Ausschluss des TMAO von, beziehungsweise direkte Wechselwirkungen des Harnstoffes mit, dem Rückgrat und den Nukleobasen der DNS erklärt werden. Auch durch Ficoll erzeugtes makromolekulares *Crowding*, wie es in lebenden Zellen durch die hohe Konzentration an Biomakromolekülen (30 - 40 Gew.-%) ausgelöst wird, führt zu einer Stabilisierung der nativen antiparallelen Konformation.

## Zusammenfassung

In einer weiteren Studie dieser Arbeit wurde der Einfluss des intrinsisch ungeordneten Proteins  $\alpha$ -Synuclein auf die gleiche Telomersequenz ebenfalls mittels Einzelmolekül-Förster-Resonanzenergietransfer-Mikroskopie untersucht. Zusätzlich wurde ebenfalls die komplementäre ebenfalls in (humanen) Telomeren vorkommende Cytosin (C)-reiche Sequenz (CCC TAA)<sub>3</sub>CCC untersucht.  $\alpha$ -Synuclein ist dafür bekannt, durch Aggregation und Ausbildung sogenannter LEWY-Körper die gleichnamige LEWY-Körper-Demenz sowie auch die PARKINSON-Krankheit auszulösen. Der Fokus der Forschung wurde bisher insbesondere auf den Einfluss der hierdurch veränderten Aufnahme und Ausbildung synaptischer Vesikel gelegt. In dieser Studie ging es hingegen um die mögliche Beeinflussung der Genregulation und Chromosomenstabilität durch monomeres und aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein. Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Synuclein in monomerer und aggregierter Form unterschiedliche Effekte auf die Konformation der genannten DNS-Sequenzen hat. Während monomeres  $\alpha$ -Synuclein keinen messbaren Effekt auf die Konformation des G-Quadruplexes hatte, bildete die Cytosin-reiche Sequenz trotz eines pH-Wertes von 7.5 zu ca. 30 % ein i-Motiv bei mikromolarer  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration aus. Aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein entfaltete hingegen die Guanin-reiche Sequenz, während der Effekt auf die C-reiche Sequenz qualitativ dem von monomerem  $\alpha$ -Synuclein glich. Grund für die unterschiedlichen Effekte ist höchstwahrscheinlich die unterschiedliche direkte Wechselwirkung bestimmter Aminosäurereste des  $\alpha$ -Synuclein mit Purin- beziehungsweise Pyrimidinbasen. Makromolekulares *Crowding* durch Ficoll konnte den Effekt der  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate auf die G-Quadruplex-Sequenz teilweise abschwächen. Der  $\alpha$ -Synuclein-Effekt auf die i-Motiv-Sequenz wurde durch Ficoll hingegen verstärkt. Da Ficoll durch den makromolekularen *Crowding*-Effekt jeweils die kompaktere Konformation stabilisiert, entsprach dies den Erwartungen.

Die Wirkung des IDP  $\alpha$ -Synuclein auf einen DNS-*Hairpin* wurde ebenfalls in einem Projekt untersucht. Monomeres  $\alpha$ -Synuclein führte in diesem Fall zur Ausbildung einer neuen, bisher nicht beobachteten, intermediären Konformation. Der zusätzliche Einsatz eines wässrigen Zweiphasensystems aus Dextran und Polyethylenglykol zur Nachahmung von flüssig-flüssig phasenseparierten Zellmilieus stabilisierte diese druckstabile intermediäre Konformation weiter. Der Vergleich mit den Einzelkomponenten Dextran und Polyethylenglykol konnte hier die besonderen Eigenschaften des Zweiphasensystems belegen.

## Abstract

### Abstract

Besides the classical DNA-double helix structure, certain DNA-sequences are able to form non-canonical secondary structures even *in vivo*. Examples are hairpin structures in case of intramolecular complementary as well as guanine-rich and cytosine-rich sequences forming G-quadruplex and i-motif conformations. Those non-canonical DNA-structures play an important role in stabilizing chromosomes and regulate gene expression. The dynamic alteration of these conformations influences other vital processes in living organisms and, *vice versa*, depends on those. On the one hand, the occurrence of those sequences in promoter regions and telomers leads to a specific influence on protein biosynthesis, the triggering of apoptosis and the genesis of tumors. On the other hand, expression or aggregation of certain proteins as well as environmental conditions like extreme pressures and temperatures are able to alter the conformational dynamics of non-canonical DNA-sequences. The high proliferation of the conserved repetition unit (GGG TTA)<sub>3</sub> GGG in telomers of vertebrates leads to a significant interest in uncovering the effects of different stress factors on these sequences.

Deep sea organisms are continuously exposed to high pressures up to 1000 bar and counteract the protein-denaturing effect of pressure with osmolytes like trimethylamine-*N*-oxide (TMAO). A first study using single-molecule FRET-microscopy showed that the widespread telomer sequence (GGG TTA)<sub>3</sub>GGG also changes its conformation, if pressure of several hectobars is applied. The driving force of pressure-induced conformational changes is the reduction of the systems volume, by changing the packing density and the hydration. Similar to the effect on proteins, TMAO is able to stabilize the antiparallel G-quadruplex conformation against pressure perturbation, while urea, a natural chaotropic cosolute, leads to unfolding of the DNA-sequence. These effects could also be explained with a similar mechanism. TMAO is excluded from the surface of the backbone and the nucleobases of the DNA. In contrast, urea is directly interacting via H-bonds with the surface of the DNA. Macromolecular crowding is realized in living cells by high protein concentrations (30 - 40 wt.-%). Here, crowding was mimicked by Ficoll PM 70, again leading to a stabilization of the native antiparallel conformation.

In a second study, the influence of the intrinsically disordered protein  $\alpha$ -synuclein on the same telomeric sequence was investigated via single-molecule FRET-microscopy. We also studied the

## Abstract

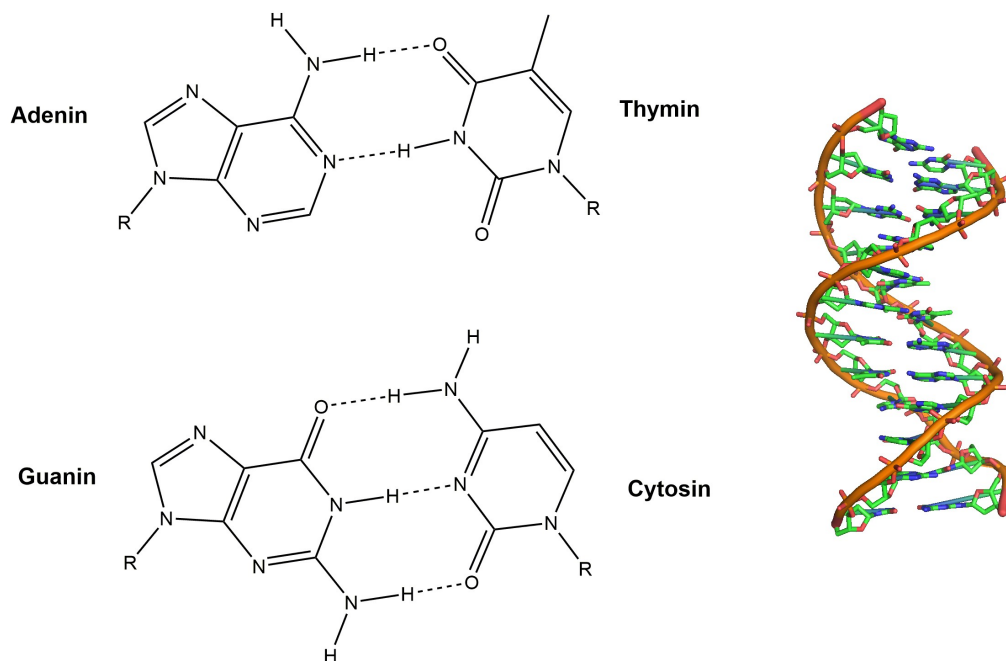
complementary cytosine-rich sequence (CCC TAA)<sub>3</sub> CCC, also known to occur in (human) telomers.  $\alpha$ -Synuclein can trigger LEWY-body dementia and PARKINSON-disease by aggregation and assembling into LEWY-bodies. Former research generally focused on  $\alpha$ -synuclein induced changes of the synaptic vesicle transport. In this study, we focused on possible changes of the chromosomal stability and alteration of gene expression.  $\alpha$ -Synuclein induced different effects on the named gene sequences. The G-quadruplex-DNA conformation was destabilized by aggregated  $\alpha$ -synuclein, whereas the cytosine-rich sequence was stabilized in the closed conformation by 30 % at micromolar concentrations of the monomeric and aggregated form, despite the pH of 7.5. The different effects are most likely caused by different direct interactions of certain amino acid residues with the nucleobases of the purine and the pyrimidine group. The macromolecular crowder Ficoll weakened the deteriorating effect of aggregated  $\alpha$ -synuclein on the G-quadruplex conformation and enhanced the folded formation of the i-motif structure. Due to the stabilization of more compact conformations by macromolecular crowding, this was an expected outcome.

Another project dealt with the interaction of a DNA hairpin with monomeric  $\alpha$ -synuclein in an aqueous two-phase system, mimicking liquid-liquid phase separated cellular components. Monomeric  $\alpha$ -synuclein lead to the formation of a new, intermediate conformation. The presence of an aqueous two-phase system consisting of dextran and polyethylene glycol stabilized this new conformation even further. Single crowding component measurements with dextran as well as polyethylene glycol highlighted the unique effects of the aqueous two-phase system.

# Einleitung

## 1 Motivation

Nachdem die Doppelhelixstruktur des Erbgutes durch WATSON und CRICK 1953 entschlüsselt wurde (Basenpaarung in Abbildung 1),<sup>1,2</sup> beobachteten GELLERT, LIPSETT und DAVIES in einer Studie von 1962 bereits G-Quadruplex-Überstrukturen von monomeren Nukleotiden.<sup>3</sup> Es dauerte allerdings bis Ende der 80er Jahre, bis diese Strukturen auch in Oligonukleotiden nachgewiesen wurden.<sup>4,5</sup> Dies warf insbesondere die Frage nach der Existenz nicht-kanonischer Nukleinsäurestrukturen *in vivo* auf. Auch dieser Nachweis konnte in einigen Studien für verschiedene Organismen in den letzten Jahrzehnten erbracht werden.<sup>6-10</sup>



**Abbildung 1: Links: Nach WATSON und CRICK benannte Basenpaarung innerhalb der DNS-Doppelhelix. Adenin und Thymin mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen (oben), sowie Guanin und Cytosin mit drei Wasserstoffbrückenbindungen (unten). (R für Desoxyribose). Rechts: Native B-Helixform zweier komplementärer DNS-Stränge (Dodecamer, PDB-Code: 1BNA).<sup>2</sup>**

Die Funktionen, Sequenzen und Konformationen dieser nicht-kanonischen Nukleinsäurestrukturen sind zahlreich. Zu den bekannteren zählen die G-Quadruplex-Konformationen der Telomere und Promotorregionen vieler mehrzelliger Tiere sowie haarnadelförmige Motive (*Hairpins*), z. B. in den transfer-Ribonukleinsäuren (t-RNS).<sup>11-19</sup> Weniger erforscht ist z. B. die i-Motiv-Konformation, welche unter anderem ebenfalls in den menschlichen Telomeren und Promotorregionen vorkommt.<sup>8</sup>



## Einleitung

Dies hat zum einen die Pharmazie inspiriert, G-Quadruplexe, insbesondere in Promotorregionen von Onkogenen und Telomeren, als mögliche Wirkstoffziele für Eingriffe in die Genexpression zu nutzen,<sup>20,21</sup> zum anderen sind Erkenntnisse in diesem Bereich für die Erforschung der Anpassungsfähigkeit von Extremophilen von Bedeutung<sup>9,10</sup>. Beispielsweise ist bekannt, dass physikalischer und chemischer Stress die Genexpression auf zellulärer Ebene verändert.<sup>22</sup> Um auf diesen Feldern Erkenntnisse zu gewinnen, ist ein thermodynamisches Verständnis des Konformationsgleichgewichtes auf molekularer Ebene wichtig.

In diesem Zusammenhang spielen auch Wechselwirkungen der DNS mit Proteinen eine große Rolle. Ein Beispiel sind neurodegenerativen Krankheiten wie PARKINSON, ALZHEIMER und LEWY-Körper-Demenz. Diese werden häufig durch die Fehlfaltung und Assemblierung von Proteinen zu unlöslichen und durch die Zelle nicht abbaubaren Aggregaten verursacht.<sup>23</sup> Ausgelöst meist durch Genmutationen werden Proteine fehlerhaft posttranslational modifiziert oder in Peptide geschnitten. Die Produkte neigen anschließend zur Ausbildung intermolekularer  $\beta$ -Faltblätter. Diese stabilisieren in einer ersten Nukleationsphase kleinere Oligomere, welche durch vermehrte und beschleunigte Anlagerung von weiteren Proteinen zu unlöslichen Aggregaten wachsen.<sup>23</sup> In der Endphase dieses Prozesses lagern sich diese Aggregate häufig zu Fibrillen zusammen. Beispiele für Proteine, die diesen Verlauf nehmen können, sind unter anderem Tauproteine,  $\alpha$ -Synuclein und das *amyloid precursor protein*.<sup>23</sup> Im Falle des  $\alpha$ -Synucleins führt die Aggregation und Bildung von LEWY-Körperchen zu vielfältigen zellulären Veränderungen, insbesondere in Neuronen.<sup>24,25</sup> Nachgewiesen sind sowohl Veränderungen des Dopamin-Kreislaufs durch verringerte Vesikelbildung an den synaptischen Membranen, sowie veränderte Wechselwirkungen mit der DNS im Zellkern.<sup>26,27</sup> Es gibt Hinweise, dass monomeres  $\alpha$ -Synuclein an den Reparaturmechanismen der DNS beteiligt ist.<sup>28</sup> Bei einer Konzentrationsreduktion der Monomere durch Aggregation kann es so zu einer erhöhten Apoptoserate von Neuronen kommen.

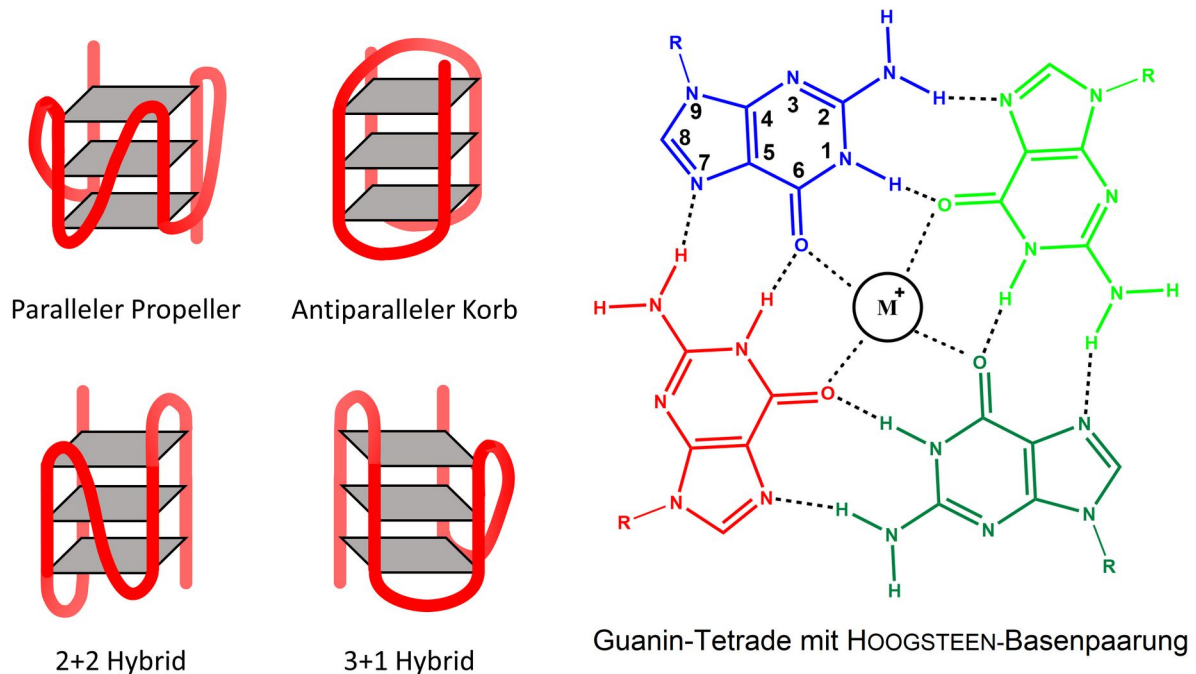
In dieser Arbeit wurde das Konformationsgleichgewicht von G-Quadruplexen, i-Motiven und *Hairpins* mithilfe der Einzelmolekül-FÖRSTER-Resonanzenergietransfer-Mikroskopie (smFRET-mic) sowie der Circular dichroismus-Spektroskopie untersucht. Zum einen wurden die Effekte von Osmolyten auf die Temperatur- und Druckstabilität einer telomerischen G-Quadruplex-Sequenz, zum anderen der konzentrationsabhängige Einfluss des kleinen, intrinsisch ungeordneten, Proteins  $\alpha$ -Synuclein in monomerer und aggregierter Form auf Vertreter der drei genannten nicht-kanonischen DNS-Strukturen (G-Quadruplex, i-Motiv und *Hairpin*) erforscht.

## Einleitung

# 2 Nicht-kanonische DNS-Strukturen – Aufbau, Konformation und biologische Relevanz

## 2.1 Nicht-kanonische DNS-Strukturen

Als G-Quadruplexe werden Strukturen bezeichnet, die durch mindestens zwei Guanin-Tetraden gekennzeichnet sind. Diese werden von jeweils vier Guaninen gebildet und durch HOOGSTEEEN-Basenpaarung in einer quadratisch planaren Anordnung stabilisiert (Abbildung 2 rechts).



**Abbildung 2:** Verschiedene schematisch dargestellte G-Quadruplex-Konformationen mit in grau dargestellten G-Tetraden und in rot dargestelltem Strangverlauf (links). HOOGSTEEEN-Basenpaarung einer Guanin-Tetrade mit koordiniertem zentralen Metallkation  $M^+$  (rechts).

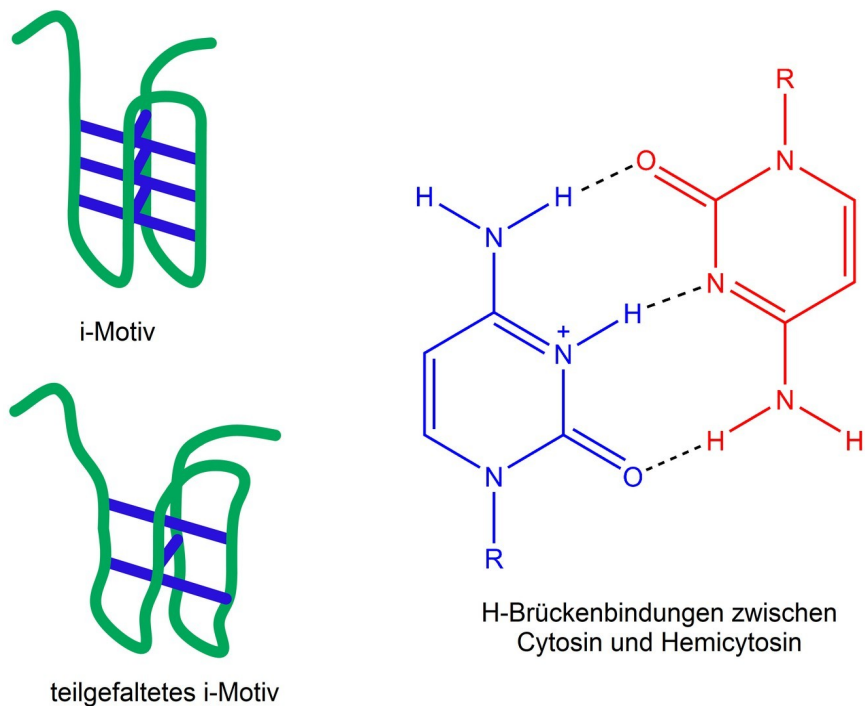
Weitere Beiträge, die diese Konformationen energetisch absenken, sind die Koordination von Kationen passender Größe ( $M^+$ ), meist Natrium- oder Kaliumkationen, durch die Sauerstoffatome am 6-Kohlenstoff der Guanine, sowie  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ( $\pi$ - $\pi$ -Stacking) der aromatischen Ringstrukturen.<sup>29,30</sup> Es sind eine Vielzahl von möglichen G-Quadruplex-Strukturen bekannt.<sup>13</sup> Diese mono- bis tetramolekularen Strukturen, mit jeweils unterschiedlich vielen Ebenen, werden weiter nach der Orientierung der beteiligten DNS-Stränge unterschieden.<sup>31</sup> Laufen diese in die gleiche

## Einleitung

Richtung, wird von einer parallelen Ausrichtung gesprochen, ist die Orientierung der aufeinander folgenden Stränge jeweils gegenläufig, ist der G-Quadruplex antiparallel. Strukturen mit einem 3:1 oder 2:2 Verhältnis der Richtungen werden meist als Hybridstrukturen bezeichnet (Abbildung 2 links). Verschiedene Studien haben bereits die Abhängigkeit der Stabilität der G-Quadruplexe von Temperatur, Druck, Sequenzlänge und Salzkonzentration gezeigt.<sup>14,16,32,33</sup> Hohe Temperatur und hoher Druck wirken destabilisierend auf G-Quadruplex-Strukturen, während eine hohe Na<sup>+</sup>- oder K<sup>+</sup>-Konzentration aufgrund der Ladungsabschirmung des negativ geladenen Phosphatrückgrats zu einer Stabilisierung führt. Auch die Untersuchung von DNS-Protein-Wechselwirkungen nimmt diese Struktur häufig in den Fokus.<sup>15,34</sup> So bindet beispielsweise das *protection of telomeres 1* (POT1)-Protein an die telomerische G-Quadruplex-Sequenz und verhindert so die Aktivierung von Doppelstrangbruchreparaturmechanismen an den Chromosomenenden.<sup>15</sup> In Anwesenheit von Na<sup>+</sup>-Ionen wurde mittels NMR für die Sequenz d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] eine antiparallele Korb-Struktur nachgewiesen, welche bei Verlängerung der Enden d[(TTAGGG)<sub>4</sub>TTA] im Gleichgewicht mit einer Hybridstruktur (2+2 Hybrid) vorliegt.<sup>35</sup> Dies wurde auch durch CD-Messungen bestätigt.<sup>35</sup> Die Kombination von smFRET-mic und CD-Spektroskopie zeigte wiederum, dass ein Doppelstrang am Ende des G-Quadruplex-bildenden Einzelstranges zu einem Gleichgewicht zwischen paralleler und antiparalleler Struktur führt.<sup>33</sup>

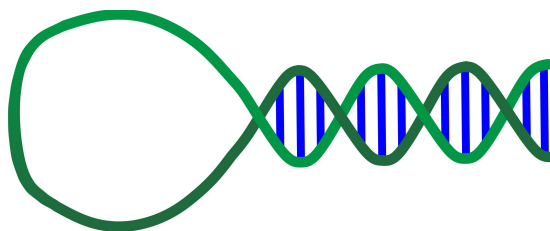
Cytosin-reiche DNS-Sequenzen neigen unter bestimmten Bedingungen zur Ausbildung von als i-Motiv bezeichneter Überstrukturen. Diese formieren sich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Cytosin und Hemicytosin (Abbildung 3), wodurch sich eine starke pH-Abhängigkeit der Stabilität ergibt.<sup>36,37</sup> Einen weiteren großen Einfluss auf die Stabilität hat der sogenannte makromolekulare *Crowding*-Effekt. Zur Ausbildung der i-Motiv-Konformation in verdünnten Puffersystemen ist in der Regel ein pH-Wert von ca. 5-6 nötig. In neutralen Lösungen führt ein starker *Crowding*-Effekt, z. B. ausgelöst durch 20 Gew.-% PEG (*in vitro*), ebenfalls zur Bildung einer kompakten i-Motiv-Konformation.<sup>38</sup> Auch Druck und Temperatur beeinflussen die Konformation Cytosin-reicher Sequenzen. So wurde die Entfaltungstemperatur einer i-Motiv-bildenden Sequenz bei pH = 6 in einer Studie von TAKAHASHI und SUGIMOTO durch erhöhten Druck, von ca. 40 °C (1 bar) auf ca. 60 °C (4000 bar), erhöht.<sup>39</sup> Darüber hinaus wurden in verschiedenen Studien auch teilgefaltete i-Motive (Abbildung 3 unten links) neben vollständig gefalteten und ungefalteten Konformationen beobachtet.<sup>37,40,41</sup>

## Einleitung



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung eines vollständig (links oben) und eines teilgefalteten (links unten) i-Motivs (H-Brücken in blau), sowie H-Brückenbindungen zwischen Cytosin (blau) und protoniertem Hemicytosin (rot) (rechts).

Bildet ein Oligonukleotid hingegen einen intramolekularen Doppelstrang aus, muss sich an einem Ende zwangsweise eine Schleifenregion befinden. Da dies insbesondere in schematischen Darstellungen haarnadelförmig erscheint, wird diese Struktur *Hairpin* genannt. Charakterisiert wird diese Struktur durch WATSON-CRICK-Basenpaare im Doppelstrangbereich und eine lose Schleifenregion am Ende (Abbildung 4). Die Stabilität dieses Motivs wird neben der Doppelstrangsequenz durch die Schleifengröße bestimmt. Darüber hinaus zeigen sich auch hier temperatur-, druck-, osmolyt- und salzkonzentrationsabhängige Stabilitätsänderungen.<sup>42,43</sup> So stabilisieren  $Mg^{2+}$ -Ionen, TMAO und Ficoll die geschlossene Konformation gegenüber dem entfaltenden Effekt hoher Drücke.<sup>42</sup>

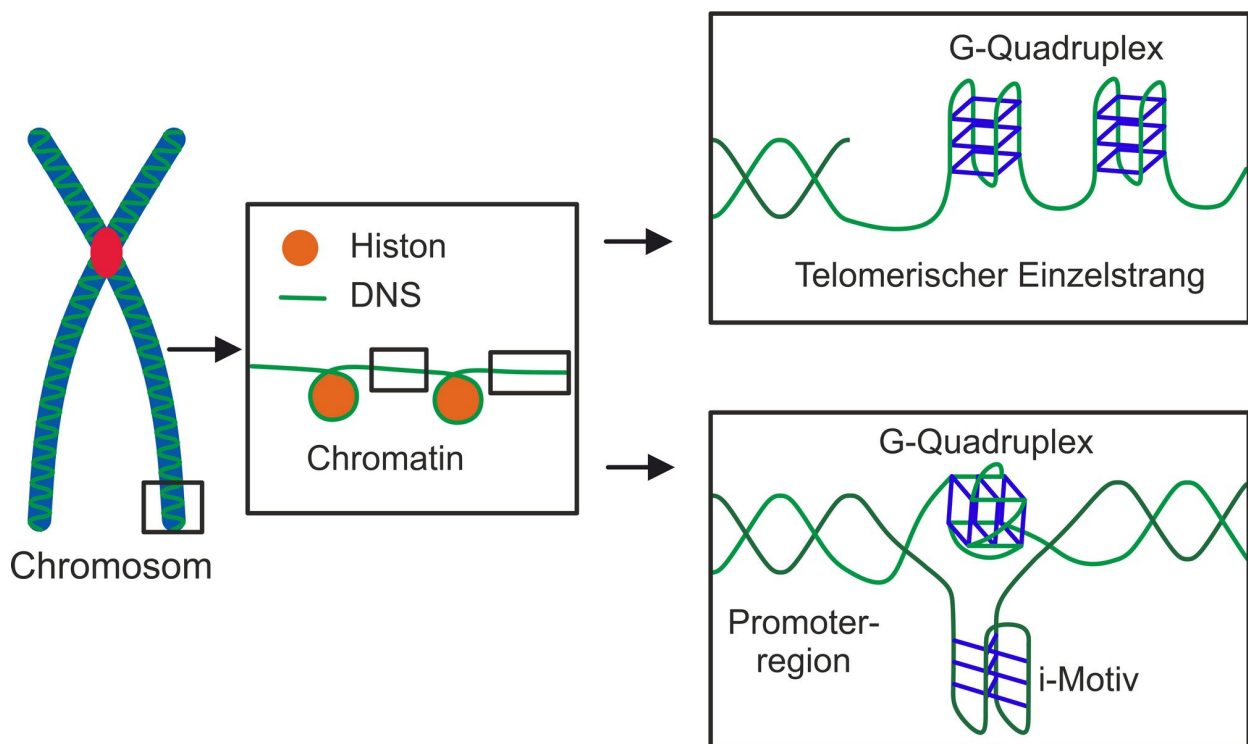


**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines DNS-Hairpins mit WATSON-CRICK-Basenpaarung in blau.

# Einleitung

## 2.2 Vorkommen und Funktion *in vivo*

DNS-Konformationen, die sich von den verschiedenen Doppelhelixstrukturen (A, B und Z) grundlegend unterscheiden, finden sich insbesondere in zwei verschiedenen Regionen des Erbgutes (Abbildung 5). Zum einen bestehen die Telomerregionen der Chromosomen aus einem Guaninreichen DNS-Strang, der insbesondere im überhängenden Einzelstrangbereich zur Ausbildung von G-Quadruplexen neigt, zum anderen befinden sich in den Promotorregionen bestimmter Gene ähnliche Sequenzen.<sup>6</sup> Ist ein Strang Guanin-reich und kann eine G-Quadruplex-Konformation ausbilden, ist der Komplementärstrang entsprechend Cytosin-reich und kann eine i-Motiv-Konformation einnehmen (Abbildung 5).<sup>8,44</sup>



**Abbildung 5: Schematische Darstellung von G-Quadruplexen und i- Motiven *in vivo*.**

In beiden Fällen ist die Bildung von G-Quadruplexen mit der Genregulation verknüpft. Im Fall der Telomere stabilisieren die G-Quadruplexe in Kombination mit DNS-bindenden Proteinen (Shelterin-Komplex) zum einen die Enden der Chromosomen, indem die Auslösung von Reparaturmechanismen für Doppelstrangbrüche verhindert wird, und regeln zum anderen die Aktivität der telomerverlängernden Telomerasen.<sup>15,45</sup> Der erste Prozess kann bei Dysfunktion zur Dislokation von chromosomaler DNS oder Chromosomenfusion führen, die Aktivierung des zweiten

## Einleitung

Prozesses ist wiederum eine der *Hallmarks* der Tumorgenese, da Tumorzellen die Teilungsbeschränkung durch Telomerverkürzung umgehen müssen.<sup>45</sup> Auf der anderen Seite steht die Telomerverkürzung auch im Zusammenhang mit der körperlichen Alterung von Tieren und Menschen, wobei die endgültige Entschlüsselung der Zusammenhänge bis heute ein großes Forschungsgebiet darstellt.<sup>46</sup> Bekannt ist beispielsweise, dass bereits eine Reduktion der Telomerasen durch Haploinsuffizienz zu schweren Krankheitsbildern wie Lungenfibrose, Blutarmut und Immunschwäche führt.<sup>46</sup>

Im Fall der G-Quadruplexe in Promoterregionen stellen diese häufig Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren dar oder interagieren direkt regulativ mit den RNS-Transkriptasen. Ein bekanntes Beispiel in diesem Zusammenhang ist die Promoterregion des (Proto-)Onkogens c-Myc. Hier sorgt die Bildung des G-Quadruplexes und anschließende Bindung durch Nucleolin für eine Deaktivierung des c-Myc Gens.<sup>47</sup> Wird der G-Quadruplex wiederum durch das Protein Nucleosiddiphosphatkinase B entfaltet, können weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden (*cellular nucleic acid-binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, TATA-binding protein*) und die Transkription einleiten.<sup>48</sup> Gegen eine Überexpression von c-Myc konnten bereits Medikamente und Kandidaten entwickelt werden, welche durch Bindung und Stabilisierung des G-Quadruplexes das Wachstum von Tumoren verringern.<sup>20,21</sup>

DNS-Haarnadelstrukturen werden *in vivo* hauptsächlich in A/T- oder G/C-reichen DNS-Abschnitten, sowie in Folge palindromischer Sequenzen gebildet.<sup>49,50</sup> Aufgrund der energetisch meist stabileren Doppelhelixstruktur spielen DNS-*Hairpins* eine entscheidene Rolle bei der Replikation und Transkription der DNS, da hier die DNS durch Helikasen in die Einzelstrangform überführt wird.<sup>49,50</sup> Auch wenn *single-strand binding proteins* (SSB) eine Ausbildung von Überstrukturen verhindern sollen, kann es zur Ausbildung von DNS-Haarnadelstrukturen kommen.<sup>49,50</sup> Diese stehen im Verdacht, zunächst einen Replikations- bzw. Transkriptionsstopp, gefolgt von einem Doppelstrangbruch auszulösen. Doppelstrangbrüche wiederum sind einer der Hauptursachen von chromosomaler Dislokation, Chromosomenfusion und anderen Genschäden.<sup>49,50</sup> Im Rahmen der Zelldifferenzierung sind diese Vorgänge teilweise *in vivo* auch funktional notwendig.<sup>49,50</sup>

### 3 Physikalische und zelluläre Variablen

#### 3.1 Druck und Temperatur

Die folgenden Abschnitte sind, falls nicht anders vermerkt, inhaltlich aus den Büchern „Basiswissen physikalische Chemie“<sup>51</sup> und „Methoden der Biophysikalischen Chemie“<sup>52</sup> entnommen.

Grundsätzlich sind freiwillig ablaufende Zustandsänderungen mit einer negativen Änderung der GIBBS-Energie  $\Delta G$  verknüpft. Die Zustandsänderung läuft entsprechend bis zur Erreichung des Gleichgewichts mit  $\Delta G = 0$  ab. Für ein reversibles Zweizustandsmodell mit dem Ausgangszustand A und dem Endzustand B einer Substanz gilt für die molare Standard-Reaktions-GIBBS-Energie  $\Delta G_m^\circ$ :

$$\Delta G_m^\circ = -RT \ln(K) = -RT \ln\left(\frac{[B]}{[A]}\right) \quad (1)$$

Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Gleichgewichtskonstante  $K$  der Quotient aus der Produktkonzentration  $[B]$  und der Eduktkonzentration  $[A]$ .  $T$  steht für die Kelvintemperatur und  $R$  für die universelle Gaskonstante mit  $8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ .

Aus der GIBBS-HELMHOLTZ-Gleichung ergibt sich der Zusammenhang von  $\Delta G_m^\circ$  mit der molaren Standard-Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_m^\circ$  und der molaren Standard-Umwandlungsentropie  $\Delta S_m^\circ$ :

$$\Delta G_m^\circ = \Delta H_m^\circ - T \cdot \Delta S_m^\circ \quad (2)$$

Im Gleichgewichtsfall mit  $\Delta G_m^\circ = 0$  ergibt sich für die molare Entropieänderung  $\Delta S_m^\circ$  bei der Umwandlungstemperatur  $T_u$ :

$$\Delta S_m^\circ = \frac{\Delta H_m^\circ}{T_u} \quad (3)$$

Das vollständige Differential für die Änderung der GIBBS-Energie  $\Delta G$  ergibt:

$$d\Delta G = \Delta V \cdot dp - \Delta S \cdot dT + \Delta \mu \cdot dn \quad (4)$$

Bei unveränderter Teilchenzahl  $n$  ist  $\mu \, dn = 0$ . Für isobare Bedingungen mit dem Druck  $p$  und der Volumendifferenz  $\Delta V$  ergibt sich aufgrund von  $\Delta V \, dp = 0$  aus Gleichung (3) und Gleichung (4):

## Physikalische und chemische Variablen

$$\left(\frac{\delta \ln(K)}{\delta T}\right)_p = \frac{\Delta H_m^0}{RT^2} \quad (5)$$

Zustandsänderungen eines Makromoleküls sind häufig durch ein kooperatives Verhalten der Monomereinheiten gekennzeichnet. Eine Änderung, wie das Bilden einer Wasserstoffbrückenbindung oder deren Auflösung, ist nicht unabhängig von der Bildung oder Auflösung weiterer Wasserstoffbrückenbindungen. Für diese Fälle gibt Gleichung (5) die VAN'T HOFF Enthalpie  $\Delta H_{\text{VH}}^0$  an. Diese ist nicht mehr auf die Monomereinheit, sondern auf die mittlere kooperative Länge  $N_0$  bezogen:

$$\left(\frac{\delta \ln(K)}{\delta T}\right)_p = \frac{\Delta H_{\text{VH}}^0}{RT^2} \quad \text{mit} \quad \Delta H_{\text{VH}}^0 = N_0 \cdot \Delta H_m^0 \quad (6)$$

$\Delta H_m^0$  kann durch kalorimetrische Messungen bestimmt werden.

Analog zu Gleichung (5) gilt für isotherme Bedingungen  $\Delta S \, dT = 0$  und damit:

$$\left(\frac{\delta \ln(K)}{\delta p}\right)_T = -\frac{\Delta V_m^0}{RT} \quad (7)$$

Aus der Steigung einer Auftragung von  $\ln(K)$  gegen  $p$  kann somit das molare Umwandlungsvolumen  $\Delta V_m^0$  berechnet werden.

Alternativ lässt sich  $\Delta V_m^0$  auch direkt aus sich ändernden Intensitäten  $I$ , die meist spektroskopisch gewonnen werden, mittels eines BOLTZMANN-Fit berechnen. Hierzu werden die Parameter  $\Delta V_m^0$ ,  $p_u$ ,  $I_A$  und  $I_B$  zur Konvergenz iteriert.  $I_A$  und  $I_B$  sind hierbei die Intensitäten im Ausgangs- und Endzustand.  $p_u$  ist der Umwandlungsdruck am Wendepunkt der sigmoidalen Funktion. Bedingung ist hierbei, dass die Anteile der Zustände näherungsweise proportional zur Intensität sind.<sup>53</sup>

$$I = \frac{I_A - I_B}{1 + e^{-(p - p_u) \cdot \Delta V_m^0 / (R \cdot T)}} + I_B \quad (8)$$

Auch für die VAN'T HOFF Enthalpie kann dieser Ansatz verwendet werden:

$$I = \frac{I_A - I_B}{1 + e^{-(T_u^{-1} - T^{-1}) \cdot \Delta H_{\text{VH}}^0 / R}} + I_B \quad (9)$$

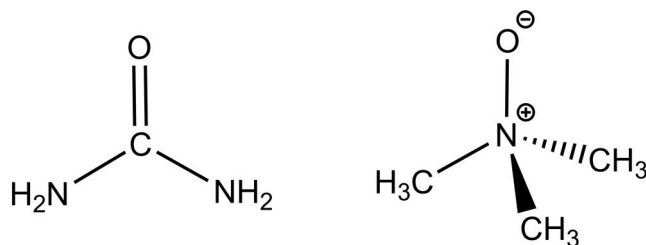


## Physikalische und chemische Variablen

Während die meisten mesophilen Organismen im milden Druckbereich um 1 bar und Temperaturen von ca. 4 °C bis 40 °C leben, haben sich im Laufe der Evolution viele extremophile Organismen an bestimmte Nischen, wie hohe Drücke von bis zu 1 kbar oder extreme Temperaturen von ca. -25 °C bis 120 °C, angepasst.<sup>54,55</sup> Ein wichtiger Punkt für das Verständnis der Überlebensfähigkeit unter solch harschen Bedingungen ist die Veränderung der Konformation der Biomakromoleküle. Für Proteine ist hier bereits sehr viel bekannt. Hoher Druck kann die Konformation zu *molten globe states* verschieben oder durch verringerte Flexibilität die Funktionalität von Enzymen beeinträchtigen.<sup>56</sup> Hohe und tiefe Temperaturen wiederum führen bei Proteinen zunächst zu einer Entfaltung, die häufig in eine Aggregation und damit in eine irreversible Denaturierung übergeht.<sup>57,58</sup> Nukleinsäuren, welche neben der Speicherung und Weitergabe der Erbinformation und dessen Regulation im Zellkern auch verschiedene Aufgaben in der Proteinbiosynthese übernehmen, werden ebenfalls durch diese Parameter beeinflusst. Während der Einfluss hoher Temperaturen ebenfalls denaturierend wirkt, gibt es größere Unterschiede bei den Effekten von Druck, abhängig von der Überstruktur der DNS. Die native B-Helix der DNS wird durch Drücke bis 2 kbar nur leicht deformiert.<sup>59</sup> Im Fall von Überstrukturen wie G-Quadruplexen oder *Hairpins* mit größerer Schleifenregion können hingegen schon bei niedrigeren Drücken entfaltete Konformationen begünstigt werden.<sup>60,61</sup>

### 3.2 Osmolyte und Crowder

Schon vor über 25 Jahren war bekannt, dass insbesondere Knorpelfische und Quastenflosser Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) und Harnstoff (Abbildung 6) im Verhältnis 1:2 als Osmolyte nutzen, um dem osmotischen Druck in der Tiefsee entgegenzuwirken.<sup>62</sup>

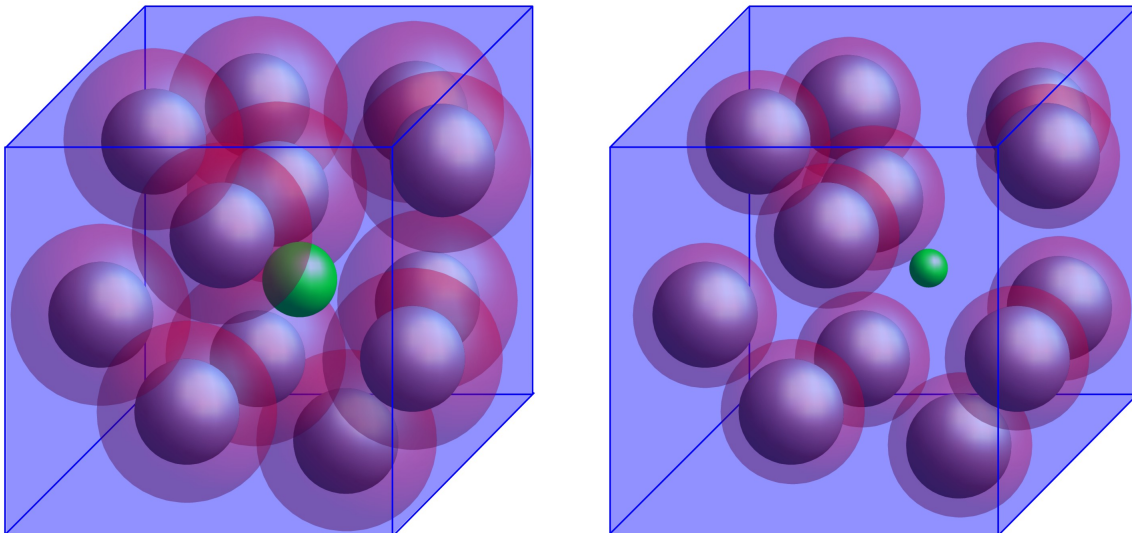


**Abbildung 6: Harnstoff (links) und Trimethylamin-*N*-oxid (rechts)**

Die höhere Konzentration an TMAO in Organismen, die größere Meerestiefen besiedeln, führte zu der Annahme, dass TMAO auch den ungünstigen Effekten hoher Drücke auf die Protein-3D-

## Physikalische und chemische Variablen

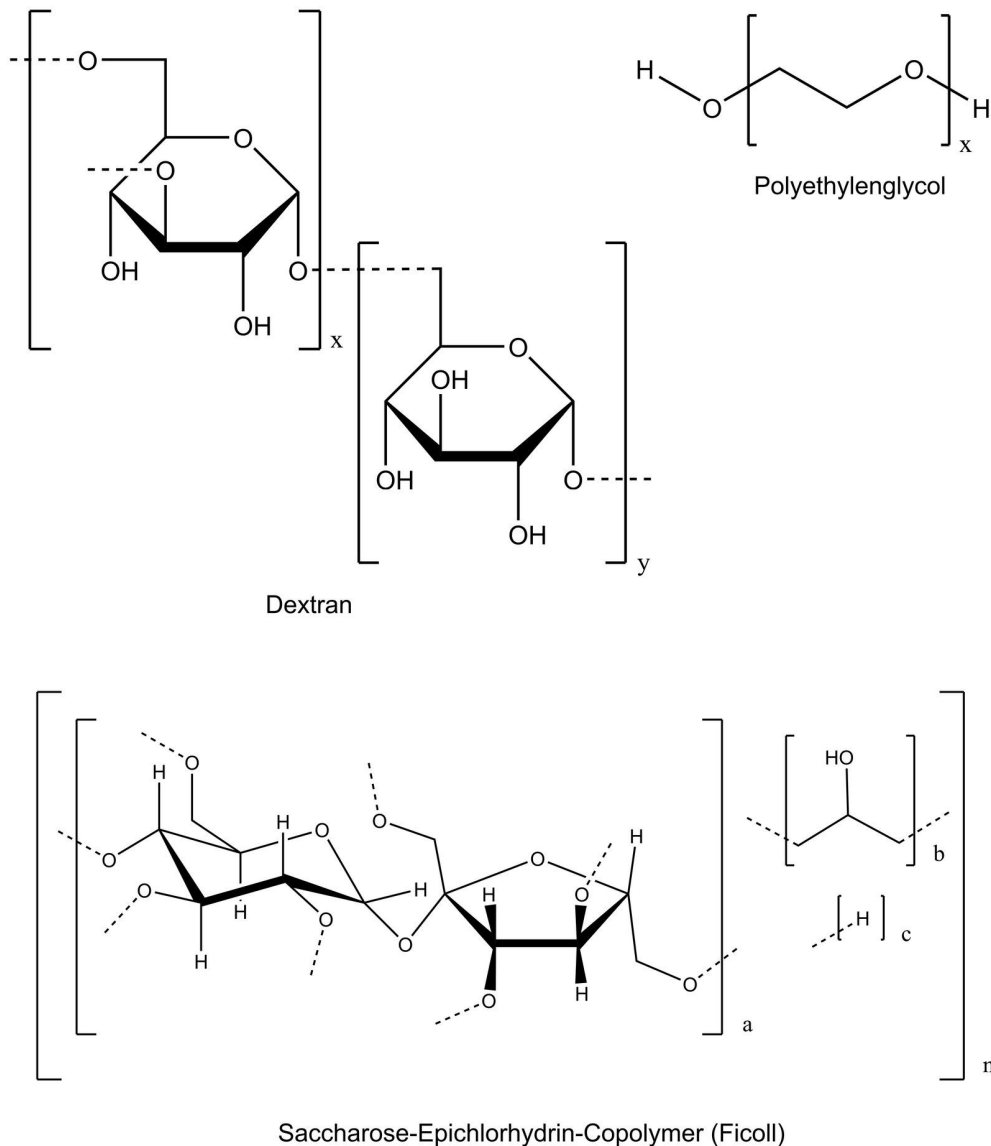
Struktur und die Bindungsaffinitäten von Liganden entgegenwirkt. Dies konnte von YANCEY *et al.* 2002 anhand von Experimenten mit verschiedenen Proteinen *in vitro* aber auch mit unter Druck kultivierter Hefe *in vivo* nachgewiesen werden.<sup>63</sup> Die Mechanismen der Wirkungsweise von TMAO und Harnstoff auf Proteine wurden durch zahlreiche experimentelle Studien und Computersimulationen untersucht.<sup>64</sup> Weitestgehend durchgesetzt hat sich bezüglich der entfaltenden Wirkung des Harnstoffs die Theorie, dass Harnstoff sich aufgrund energetisch günstiger Wechselwirkungen mit dem Proteinerückgrat und bestimmten Seitenketten an die Proteinoberfläche anlagert und so eine oberflächenvergrößernde Entfaltung begünstigt.<sup>64</sup> Für die stabilisierende Wirkung des TMAO wird angenommen, dass es sich um einen indirekten Effekt handelt. Aufgrund der energetisch ungünstigen Wechselwirkungen zwischen TMAO und dem Proteinerückgrat wird die Kontaktvermeidung begünstigt. Diese ist für kompakte gefaltete Proteinstrukturen mit einer kleinen lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (*solvent-accessible surface area, SASA*) gewährleistet.<sup>64</sup> Ein weiterer Mechanismus führt zum *Crowding*-Effekt. Hierbei kommt zum Tragen, dass der Mindestabstand der Mittelpunkte von Molekülen nach dem Modell harter Sphären mindestens die Summe der Radien betragen muss. Damit ist das verfügbare Volumen an dem sich der Mittelpunkt und damit das Molekül selbst aufhalten kann, umso kleiner, je größer die Anzahl und Größe anderer Moleküle, sowie die eigene Größe ist (Abbildung 7).



**Abbildung 7: 3D-Schema des makromolekularen *Crowding*-Effekts. In transparentem rot ist das Ausschlussvolumen dargestellt. Dieses ist für den Mittelpunkt des grünen Moleküls nicht erreichbar.**

## Physikalische und chemische Variablen

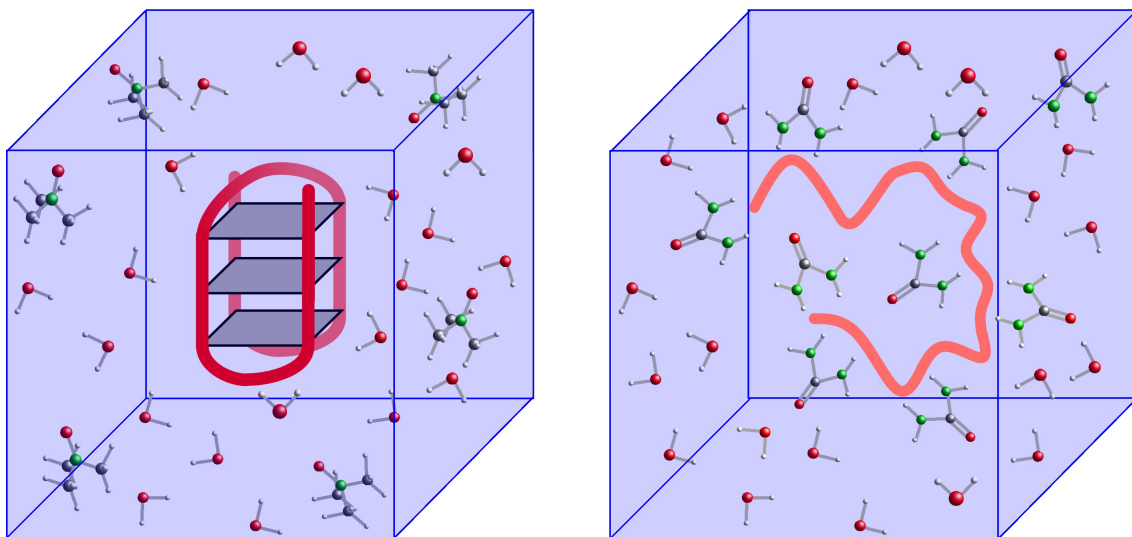
Dieser *Crowding*-Effekt spielt sowohl eine zusätzliche Rolle bei kleinen Molekülen wie TMAO (welches daher auch als *Microcrowder* bezeichnet wird), als auch für weitestgehend inerte gelöste Makromoleküle wie Polyethylenglykol (PEG), Dextran oder Ficoll (Abbildung 8) (makromolekularer *Crowding*-Effekt).



**Abbildung 8: Verschiedene makromolekulare Crowder.** Dextran besteht aus  $\alpha$ -1,6 verknüpften D-Glukoseeinheiten, welche teilweise durch  $\alpha$ -1,3-Bindungen quervernetzt sind. PEG besteht aus linear verknüpften Ethylenglycoleinheiten. Ficoll ist ein quervernetztes Saccharose (a)-Epichlorhydrin (b)-Copolymer.  $x$ ,  $y$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  und  $n$  geben jeweils die Wiederholungsanzahl an.

## Physikalische und chemische Variablen

Diese Makromoleküle werden häufig zur Nachahmung der durch hohe Proteinkonzentrationen (30 - 40 Gew.-% bzw. 20 - 30 Vol.-% Makromoleküle)<sup>65,66</sup> eingeschränkten Bewegungsfreiheitsgrade innerhalb des Cytosols verwendet. Die Auswirkungen von TMAO, Harnstoff und makromolekularem *Crowding* auf andere Biomakromoleküle, wie z. B. Nukleinsäuren, ist weit weniger etabliert. Für die obigen nicht kanonischen-DNS Strukturen liegen hier bisher nur wenige Informationen vor. Für Harnstoff ist beispielsweise bekannt, dass entsprechend hohe Konzentrationen zur Entfaltung des telomerischen G-Quadruplex-Struktur führen.<sup>67</sup> Theoretische Studien legen einen ähnlichen Mechanismus durch direkte Wechselwirkungen zwischen Harnstoff und Nukleobasen bzw. Phosphatrückgrat ähnlich wie bei Proteinen nahe.<sup>68</sup> TMAO stabilisierte gefaltete Nukleinsäurestrukturen in verschiedenen Studien.<sup>69-71</sup> Erklärt wird dies ebenfalls analog zur Wirkung auf Proteine mit ungünstigen Wechselwirkungen zwischen dem Phosphatrückgrat der Nukleinsäuren und TMAO. Beide Mechanismen sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von TMAO und Harnstoff. Während TMAO von der Oberfläche ausgeschlossen ist (*excluded volume effect* bzw. *preferential hydration*) und so kompakte Strukturen wie G-Quadruplexe begünstigt, lagert sich Harnstoff an der Oberfläche an und sorgt so für die enthalpische Absenkung der EntfaltungsgIBBS-Energie. Dies führt bei hohen Konzentrationen zur Entfaltung des Biomoleküls. Rote Linie: Guanin-reiches Oligonukleotid, TMAO, Harnstoff und Wasser als Kugelstruktur.**

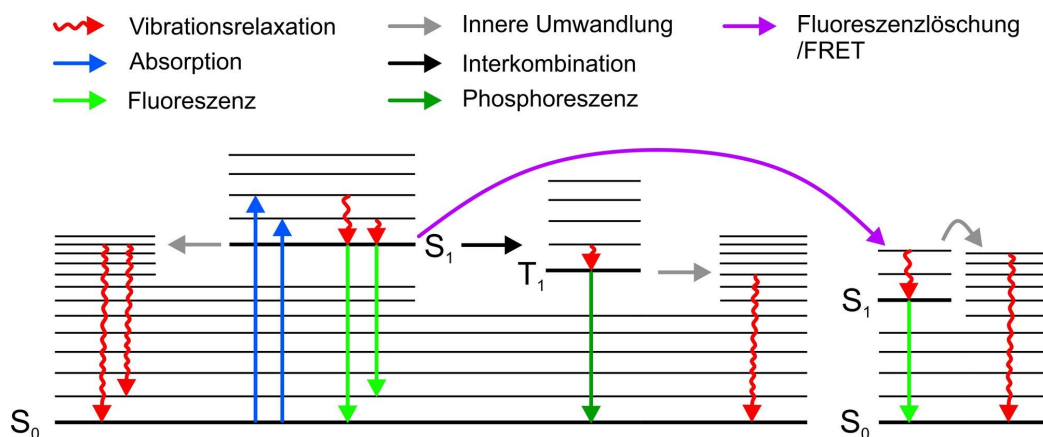
# 4 Verwendete Methoden und Geräte

## 4.1 Einzelmolekül-Fluoreszenz Methoden

Die folgenden Abschnitte sind, falls nicht anders vermerkt, inhaltlich aus den Büchern „Methoden der Biophysikalischen Chemie“<sup>52</sup> und „Single-Molecule Detection in Solution“<sup>72</sup> entnommen.

### 4.1.1 Fluoreszenz

Wird ein Molekül durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand überführt, gibt es verschiedene Möglichkeiten der Relaxation. Eine Möglichkeit ist die Emission von Strahlung (Fluoreszenz). Die Wellenlänge der Emissionsstrahlung ist in der Regel im Vergleich zur absorbierten Strahlung rotverschoben (STOKES-Verschiebung), da höhere Schwingungszustände  $v_n$  des angeregten  $S_1$ -Zustandes zunächst durch Vibrationsrelaxation in den Schwingungsgrundzustand  $v_0$  des  $S_1$ -Zustandes relaxieren. Darüber hinaus können durch Fluoreszenz auch höhere Schwingungszustände des elektronischen Grundzustandes  $S_0$  besetzt werden. Dieser Prozess steht in Konkurrenz zu anderen Relaxationsprozessen eines Fluorophors. Diese umfassen Vibrationsrelaxation, Interkombination in den Tripletzustand mit anschließender Phosphoreszenz oder auch Fluoreszenzlöschung durch andere Moleküle (Abbildung 10).



**Abbildung 10: JABLONSKI-Schema der Anregung und Relaxation eines Fluorophors.** Durch Absorption (blau) wird ein Molekül hier vom Grundzustand  $S_0$  in einen Schwingungszustand  $v$  des elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$  angeregt. Zunächst relaxiert das System in den untersten Schwingungszustand  $v_0$  des angeregten Zustandes  $S_1$ . Anschließend sind verschiedene Relaxationwege wie Fluoreszenz, Vibrationsrelaxation nach innerer Umwandlung (*internal conversion*) oder Phosphoreszenz nach Interkombination (*intersystem crossing*) in den Tripletzustand möglich.

## Verwendete Methoden und Geräte

Um den Anteil der Fluoreszenz im Vergleich zu anderen Prozessen anzugeben, wird die Quantenausbeute  $\phi$  als Quotient der emittierten Photonen  $I_F$  und der absorbierten Photonen  $I_A$  definiert. Jeder der verschiedenen Prozesse hat eine eigene Geschwindigkeitskonstante  $k_x$  deren Verhältnisse die Wahrscheinlichkeiten der Prozesse als Relaxationsweg entsprechen. Ist  $k_F$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und werden alle nicht Fluoreszenzprozesse in der Geschwindigkeitskonstante  $k$  zusammengefasst, ergibt sich für die Quantenausbeute  $\phi$ :

$$\phi = \frac{I_F}{I_A} = \frac{k_F}{k + k_F} \quad (10)$$

Werden nach einem Anregungspuls, welcher  $N_0^*$  Teilchen anregt, keine weiteren Moleküle angeregt, so sinkt die Anzahl der angeregten Moleküle exponentiell mit der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_F$ :

$$N^*(t) = N_0^* \cdot e^{-(k_F+k)t} = N_0^* \cdot e^{-\frac{t}{\tau_F}} \quad (11)$$

Die Fluoreszenzintensität ist in diesem Fall proportional zur Anzahl der angeregten Fluorophore.

$$I_F(t) = k_F \cdot N^*(t) = k_F \cdot N_0^* \cdot e^{-\frac{t}{\tau_F}} \quad (12)$$

### 4.1.2 FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET)

Der FÖRSTER-Resonanzenergietransfer zeichnet sich durch einen strahlungslosen Energieübertrag von einem angeregten Molekül auf ein Molekül im Grundzustand aus. Es handelt sich hierbei um eine elektrische Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Wird ein Molekül durch Absorption eines Photons angeregt, bildet sich ein Übergangsdipolmoment aus, welches andere nahe Moleküle beeinflussen kann. Liegt der angeregte Zustand energetisch im Bereich des angeregten Zustands eines zweiten Moleküls und ist der räumliche Abstand klein genug, kann die Energie übertragen werden.

Es ergeben sich somit drei wesentliche Abhängigkeiten des FÖRSTER-Resonanzenergietransfers. Eine Abhängigkeit vom Abstand  $R$ , von der Orientierung der Dipolmomente der Fluorophore, sowie von der spektralen Überlappung  $J$  (Abbildung 11).

Für die Geschwindigkeitskonstante des Energieübertrags  $k_{\text{FRET}}$  gelten folgende proportionale Abhängigkeiten:

$$k_{\text{FRET}} = \text{konst.} \cdot \frac{\kappa^2 J \phi_D}{n_L^4 R^6 \tau_D} \quad (13)$$

## Verwendete Methoden und Geräte

Der Orientierungsfaktor  $\kappa$  entspricht hierbei dem Winkelanteil des Skalarproduktes der Dipole

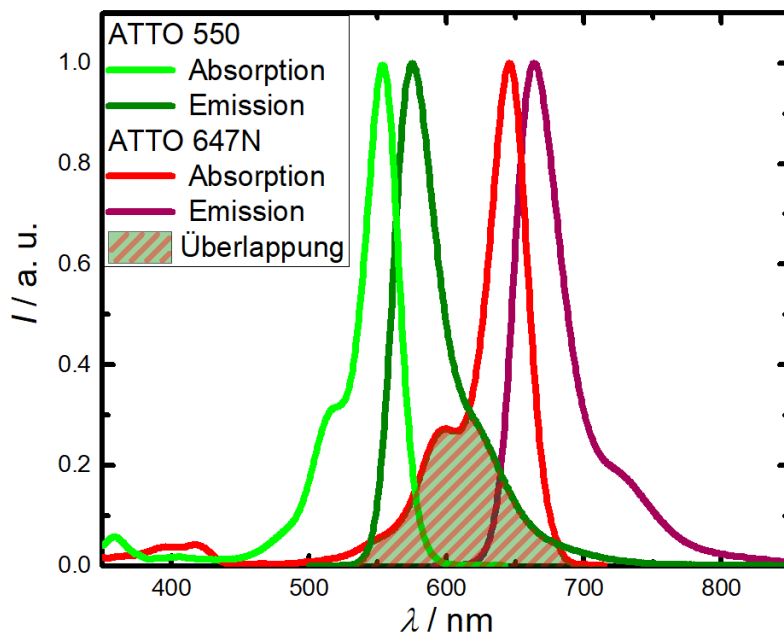
$$\cos(\varphi_{DA}) - 3 \cdot \cos(\varphi_{DR}) \cdot \cos(\varphi_{AR}) = \kappa \quad (14)$$

und das Überlappungsintegral  $J$  ergibt sich aus Gleichung (15).  $\varphi_{DA}$ ,  $\varphi_{DR}$  und  $\varphi_{AR}$  sind jeweils die Winkel zwischen dem Dipolmoment des Donors D und des Akzeptors A bzw. des Abstandsvektors R.  $\phi_D$  ist die Quantenausbeute und  $\tau_D$  die Fluoreszenzlebenszeit des Donorfluorophors ohne Akzeptormolekül.  $n_L$  ist der Brechungsindex des umgebenden Lösungsmittels. Unter der Annahme von Rotationsfreiheit der Fluorophore in Lösung ist  $\kappa^2 = \frac{2}{3}$ .

$$J = \int f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (15)$$

$f_D(\lambda)$  ist die normierte Fluoreszenzintensität des Donors und  $\varepsilon_A(\lambda)$  ist der Extinktionskoeffizient des Akzeptors, jeweils in Abhängigkeit der Wellenlänge  $\lambda$ .

Abbildung 11 zeigt dies am Beispiel des häufig genutzten FRET-Paars ATTO 550 und ATTO 647N.<sup>73,74</sup>



**Abbildung 11: Absorptions- und Emissionsspektrum von ATTO 550 und ATTO 647N mit gekennzeichneter Überlappung. Die geplotteten Werte stammen aus den Supportdaten von ATTO-TEC.<sup>73,74</sup>**

## Verwendete Methoden und Geräte

Die Effizienz dieses Energieübertrages wird bei zwei Fluorophoren als FRET-Effizienz  $E$  bezeichnet und ergibt sich aus der Anzahl der Akzeptorfluoreszenzphotonen  $F_{A,FRET}$  geteilt durch die Summe der Akzeptor- und Donorfluoreszenzphotonen  $F_D$ :

$$E = \frac{F_{A,FRET}}{F_{A,FRET} + F_D} \quad (16)$$

Die entsprechende Abstandsabhängigkeit von  $E$  ist über den FÖRSTERRadius  $R_0$  definiert, welcher den Abstand der Fluorophore bei einer FRET-Effizienz von 50 % angibt.

$$E = \left[ 1 + \left( \frac{R_{DA}^6}{R_0^6} \right) \right]^{-1} \quad (17)$$

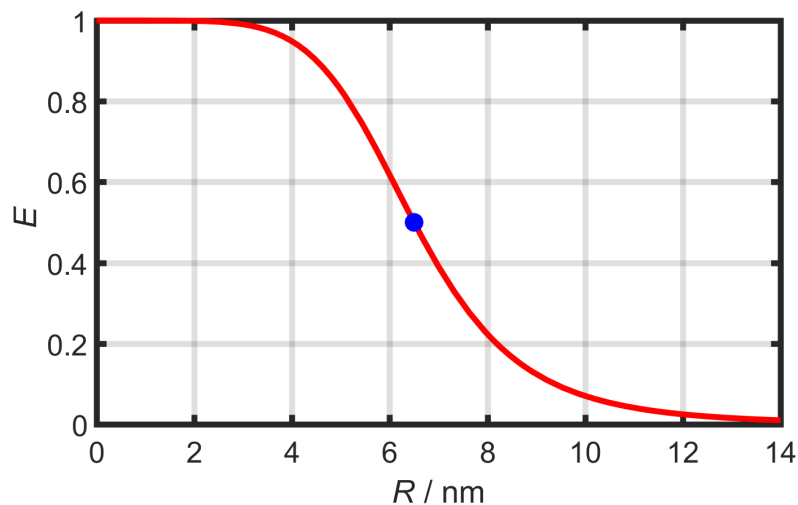
Die Reichweite dieser Wechselwirkung reicht bis ca. 10 nm. Bei Abständen kleiner 2-4 nm erreicht  $E$  ein maximales Plateau. Daher liegen die meisten FÖRSTER-Radien zwischen 4 und 8 nm.<sup>75</sup> Eine Unterscheidung der Abstände ist in der Regel zwischen 4 und 10 nm gut möglich. Abbildung 12 zeigt die Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz für ATTO 550 und ATTO 647N mit einem FÖRSTER-Radius von 6.5 nm.<sup>75</sup>

Allerdings ergeben sich durch unterschiedliche Fluoreszenzausbeuten der Einzelfluorophore  $\phi_{D/A}$  eines FRET-Paares, sowie durch die Wellenlängenabhängigkeit der Sensitivität der *single photon avalanche diodes* (SPAD)  $\alpha_{A/D}^\lambda$  Verzerrungen. Aus diesem Grund wird Gleichung (16) durch den Korrekturfaktor  $\gamma$  erweitert (Gleichung (18)).<sup>76</sup>

$$\frac{F_{A,FRET}}{F_{A,FRET} + \gamma \cdot F_D} \quad \text{mit} \quad \gamma = \frac{\alpha_A^\lambda \cdot \phi_A}{\alpha_D^\lambda \cdot \phi_D} \quad (18)$$



## Verwendete Methoden und Geräte

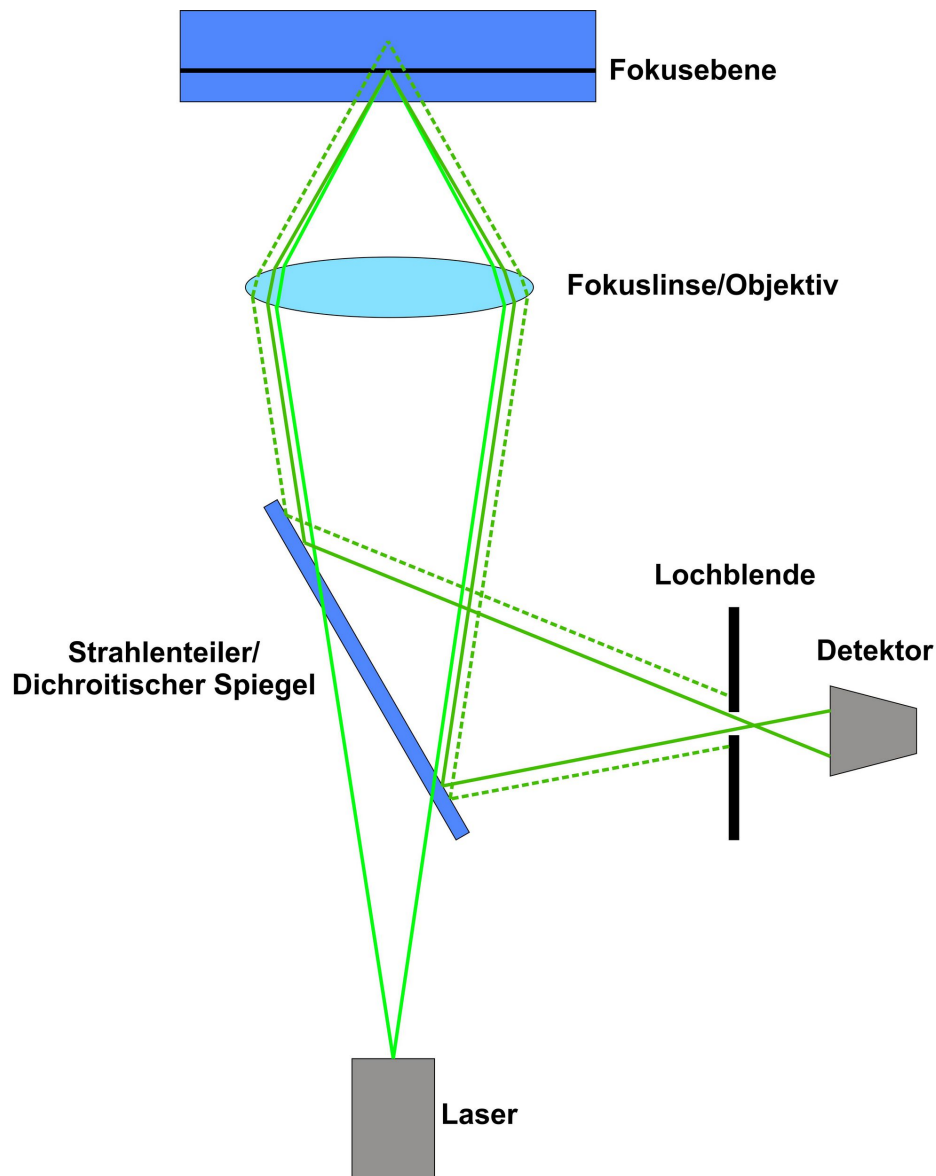


**Abbildung 12: Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz  $E$  mit  $R_0 = 6.5$  nm (blauer Punkt). Dies entspricht dem Försterradius von ATTO 550 und ATTO 647N.<sup>75</sup>**

### 4.1.3 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

In der Fluoreszenzmikroskopie werden mit Fluorophoren markierte Proben mit Licht (häufig mithilfe von Lasern erzeugt) angeregt und das Fluoreszenzlicht mittels Kamera oder Detektor aufgenommen. Grundsätzlich kann zwischen bildgebenden Verfahren und korrelativen Verfahren unterschieden werden. Bei ersteren ist die Bestimmung von Strukturen das Hauptziel, während bei korrelativen Verfahren molekulare Eigenschaften, wie der hydrodynamische Radius, die Konformation oder intermolekulare Wechselwirkungen im Vordergrund stehen. Für beide Verfahren spielt die konfokale Mikroskopie eine entscheidende Rolle. Durch eine Lochblende im Strahlengang des Fluoreszenzlichts kann verhindert werden, dass Licht von außerhalb des kleinen konfokalen Volumens zum Detektor gelangt. Bei bildgebenden Verfahren kann so durch Abrastern der Probe störendes Hintergrundlicht vermieden werden, während bei korrelativen Verfahren durch entsprechend geringe Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit, mehr als ein Molekül gleichzeitig im konfokalen Volumen vorzufinden, klein gehalten werden kann. Gängige Parameter sind hier z. B. 1 fL konfokales Volumen  $V_k$  bei einer Konzentration von 50 pM, wodurch die Wahrscheinlichkeit, mehr als ein Molekül im konfokalen Volumen anzutreffen, gering ist.<sup>72</sup>

## Verwendete Methoden und Geräte



**Abbildung 13: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops. Das Laserlicht passiert den Strahlenteiler, regt die fluoreszenzmarkierte Probe in und um die Fokusebene an. Das rotverschobene Fluoreszenzlicht wird vom Strahlenteiler reflektiert. Nicht aus der Fokusebene stammendes Licht wird durch die Lochblende vor dem Detektor gestoppt.**

Eine wichtige Methode ist die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS). Diese Methode macht sich zunutze, dass das Fluoreszenzsignal eines konfokalen Mikroskop bei geringen Konzentrationen stark fluktuiert. Dies wird zur Erzeugung von Auto- bzw. Kreuzkorrelation von Fluoreszenzsignalen ausgenutzt. Aus den Autokorrelationsfunktionen können verschiedene Daten berechnet werden, wie

## Verwendete Methoden und Geräte

der Diffusionskoeffizient der markierten Spezies und dessen Konzentration. Für den Fall nur einer Fluorophorspezies ergibt sich für die Autokorrelationsfunktion aus der gemessenen Intensität  $I(t)$ :<sup>72</sup>

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (19)$$

$G(\tau)$  gibt hierbei die Korrelation in Abhängigkeit des Zeitversatzes  $\tau$  an,  $I(t)$  die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$ .

Für freie Diffusion im dreidimensionalen Raum hängt die Autokorrelation wie folgt von der durchschnittlichen Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  im Fokus und dem Diffusionskoeffizienten  $D$  ab:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega^2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}} + 1 \quad (20)$$

Das konfokale Volumen  $V_k$  ergibt sich aus dem lateralen Radius  $\omega$  und dem Radius  $z_0$  des konfokalen Volumens entlang der optischen Achse:

$$V_k = \pi^{\frac{3}{2}} \omega^2 z_0 \quad (21)$$

Die FCS kann somit zur Konzentrationsbestimmung der Fluorophore genutzt werden, indem das Modell aus Gleichung (20) an die aus den Intensitäten erstellten Autokorrelationsdaten gefittet wird.

Die durchschnittliche molare Konzentration  $\langle c \rangle$

$$\langle c \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V_k \cdot N_A} \quad (22)$$

ergibt sich entsprechend Gleichung (22) aus der durchschnittlichen Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  im Fokus und dem konfokalen Volumen  $V_k$ , sowie der AVOGADRO-Konstante  $N_A$ .

Da viele Fluorophore auch einen Triplett-Zustand einnehmen können, welcher über eine längere Lebenszeit  $\tau_T$  per Phosphoreszenz relaxiert, muss dies bei Einsatz entsprechender Fluorophore im Modell berücksichtigt werden:

$$G(\tau) = \left[ 1 - Z + Z \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} \right] \frac{1}{\langle N \rangle} \left( 1 + \frac{4D\tau}{\omega^2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}} + 1 \quad (23)$$

## Verwendete Methoden und Geräte

Z gibt hier den Anteil der Moleküle im Tripletzustand an. Lebenszeiten von Tripletzuständen  $\tau_T$  bewegen sich typischerweise im Bereich von  $\mu\text{s}$  bis  $\text{ms}$ .

### 4.1.4 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie (smFRET-mic)

Die Erzeugung von smFRET-Daten mittels *time correlated single photon counting* (TCSPC) verläuft wie folgt: Der Puls des Anregungslasers startet gleichzeitig eine Zeitmessung. Wird durch den Laserpuls ein Fluorophor angeregt und findet die Relaxation durch Fluoreszenz statt, stoppt die Detektion des Photons die Zeitmessung. Die Lebensdauer von Fluorophoren liegt in der Regel im ns-Bereich. Diese Zeit wird zusammen mit der globalen Zeit der Messung sowie etwaigen Kanalinformationen (Nummer des Anregungslaser und Detektorkanal) als Datenpunkt abgespeichert. Um aus diesen Datenpunkten FRET-Histogramme zu erzeugen, werden die Detektionen der Photonen in Zeitfenster (*binning time*) ähnlich der Verweildauer des zu untersuchenden Moleküls im konfokalen Volumen (üblicherweise 1 ms) eingeteilt und addiert. Übersteigen die gezählten Photonen innerhalb eines Zeitfensters einen bestimmten Schwellenwert (üblicherweise 20-30 Photonen), wird dies als Event gezählt. Abbildung 14 zeigt beispielhaft die Anzahl der Fluoreszenzphotonen pro Event mit einer *binning time* von 1 ms gegen die Messzeit aufgetragen. (Das zugehörige Histogramm befindet sich in Abbildung 33(b).)

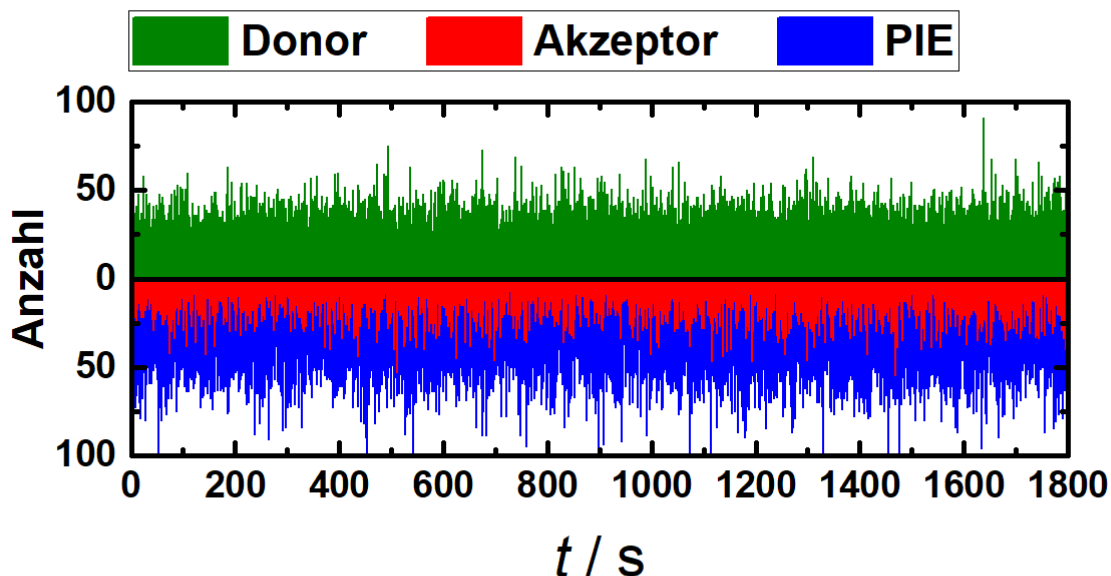
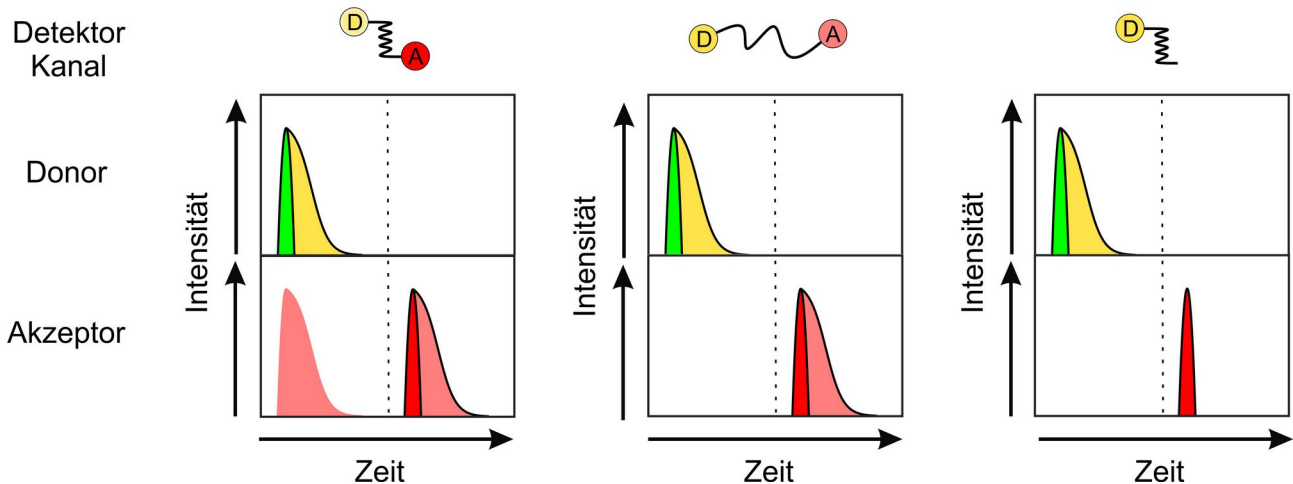


Abbildung 14: Anzahl der Fluoreszenzphotonen des i-Motivs (ca. 50 pM) in 20 mM TrisHCl bei pH 7.5, 15 mM NaCl bei einer *binning time* von 1 ms.

## Verwendete Methoden und Geräte

Für jedes Event kann nun aufgrund der Kanalinformationen nach Gleichung (18) bei bekanntem  $\gamma$  die FRET-Effizienz berechnet werden. Zur Darstellung in Histogrammen werden die Events wiederum in FRET-Effizienzintervallen zusammengefasst.



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der *pulsed interleaved excitation* (PIE) zum Ausschluss von Fluoreszenzsignalen, welche nicht auf doppelt gelabelten Molekülen basieren. D = Donorfluorophor, A = Akzeptorfluorophor. Im ersten und zweiten Fall (links und mittig) ergibt sich im Idealfall (gleiche Quantenausbeute, Detektorsensitivität) eine Photonenstochiometrie von 0.5. Der zu diskriminierende Fall rechts ergäbe eine Photonenstochiometrie von 1.

Da sowohl die Reaktionen für das Labeling als auch die Hybridisierung der einzeln gelabelten DNS-Stränge nie 100 % erreichen kann, tragen DNS-Stränge, welche nur Donorfluorophor zeigen, unabhängig von der Konformation oder dem Hybridisierungsstatus immer zum Signal mit niedriger FRET-Effizienz bei. Auch Triplett- und Dunkelzustände des Akzeptors würden hier die Ergebnisse verzerren. Um dies zu kompensieren, wird die *pulsed interleaved excitation* (PIE)-Methode verwendet. Hierbei wird abwechselnd der Donor- und der Akzeptorfluorophor mittels entsprechendem Laser angeregt. Ist der Akzeptorfluorophor nicht vorhanden, ergibt sich im zweiten Zeitfenster kein Fluoreszenzsignal und der Messpunkt kann aussortiert werden. Quantitativ wird hierzu die Photonenstochiometrie  $S_{\text{EFF}}$  genutzt:

$$S_{\text{EFF}} = \frac{n_{\text{A,FRET}} + n_{\text{D}}}{n_{\text{A,FRET}} + n_{\text{D}} + n_{\text{A,direkt}}} \quad (24)$$

In Gleichung (24) steht  $n_{\text{D}}$  für die Anzahl der Donorfluoreszenzphotonen und  $n_{\text{A,FRET}}$  für die durch FRET ausgelösten Akzeptorfluoreszenzphotonen.  $n_{\text{A,direkt}}$  gibt die Anzahl der durch direkte Anregung im zweiten Zeitkanal entstehenden Akzeptorfluoreszenzphotonen an. Events mit  $S_{\text{EFF}} > 0.8$  werden

## Verwendete Methoden und Geräte

von der Auswertung ausgeschlossen. Der umgekehrte Fall eines Moleküls, welches nur den Akzeptorfluorophor trägt, stellt wiederum kein Problem dar, da hier der Schwellenwert bei Anregung mit der Wellenlänge für den Donorfluorophor im ersten Zeitfenster nicht erreicht wird.

Der verwendete Aufbau ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt. Die smFRET-Messungen wurden mit einem konfokalen inversen Mikroskop unter Verwendung eines 60x Wasserimmersionsobjektiv (Olympus) in Kombination mit Optik, Elektronik und Lasern (Microtime 200, Pico Quant) durchgeführt. Die verwendeten Laser haben eine Wellenlänge von 560 nm (LDH series, Pico Quant) sowie 635 nm (LDH series, Pico Quant). Das Laserlicht wird mithilfe eines Lichtleiters in die Optikeinheit geleitet. Hier wird das Licht zunächst durch einen dichroitischen Vierbandspiegel (ZT 405/488/561/640, Chroma) in das Mikroskop reflektiert. Von einer Probe abgegebenes Fluoreszenzlicht mit entsprechend rotverschobener Wellenlänge passiert zunächst den genannten dichroitischen Vierbandspiegel, anschließend einen 575 nm *Longpassfilter* (HQ 575 LP, Chroma) und wird anschließend durch einen weiteren dichroitischen Spiegel (FF 650 Di01, Semrock) auf die verschiedenen Kanäle aufgeteilt. Die Wellenlänge des Lichts wird vor den Einzelphoton-Lawinendioden (SPAD) durch Filter (FF 01-593/40 und FF 01-676/29, Semrock) auf den entsprechenden Wellenlängenbereich begrenzt, um den *Crosstalk* zu minimieren. Die Größen zur Berechnung von  $\gamma$  wurde aus den verfügbaren Datenblättern der Hersteller (ATTO-TEC, Perkin Elmer) entnommen:<sup>73,74,77</sup>

$$\alpha_A^{664\text{ nm}} = 0.63; \quad \phi_A = 0.65$$

$$\alpha_D^{575\text{ nm}} = 0.58; \quad \phi_D = 0.8$$

Die Anwendung von Gleichung (18) ergibt  $\gamma = 0.88$ .

## Verwendete Methoden und Geräte

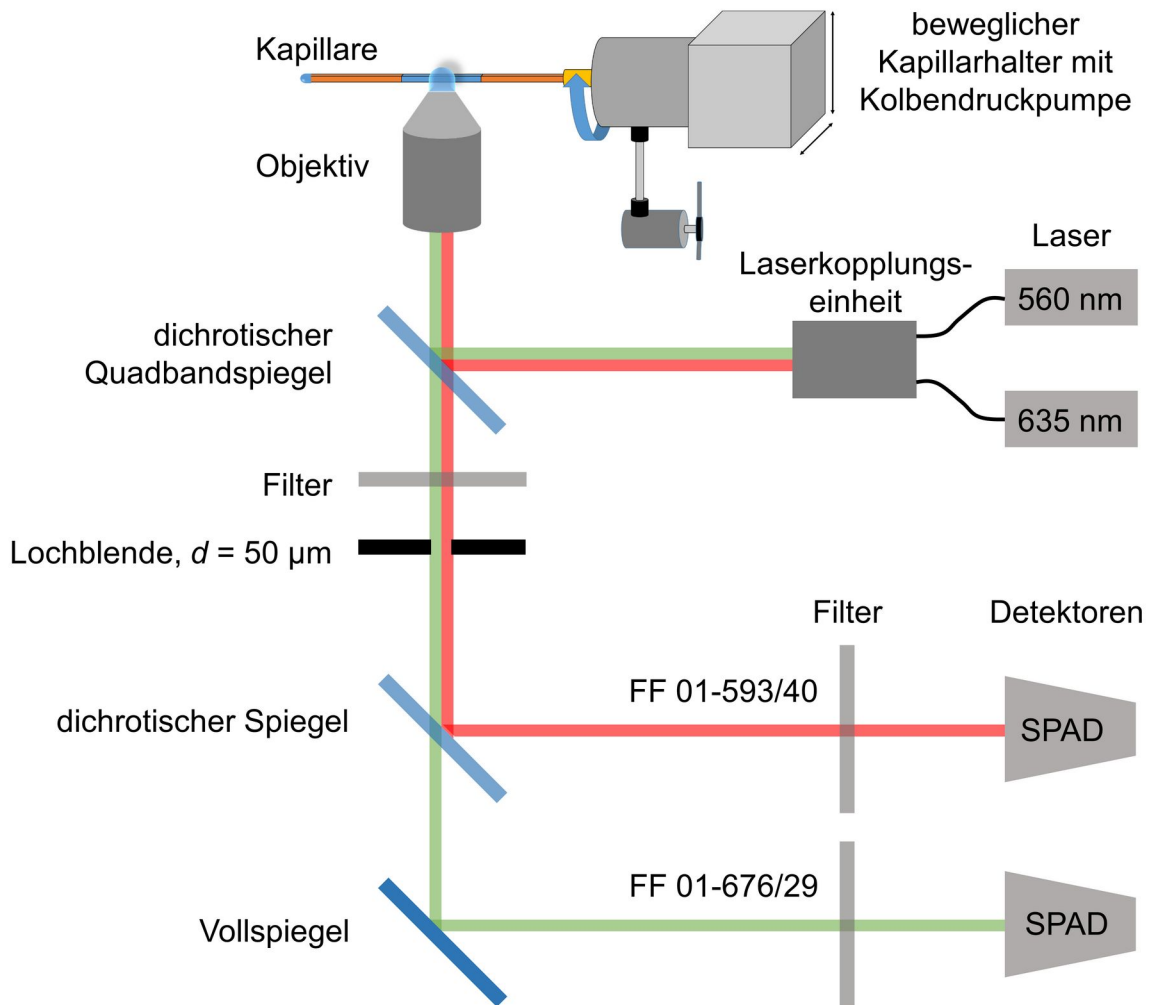


Abbildung 16: Schematischer Aufbau der Messapparatur mit Kapillare für Hochdruckmessungen.

## 4.2 Circulardichroismus-Spektroskopie

Die Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie ist eine Abwandlung der Absorptionsspektroskopie. Es wird die Differenz der Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht gemessen und in Form der Differenz der Extinktionskoeffizienten ausgegeben:

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_l - \varepsilon_r \quad (25)$$

Diese Größe ist von der Absorptionswellenlänge des Probenmoleküls abhängig. Voraussetzung für eine solche Differenz ist die optische Aktivität eines Chromophores, welche durch intrinsische oder

## Verwendete Methoden und Geräte

umgebungsinduzierte Chiralität entsteht. Aufgetragen wird in der Regel die molare Elliptizität  $[\Theta_M]_\lambda$ . Die Elliptizität  $\Theta_\lambda$  ist wie folgt definiert:

$$\Theta_\lambda = \arctan\left(\frac{E_r - E_l}{E_r + E_l}\right) \quad (26)$$

und über das LAMBERT-BEER'sche Gesetz mit  $\Delta\varepsilon$  verknüpft:

$$\Theta_\lambda = \ln(10) \cdot \frac{180^\circ}{4\pi} \cdot \Delta\varepsilon \cdot c_m \cdot d \approx 33^\circ \cdot \Delta\varepsilon \cdot c_m \cdot d \quad (27)$$

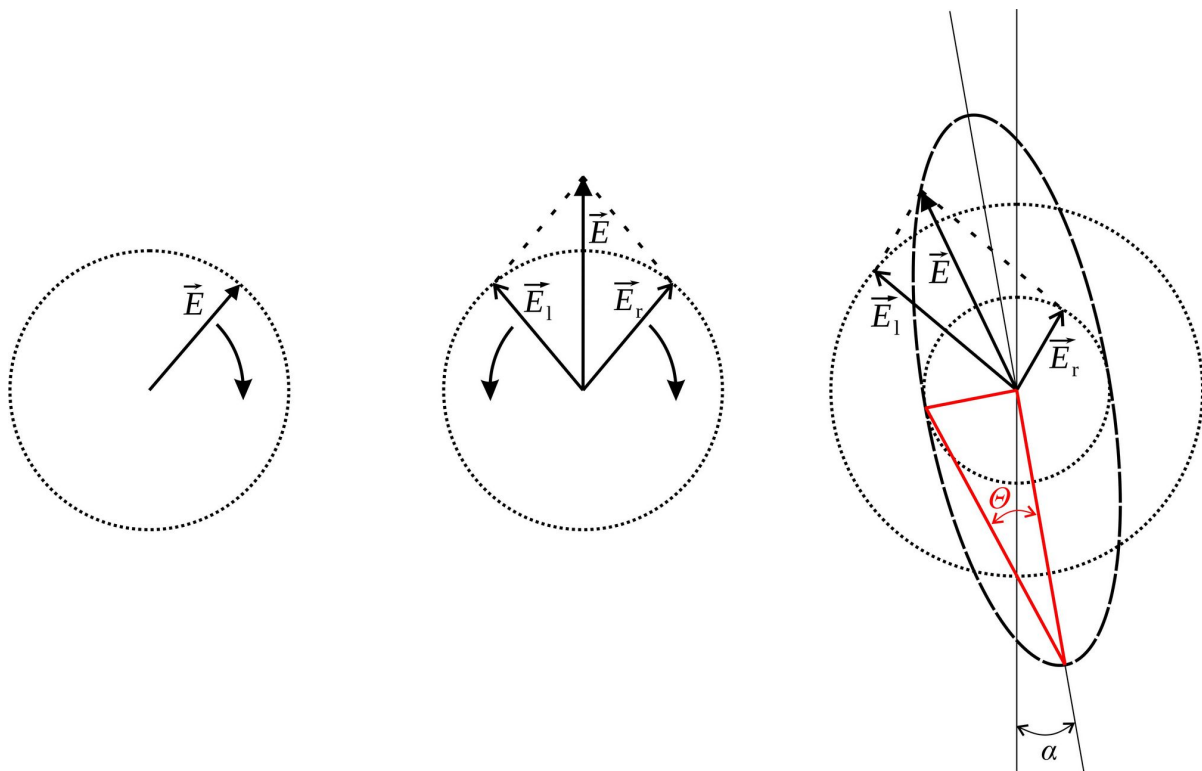
Die molare Elliptizität ergibt sich hieraus mittels der molaren Konzentration  $c$  und der Schichtdicke  $d$ :

$$[\Theta_M]_\lambda = \frac{\Theta_\lambda}{c \cdot d} \quad (28)$$

In Abbildung 17 sind die rechts- und linksdrehenden Komponenten des elektrischen Feldvektors des Lichtes  $\vec{E}_r$  und  $\vec{E}_l$ , welche sich senkrecht zur Ausbreitungsrichtung bewegen, skizziert. Von links nach rechts sind zirkular, linear und elliptisch polarisiertes Licht dargestellt. Bei zirkular polarisiertem Licht ist eine der Komponenten null, gleiche Beträge der Vektoren führen hingegen zu linear polarisiertem Licht. Aus Vektoren unterschiedlicher Länge ergibt sich wiederum elliptisch polarisiertes Licht. Für den letzten Fall sind die Elliptizität  $\Theta$  und der Drehwinkel  $\alpha$  in Abbildung 17 gezeigt.



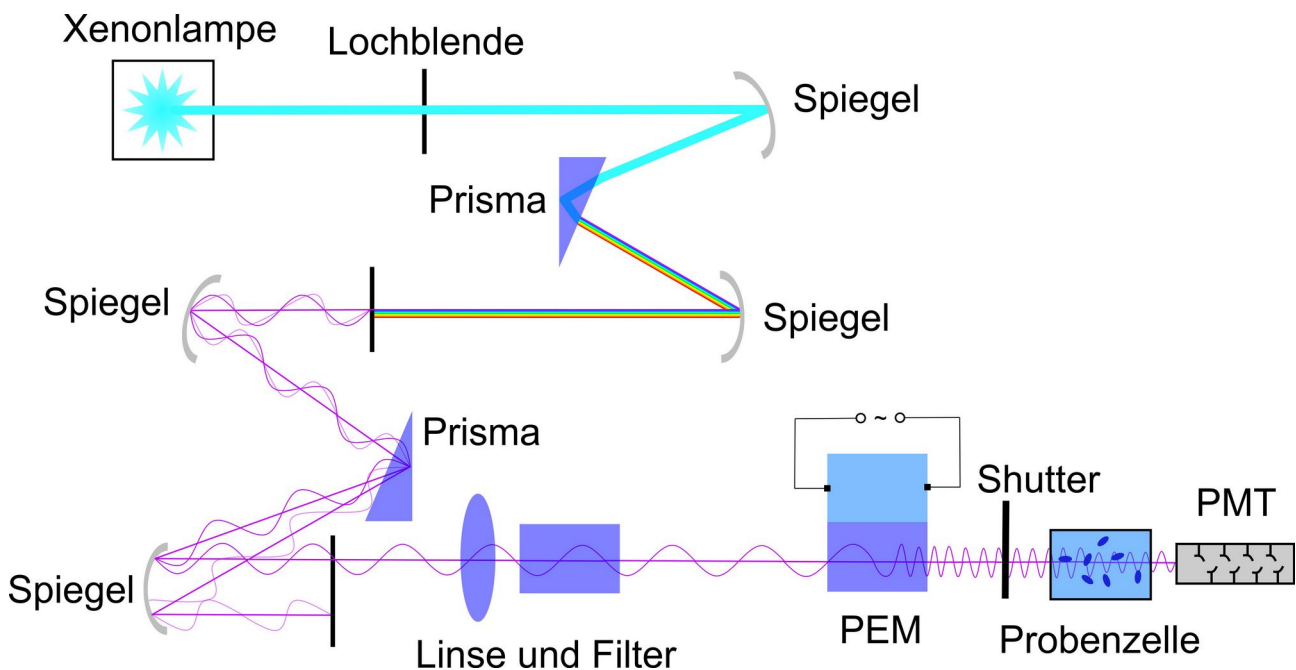
## Verwendete Methoden und Geräte



**Abbildung 17: Schematische 2D-Darstellung des elektronischen Feldvektors  $\vec{E}$  von verschieden polarisiertem Licht (links: zirkular polarisiert, mitte: linear polarisiert und rechts elliptisch polarisiert). Im Fall des elliptisch polarisierten Lichts ist die Elliptizität  $\theta$  in rot und der optische Drehwinkel  $\alpha$  eingezeichnet.**

Um die Elliptizität zu messen, wird monochromatisches zirkular polarisiertes Licht mit wechselnder Drehrichtung benötigt. Abbildung 18 zeigt den schematischen Aufbau des für diese Arbeit verwendeten CD-Spektropolarimeters. Das polychromatische Licht aus einer 150 W Xenonlampe wird zunächst durch ein  $\alpha$ -Quarz-Prisma mit parallel zum Licht ausgerichteter optischer Achse spektral zerlegt. Ein Spalt sorgt für die Auswahl der entsprechenden Wellenlänge. Das so erhaltene monochromatische Licht wird durch ein zweites  $\alpha$ -Quarz-Prisma mit senkrecht zur Ausbreitungsrichtung ausgerichteter optischer Achse in den linear polarisierten „ordentlichen“ und den „außerordentlichen“ Anteil zerlegt. Letzterer Anteil wird erneut durch einen Spalt blockiert. Das so erhaltene monochromatische linear polarisierte Licht wird nach Fokussierung mittels eines photoelastischen Modulators (PEM) abwechselnd in rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht gleicher Intensität umgewandelt. Hierzu wird ein Block aus Quarzglas über eine mechanische Verbindung zu einem  $\alpha$ -Quarzblock durch eine angelegte Wechselspannung abwechselnd gestaucht und gestreckt. Die anschließende Transmission wird durch einen Photomultiplier detektiert und von einem Computer aufgezeichnet.

## Verwendete Methoden und Geräte



**Abbildung 18:** Schema des Aufbaus des CD-Spektropolarimeters J-715 von Jasco. Polychromatisches Licht aus einer 150 W Xenonlampe wird mit einem Spiegelsystem und einem parallel ausgerichteten  $\alpha$ -Quarz-Prisma farblich zerlegt. Ein Spalt lässt nur Licht mit der gewünschten Wellenlänge passieren. Ein zweites Spiegelsystem mit senkrecht ausgerichtetem  $\alpha$ -Quarz-Prisma spaltet das Licht nach dem Drehwinkel der Polarisationsebene auf. Das so entstehende linear polarisierte Licht wird nach Fokussierung durch Linse und Filter mittels eines photoelastischen Modulators (PEM) abwechselnd rechts- und linkszirkular polarisiert. Der Shutter lässt das Licht in den entsprechenden Zeitabständen in die Probenkammer. Die Transmission wird anschließend von einem Photomultiplier detektiert.

Für Makromoleküle können entsprechende Spektren verschiedenen Konformationen zugeordnet werden. So kann z. B. zwischen der ungeordneten Struktur und verschiedenen G-Quadruplex-Strukturen Guanin-reicher Oligonukleotide unterschieden werden.<sup>30</sup> Bei Nukleinsäuren sind die Nukleobasen die Chromophore, welche aufgrund der chiralen Ribose sowie insbesondere aufgrund sekundärer Überstrukturen optisch aktiv sind. Grundsätzlich sind CD-Spektren additiv, sodass sich Spektren durch Linearkombination entsprechend anteiliger Spektren darstellen lassen. Genutzt wird dies in erster Linie zur Sekundärstrukturanteilbestimmung von Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wird dieser Umstand genutzt, um bei Vorliegen einer G- oder C-reichen Struktur, welche mit einem DNS-Doppelstrang verknüpft ist, das Spektrum des Einzelstrangbereichs durch Subtraktion gesondert gemessener Doppelstrangspektren zu separieren. Beispielhaft ist dies in Abbildung 19 dargestellt. Vorteile der CD-Spektroskopie sind eine hohe Empfindlichkeit, kurze Messzeiten und

## **Verwendete Methoden und Geräte**

keine Notwendigkeit, optisch aktive Probenmoleküle chemisch zu verändern. Limitiert wird diese Methode allerdings durch die Mittelung über die Gesamtheit aller Probenmoleküle (Ensemblemittelwert), womit bei gleichzeitigem Vorliegen verschiedener Konformationen eine Quantifizierung fehleranfällig ist.

## Auswertung

### 4.3 Auswertung

#### 4.3.1 Auswertung der smFRET-Daten

Die Daten der smFRET-Messungen wurden mit der Software SymphoTime von PicoQuant (Version 5.3.2.2) aufgenommen und mittels des integrierten *multiparameter fluorescence detetion* Skriptes<sup>78</sup>, wie in Kapitel 4.1.4 beschrieben, in Histogramme umgerechnet (*binning time*: 1 ms; FRET-Effizienzintervalle: 0.025). Jedes Histogramm wurde anschließend auf die höchste vorkommende Anzahl der Events normiert. Mittels MATLAB R2016a wurde eine entsprechende Funktion aus zwei (Gleichung (29)) oder drei (Gleichung (30)) GAUSS-Funktionen auf die Daten der Histogramme gefittet und die Fläche unter den GAUSS-Funktionen mittels Integration berechnet.

$$f(x) = a_1 \cdot e^{-\left(\frac{x-b_1}{c_1}\right)^2} + a_2 \cdot e^{-\left(\frac{x-b_2}{c_2}\right)^2} \quad (29)$$

$$f(x) = a_1 \cdot e^{-\left(\frac{x-b_1}{c_1}\right)^2} + a_2 \cdot e^{-\left(\frac{x-b_2}{c_2}\right)^2} + a_3 \cdot e^{-\left(\frac{x-b_3}{c_3}\right)^2} \quad (30)$$

Die relativen Anteile der entsprechenden Konformation wurden aus der Fläche unter der jeweiligen GAUSS-Funktion berechnet. Gezeigt sind jeweils die Histogramme einer Messung mit den entsprechenden GAUSS-Fits und die über alle Wiederholungsmessungen gemittelten Anteile mit entsprechender Standardabweichung.

#### 4.3.2 Auswertung der CD-Daten

Von den mittels JASCO Spectrum Measurement aufgenommenen CD-Spektren wurden die entsprechenden Pufferspektren subtrahiert. Anschließend wurde nach Gleichung (28) auf die DNS-Konzentration und die Schichtdicke der Probe von 1 mm normiert. Im Fall der um einen Doppelstrang erweiterten telomerischen G-Quadruplex- und i-Motiv-Sequenzen (G4+DS1 und C3+DS1) wurden ebenfalls die entsprechenden Spektren des Doppelstrangs (DS1+DS2) abgezogen (Abbildung 19). Die Messungen wurden jeweils dreimal wiederholt. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Messreihe.

## Auswertung

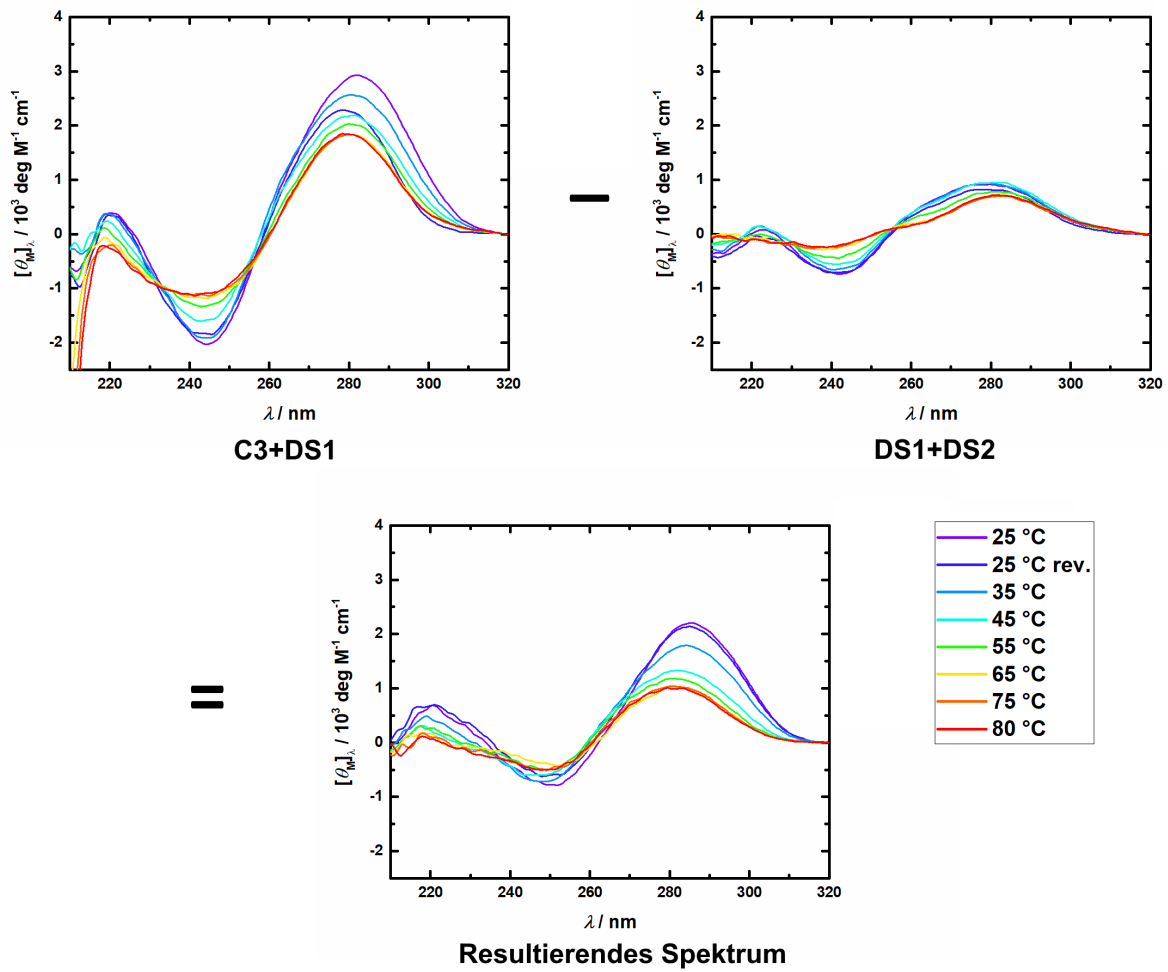


Abbildung 19: Temperaturabhängige CD-Spektren des i-Motiv-Konstruktes (C3+DS1) in 20 mM Natriumacetat-Puffer bei pH 5. Beispiel für die Subtraktion der Doppelstrangspektren (DS1+DS2) von den Spektren des Konstruktes (C3+DS1).

## Probenpräparation

### 5 Probenpräparation

#### 5.1 DNS-Sequenzen und Hybridisierung

Alle verwendeten DNS-Sequenzen wurden, gegebenenfalls in bereits fluoreszenzmarkierter Form, von IBA Lifescience als 100 µM wässrige Lösung bezogen. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

##### **G-Quadruplex:**

G1: 5'-TGG GGA CGG CGA CGG A GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG **X**-3'

G2: 5'-CCG **Y**CG CCG TCC CCA-3'

G3: 5'-TGG GGA CGG CGA CGG A GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG T-3'

G4: 5'-A GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG T-3'

G5: 5'-TGG GGA CGG CGA CGG TGT GGG TGG GTA GGG TGG GTA **AX**-3'

##### **i-Motiv:**

C1: 5'-TGG GGA CGG CGG A CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC **Y**-3'

C2: 5'-CCG **X**CG CCG TCC CCA-3'

C3: 5'-TGG GGA CGG CGG A CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC T-3'

C4: 5'-A CCC TAA CCC TAA CCC TAA CCC T-3'

##### **Doppelstrang:**

DS1: 5'-CCG TCG CCG TCC CCA-3'

DS2: 5'-TGG GGA CGG CGA CGG-3'

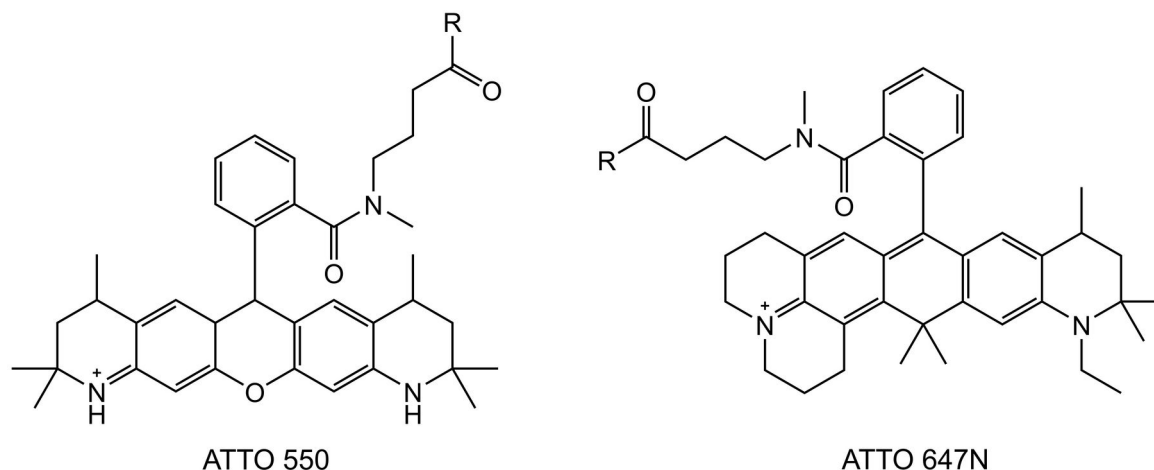
##### **Hairpin:**

H1: 5'-TGG CGA CGG CAG CGA GGC TTA GCG GCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA  
AAA AAA AGC CGC **X**-3'

H2: 5'-GCC TCG **CY**G CCG TCG CCA-3'

## Probenpräparation

**X** steht hier für ATTO 550 modifiziertes Desoxythymidin und **Y** für ATTO 647N modifiziertes Desoxythymidin (Abbildung 20).



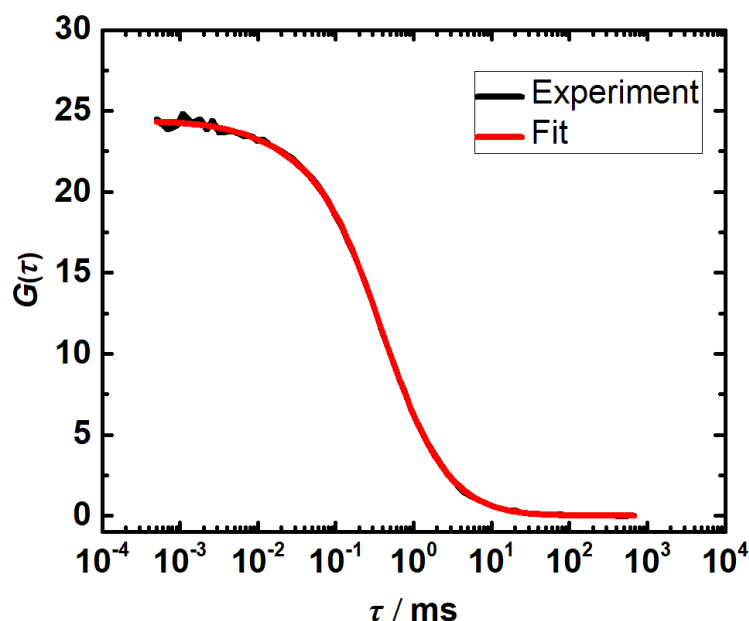
**Abbildung 20: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe. R steht für die Verknüpfung mit der Nucleobase des Thymidin.**

Alle Pufferlösungen wurden mit nukleasefreiem Wasser angesetzt und gefiltert (0.2  $\mu\text{m}$  FP30 Whatman, GE Healthcare Lifesciences).

### 5.1.1 smFRET-Mikroskopie

Die komplementären DNS-Stränge (z. B. G1 und G2 bzw. C1 und C2) wurden im Verhältnis 1:1 in 20 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (TrisHCl) pH 7.5 Puffer mit 50 mM NaCl auf 1  $\mu\text{M}$  je DNS-Strang verdünnt und in einem Thermoschüttler bei 300 rpm hybridisiert. Hierzu wurde die DNS-Lösung 5 min im vorgeheizten Thermoschüttler bei 95  $^{\circ}\text{C}$  gehalten und anschließend schrittweise alle 12 min um je 10  $^{\circ}\text{C}$  bis zum Erreichen der Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert wurden die Lösungen anschließend bei -80  $^{\circ}\text{C}$ . Vor Versuchsdurchführung wurden die hybridisierte und in Pufferlösung gelöste DNS aufgetaut und in zwei Schritten (1:1000, 1:10) auf eine Konzentration von ca. 50 pM verdünnt. Die Konzentration wurde vor der smFRET-Messung mittels FCS überprüft und nur bei einer tatsächlichen Konzentration unter 200 pM genutzt. Beispielhaft ist in Abbildung 21 die Autokorrelation der ATTO 647N Fluoreszenz für C1+C2 mit einem Fit nach Gleichung (23) gezeigt. Dieser Fit ergab bei einem konfokalen Volumen von 1 fL<sup>42</sup> folgende Werte für die verschiedenen Parameter:  $z_0 = 1.76 \mu\text{m}$ ;  $w_0 = 0.32 \mu\text{m}$ ;  $D = 67 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ;  $\langle N \rangle = 0.04$ ;  $\langle c \rangle = 70 \text{ pM}$ ;  $\tau_T = 9.74 \mu\text{s}$ .

## Probenpräparation



**Abbildung 21: Autokorrelation der Fluoreszenz von C1+C2 (Anregung von ATTO 647N bei 635 nm) mit Fit nach dem Modell aus Gleichung (23).**

Für Zusätze wie TMAO wurden Stammlösungen im entsprechenden Puffer angesetzt und diese in gewünschter Menge beim Verdünnungsvorgang statt Puffer verwendet, z. B. 10  $\mu$ L Lösung mit hybridisierter DNS (1:1000) + 20  $\mu$ L 5 M TMAO + 70  $\mu$ L Puffer für eine 1 M TMAO Probenlösung.

### 5.1.2 CD-Spektroskopie

Für die CD-Messungen der G-Quadruplex-Sequenzen wurden die entsprechenden DNS-Stränge (G4) direkt bei der Messkonzentration von 10  $\mu$ M DNS-Konstrukt hybridisiert. Dies wurde in einem 20 mM TrisHCl pH 7.5 Puffer mit 15 mM NaCl und ggf. weiteren Zusätzen nach dem obigen Temperaturschema durchgeführt.

Für die CD-Messungen der i-Motiv-Sequenzen wurden die entsprechenden DNS-Stränge (C3+DS1, DS1+DS2) direkt bei der Messkonzentration von 15  $\mu$ M DNS-Konstrukt hybridisiert. Dies wurde in einem 20 mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ -Puffer mit pH 7.5 und ggf. weiteren Zusätzen oder in 20 mM Natriumacetatpuffer mit pH 5 nach dem obigen Temperaturschema durchgeführt.

Im weiteren Verlauf stehen die Abkürzungen für die jeweiligen DNS-Stränge wie oben aufgeführt. Hybridisierte DNS-Stränge sind mit einem plus angegeben (z. B. G1+G2).



## Probenpräparation

### 5.2 NMR

Für die von Dr. Balasubramanian Harish durchgeführten NMR-Messungen wurde eine Konzentration von 2 mM G4 in 20 mM 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)-Puffer bei pH 7.5 und 5 °C verwendet. Zusätzlich enthielten die Probenlösungen 10 Vol.-% D<sub>2</sub>O, 50 mM NaCl und 0.1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA).

### 5.3 $\alpha$ -Synuclein-Aggregate

Die Expression von  $\alpha$ -Synuclein ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben worden.<sup>79,80</sup> Analog wurde ein pT7-7 Plasmid mit entsprechender Gensequenz für humanoides  $\alpha$ -Synuclein von GenScript gekauft und per Hitzeschockmethode in den *Escherichia coli* Stamm BL21 (DE3) eingebracht. Eine einzelne Kolonie wurde in 100 mL LB Medium mit 150  $\mu$ g/mL Ampicillin überführt und bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm bis zum Erreichen einer Absorbanz von 0.8 bei 600 nm inkubiert. Anschließend wurde die Expression durch 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert und weitere 3 h inkubiert. Die geernteten Zellen wurden in 0.75 mL Puffer (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 10 mM EDTA und 150 mM NaCl) resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Die Gefäße mit den gefrorenen Zellen wurden bei Bedarf für 7 min in kochendem Wasser aufgetaut und der Überstand nach 5 min zentrifugieren auf höchster Stufe mit 136  $\mu$ L/mL 10 Gew.-%igem Streptomycin und 228  $\mu$ L/mL Eisessig versetzt. Nach erneuter Zentrifugation von 2 min wurde der Überstand bei 4 °C im Volumenverhältnis 1:1 mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und mit einer Lösung aus 1:1 v/v gesättigter Ammoniumsulfatlösung und Wasser gewaschen und anschließend in 900  $\mu$ L 100 mM Ammoniumacetat gelöst. Weiter wurde zweimal durch Zugabe des gleichen Volumens Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde erneut in 100 mM Ammoniumacetat suspendiert und mehrfach gegen 10 mM TrisHCl Puffer (pH 7.5) dialysiert. Die Endkonzentration betrug ca. 100 mg/mL  $\alpha$ -Synuclein. Nicht verwendete Proben wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Expression und Aufreinigung des  $\alpha$ -Synucleins wurde von Simone Möbitz durchgeführt.

Um eine Stammlösung mit  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten zu erhalten, wurde lyophilisiertes  $\alpha$ -Synuclein (Endkonzentration 2 mM) in 20 mM TrisHCl-Puffer (pH 7.4) mit 10 % Ethanol und 100 mM NaCl bei 37 °C für 6 h inkubiert. Das Größenprofil wurde von Dr. Rosario Oliva mittels dynamischer

## Probenpräparation

Lichtstreuung ermittelt (Abbildung 22). Der hydrodynamische Radius  $R_H$  der Hauptspezies lag zwischen 100 und 400 nm.

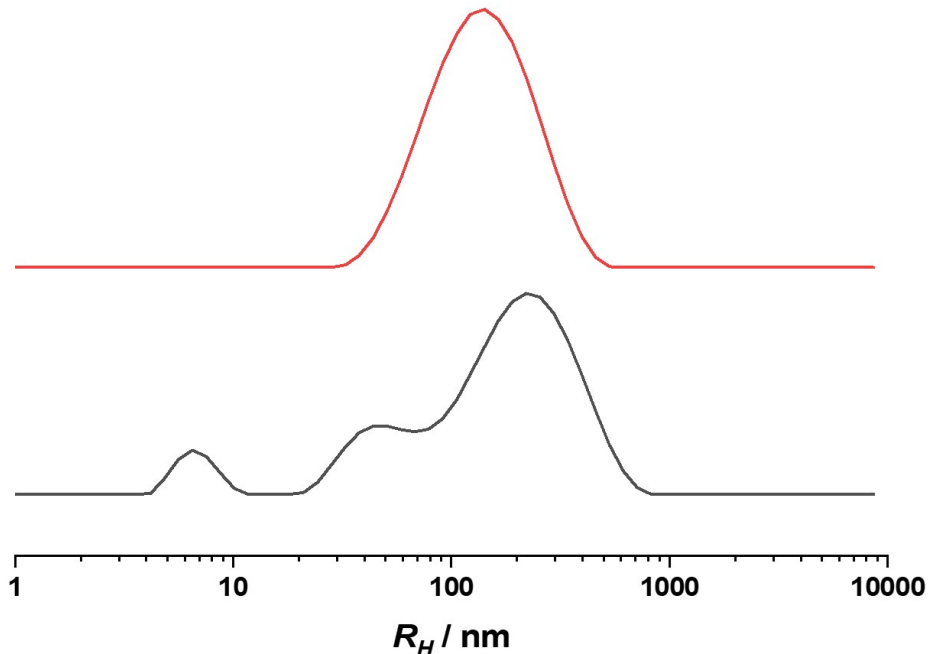


Abbildung 22: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilung von  $\alpha$ -Synuclein bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (rot) und 50  $\mu\text{M}$  (schwarz).

### 5.4 Mikroskopiemesszellen für Hochdruck und Temperatur

Während Messungen bei Raumbedingungen (25 °C, 1 bar) auf einem, in einen Halter eingespannten, Deckgläschen (Marienfeld, *High Precision Cover Glass* 22x22 mm, Stärke 170  $\mu\text{m}$ , Toleranz 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt wurden, werden für druck- und temperaturabhängige Mikroskopiemessungen spezielle Messzellen benötigt. Die Temperaturmesszelle besteht aus einem Teflonquader mit einer runden Probenaussparung, um welche ein dünner Kanal läuft. Der Kanal wird mit Silikonpaste (Korasilon mittelviskos) gefüllt und die Probenaussparung entsprechend durch zwei Deckgläser nach oben und unten abgedichtet. Die Probe kann durch zwei seitliche Kunststoffschläuche eingefüllt und abgelassen werden. Das Probenvolumen beträgt ca. 0.5 mL Die Temperatur wird durch einen aufgeschraubten Heizblock geregelt und durch ein externes Thermometer an diesem gemessen.

Für die Messung unter Hochdruck wurden *fused silica*-Kapillaren (Optronis, Kantenlänge der Grundfläche 50  $\mu\text{m}$ , Wandstärke  $170 \pm 5 \mu\text{m}$ , Außenhülle Polyimid) mit einer quadratischen

## Probenpräparation

Grundfläche genutzt. Die Kapillaren (30 cm) wurden zunächst an einem Ende auf einer Länge von ca. 3 cm mit einem Feuerzeug von ihrer Kunststoffbeschichtung befreit. Der freie Glasbereich wird mit Ethanol gereinigt. Die Druckschraube besteht aus einem kurzen druckfesten Stahlrohr mit einem Innendurchmesser von 1 mm und ist mit einem Gewinde versehen. In diese Druckschraube wird die Kapillare mit zwei Komponentenepoxidkleber (UHU Endfest 300, Härtnern und Harz im Gewichtsverhältnis 1:2) eingeklebt. Hierzu wird der Kapillarhalter auf einer durch Aluminiumfolie geschützten Heizplatte zunächst auf ca. 180 °C erhitzt. Das freie Glasende der Kapillare wird nun mit ca. 0,3 g Epoxidkleber benetzt und sofort in die noch heiße Kapillarhalterung eingeführt. Um eine gleichmäßige Verteilung des Klebers zu gewährleisten wird die Druckhalterung mit Kapillare kurz auf einer hitzebeständigen Unterlage gerollt und anschließend für weitere 20 min auf der Heizplatte bei 180 °C zum Aushärten belassen. Die Druckschrauben wurden durch Ausbrennen mittels eines Bunsenbrenners und anschließender Reinigung im Ultraschallbad recycelt.

### 5.5 Polysobat 80

Um die Adsorption von DNS an den Glasoberflächen der Deckgläschen und Kapillaren zu verhindern, wurden diese mit Polysorbat 80 beschichtet. Hierzu wurden die Deckgläschen mindestens 12 h in einer 1 Vol.-%igen wässrigen Polysorbat 80-Lösung gelagert. Anschließend wurden die Deckgläser mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Druckluft getrocknet. Die Kapillaren wurden ebenfalls mit 1 Vol.-%iger wässriger Polysorbat 80-Lösung gefüllt und mindestens 12 h gelagert. Anschließend wurde ca. 5 min mit destilliertem Wasser gespült bevor die Probenlösung eingefüllt wurde.

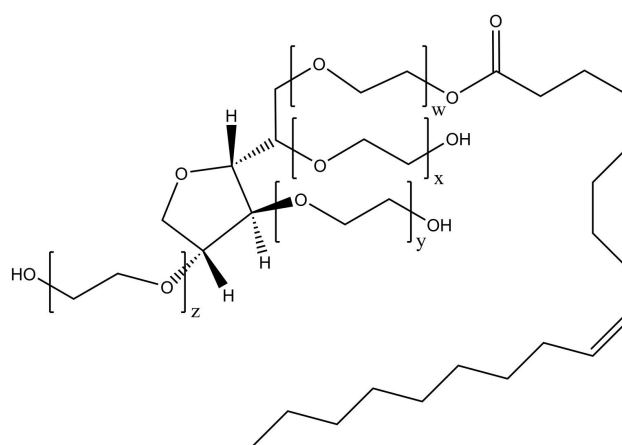


Abbildung 23: Struktur von Polysorbat 80 mit  $w+y+x+z = 20$ .

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

# 6 Einfluss von TMAO, Harnstoff, Druck und Temperatur auf das Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplexes

Für die Durchführung, Auswertung und Betreuung der im folgenden Abschnitt durchgeführten NMR-Messungen bedanke ich mich bei Dr. Balasubramanian Harish und Prof. Dr. Catherine A. Royer. Die smFRET-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Satyajit Patra durchgeführt.

## 6.1 Einleitung

Ein detailliertes Verständnis der Topologie von G-Quadruplexen bei Anwesenheit von Kosolvenzien und externen Stressfaktoren wie hohem Druck fehlen weitestgehend. Insbesondere hoher Druck hat eine besondere physikochemische und biologische Relevanz. Physikochemisch lassen sich durch Variation des Drucks volumetrische Informationen über die beobachtbaren Konformationen gewinnen. Weiter steht der hydrostatische Druck direkt mit der Packungsdichte sowie der Hydratation in Zusammenhang und lässt so Rückschlüsse auf die Triebkräfte biomolekularer Assemblierung zu.<sup>81-83</sup>

Ein anderes Feld, in dem hoher hydrostatischer Druck eine große Rolle spielt, ist die Tiefsee inklusive des Tiefseebodens. Dieser von Drücken bis zu 1000 bar und heißen vulkanischen Quellen geprägte Lebensraum gilt als Ursprung des Lebens auf der Erde. In dieser Umgebung leben eine Vielzahl bis heute spärlich erforschter Lebewesen. Die Mechanismen der Anpassung an diese Umweltbedingungen sind Gegenstand aktueller Forschung. Ein Meilenstein in diesem Zusammenhang war die Entdeckung von YANCEY *et al.*, dass bestimmte Osmolyte in Tiefseeorganismen den Einflüssen der harschen Umweltbedingungen entgegenwirken.<sup>84</sup> Eines dieser Osmolyte ist Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), welches sich durch die Stabilisierung der nativen Konformation verschiedener Biomoleküle gegenüber Druck- und Temperaturentfaltung auszeichnet.<sup>85,86</sup>

In einer ersten Studie dieser Dissertation wurden die Einflüsse von TMAO, Harnstoff und Ficoll auf das Konformationsgleichgewicht von G-Quadruplexen der humanen telomerischen G-reichen Wiederholungseinheit  $d[A(GGGTTA)_3GGG]$  unter hohem hydrostatischem Druck untersucht.

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

Bisher wurde diese Sequenz in erster Linie mit Ensemblemethoden, wie CD- und UV/VIS-Spektroskopie, sowie der NMR-Spektroskopie bei Atmosphärendruck untersucht.<sup>14,35,39,60,82</sup>

In dieser Studie wiederum kommt in erster Linie die single-molecule FRET-Mikroskopie (smFRET-mic) zum Einsatz, welche eine Auflösung unterschiedlicher Konformationen aufgrund unterschiedlicher Abstände der Fluoreszenzmarker erlaubt. Für druckabhängige Messungen wird der bereits von Patra *et al.* beschriebene Aufbau bestehend aus einer in x-, y- und z-Richtung beweglichen Bühne und einer drehbaren Einschraubvorrichtung für *fused-silica*-Kapillaren genutzt.<sup>42</sup> Die in eine Druckschraube eingeklebte Kapillare wird am anderen Ende mittels eines Erdgas/Sauerstoffbrenners zugeschmolzen. Der Aufbau eignet sich für Messungen bis ca. 2 kbar. Die untersuchte DNS-Struktur bestand aus einem Doppelstranganteil mit dem Akzeptorfluorophor ATTO 647N sowie einem Einzelstranganteil der Sequenz [A(GGGTTA)<sub>3</sub>GGGT], wobei das abschließende Desoxythymidin mit dem Donorfluorophor ATTO 550 verbunden ist (G1+G2).

Röntgenkristallographische Studien haben bereits gezeigt, dass die verwendete Sequenz aus humanen Telomeren in Lösungen mit K<sup>+</sup>-Ionen eine parallele „Propeller“-Struktur ausbildet, während Na<sup>+</sup>-Ionen zu einer antiparallelen „Korb“-Struktur führen.<sup>20,87</sup> Neuere smFRET-Studien haben wiederum gezeigt, dass der mögliche Konformationsraum deutlich komplexer ist. So lässt sich beispielsweise in NaCl-Lösung nicht nur eine antiparallele Konformation, sondern auch hybride und parallele Konformationen beobachten.<sup>13,33,88,89</sup>

Die erhaltenen FRET-Effizienz-Histogramme wurden mittels eines Modells aus drei GAUSS-Funktionen gefittet, um aus den Integralen über die einzelnen GAUSS-Funktionen (im Intervall [0 1]) die Anteile der Konformationen zu bestimmen. Die Zentren der GAUSS-Funktionen lagen bei ca. 0.9, 0.6 und 0.3 und repräsentieren in entsprechender Reihenfolge die antiparallele Korb-Struktur, die parallele Propeller- bzw. eine Hybridstruktur, sowie die entfaltete DNS.<sup>33,88,89</sup> Für eine FRET-Effizienz von 0.6 ergibt sich allerdings das Problem der Nichtunterscheidbarkeit von paralleler und hybrider G-Quadruplex-Konformation. Dies ist auch aus Abbildung 2 ersichtlich, da der Abstand der DNS-Enden dieser Strukturen annähernd gleich sind und somit auch der für die FRET-Effizienz entscheidene Abstand der Fluorophore. Auch durch CD-Messungen lässt sich nicht eindeutig zwischen hybrider Anordnung und einem Gemisch aus antiparallel und parallel unterscheiden, da das Signal dem Mittel über die gesamte Probe entspricht. Dieses Problem wird zunächst durch den Vergleich mit temperaturabhängigen Messungen adressiert.

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

### 6.2 Temperaturabhängige Messungen des telomerischen G-Quadruplex

Die CD-Messungen im folgenden Teil wurden von Björn Schmidt im Rahmen einer vom Autor und Prof. Dr. Roland Winter betreuten Bachelorarbeit durchgeführt.

#### 6.2.1 Ergebnisse

Falls nicht anders angemerkt, wurden die diffusionsbasierten smFRET-Messungen in 20 mM TrisHCl-Puffer mit ca. 5  $\mu$ M NaCl bei pH 7.5 und 25 °C durchgeführt. Die Messzeit pro Histogramm betrug jeweils 5 min. Die per FCS ermittelte Konzentration der hybridisierten DNS (G1+G2) betrug ca. 100 pM. Die CD-Messungen wurden in 20 mM TrisHCl pH 7.5 und 15 mM NaCl mit der Sequenz G4 durchgeführt.

In Abbildung 24 (a) und (b) ist der temperaturabhängige Verlauf der Histogramme und der entsprechenden Anteile der Konformationen abgebildet. Zu Beginn bis ca. 25 °C liegt das Konformationsgleichgewicht auf Seiten einer Konformation mit hoher FRET-Effizienz (ca. 0.9) im Verhältnis von ca. 60 % zu ca. 40 % mit einer durch mittlere FRET-Effizienz (ca. 0.6) gekennzeichneten zweiten Konformation. Bei Temperaturerhöhung bildet sich zwischen 25 °C und 45 °C vermehrt die zweite Konformation mit  $E \approx 0.6$  des telomerischen G-Quadruplex aus (Verhältnis von  $E \approx 0.6:E \approx 0.9$  ca. 7:3). Oberhalb von 45 °C erscheint eine dritte Konformation ( $E \approx 0.3$ ) und erreicht ein Plateau ab ca. 65 °C, wobei über 90 % der DNS diese Konformation einnimmt und nur noch ein geringer Anteil zwischen 5 % und 10 % in der Konformation mit mittlerer FRET-Effizienz vorliegt. Ein Vergleich mit den in Abbildung 25 (a) dargestellten CD-Messungen des telomerischen G-Quadruplex (G4) zeigen einen ähnlichen Konformationsverlauf in Abhängigkeit der Temperatur mit zwei Übergängen. Die Zuordnung der CD-Peaks zu entsprechenden G-Quadruplex-Konformationen erfolgte auf Grundlage der Literatur (DEL VILLAR-GUERRA *et al.* 2018).<sup>30</sup> Die charakteristischen positiven Peaks für eine antiparallele Konformation bei ca. 245 nm und ca. 295 nm sowie der negative Peak bei ca. 265 nm sind zunächst bei 20 °C dominant, wobei eine Schulter bei 250 nm auf das Vorhandensein geringer Anteile einer parallelen Konformation hindeutet. Wird die Temperatur auf 40 °C erhöht, entspricht das CD-Spektrum wiederum eher dem Verlauf eines parallelen G-Quadruplexes mit einem positiven Peak um 255 nm und einem negativen Peak um 235 nm. Hier deuten die noch geringfügig erhaltenen Peaks bei

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

295 nm und 265 nm sowie eine Schulter bei 250 nm auf Reste der antiparallelen Konformation hin. Das Fehlen eines breiten positiven Peaks zwischen 280 und 300 nm spricht gegen das Vorliegen einer Hybridkonformation. Die CD-Spektren bei Temperaturen oberhalb von 60 °C werden keine charakteristischen G-Quadruplex-Peaks mehr beobachtet und können somit einer entfalteten Konformation zugeordnet werden. Damit wird zum einen die Zuordnung der antiparallelen Konformationen mit  $E \approx 0.9$  sowie der entfalteten DNS bei  $E \approx 0.3$  bestätigt, als auch die Zuordnung von  $E \approx 0.6$  zu einer parallelen Konformation ermöglicht.

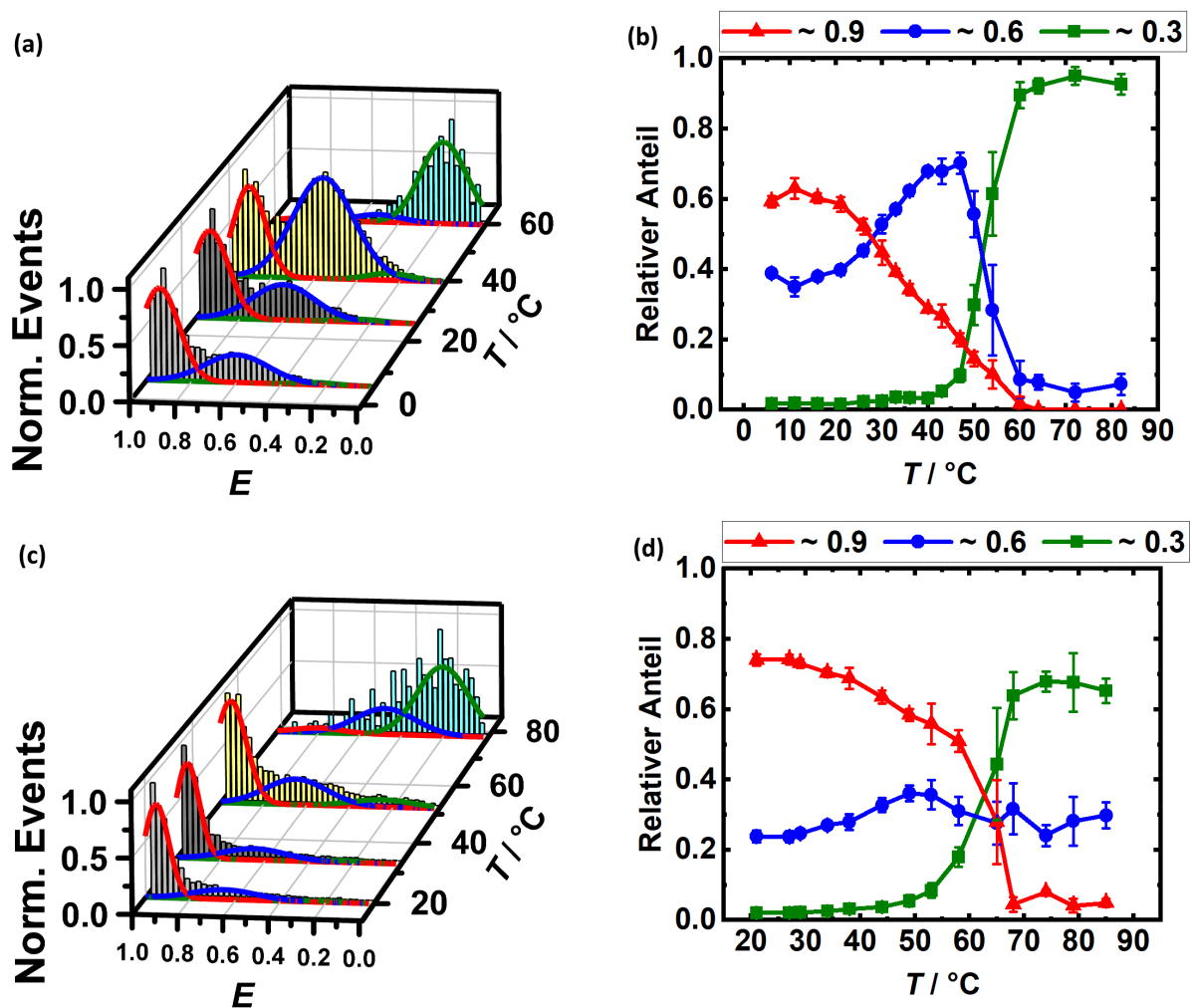


Abbildung 24: Temperaturabhängige FRET-Effizienz-Histogramme (a) und (c), sowie die relativen Konformationsanteile (b) und (d) des telomerischen G-Quadruplexes (G1+G2) in TrisHCl-Puffer bei pH 7.5 und 1 bar. Die Proben für (c) und (d) enthielten darüber hinaus 1 M TMAO. Die DNS-Konzentration betrug ca. 100 pM.

Weiter wurde aus den smFRET-Daten für die erste Konformationsänderung nach Gleichung (9) eine Umwandlungstemperatur von  $32.7 \pm 1.5$  °C und eine VAN'T-HOFF Umwandlungsenthalpie von

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

$198 \pm 68 \text{ kJ mol}^{-1}$  bestimmt. Für die anschließende Entfaltung oberhalb von  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde eine Umwandlungstemperatur von  $56.3 \pm 4.5 \text{ }^\circ\text{C}$  und eine VAN'T-HOFF Enthalpie von  $313 \pm 30 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet. Die Berechnung der Entfaltungsenthalpie steht unter dem Vorbehalt, dass es sich hier nicht um ein Zweizustandssystem handelt, sondern real parallele und antiparallele Konformation gleichzeitig entfaltet werden. Die antiparallele Konformation spielt allerdings ab  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  mit unter 20 % und mit nahe 0 % ab  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  nur eine geringe Rolle bei der Entfaltung.

Unter Zugabe von 1 M TMAO (Abbildung 24 (c) und (d)) ist der Anteil der antiparallelen Konformation im Temperaturbereich von  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  bis ca.  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  deutlich erhöht. Nichtsdestotrotz lässt sich eine geringe Abnahme der antiparallelen Konformation zugunsten der parallelen Konformation beobachten. Oberhalb von  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  startet auch hier die Entfaltung, wobei diese in erster Linie die antiparallele Konformation betrifft, sodass bei Erreichen des Plateaus immer noch ca. 30 % in paralleler Konformation gefaltet bleiben, während die übrigen 70 % entfaltet vorliegen. Auch hier wurde mittels Gleichung (9) die Umwandlungstemperatur und VAN'T-HOFF-Enthalpien bestimmt:  $T_{\text{ul}}$  lag mit  $41.7 \pm 1.2 \text{ }^\circ\text{C}$  um  $9 \text{ }^\circ\text{C}$  höher,  $\Delta H_{\text{VH1}}$  mit  $131 \pm 16 \text{ kJ mol}^{-1}$  allerdings niedriger. Für die Entfaltungstemperatur und -enthalpie konnte der gleiche Trend mit  $63.3 \pm 4.2 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $7 \text{ }^\circ\text{C}$  höher) und  $191 \pm 24 \text{ kJ mol}^{-1}$  beobachtet werden. Auch hier ist die Aussagekraft der Entfaltungsenthalpie aufgrund des Vorliegens von drei Konformationen eingeschränkt.

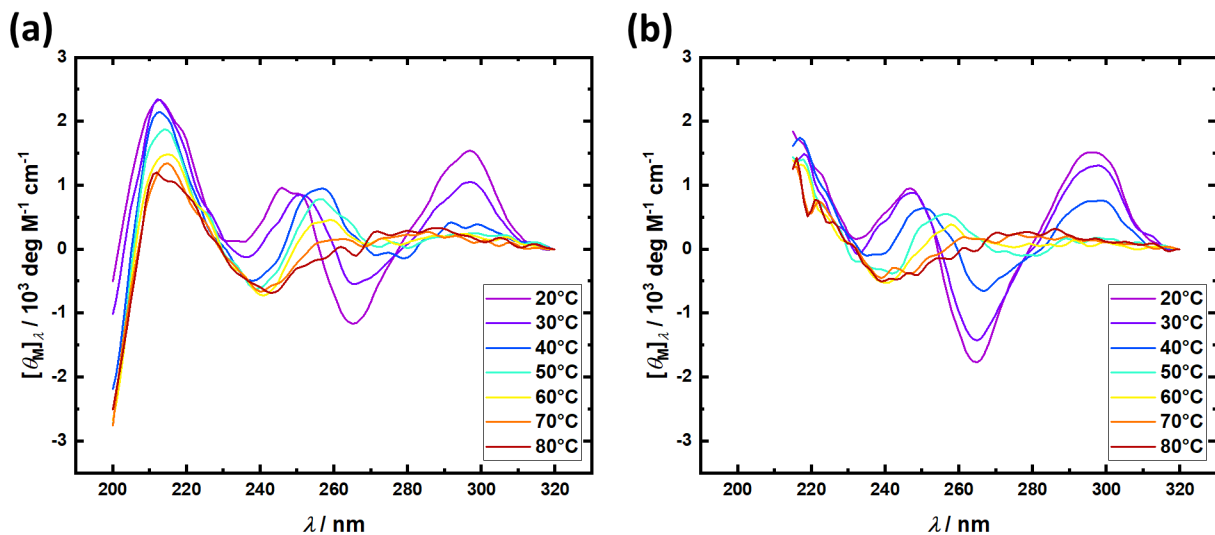


Abbildung 25: CD-Messung des humanen G-Quadruplexes ( $10 \mu\text{M G4}$ ) in  $20 \text{ mM TrisHCl}$  pH 7.5 und  $15 \text{ mM NaCl}$  (a). Die Probe für (b) enthielt zusätzlich  $1 \text{ M TMAO}$ .



## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

Die in Abbildung 25 (b) aufgeführten CD-Messungen zeigen ebenfalls einen ähnlichen Trend für die Zugabe von 1 M TMAO wie die smFRET-Messungen. Die für eine antiparallele Konformation charakteristischen Peaks sind in Abbildung 25 (b) bei 20 °C stärker ausgeprägt und weisen keine Schultern auf. Dies deutet auf einen größeren Anteil an antiparallelen Konformation hin. Der Peak bei ca. 290 nm im 40 °C-CD-Spektrum zeigt, dass die antiparallele Konformation erst bei ca. 10 °C höherer Temperatur vollständig umgewandelt ist. Der Peak bei 255 nm der parallelen Konformation ist nur bei 50 °C und ansatzweise in der 60 °C-Messung zu sehen. Bei 70 °C ist das Ergebnis wiederum, ähnlich den Messungen ohne TMAO, eine weitestgehend entfaltete DNS.

### 6.2.2 Diskussion

Aufgrund der temperaturabhängigen Konformationsänderung von einer antiparallelen zu einer parallelen Konformation konnte der Vergleich mit CD-Spektren die Konformationszuordnung der smFRET-Peaks klären. Darüber hinaus lassen sich auch aus dem beobachteten Konformationswechsel an sich weitere Erkenntnisse gewinnen.

Für die antiparallele Konformation ist eine geringere SASA im Vergleich mit der parallelen Konformation belegt.<sup>18</sup> Für die SASA  $A_{\text{Konformation}}$  gilt entsprechend:

$$A_{\text{antiparallel}} < A_{\text{parallel}} < A_{\text{entfaltet}}. \quad (31)$$

Eine größer werdende zugängliche Oberfläche führt in der Regel zu einer steigenden Hydratation und geht mit einem negativen Beitrag für  $\Delta H_w$  durch eine höhere Anzahl an gebundenen Wassermolekülen in der Hydrathülle einher. Dies führt allerdings auch zu einem negativen Beitrag von  $\Delta S_w$  aufgrund der verringerten Bewegungsfreiheitsgrade der zusätzlich gebundenen Wassermoleküle. Da der Entropieterm mit zunehmender Temperatur wichtiger wird und die Enthalpieänderung in erster Näherung von der Temperatur unabhängig sein sollte, kann nur eine zusätzliche positive Entropieänderung der DNS,  $\Delta S_{\text{DNS}}$ , für ein negatives  $\Delta G$  sorgen. Für die Entfaltung bei höheren Temperaturen ist dies erwartbar, da die Entfaltung von Makromolekülen mit einem Entropiegewinn einhergeht. Für die Änderung von antiparalleler zu paralleler Konformation lässt dies auf eine höhere Flexibilität der parallelen Konformation und somit einen positiven Beitrag von  $\Delta S_{\text{DNS}}$  schließen.

Gemäß den beschriebenen Mechanismen des Oberflächenausschlusses von TMAO (Kapitel 3.2) wird die antiparallele Konformation sowohl in den smFRET-Messungen als auch in den CD-

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

Messungen gegenüber der parallelen Konformation stabilisiert. In den smFRET-Messungen ist zusätzlich ein stabilisierender Effekt des TMAO auf die parallele Konformation gegenüber der Entfaltung bei höheren Temperaturen zu beobachten, welcher in den CD-Messungen nicht eindeutig erkennbar ist. Dies ist kann zum einen auf die geringere Empfindlichkeit der CD-Spektroskopie in Bezug auf kleinere Konformationsanteile zurückgeführt werden, zum anderen sind auch die NaCl- und DNS-Konzentration methodenbedingt höher.

Die VAN'T HOFF-Enthalpie aus den smFRET-Messungen war in Anwesenheit von 1 M TMAO für beide Konformationsübergänge um ca.  $\frac{1}{3}$  niedriger. Dies deutet auf eine geringere kooperative Länge  $N_0$  hin.

Zusammenfassend zeigten die temperaturabhängigen Messungen des telomerischen G-Quadruplexes mit und ohne TMAO sowohl in den smFRET- als auch in den CD-Messungen zwei Konformationsänderungen. Dies ermöglichte die korrekte Zuordnung der Konformationen zu den entsprechenden FRET-Effizienzpeaks. Weiter zeigte TMAO eine stabilisierende Wirkung auf die antiparallele Ausgangskonformation gegenüber einer parallelen Konformation. In den smFRET-Messungen ist darüber hinaus eine geringe Stabilisierung gegen Entfaltung durch TMAO zu beobachten, welche aufgrund der größeren Temperaturintervalle aus den CD-Messungen nicht eindeutig ersichtlich ist. Dies bestätigt die größere SASA der parallelen Konformation gegenüber einer antiparallelen Anordnung und lässt auf eine erhöhte Flexibilität der parallelen Konformation schließen.

# Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

## 6.3 Druckabhängigkeit

### 6.3.1 Ergebnisse

Falls nicht anders angemerkt, wurden die diffusionsbasierten smFRET-Messungen in 20 mM TrisHCl-Puffer mit ca. 5  $\mu$ M NaCl bei pH 7.5 und 25 °C durchgeführt. Die Messzeit pro Histogramm betrug jeweils 5 min. Die per FCS ermittelte Konzentration der hybridisierten DNS (G1+G2) betrug ca. 100 pM.

Die Erhöhung des hydrostatischen Drucks bewirkt zunächst im Bereich bis ca. 400 bar eine Konformationsänderung von der initialen antiparallelen zur parallelen Anordnung. Hierbei sinkt der Anteil der antiparallelen Konformation im Druckbereich von 250 bar bis 500 bar von ca. 50 % auf ca. 30 %, während der parallel Anteil von ca. 35 % auf 55 % zunimmt. Wird der Druck weiter erhöht, ist der Beginn der Entfaltung ab ca. 1000 bar erkennbar (Abbildung 26a und Abbildung 28a). 15 Gew.-% Ficoll PM 70 und 1 M TMAO stabilisieren jeweils die antiparallele Konformation sowohl bei 1 bar als auch bei höheren Drücken (Abbildung 26b und c, Abbildung 28b und c), sodass der Anteil der antiparallelen Konformation im Druckbereich von 1250 bar bis 1500 bar (15 Gew.-% Ficoll) bzw. von 750 bar bis 1000 bar (1 M TMAO) von ca. 70 % auf ca. 55 % abnimmt. Der Anteil der parallelen Konformation nimmt entsprechend von einem Startwert von 25 % auf 40 % zu. Im Gegensatz dazu führt 2 M Harnstoff schon bei einem bar für eine Entfaltung von ca. 70 % (Abbildung 26d und Abbildung 28d). Die Kombination von Druck, 1 M TMAO und 2 M Harnstoff zeigt, dass TMAO die entfaltenden Effekte der beiden anderen Einflüsse, Druck und 2 M Harnstoff, kompensiert und über weite Druckbereiche zur Ausbildung eines Konformationsgleichgewichtes mit ähnlichen Anteilen wie in Puffer bei 1 bar führt. Erst oberhalb von 750 bar ist die parallele Struktur dominant. Gleichzeitig findet unter Einfluss von 1 M TMAO und 2 M Harnstoff im Bereich von 750 bar bis 1500 bar in geringem Maße auch eine Entfaltung statt (Abbildung 26e und Abbildung 28e).

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

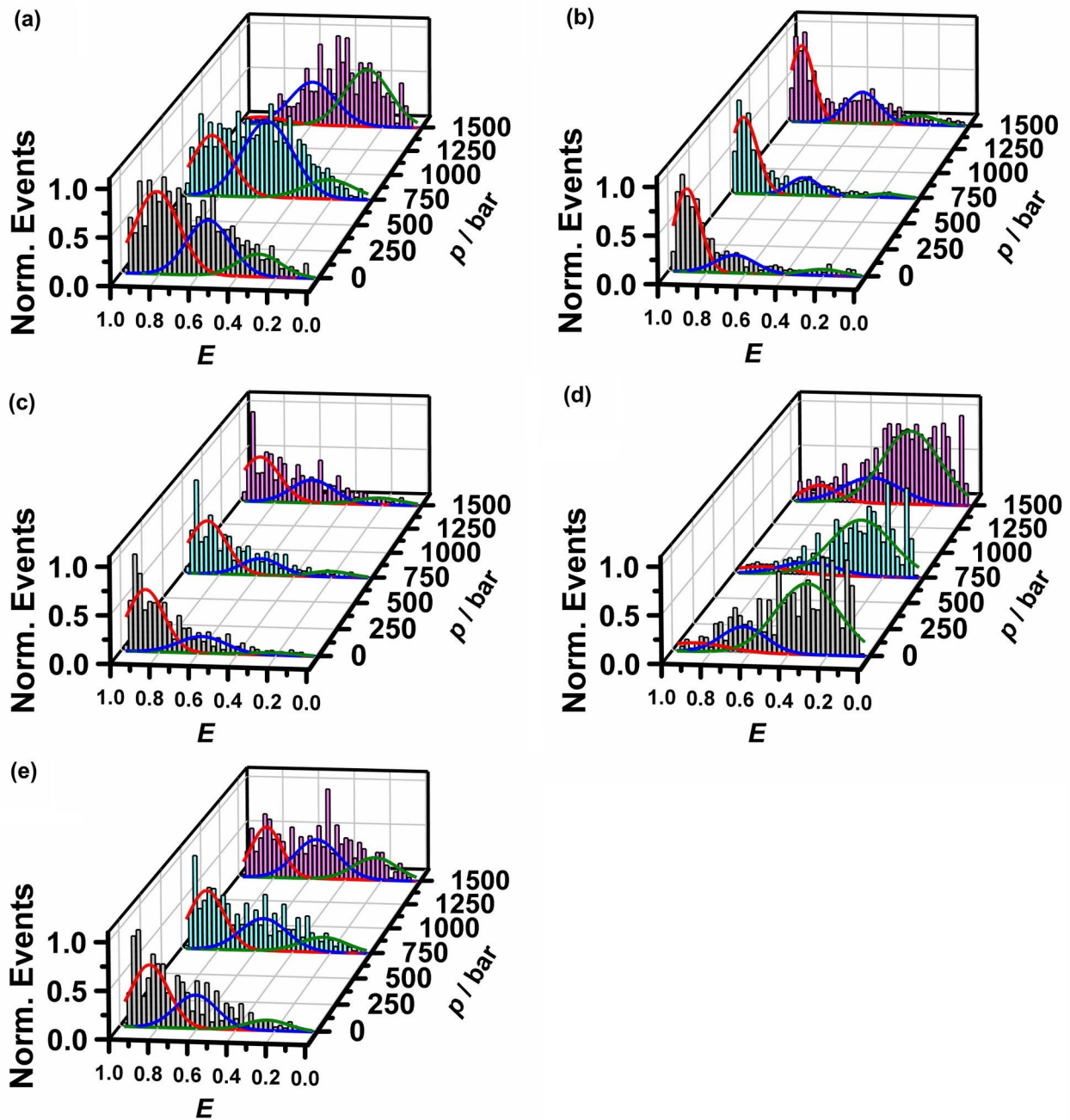


Abbildung 26: (a)-(e) Druckabhängige FRET-Effizienz-Histogramme des telomerischen G-Quadruplexes (G1+G2) in 20 mM TrisHCl pH 7.5 und 25 °C. Die farbigen Linien geben die gefitteten GAUSS-Peaks für die Bestimmung der Konformationsanteile an (rot: antiparallel, blau: parallel/hybrid und grün: entfaltet). (a) Reiner Puffer, (b) 15 Gew.-% Ficoll, (c) 1 M TMAO, (d) 2 M Harnstoff und (e) 2 M Harnstoff und 1 M TMAO. Die DNS-Konzentration betrug ca. 100 pM.

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

Für die Konformationsänderung von antiparallel zu parallel ließ sich die Volumenänderung mit einem Zweizustandsmodell für die Messungen in Puffer und in 1 M TMAO abschätzen, da hier die entfaltete DNS über den relevanten Druckbereich nur einen geringen und gleichbleibenden Anteil einnahm (Abbildung 28a bis 1000 bar und Abbildung 28b). Hierzu wurde zunächst die Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$  aus den Anteilen der jeweiligen Konformationen berechnet (Gleichung (32)) und anschließend die Volumenänderung  $\Delta V$  aus der Steigung der Auftragung von  $\ln(K_{eq})$  gegen  $p$  (Gleichung (7)). Abbildung 28f und g zeigen die entsprechenden linearen Fits. Für die Messung in Puffer ergab sich eine Volumenänderung  $\Delta V$  von  $-26.2 \pm 0.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Dies weist auf ein geringeres molares Volumen des parallelen G-Quadruplexes im Vergleich zum antiparallelen G-Quadruplex hin. 1 M TMAO führte zu einer geringeren Volumenänderung von  $-17.0 \pm 0.3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ .

$$K_{eq}(p) = \frac{[\text{parallel/hybrid}]}{[\text{antiparallel}]} \quad (32)$$

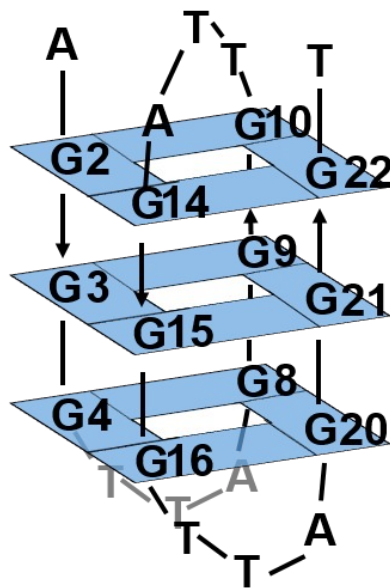


Abbildung 27: Sequenz G4 schematisch in einer antiparallelen Korb-Konformation mit der für die NMR-Auswertung verwendeten Guanin-Nummerierung dargestellt.

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

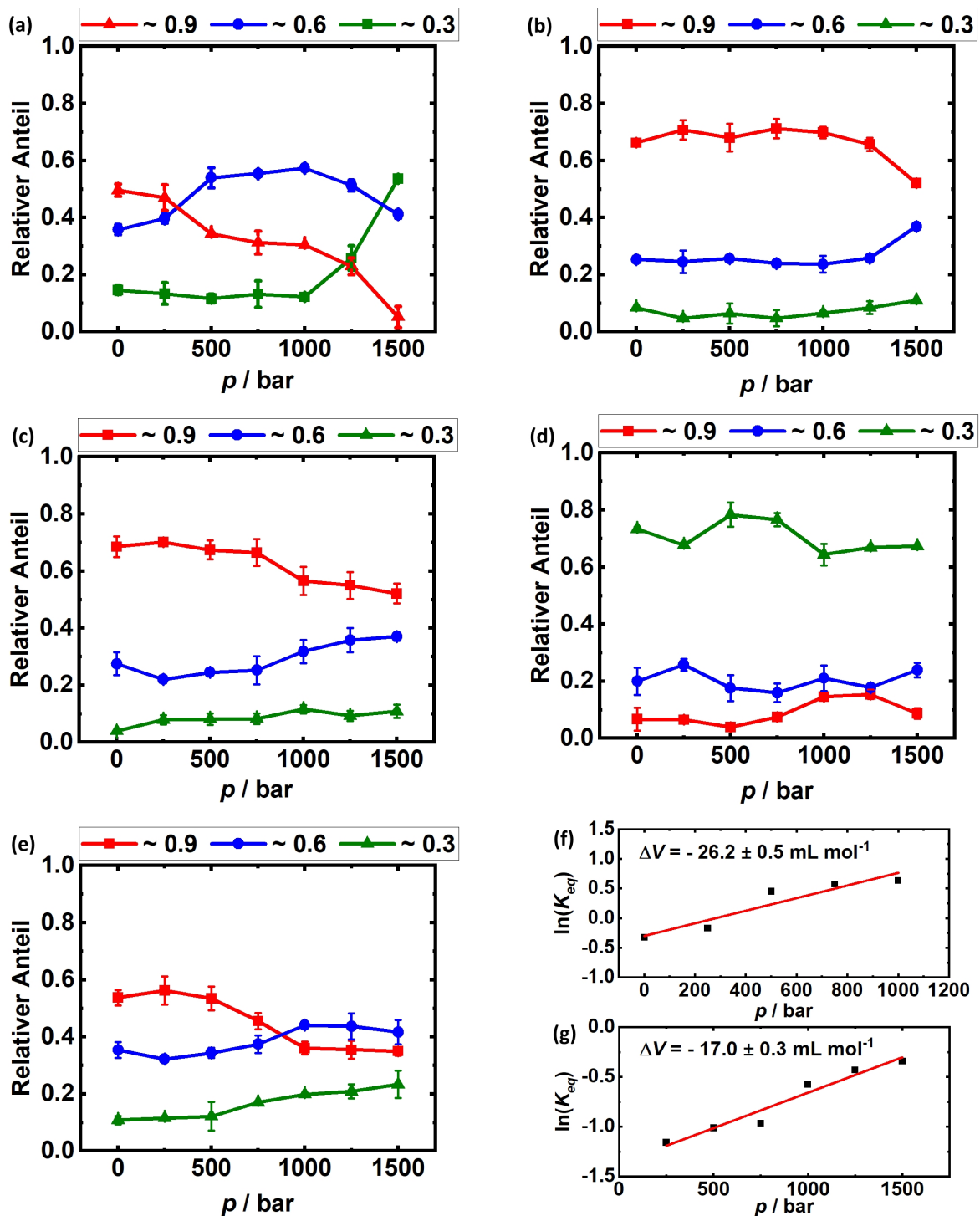


Abbildung 28: (a)-(e) Druckabhängige relative Anteile der Konformationen des telomerischen G-Quadruplexes (G1+G2) in TrisHCl-Puffer mit pH 7.5 bei 25 °C. (b)-(e) enthielten darüber hinaus die Zusätze: (b) 15 Gew.-% Ficoll PM 70, (c) 1 M TMAO, (d) 2 M Harnstoff, (e) 1 M TMAO und 2 M Harnstoff. Konformationen:  $E \approx 0.9$  antiparallel,  $E \approx 0.6$  prallel oder hybrid,  $E \approx 0.3$  entfaltet. (f) Berechnung der druckinduzierten Volumenänderung in Puffer und (g) unter Zusatz von 1 M TMAO mittels linearer Regression nach Gleichung (5). Die DNS-Konzentration betrug ca. 100 pM.

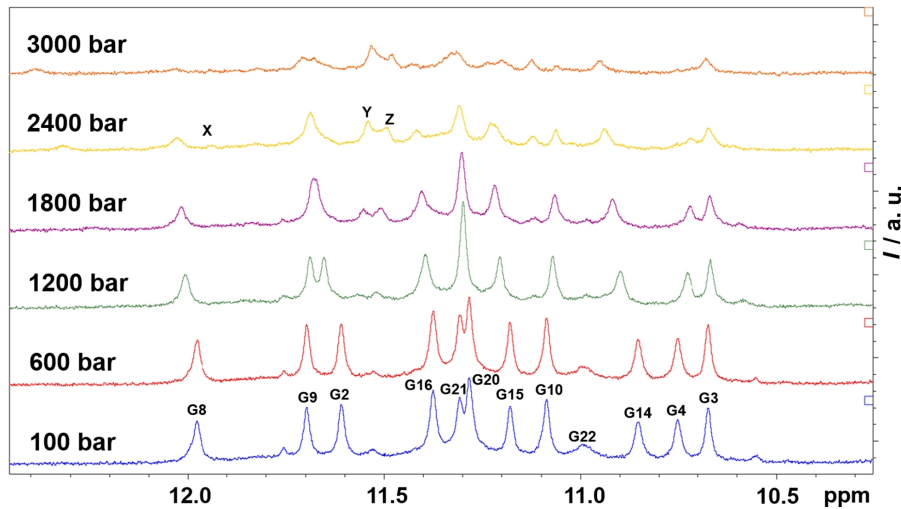
## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

Abbildung 29 zeigt die Druckabhängigkeit des 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektrums (A) sowie die 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY NMR-Spektren für 400 und 2400 bar Drücke (B) für die Sequenz G4. Es wurde ein Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit einer hochdruckstabilen Keramikzirkoniamesszelle (Daedalus Innovations) verwendet. Der Druck wurde mit einer automatischen Pumpe (Daedalus Innovations) erzeugt. Die in einem 20 mM MOPS-Puffer mit 50 mM NaCl, 10 Vol.-%  $\text{D}_2\text{O}$  und 0.1 mM EDTA bei 5 °C beobachteten 12 scharfen Peaks in der Iminoprotonenregion bei 100 bar wurden bereits in früheren Studien der antiparallelen G-Quadruplex-Konformation zugeordnet.<sup>35,87</sup> Abbildung 27 zeigt die Nummerierung der Guanine für die NMR-Auswertung. Bei 1800 bar sind klare Änderungen des  $^1\text{H}$  NMR-Spektrums erkennbar. Die Aufspaltung der Peaks von G2 und G9 sowie von G20 und G21 verschwindet. Darüber hinaus steigt die chemische Verschiebung für G8, G14, G15 und G16, während diese für G4 sinkt. Weiter erscheinen mit Y und Z zwei neue Peaks ab 1800 bar. Dies spricht für eine Änderung zu einer anderen G-Quadruplex-Konformation. Weitere Druckerhöhung über 1800 bar führte zu weiteren Änderungen. Ab 2400 bar erscheint ein Peak bei X, welcher mit der Kopplung X-Z in dem entsprechenden 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY-Spektrum korreliert ist. Die Verbreiterung der Peaks und das Absinken der Intensität lässt auf eine Entfaltung ab 3000 bar schließen. Unter Berücksichtigung der stark abweichenden Bedingungen (DNS- und NaCl-Konzentration, niedrigere Temperatur) ist eine quantitative Übereinstimmung der Übergangsdrücke nicht zu erwarten. Die qualitativen Ergebnisse der smFRET-Mic Experimente einer zweistufigen Konformationsänderung mit einem Wechsel von antiparallel zu parallel in einem ersten Druckbereich und folgender Entfaltung bei weiterer Druckerhöhung werden hingegen durch die  $^1\text{H}$  NMR-Experimente gestützt.

Durch Fitten der abnehmenden Peakfläche der NMR-Peaks mit Gleichung (8) konnten auch hier Volumenänderungen bestimmt werden. Für G8, G16 und G14 ergab sich ein  $\Delta V$  um  $-29 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Während die Volumenänderung für G3 mit  $-25 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  geringer ausfiel, wurde für G15 ein höherer Betrag von  $-38 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  erhalten. Die so erhaltenen Volumenänderungen von durchschnittlich  $-30 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  bestätigen damit die Größenordnung von  $\Delta V$  der Konformationsänderung von antiparallel zu parallel aus den smFRET-Mic-Messungen (siehe Anhang, Weitere Abbildungen 10.1, Abbildung 48).

# Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

(A)



(B)

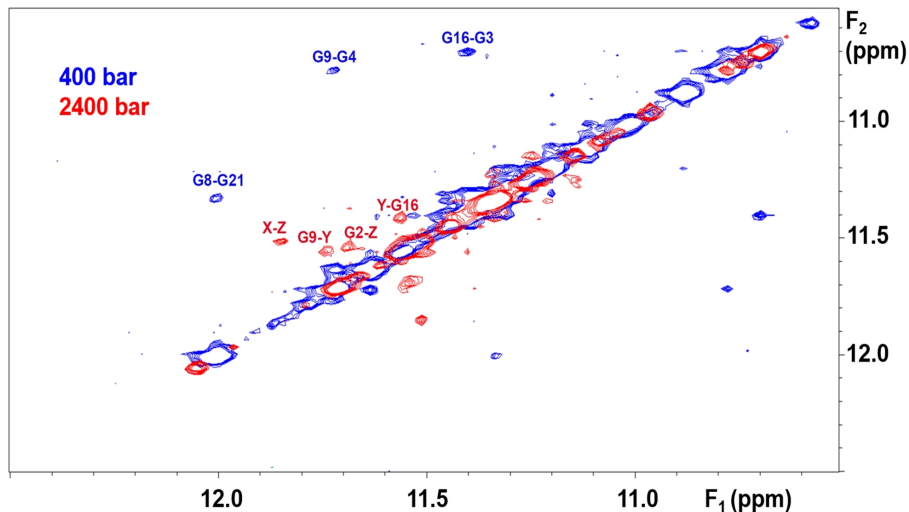


Abbildung 29: (A) 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren und (B) 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY NMR-Spektren der DNS-Sequenz G4 (2 mM) bei verschiedenen Drücken in 50 mM NaCl und 20 mM MOPS-Puffer bei pH 7.5.

## 6.3.2 Diskussion

Insgesamt konnten in den druckabhängigen smFRET- und NMR-Messungen zwei Konformationsänderungen beobachtet werden. In einem ersten Druckbereich konnte eine Umwandlung der antiparallelen in eine parallele Konformation beobachtet werden. Bei höheren Drücken kam es zur Entfaltung der DNS. Die unterschiedliche Höhe der Umwandlungs-Entfaltungsdrücke der verschiedene Methoden kann auf die stabilisierenden Bedingungen in den NMR-Messungen zurückgeführt werden (höhere Salzkonzentration, niedrigere Temperaturen). Die



## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

Volumenänderungen der Konformationsänderung von antiparallel zu parallel lag in den smFRET-Messungen mit  $26 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  in einem ähnlichen Bereich wie in den NMR-Messungen für die einzelnen Guanin-Peaks mit  $25 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  bis  $39 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ .

Die Volumenänderung,  $\Delta V$ , der Konformationsänderung des G-Quadruplexes, kann in folgende verschiedene Beiträge zerlegt werden:<sup>14</sup>

$$\Delta V = \Delta V_M + \Delta V_T + \Delta V_I + n \cdot \Delta V_{\text{Na}^+} \quad (33)$$

Hierbei ist  $\Delta V_M$  die Volumenänderung des DNS-Moleküls, das nicht vom umgebenden Wasser eingenommen werden kann (Änderung des VAN-DER-WAALS-Volumens),  $\Delta V_T$  gibt die Änderung des thermischen Volumens an, welches durch die thermische Bewegung von DNS-Molekül und Wasser an der wasserzugänglichen Oberfläche des Moleküls zustande kommt. Die Änderung des Hydratationsvolumens wird durch  $\Delta V_I$  beschrieben und ergibt sich durch die ca. 10 % Volumenänderung des Wassers bei Ausbildung einer Hydratationsschicht, die eine etwas größere Dichte im Vergleich zur Volumenphase des Wassers besitzt.<sup>82</sup> Der letzte Anteil  $n \cdot \Delta V_{\text{Na}^+}$  gibt mögliche Volumenänderungen der im Zentrum der Guanin-Tetraden koordinierten Natriumkationen ( $n_{\text{max}} = 3$ ) bei Freisetzung und Rehydratisierung an. Die Arbeitsgruppe von T. CHALIKIAN konnte bereits zeigen, dass die Faltung eines G-Quadruplex eine Volumenänderung von  $\Delta V_{\text{fold}} = 56 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  (50 mM NaCl, 47 °C) mit sich bringt und mit einer hohen Dehydratation einhergeht.<sup>14</sup> Da es sich bei dem hier mittels smFRET-mic untersuchten Übergang allerdings um eine Konformationsänderung zwischen zwei gefalteten Zuständen handelt, ist eine geringere Hydratations- und Volumenänderung verglichen mit einer Entfaltung erwartbar. Darüber hinaus wurde für eine solche Konformationsänderung keine Freisetzung der Natriumkationen beobachtet.<sup>12</sup> Daher kann im vorliegenden Fall der vierte Term vernachlässigt werden. Da die Triebkraft für druckinduzierte Konformationsänderungen die beobachteten Volumenverringerungen sind, können sich die antiparallele und die parallele Struktur nur in den Parametern  $V_M$ ,  $V_T$ , und  $V_I$  unterscheiden.

Die Zugabe von 1 M TMAO oder 15 Gew.-% Ficoll erhöht den Anteil der antiparallelen Konformation. Weiter sind beide Kosolute in der Lage, die druckinduzierten Effekte auf die G-Quadruplex-DNS teilweise zu kompensieren. Dies drückt sich auch in der betragsmäßig kleineren Volumenänderung bei Anwesenheit von 1 M TMAO aus. Für TMAO ist bekannt, dass die Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat und den Nukleobasen ungünstig sind.<sup>70,90</sup> Dies führt zu einem Ausschluss von der DNS-Oberfläche und begünstigt kompakte Konformationen mit einer

## Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex

geringen SASA. In ähnlicher Weise stabilisiert der makromolekulare *Crowder* Ficoll kompakte und SASA reduzierte Konformationen aufgrund eines kleineren Oberflächenausschlussvolumens.<sup>91</sup> Für die antiparallele Konformation ist eine geringere SASA im Vergleich mit der parallelen Konformation belegt.<sup>18</sup> Daher ist von einer stärkeren Hydratisierung der parallelen Konformation mit entsprechend negativem Beitrag der Änderung des Hydratisierungsvolumens  $\Delta V_i$  auszugehen. Dies wird auch durch das Verhalten unter Einfluss von TMAO gestützt, da hier die geringere SASA aufgrund der ungünstigen Wechselwirkungen mit der DNS thermodynamisch eine größere Rolle spielt. Der Unterschied in der Volumenänderung der Konformationsänderung von ca.  $9 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  ist darüber hinaus ein Hinweis auf die Komprimierung der antiparallelen Konformation durch 1 M TMAO, möglicherweise durch reduzierte Packungsdefekte, wodurch die Triebkraft der druckinduzierten Konformationsänderung weiter verringert wird. Im Gegensatz dazu werden G-Quadruplexe durch Harnstoff destabilisiert. Dies geschieht aufgrund der bevorzugten Anlagerung der Harnstoffmoleküle an die Nukleobasen, welche auch zur Freisetzung der koordinierten Natriumkationen führt.<sup>67,92</sup> Hierdurch werden entfaltete Konformationen mit einer hohen SASA begünstigt. Interessanterweise werden die Effekte des Harnstoffs bei einer 1:2 Mischung von TMAO und Harnstoff vollständig kompensiert. Dies könnte durch Lösungsmittel vermittelte Mechanismen wie einer Verstärkung des H-Brückennetzwerks der Wassermoleküle durch TMAO zustande kommen, wie es in verschiedenen Studien unter Verwendung von Moleküldynamiksimulationen, RÖNTGEN-RAMAN-Streuexperimenten, dielektrischer Spektroskopie und Dampfdruckosmometrie vorgeschlagen wird.<sup>85,93,94</sup> Auch eine Stabilisierung der Hydratationsschicht könnte der Akkumulation des Harnstoffs an der Oberfläche der DNS entgegenwirken.

Insgesamt gesehen konnte ein Beitrag zur Aufklärung der Effekte von Druck und biologisch inspirierten Osmolyten auf den Konformationsraum G-Quadruplex-bildender DNS-Sequenzen geleistet werden. Physikalische und chemische Extreme limitieren die Biosphäre. Die Einschränkung des gerade noch habitablen Lebensraums durch hohen Druck und die entsprechenden Anpassungsmechanismen der Extremophilen ist immer noch wenig verstanden. Hier konnte gezeigt werden, dass hoher hydrostatischer Druck das Konformationsgleichgewicht von G-Quadruplex-Sequenzen schon bei wenigen hundert bar beeinflussen kann. Höhere Drücke über 1000 bar können sogar eine Entfaltung auslösen. Das in Tiefseeorganismen vorkommende

## **Konformationsverhalten eines telomerischen G-Quadruplex**

Osmolyt TMAO unterbindet diese Druckeffekte im Bereich der in der irdischen Tiefsee vorkommenden Drücke bis ca. 1000 bar selbst in Anwesenheit von 2 M Harnstoff.

## **Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation**

# **7 Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf das Konformationsgleichgewicht von G-Quadruplexen und i-Motiven am Beispiel telomerischer DNS-Sequenzen**

Die Messungen der folgenden Studie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sanjib Kumar Mukherjee durchgeführt.

### **7.1 Einleitung**

Die Ausbildung von Aggregaten und Fibrillen neuronaler Proteine sind ein Charakteristikum neurodegenerativer Erkrankungen und können beispielsweise das Parkinson-Syndrom (PS), die Alzheimer-Krankheit oder eine Multisystematrophie auslösen.<sup>23,26,95-98</sup> Hierbei spielen insbesondere Prion- und Tauproteine, aber auch intrinsisch ungeordnete Proteine (*intrinsically disordered proteins*, IDP), wie das 14 kDa kleine  $\alpha$ -Synuclein, welches die Ausbildung von neurotoxischen LEWY-Körpern induzieren kann, eine Rolle.<sup>24,28</sup> Neben der Apoptose können LEWY-Körper auch die Bildung Dopamin transportierender Vesikel reduzieren und so die Hirnfunktion auf neuronalem Level verändern.<sup>26,27</sup> Weiter kann  $\alpha$ -Synuclein in der Nukleus-Fraktion humaner doperminerger Neuroblastoma-Zellen sowohl in monomerer als auch in oligomerer Form nachgewiesen werden, wobei die monomere Form in die Reparaturmechanismen von DNS-Doppelstrangbrüchen involviert ist.<sup>25,28,99-101</sup> Ein durch Aggregation induziertes Absinken der Monomerkonzentration von  $\alpha$ -Synuclein wird daher mit einer erhöhten Absterberate von Neuronen in Zusammenhang gebracht.<sup>28</sup> Die aggregierte Form des  $\alpha$ -Synucleins, welche sich in Neuronen von PS Patienten nachweisen lässt, interagiert stärker mit DNS als die monomere Form.<sup>100,102,103</sup> Allgemein konnten Cherny *et al.* zeigen, dass  $\alpha$ -Synuclein mit Histon-freien transkriptional-aktiven DNS-Segmenten wechselwirkt und so die Aktivität von Genen für die zelluläre Antwort auf Umweltstimuli reduziert.<sup>104</sup> Daher ist die Untersuchung von Konformationsänderungen von DNS in Anwesenheit von  $\alpha$ -Synuclein von großer Bedeutung für das Verständnis der Veränderung von DNS-Replikation, -Transkription und -Schädigung durch Proteinaggregation.

Nicht-kanonische DNS-Strukturen spielen bei der DNS-Replikation, -Trankription und -Translation ebenfalls eine wichtige Rolle.<sup>105,106</sup> Guanin-reiche DNS-Sequenzen, welche G-Quadruplexe bilden,

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

wurden in den letzten Jahren gut charakterisiert.<sup>14,36,60,107–109</sup> Cytosin-reiche Sequenzen, welche unter bestimmten Bedingungen i-Motive ausbilden, sind wiederum deutlich weniger erforscht.<sup>36,41</sup> Beide Strukturen sind aufgrund ihres Vorkommens in den Telomeren und in Promoterregionen von Onkogenen für die Entstehung von Tumoren relevant.<sup>6,44,48,110</sup>

Daher wurde in der folgenden Studie die Wechselwirkung von nativem und aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein mit nicht-kanonischen DNS-Strukturen auf molekularer Ebene mithilfe der smFRET-mic untersucht. Diese Methode vermeidet das Mitteln über die gesamte Probe, wie es in Ensemblemethoden (z. B. CD-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie) unumgänglich ist. Hierdurch können verschiedene miteinander im Gleichgewicht liegende Konformationen eindeutiger nachgewiesen werden. Es wurden unterschiedliche DNS-Konstrukte, zum einen ein telomerischer G-Quadruplex mit der Sequenz (GGG TTA)<sub>3</sub> GGG<sup>33,108</sup>, verbunden mit einem Doppelstrang für den zweiten Fluorophor des FRET-Paares (G1+G2), sowie die komplementäre i-Motiv-bildende Sequenz (CCC AAT)<sub>3</sub> CCC, verbunden mit dem gleichen Doppelstrang (C1+C2), zum anderen die G-Quadruplex-Sequenz des c-Myc Promoters (G5+G2), verwendet.  $\alpha$ -Synuclein wurde in Konzentrationen eingesetzt, welche näherungsweise in Neuronen vorkommen.<sup>111</sup> Darüber hinaus wurde der Effekt des IDP  $\alpha$ -Synuclein mit dem globulären Modellprotein Lysozym (aus Hühnereiweiß) verglichen.

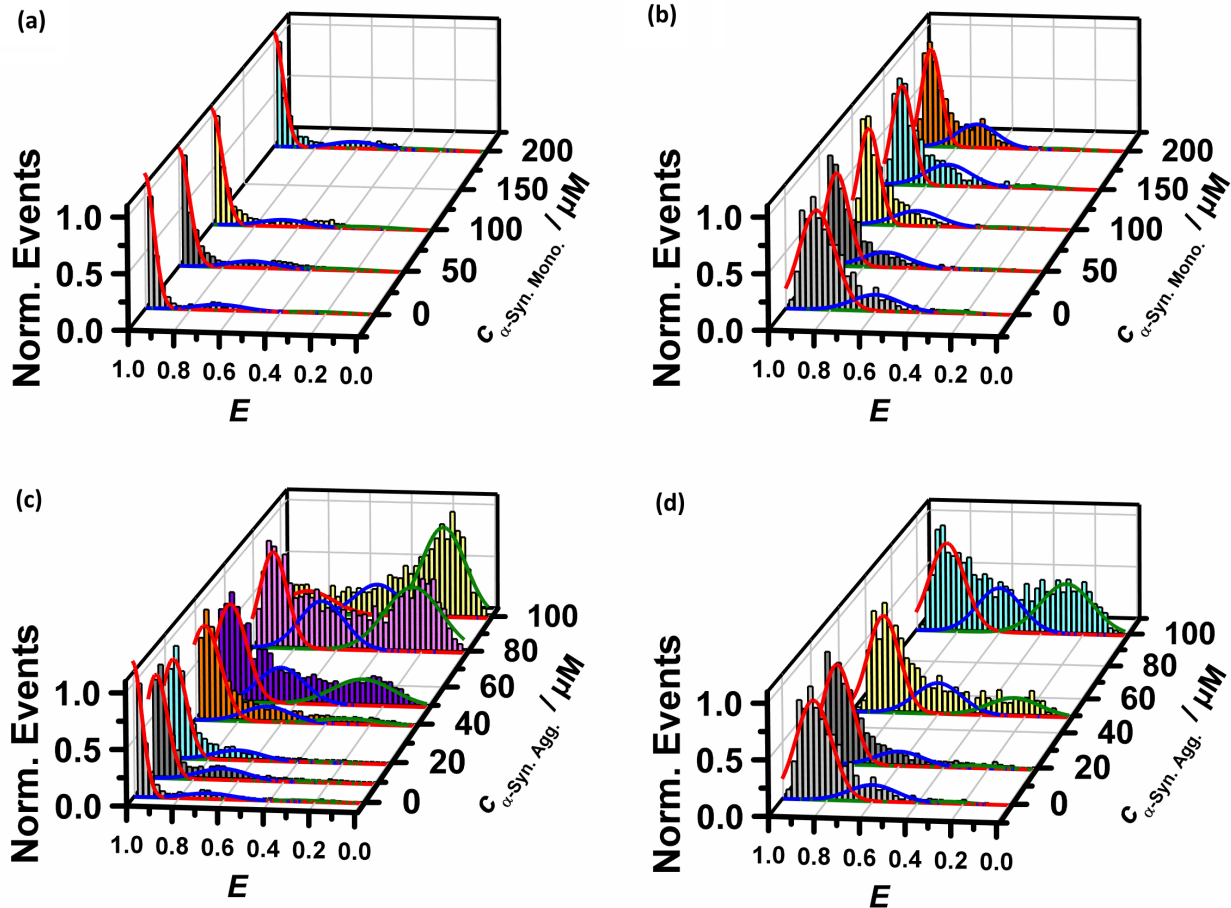
Je nach den äußeren Bedingungen, wie Druck, Temperatur, Salzkonzentration und -art, bildet die G4-Sequenz unterschiedliche Konformationen, wie antiparallele, parallele oder hybride G-Quadruplexe, aus.<sup>30,35,108</sup> Ähnliche Studien zeigten für entsprechend C-reiche Sequenzen die Ausbildung von i-Motiv-Konformationen bei pH 5, während bei neutralem pH eher un- oder teilgefaltete Konformationen angenommen werden.<sup>41</sup> Um die Effekte des intrazellulären *Crowdings* nachzuahmen, wurde Ficoll PM 70 eingesetzt.

## 7.2 Ergebnisse

Falls nicht anderweitig angegeben, wurden die gezeigten smFRET-Daten aus 30 minütigen Messungen bei 25 °C gewonnen. Bei pH 7.5 zeigt das FRET-Histogramm des G-Quadruplexes in reinem Puffer zunächst zwei Peaks, welche wie in der vorangegangenen Studie zugeordnet wurden.<sup>108</sup>  $E \approx 0.9$  entspricht hierbei der antiparallelen Konformation, während  $E \approx 0.6$  einer parallelen Konformation entspricht. Bei erhöhter Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein in aggregierter Form

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

wird ein weiterer Peak mit  $E \approx 0.3$  sichtbar (Abbildung 31a). Dieser kann der ungefalteten Konformation zugeordnet werden.



**Abbildung 30:** FRET-Effizienz-Histogramme des G-Quadruplex-Konstruktes (G1+G2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl bei pH 7.5 und  $25^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit der Konzentration von monomerem (a), (b) und aggregiertem (c),(d)  $\alpha$ -Synuclein und bei zusätzlicher Zugabe von 30 Gew.-% Ficoll PM 70 (b), (d). In allen vier Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.

Abbildung 30(a) und Abbildung 31(a) zeigen, dass  $\alpha$ -Synuclein-Monomere bis zu einer Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  keinen Einfluss auf das Konformationsgleichgewicht des telomerischen G-Quadruplexes haben. Um mögliche Effekte der stark von hohen Makromolekülkonzentrationen geprägten Umgebung in lebenden Zellen Rechnung zu tragen, wurden die Messungen auch unter Zugabe von 30 Gew.-% Ficoll PM 70 durchgeführt. Hierbei ist der Anteil der parallelen Konformation zwar leicht von ca. 20 auf ca. 30 % erhöht, eine Abhängigkeit von der  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration ist unter Berücksichtigung des Fehlers allerdings nicht zu erkennen (Abbildung 30(b) und Abbildung 31(b)).

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

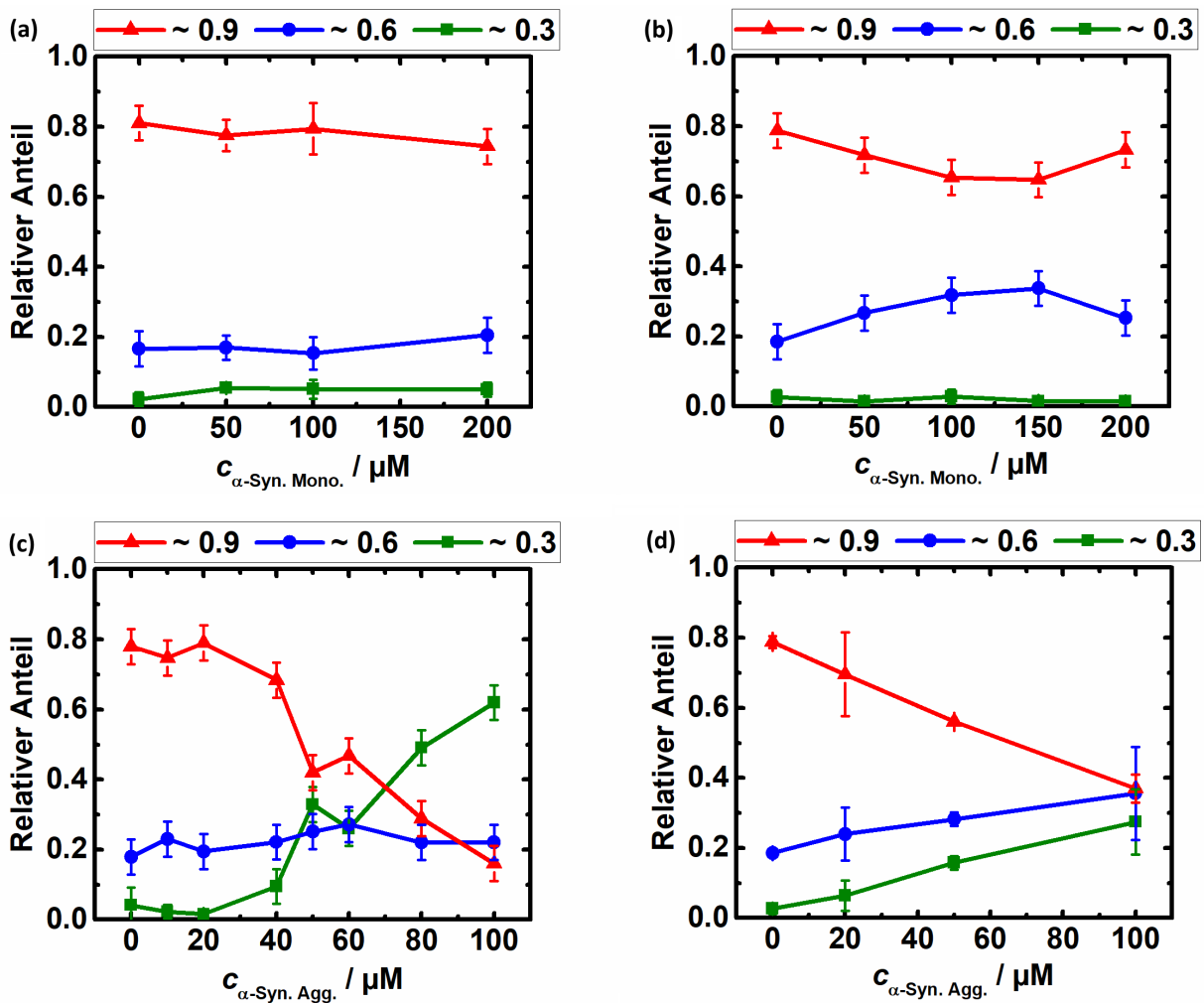


Abbildung 31: Relative Anteile des G-Quadruplex-Konstruktes (G1+G2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration von monomerem (a), (b) und aggregiertem (c),(d)  $\alpha$ -Synuclein und bei zusätzlicher Zugabe von 30 Gew.-% Ficoll PM 70 (b), (d). In allen vier Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.

Wird statt der  $\alpha$ -Synuclein-Monomere die aggregierte Form eingesetzt, zeigen sich wiederum deutliche Veränderungen des Konformationsgleichgewichts des telomerischen G-Quadruplexes. Neben einer geringen Verbreiterung des Peaks um  $E \approx 0.9$  ist vor allem die Zunahme des Anteils entfalteter DNS von  $\sim 0\%$  auf  $\sim 60\%$  bei Erhöhung der  $\alpha$ -Synuclein-Aggregatkonzentration von 0  $\mu\text{M}$  auf 100  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Über den Verlauf der Konzentrationserhöhung bis 100  $\mu\text{M}$  sinkt der Anteil der antiparallelen Konformation entsprechend von ca. 80 % auf ca. 20 %, während der Anteil der parallelen Konformation mit ca. 25 % gleich bleibt (Abbildung 30(c) und Abbildung 31(c)). Wird dem Puffer allerdings 30 Gew.-% Ficoll PM 70 zugesetzt, ist der Anstieg des Anteils entfalteter DNS deutlich geringer ausgeprägt. Der Anteil der antiparallelen Konformation sinkt hier

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

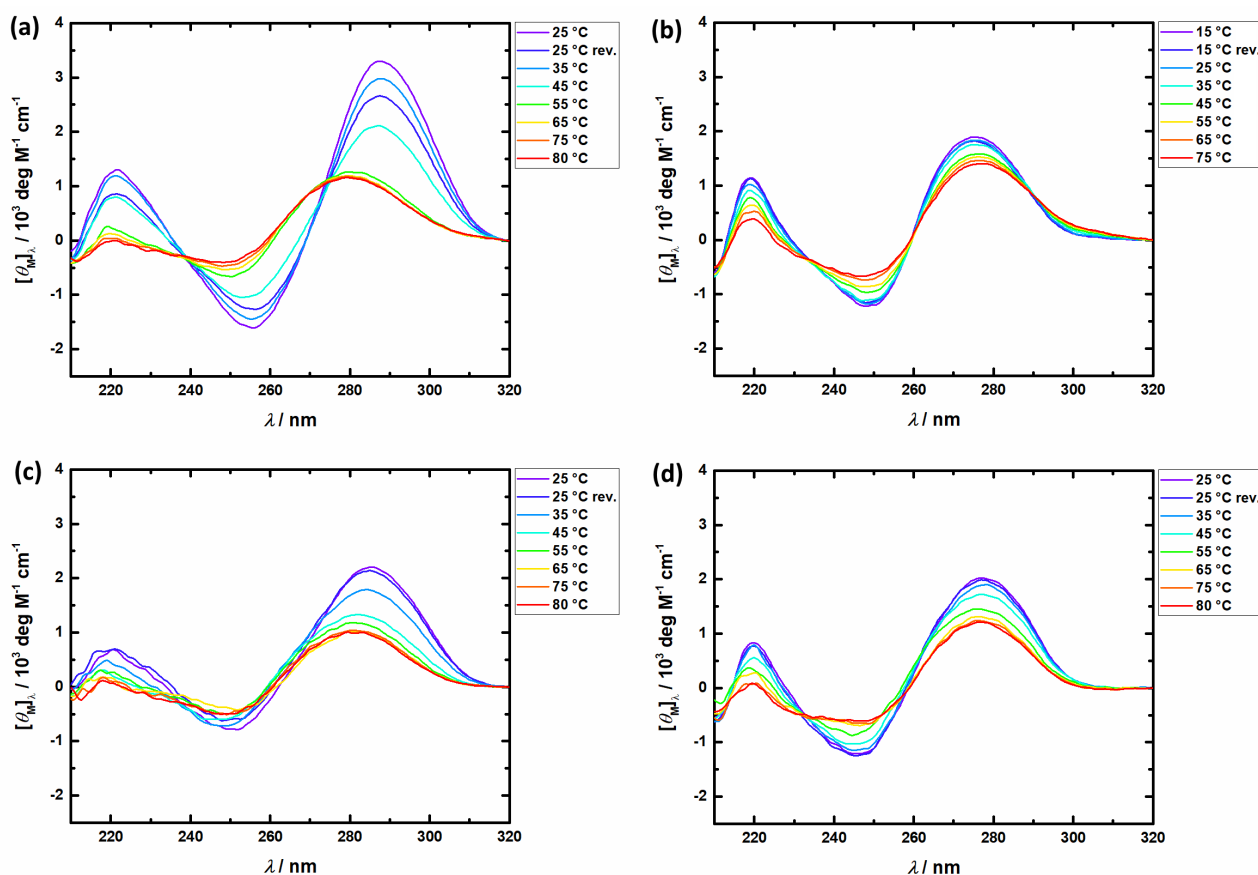
bei Erhöhung der  $\alpha$ -Synuclein-Aggregatkonzentration bis 100  $\mu\text{M}$  von ca. 80 % auf ca. 35 %, während der Anteil parallel Konformation leicht von  $\sim 20$  % auf  $\sim 35$  %, und der Anteil der entfalteten Konformation von  $\sim 0$  % auf  $\sim 25$  % steigt (Abbildung 30(d) und Abbildung 31(d)). Der makromolekulare *Crowder* Ficoll PM 70 verringert somit die durch die  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate ausgelöste G-Quadruplex-Entfaltung, welche ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein einsetzt.

LIU *et al.* haben für eine Kombination von G- und C-reiche DNS gezeigt, dass diese bei saurem pH in einem Gleichgewicht aus Doppelstrang, G-Quadruplex und i-Motiv vorliegt.<sup>36</sup> Bei neutralem pH wiederum bildet sich *in vitro* kein vollständig gefaltetes i-Motiv aus, die C-reiche Sequenz liegt vielmehr partiell gefaltet oder ungefaltet vor.<sup>41</sup> Dieses Gleichgewicht wird *in vivo* möglicherweise durch den intrazellularen *Crowding*-Effekt verschoben.<sup>112</sup>

Da in der Literatur<sup>11,113,114</sup> zur Untersuchung der telomerischen C-reichen Wiederholungseinheit in der Regel die Sequenz C4 eingesetzt wird, diese allerdings für FRET-Messungen mit den bisher verwendeten ATTO-Fluorophoren aufgrund der geringen Länge ungeeignet ist, wurden zunächst im Rahmen der vom Autor betreuten Bachelorarbeit von Pascal Hübner das Konformationsverhalten der Sequenzen C4 und C3+DS1 mittels CD-Spektroskopie untersucht. Die temperaturabhängigen Daten der DNS sind in Abbildung 32 dargestellt.



## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation



**Abbildung 32: CD-Spektren telomerischer i-Motiv-DNS. C4 (a) und C3+DS1 (c) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 5, C4 (b) und C3+DS1 (d) in 20 mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ -Puffer bei pH 7.5. Die DNS-Konzentration betrug 15  $\mu\text{M}$ .**

In Abbildung 32(a) sind die CD-Spektren von C4 in Abhängigkeit der Temperatur bei pH 5 dargestellt. Es sind bei 25 °C klar die typischen Peaks eines i-Motifs bei ca. 290 nm (positiv) und ca. 260 nm (negativ) erkennbar.<sup>36</sup> Ein weiterer Peak liegt um 220 nm. Mit zunehmender Temperatur nimmt der Peak bei 290 nm ab und verschiebt sich zu kleineren Wellenlängen. Bei 80 °C liegt der positive Peak bei ca. 280 nm, während der negative Peak fast vollständig verschwunden ist. Der dritte Peak um 220 nm sinkt ebenfalls. Ein BOLTZMANN-Fit des Elliptizitätsverlaufs am Maximum von 287 nm nach Gleichung (8) ergab eine Entfaltungstemperatur von  $45.5 \pm 0.6$  °C. Abbildung 32(b) zeigt keinen Peak bei 290 nm, sondern von Anfang an positive Peaks bei 280 nm und 220 nm, sowie einen negativen Peak bei ca. 250 nm. Die temperaturabhängige Abnahme dieser Peaks lässt darauf schließen, dass auch hier eine geordnete Struktur wie ein unvollständig gefaltetes i-Motiv mit weniger H-Brücken vorliegt. Ebenfalls möglich ist, dass die DNS bereits weitestgehend entfaltet vorliegt und die Reduktion der Ordnung auf eine größere Fluktuation der zufälligen Konformationen aufgrund der höheren Temperatur hindeutet. Für beide Theorien gibt es Hinweise

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

aus der Literatur.<sup>40,41</sup> Das Vorliegen zweier isochroistischer Punkte spricht allerdings für einen Zweizustandsübergang und somit für eine teilgefaltete Struktur bei niedrigeren Temperaturen statt einer Vielzahl unterschiedlicher Konformationen einer entfalteten DNS. In Abbildung 32(c) und (d) sind analoge Messdaten für C3+DS1 abgebildet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde von jedem Spektrum von C3+DS1 das Spektrum von DS1+DS2 bei den gleichen Bedingungen abgezogen. Dies soll insbesondere Einflüsse auf das Spektrum reduzieren, welche sich aus Veränderungen im Doppelhelixbereich der DNS temperaturbedingt ergeben (Abbildung 19). Im Falle von C3+DS1 bei pH 5 ist das Maximum bei 25 °C bereits niedriger und zu kleineren Wellenlängen verschoben als im Falle von C4. Auch die Entfaltungstemperaturen von  $45.0 \pm 0.6$  °C (C4) und  $37.1 \pm 0.7$  °C (C3+DS1) deutet daraufhin, dass die i-Motiv-Konformation durch den Doppelstrang destabilisiert wird. Bei pH 7.5 hingegen zeigen sich nach entsprechendem Abzug der Doppelstrangspektren kaum Unterschiede. Die Entfaltungstemperaturen lagen bei  $40.6 \pm 0.8$  °C (C4) und  $47.2 \pm 0.7$  °C (C3+DS1). Dies weist erneut auf eine Stabilisierung der teilgefalteten Konformation durch den Doppelstrangbereich hin. Vergleichende smFRET-Messungen bei 25 °C und pH 5 sowie pH 7.5 (Abbildung 33) zeigen für beide pH-Werte jeweils einen Peak. Bei pH 5 liegt der Peak bei 1, während bei pH 7.5 ein Peak um mit einem Maximum zwischen 0.5 und 0.6 sichtbar ist. Unter Berücksichtigung von Literaturdaten aus NMR-, CD- und smFRET-Messungen, sowie den durchgeführten CD-Messungen, kann dem Peak mit hoher FRET-Effizienz das vollständig gefaltete i-Motif zugeordnet werden, während dem Peak zwischen 0.5 und 0.6 eine teilgefaltete Konformation zugeordnet wird.<sup>40,41,115</sup>

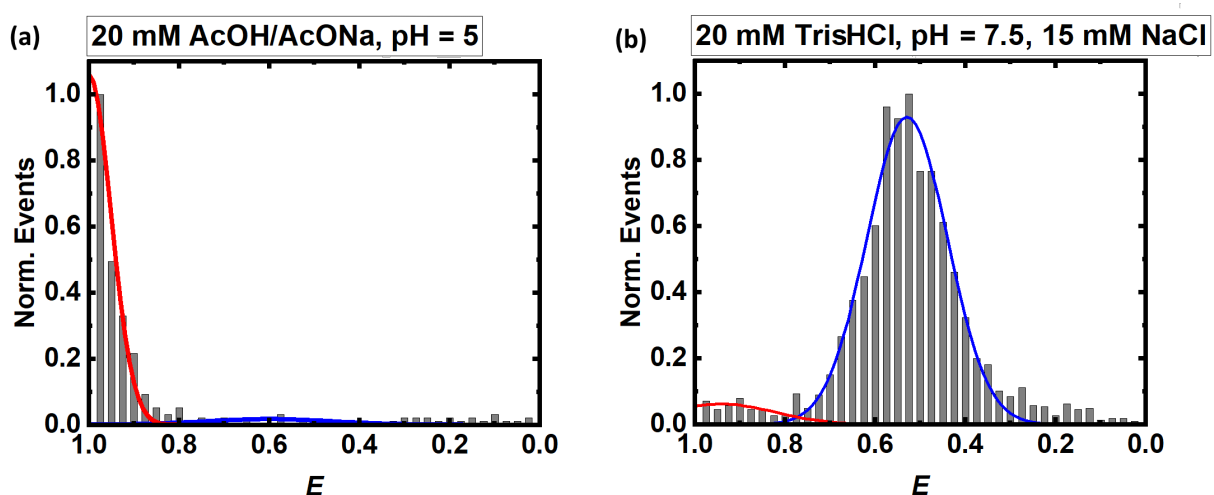
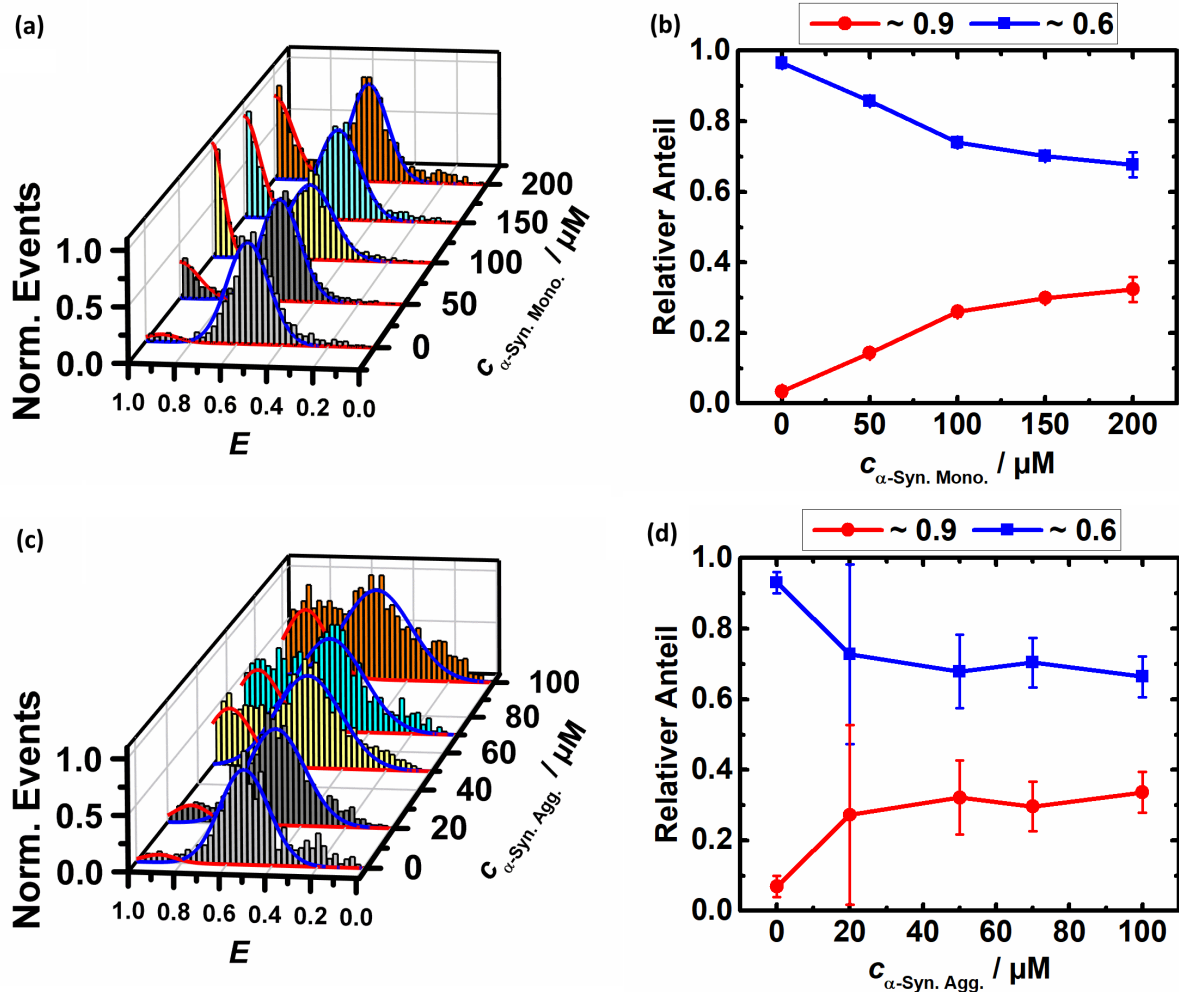


Abbildung 33: FRET-Effizienz-Histogramme von C1+C2 (50 pM) bei 25 °C in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH = 5 (a) und in 20 mM TrisHCl-Puffer mit 15 mM NaCl bei pH = 7.5 (b).

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

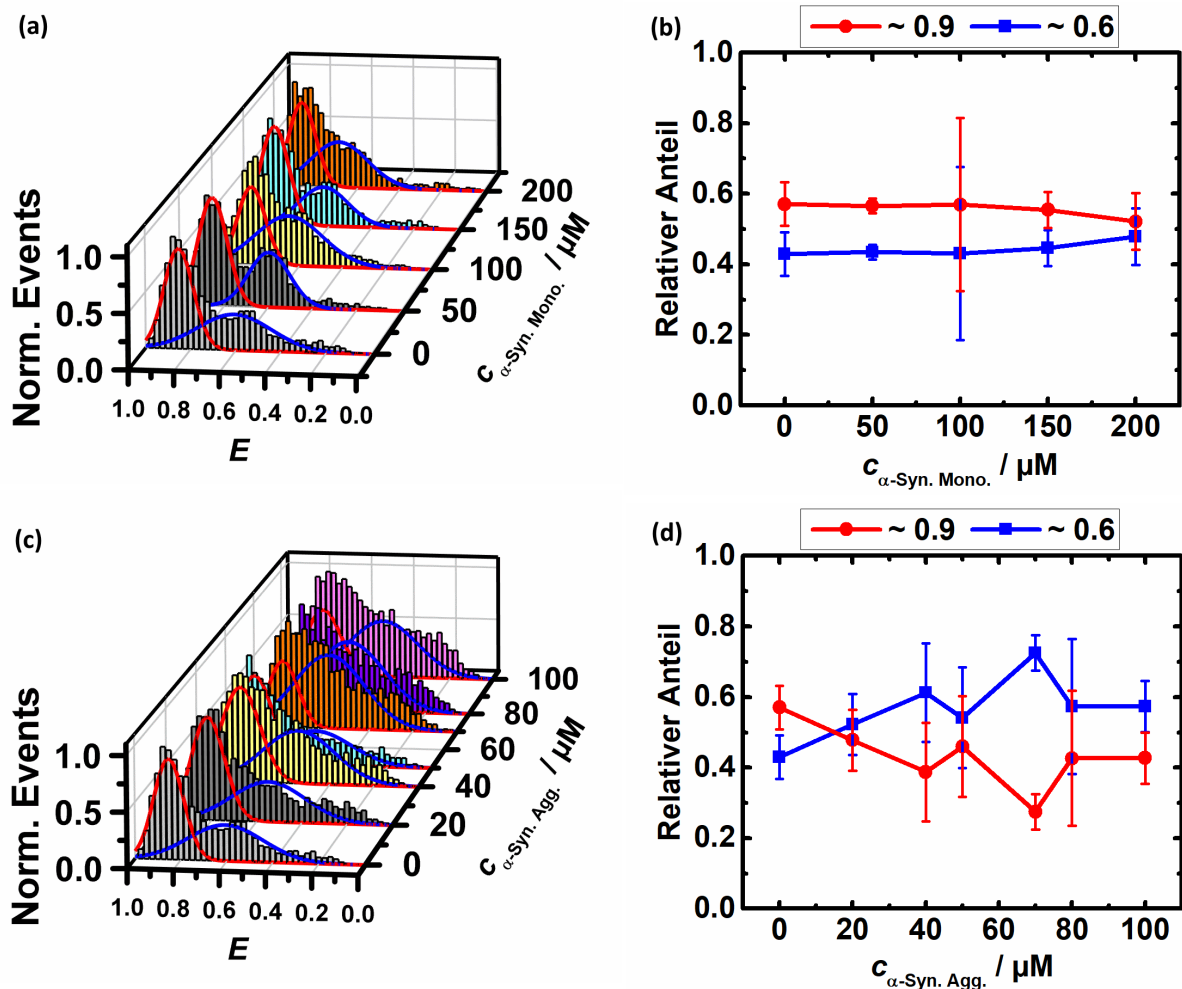


**Abbildung 34:** FRET-Effizienz-Histogramme (a), (c) und relativer Anteil (b), (d) des i-Motiv-Konstruktes (C1+C2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl bei pH 7.5 und  $25^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit der Konzentration monomeren  $\alpha$ -Synucleins (a), (b) und aggregierten  $\alpha$ -Synucleins (c), (d). In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca.  $50 \mu\text{M}$ .

Im Gegensatz zu den Auswirkungen des  $\alpha$ -Synucleins auf die G-Quadruplex-Sequenz führt sowohl die Zugabe von monomerem als auch von aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein zu einer schwachen Induktion der Faltung der i-Motiv-Konformation (Abbildung 34). Der Anteil des vollständig gefalteten i-Motivs steigt hierbei bei steigender Konzentration an monomerem  $\alpha$ -Synuclein von  $\sim 0\%$  auf  $\sim 35\%$  ( $200 \mu\text{M}$ ). Der Anteil der partiell gefalteten Struktur nimmt entsprechend von  $\sim 100\%$  auf  $\sim 65\%$  ab. Für aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein sind die Änderungen der Konformationsanteile schon bei geringeren Konzentrationen ähnlich ausgeprägt. Der Anteil von  $\sim 35\%$  gefaltetem i-Motiv wird bereits bei einer Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  erreicht und bleibt bis zur höchsten gemessenen Konzentration von  $100 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten konstant. Die größte Veränderung findet

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

jeweils bis zur Hälfte der maximal eingesetzten  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration statt (Abbildung 34(b) und (d)).



**Abbildung 35:** FRET-Effizienz-Histogramme (a), (c) und relativer Anteil der Konformationen (b), (d) des i-Motiv-Konstruktes (C1+C2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl und 30 Gew.-% Ficoll PM 70 bei pH 7.5 und  $25^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit der Konzentration monomeren  $\alpha$ -Synucleins (a), (b) und aggregierten  $\alpha$ -Synucleins (c), (d). In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca.  $50 \mu\text{M}$ .

Wird  $\alpha$ -Synuclein mit 30 Gew.-% Ficoll PM 70 kombiniert, liegt bereits ohne  $\alpha$ -Synuclein ca. 60 % der DNS (C1+C2) gefaltet und 40 % teilgefaltet vor. Eine Erhöhung der  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration führt bei den Monomeren zu keiner Veränderung über den Bereich bis  $200 \mu\text{M}$ . Somit zeigt sich kein additiver Effekt von Ficoll und monomerem  $\alpha$ -Synuclein. Bei der Zugabe von Aggregaten dreht sich das anfängliche Verhältnis von 60 % i-Motiv und 40 % teilgefalteter DNS ab einer Konzentration von ca.  $20 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein um, wobei die Fehler der Anteile, möglicherweise

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

aufgrund von Lichtstreuungseffekten der Aggregate, recht groß ausfallen. Der gegensätzliche Effekt könnte mit einer beginnenden Fibrillenbildung zusammenhängen. Die Aggregate sind zum Anfangszeitpunkt weitestgehend amorph und im beschriebenen Größenprofil (Kapitel 5.3). Crowder beschleunigen die anschließende Fibrillenbildung wie bereits UVERSKY *et al.* gezeigt haben.<sup>116</sup>

Die Druckabhängigkeit des Konformationsverhalten der Sequenz (C1+C2) wurde ebenfalls untersucht. In TrisHCl Puffer bei pH 7.5 lag bis zu einem Druck von 1.5 kbar ausschließlich die unvollständig gefaltete Konformation vor (Abbildung 36A und B). Auch die Zugabe von 1 M TMAO veränderte die Konformation nicht (Abbildung 36C und D).

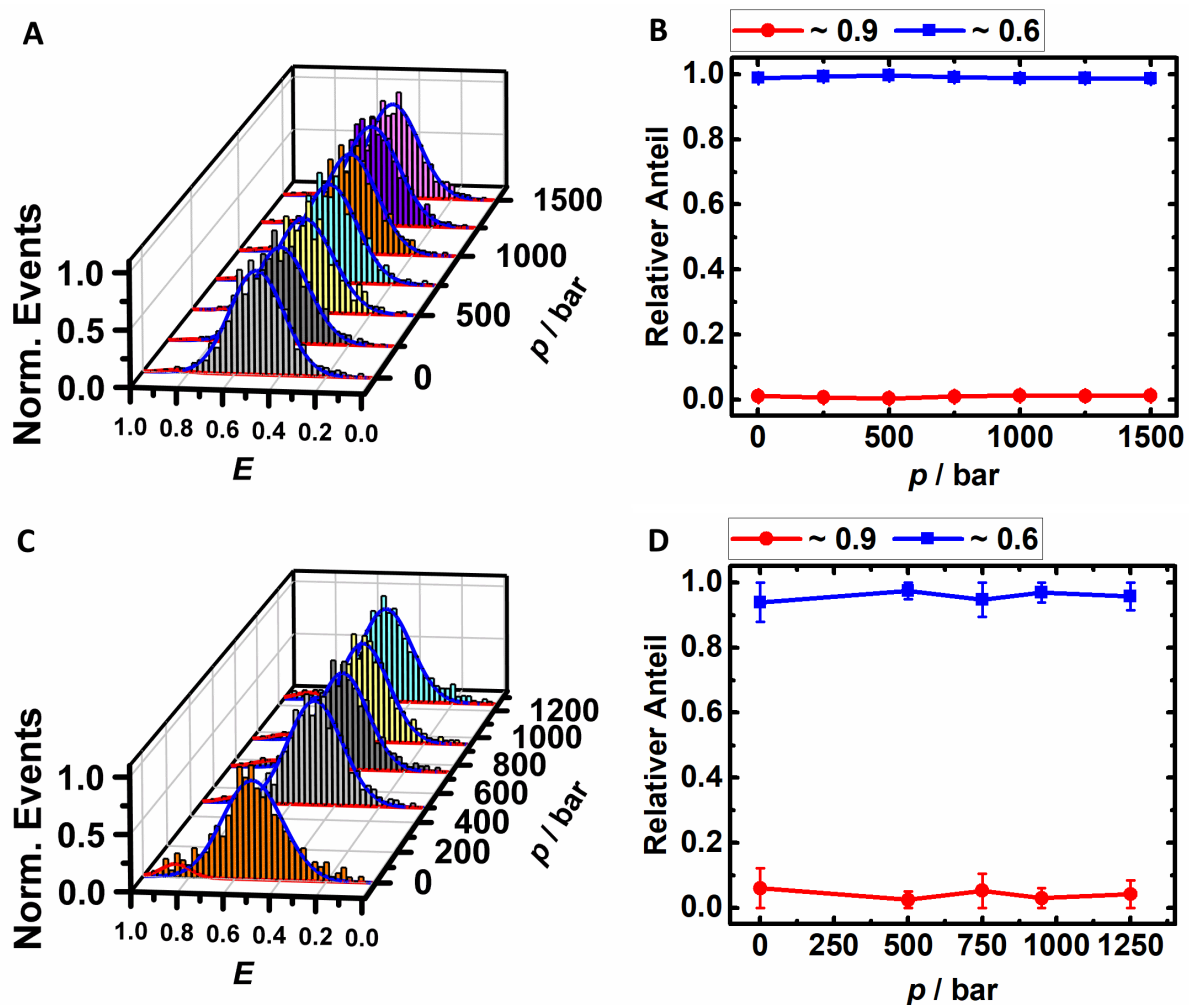
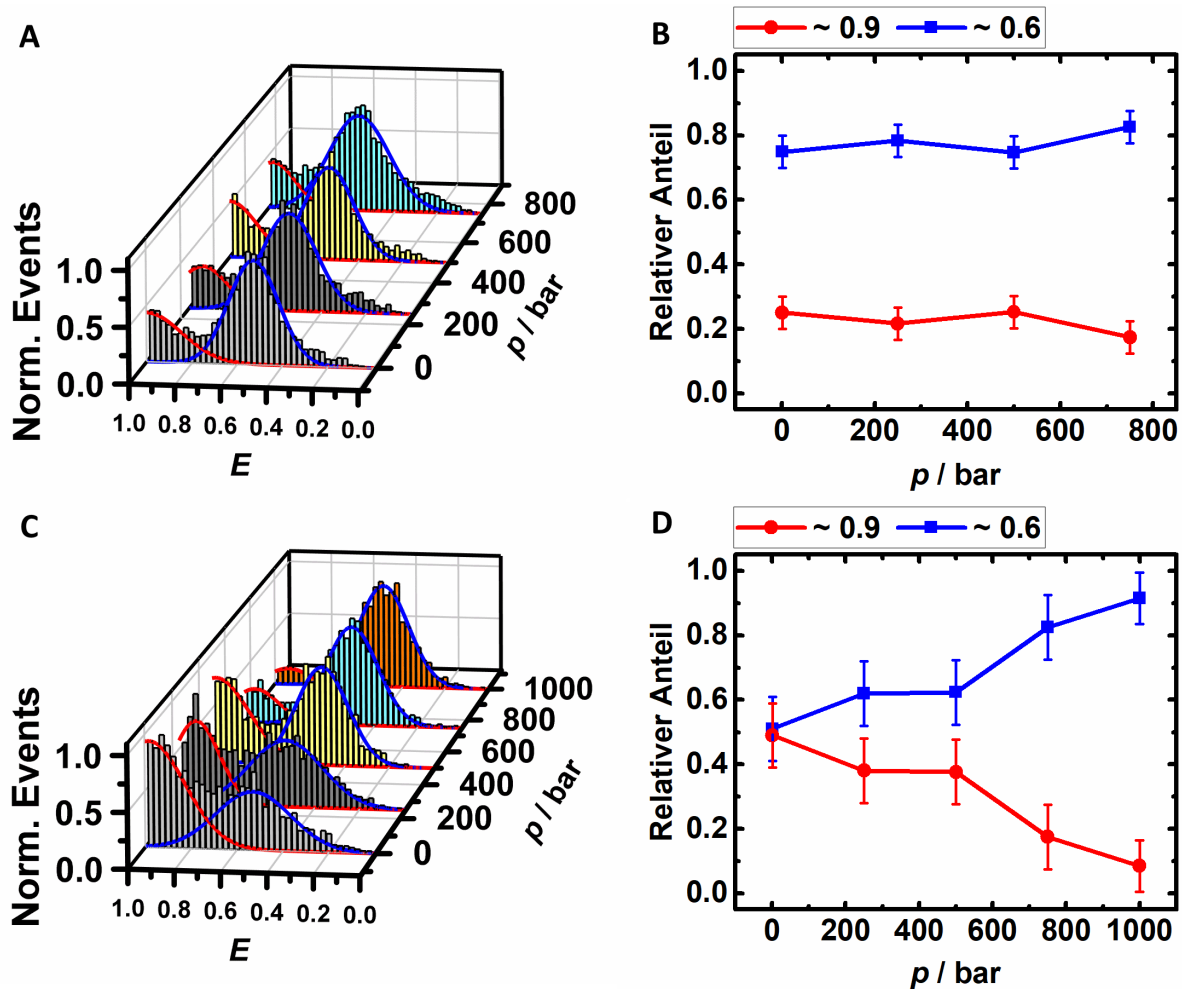


Abbildung 36: FRET-Effizienz-Histogramme (A, C) und relativer Anteil der Konformationen (B, D) des i-Motiv-Konstruktes (C1+C2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl in Abhängigkeit des Drucks. Die Proben für C und D enthielten zusätzlich 1 M TMAO. In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

Die durch Zugabe von  $\alpha$ -Synuclein induzierte i-Motiv-Konformation war im Falle von 100  $\mu\text{M}$  monomerem Protein gering (ca. 25 %). Das Konformationsgleichgewicht ist allerdings bis mindestens 750 bar druckstabil (Abbildung 37(a) und (b)). Anders verhielt es sich bei der Zugabe von aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein. Hier war der induzierte Anteil an der i-Motiv-Konformation größer (ca. 50 %), sank allerdings mit zunehmendem Druck auf ca. 15 % bei 1000 bar (Abbildung 37(c) und (d)).



**Abbildung 37:** FRET-Effizienz-Histogramme (A), (C) und relativer Anteil der Konformationen (B), (D) des i-Motiv-Konstruktes (C1+C2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl in Abhängigkeit des Drucks. Die Proben für A und B enthielten zusätzlich 100  $\mu\text{M}$  monomeres  $\alpha$ -Synuclein, die Proben für C und D 100  $\mu\text{M}$  aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein. In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.

Da der Anteil des gefalteten i-Motivs in etwa dem Wert für monomeres  $\alpha$ -Synuclein bei jeweils 750 bar entspricht, ist ein Großteil des Druckeffektes vermutlich auf die Dissoziation der Aggregate zurückzuführen. Belegt wird die Dissoziation durch druckabhängige Ensemble-

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

Fluoreszenzmessungen von  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten mit Thioflavin-T (ThT) (Abbildung 38) und auch durch Ergebnisse aus der Literatur, die eine Dissoziation von oligomerem  $\alpha$ -Synuclein im Bereich bis 1000 bar gezeigt haben.<sup>117</sup> Im Falle der Messungen mit aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein in der Hochdruckkapillare lässt sich eine deutliche Erhöhung des faltenden Effektes erkennen (ca. 50 % statt ca. 35 % i-Motiv-Konformation in Abbildung 34(d) und Abbildung 37(d)). Dies kann auf die unterschiedlichen Messzellen für konzentrations- und druckabhängige Messungen zurückgeführt werden. In den druckabhängigen Messungen wurden Kapillaren mit einem Innendurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  genutzt, während die konzentrationsabhängigen Messungen auf Deckgläschen durchgeführt wurden. Im ersteren Fall ist das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen und damit auch die Wechselwirkungen mit der Polysorbat 80 beschichteten Glasoberfläche deutlich erhöht. Für monomeres  $\alpha$ -Synuclein könnten Wechselwirkungen des unpolaren *non-amyloid- $\beta$ -component* (NAC)-Bereichs (Aminosäure (AS) 61-95)<sup>118</sup> mit dem unpolaren Lipidbereich des Polysorbat 80 ein häufigeres Auftreten intermediärer Zwischenstrukturen begünstigen. Im Fall des aggregierten  $\alpha$ -Synucleins ist der unpolare Proteinbereich für die Assoziation der Monomere verantwortlich und daher für Wechselwirkungen mit dem Polysorbat 80 weniger zugänglich. Hier ist eine Erhöhung der Aktivität aufgrund eines Ausschlusses von der Oberfläche zu vermuten, welche sich in einem größeren Effekt widerspiegelt.

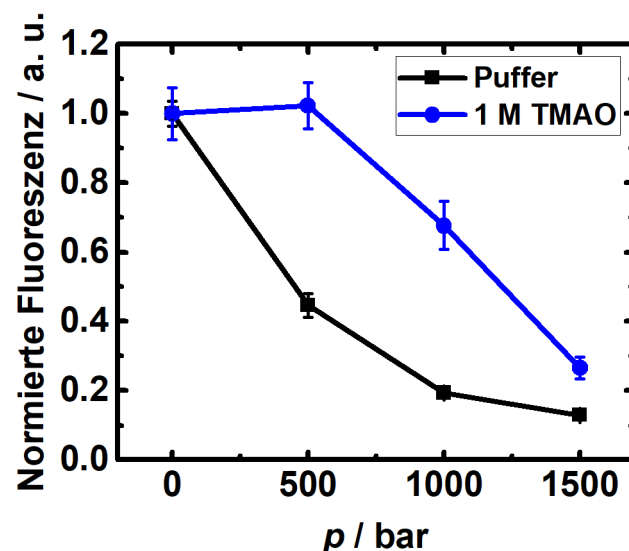


Abbildung 38: Druckabhängige Thioflavin-T-Fluoreszenz für  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate.

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

Weiter wurde die Wechselwirkung des i-Motivs mit  $\alpha$ -Synuclein auch von 1 M TMAO beeinflusst. Im Fall von monomerem  $\alpha$ -Synuclein in Kombination mit 1 M TMAO wurde der Effekt des  $\alpha$ -Synucleins verstärkt. Der Anteil des gefalteten i-Motivs lag im gemessenen Druckbereich bei ca. 60 % (Abbildung 39A und B), während der Effekt des aggregierten  $\alpha$ -Synucleins vermindert wurde (Abbildung 39C und D). Hierbei lag der Anteil des gefalteten i-Motivs bei nur 20 % gegenüber ca. 50 % bei 1 bar ohne TMAO.

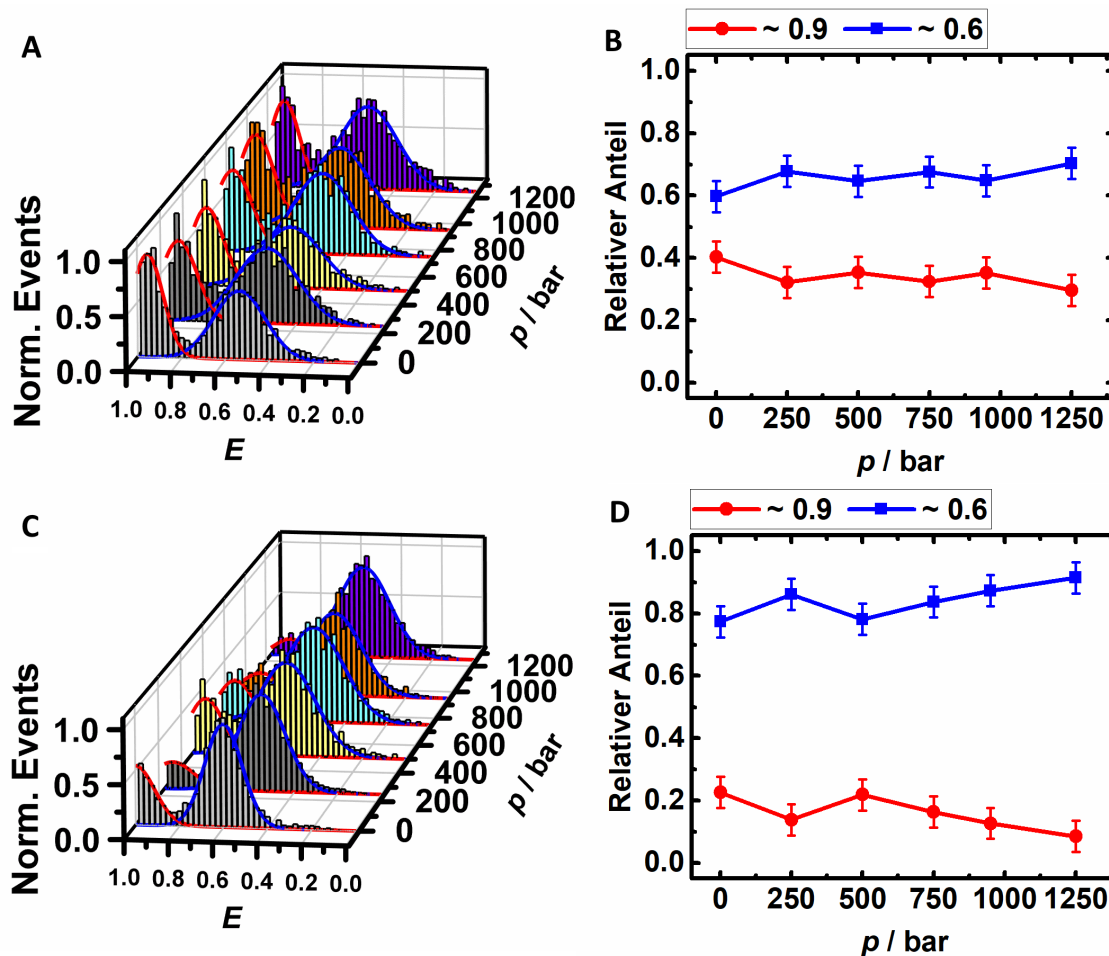


Abbildung 39: FRET-Effizienz-Histogramme (A), (C) und relativer Anteil der Konformationen (B), (D) des i-Motiv-Konstruktes (C1+C2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl und 1 M TMAO in Abhängigkeit des Drucks. Die Proben für A und B enthielten zusätzlich  $100 \mu\text{M}$  monomeres  $\alpha$ -Synuclein, die Proben für C und D  $100 \mu\text{M}$  aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein. In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca.  $50 \text{ pM}$ .

Vergleichsmessungen von i-Motiv und G-Quadruplex mit monomerem und aggregiertem Lysozym sind in Abbildung 40 und 41 dargestellt. Unterschiede zu den Messungen mit  $\alpha$ -Synuclein ergaben sich insbesondere für die Messungen des i-Motivs mit monomerem Lysozym. Hier ist keine



## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

Änderung der Konformation im Konzentrationsbereich bis 200  $\mu\text{M}$  Lysozym zu sehen. Aggregiertes Lysozym führte oberhalb von 50  $\mu\text{M}$  zur verstärkten Faltung des i-Motivs. Der Effekt ist hier sogar stärker als mit  $\alpha$ -Synuclein. Während der Anstieg der gefalteten Konformation im Fall von 100  $\mu\text{M}$  aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein von 0 auf 35 % ansteigt, erhöht sich der Anteil mit aggregiertem Lysozym auf ca. 55 %. Die Ergebnisse für die G-Quadruplex-Struktur ähneln denen mit  $\alpha$ -Synuclein. Für monomeres Lysozym sind keine Konformationsänderungen im untersuchten Konzentrationsbereich von 200  $\mu\text{M}$  erkennbar. Aggregate führen hingegen in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zur Entfaltung von 80 % der vorliegenden DNS. Damit ist auch hier der Effekt des Lysozyms stärker als der von  $\alpha$ -Synuclein, welches zu einer ca. 60 %igen Entfaltung führt.

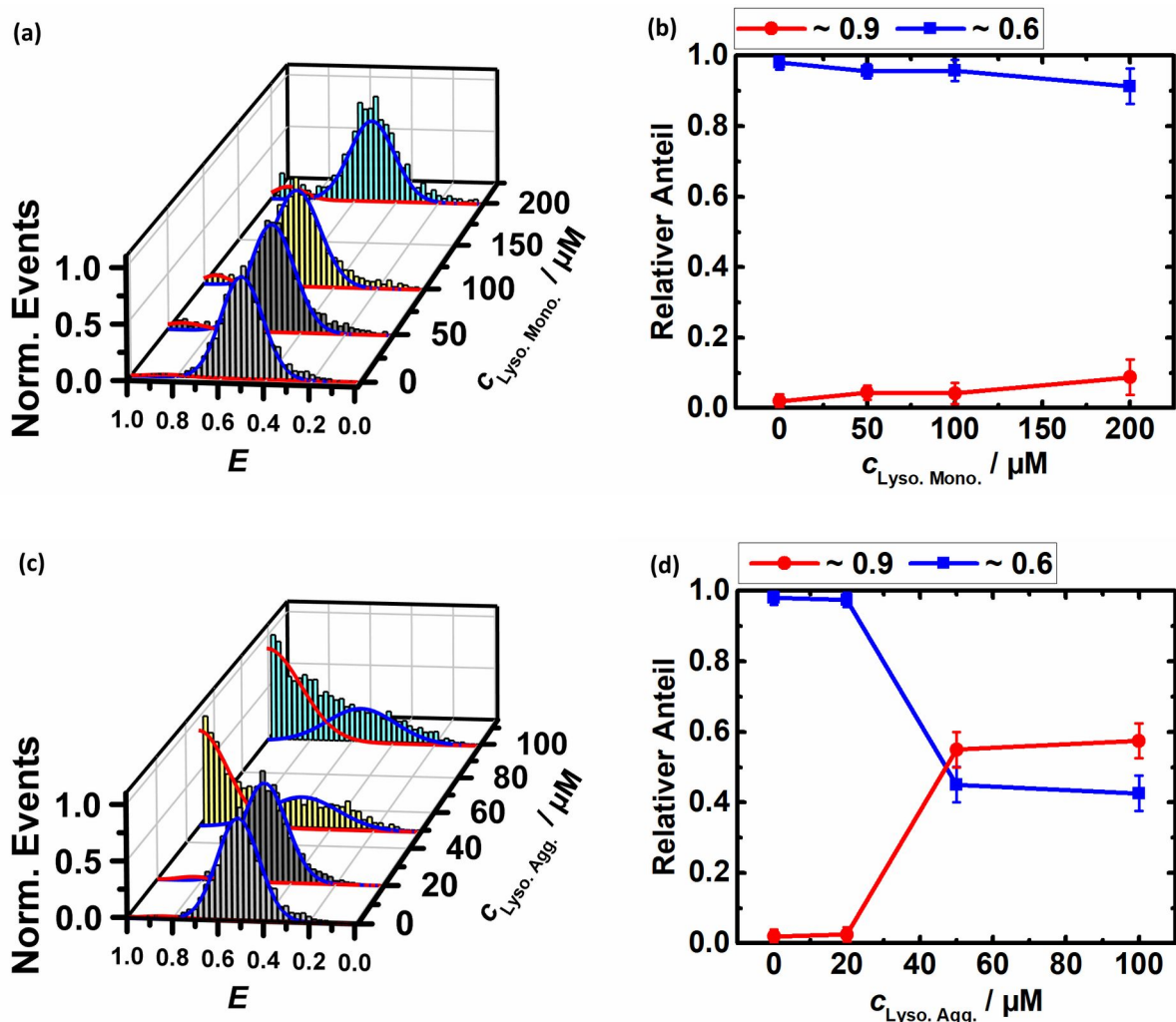


Abbildung 40: Telomerische i-Motiv-Sequenz (C1+C2) in 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. (a) und (b) zeigen das FRET-Effizienz-Histogramm und den Verlauf der Konformationsanteile in Abhängigkeit der Konzentration von monomeres Lysozym. (c) und (d) zeigen entsprechend die Abhängigkeit von aggregiertem Lysozym.

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

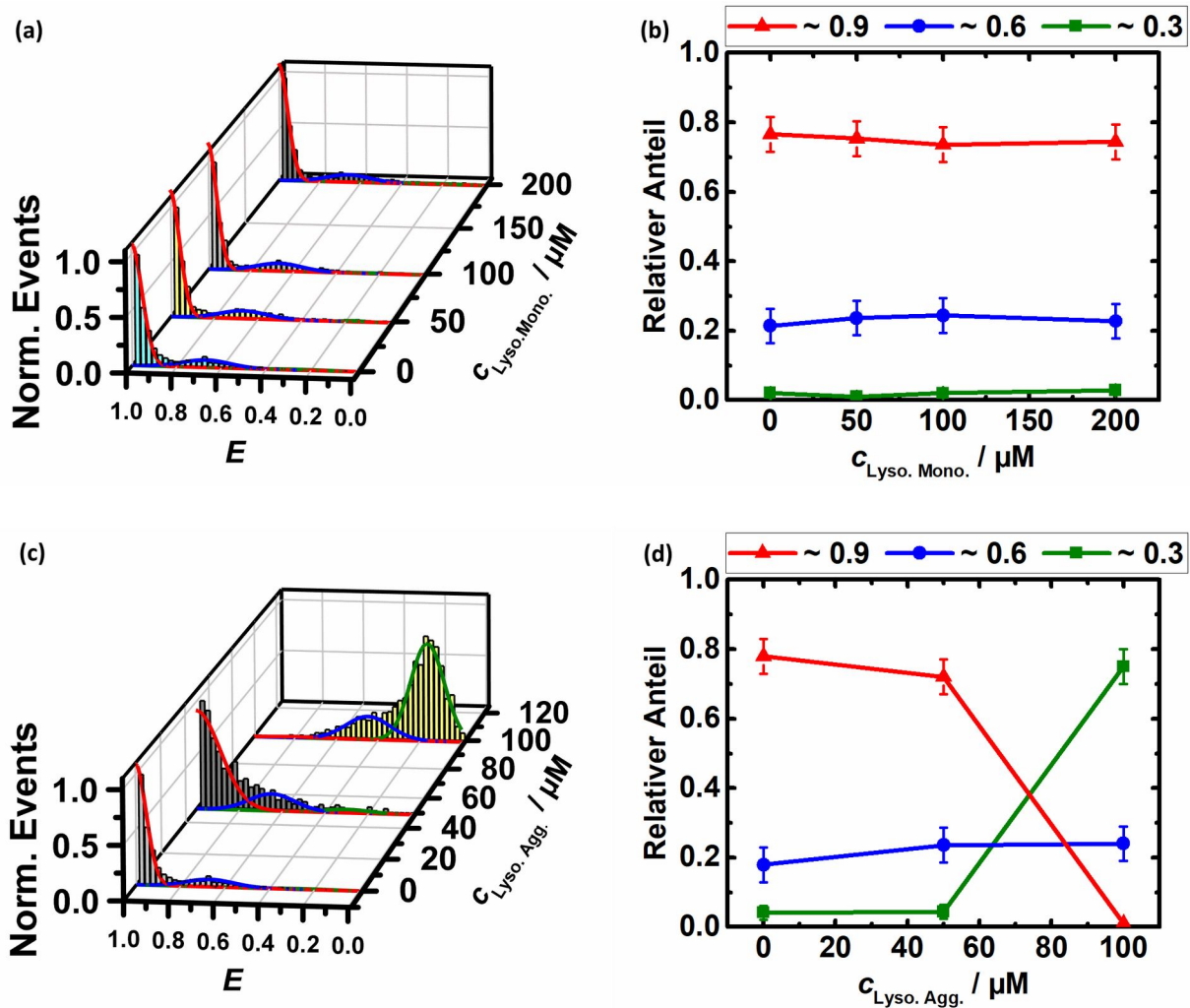


Abbildung 41: Telomerische G-Quadruplex-Sequenz (G1+G2) in 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. (a) und (b) zeigen das FRET-Effizienz-Histogramm und den Verlauf der Konformationsanteile in Abhängigkeit der Konzentration von monomerelem Lysozym. (c) und (d) zeigen entsprechend die Abhängigkeit von aggregiertem Lysozym.

Die Effekte von  $\alpha$ -Synuclein auf die G-Quadruplex-Sequenz (G5+DS1) der Promotorregion des (Proto-)Onkogen c-Myc (c-Myc-GQdp) waren deutlich geringer. Monomeres  $\alpha$ -Synuclein hatte ähnlich wie im Falle des telomerischen G-Quadruplex keinen nennenswerten Einfluss auf die Konformation. Aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein führte allerdings auch hier zu vermehrter Entfaltung von 20 % in reinem Puffer auf ca. 40 % oberhalb von 50  $\mu M$  aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein. Die geringeren Effekte können auf die höhere thermodynamische Stabilität des c-Myc-G-Quadruplexes zurückgeführt werden.<sup>119,120</sup>

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

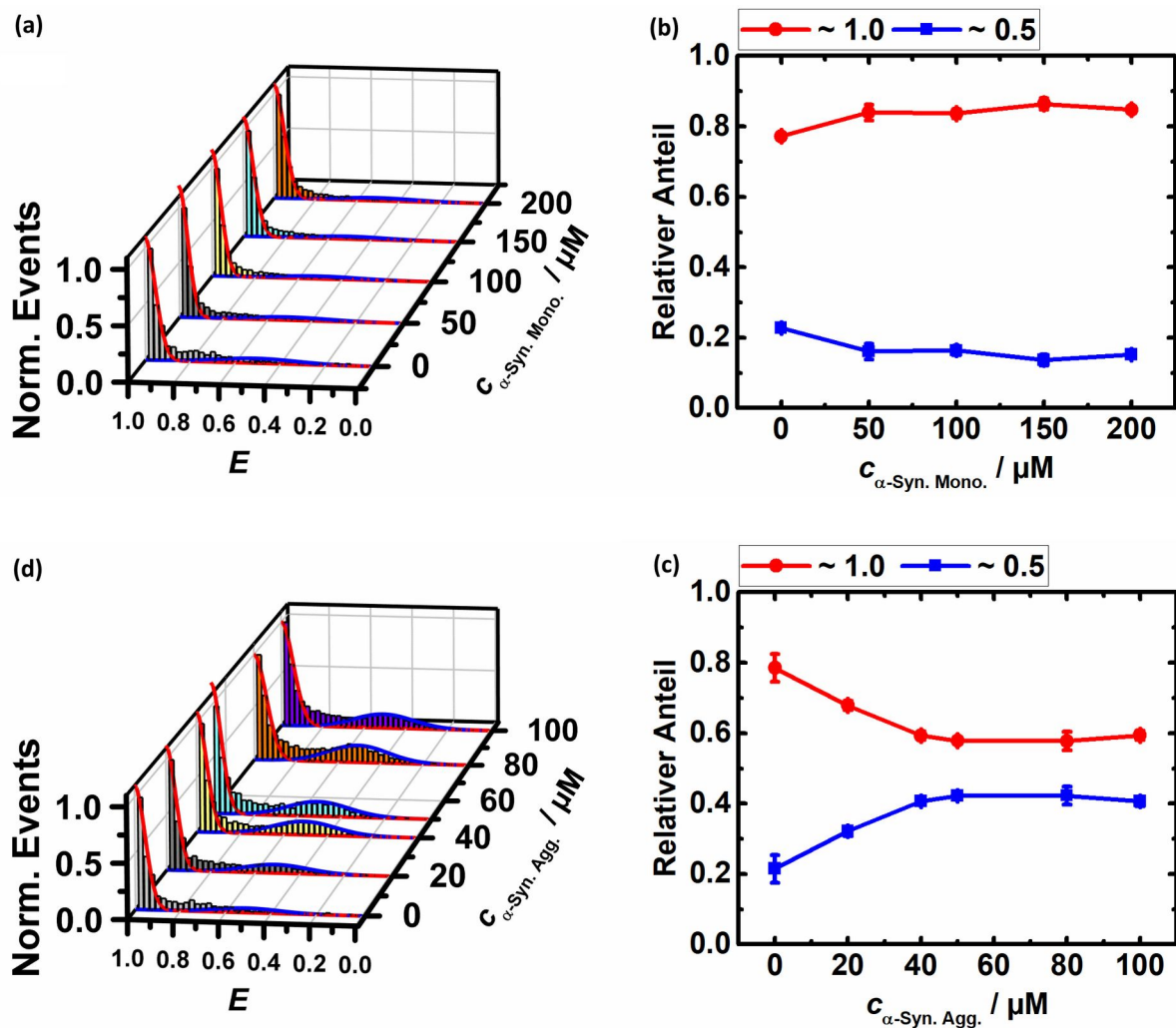


Abbildung 42: G-Quadruplex-Sequenz aus der c-Myc Promotorregion (G5+G2) in 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. (a) und (b) zeigen das FRET-Effizienz-Histogramm und den Verlauf der Konformationsanteile in Abhängigkeit der Konzentration von monomeres  $\alpha$ -Synuclein. (c) und (d) zeigen entsprechend die Abhängigkeit von aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein.

### 7.3 Diskussion

Aus der Literatur gibt es bereits klare Hinweise, dass positiv geladene IDPs, wie  $\alpha$ -Synuclein, eine hohe Affinität für Nukleinsäuren haben und entsprechend Komplexe bilden können.<sup>121–123</sup>  $\alpha$ -Synuclein kann in drei Bereiche unterteilt werden: Den positiv geladenen N-terminalen Bereich (AS 1-60), einen zentralen hydrophoben Bereich, die sogenannte NAC-Region (AS 61-95), welche auch für das Aggregationspotential verantwortlich ist, und einen durch die Aminosäuren Asp und Glu hoch negativ geladenen C-Terminus (AS 96-140).<sup>124</sup> Aufgrund des Phosphatrückgrats weist DNS

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

eine hohe negative Gesamtladung auf. Daher sind unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit den positiv geladenen  $\epsilon$ -Aminogruppen der im *N*-Terminus vorliegenden Lysinreste möglich.<sup>125</sup> Die unterschiedlichen Effekte der Aggregate und Monomere auf die G-Quadruplex-Konformation kommen möglicherweise durch eine höhere positive Nettoladung der Oberfläche der Proteinaggregate zustande.<sup>126</sup>

Die größeren Effekte des aggregierten Lysozyms gegenüber aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein könnte auf die höhere Anzahl potentiell positiv geladener Aminosäuren bei einer geringeren Gesamtgröße des Lysozyms und damit eine höhere positive Ladungsdichte zurückzuführen sein. Lysozym besteht aus 129 Aminosäuren mit sechs Lysinresten und elf Argininresten,  $\alpha$ -Synuclein hingegen enthält bei 140 Aminosäuren 15 Lysinreste. Unter der Annahme, dass die Lysin- und Argininreste bei einem pH von 7.5 auch im Protein positiv geladen sind, ergibt sich für Lysozym eine höhere positive Bruttoladung. Die unterschiedlichen Effekte der Monomere kann auf eine geringere Zugänglichkeit der positiv geladenen Aminosäuren im globulären Lysozym zurückgeführt werden. Der zusätzliche Energieaufwand zur Entfaltung des Lysozyms beschränkt somit die Wechselwirkungen mit der DNS. Im Fall des  $\alpha$ -Synucleins sind diese Beiträge aufgrund der IDP-Struktur nicht vorhanden. Die entsprechenden Ergebnisse bestärken darüber hinaus den Erklärungsansatz der Effekte mittels elektrostatischer Wechselwirkungen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass monomeres und aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein unterschiedliche Effekte auf nicht-kanonische DNS-Strukturen hat. Die Art der Effekte ist hierbei auch von der Sequenz und Konformation der DNS abhängig. Während monomeres  $\alpha$ -Synuclein keinen erkennbaren Effekt auf die Konformation des eingesetzten telomerischen G-Quadruplexes hatte, führte es zu einem höheren Anteil der i-Motiv-Konformation der C-reichen komplementären Sequenz. Aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein zeigte einen ähnlichen Effekt auf die C-reiche Sequenz wie die Monomere, allerdings schon bei etwa der Hälfte der Konzentration, und führte im Gegensatz dazu zu einer Entfaltung des G-Quadruplexes. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Effekte der Monomere und Aggregate könnte die herabgesetzte Entropie der Aggregate spielen, wodurch die Wechselwirkung mit der DNS zu einer geringeren negativen Entropieänderung und stärkeren Effekten führen würde. Die Unterschiede in den Effekten auf die verschiedenen Sequenzen liegen höchstwahrscheinlich an unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den verschiedenen Nukleobasen. Während die Schleifenregionen des G-Quadruplexes (TTA) hauptsächlich aus Pyrimidinbasen und das Zentrum (GGG) aus Purinbasen besteht, ist dies für das i-Motiv genau entgegengesetzt.

## Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation

LUSCOMBE *et al.* haben in einer Metastudie über Protein-DNS-Komplexe aus 3D-Strukturen der *Protein Data Bank* (PDB) der *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB) gezeigt, dass insbesondere die positiv geladenen Aminosäuren Asparagin und Lysin neben dem Phosphatrückgrat der DNS bevorzugt Wasserstoffbrückenbindungen mit Guanin eingehen.<sup>127</sup> Zufälliges *Docking* zwischen DNS und Proteinen in derselben Studie zeigte bevorzugte Wechselwirkungen von Lysin mit Adenin und Guanin gegenüber Cytosin und Thymin.<sup>127</sup> Die im Fall des i-Motiv bereits an der Oberfläche exponierten Adenine können somit direkt mit den Lysinseitenketten des  $\alpha$ -Synucleins wechselwirken. Die zusätzliche Ladungsabschirmung durch Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat reduziert die intramolekulare elektrostatische Repulsion. Auch eine möglicherweise lokal erhöhte Dichte an Protonen durch positiv geladene Lysinreste könnte die Bildung von Hemicytosin und damit die Bildung des i-Motivs begünstigen. Im Fall des G-Quadruplexes konkurrieren die Lysinreste hingegen direkt mit den konstituierenden Wasserstoffbrücken der HOOGSTEN-Basenpaarungen und der Koordination des zentralen  $\text{Na}^+$ -Ions. Dies erklärt, warum der Effekt auf den G-Quadruplex entfaltend ist und die hohe lokale Dichte an  $\alpha$ -Synuclein in aggregierter Form notwendig ist.

Makromolekulares *Crowding* verändert maßgeblich die Energiehyperfläche und das Konformationsgleichgewicht bimolekularer Systeme. Aufgrund des *excluded volume*-Effektes werden kompaktere Strukturen mit geringerer SASA stabilisiert.<sup>128,129</sup> Dies zeigte sich durch einen geringeren Anteil des durch 100  $\mu\text{M}$  an aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein entfalteten G-Quadruplexes bei Anwesenheit von 30 Gew.-% Ficoll. In 30 Gew.-% Ficoll PM 70 liegt C1+C2 auch bei pH 7.5 zu ca. 60 % als i-Motiv vor. Ähnliche Effekte sind bereits für andere *Crowder* wie PEG 2000 bekannt.<sup>41</sup> Zugabe von monomerem  $\alpha$ -Synuclein bis 200  $\mu\text{M}$  führte zu keinem weiteren Effekt. Wird von einer DNS-Protein-Komplexbildung bei der Ausbildung des i-Motivs in Verbindung mit  $\alpha$ -Synuclein ausgegangen, kann dies durch die Entropieabsenkung größerer Komplexe aufgrund des durch Ficoll PM 70 ausgeschlossenen Volumens erklärt werden (siehe auch Abbildung 7). Im Fall der Kombination von Ficoll PM 70 und  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate wirkten diese, unter Vorbehalt der großen Fehlerbereiche dieser Messreihe, sogar antagonistisch auf die i-Motiv-Konformation. Wie bereits in Kapitel 7.2 angemerkt, könnte dies mit einer durch Ficoll PM 70 ausgelösten Bildung von  $\alpha$ -Synuclein-Fibrillen zusammenhängen. Die längliche Struktur der Fibrillen könnte in diesem Fall längliche DNS-Konformationen begünstigen.

## **Einfluss von $\alpha$ -Synuclein auf G-Quadruplex- und i-Motiv-Konformation**

Aus den Hochdruckmessungen der C-reichen Sequenz C1+C2 in Kombination mit  $\alpha$ -Synuclein lassen sich Aussagen über die Art der Komplexbildung treffen. Druck bis 1500 bar beeinflusste die Ausbildung des gefalteten i-Motivs durch Wechselwirkungen mit monomerem  $\alpha$ -Synuclein nicht. Hier kann daher von der Ausbildung eines kompakten Komplexes ohne größere Kavitäten ausgegangen werden. Der stärkere Effekt des aggregierten  $\alpha$ -Synucleins wird wiederum durch Druck abgeschwächt. Separate Messungen mit  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten ohne DNS lassen darauf schließen, dass die Aggregate im gemessenen Druckbereich wieder dissoziieren und somit nur noch der Effekt des monomeren  $\alpha$ -Synucleins beobachtet werden kann. Erstaunlich sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der kombinierten Einflüsse von 100  $\mu$ M  $\alpha$ -Synuclein und 1 M TMAO auf die i-Motiv-Sequenz. Im Fall des monomeren  $\alpha$ -Synucleins steigt der Anteil des i-Motivs, im Fall des aggregierten  $\alpha$ -Synucleins wiederum sinkt der Anteil des i-Motivs jeweils in einer Lösung mit 1 M TMAO. In beiden Fällen ist keine Abhängigkeit vom Druck im gemessenen Bereich zu beobachten. Der synergistische Effekt von TMAO und monomerem  $\alpha$ -Synuclein kann durch den Ausschluss des TMAO von der Oberfläche des Proteinrückgrats erklärt werden. Hierdurch wird wahrscheinlich die Bildung eines kompakten DNS- $\alpha$ -Synuclein-Komplexes begünstigt. Da TMAO besonders in einer Konzentration von 1 M ebenfalls die Fibrillenbildung von  $\alpha$ -Synuclein beschleunigt,<sup>130</sup> ist der antagonistische Effekt von TMAO und aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein höchstwahrscheinlich auf den selben Mechanismus zurückzuführen wie für Ficoll PM 70 vorgeschlagen. Zugleich könnten direkte Wechselwirkungen von TMAO mit den positiv geladenen Seitenketten im N-terminalen Bereich des  $\alpha$ -Synucleins, welche von HONG und XIONG nachgewiesen wurden, die Interaktion mit den Nukleobasen und dem negativ geladene Phosphatrückgrat teilweise blockieren.<sup>131</sup>

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von im Nukleus vorkommendem  $\alpha$ -Synuclein und dessen pathogenen Aggregaten auf die mit der Genexpression in Zusammenhang stehenden nicht-kanonischen DNS-Konformationen, nicht vernachlässigt werden sollte. G-Quadruplexe und i-Motive stehen sowohl in den Telomeren als auch in den Promoterregionen direkt mit der Genexpression und -stabilität in Zusammenhang. Die Faltung und Entfaltung von G-Quadruplexen wirkt hier häufig wie ein Schalter für die Genexpression, dessen Veränderung durch aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein möglicherweise einen, bisher wenig erforschten, Mechanismus der Pathogenese darstellt.

# 8 Änderung der Konformationsdynamik eines DNS-*Hairpins* durch $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

Die Messungen der folgenden Studie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Sanjib Kumar Mukherjee durchgeführt.

## 8.1 Einleitung

DNS-Protein-Wechselwirkungen sowie die Konformationsstabilität der DNS sind für die Zellfunktion unerlässlich.<sup>125</sup> Es gibt Hinweise, dass  $\alpha$ -Synuclein und andere amyloidogene Proteine, welche in direktem Zusammenhang mit Parkinson und anderen neurodegenerativen Krankheiten stehen, Auswirkungen auf die Konformationsstabilität der DNS haben.<sup>102,132–134</sup> Die genauen durch Bindung amyloidogener Proteine ausgelösten Konformationsänderungen der DNS sind noch weitestgehend unerforscht.<sup>134,135</sup> Die Änderung der Genexpression bei Krankheiten wie Parkinson- und Alzheimer-Syndrom wird durch Konformationsänderungen der DNS beeinflusst.<sup>136,137</sup> Für beide Krankheiten konnte gezeigt werden, dass die DNS in *post mortem* untersuchten Neuronen von der nativen B-Form abweicht. Für Parkinson bildet sich eine veränderte B-Form, während bei Alzheimer die Z-Form eingenommen wird.<sup>136,137</sup> Die Faktoren, die zu dieser Änderung führen, sind bisher ungeklärt. Da  $\alpha$ -Synuclein die Transkription modulieren kann,<sup>138</sup> hat es einen erheblichen Einfluss auf das Genexpressionsprofil und kann so zu Fehlfunktionen von Neuronen führen.<sup>24,138,139</sup> Auch die DNS selbst zeigte *in vitro* die Eigenschaft, die Proteinaggregation zu verstärken.<sup>139</sup> Allerdings gibt es bislang nur wenige Studien, die sich mit der direkten Wechselwirkung zwischen  $\alpha$ -Synuclein und Nukleinsäuren beschäftigt haben. In diesem Zusammenhang sind insbesondere nicht-kanonische DNS-Strukturen, wie DNS-*Hairpins*, von großem Interesse, da diese eine entscheidende Rolle bei der DNS-Rekombination und -Umlagerung einnehmen.<sup>50,140,141</sup> Darüber hinaus ist in den letzten Jahren klar geworden, dass die Eigenschaften von Biomolekülen durch die *in vivo* vorliegenden *Crowding*-Bedingungen, verglichen mit verdünnten *in vitro* eingesetzten Puffern, stark beeinflusst werden.<sup>128,129,142–144</sup> Von besonderem Interesse in Verbindung hiermit sind Membran-freie Kompartimente, welche aus separierten flüssigen Phasen bestehen und meist von Protein oder Protein-RNS-Gemischen gebildet werden.<sup>145,146</sup> Der Einfluss dieser

## DNS-Hairpin und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

Kompartimentierung entsteht durch veränderte Reaktivitäten der zellularen Chemie.<sup>145,146</sup> Im Gegensatz zu Membran-umschlossenen Kompartimenten fehlt bei einer flüssig-flüssig Phasenseparation (*liquid-liquid phase separation*, LLPS), wie sie auch bei künstlichen wässrigen Zweiphasensystemen (*aqueous two-phase system*, ATPS) beobachtet werden kann, die physikalische Barriere, sodass der Austausch von Molekülen mit der Umgebung deutlich schneller verläuft. Bisher sind die Effekte von ATPS und LLPS auf die Konformation von Nukleinsäuren nur wenig untersucht worden. Eine bereits bekannte Auswirkung ist die Stabilisierung von DNS-Hairpins gegenüber der ebenfalls bekannten druckinduzierten Entfaltung des auch hier verwendeten DNS-Hairpins (DS1+DS2).<sup>43,61,147</sup> In der folgenden Studie wurde ein DNS-Hairpin untersucht, welcher aus einer 32 Adenin enthaltenden Schleife und einem kurzen komplementären intramolekularen Doppelstrang besteht und am Ende ein ATTO 550 modifiziertes Thymin trägt. Dieser Doppelstrang wird durch einen längeren intermolekularen Doppelstrang erweitert, wobei der kürzere Komplementärstrang ein ATTO 647N modifiziertes Thymin enthält (siehe Abbildung 43).

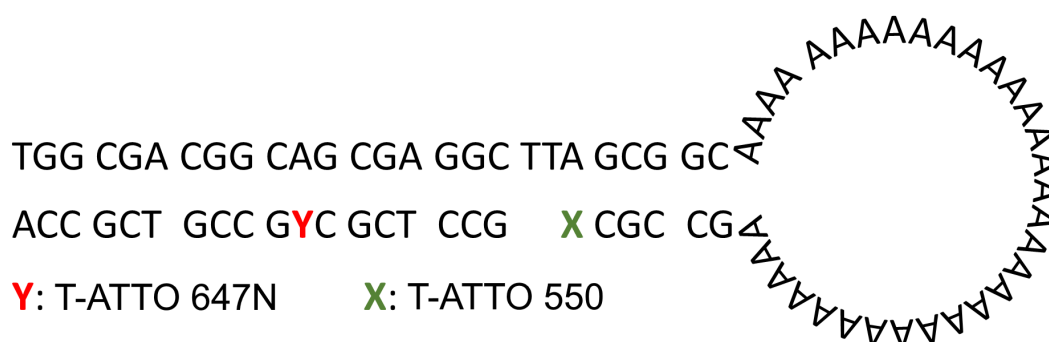


Abbildung 43: Sequenz und schematische Darstellung des verwendeten Hairpin-Konstruktes (DS1+DS2).

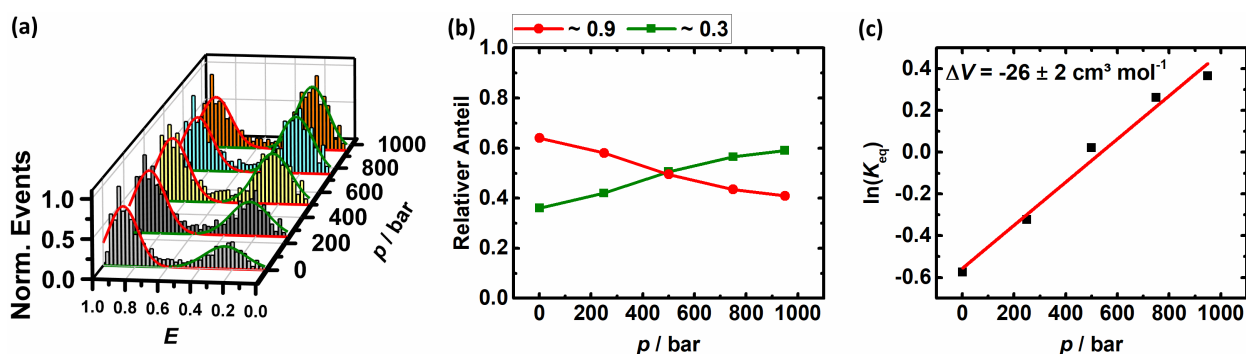
## 8.2 Ergebnisse

Falls nicht anderweitig angegeben wurden die gezeigten smFRET-Daten aus 30 minütigen Messungen bei 25 °C gewonnen. In wässriger Lösung in einem 20 mM TrisHCl Puffer bei pH 7.5 und 15 mM NaCl liegt dieses Hairpin-Konstruktes in einem Gleichgewicht aus geschlossenem Hairpin mit hybridisiertem intramolekularem Doppelstrang und entfalteter Form vor. Wie bereits bekannt ist, liegt das Verhältnis von Hairpin und offener Konformation bei 25 °C und pH 7.5 in etwa bei 3:2 (Abbildung 44).<sup>61,148</sup> Die druckinduzierte Entfaltung führt entsprechend zu einer Abstandsvergrößerung zwischen den Fluorophoren, welche ein FRET-Paar bilden. Somit kann der



## DNS-Hairpin und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

geringeren FRET-Effizienz  $E \approx 0.3$  eine regellose Anordnung und der FRET-Effizienz von  $E \approx 0.9$  der geschlossene *Hairpin* zugeordnet werden. In Abbildung 44 ist eine Einzelmessung der druckabhängige Entfaltung des DNS-*Hairpins* dargestellt. Da die Ergebnisse bereits aus der Literatur bekannt sind, wurde auf eine Wiederholung verzichtet.<sup>61,148</sup> Bei Druckerhöhung auf 1000 bar kehrt sich das Verhältnis der Konformationen um. Unter Zugabe von monomerem  $\alpha$ -Synuclein ist oberhalb einer Proteinkonzentration von 125  $\mu\text{M}$  ein weiterer Peak um  $E \approx 0.6$  zu beobachten. Dieser wird einer kompakten Protein-gebundenen Konformation zugeordnet. Zur Quantifizierung der Anteile der verschiedenen Konformationen wurden die Peaks jeweils mit einer GAUSS-Funktion gefittet (Gleichung (29)), sodass die Fläche unter dieser Funktion, normiert auf die Gesamtfläche aller Peaks, den relativen Anteil der entsprechenden Konformation ergibt. Neben den konzentrationsabhängigen Effekten des  $\alpha$ -Synucleins in reinem Puffer wurden diese auch unter Druckmodulation und in Kombination mit einem synthetischen ATPS aus PEG (4.5 kDa) und Dextran (10 kDa) untersucht.



**Abbildung 44: DNS-*Hairpin* (DS1+DS2) in 20 mM TrisHCl pH 7.5 und 15 mM NaCl bei verschiedenen Drücken. Links: Histogramme mit gefitteten Gausspeaks. Mitte: Relativer Anteil der geschlossenen und der offenen Konformation in Abhängigkeit des Drucks. Rechts: Regressionsgerade zur Bestimmung des Entfaltungsvolumens nach Gleichung (7).**

Abbildung 45(a) zeigt das konzentrationsabhängige Verhalten des DNS-*Hairpins* in Anwesenheit von 0 bis 200  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein. Mit zunehmender  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration steigt hier der Anteil der Konformation mit  $E \approx 0.6$ . Die druckabhängigen Messungen bei verschiedenen  $\alpha$ -Synuclein-Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ; Abbildung 45(b)-(d)) zeigen die druckinduzierte Konformationsänderung von geschlossen nach geöffnet, die bereits auch in reinem Puffer beobachtet wurde.<sup>61,148</sup> Die durch das  $\alpha$ -Synuclein induzierte Konformation mit  $E \approx 0.6$  bleibt in ihrem Anteil jedoch auch bei steigendem Druck stabil. Die zusätzliche Zugabe von 11 Gew.-% PEG und 11 Gew.-% Dextran führten zu einer drastischen Absenkung der Konformationen mit  $E \approx 0.9$

## DNS-Hairpin und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

und  $E \approx 0.3$  (Abbildung 45 (e) und (f)), sodass die DNS fast ausschließlich in der Konformation mit  $E \approx 0.6$  vorliegt.

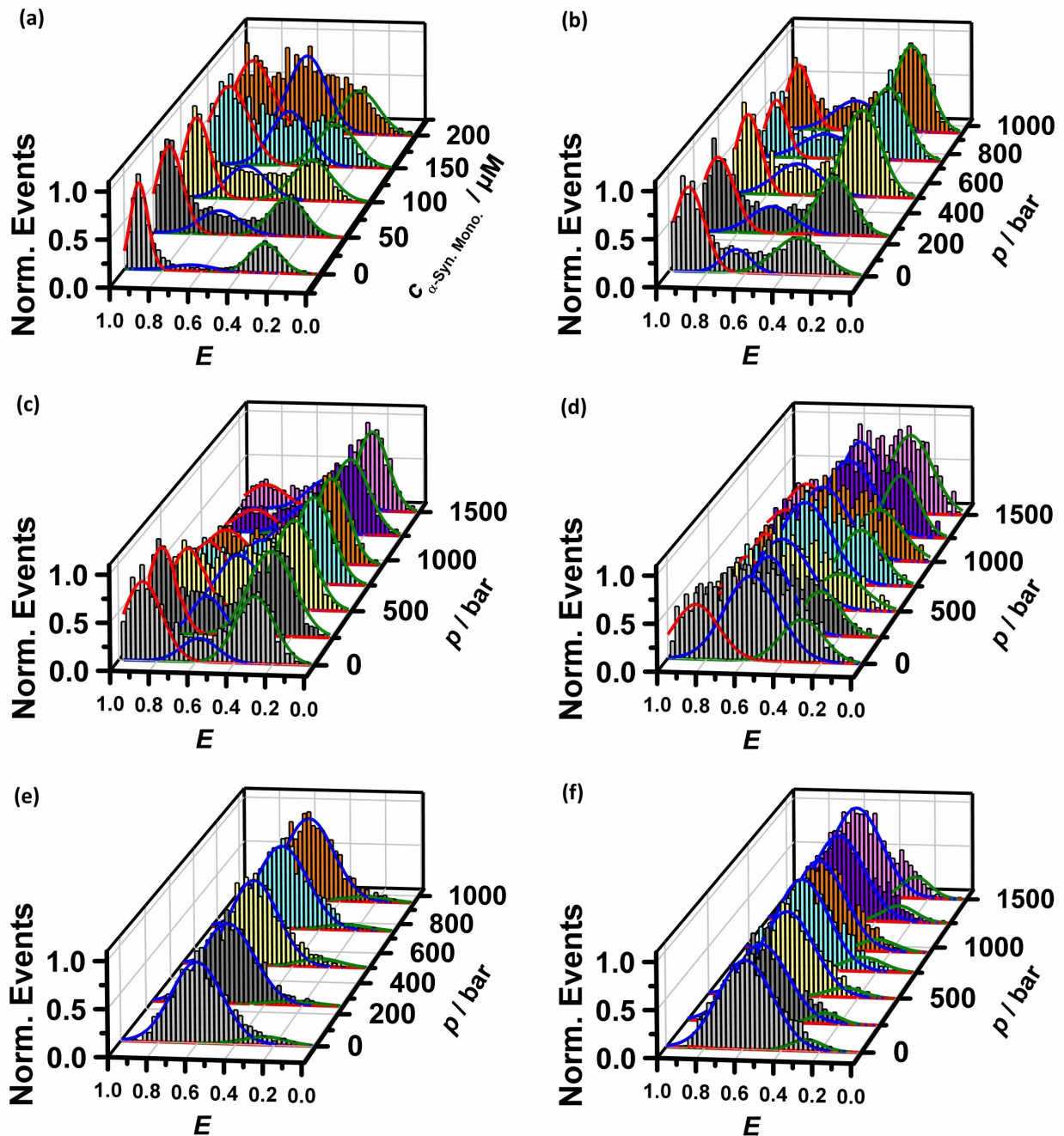


Abbildung 45: FRET-Effizienz-Histogramme DNS-Hairpin-Konstruktes (DS1+DS2) in 20 mM TrisHCl, 15 mM NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration monomeren  $\alpha$ -Synucleins (a) und des Drucks (b)-(f). (b) bis (d) enthielten in entsprechender Reihenfolge eine  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration von 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M und 200  $\mu$ M, (e) und (f) enthielten zusätzlich zu 50  $\mu$ M (e) bzw. 150  $\mu$ M (f)  $\alpha$ -Synuclein noch 11 Gew.-% PEG und 11 Gew.-% Dextran (ATPS). In allen Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM in der untersuchten Phase.

## DNS-Hairpin und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

Die jeweiligen Anteile, welche aus den gefitteten GAUSS-Kurven hervorgehen, sind in Abbildung 46 dargestellt. Zunächst wurde festgestellt, dass bei steigender Konzentration von monomerem  $\alpha$ -Synuclein oberhalb von 125  $\mu\text{M}$  der Anteil für  $E \approx 0.6$  von ca. 20 % bis ca. 60 % steigt, während die Anteile für  $E \approx 0.9$  und  $E \approx 0.3$  von ihren Ausgangswerten von ca. 55 % bzw. 25 % auf ca. 20 % absinken (Abbildung 46(a)). Für drei verschiedene  $\alpha$ -Synuclein-Konzentrationen (50  $\mu\text{M}$  Abbildung 46(b), 150  $\mu\text{M}$  Abbildung 46(c) und 200  $\mu\text{M}$  Abbildung 46(d)) wurden auch entsprechende Druckreihen vermessen. Für 50  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein zeigte sich in einem Druckbereich bis 1 kbar ein konstanter Anteil von 20 % der Protein-gebundenen Form mit  $E \approx 0.6$ . Der Anteil des gefalteten *Hairpins* sank wiederum von ca. 50 % auf 20 %, während der Anteil der regellosen Anordnung sich spiegelbildlich verhielt. Werden nur die entfaltete und gefaltete Konformation betrachtet, liegt das Entfaltungsvolumen mit  $\Delta V = -31 \pm 6 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  (Abbildung 49) in der Größenordnung der Puffermessungen ( $\Delta V = -26 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ).<sup>147</sup> Der große Fehler (20 %) und die Abweichung der Volumenänderungen kann auf die stark vereinfachte Betrachtung als Zweizustandsmodell zurückgeführt werden. Bei 200  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein dominiert über einen weiten Druckbereich von 1 bar bis 1250 bar die Protein-gebundene Konformation. Dies lässt auf die Bildung eines kompakten, kavitätsfreien Komplexes aus DNS und  $\alpha$ -Synuclein schließen. Parallel sinkt der Anteil des gefalteten Zustands von ca. 25 % auf ca. 10 %, während der entfaltete Zustand von ca. 20 % auf ca. 35 % steigt. Erst bei 1500 bar nahm auch der Anteil des Peaks um  $E \approx 0.6$  zugunsten der entfalteten Konformation ab.

LLPS verändert eine ganze Reihe physiologischer Parameter, wie beispielsweise die Proteindynamik, -faltung, -aggregation und -aktivität.<sup>147,149,150</sup> In diesem Fall wurde ein ATPS aus 11 Gew.-% PEG und 11 Gew.-% Dextran eingesetzt. Dieses bietet den Vorteil, dass das ATPS selbst druckstabil ist und beobachtete Unterschiede zur Puffermessung auf die Wechselwirkungen zwischen DNS, Protein und ATPS zurückgeführt werden können.<sup>147</sup> Es konnte bereits von Arns *et al.* gezeigt werden, dass sich die Hairpin-DNS in den dextranreichen Tröpfchen anreichert und dies der druckinduzierten Entfaltung entgegenwirkt.<sup>147</sup> Im Gegensatz hierzu führt die Kombination aus  $\alpha$ -Synuclein und ATPS zur Ausbildung der Protein-gebundenen Konformation, sowie zu einer Anreicherung in der PEG-Phase (Abbildung 45(e) und (f), Abbildung 46(e) und (f)). Das Verhalten ist hierbei über den untersuchten Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{M}$  bis 150  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Synuclein ähnlich. Auch Drücke bis zu 1.5 kbar beeinflussen die zu ca. 90 % vorliegende Konformation mit  $E \approx 0.6$  nicht.

## **DNS-*Hairpin* und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem**

In den reinen *Crowder*-Lösungen mit ähnlichen Konzentrationen wie in den verschiedenen ATPS-Phasen (11 Gew.-% PEG bzw. 30 Gew.-% Dextran) liegt das Gleichgewicht bei 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Synuclein deutlich stärker auf der Seite der gefalteten Konformation (ca. 53 %) bei ca. 32 % Protein-gebundener Konformation und 15 % entfalteter DNS (Abbildung 47). Dies zeigt, dass sich die Bedingungen innerhalb eines ATPS deutlich von denen innerhalb reiner *Crowder*-Lösungen aus den Einzelkomponenten gleicher Konzentration unterscheidet. Weiter zeigt sich im Vergleich zu Abbildung 46(b) ein stabilisierender Effekt des PEG auf die geschlossene Konformation des *Hairpins*. Während ohne PEG bei 800 bar in erster Linie die entfaltete Konformation vorliegt (ca. 55 %), liegt die DNS mit 11 Gew.-% PEG bis 800 bar weitestgehend (ca. 45 % geschlossen, 30 % gebunden und 25 % entfaltet) in der geschlossenen *Hairpin*-Konformation vor.

## DNS-Hairpin und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

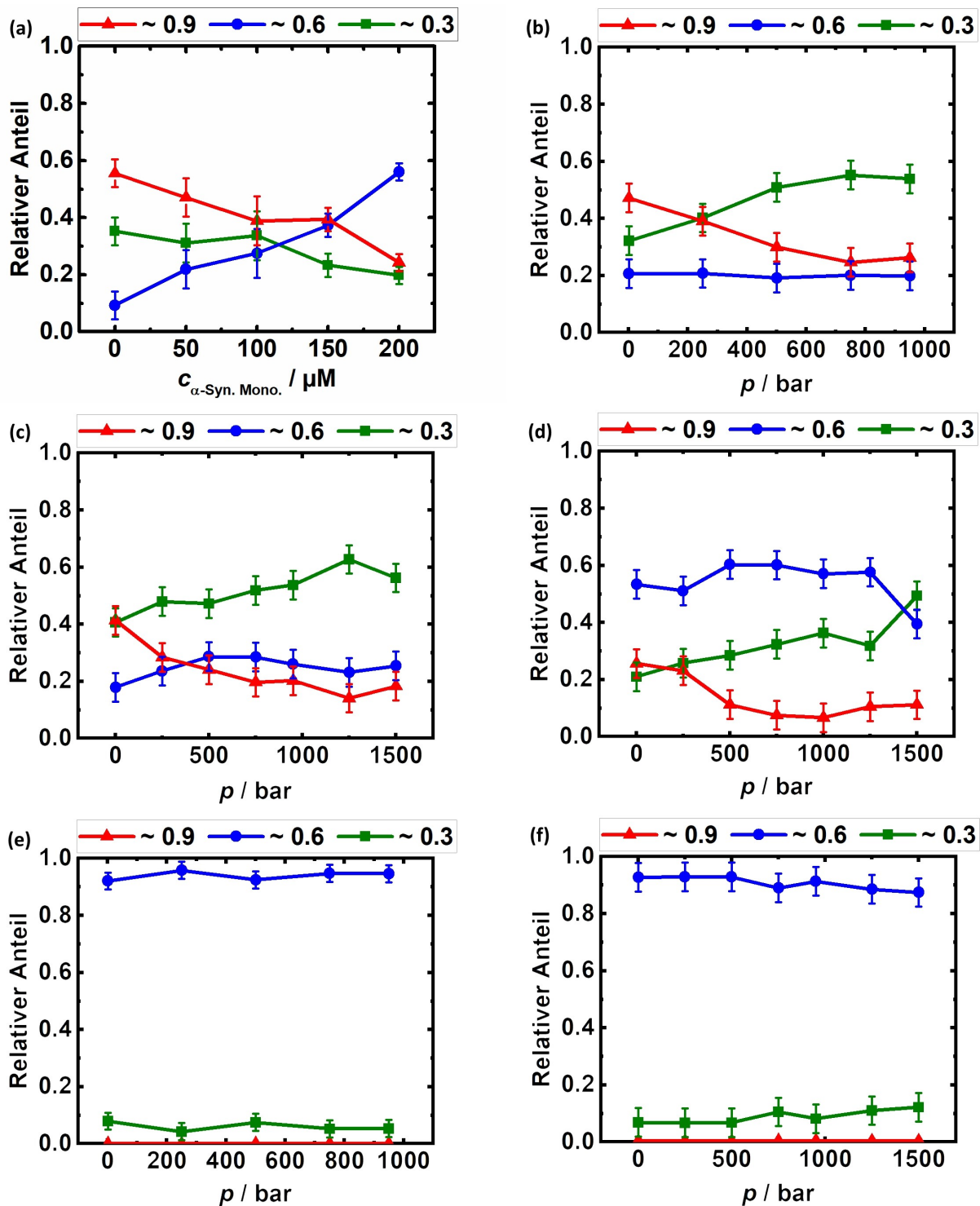


Abbildung 46: Relative Anteile der Konformationen des DNS-Hairpin-Konstruktes (DS1+DS2) in 20 mM TrisHCl, 15 mM NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration monomeren  $\alpha$ -Synucleins (a) und des Drucks (b)-(f). (b) bis (d) enthielten in entsprechender Reihenfolge eine  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$ , (e) und (f) enthielten zusätzlich zu 50  $\mu\text{M}$  (e) bzw. 150  $\mu\text{M}$  (f)  $\alpha$ -Synuclein noch 11 Gew.-% PEG und 11 Gew.-% Dextran (ATPS). In allen Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50  $\mu\text{M}$  in der untersuchten Phase.

## DNS-Hairpin und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem

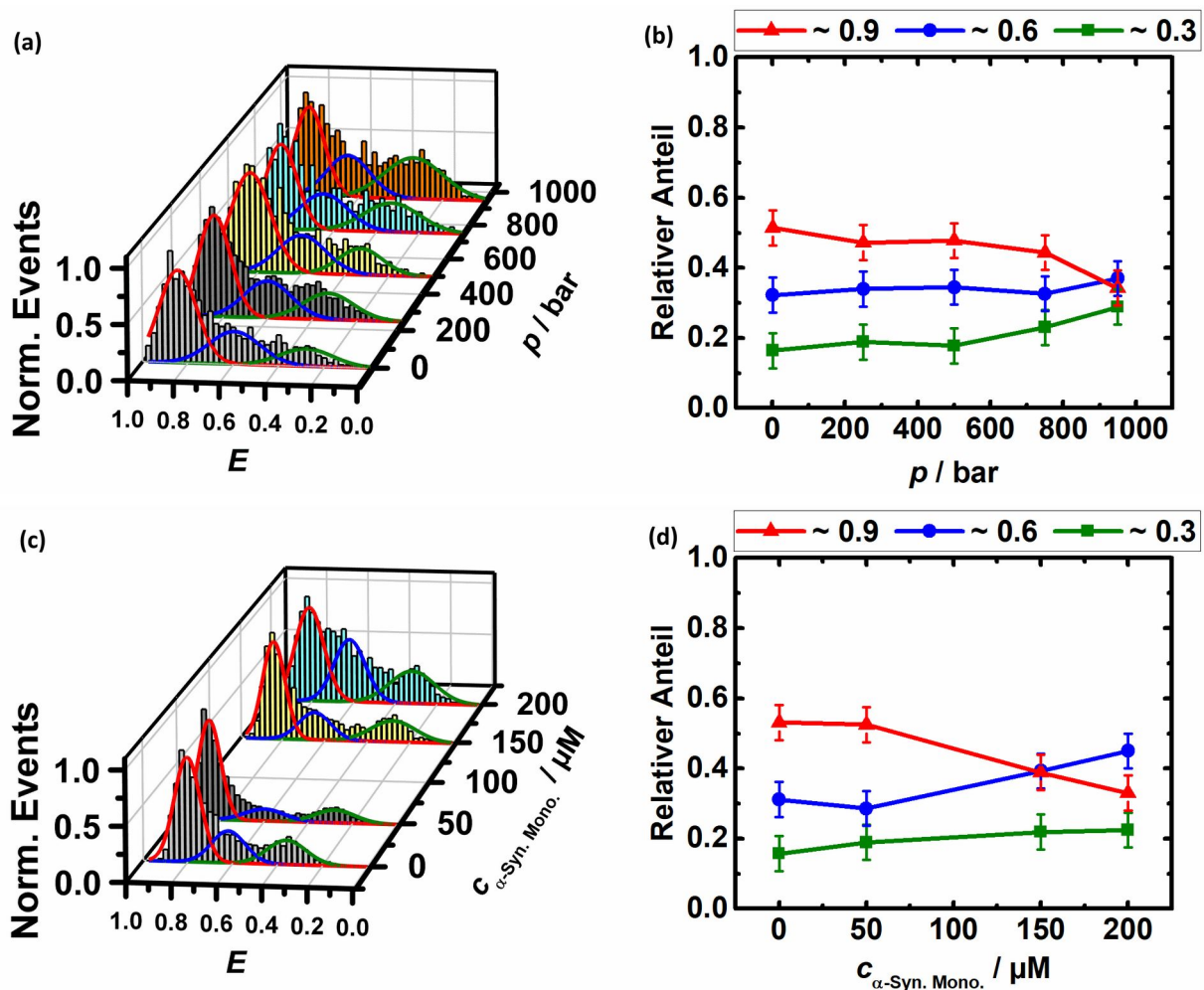


Abbildung 47: FRET-Effizienz-Histogramme (a) (c) und relative Konformationsanteile (b) (d) des DNS-Hairpins (DS1+DS2) in 15 mM NaCl und 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. Die Probe für (a) und (b) enthielt zusätzlich 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Synuclein und 11 Gew.-% PEG. Die Probe für (c) und (d) enthielt zusätzlich 30 Gew.-% Dextran. Die DNS-Konzentration betrug ca. 50  $\mu$ M.

### 8.3 Diskussion

Intrinsisch ungeordnete Proteine, welche DNS binden, stellen eine genetisch kontrollierte Möglichkeit dar, die Konformation und Dynamik von Nukleinsäuren innerhalb der Zelle zu modulieren. Die gezeigten Daten belegen, dass  $\alpha$ -Synuclein diese Eigenschaften besitzt und somit in der Lage ist, die Expressionsregulation zu beeinflussen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Effekte des  $\alpha$ -Synucleins stark von der Umgebung abhängen und zellinterne LLPS möglicherweise eine große Rolle bei den Auswirkungen von DNS-Protein-Wechselwirkungen spielen. Für DNS-Doppelstränge konnte bereits gezeigt werden, dass diese bei Bindung an  $\alpha$ -

## **DNS-*Hairpin* und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem**

Synuclein mechanisch gestreckt werden.<sup>139</sup> Nun konnte auch nachgewiesen werden, dass  $\alpha$ -Synuclein die Konformation und Dynamik von DNS-*Hairpins* beeinflusst. Die beobachtete intermediäre Konformation, welche nur in Folge der Wechselwirkung mit  $\alpha$ -Synuclein nachgewiesen wurde, weist auf eine komplexe Energiehyperfläche von Nukleinsäuren mit vielen lokalen Minima hin. Wie bereits NARAYANAN *et al.* gezeigt haben, sind die einzelnen Subzustände hierbei durch niedrige freie Energiebarrieren getrennt, statt ein definiertes Zweizustandsmodell abzubilden. Diese zusätzlichen Konformationen entstehen höchstwahrscheinlich durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem negativen Phosphatrückgrat der DNS und dem positiv geladenen *N*-terminalen Bereich des  $\alpha$ -Synucleins, sowie aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Lysinresten des *N*-terminalen Bereichs und den Adeninbasen der Schleifenregion. Die druckabhängigen Messungen haben gezeigt, dass der entstehende Protein-DNS-Komplex kompakt und weitestgehend kavitätsfrei ist. Weiter weist der gleichbleibende Anteil der Protein-gebundenen Konformation bei Druckerhöhung darauf hin, dass die Wechselwirkungen zwischen Protein und DNS in erster Linie in der Schleifenregion und nicht in der intra- oder intermolekularen Doppelstrangregion stattfindet. Bei Wechselwirkungen mit dem kurzen intramolekularen Doppelstrang wäre ansonsten zu erwarten, dass die druckinduzierte Öffnung den Anteil der Protein-gebundenen Konformation beeinflusst. Bei Wechselwirkungen mit dem intermolekularen Doppelstrangbereich wären deutlich geringere Änderungen der FRET-Effizienz oder bei Dissoziation der DNS ein Verlust des PIE-Signals zu erwarten. Die Stabilisierung der intermediären Protein-gebundenen Form im ATPS mit Populationen um 90 % weist auf eine starke Beschränkung des Konformationsraums in der die Tröpfchen umgebenden Phase hin. Neben einem starken *Crowding*-Effekt, welcher zum Absinken des entfalteten Anteils durch Begünstigung hoher Packungsdichte und geringer partieller Volumina führt, sind auch enthalpische Beiträge zwischen PEG,  $\alpha$ -Synuclein und DNS wahrscheinlich, welche den Anteil des geschlossenen DNS-*Hairpins* verschwinden lassen.

SmFRET-Daten erlauben die Bestimmung der Konformationsverteilung und ihrer Änderungen auf monomolekularer Ebene. Es können Konformationen entdeckt werden, welche mit den meisten Ensemblemethoden aufgrund der Mittelung über alle Probenmoleküle nicht beobachtet werden können. So können auch unspezifische oder sehr komplexe Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Biomolekülklassen untersucht werden. Die mittels smFRET untersuchte Kombination von DNS-Protein-Wechselwirkungen mit flüssig-kondensierten Phasen wie LLPS und

## **DNS-*Hairpin* und $\alpha$ -Synuclein in einem wässrigen Zweiphasensystem**

ATPS geben einen ersten Einblick in das Verständnis bisher wenig erforschter zellulärer Mechanismen. Die Veränderung des Drucks und der Lösemittelbedingungen bieten hierbei weitere Einblicke sowohl in die Energiehyperfläche der beteiligten Moleküle als in die Mechanismen, welche beispielsweise Tiefseeorganismen ihre Anpassung an den extremen Lebensraum ermöglichen.



### 9 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden vielfältige Einflüsse auf drei verschiedene DNS-Sekundärstrukturen mittels smFRET-Mikroskopie auf molekularer Ebene untersucht. Neben der Bestätigung bereits aus Ensemble-Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie bekannten Ergebnissen der Temperatur- und Druck-induzierten Entfaltung eines telomerischen G-Quadruplexes, konnte eine vorherige Sekundärstrukturänderung von einer antiparallelen in eine parallele Konformation sowohl unter Hochdruck als auch bei erhöhter Temperatur nachgewiesen werden. Dies zeigt die Komplexität der Energielandschaft und des Konformationsraums von Nukleinsäuren. Die niedermolekularen Osmolyte TMAO und Harnstoff, welche von piezophilen Organismen, die unter entsprechendem Druckstress stehen, in relativ hoher Konzentration gebildet werden, zeigten ähnliche struktur-stabilisierende Effekte auf die antiparallele G-Quadruplex-Konformation wie auf native Proteinstrukturen. Hierdurch wird die These gestützt, dass die genannten Osmolyte nicht nur die Funktionalität von Proteinen unter Hochdruck erhalten, sondern auch zur Aufrechterhaltung der nativen Funktionsweise der Genexpression und -regulation in extremen Habitaten wie der Tiefsee beitragen.

Weiter wurde der Einfluss des kleinen intrinsisch ungeordneten Proteins  $\alpha$ -Synuclein auf die in Wirbeltiertelomeren vorkommenden Sequenzen (GGG TTA)<sub>3</sub> GGG und (CCC TAA)<sub>3</sub> CCC in Kombination mit dem makromolekularen *Crowder* Ficoll zur Imitation intrazellulärer Bedingungen untersucht.  $\alpha$ -Synuclein hat in aggregierter Form neurotoxische Eigenschaften, welche als Ursache der zweithäufigsten Demenzerkrankung, der LEWY-Körper-Demenz gilt. Insbesondere die beobachtete Entfaltung der telomerischen G-Quadruplex-Struktur durch aggregiertes  $\alpha$ -Synuclein könnte *in vivo* zur fehlerhaften Aktivierung von DNS-Reparaturmechanismen an den Enden der Chromosomen führen. Dieser molekulare Erklärungsansatz einer Reduktion der Chromosomenstabilität würde eine vermehrte Apoptose durch LEWY-Körper und kleinere  $\alpha$ -Synuclein-Aggregate in Neuronen erklären. Hier sind insbesondere auf Zellkulturen basierende oder *in vivo*-Ansätze für die weitere Aufklärung gefragt.

Das Konformationsgleichgewicht der untersuchten Cytosin-reichen Sequenz wurde durch  $\alpha$ -Synuclein in Richtung des gefalteten i-Motivs verschoben. Dies zeigt das beide DNS-Sequenzen mit ihren spezifischen Sekundärstrukturen (G-Quadruplex und i-Motiv) in jeweils unterschiedlicher

## Fazit und Ausblick

Weise von monomerem und aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein beeinflusst werden. Dies kann mit den unterschiedlichen Wechselwirkungen insbesondere der positiv geladenen Aminosäureseitenketten mit Purin und Pyrimidinbasen, sowie mit der Zugänglichkeit der unterschiedlichen Nukleobasen in den verschiedenen DNS-Überstrukturen erklärt werden. Da das Konformationsgleichgewicht des *i*-Motivs in Anwesenheit von monomerem  $\alpha$ -Synuclein nicht durch Druck bis 1.5 kbar beeinflusst wurde, kann auf die Bildung eines kompakten, kavitätsfreien Komplexes geschlossen werden. Die weitere Verschiebung des Konformationsgleichgewichts durch den *Microcrowder* TMAO, welcher alleine keinen Effekt auf die *i*-Motiv-Sequenz hatte, stützt diese These ebenfalls.

Die Verhinderung der Ausbildung von DNS-Hairpins im Zuge der DNS-Replikation ist eine der Aufgaben des *Replication Protein A* (RPA). Doch auch andere Proteine wechselwirken während der Replikation oder Transkription mit den Einzelsträngen der DNS. Die untersuchte *Hairpin*-DNS zeigt in Puffer lediglich eine offene und eine geschlossene Konformation. Eine Kombination aus  $\alpha$ -Synuclein und einem wässrigen Zweiphasensystem führte zur Ausbildung einer dritten Konformation mit intermediärem Fluorophorabstand. Zum einen liefert dies einen weiteren Hinweis auf die zunehmend diskutierte Rolle von  $\alpha$ -Synuclein im genregulatorischen System des Zellkerns, zum anderen konnte anhand des beschriebenen *in vitro*-Modellsystems ein Einfluss des Dextran-PEG-Zweiphasensystems auf die Protein-DNS-Wechselwirkungen gezeigt werden, welcher durch die Einzelkomponenten nicht hervorgerufen wird. Dies stellt die besonderen Eigenschaften wässriger Zweiphasensysteme heraus, welche *in vivo* vor allem durch Proteine in Kombination mit RNS oder freien (Desoxy-)Nukleotiden gebildet werden.

Darüber hinaus haben die letzten Monate gezeigt, dass auch ein grundlegendes Verständnis des *in vitro*-Verhaltens von Nukleinsäuren von großer Bedeutung ist. Mit der Entwicklung neuer Boten-RNS basierter Therapeutika steht eine Technologie in den Startlöchern, welche neben der Vorbeugung von Infektionskrankheiten auch die Behandlung einer Vielzahl von schwerwiegenden Krankheiten wie Tumor-, neurodegenerative und Autoimmunerkrankungen revolutionieren könnte. Zur Formulierung dieser Therapeutika werden schon heute synthetische Makromoleküle wie Lipid-modifiziertes PEG eingesetzt.<sup>151</sup> Trotzdem stellt die Stabilität, welche sich aus Konformations-, Bindungs- und Phasenstabilität ergibt, bis heute ein gravierendes Problem dar (längere Lagerung bei  $<-60$  °C nötig, Haltbarkeit von 6 h bei Raumtemperatur).<sup>151</sup> Wie auch diese Arbeit zeigt, lässt sich die Stabilität von Nukleinsäuren durch den Einsatz von Osmolyten und Makromolekülen

## **Fazit und Ausblick**

modulieren. Weitere Forschung ist hier insbesondere in Bezug auf RNS und größere Nucleinsäuren notwendig.

## Weitere Abbildungen

### 10 Anhang

#### 10.1 Weitere Abbildungen

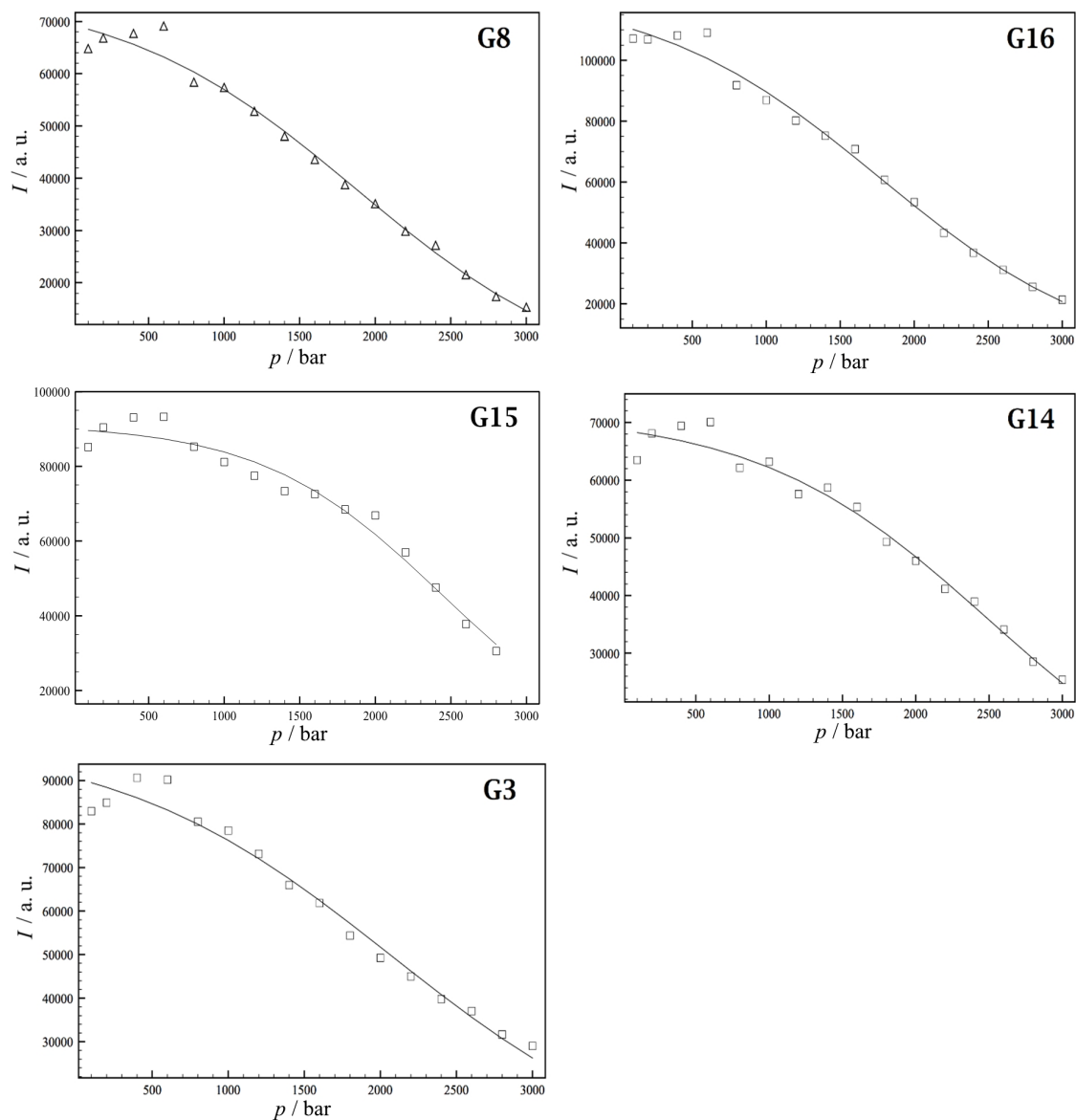


Abbildung 48: Druckabhängige Änderung der Peakfläche der Iminoprotonenpeaks aus den entsprechenden NMR-Daten (Abbildung 29) mit BOLTZMANN-Fit zur Bestimmung der Volumenänderung. Ausgewertet von Dr. Balasubramanian Harish.

## Weitere Abbildungen

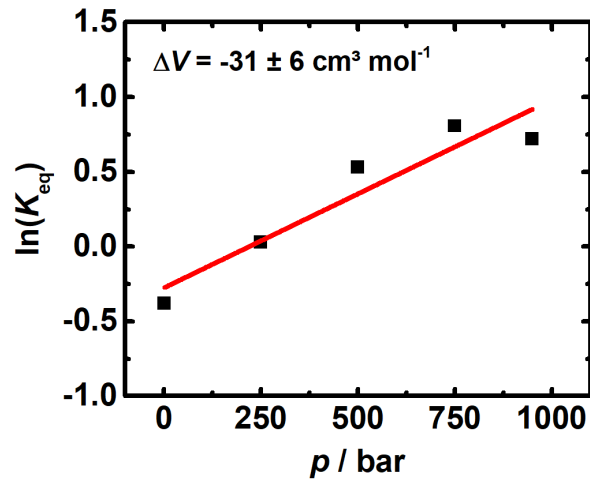


Abbildung 49: Lineare Regressionsgerade zur Bestimmung der Volumenänderung nach Gleichung (5).  $K_{\text{eq}}$  ist die Gleichgewichtskonstante der Messung des DNS-Hairpins in 20 mM TrisHCl pH 7.5, 15 mM NaCl und 50  $\mu\text{M}$  monomerem  $\alpha$ -Synuclein bei 25  $^{\circ}\text{C}$ .

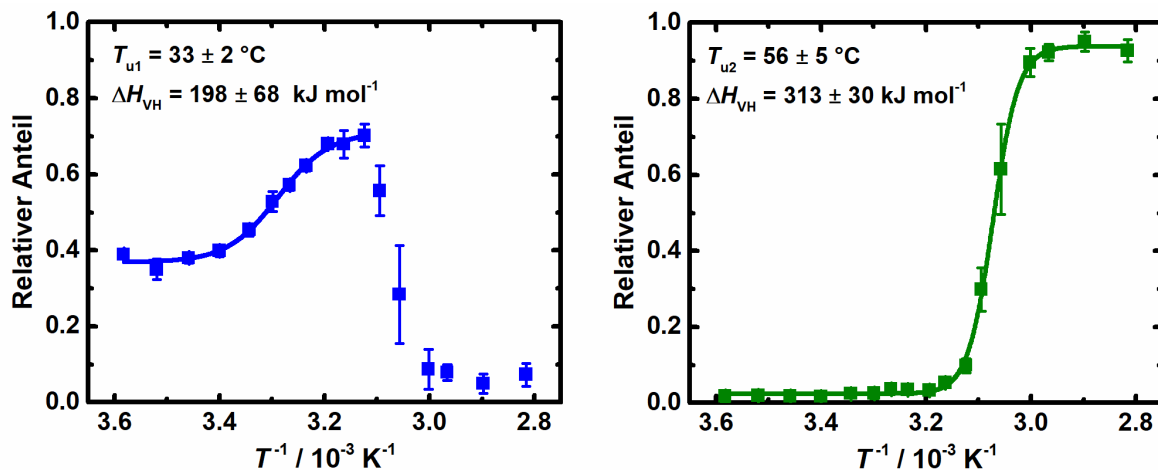


Abbildung 50: Boltzmann-Fits nach Gleichung (9) (Linien) zur Bestimmung der Umwandlungstemperaturen und VAN'T HOFF-Enthalpie von G1+G2. Gemessen wurde in 20 mM TrisHCl pH 7.5, 5  $\mu\text{M}$  NaCl, bei 25  $^{\circ}\text{C}$ . Blau: relativer Anteil der parallelen Konformation ( $E \approx 0.6$ ). Grün: Anteil der entfalteten Konformation ( $E \approx 0.3$ ).

## Weitere Abbildungen

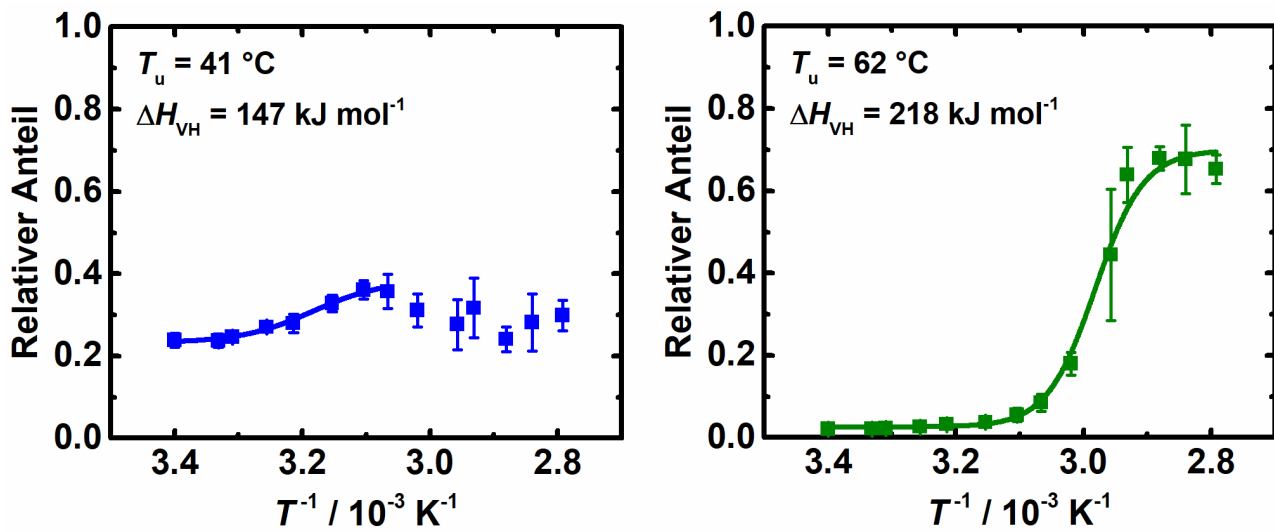


Abbildung 51: Boltzmann-Fits nach Gleichung (9) (Linien) zur Bestimmung der Umwandlungstemperaturen und VAN'T HOFF-Enthalpie von G1+G2. Gemessen wurde in 20 mM TrisHCl pH 7.5, 5  $\mu\text{M}$  NaCl und 1 M TMAO bei 25 °C. Blau: relativer Anteil der parallelen Konformation ( $E \approx 0.6$ ). Grün: relativer Anteil der entfaltenen Konformation ( $E \approx 0.3$ ).

## Abkürzungsverzeichnis

### 10.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATPS	<i>aqueous two-phase system</i>
C	Cytosin
CD	<i>circular dichroism</i>
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FRET	FÖRSTER-Resonanzenergietransfer
G	Guanin
G-Qdp	Guanin-Quadruplex
hTel	humane Telomersequenz
IDP	<i>intrinsically disordered protein</i>
LLPS	<i>liquid-liquid phase separation</i>
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
NAC	<i>non-amyloid-<math>\beta</math>-component</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PEM	Photoelastischer Modulator
PIE	<i>pulsed interleaved excitation</i>

## Abkürzungsverzeichnis

PMT	<i>photo multiplier tube</i>
PS	Parkinson-Syndrom
RCSB	<i>Research collaboratory for structural bioinformatics</i>
RNS	Ribonukleinsäure
SASA	<i>solvent-accessible surface area</i>
SPAD	<i>single-photon avalanche diode</i>
SSB	<i>single-strand binding protein</i>
sm	<i>single-molecule</i>
T	Thymin
TCSPC	<i>time correlated single photon counting</i>
TMAO	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrisHCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
t-RNS	transfer Ribonukleinsäure
UV/VIS	<i>ultraviolet/visible light</i>



## Chemikalien und Lieferanten/Hersteller

### 10.3 Chemikalien und Lieferanten/Hersteller

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant/Hersteller</b>
Dextran (10 kDa)	Sigma-Aldrich
DNS-Oligonukleotide (siehe 5 Probenpräparation)	IBA-Lifescience
Eisessig	Sigma-Aldrich
Ethanol (analytisch)	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Sigma-Aldrich
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
Nuklease-freies Wasser	Omega Bio-Tek
PEG (4.6 kDa)	Sigma-Aldrich
Polysorbat 80	Sigma-Aldrich
Salzsäure (30 Gew.-%)	Sigma-Aldrich
Silikonpaste (Korasilon mittelviskos)	Carl Roth
TMAO	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
TrisHCl	Sigma-Aldrich

## Verwendete Geräte

### 10.4 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Konfokales Laser-Mikroskop	Microtime 200	PicoQuant
bestehend aus:		
<i>fiber coupling unit</i>	FCU	PicoQuant
Laser 560 nm	LDH-D-TA-560	PicoQuant
Laser 635 nm	LDH-D-C635B	PicoQuant
<i>laser driver</i>	Sepia II	PicoQuant
<i>optical unit</i> mit zwei SPAD	SPCM-AQR	Perkin Elmer
<i>microscope controller</i>	Microtime 200	PicoQuant
PC mit <i>photon counting PCI-board</i>	Time Harp 200	PicoQuant
Inverses Mikroskop	IX71	Olympus
Objektiv	60x Wasserimmersion	Olympus
CD-Spektropolarimeter	J-715	Jasco
Heizplatte mit Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph
Minizentrifuge	iFuge M08	neuation
pH-Meter	FE20 Five Easy	Mettler Toledo
Thermoschütteler	980VWHSTSEUN	VWR
Wasserbad mit Thermostat	HL	Julabo

## Literaturverzeichnis

### 10.5 Literaturverzeichnis

1. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
2. Drew, H. R. *et al.* Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 2179–2183 (1981).
3. Gellert, M., Lippset, M. N. & Davies, D. R. Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 2013–2018 (1962).
4. Sen, D. & Gilbert, W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motif for meiosis. *Nature* **334**, 364–366 (1998).
5. Sundquist, W. I. & Klug, A. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* **342**, 825–829 (1989).
6. Lipps, H. J. & Rhodes, D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol.* **19**, 414–422 (2009).
7. Yang, X. *et al.* RNA G-quadruplex structures exist and function in vivo in plants. *Genome Biol.* **21**, 226 (2020).
8. Zeraati, M. *et al.* I-motif DNA structures are formed in the nuclei of human cells. *Nat. Chem.* **10**, 631–637 (2018).
9. Fujiwara, A., Fujiwara, M., Nishida-Umehara, C., Abe, S. & Masaoka, T. Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNA markers. *Genetica* **131**, 267–274 (2007).
10. Rocco, L., Costagliola, D. & Stingo, V. (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in selachian chromosomes. *Heredity (Edinb).* **87**, 583–588 (2001).
11. Phan, A. T. & Mergny, J.-L. Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4618–4625 (2002).
12. Ambrus, A. *et al.* Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2723–2735 (2006).
13. Noer, S. L. *et al.* Folding dynamics and conformational heterogeneity of human telomeric G-quadruplex structures in Na<sup>+</sup> solutions by single molecule FRET microscopy. *Nucleic Acids Res.* **44**, 464–471 (2016).
14. Fan, H. Y. *et al.* Volumetric characterization of sodium-induced G-quadruplex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4518–4526 (2011).

## Literaturverzeichnis

15. Ray, S., Bandaria, J. N., Qureshi, M. H., Yildiz, A. & Balci, H. G-quadruplex formation in telomeres enhances POT1/TPP1 protection against RPA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2990–2995 (2014).
16. Li, Y. Y., Dubins, D. N., Le, D. M. N. T., Leung, K. & Macgregor, R. B. The role of loops and cation on the volume of unfolding of G-quadruplexes related to HTel. *Biophys. Chem.* **231**, 55–63 (2017).
17. Takahashi, S., Bhowmik, S. & Sugimoto, N. Volumetric analysis of formation of the complex of G-quadruplex DNA with hemin using high pressure. *J. Inorg. Biochem.* **166**, 199–207 (2016).
18. Miller, M. C., Buscaglia, R., Chaires, J. B., Lane, A. N. & Trent, J. O. Hydration Is a Major Determinant of the G-Quadruplex Stability and Conformation of the Human Telomere 3' Sequence of d(AG<sub>3</sub>(TTAG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17105–17107 (2010).
19. Traut, W. *et al.* The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosom. Res.* **15**, 371–382 (2007).
20. Neidle, S. Human telomeric G-quadruplex: The current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J.* **277**, 1118–1125 (2010).
21. Luedtke, N. W. Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules. *Chim. Int. J. Chem.* **63**, 134–139 (2009).
22. Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D. & Cockell, C. S. The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol.* **21**, 204–212 (2013).
23. Ross, C. A. & Poirier, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat. Med.* **10**, S10 (2004).
24. Vasquez, V. *et al.* A multi-faceted genotoxic network of alpha-synuclein in the nucleus and mitochondria of dopaminergic neurons in Parkinson's disease: Emerging concepts and challenges. *Prog. Neurobiol.* **185**, 101729 (2020).
25. Leng, Y., Chase, T. N. & Bennett, M. C. Muscarinic Receptor Stimulation Induces Translocation of an  $\alpha$ -Synuclein Oligomer from Plasma Membrane to a Light Vesicle Fraction in Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **276**, 28212–28218 (2001).
26. Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A. & Masliah, E. The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 38–48 (2013).
27. Saleh, H. *et al.* Mini review: Linkage between  $\alpha$ -Synuclein protein and cognition. *Transl. Neurodegener.* **4**, 5–10 (2015).
28. Schaser, A. J. *et al.* Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Sci. Rep.* **9**, 1–19 (2019).

## Literaturverzeichnis

29. Saintomé, C., Amrane, S., Mergny, J. L. & Alberti, P. The exception that confirms the rule: A higher-order telomeric G-quadruplex structure more stable in sodium than in potassium. *Nucleic Acids Res.* **44**, 2926–2935 (2016).
30. del Villar-Guerra, R., Trent, J. O. & Chaires, J. B. G-Quadruplex Secondary Structure Obtained from Circular Dichroism Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 7171–7175 (2018).
31. Zhou, J. *et al.* A Thermophilic Tetramolecular G-Quadruplex/Hemin DNAzyme. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 16636–16640 (2017).
32. Kim, B. G., Evans, H. M., Dubins, D. N. & Chalikian, T. V. Effects of Salt on the Stability of a G-Quadruplex from the Human c-MYC Promoter. *Biochemistry* **54**, 3420–3430 (2015).
33. Tippana, R., Xiao, W. & Myong, S. G-quadruplex conformation and dynamics are determined by loop length and sequence. *Nucleic Acids Res.* **42**, 8106–8114 (2014).
34. Pradhan, P. *et al.* Prion protein transcription is auto-regulated through dynamic interactions with G-quadruplex motifs in its own promoter. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1863**, 194479 (2020).
35. Lim, K. W., Ng, V. C. M., Martín-Pintado, N., Heddi, B. & Phan, A. T. Structure of the human telomere in Na<sup>+</sup> solution: An antiparallel (2+2) G-quadruplex scaffold reveals additional diversity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 10556–10562 (2013).
36. Liu, L., Ma, C., Wells, J. W. & Chalikian, T. V. Conformational Preferences of DNA Strands from the Promoter Region of the c-MYC Oncogene. *J. Phys. Chem. B* **124**, 751–762 (2020).
37. Megalathan, A. *et al.* Single-molecule analysis of i-motif within self-assembled DNA duplexes and nanocircles. *Nucleic Acids Res.* **47**, 7199–7212 (2019).
38. Rajendran, A., Nakano, S. I. & Sugimoto, N. Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH. *Chem. Commun.* **46**, 1299–1301 (2010).
39. Takahashi, S. & Sugimoto, N. Pressure-dependent formation of i-motif and G-quadruplex DNA structures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 31004–31010 (2015).
40. Choi, J., Kim, S., Tachikawa, T., Fujitsuka, M. & Majima, T. pH-Induced Intramolecular Folding Dynamics of i-Motif DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16146–16153 (2011).
41. Paul, S., Hossain, S. S. & Samanta, A. Insights into the Folding Pathway of a c-MYC-Promoter-Based i-Motif DNA in Crowded Environments at the Single-Molecule Level. *J. Phys. Chem. B* **124**, 763–770 (2020).

## Literaturverzeichnis

42. Patra, S., Anders, C., Schummel, P. H. & Winter, R. Antagonistic effects of natural osmolyte mixtures and hydrostatic pressure on the conformational dynamics of a DNA hairpin probed at the single-molecule level. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 13159–13170 (2018).
43. Patra, S., Anders, C., Erwin, N. & Winter, R. Osmolyte Effects on the Conformational Dynamics of a DNA Hairpin at Ambient and Extreme Environmental Conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 5045–5049 (2017).
44. Hänsel-Hertsch, R. *et al.* Landscape of G-quadruplex DNA structural regions in breast cancer. *Nat. Genet.* **52**, 878–883 (2020).
45. Diotti, R. & Loayza, D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* **2**, 119–135 (2011).
46. Aubert, G. & Lansdorp, P. M. Telomeres and aging. *Physiol. Rev.* **88**, 557–579 (2008).
47. Brooks, T. A., Kendrick, S. & Hurley, L. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *FEBS J.* **277**, 3459–3469 (2010).
48. Brooks, T. A. & Hurley, L. H. Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer* **1**, 641–649 (2010).
49. Lobachev, K. S. Hairpin- and cruciform-mediated chromosome breakage: causes and consequences in eukaryotic cells. *Front. Biosci.* **12**, 4208–4220 (2007).
50. Bikard, D., Loot, C., Baharoglu, Z. & Mazel, D. Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 570–588 (2010).
51. Czeslik, C., Seeman, H. & Winter, R. *Basiswissen physikalische Chemie.* (Vieweg+Teubner, 2010).
52. Winter, R., Frank, N., Czeslik, C., Noll, F. & Czeslik, C. *Methoden der Biophysikalischen Chemie.* (Vieweg+Teubner Verlag, 2011).
53. Schummel, P. H., Haag, A., Kremer, W., Kalbitzer, H. R. & Winter, R. Cosolvent and Crowding Effects on the Temperature and Pressure Dependent Conformational Dynamics and Stability of Globular Actin. *J. Phys. Chem. B* **120**, 6575–6586 (2016).
54. Kashefi, K. Extending the Upper Temperature Limit for Life. *Science* **301**, 934–934 (2003).
55. Clarke, A. *et al.* A Low Temperature Limit for Life on Earth. *PLoS One* **8**, e66207 (2013).
56. Masson, P. & Cléry, C. Pressure-induced molten globule states of proteins. *Prog. Biotechnol.* **13**, 117–126 (1996).
57. Lopez, C. F., Darst, R. K. & Rossky, P. J. Mechanistic elements of protein cold denaturation. *J. Phys. Chem. B* **112**, 5961–5967 (2008).

## Literaturverzeichnis

58. Bischof, J. C. & He, X. Thermal stability of proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1066**, 12–33 (2006).
59. Wilton, D. J., Ghosh, M., Chary, K. V. A., Akasaka, K. & Williamson, M. P. Structural change in a B-DNA helix with hydrostatic pressure. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4032–4037 (2008).
60. Takahashi, S. & Sugimoto, N. Effect of pressure on the stability of G-quadruplex DNA: Thermodynamics under crowding conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 13774–13778 (2013).
61. Patra, S. *et al.* Exploring the effects of cosolutes and crowding on the volumetric and kinetic profile of the conformational dynamics of a poly dA loop DNA hairpin: a single-molecule FRET study. *Nucleic Acids Res.* **47**, 981–996 (2019).
62. Lin, T.-Y. & Timasheff, S. N. Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein. *Biochemistry* **33**, 12695–12701 (1994).
63. Yancey, P. H., Blake, W. R. & Conley, J. Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **133**, 667–676 (2002).
64. Canchi, D. R. & García, A. E. Cosolvent Effects on Protein Stability. *Annu. Rev. Phys. Chem* **64**, 273–293 (2013).
65. Zimmerman, S. B. & Minton, A. P. Macromolecular Crowding: Biochemical, Biophysical, and Physiological Consequences. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 27–65 (1993).
66. Fiorini, E., Börner, R. & Sigel, R. K. O. Mimicking the in vivo Environment – The Effect of Crowding on RNA and Biomacromolecular Folding and Activity. *Chim. Int. J. Chem.* **69**, 207–212 (2015).
67. Aslanyan, L. *et al.* Effect of Urea on G-Quadruplex Stability. *J. Phys. Chem. B* **121**, 6511–6519 (2017).
68. Oprzeska-Zingrebe, E. A. & Smiatek, J. Preferential Binding of Urea to Single-Stranded DNA Structures: A Molecular Dynamics Study. *Biophys. J.* **114**, 1551–1562 (2018).
69. Holmstrom, E. D., Dupuis, N. F. & Nesbitt, D. J. Kinetic and thermodynamic origins of osmolyte-influenced nucleic acid folding. *J. Phys. Chem. B* **119**, 3687–3696 (2015).
70. Lambert, D., Leipply, D. & Draper, D. E. The Osmolyte TMAO Stabilizes Native RNA Tertiary Structures in the Absence of Mg<sup>2+</sup>: Evidence for a Large Barrier to Folding from Phosphate Dehydration. *J. Mol. Biol.* **404**, 138–157 (2010).

## Literaturverzeichnis

71. Lambert, D. & Draper, D. E. Effects of Osmolytes on RNA Secondary and Tertiary Structure Stabilities and RNA-Mg<sup>2+</sup> Interactions. *J. Mol. Biol.* **370**, 993–1005 (2007).
72. Enderlein, È. & Keller, R. A. *Single Molecule Detection in Solution. Single Molecule Detection in Solution* (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002). doi:10.1002/3527600809
73. ATTO-TEC. ATTO 550. Available at: [https://www.atto-tec.com/product\\_info.php?info=p103\\_atto-550.html](https://www.atto-tec.com/product_info.php?info=p103_atto-550.html).
74. ATTO-TEC. ATTO 647N. Available at: [https://www.atto-tec.com/product\\_info.php?info=p114\\_atto-647n.html](https://www.atto-tec.com/product_info.php?info=p114_atto-647n.html).
75. Förster-radius R<sub>0</sub> of selected ATTO-dye pairs. (2018).
76. Ha, T. *et al.* Single-molecule fluorescence spectroscopy of enzyme conformational dynamics and cleavage mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 893–898 (1999).
77. PerkinElmer. *SPCM-AQR Single Photon Counting Module Datasheet*. (2005).
78. Rothwell, P. J. *et al.* Multiparameter single-molecule fluorescence spectroscopy reveals heterogeneity of HIV-1 reverse transcriptase:primer/template complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1655–1660 (2003).
79. Volles, M. J. & Lansbury, P. T. Relationships between the Sequence of  $\alpha$ -Synuclein and its Membrane Affinity, Fibrillization Propensity, and Yeast Toxicity. *J. Mol. Biol.* **366**, 1510–1522 (2007).
80. Shaltiel-Karyo, R. *et al.* Inhibiting  $\alpha$ -synuclein oligomerization by stable cell-penetrating  $\beta$ -synuclein fragments recovers phenotype of parkinson's disease model flies. *PLoS One* **5**, (2010).
81. Roche, J. *et al.* Cavities determine the pressure unfolding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6945–6950 (2012).
82. Son, I., Shek, Y. L., Dubins, D. N. & Chalikian, T. V. Hydration changes accompanying helix-to-coil DNA transitions. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 4040–4047 (2014).
83. Daniel, I., Oger, P. & Winter, R. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 858–875 (2006).
84. Yancey, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **208**, 2819–2830 (2005).
85. Zou, Q., Bennion, B. J., Daggett, V. & Murphy, K. P. The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1192–1202 (2002).



## Literaturverzeichnis

86. Ma, J., Pazos, I. M. & Gai, F. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8476–81 (2014).
87. Wang, Y. & Patel, D. J. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG<sub>3</sub>(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] G-tetraplex. *Structure* **1**, 263–282 (1993).
88. Ying, L., Green, J. J., Li, H., Klenerman, D. & Balasubramanian, S. Studies on the structure and dynamics of the human telomeric G quadruplex by single-molecule fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 14629–14634 (2003).
89. Shirude, P. S. & Balasubramanian, S. Single molecule conformational analysis of DNA G-quadruplexes. *Biochimie* **90**, 1197–1206 (2008).
90. Pincus, D. L., Hyeon, C. & Thirumalai, D. Effects of trimethylamine N-Oxide (TMAO) and crowding agents on the stability of RNA hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7364–7372 (2008).
91. Minton, A. P. Models for excluded volume interaction between an unfolded protein and rigid macromolecular cosolutes: Macromolecular crowding and protein stability revisited. *Biophys. J.* **88**, 971–985 (2005).
92. Miner, J. C. & García, A. E. Concentration-dependent and configuration-dependent interactions of monovalent ions with an RNA tetraloop. *J. Chem. Phys.* **148**, 222837 (2018).
93. Gao, M., Arns, L. & Winter, R. Modulation of the Thermodynamic Signatures of an RNA Thermometer by Osmolytes and Salts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 2302–2306 (2017).
94. Bennion, B. J. & Daggett, V. Counteraction of urea-induced protein denaturation by trimethylamine N-oxide: A chemical chaperone at atomic resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6433–6438 (2004).
95. Spillantini, M. G. *et al.*  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840 (1997).
96. Ono, K., Hirohata, M. & Yamada, M.  $\alpha$ -Synuclein Assembly as a Therapeutic Target of Parkinsons Disease and Related Disorders. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 3247–3266 (2008).
97. Wakabayashi, K., Yoshimoto, M., Tsuji, S. & Takahashi, H. A-Synuclein Immunoreactivity in Glial Cytoplasmic Inclusions in Multiple System Atrophy. *Neurosci. Lett.* **249**, 180–182 (1998).
98. Tröster, A. I. Neuropsychological characteristics of dementia with Lewy bodies and Parkinson’s disease with dementia: Differentiation, early detection, and implications for ‘mild cognitive impairment’ and biomarkers. *Neuropsychol. Rev.* **18**, 103–119 (2008).
99. Hegde, M. L. & Jagannatha Rao, K. S. Challenges and complexities of  $\alpha$ -synuclein toxicity: New postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson’s disease. *Arch. Biochem. Biophys.* **418**, 169–178 (2003).

## Literaturverzeichnis

100. Giasson, B. I., Uryu, K., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Y. Mutant and wild type human  $\alpha$ -synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**, 7619–7622 (1999).
101. Hegde, M. L. & Rao, K. S. J. DNA induces folding in  $\alpha$ -synuclein: Understanding the mechanism using chaperone property of osmolytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **464**, 57–69 (2007).
102. Hegde, M. L. & Vasudevaraju, P. DNA induced folding/fibrillation of alpha-synuclein: new insights in Parkinson's disease. *Front. Biosci.* **15**, 418–436 (2010).
103. Kikuchi, A. *et al.* Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol. Dis.* **9**, 244–248 (2002).
104. Cherny, D., Hoyer, W., Subramaniam, V. & Jovin, T. M. Double-stranded DNA stimulates the fibrillation of  $\alpha$ -synuclein in vitro and is associated with the mature fibrils: An electron microscopy study. *J. Mol. Biol.* **344**, 929–938 (2004).
105. Rhodes, D. & Lipps, H. J. Survey and summary G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8627–8637 (2015).
106. Assi, H. A., Garavís, M., González, C. & Damha, M. J. I-motif DNA: Structural features and significance to cell biology. *Nucleic Acids Res.* **46**, 8038–8056 (2018).
107. Xue, Y. *et al.* Human telomeric DNA forms parallel-stranded intramolecular G-quadruplex in  $K^+$  solution under molecular crowding condition. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 11185–11191 (2007).
108. Knop, J.-M. M., Patra, S., Harish, B., Royer, C. A. & Winter, R. The Deep Sea Osmolyte Trimethylamine N -Oxide and Macromolecular Crowders Rescue the Antiparallel Conformation of the Human Telomeric G-Quadruplex from Urea and Pressure Stress. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 14346–14351 (2018).
109. Di Antonio, M. *et al.* Single-molecule visualization of DNA G-quadruplex formation in live cells. *Nat. Chem.* **12**, 832–837 (2020).
110. Tong, X. *et al.* Solution structure of all parallel G-quadruplex formed by the oncogene RET promoter sequence. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6753–6763 (2011).
111. Lin, W. L., Delucia, M. W. & Dickson, D. W.  $\alpha$ -Synuclein immunoreactivity in neuronal nuclear inclusions and neurites in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* **354**, 99–102 (2004).
112. Gao, M. *et al.* RNA Hairpin Folding in the Crowded Cell. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 3224–3228 (2016).

## Literaturverzeichnis

113. Aviñó, A. *et al.* Stabilization of Telomeric I-Motif Structures by (2' S )-2'-Deoxy-2'- C - Methylcytidine Residues. *ChemBioChem* **18**, 1123–1128 (2017).
114. Day, H. A., Pavlou, P. & Waller, Z. A. E. I-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 4407–4418 (2014).
115. Sedghi Masoud, S. *et al.* Analysis of Interactions between Telomeric i-Motif DNA and a Cyclic Tetraoxazole Compound. *ChemBioChem* **19**, 2268–2272 (2018).
116. Uversky, V. N., M. Cooper, E., Bower, K. S., Li, J. & Fink, A. L. Accelerated  $\alpha$ -synuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS Lett.* **515**, 99–103 (2002).
117. De Oliveira, G. A. P. *et al.* Structural basis for the dissociation of  $\alpha$ -synuclein fibrils triggered by pressure perturbation of the hydrophobic core. *Sci. Rep.* **6**, 1–15 (2016).
118. Bisaglia, M. *et al.* Structure and topology of the non-amyloid- $\beta$  component fragment of human  $\alpha$ -synuclein bound to micelles: Implications for the aggregation process. *Protein Sci.* **15**, 1408–1416 (2006).
119. Dettler, J. M., Buscaglia, R., Le, V. H. & Lewis, E. A. DSC deconvolution of the structural complexity of c-MYC P1 promoter G-Quadruplexes. *Biophys. J.* **100**, 1517–1525 (2011).
120. Pagano, B. *et al.* Differential scanning calorimetry to investigate G-quadruplexes structural stability. *Methods* **64**, 43–51 (2013).
121. Turner, A. L. *et al.* Highly disordered histone H1–DNA model complexes and their condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 11964–11969 (2018).
122. Aguado-Llera, D. *et al.* The basic helix-loop-helix region of human neurogenin 1 is a monomeric natively unfolded protein which forms a ‘fuzzy’ complex upon DNA binding. *Biochemistry* **49**, 1577–1589 (2010).
123. Holmstrom, E. D., Liu, Z., Nettels, D., Best, R. B. & Schuler, B. Disordered RNA chaperones can enhance nucleic acid folding via local charge screening. *Nat. Commun.* **10**, 1–11 (2019).
124. Wu, K. P., Weinstock, D. S., Narayanan, C., Levy, R. M. & Baum, J. Structural Reorganization of  $\alpha$ -Synuclein at Low pH Observed by NMR and REMD Simulations. *J. Mol. Biol.* **391**, 784–796 (2009).
125. Ghosh, S., Pandey, N. K., Sen, S., Tripathy, D. R. & Dasgupta, S. Binding of hen egg white lysozyme fibrils with nucleic acids. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **127**, 52–60 (2013).
126. Calamai, M. *et al.* Nature and significance of the interactions between amyloid fibrils and biological polyelectrolytes. *Biochemistry* **45**, 12806–12815 (2006).

## Literaturverzeichnis

127. Luscombe, N. M., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. Amino acid-base interactions: A three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2860–2874 (2001).
128. Nakano, S. I., Miyoshi, D. & Sugimoto, N. Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids. *Chem. Rev.* **114**, 2733–2758 (2014).
129. Zhou, H.-X., Rivas, G. & Minton, A. P. Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 375–397 (2008).
130. Uversky, V. N., Li, J. & Fink, A. L. Trimethylamine-N-oxide-induced folding of  $\alpha$ -synuclein. *FEBS Lett.* **509**, 31–35 (2001).
131. Hong, J. & Xiong, S. TMAO-Protein Preferential Interaction Profile Determines TMAO's Conditional In Vivo Compatibility. *Biophys. J.* **111**, 1866–1875 (2016).
132. Vasudevaraju, P., Bharathi, Garruto, R. M., Sambamurti, K. & Rao, K. S. J. Role of DNA dynamics in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* **58**, 136–148 (2008).
133. MacEdo, B. *et al.* Nonspecific prion protein-nucleic acid interactions lead to different aggregates and cytotoxic species. *Biochemistry* **51**, 5402–5413 (2012).
134. Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P. & Binder, L. I. Identification of nuclear T isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8422–8426 (1990).
135. Maroteaux, L., Campanelli, J. T. & Scheller, R. H. Synuclein: A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* **8**, 2804–2815 (1988).
136. Hegde, M. L. *et al.* Studies on genomic DNA topology and stability in brain regions of Parkinson's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* **449**, 143–156 (2006).
137. Suram, A., Rao, J. K. S., Latha, K. S. & Viswamitra, M. A. First evidence to show the topological change of DNA from B-DNA to Z-DNA conformation in the hippocampus of Alzheimer's brain. *NeuroMolecular Med.* **2**, 289–297 (2002).
138. Siddiqui, A. *et al.* Selective binding of nuclear alpha-synuclein to the PGC1alpha promoter under conditions of oxidative stress may contribute to losses in mitochondrial function: Implications for Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 993–1003 (2012).
139. Jiang, K. *et al.* Alpha-Synuclein Modulates the Physical Properties of DNA. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 15685–15690 (2018).
140. Roth, D. B., Menetski, J. P., Nakajima, P. B., Bosma, M. J. & Gellert, M. V(D)J recombination: Broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell* **70**, 983–991 (1992).

## Literaturverzeichnis

141. Varani, G. Exceptionally stable nucleic acid hairpins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 379–404 (1995).
142. Senske, M. *et al.* Protein stabilization by macromolecular crowding through enthalpy rather than entropy. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 9036–9041 (2014).
143. Gao, M. *et al.* Crowders and Cosolvents-Major Contributors to the Cellular Milieu and Efficient Means to Counteract Environmental Stresses. *ChemPhysChem* **18**, 2951–2972 (2017).
144. Charlton, L. M. *et al.* Residue-level interrogation of macromolecular crowding effects on protein stability. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6826–6830 (2008).
145. Alberti, S., Gladfelter, A. & Mittag, T. Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell* **176**, 419–434 (2019).
146. Berry, J., Brangwynne, C. P. & Haataja, M. Physical principles of intracellular organization via active and passive phase transitions. *Reports Prog. Phys.* **81**, (2018).
147. Arns, L. & Winter, R. Liquid-liquid phase separation rescues the conformational stability of a DNA hairpin from pressure-stress. *Chem. Commun.* **55**, 10673–10676 (2019).
148. Arns, L., Knop, J.-M., Patra, S., Anders, C. & Winter, R. Single-molecule insights into the temperature and pressure dependent conformational dynamics of nucleic acids in the presence of crowders and osmolytes. *Biophys. Chem.* **251**, 1–12 (2019).
149. Oliva, R., Banerjee, S., Cinar, H. & Winter, R. Modulation of enzymatic activity by aqueous two-phase systems and pressure-rivalry between kinetic constants. *Chem. Commun.* **56**, 395–398 (2020).
150. Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F. & George, J. M. Stabilization of  $\alpha$ -Synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* **273**, 9443–9449 (1998).
151. BioNTech Manufacturing GmbH. Information für Anwender: Comirnaty Konzentrat zur Herstellung einer Injektionsdispersion. 1–10 (2021).

## Abbildungsverzeichnis

### 10.6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Links: Nach Watson und Crick benannte Basenpaarung innerhalb der DNS-Doppelhelix. Adenin und Thymin mit zwei Wasserstoffbrückenbindungen (oben), sowie Guanin und Cytosin mit drei Wasserstoffbrückenbindungen (unten). (R für Desoxyribose). Rechts: Native B-Helixform zweier komplementärer DNS-Stränge (Dodecamer, PDB-Code: 1BNA).<sup>2</sup>.....5
- Abbildung 2: Verschiedene schematisch dargestellte G-Quadruplex-Konformationen mit in grau dargestellten G-Tetraden und in rot dargestelltem Strangverlauf (links). Hoogsteen-Basenpaarung einer Guanin-Tetrade mit koordiniertem zentralen Metallkation  $M^+$  (rechts)....7
- Abbildung 3: Schematische Darstellung eines vollständig (links oben) und eines teilgefalteten (links unten) i-Motivs (H-Brücken in blau), sowie H-Brückenbindungen zwischen Cytosin (blau) und protoniertem Hemicytosin (rot) (rechts).....9
- Abbildung 4: Schematische Darstellung eines DNS-Hairpins mit Watson-Crick-Basenpaarung in blau.....9
- Abbildung 5: Schematische Darstellung von G-Quadruplexen und i- Motiven *in vivo*.....10
- Abbildung 6: Harnstoff (links) und Trimethylamin-*N*-oxid (rechts).....14
- Abbildung 7: 3-D-Schema des makromolekularen *Crowding*-Effekts. In transparentem rot ist das Ausschlussvolumen dargestellt. Dieses ist für den Mittelpunkt des grünen Moleküls nicht erreichbar.....15
- Abbildung 8: Verschiedene makromolekulare *Crowder*. Dextran besteht aus  $\alpha$ -1,6 verknüpften D-Glukoseeinheiten, welche teilweise durch  $\alpha$ -1,3-Bindungen quervernetzt sind. PEG besteht aus linear verknüpften Ethylenglycoleinheiten. Ficoll ist ein quervernetztes Saccharose (a)-Epichlorhydrin (b)-Copolymer. x, y, a, b, c und n geben jeweils die Wiederholungsanzahl an. ....16
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von TMAO und Harnstoff. Während TMAO von der Oberfläche ausgeschlossen ist (*excluded volume effect* bzw. *preferential hydration*) und so kompakte Strukturen wie G-Quadruplexe begünstigt, lagert sich Harnstoff an der Oberfläche an und sorgt so für die enthalpische Absenkung der Entfaltungsgibbs-Energie. Dies führt bei hohen Konzentrationen zur Entfaltung des Biomoleküls. Rote Linie: Guanin-reiches Oligonukleotid, TMAO, Harnstoff und Wasser als Kugelstruktur.....17
- Abbildung 10: Jablonski-Schema der Anregung und Relaxation eines Fluorophors. Durch Absorption (blau) wird ein Molekül hier vom Grundzustand  $S_0$  in einen Schwingungszustand  $v$  des elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$  angeregt. Zunächst relaxiert das System in den untersten Schwingungszustand  $v_0$  des angeregten Zustandes  $S_1$ . Anschließend sind verschiedene Relaxationwege wie Fluoreszenz, Vibrationsrelaxation nach innerer

## Abbildungsverzeichnis

Umwandlung ( <i>internal conversion</i> ) oder Phosphoreszenz nach Interkombination ( <i>intersystem crossing</i> ) in den Triplettzustand möglich.....	18
Abbildung 11: Absorptions- und Emmissionspektrum von ATTO 550 und ATTO 647N mit gekennzeichnete Überlappung. Die geplotteten Werte stammen aus den Supportdaten von ATTO-TEC. <sup>73,74</sup> .....	20
Abbildung 12: Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz $E$ mit $R_0 = 6.5$ nm (blauer Punkt). Entspricht dem Försterradius von ATTO 550 und ATTO 647N. <sup>75</sup> .....	21
Abbildung 13: Schematische Darstellung eines konfokalen Mikroskops. Das Laserlicht passiert den Strahlenteiler, regt die fluoreszenzmarkierte Probe in und um die Fokusebene an. Das rotverschobene Fluoreszenzlicht wird vom Strahlenteiler reflektiert. Nicht aus der Fokusebene stammendes Licht wird durch die Lochblende vor dem Detektor gestoppt.....	23
Abbildung 14: Anzahl der Fluoreszenzphotonen des i-Motivs (ca. 50 pM) in 20 mM TrisHCl bei pH 7.5, 15 mM NaCl bei einer <i>binning time</i> von 1 ms.....	25
Abbildung 15: Schematische Darstellung der <i>pulsed interleaved excitation</i> (PIE) zum Ausschluss von Fluoreszenzsignalen, welche nicht auf doppelt gelabelten Molekülen basieren. D = Donorfluorophor, A = Akzeptorfluorophor. Im ersten und zweiten Fall (links und mittig) ergibt sich im Idealfall (gleiche Quantenausbeute, Detektorsensitivität) eine Photonenstöchiometrie von 0.5. Der zu diskriminierende Fall rechts ergäbe eine Photonenstöchiometrie von 1.....	26
Abbildung 16: Schematischer Aufbau der Messapparatur mit Kapillare für Hochdruckmessungen.....	28
Abbildung 17: Schematische 2D-Darstellung des elektronischen Feldvektors von verschieden polarisiertem Licht (links: zirkular polarisiert, mitte: linear polarisiert und rechts elliptisch polarisiert). Im Fall des elliptisch polarisierten Licht ist die Elliptizität $\Theta$ in rot und der optische Drehwinkel $\alpha$ eingezeichnet.....	30
Abbildung 18: Schema des Aufbaus des CD-Spektropolarimeters J-715 von Jasco. Polychromatisches Licht aus einer 150 W Xenonlampe wird mit einem Spiegelsystem und einem parallel ausgerichteten $\alpha$ -Quarz-Prisma farblich zerlegt. Ein Spalt lässt nur Licht mit der gewünschten Wellenlänge passieren. Ein zweites Spiegelsystem mit senkrecht ausgerichtetem $\alpha$ -Quarz-Prisma spaltet das Licht nach dem Drehwinkel der Polarisationssebene auf. Das so entstehende linear polarisierte Licht wird nach Fokussierung durch Linse und Filter mittels eines photoelastischen Modulators (PEM) abwechselnd rechts- und linkszirkular polarisiert. Der <i>Shutter</i> lässt das Licht in den entsprechenden Zeitabständen in die Probenkammer. Die Transmission wird anschließend von einem Photomultiplier detektiert.....	31

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 19: Temperaturabhängige CD-Spektren des i-Motiv-Konstruktes (C3+DS1) in 20 mM Natriumacetat-Puffer bei pH 5. Beispiel für die Subtraktion der Doppelstrangspektren (DS1+DS2) von den Spektren des Konstruktes (C3+DS1).....34
- Abbildung 20: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe. R steht für die Verknüpfung mit der Nukleobase des Thymidin.....36
- Abbildung 21: Autokorrelation der Fluoreszenz von C1+C2 (Anregung von ATTO 647N bei 635 nm) mit Fit nach dem Modell aus Gleichung (23).....37
- Abbildung 22: Mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelte Größenverteilung von  $\alpha$ -Synuclein bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M (rot) und 50  $\mu$ M (schwarz).....39
- Abbildung 23: Struktur von Polysorbat 80 mit  $w+y+x+z = 20$ .....40
- Abbildung 24: Temperaturabhängige FRET-Effizienz-Histogramme (a) und (c), sowie die relativen Konformationsanteile (b) und (d) des telomerischen G-Quadruplexes in TrisHCl-Puffer bei pH 7.5 und 1 bar. Die Proben für (c) und (d) enthielten darüber hinaus 1 M TMAO. ....44
- Abbildung 25: CD-Messung des humanen G-Quadruplexes (G4) in 20 mM TrisHCl pH 7.5 und 15 mM NaCl (a). Die Probe für (b) enthielt zusätzlich 1 M TMAO.....45
- Abbildung 26: (a)-(e) Druckabhängige FRET-Effizienz-Histogramme des G-Quadruplex-Konstruktes in 20 mM TrisHCl pH 7.5 und 25 °C. Die farbigen Linien geben die gefitteten Gauss-Peaks für die Bestimmung der Konformationsanteile an (rot: antiparallel, blau: parallel/hybrid und grün: entfaltet). (a) Reiner Puffer, (b) 15 Gew.-% Ficoll, (c) 1 M TMAO, (d) 2 M Harnstoff und (e) 2 M Harnstoff und 1 M TMAO.....49
- Abbildung 27: Sequenz G4 schematisch in einer antiparallelen Korb-Konformation mit der für die NMR-Auswertung verwendeten Guanin-Nummerierung dargestellt.....50
- Abbildung 28: (a)-(e) Druckabhängige relative Anteile der Konformationen des telomerischen G-Quadruplexes in TrisHCl-Puffer mit pH 7.5 bei 25 °C. (b)-(e) enthielten darüber hinaus die Zusätze: (b) 15 Gew.-% Ficoll PM 70, (c) 1 M TMAO, (d) 2 M Harnstoff, (e) 1 M TMAO und 2 M Harnstoff. Konformationen:  $E \approx 0.9$  antiparallel,  $E \approx 0.6$  prallel oder hybrid,  $E \approx 0.3$  entfaltet. (f) Berechnung der druckinduzierten Volumenänderung in Puffer und (g) unter Zusatz von 1 M TMAO mittels linearer Regression nach Gleichung (5).....51
- Abbildung 29: (A) 1D  $^1\text{H}$  NMR-Spektren und (B) 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY NMR-Spektren der DNS-Sequenz G4 bei verschiedenen Drücken in 50 mM NaCl.....53
- Abbildung 30: FRET-Effizienz-Histogramme des G-Quadruplex-Konstruktes (G1+G2) in 20 mM TrisHCl,  $\sim 5 \mu\text{M}$  NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration von monomerem (a), (b) und aggregiertem (c),(d)  $\alpha$ -Synuclein und bei zusätzlicher Zugabe von 30 Gew.-% Ficoll PM 70 (b), (d). In allen vier Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50  $\mu\text{M}$ . ....58



## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 31:** Relative Anteile des G-Quadruplex-Konstruktes (G1+G2) in 20 mM TrisHCl, ~5 µM NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration von monomerem (a), (b) und aggregiertem (c),(d) α-Synuclein und bei zusätzlicher Zugabe von 30 Gew.-% Ficoll PM 70 (b), (d). In allen vier Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.....59
- Abbildung 32:** CD-Spektren telomerischer i-Motiv-DNS. C4 (a) und C3+DS1 (c) in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH 5, C4 (b) und C3+DS1 (d) in 20 mM Na<sub>x</sub>H<sub>x</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer bei pH 7.5. Die DNS-Konzentration betrug 15 µM.....61
- Abbildung 33:** FRET-Effizienz-Histogramme von C1+C2 (50 pM) bei 25 °C in 20 mM Natriumacetatpuffer bei pH = 5 (a) und in 20 mM TrisHCl-Puffer mit 15 mM NaCl bei pH = 7.5 (b).....62
- Abbildung 34:** FRET-Effizienz-Histogramme (a), (c) und relativer Anteil (b), (d) des i-Motiv-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, ~5 µM NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration monomeren α-Synucleins (a), (b) und aggregierten α-Synucleins (c), (d). In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.....63
- Abbildung 35:** FRET-Effizienz-Histogramme (a), (c) und relativer Anteil der Konformationen (b), (d) des i-Motiv-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, ~5 µM NaCl und 30 Gew.-% Ficoll PM 70 bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration monomeren α-Synucleins (a), (b) und aggregierten α-Synucleins (c), (d). In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM. ....64
- Abbildung 36:** FRET-Effizienz-Histogramme (A, C) und relativer Anteil der Konformationen (B, D) des i-Motiv-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, ~5 µM NaCl in Abhängigkeit des Drucks. Die Proben für C und D enthielten zusätzlich 1 M TMAO. In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.....65
- Abbildung 37:** FRET-Effizienz-Histogramme (A), (C) und relativer Anteil der Konformationen (B), (D) des i-Motiv-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, ~5 µM NaCl in Abhängigkeit des Drucks. Die Proben für A und B enthielten zusätzlich 100 µM monomeres α-Synuclein, die Proben für C und D 100 µM aggregiertes α-Synuclein. In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.....66
- Abbildung 38:** Druckabhängige Thioflavin-T- Fluoreszenz für α-Synuclein-Aggregate.....67
- Abbildung 39:** FRET-Effizienz-Histogramme (A), (C) und relativer Anteil der Konformationen (B), (D) des i-Motiv-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, ~5 µM NaCl und 1 M TMAO in Abhängigkeit des Drucks. Die Proben für A und B enthielten zusätzlich 100 µM monomeres α-Synuclein, die Proben für C und D 100 µM aggregiertes α-Synuclein. In beiden Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM.....68
- Abbildung 40:** Telomerische i-Motiv-Sequenz in 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. (a) und (b) zeigen das FRET-Effizienz-Histogramm und den Verlauf der Konformationsanteile in

## Abbildungsverzeichnis

- Abhängigkeit der Konzentration von monomerem Lysozym. (c) und (d) zeigen entsprechend die Abhängigkeit von aggregiertem Lysozym.....69
- Abbildung 41: Telomerische G-Quadruplex-Sequenz in 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. (a) und (b) zeigen das FRET-Effizienz-Histogramm und den Verlauf der Konformationsanteile in Abhängigkeit der Konzentration von monomerem Lysozym. (c) und (d) zeigen entsprechend die Abhängigkeit von aggregiertem Lysozym.....70
- Abbildung 42: G-Quadruplex-Sequenz aus der c-Myc Promotorregion (G5+G2) in 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. (a) und (b) zeigen das FRET-Effizienz-Histogramm und den Verlauf der Konformationsanteile in Abhängigkeit der Konzentration von monomerem  $\alpha$ -Synuclein. (c) und (d) zeigen entsprechend die Abhängigkeit von aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein...71
- Abbildung 43: Sequenz und schematische Darstellung des verwendeten *Hairpin*-Konstruktes (DS1+DS2).....76
- Abbildung 44: DNS-*Hairpin* in 20 mM TrisHCl pH 7.5 und 15 mM NaCl bei verschiedenen Drücken. Links: Histogramme mit gefitteten Gausspeaks. Mitte: Relativer Anteil der geschlossenen und der offenen Konformation in Abhängigkeit des Drucks. Rechts: Regrussionsgerade zur Bestimmung des Entfaltungsvolumens nach Gleichung (7).....77
- Abbildung 45: FRET-Effizienz-Histogramme DNS-*Hairpin*-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, 15 mM NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration monomeren  $\alpha$ -Synucleins (a) und des Drucks (b)-(f). (b) bis (d) enthielten in entsprechender Reihenfolge eine  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration von 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M und 200  $\mu$ M, (e) und (f) enthielten zusätzlich zu 50  $\mu$ M (e) bzw. 150  $\mu$ M (f)  $\alpha$ -Synuclein noch 11 Gew.-% PEG und 11 Gew.-% Dextran (ATPS). In allen Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM in der untersuchten Phase.79
- Abbildung 46: Relative Anteile der Konformationen des DNS-*Hairpin*-Konstruktes in 20 mM TrisHCl, 15 mM NaCl bei pH 7.5 und 25 °C in Abhängigkeit der Konzentration monomeren  $\alpha$ -Synucleins (a) und des Drucks (b)-(f). (b) bis (d) enthielten in entsprechender Reihenfolge eine  $\alpha$ -Synuclein-Konzentration von 50  $\mu$ M, 150  $\mu$ M und 200  $\mu$ M, (e) und (f) enthielten zusätzlich zu 50  $\mu$ M (e) bzw. 150  $\mu$ M (f)  $\alpha$ -Synuclein noch 11 Gew.-% PEG und 11 Gew.-% Dextran (ATPS). In allen Fällen betrug die DNS-Konzentration ca. 50 pM in der untersuchten Phase.82
- Abbildung 47: FRET-Effizienz-Histogramme (a) (c) und relative Konformationsanteile (b) (d) des DNS-*Hairpins* in 15 mM NaCl und 20 mM TrisHCl-Puffer bei pH 7.5. Die Probe für (a) und (b) enthielt zusätzlich 50  $\mu$ M  $\alpha$ -Synuclein und 11 Gew.-% PEG. Die Probe für (c) und (d) enthielt zusätzlich 30 Gew.-% Dextran.....83
- Abbildung 48: Druckabhängige Änderung der Peakfläche der Iminoprotonenpeaks aus den entsprechenden NMR-Daten (Abbildung 29) mit Boltzmann-Fit zur Bestimmung der Volumenänderung. Ausgewertet von Dr. Balasubramanian Harish.....I

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 49:** Lineare Regressionsgerade zur Bestimmung der Volumenänderung nach Gleichung (5).  $K_{eq}$  ist die Gleichgewichtskonstante der Messung des DNS-Hairpins in 20 mM TrisHCl pH 7.5, 15 mM NaCl und 50  $\mu$ M monomerem  $\alpha$ -Synuclein bei 25 °C.....II

**Abbildung 50:** Boltzmann-Fits nach Gleichung (9) (Linien) zur Bestimmung der Umwandlungstemperaturen und Van't Hoff-Enthalpie von G1+G2. Gemessen wurde in 20 mM TrisHCl pH 7.5, 5  $\mu$ M NaCl, bei 25 °C. Blau: relativer Anteil der parallelen Konformation ( $E \approx 0.6$ ). Grün: Anteil der entfalteten Konformation ( $E \approx 0.3$ ).....II

**Abbildung 51:** Boltzmann-Fits nach Gleichung Gleichung(9) (Linien) zur Bestimmung der Umwandlungstemperaturen und Van't Hoff-Enthalpie von G1+G2. Gemessen wurde in 20 mM TrisHCl pH 7.5, 5  $\mu$ M NaCl und 1 M TMAO bei 25 °C. Blau: relativer Anteil der parallelen Konformation ( $E \approx 0.6$ ). Grün: relativer Anteil der entfalteten Konformation ( $E \approx 0.3$ ).....III

## Publikationsliste

### 10.7 Publikationsliste

1. Patra, S.; Schuabb, V.; Kiesel, I.; Knop, J.-M.; Oliva, R. and Winter R. Exploring the effects of cosolutes and crowding on the volumetric and kinetic profile of the conformational dynamics of a poly dA loop DNA hairpin: a single-molecule FRET study. *Nucleic Acid Res.* **2**, 47, 981-996 (2019) DOI: 10.1093/nar/gky1122.
2. Knop, J.-M.; Patra, S.; Harish, B.; Royer, C. A. and Winter R. The Deep Sea Osmolyte Trimethylamine N-Oxide and Macromolecular Crowders Rescue the Antiparallel Conformation of the Human Telomeric G-Quadruplex from Urea and Pressure Stress. *Chem. - A Eur. J.* **54**, 24, 14346-14351 (2018) DOI: 10.1002/chem.201802444.
3. Arns, L.; Knop, J.-M.; Patra, S.; Anders, C. and Winter R. Single-molecule insights into the temperature and pressure dependent conformational dynamics of nucleic acids in the presence of crowders and osmolytes. *Biophysical Chemistry* **251**, 106190 (2019) DOI: 10.1016/j.bpc.2019.106190.
4. Mukherjee, S. K.; Knop, J.-M., Möbitz, S. and Winter R. Alteration of the Conformational Dynamics of a DNA Hairpin by  $\alpha$ -Synuclein in the Presence of Aqueous Two-Phase Systems. *Chem. - A Eur. J.* **26**, 10987-10991 (2020) DOI: 10.1002/chem.202002119.
5. Knop, J.-M.; Mukherjee, S. K.; Oliva, R.; Möbitz, S. and Winter R. Remodeling of the Conformational Dynamics of Noncanonical DNA Structures by Monomeric and Aggregated  $\alpha$ -Synuclein. *J. Am. Chem. Soc* **142**, 18299-18303 (2020) DOI: 10.1021/jacs.0c07192.
6. Mukherjee, S. K.; Knop, J.-M., Möbitz, S. and Winter R. Untangling the Interaction of  $\alpha$ -Synuclein with DNA i-Motifs and Hairpins by Volume-sensitive Single-molecule FRET Spectroscopy *RSC Chem. Biol.* Angenommen im Juli 2021 DOI: 10.1039/d1cb00108f

Inhalte einschließlich graphischer Darstellungen der unter Beteiligung des Autors erstellten Publikationen 2., 4., 5. und 6. wurden mit Genehmigung der Rechteinhaber in dieser Dissertation wiederverwendet. Die Lizenznummer für 2. lautet: 5102460265818. Die unter 4., 5. und 6. aufgeführten Publikationen dürfen ohne weitere Genehmigung im Rahmen von Dissertationen wiederverwendet werden.

# Vorträge und Präsentationen

## 10.8 Vorträge und Präsentationen

- 1) J.-M. Knop, S. Patra, R. Winter *On the pressure stability of G-quadruplex forming DNA from human telomere* **Vortrag** DFG FOR 1979 Meeting, Regensburg Deutschland, 26.03.2018
- 2) J.-M. Knop, S. Patra, R. Winter *The Deep-Sea Osmolyte TMAO Facilitates Conformational Stability of G-Quadruplex* **Posterpräsentation** 10th HPBB Konferenz, Numazu Japan, 20.09.2018
- 3) J.-M. Knop, S. Patra, B. Harish, C. A. Royer, R. Winter *The Deep-Sea Osmolyte TMAO Facilitates Conformational Stability of G-Quadruplex DNA Structures Against Urea and Pressure Stress* **Posterpräsentation** 10th IMBP - DFG FOR 1979 - RESOLV Konferenz, Dortmund Deutschland 30.09.2019
- 4) J.-M. Knop, S. Patra, B. Harish, C. A. Royer, R. Winter *Investigating the Pressure Stability of Non-Canonical DNA Motifs by Single-Molecule FRET Microscopy* **Vortrag und Posterpräsentation** RESOLV Meeting, Bochum Deutschland 26.11.2019
- 5) J.-M. Knop, S. Patra, B. Harish, C. A. Royer, R. Winter *Investigating the Pressure Stability of Non-Canonical DNA Motifs by Single-Molecule FRET Microscopy* **Vortrag** Tag der Chemie, Dortmund Deutschland, 07.02.2020