

# Hidden Markov Modelle für Einzelmoleküldaten

Von der Fakultät Mathematik und Physik der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Nawid Zarrabi

aus Konstanz

Hauptberichter:	Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter:	Prof. Don C. Lamb (LMU München)
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Christian Holm

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Mai 2010

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart

2010



„Vieles Reden tut es nicht  
nur das Messen bringt's ans Licht“

Lichtenberg

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Summary .....</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>16</b>
1.1 Historie und Anwendungsbeispiele von Hidden Markov Modellen.....	19
1.2 Hidden Markov Modelle in der Einzelmolekülspektroskopie .....	20
1.3 Ziel der Arbeit .....	21
<b>2 Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie .....</b>	<b>24</b>
2.1 Photophysik organischer Fluorophore .....	24
2.2 Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) .....	27
2.3 Einzelmolekül-FRET-Aufbau als TIR-Mikroskop .....	30
2.4 Einzelmolekül-FRET-Aufbau als konfokales Mikroskop.....	32
2.5 Duty Cycle Optimized Alternating Laser Excitation (DCO-ALEX).....	35
2.6 Auswertesoftware Burst Analyzer .....	37
2.7 Hellfeldmikroskopie.....	39
<b>3 Hidden Markov Modelle.....</b>	<b>40</b>
3.1 Grundgerüst eines Hidden Markov Modells .....	40
3.2 Die klassische Maximum-Likelihood-Methode.....	41
3.3 Der Expectation-Maximization-Algorithmus .....	45
3.4 Hidden Markov Modelle .....	47
3.5 Der Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus .....	48
3.6 Viterbi-Pfad .....	50
3.7 Verallgemeinerung auf Semi-Markov-Prozesse .....	51
3.8 Anwendung der Hidden-Markov-Modelle auf Messdaten.....	52
3.8.1 Erweiterung der Hidden-Markov-Modelle auf Einzelmolekül-FRET-Daten .....	52
3.8.2 Neue Schätzer für die Hidden Markov Modelle .....	54
3.9 Modellauswahl-Kriterien .....	60
<b>4 Das TATA-Box Binde-Protein (TBP) und der negative Cofaktor 2 (NC2) .</b>	<b>65</b>
4.1 Experimentelle Realisierung .....	68
4.2 Probenpräparation .....	68
4.3 Beschreibung der Dynamik in den FRET-Trajektorien .....	70
4.4 Hidden Markov Analyse .....	72
4.5 Modellselektionskriterien.....	77
4.6 Molekülweises HMM im Vergleich zu globalen HMMs.....	80
4.7 Diskussion der Dynamik .....	82
4.8 FRET-Datenanalyse der Ratenmatrizen.....	83
4.9 Interpretation der Ergebnisse .....	87

<b>5</b>	<b>Der Kdp-Transporter .....</b>	<b>89</b>
5.1	Einzelmoleküldaten .....	92
5.2	Automatische Burstmarkierung.....	95
5.3	Manuelle Auswertung .....	97
5.4	Auswertung mit Hidden Markov Modelle .....	99
5.4.1	Beispieltrajektorien .....	101
5.4.2	Modelle mit weiteren Zuständen.....	106
5.5	Diskussion .....	107
<b>6</b>	<b>Die EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase.....</b>	<b>111</b>
6.1	Struktur und Funktion der F-Typ ATP-Synthase aus <i>E. coli</i> .....	111
6.2	Enzympräparation für fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen .....	112
6.3	Konformationsänderungen der ε-Untereinheit durch Aktivierung der ATP-Synthase.....	114
6.4	Position der α-Untereinheit .....	117
6.5	Wirkung des Inhibitors Aurovertin .....	118
6.6	Rotation des c-Rings .....	121
6.7	Zusammenfassung .....	130
<b>7</b>	<b>Die F<sub>1</sub>-ATPase.....</b>	<b>132</b>
7.1	Probenpräparation .....	133
7.2	Ausgangspunkt der Datenanalyse .....	134
7.3	Eine erweiterte HMM-Architektur.....	135
7.4	Korrekte Modellierung der Rückwärtsschritte.....	137
7.5	Abhängigkeit der Übergangsraten von Nukleotid- und Phosphatkonzentration .....	139
7.6	Zuordnung der Mikrozustände und Übergangsraten.....	141
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>143</b>
8.1	Stärken der Hidden Markov Analyse .....	143
8.2	Grenzen der Hidden Markov Analyse.....	144
8.3	Photonenweise Hidden Markov Modelle.....	144
8.4	Vergleich mit anderen Analyseverfahren.....	145
8.5	Robustheit.....	147
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>148</b>
<b>Anhang A</b>	<b>Verteilungsfunktion der FRET-Effizienz aus Normalverteilungen .....</b>	<b>152</b>
<b>Anhang B</b>	<b>Verbreiterung der Emissionsfunktion.....</b>	<b>157</b>
<b>Anhang C</b>	<b>Herleitung der klassischen Schätzfunktionen.....</b>	<b>159</b>
<b>Anhang D</b>	<b>Herleitung der modifizierten Schätzfunktionen.....</b>	<b>162</b>
<b>Anhang E</b>	<b>2D-Histogramme .....</b>	<b>166</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>167</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2D	zwei-dimensional
3D	drei-dimensional
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AdML	Adenovirus Major Late
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AIC	Akaike Information Criterion
ALEX	Alternating Laser Excitation
AMD	Advanced Micro Devices, Inc.
AMPPNP	Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphat
AOM	Acousto-Optic Modulator
APD	Avalanche Photodiode
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BIC	Bayesian Information Criterion
BSA	Bovine Serum Albumin
CMOS	Complementary Metal-Oxide Semiconductor
DCO	Duty Cycle Optimized
DNA	Deoxyribonucleic Acid
E. coli	Escherichia Coli
ECL	emitter-coupled logic
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Expectation-Maximization
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FLOPS	Floating-Point Operations Per Second
FPT	First Passage Time
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
HMM	Hidden Markov Model
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSMM	Hidden semi-Markov Models

IC	Internal Conversion
ISC	Inter System Crossing
K <sup>+</sup>	Kaliumionen
KCl	Kalium-Chlorid
kDa	Kilodalton
Kdp	Potassium dihydrogen phosphate
LSM	Laser Scanning Microscope
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
M	Mol
MATLAB	Matrix Laboratory (Mathworks, Inc.)
MgCl	Magnesium Chlorid
MOPS	3-(n-Morpholino)Propanesulfonic Acid
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NC2	Negative Cofaktor 2
OCS	Oligocyclic suboxides
PCH	Photon Counting Histogram
PDB	Protein Data Bank
PDF	Probability Density Function
PEG	Polyethylene Glycol
RMS	Root-Mean-Square
RNA	Ribonucleic Acid
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Atpase
SMP	Sub-Mitochondriale Partikel
SPC	Single Photon Counting
TATA	Thymine Adenine Thymine Adenine
TBP	TATA-Box-Binding Protein
TCSPC	Time-Correlated Single-Photon Counting
TFIIA	Transcription Factor IIA
TIR	Total Internal Reflection
TM	Transmembran-Domäne
TMR	Tetramethylrhodamin-C <sub>5</sub> -Maleimid
TNPAMP	Trinitrophenyl-Adenosinmonophosphat
TTL	Transistor-Transistor Logic
WBIC	Weighted Bayesian Information Criterion

## Summary

All living organisms share the same structural and functional unit: the cell. It represents an autonomous and self-maintaining system. A cell contains amongst other components proteins which determine the cell structure and catalyze most of the biochemical reactions inside the cell. A multitude of different tasks are addressed by specialized proteins, so called enzymes, for example replicating DNA, pumping ions selectively across the cell membrane or performing mechanical work. In order to understand the processes taking place inside a cell, it is very important to unravel the enzymatic reaction pathways. Crystallographic methods provide structural snapshots of the proteins while they adopt certain conformations along the reaction pathway. Conformations of numerous important enzymes have been discovered, but these methods have major drawbacks such as long acquisition times and the need for averaging over many molecules. Furthermore, live cell analysis is not possible since all enzymes have to be trapped in the same conformation by stopping the reaction pathway at a certain point. Therefore, protein dynamics or a complete enzymatic reaction pathway cannot be observed with this technique.

The first detection of fluorescence originating from a single molecule 20 years ago marked a breakthrough. This novel technology offers non-invasive optical far-field detection and allows recording the entire reaction pathway in a living cell. The fluorescent time trajectory of a labeled enzyme overcomes the drawback of the signal averaging of ensemble techniques. Single molecule trajectories allow the identification of different conformations and derive statistical information about the number of occurrences, time intervals and transition rates. These are exactly the parameters which characterize a reaction cycle of an enzyme. Consequently, the number of investigated biological systems has drastically increased over the last 20 years. This has been accompanied by the development of many new sample preparation methods as well as detection techniques.

A prerequisite of many single molecule experiments is the introduction of a marker. This can be a fluorescent molecule or a light-scattering polystyrene bead. The rotation of a molecular motor labeled with such a bead allows the widefield detection with a camera from which the position of the protein can be tracked with a time resolution of less than 1 ms using fast video microscopy.

Fluorescence spectroscopy is yet another powerful tool which utilizes the emitted fluorescent light of an excited dye. An extension of this method is Förster Resonance



Energy Transfer (FRET). An excited fluorophore (donor) can transfer its energy radiation-less to another fluorophore (acceptor) that in turn emits the fluorescence photons instead. This FRET process is highly dependent on the mutual distance between both fluorophores. Usually, the spatial sensitivity is in the range between 2 to 10 nm. The distance can be directly obtained from the ratio of the recorded fluorescence intensities of both fluorophores. Protein dynamics can be typically resolved down to about 1 ms which is only limited by the brightness of the fluorophores.

The main goal of these methods is the generation of a trajectory which mirrors the dynamical behavior of the molecule under investigation. A FRET experiment results in a FRET-efficiency trajectory and therefore in time-dependant distance data, a bead experiment results in a trajectory which contains time dependant xy-positions. Once the trajectory has been recorded, the information about the reaction cycle at the single-molecule level in terms of a time trajectory is available. The next critical step is to reconstruct the conformational states of the enzyme by analyzing the measured data stream. In the beginning of single-molecule spectroscopy, analysis-by-eye and threshold based algorithms were used to identify different conformational states. These approaches work as long as two conformations adopt clearly distinguishable values within the time trajectory, i.e. every data point can be assigned to either of the two conformations. The statistical properties, like mean duration or occurrence of each state can be used to extract information about the reaction cycle.

In a more complex reaction cycle of the enzyme, the distribution of the measured values originating from different conformations may overlap. At this point, a threshold algorithm and analysis-by-eye fails. This necessitates more sophisticated analysis methods, which can be applied directly on the recorded time trajectory. In this thesis, the concept of hidden Markov models (HMM) is used as a tool to analyze single-molecule data on a statistically solid basis.

### **Hidden Markov Models**

A hidden Markov model is a stochastic model which can assign unobservable states from a trajectory to measurable values. Unlike the threshold algorithm, the concept of hidden Markov models is capable to deal with overlapping distribution functions. The power of the hidden Markov framework lies in the ability to optimize the whole set of parameters for a given time trajectory.

Every state has its unique probability density function (pdf) of measured values. Transitions from one state into another occur in an autonomous random process, which is only determined by fixed transition probabilities. Due to these transition probabilities the shape of the corresponding state duration histogram has the functional form of a mono-exponential decay and is defined by its decay time.

The initial step of the optimization process is to supply a complete hidden Markov model with initial parameter values. A likelihood value is obtained by applying the model to the given data points, similar to the  $\chi^2$ -value of the widely used Levenberg-Marquardt curve fitting algorithm. Furthermore, this yields an estimate of the probability to be in a specific state for every data point of the trajectory. Using a separate estimation function for each hidden Markov parameter together with the initial state assignment, a better estimation of the model parameters can be deduced. The updated model parameter values result in a higher likelihood value. In an iterative process, all model parameter can be optimized simply by the data of the time trajectory.

However, there are two drawbacks accompanying the standard hidden Markov model when applied to data from single-molecule experiments: Firstly, the signal-to-noise ratio of the measured time trajectories is in general not constant; it fluctuates which in turn affects the width of the probability density functions. The standard hidden Markov model however assumes these parameters to be constant. The second drawback resides in the expected shape of the state duration histograms. Conformational states of enzymes are not necessarily constrained to mono-exponentially decaying functions, although this is often the case. In order to overcome these inherent limitations, two extensions to the framework of hidden Markov models are presented in this thesis and applied to data from single-molecule experiments.

The problem of a fluctuating signal-to-noise ratio typically occurs in single-molecule FRET trajectories. The distribution function of one FRET level with temporally fluctuating sum intensity has the same mean value but different widths depending on the sum intensity. A standard hidden Markov model only provides probability functions with a constant width and can therefore not adapt to the fluctuating sum intensity. An iteration step in the optimization procedure will not necessarily increase the likelihood value anymore; i.e., the optimization procedure does not converge.

Therefore, the newly developed extended Markov model uses information about the sum intensity in addition to the FRET efficiency trajectory. It introduces an

additional dependence of the model parameters on the measurement data which leads to an extended shape of the corresponding estimation functions. Starting from a variable transformation of the donor and acceptor intensities to the FRET efficiency and the sum intensity, the new likelihood function and all extended estimation functions were derived. This extended hidden Markov model is tested with Monte Carlo simulations and was extensively used in three different projects. In the first project, immobilized samples with a diverse brightness from molecule to molecule were investigated. In the second and third project, data from freely diffusing liposomes with high fluctuating sum intensity were analyzed.

The problem of the restricted shape of the state duration histograms originates in the Markov assumption itself: the transition from one state to another only depends on the transition probabilities of the actual state, independent from the path, i.e. information of states visited in the past. This implies mono-exponentially decaying state duration histograms for all Markov states. This limitation was removed by introducing another extension of the standard hidden Markov model. Each probability density function is now connected to a so called macro state which completely describes the shape of the state duration histogram. The macro states consist of indistinguishable micro states. The shape of the state duration histogram which can now be different from a mono-exponential decay is determined by the arrangement of the micro states. A macro state with several micro states in a row introduces one maximum away from zero in the state duration histogram. Every parallel branch of micro states adds one additional maximum. This type of extended hidden Markov model is known as “aggregated Markov model” and represents a semi-Markov model. It was applied in a fourth project to analyse experimental data of the rotary movement of the  $F_1$ -ATPase.

### **The TBP-NC2-complex – NC2 controls the DNA transcription process**

The first project investigates the DNA transcription process of cells. The initial step of the DNA transcription process is the binding of the TATA-box Binding Protein (TBP) to the TATA-box of the DNA resulting in a stable TBP-DNA-complex. The presence of the Negative Cofactor 2 (NC2) introduces a mobility of TBP on the DNA-strand. A possible explanation for this mobility is the formation of a ring-like TBP-NC2-subcomplex around the DNA strand which enables the sub-complex to move along the DNA-strand. The distance between TBP and a certain position of the DNA strand was recorded by single-molecule FRET. A TBP-mutant providing an additional cysteine

was used to covalently bind an organic fluorophore serving as a FRET donor. The FRET acceptor was attached to the DNA strand and was therefore immobilized at the surface. The single-molecule FRET data of the TBP-DNA-complex were acquired by a camera-based TIR microscope. Eight different data sets were used for analysis with the extended hidden Markov framework. The aim was to compare the influence of the alternative promoter sequence H2B-J on the dynamic behavior of the TBP-NC2-DNA-complex in contrast to the promoter AdML.

After addition of NC2, the obtained FRET trajectories exhibit certain jumps between obviously more than two distinct states. A FRET histogram of the trajectories exhibits two broad, overlapping maxima suggesting at least two conformational states. It is evident, that a threshold algorithm will fail to distinguish all included states.

However, the optimization process of the new extended HMM with dynamic widths converged and yielded a maximum of the overall likelihood value independent of initial values. Very short intermediate states as well as transition rates were revealed by the extended hidden Markov approach and showed a dependence on the promoter sequence. The TBP-NC2-DNA-complex in combination with the alternative promoter H2B-J exhibited a decreased dynamics. Finally, the hypothesis was verified that a DNA-bending motion together with the mobility of the TBP-NC2-subcomplex is responsible for the observed dynamics. Furthermore, the influence of the length of the DNA-strand and the influence of the direction of immobilization on the deduced rate constants were excluded.

### **The KdpFABC complex – a powerful potassium pump**

The second project addresses questions concerning a potassium transporter from *Escherichia coli*, the KdpFABC complex. This powerful potassium pump is able to pump potassium ions under ATP consumption across the inner cell membrane into the cytosol. The subunit KdpB contains the ATP binding place and exhibits strong inter-domain movement between conformational changes during ATP hydrolysis. Via genetically introduced cysteins in the KdpB-subunit, two distinct labeling positions were provided in order to covalently bind a FRET pair of fluorophores. The whole KdpFABC complex including the KdpB-mutant was reconstituted into freely diffusing liposomes with a diameter of about 100 nm. The proteoliposomes were used for single-molecule FRET measurements and the data was recorded for subsequent HMM analysis. The aim was to identify distinct conformational states and furthermore to propose a reaction cycle of the enzyme.

The developed extension of the hidden Markov framework has been proven to successfully deal with highly fluctuating FRET trajectories. The FRET efficiency can always be calculated from the measured fluorescence count rates, but the accuracy is higher the more photon counts are recorded. This strongly affects the shape of the probability density function at every occurrence of the states.

The two expected main conformations were identified in the trajectories with the extended HMM approach, their FRET distances are in accordance with proposed distances from homology studies. Fast transition rates between both states were determined. Additionally, the influence of the inhibitor OCS and Ortho-Vanadate was investigated. Both inhibitors suppress the ability to pump potassium ions. Surprisingly, both inhibitors were not able to freeze the inter-domain-movement of the KdpB-subunit. Instead they slowed down the transition rates. With this data, a reaction cycle and possible insertion points for the two inhibitors were proposed.

### **The $F_0F_1$ -ATP synthase – the power plant of the cell**

The enzyme  $F_0F_1$ -ATP synthase is the subject of the third project. It is capable of catalyzing the ATP synthesis reaction by rephosphorylation of ADP. The enzyme couples this endergonic reaction through a remarkable process with an exergonic proton flux across the cell membrane. Subunits of the enzyme perform a step-wise rotary movement during the catalytic reaction cycle. With  $F_0F_1$ -ATP synthases from *Escherichia coli*, this reaction can also run reversely which makes the motor rotate in a backward direction.

The rotary movement of the  $F_1$ -part of the enzyme in hydrolysis direction consists of three stopping angles with a distance of  $\sim 120^\circ$  each and is well characterized. However, little is known about the membrane embedded  $F_0$ -part. Different single-molecule FRET experiments between rotor and stator subunits were performed to address questions related to the dynamics of the whole enzyme.

In order to create single-molecule FRET data, FRET labeled enzymes were reconstituted into liposomes and measured in a confocal microscope in solution on a single-molecule level. This allows an observation of the inter-subunit rotary movement both in hydrolysis and synthesis direction. However, a reliable identification of the steps in the FRET trajectories is required since all the information is encoded in the properties characterizing the steps. Starting from a manual state-assignment within the FRET trajectories, the extended hidden Markov analysis was used to assign states in a more objective way. This led to the following structural and dynamical predictions.

The  $F_0F_1$ -ATP synthase is only able to synthesize ATP as long as it resides in an activated state. This activation appeared in a slight shift of the averaged FRET efficiencies of the rotation angles in relation to the case without enzyme activation.

Furthermore, the position of one special subunit ( $\alpha$ -subunit) of the  $F_0$ -part was determined by FRET triangulation using information from two data sets with labels being attached at different positions. The FRET states of the first data set were assigned to the corresponding state of the second data set by comparing dwell times and resulted in a set of distances used in the triangulation.

The most important result was the determination of the rotational step-size of the  $F_0$ -part during ATP synthesis. In contrast to the  $120^\circ$ -steps occurring during ATP hydrolysis, a step-size of  $36^\circ$  was found. Because of the short dwell times of the steps and their mono-exponentially decaying distribution, “missed events” are expected resulting in jumps larger than  $36^\circ$ . The probabilities of these larger step sizes predicted from Monte-Carlo simulations were in good agreement with the experimental data.

### **The rotary motor $F_1$ -ATPase**

The fourth project investigates the step-wise rotary subunit movement of the  $F_1$ -part of the ATP synthase. The step-wise motion of immobilized  $F_1$ -ATPases was detected by linking a polystyrene bead with a diameter of  $\sim 500$  nm to the rotating  $\gamma$ -subunit of the biopolymer. Via standard bright-field microscopy, the position of the bead was recorded with an EMCCD-camera and transformed offline in corrected xy-coordinates of the bead. Different data sets with xy-coordinates from the same protein under different nucleotide concentrations were used for subsequent HMM analysis. A time averaged histogram of the xy-positions revealed the existence of the three stopping positions. Their distributions were too broad leading a standard threshold approach to fail. The aim of the hidden Markov approach was to identify the three stopping positions and to extract the rate constants in dependence on the nucleotide concentration.

A histogram of the xy-positions showed a well defined 2D Gaussian distribution for each stopping position, but their dwell time histograms derived from a standard hidden Markov approach clearly shows a non-exponential decay. The extended semi-Markov model with aggregated Markov states was able to reconstruct the dwell time histograms of the single-molecule data. A global model was proposed, which is capable to describe the behaviour of the enzyme over a wide range of different nucleotide concentrations. The increase in the mean turn-over rate with increasing

ATP concentration was well reflected by the corresponding transition probabilities. Furthermore, other transition probabilities revealed to be independent from the nucleotide concentration.

The discovery of the conformational dynamics of proteins within the last decades has led to a better understanding of many cellular processes. Time trajectories derived from complex enzymatic reaction can nowadays be readily obtained using many different techniques, but the interpretation of the data is still a big challenge. In this thesis, extensions to the HMM framework are presented, and successfully applied to identify recurrent states within measured time trajectories even with fluctuating signal-to-noise ratios or with non-exponential state duration histograms.

## 1 Einleitung

Seit der Publikation der ersten Einzelmolekülexperimente 1989/1990 [1, 2] hat der experimentelle Aufwand, der hinter solchen Experimenten steht, beachtliche Maße angenommen. Neben ausgefeilten Aufreinigungsmethoden zur Erzeugung hochreiner Enzymessays stehen auf der Messtechnikseite hochempfindliche Aufbauten mit neuen Technologien (TCSPC, FLIM, ...) zur Verfügung, mit deren Hilfe an einem einzigen Messtag enorme Datenmengen erzeugt werden können. Da die Qualität einer Aussage aus experimentell gewonnenen Daten mit der aufgenommenen Datenmenge steigt, wird von diesen Möglichkeiten auch ausgiebig gebrauch gemacht.

Eine Auswertung dieser Datenmengen führt klassischerweise dann zu Methoden, die diese Daten in geeigneter Form mitteln, um so die Genauigkeit der gebildeten Mittelwerte zu erhöhen. Histogramm- und Korrelationsmethoden sind dementsprechend die theoretischen Analysemethoden, die die geforderte Mittelung auf geeignete Weise durchzuführen scheinen. Modelle können über Kurvenanpassungen an die aufbereiteten Daten angepasst werden, aus den gewonnenen Parametern werden Aussagen getroffen. Doch je tiefer man in den Kosmos biomechanischer Vorgänge vordringt, desto komplexere Bewegungsmuster treten zum Vorschein. Die recht einfachen Mittelungen, die eben jene Histogramm- und Korrelationsmethoden zu Grunde liegen, reichen für eine detaillierte Beschreibung immer weniger aus. Um beispielsweise per FCS zwei in einer Lösung gleichzeitig vorhandenen Spezies auseinander halten zu können, müssen deren Diffusionskonstanten deutlich auseinander liegen [3]. Eine Weiterentwicklung der Modelle für die Kurvenanpassung ist unweigerlich begrenzt, da die zugrunde liegende Mittelung bereits einen Großteil der aufgenommenen Information vernichtet hat [4].

Die Entwicklung algorithmusbasierter Analysemethoden scheint mit dem technologischen Fortschritt kaum mithalten zu können. Verfahren, die direkt auf die Datenstruktur von Fluoreszenz-Einzelmolekülexperimenten angepasst sind und nur dadurch den vollen Informationsgehalt ausschöpfen können, sind nun knapp 20 Jahre nach dem ersten Einzelmolekülexperiment erst am Entstehen. Zitat aus dem Hidden Markov Review 2007 von David S. Talaga [4]: „Es gibt einen Bedarf an Werkzeugen, die direkt auf Einzelmoleküldaten anwendbar sind. [...] Momentane Theorien beruhen üblicherweise auf deterministisches Wissen aus Zuständen [...], Verweildauern und Korrelationsfunktionen.“ Zwar gibt es eine Reihe neuer Ansätze, die teilweise sogar ohne explizite Vorgabe eines Modells Zustände im Datenstrom identifizieren können



[5, 6]. Doch bis auf sehr wenige Ausnahmen (z.B. [7-9]) beruhen derartige Studien oft nur auf synthetische Daten, die mit Monte-Carlo-Simulationen erzeugt wurden [6, 10-14]. Für substantielle Erfolge ist ein völlig anderer Ansatz nötig, der nicht auf Histogrammmethoden basiert. Erst die Auffassung der Messdaten als Likelihood-Werte und eine damit verbundene, durchgehend statistische Behandlung der Messdaten erlaubt bei der Konstruktion neuer Analyseverfahren die Bestimmung des Augenblicks, in dem die Mittelung erfolgt. Die Weiterentwicklung der Modelle ist nicht mehr durch die gewählte Methode limitiert, sondern nun vielmehr in der Lage, den vollen Informationsgehalt der Daten wirklich auszuschöpfen [11, 15, 16]. Auf diese Weise lassen sich Algorithmen entwickeln, die den vollen Umfang der Effekte in den Messdaten respektieren und gleichzeitig die Größe des Datensatzes zur Verbesserung der Aussagenqualität nutzen. Konsequenterweise haben die Adaption bekannter Likelihood-basierter Methoden und deren Weiterentwicklung in der Einzelmolekülspektroskopie in jüngster Zeit einen enormen Aufstieg erfahren.

Um die Funktionsweise von Proteinen zu beschreiben, wird in der Regel von charakteristischen Konformationen des Proteins ausgegangen, deren Übergänge einen Reaktionszyklus bilden. Einzelmolekülpuren zeigen, dass weder die Sprünge zwischen den Zuständen noch die Verweildauern immer gleich sind. Vielmehr scheint es sich um einen zufälligen Mechanismus zu handeln, deren Größen sich durch Wahrscheinlichkeiten beschreiben lassen. Oft wurden Verweildauer-Histogramme in Einzelmolekülexperimenten beobachtet, die ein monoexponentielles Abfallen mit einer für jeden Zustand typischen Abklingzeit aufweisen.

Ein solcher Mechanismus lässt sich durch ein Markov Modell beschreiben. Es basiert auf Zustände, die in einem zufälligen Prozess ineinander übergehen können. Der Übergang eines Zustands in einen anderen wird dabei durch jeweils eine konstante Übergangsrate festgelegt. Dabei spielt es keine Rolle, in welchem Zustand das System vorher war. Die zeitliche Entwicklung eines Markov Modells ist eine Sequenz von Zuständen. Bildet man aus dieser Zeitreihe Verweildauer-Histogramme, so haben diese immer eine monoexponentiell abfallende Form. Auch umgekehrt kann von einem monoexponentiell abfallenden Verweildauer-Histogramm auf einen Markov-Zustand geschlossen werden. Ein jüngst erschienener Review-Artikel dokumentiert, dass Hidden Markov Modelle im Begriff sind, sich als Analysemethode für fluoreszenzspektroskopisch erzeugte Einzelmoleküldaten zu etablieren [17].

Nicht nur das Zustandekommen der Messdaten sondern auch die Wege innerhalb des Reaktionszyklusses eines Proteins werden bei einer Beschreibung mit Hidden Markov Modellen als ein stochastischer Prozess aufgefasst. Hierbei nimmt der Wahrscheinlichkeitsbegriff eine zentrale Rolle ein. Dabei ist es gar nicht so einfach, eine Definition des Begriffs Wahrscheinlichkeit zu finden. Zwischen den englischen Begriffen *likelihood* und *probability* wird im Deutschen nicht unterschieden, beides wird mit *Wahrscheinlichkeit* übersetzt. Dabei gibt es einen fundamentalen Unterschied: *probability* bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, dass unter bestimmten Umständen  $U$  ein Ereignis  $E_i$  eintritt, *likelihood* bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der sich das Ereignis  $E$  unter den Umständen  $U_i$  ereignet hat. Die *probability* bezieht sich auf zukünftige Ereignisse, wohingegen sich das *likelihood* auf vergangene Ereignisse mit bekanntem Ergebnis bezieht [18]. Um die Unterscheidung zu gewährleisten, wird in dieser Arbeit der englische Begriff *likelihood* gemäß der Fachliteratur auch im Deutschen verwendet, wohingegen *probability* mit *Wahrscheinlichkeit* übersetzt wird.

Ausgehend von der Begriffsdefinition gibt es zwei sehr verschiedene Sichtweisen der Statistik. Die *klassische Statistik* führt zu einem unbestechlichen, objektiven Wahrscheinlichkeitsbegriff, die *Bayessche Statistik* berücksichtigt oftmals vorhandenes Vorwissen in die Wahrscheinlichkeitsbildung, was zu einer subjektiven Verwendung des Wahrscheinlichkeitsbegriffs führt.

In der *klassischen Statistik* lässt sich die Wahrscheinlichkeit für ein bestimmtes Ereignis nur aus der relativen Häufigkeit ableiten, wie oft dieses Ereignis in immer gleichen, voneinander unabhängigen Zufallsexperimenten auftritt. Sie ist der Grenzwert für unendlich viele Versuche. Eine Definition auf diese Weise ist objektiv, deren Vertreter sind „Frequentisten“. Eine Angabe zur Genauigkeit der abgeleiteten Werte wird über Konfidenzintervallschätzung bewerkstelligt. Für eine Genauigkeitsangabe der Ausgangsgrößen müssen jedoch extra Zufallsvariablen eingeführt werden [19].

Die *Bayessche Statistik* verlangt die Inkorporation subjektiven Vorwissens über so genannte *Priors*. Die enge Forderung der Wiederholbarkeit des Experiments aus der klassischen Statistik wird hier durch Einführung nicht begründbarer, subjektiver Priors aufgegeben. Dadurch verliert diese Methode zwar ihre Objektivität, erweitert aber ihren Anwendungsspielraum enorm. In der Realität ist oft aufgrund von Erfahrung ein relevantes Vorwissen vorhanden, das sich nicht durch wiederholbare Experimente

erzeugen lässt. Dieses Vorwissen ist in der Bayesschen Statistik explizit im Modell verankert. Die Grundlage bildet der berühmte Satz von Bayes aus dem Jahr 1763 [20]:

$$\Pr(M | D) = \frac{\Pr(D | M) \cdot \Pr(M)}{\Pr(D)} \quad (1)$$

$\Pr(D|M)$  ist das Likelihood, bei einem gegebenem Modell  $M$  genau die Daten  $D$  zu erhalten.  $\Pr(M)$  ist der erwähnte Prior, der das Vorwissen über das Modell  $M$  ausdrückt.  $\Pr(D)$  ist die gemittelte Wahrscheinlichkeit der Daten. Der Satz von Bayes drückt aus, auf welche Weise sich eine bereits vor einem Experiment vorhandene Meinung  $\Pr(M)$  durch die Messdaten ändert. Die neue Meinung  $\Pr(M|D)$  hängt von dem Vorwissen *und* den Messdaten ab.

Beide Sichtweisen haben ihre Vor- und Nachteile, beide haben ihre Existenzberechtigung. Der Einsatz von Vorwissen kann sehr nützlich sein, kann aber auch den Erkenntnisgewinn verfälschen. Eine schöne Gegenüberstellung findet sich in Ref. [21] von David Malakoff.

In dieser Arbeit wurden Messdaten aus Einzelmolekülexperimenten mit Hidden Markov Modellen analysiert. Dies ist eine ausgewiesene Bayessche Datenanalyse-Methode. Allerdings stehen in der hier vorliegenden Arbeit große Datenmengen sehr flachen Priors gegenüber, der Einfluss dieser Priors ist hier demnach äußerst gering.

Ein gemäßiger Mittelweg zwischen der klassischen und Bayesschen Statistik bilden Likelihood-Methoden. Sie stützen sich ausschließlich auf den zweiten Term  $\Pr(D|M)$  von Bayes' Satz, dem Likelihood, und ziehen ohne Verwendung von Priors alle Schlussfolgerungen ausschließlich aus dieser Größe (siehe Ref. [22], Kapitel 1, S. 11.) Reine Likelihood-Verfahren sind dementsprechend auch außerordentlich verbreitet [19].

## 1.1 Historie und Anwendungsbeispiele von Hidden Markov Modellen

Die Geschichte der Hidden Markov Analyse begann in den 60er Jahren im IBM T.J. Watson Research Center in New York [23]. Für eine automatische Buchstaben-erkennung wurden Buchstaben als Markov-Zustände modelliert [24]. Am gleichen Ort wurde 10 Jahre später ein System zur phonetischen Spracherkennung entwickelt [25-28]. In den 80er Jahren wurde die Spracherkennung mit Hidden Markov Modellen auch an anderen nicht-öffentlichen Institutionen weiterentwickelt [29] und übertrug

sich von dort aus auch in andere Problembereiche. Eckpunkte der Entwicklung im Audibereich waren die Identifikation verschiedener Sprecher [30, 31] oder verschiedener Geräuschquellen [32, 33] oder die zeitabhängige Ermittlung der Frequenz eines Signals in weißem Rauschen mit dem Viterbi-Algorithmus [34-36]. Mustererkennung in EKG mit vorgelehrnten Hidden Markov Modellen [37-39] oder die Modellierung der Zahl epileptischer Anfälle aus EKG-Daten [40, 41] waren weitere sehr wichtige Anwendungen dieser Methode.

In der biomedizinischen Grundlagenforschung kommen Hidden Markov Modelle hauptsächlich bei Problemen der DNA-Sequenzierung und der Modellierung des Stromflusses durch Ionenkanäle in Zellmembranen zum Einsatz. Das Zeitsignal des gemessenen Stromflusses von Ionenkanälen kann durch Hidden Markov Modelle beschrieben werden, dabei entsprechen unterschiedliche Leitfähigkeitspegel verschiedene Markov-Zustände. Mittlere Verweildauern eines Zustands sind dabei die typischen interessierenden Messgrößen (Übersichtsartikel [42]). Bei der DNA-Sequenzierung werden verschiedene Regionen oder Segmente durch Markov-Zustände modelliert [43], im Sequenz-Alignment und bei der Datenbanksuche werden ganze Proteinfamilien durch Markov-Zustände assoziiert [44]. Beide Bereiche haben erheblich zur Weiterentwicklung der Theorie der Hidden Markov Modelle beigetragen [45-49]. Eine sehr gelungene und ausführliche Übersicht über die Historie der Hidden Markov Modelle, deren Entwicklungsschritte und Anwendungen findet sich im Review-Artikel von Ephraim und Merhav von 2002 [23].

## 1.2 Hidden Markov Modelle in der Einzelmolekülspektroskopie

Eine Anpassung von Hidden Markov Modellen auf Einzelmoleküldaten wurde erst 2003 von Andrec *et. al.* formuliert [10]. Mit umfassenden Monte-Carlo-Simulationen wird die Leistungsfähigkeit des Verfahrens unter Einzelmolekülbedingungen demonstriert. 2006 erschienen zwei Anwendungen der Methode auf echte Einzelmoleküldaten. Messina *et. al.* modellierte die gebinnte Fluoreszenzintensität mit Markov-Zuständen und rekonstruierte daraus die Anzahl der Chromophore [9]. McKinney *et. al.* und Joo *et. al.* assoziierten verschiedene Konformationen eines Proteins mit Markov-Zuständen über binweise erstellte FRET-Effizienzen [7, 50]. 2009 stellte Jäger *et. al.* eine Markov-Analyse vor, die eine Zustandszuordnung direkt über die Interphotonenzeiten bewerkstelligt und somit auf unterschiedliche Intensitäten sensitiv ist [51]. In Abwandlungen wurde die Methode auch auf benachbarte Probleme

angewandt, z.B. auf die Identifikation zweier Konformationen eines DNA-Stranges [52], die durch den Aktionsradius eines verbundenen Kügelchens unterscheidbar wurden.

### 1.3 Ziel der Arbeit

Durch die hohen qualitativen Verbesserungen organischer Farbstoffe und Fortschritte in der Proteinmarkierung sowie Proteinaufreinigung wurde FRET, Förstertyp Resonanz Energie Transfer, zu einer zunehmend wichtigen Methode der Einzelmolekülspektroskopie. Mittels FRET lassen sich Konformationsänderungen eines Proteins in Echtzeit während des katalytischen Zyklus studieren. Verschiedene Konformationen werden hierbei durch charakteristische FRET-Effizienzen identifizierbar. Stabile Konformationen und schnelle Konformationswechsel kennzeichnen meist den Reaktionszyklus eines Proteins. In der FRET-Trajektorie führt dies zu ausgeprägten Stufen mit sprunghaften Stufenwechseln. Primäres Ziel der Arbeit war es, die Stufenerkennung durch ein objektives Verfahren zu verwirklichen, welches auch unter stark verrauschten Bedingungen Ergebnisse erzielt.

Alle bisherigen HMM-basierten Verfahren zielen entweder auf die Modellierung der Gesamthelligkeit ab, oder setzen bei FRET-Effizienztrajektorien stillschweigend Moleküle mit gleicher und konstanter Summenhelligkeit voraus. Die durch das Schrotrauschen verbreiterte FRET-Effizienz eines Zustands wird durch eine Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion modelliert, deren Parameter Mittelwert und Varianz global und zeitinvariant sind. Ist die Gesamthelligkeit und damit die Varianz nicht mehr konstant, muss eine Auswertung (wie in [7]) mit starren Parametern scheitern. Eine verwendete Einzelmolekül-Methode beruht auf FRET-Messungen an freidiffundierenden, in Liposomen rekonstituierten Proteinmutanten [53-55]. Die Summenintensität hängt hauptsächlich von der Position des Liposoms ab und führt zu einer stark zeitlich modellierten Breite der FRET-Effizienzverteilung. Der iterative Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus zur Parameteroptimierung konvergiert nicht mehr oder zeigt über die Iterationsschritte ein nicht monoton steigendes Verhalten des Loglikelihood-Wertes.

Da jedoch aus der Summenintensität auf die Breite der FRET-Effizienzverteilung geschlossen werden kann, lässt sich das Grundgerüst der Hidden Markov Modelle durch entsprechende Erweiterungen auch für Daten mit fluktuierender Helligkeit

verwenden. Diese Erweiterungen werden in der hier vorliegenden Arbeit vorgestellt und das Potential der Methode an echten Messdaten demonstriert.

Im Rahmen des ersten Projekts wurde ein Regulierungsmechanismus des DNA-Transkriptionsvorgangs untersucht. Hierzu wurde der Einfluss des Negativen Cofaktors 2 (NC2) auf das Binden und der anschließenden Bewegung des TATA-Box Binde Proteins (TBP) auf immobilisierten DNA-Strängen per Einzelmolekül-FRET im TIR-Mikroskop beobachtet (Total Internal Reflection). Die gemessenen FRET-Trajektorien in Anwesenheit von NC2 zeigen Sprünge zwischen konstanten Stufen, weswegen eine Auswertung mittels HMMs nahe liegt. Das Verhalten der Probe lässt sich nur dann entschlüsseln, wenn es gelingt, diese Zustände in unterschiedlichen Probenpräparationen zu identifizieren und einander zuzuordnen.

Die für eine Analyse anspruchsvollste Signalform entstand im zweiten und dritten Projekt. Hier wurde mittels Einzelmolekül-FRET die Konformationsdynamik einzelner fluoreszenz-markierter Membranproteine aus *E. coli*, rekonstituiert in frei diffundierenden Liposomen, untersucht. Im Rahmen des zweiten Projekts konnte die Konformationsdynamik des ATP-betriebenen Kalium-Transporters KdpFABC auf diese Weise erstmals direkt beobachtet werden. Im Rahmen des dritten Projekts wurde die schrittweise Drehbewegung des molekularen Motors  $F_0F_1$ -ATP-Synthase untersucht. Mit einem FRET-Marker am Rotor und dem anderen am Stator konnte an unterschiedlichen Markierungspositionen innerhalb des Enzyms die schrittweise Drehbewegung in beiden Drehrichtungen beobachtet werden. In allen Fällen zeigte die FRET-Trajektorie Sprünge zwischen diskreten Zuständen, allerdings war die Summenintensität starken Schwankungen unterworfen, was ein zeitabhängiges Signal-Rausch-Verhältnis impliziert. Übergangsraten und der Einfluss von Inhibitoren lassen sich nur dann ermitteln, wenn es gelingt, die Zustände in der FRET-Trajektorie zu identifizieren.

Eine Erweiterung der HMMs auf Semi-Markov-Prozesse findet sich im vierten Projekt. Es handelt sich hier um immobilisierte  $F_1$ -ATPasen, die während der Hydrolyse von ATP eine Rotationsbewegung der Untereinheiten zeigt. Durch ein Kügelchen von  $\sim 0,5 \mu\text{m}$  wird die Bewegung der sich drehenden Untereinheiten in Bezug auf den immobilisierten Rest des Proteins mittels Hellfeldmikroskopie beobachtet. Die Drehbewegung zeigte diskrete Sprünge mit nicht monoexponentiellen Verweilzeiten. Auch hier lag die Herausforderung darin, eine Zustandszuordnung trotz überlappender Verteilungsfunktionen zu ermöglichen, um schließlich charakteristische

Größen wie die Verweildauer oder die Abhängigkeit der Übergangsraten von der Nukleotidkonzentration ermitteln zu können.

In allen vier Projekten können aus den Einzelmoleküldaten nur dann Aussagen getroffen werden, wenn die Identifizierung der diskreten Zustände aus der gemessenen Trajektorie gelingt.

## 2 Grundlagen der Einzelmolekülspektroskopie

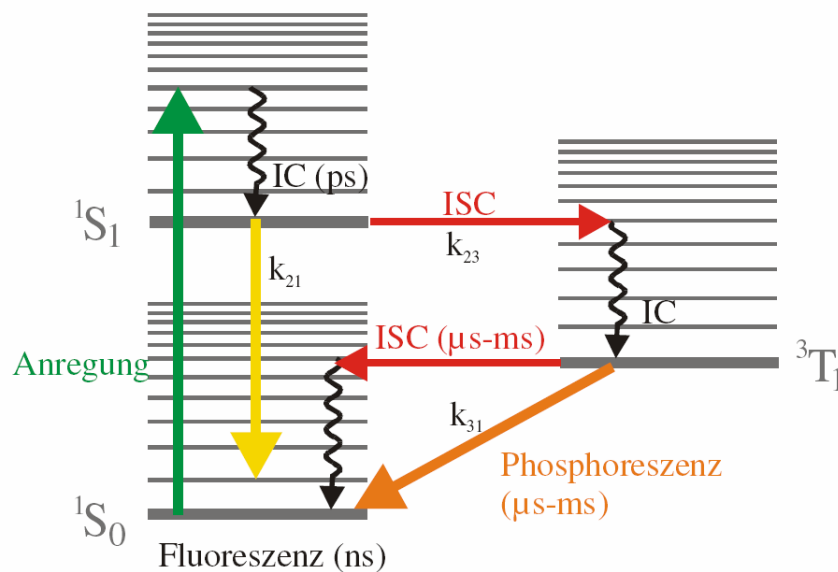
Das folgende Kapitel stellt die in den vier vorgestellten Proben verwendeten Messmethoden zusammen. Ausgehend von der Photophysik von Farbstoffmolekülen (Abschnitt 2.1) werden die Grundlagen der spektroskopischen Methode FRET, Förster Resonanz Energie Transfer, dargestellt (Abschnitt 2.2). Die danach folgenden Abschnitte behandeln die messtechnischen Grundlagen für die vorgestellten Messdaten. Mit einem kamerabasiertem TIR-Mikroskop (Totale Interne Reflexion) lassen sich viele Moleküle gleichzeitig betrachten (Abschnitt 2.3). Ein konfokaler Aufbau mit zwei Avalanche Photodioden (APD) erlaubt Einzelmolekülmessungen an nicht-immobilisierten Proben mit hoher Zeitauflösung (Abschnitt 2.4). Die detektierte Fluoreszenzintensität lässt sich durch die Wahl geeigneter Signalsequenz optimieren (Abschnitt 2.5) und mit der entsprechenden Software analysieren (Abschnitt 2.6). Schließlich wird im letzten Kapitel kurz die Hellfeldmikroskopie umrissen, da auf diese Weise die  $F_1$ -ATPasen aus dem vierten Projekt gemessen wurden (Abschnitt 2.7).

### 2.1 Photophysik organischer Fluorophore

Fluorophore haben die Eigenschaft, absorbiertes Licht wiederum als Licht zu emittieren. Die photophysikalischen Eigenschaften von Fluorophoren lassen sich recht anschaulich durch ein Jabłoński-Diagramm darstellen, siehe Abbildung 1. Vereinfacht umfasst es drei elektronische Zustände: zwei Singulett-Zustände  $S_0$  und  $S_1$  und einen Triplett-Zustand  $T_1$ , sowie die zugehörigen vibronischen Zustände.

Das Molekül befindet sich im Grundzustand, wenn seine Valenzelektronen den elektronischen Grundzustand  $S_0$  (HOMO) besetzen. Ihre Elektronenspins sind gepaart, es handelt sich also um einen Singulett-Zustand. Unter Erhaltung des Elektronenspins bewirkt die Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge einen Übergang in den ersten angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  (LUMO). Bei den meisten Molekülen relaxiert das angeregte Elektron strahlungslos durch innere Umwandlung (internal conversion, IC) in ein hohes Schwingungsniveau des  $S_0$ -Zustandes, wo die Energie über eine weitere Schwingungskaskade abgebaut wird. Erfolgt die Relaxation in den Grundzustand jedoch unter Abgabe eines Photons, spricht man von Fluoreszenz. Dabei erfolgt zunächst eine Relaxation über vibronische Zwischenzustände mit typischen Lebensdauern von einigen Pikosekunden in den vibronischen Grundzustand des  $S_1$ -





**Abbildung 1: Jablonski-Diagramm eines elektronischen drei-Niveau-Systems nach [56]. Das Einnehmen eines höheren Energieniveaus durch Absorption eines Photons ist durch einen grünen Pfeil dargestellt, die Relaxation über den durch einen gelben Pfeil markierten Weg ist mit der Abgabe eines Fluoreszenzphotons verknüpft. Die Population (und Depopulation) des Triplet-Zustands  $T_1$  ist durch rote Pfeile markiert, dieser Zustand kann ebenfalls unter Abgabe eines Phosphoreszenzphotons in den Grundzustand überführt werden. Die strahlungslose Relaxation der vibronischen Seitenbanden zeigen schwarze Pfeile.**

Zustands. Anschließend erfolgt die Emission des Fluoreszenzphotons innerhalb von Nanosekunden auf einen vibronischen Zwischenzustand des elektronischen Grundzustands  $S_0$ , aus denen das Elektron schließlich strahlungslos in den vibronischen Grundzustand von  $S_0$  relaxiert. Die Fluoreszenz-Photonen tragen somit nur einen Teil der Anregungsenergie und sind daher gegenüber dem rein elektronischen Übergang zu längeren Wellenlängen hin verschoben (Stokes-Verschiebung). Aus dem gleichen Grund ist das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge.

Das Verweildauerhistogramm des angeregten Zustands hat eine monoexponentiell fallende Form. Der Zerfall des Zustands ist demnach ein gedächtnisfreier Zufallsprozess (Markov-Prozess) und kann mit einer einzigen charakteristischen Größe, der Lebensdauer  $\tau$ , beschrieben werden. Sie ist direkt mit den involvierten Übergangsraten  $k$  verknüpft:

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{strahlend}} + \sum k_{\text{nicht strahlend}}} \quad (2)$$

$k$  setzt sich als Summe aus strahlenden und nicht-strahlenden Anteilen zusammen. Zum strahlenden Fluoreszenz-Übergang gibt es demnach nicht-strahlende Konkurrenz-Prozesse: Die beiden wichtigsten sind die oben erwähnte *Innere Umwandlung* (*internal conversion, IC*) und die *Interkombination* (*inter system crossing, ISC*), siehe Abbildung 1.

Die Interkombination ist ein Übergang vom angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  in den Triplett-Zustand  $T_1$ . Durch die erforderliche Spin-Umkehrung wird dieser Übergang erst durch Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht. Die Übergangsrates  $k_{23}$  dieses spinverbotenen Übergangs ist jedoch viel geringer als die des spinerlaubten Übergangs  $k_{21}$  und findet entsprechend selten statt. Auch die Relaxationsrate  $k_{31}$  aus diesem Triplett-Zustand in den Singulett-Zustand  $S_0$  ist sehr viel kleiner als der Fluoreszenz-Übergang  $k_{21}$ . Der Triplett-Zustand ist deshalb metastabil mit typischen Lebenszeiten von bis zu einigen Millisekunden. In dieser Zeit werden keine Photonen emittiert, bei Fluoreszenz-Farbstoffen ist dieser Zustand deshalb unerwünscht. Erfolgt die Relaxation aus dem metastabilen Triplett-Zustand in den Singulett-Zustand strahlend, spricht man von Phosphoreszenz.

Die Lebensdauern der höheren Schwingungsniveaus bzw. der höheren Triplett-Niveaus liegen im Bereich von Pikosekunden, so dass die optischen Eigenschaften bei einem solchen System hauptsächlich durch die Übergangsrates  $k_{21}$ ,  $k_{23}$  und  $k_{31}$  zwischen den drei Niveaus  $S_0$ ,  $S_1$  und  $T_1$  geprägt werden.

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $Q$  eines Fluorophors wird durch solche Konkurrenz-Prozesse reduziert:

$$Q = \frac{k_{\text{strahlend}}}{k_{\text{strahlend}} + \sum k_{\text{nicht strahlend}}} \quad (3)$$

Es existieren Farbstoffe mit hoher Quantenausbeute ( $Q > 0.9$  beispielsweise Rhodamine oder Cyanine), dennoch kann der Farbstoff durch die Umgebung, z.B. durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen, gelöscht (*quenching*) werden, wodurch die Quantenausbeute verringert wird.

Irreversibles Bleichen ist die Folge dauerhafter photochemischer Veränderungen des elektronischen Systems des Fluorophors und wird meist durch Photooxidation durch Singulett-Sauerstoff oder durch Reaktion mit Hydroxylradikalen ausgelöst. Entscheidend für die Bleichrate sind die Umgebungsbedingungen des Fluorophors, z.B. pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt. Sie bestimmen über die Stabilität des  $\pi$ -

Elektronensystems des angeregten Zustands und somit über die Bleichrate des Fluorophors.

Die Helligkeit eines Fluorophors steht in Zusammenhang mit seinem Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon(\nu)$ , der eine stoffspezifische Funktion der Wellenlänge  $\nu$  ist.

Hohe Quantenausbeute, großer Extinktionskoeffizient, geringer Tripletanteil sowie kleine Bleichwahrscheinlichkeit sind u.a. Merkmale eines leuchtstarken Fluorophors.

## 2.2 Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Die Anregungsenergie eines Moleküls kann auch strahlungslos über induzierte Dipol-Dipol-Wechselwirkung an ein anderes Molekül abgegeben werden. Das Molekül, das direkt angeregt wird, nennt man FRET-Donor. Das zweite Molekül, das über die Dipol-Dipol-Wechselwirkung die Energie des FRET-Donors aufnimmt, wird als FRET-Akzeptor bezeichnet. Dieser Resonanz-Energietransfer wird von den folgenden Faktoren maßgeblich beeinflusst:

- Das Emissionsspektrum des angeregten Moleküls muss mit dem Absorptionsspektrum des anzuregenden Moleküls spektral überlappen.
- Die Orientierung der Dipole fließt entscheidend in die Effizienz des Energietransfers ein.
- Die Effizienz des Energietransfers ist stark abhängig vom Abstand der beiden Moleküle. Der Fluorophorabstand bei 50 % FRET Effizienz heißt Förster-Radius  $R_0$  und wird durch das Fluorophorpaar bestimmt. Ein typischer Wert sind 5 nm, der Wertebereich 10 bis 90 % der FRET-Effizienz verteilt sich auf Abstandswerte von ca. 3 bis 8 nm.

Die Abhängigkeit der FRET-Effizienz  $E$  vom Fluorophor-Abstand  $r_{DA}$  geht mit der sechsten Potenz [57]:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} \quad (4)$$

Der Förster-Radius  $R_0$  (in Å) ist folgendermaßen definiert:

$$R_0 = \left( 8,8 \cdot 10^{23} \frac{J Q_D \kappa^2}{N_A n^4} \right)^{\frac{1}{6}} \quad (5)$$

$Q_D$  ist die Quantenausbeute des FRET-Donors in Abwesenheit des FRET-Akzeptors. Mit  $\kappa^2$  wird die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor beschrieben. Dieser Faktor kann Werte zwischen 0 und 4

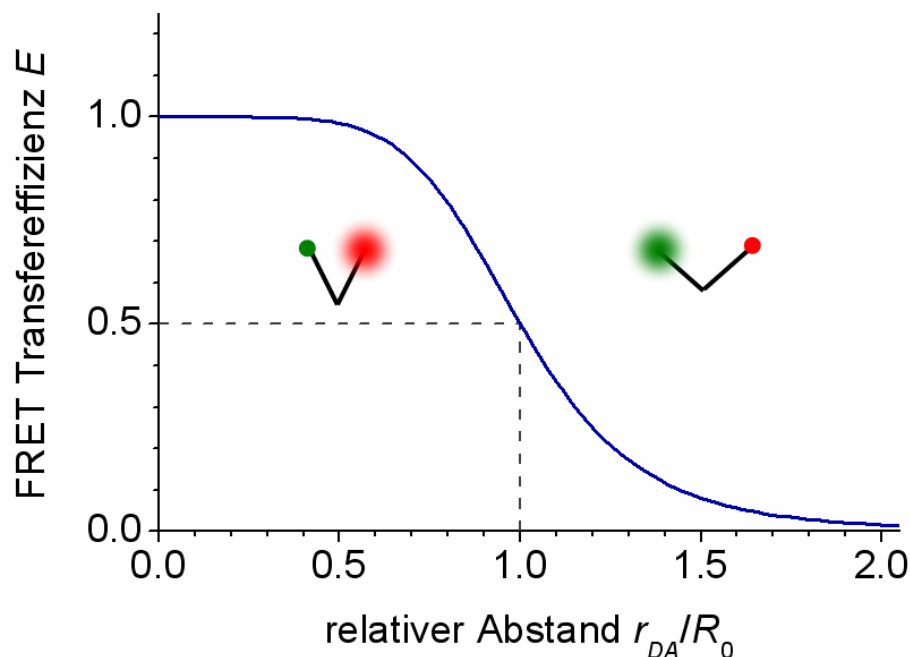
annehmen. Da in der Praxis die Orientierung der Dipole zueinander zeitlich sehr viel schneller fluktuiert als die beobachteten FRET-Änderungen, wird für  $\kappa^2$  meist der Wert  $2/3$  angenommen. Er ergibt sich als Mittelwert über alle möglichen Orientierungen. Der Brechungsindex des umgebenden Mediums wird durch  $n$  beschrieben,  $N_A$  ist die Avogadro-Konstante.  $J$  bezeichnet das Überlappungsintegral des Emissionsspektrums des FRET-Donors mit dem Absorptionsspektrum des FRET-Akzeptors. Diese Größe wird durch die Eigenschaften des Fluorophor-Paares beschrieben:

$$J = \int I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (6)$$

$I_D$  ist die normierte Fluoreszenzintensität des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.  $\varepsilon_A(\lambda)$  ist der Extinktionskoeffizient des Akzeptors, also seine Fähigkeit, Licht der Wellenlänge  $\lambda$  zu absorbieren.

Die FRET-Effizienz kann alternativ durch die beiden maßgeblichen Übergangsraten des FRET-Prozesses beschrieben werden: Die Übergangsrate  $k_D$  aus der Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{Fl}$  des Donors in Abwesenheit des Akzeptors und die Übergangsrate des Energietransfers auf den Akzeptor  $k_{ET} = k_D \cdot (R_0 / r_{DA})^6$ .

Diese Raten sind proportional zu den Fluoreszenz-Intensitäten des Donors  $I_D$  und



**Abbildung 2:** Abstandsabhängigkeit der FRET Transfereffizienz  $E$ . Der Försterradius  $R_0$  liegt bei geeigneter Wahl des Fluorophoren-Paares bei einigen wenigen Nanometern. Die Größe von Proteinen ist in der gleichen Größenordnung, weswegen sich FRET für molekulare Abstandsmessungen als Standardverfahren etabliert hat.

des Akzeptors  $I_A$ .

Dies führt zur Bestimmung der FRET-Effizienz  $E$  in Abhängigkeit der spektroskopischen Messgrößen  $k_{ET}$  und  $k_D$  bzw.  $I_A$  und  $I_D$ :

$$E = \frac{k_{ET}}{k_D + k_{ET}} = \frac{I_A}{I_D + I_A} \quad (7)$$

Ist der Försterradius  $R_0$  für das FRET-Paar bekannt, könnten aus den gemessenen Intensitäten die entsprechenden Abstände  $r_{DA}$  der Fluorophore berechnet werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die gemessenen Intensitäten  $\tilde{I}_A$  und  $\tilde{I}_D$  von den realen Photonenemissionsraten  $I_A$  und  $I_D$  unterscheiden. In  $\tilde{I}_A$  und  $\tilde{I}_D$  fließen die Detektionseffizienzen der gesamten Messanordnung (Filter, Optische Elemente, Detektoreffizienzen, usw.) ein. Erst nach einer Korrektur der Intensitäten  $\tilde{I}_A$  und  $\tilde{I}_D$  erhält man über die FRET-Effizienz  $E$  den Abstand des FRET-Paars  $r_{DA}$ .

Um verschiedene FRET-Stufen zu unterscheiden, genügt oft die Angabe des Abstandsfaktors  $P$  (proximity-factor), den man direkt aus den unkorrigierten Intensitäten erhält:

$$P = \frac{\tilde{I}_A}{\tilde{I}_D + \tilde{I}_A} \quad (8)$$

Mit Hilfe von Korrekturfaktoren lässt sich die FRET-Effizienz aus den gemessenen Fluoreszenz-Zählraten bestimmen:

$$E = \frac{\tilde{I}_A^{korr}}{\gamma \tilde{I}_D^{korr} + \tilde{I}_A^{korr}} \quad (9)$$

mit

$$\gamma = \frac{\Phi_A \eta_A}{\Phi_D \eta_D} \quad (10)$$

und

$$\begin{aligned} \tilde{I}_D^{korr} &= \tilde{I}_D - \tilde{I}_D^0 \\ \tilde{I}_A^{korr} &= \tilde{I}_A - \tilde{I}_A^0 - \beta \tilde{I}_D - \alpha \tilde{I}_A^{dir} \end{aligned} \quad (11)$$

Der Korrekturfaktor  $\gamma$  setzt sich aus den Quanteneffizienzen der Fluorophore  $\Phi_D$  und  $\Phi_A$  und den Detektionseffizienzen beider Detektionskanäle  $\eta_D$  und  $\eta_A$  zusammen.  $\beta$  berücksichtigt spektrales Übersprechen des Donor-Kanals in den Akzeptor-Kanal und  $\alpha$  beschreibt die Akzeptordirektanregung durch den Laser,  $\tilde{I}_D^0$  und  $\tilde{I}_A^0$  ist ein konstantes Hintergrundsignal z.B. durch Raman-Photonen des Lösungsmittels.

Die FRET-Effizienz  $E$  kann alternativ auch aus der FRET-bedingten Verkürzung der Donor-Lebenszeit  $\tau_{DA}$  in Bezug auf die ungestörte Donorlebenszeit  $\tau_D$  ausgedrückt werden:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (12)$$

Zur Erfassung der Lebensdauer ist eine aufwändigere Messtechnik erforderlich. Es gilt, die im Nanosekunden-Bereich liegende durchschnittliche Dauer zwischen Anregung und Emission zu erfassen. Das erfordert zum einen eine zeitliche Begrenzung der Anregungsenergie auf kurze Pulse, um den Anregungszeitpunkt registrieren zu können. Zum anderen muss jedes Photon einzeln mit einem Zeitstempel gespeichert werden. Ersteres erfordert gepulste Laser mit Picosekunden-Pulslänge, Zweiteres erfordert schnelle Detektoren und schnelle Zählerkarten mit hohen Datendurchsatzraten. Die zugehörige Technologie hat sich mit dem Namen Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC, etabliert.

Abstände von Untereinheiten in Biomolekülen liegen häufig im Bereich von wenigen Nanometern, d.h. im Bereich des Förster-Radius. Mittels FRET können somit biochemische Prozesse wie Bindung von Signalstoffen oder Substraten und konformative Änderungen an Proteinen zeitlich verfolgt werden.

### 2.3 Einzelmolekül-FRET-Aufbau als TIR-Mikroskop

Ein Lichtstrahl wird an einer Grenzschicht zwischen zwei optisch unterschiedlich dichten Materialien reflektiert, wobei der Ausfallswinkel  $\theta_r$  dem Einfallswinkel  $\theta_i$  entspricht. Befindet sich jenseits der Grenzschicht ein Material mit einer geringeren optischen Dichte  $n_t$ , so wird ein Teil des Lichts durch die Grenzschicht hindurch transmittiert, Abbildung 3a. Abhängig von den optischen Dichten beider Materialien ergibt sich gemäß des Snelliusschen Brechungsgesetz für die Strahlrichtung im optisch dünneren Medium ein neuer Winkel  $\theta_t$ :

$$\sin \theta_i \cdot n_i = \sin \theta_t \cdot n_t \quad (13)$$

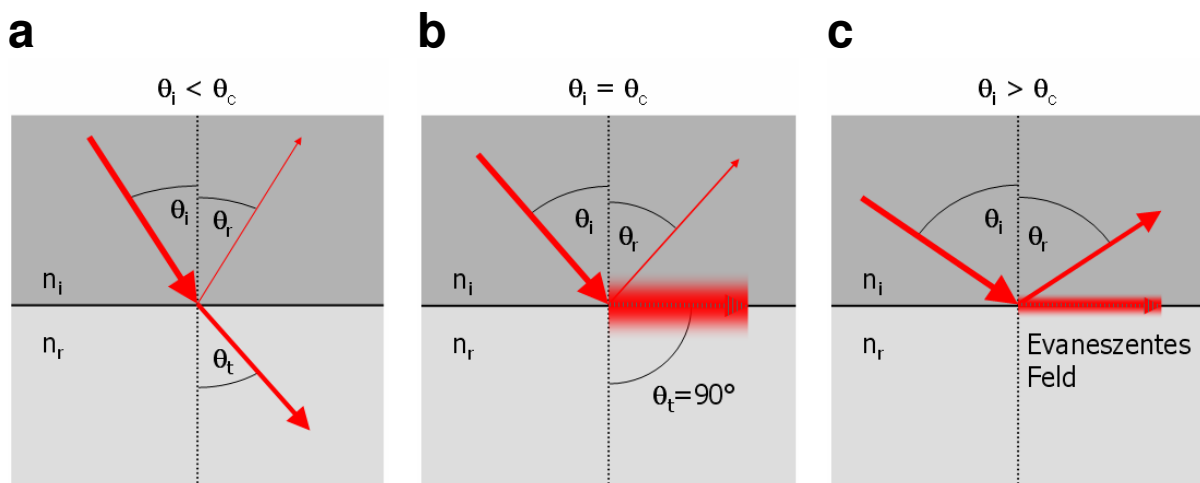
Ab einem bestimmten Einfallswinkel erreicht  $\theta_t$  den Wert  $90^\circ$ , d.h. der transmittierte Strahl wird so stark gebeugt, dass er entlang der Phasengrenze verlaufen muss, siehe Abbildung 3b. Bei einem Quarz-Wasser-Übergang liegt der kritische

Winkel bei  $\theta_i=65,6^\circ$  (Quarz  $n_i=1,46$ ; Wasser  $n_r=1,33$ ). Es entsteht ein evaneszentes Feld entlang dieser Phasengrenze mit der Frequenz des reflektierten Lichts. In Richtung der Einfallsebene klingt die Intensität exponentiell ab mit typischen  $1/e$ -Werten von wenigen 100 nm (sichtbares Licht, Quarz-Wasser-Grenzfläche).

Bei noch größeren Einfallswinkeln wird das meiste Licht intern total reflektiert, nur ein kleiner Teil der Amplitude geht in das evaneszente Feld, dessen Eindringtiefe mit steigendem Winkel weiter abfällt [58], siehe auch Abbildung 3c.

Verantwortlich für das Entstehen eines solchen Feldes ist die endliche Ausdehnung des Anregungsstrahls und die dadurch entstehenden Beugungseffekte an der Phasengrenze. Eine Modellierung durch die Maxwell'schen Gleichungen liefern die exponentiell abfallende evaneszente Welle und die funktionale Abhängigkeit der Eindringtiefe vom Einfallswinkel, den beiden optischen Dichten sowie der Wellenlänge [58].

Mit einem entsprechend eingekoppeltem Laser kann an einem Quarz-Wasser-Übergang recht einfach ein solches Feld erzeugt werden. Fluorophore jenseits der Grenzschicht können nur dann angeregt werden, wenn sie sich direkt an der Grenzschicht befinden, beispielsweise durch Immobilisierung an ein Quarzplättchen. Störsignale aus der Lösung von ungebundenen Fluorophoren können nicht auftreten, da diese Fluorophore nicht mehr angeregt werden können. Die auf diese Weise erreichbare axiale Auflösung dieser Mikroskopiemethode übertrifft sogar die einer konfokalen Anordnung. Außerdem kann das ganze ausgeleuchtete Volumen auf einmal abgebildet werden, was den Einsatz von Kamerasystemen erfordert. Durch

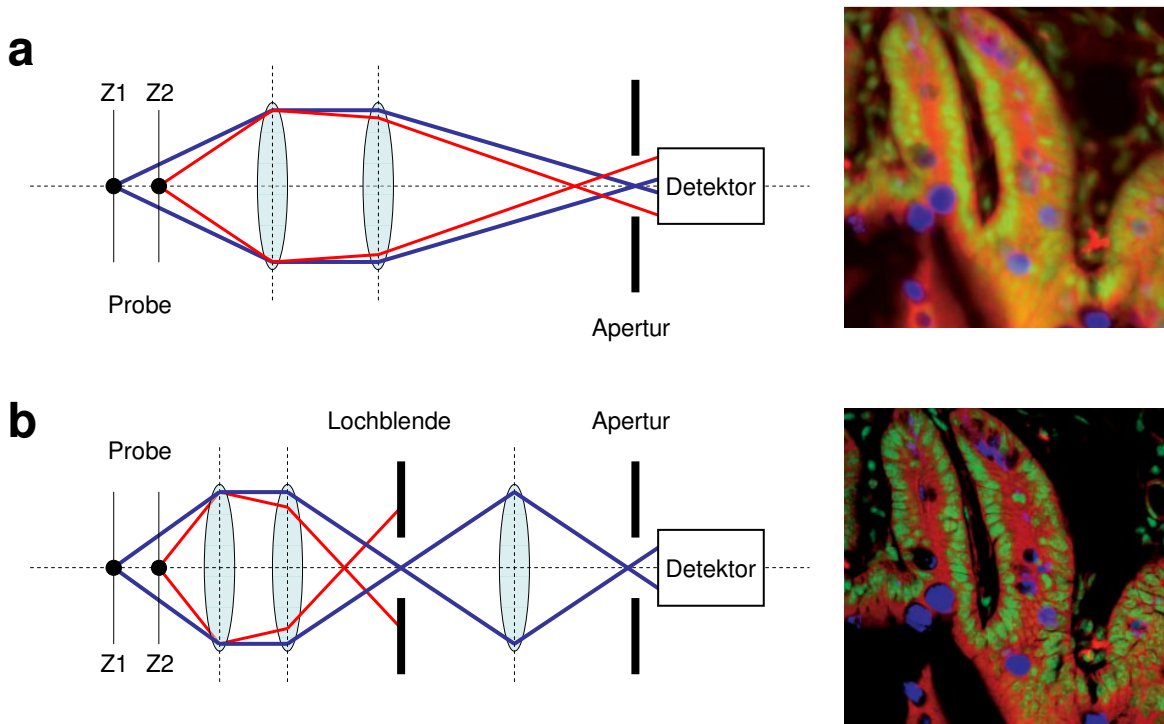


**Abbildung 3: Reflexion eines Lichtstrahls an der Grenzschicht zweier optisch unterschiedlich dichten Materialien nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz. Überschreitet der Einfallswinkel vom optisch dichteren Medium einen Grenzwert, so bildet sich ein evaneszentes Wellenfeld entlang der Grenzschicht aus, welches zu beiden Seiten exponentiell abfällt.**

Einsatz hochsensitiver Kameras (EMCCD-Kameras) kann Einzelmolekülaufösung erreicht werden.

## 2.4 Einzelmolekül-FRET-Aufbau als konfokales Mikroskop

Im Gegensatz zu einem klassischen Mikroskop mit Weitfeldanregung wird bei einem konfokalen Mikroskop nur ein räumlich begrenzter Punkt von der Größe einiger weniger Femtoliter der Probe angeregt und abgebildet. Der Anregungsstrahlengang fokussiert die Lichtquelle in allen drei Dimensionen auf einen einzigen Punkt, dessen untere Größengrenze lediglich durch die Wellenlänge des Anregungslichts begrenzt wird. Monochromatisches paralleles Laserlicht ist hierfür besonders geeignet.



**Abbildung 4:** Vergleich des Strahlengangs eines konventionellen Mikroskop (a) mit einer konfokalen Anordnung (b). Der wesentliche Vorteil eines konfokalen Mikroskops besteht darin, dass nur Strahlen (blau) aus einer Ebene den Detektor erreichen können, Strahlen aus anderen Ebenen werden durch die Lochblende abgelenkt. Neben einer geringen Verbesserung der lateralen Auflösung ergibt sich dadurch eine wesentliche Verbesserung der transversalen Auflösung, was zu einer Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses führt. Die fluorezenzspektroskopischen Abbildungen werden auf diese Weise insgesamt kontrastreicher. Die beiden Beispielabbildungen rechts zeigen einen Schnitt durch einen dreifach gefärbten Mäusedarm (aus [59]). Im nichtkonfokalen Bild (a, rechts) werden die interessierenden Informationen aus der Fokalebene durch außerfokale Präparatebenen überlagert; unterschiedlich gefärbte Präparatstellen erscheinen farblich gemischt. In der konfokalen Darstellung (b, rechts) werden Objekteinzelheiten deutlich sichtbar, die im nichtkonfokalen Bild nur verschwommen zu sehen sind.



Fluorophore aus benachbarten Raumpunkten werden auf diese Weise erst gar nicht angeregt. Eine Lochblende von einigen Mikrometern Durchmesser erzeugt zudem eine räumliche Begrenzung in axialer Richtung, da Fluoreszenzphotonen von Raumpunkten außerhalb der Fokusebene die Lochblende nicht passieren können und somit nicht zur Entstehung des Signals beitragen, siehe Abbildung 4. Mit Photodioden, Photomultiplier oder Avalanche Photodioden (APD) kann das Fluoreszenzsignal aus diesem Punkt mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis ( $10^5$ ) und mit entsprechender Messtechnik (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) mit hoher zeitlicher Auflösung ( $4 \cdot 10^{-12}$  s) aufgezeichnet werden.

Um ein zweidimensionales Bild der Probe zu erhalten, muss entweder das konfokale Volumen selbst (Laser Scanning Microscope, LSM) bewegt werden, oder die Probe wird relativ zum konfokalen Volumen (Sample Scanning Microscope) verschoben. Ein LSM wird üblicherweise durch Ablenkung des Laserstrahls mittels zweier beweglicher Spiegel realisiert. Mechanisch lassen sich so Bildraten von vielen kHz erreichen. Sample Scanning Mikroskope verwenden einen Piezotisch, auf dem die Probe mit einer Ortspräzision von bis zu 1 nm über einen Bereich von einigen hundert Mikrometern verfahren werden kann. Durch Kombination dreier Achsen lassen sich auf diese Weise 3D-Scanner realisieren.

Der Gewinn in der lateralen Ortsauflösung konfokal erzeugter fluoreszenzspektroskopischer Bilder begründet sich nur zum Teil auf die verbesserte laterale Ortsauflösung. Entscheidend für die Qualitätsverbesserung ist das verbesserte Signal-Rausch-Verhältnis, welches auf eine Reduktion des als Rauschen auftretenden Signals benachbarter Raumpunkte beruht. Die konfokale Anordnung reduziert laterales Übersprechen, in dem lateral benachbarte Raumpunkte erst gar nicht ausgeleuchtet werden. Die Lochblende reduziert transversales Übersprechen, in dem das Signal aus transversal benachbarten Raumpunkten herausgefiltert wird.

Der für die konfokalen Messungen des Kdp-Transporters verwendete Einzelmolekülaufbau ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Ein gepulster Laser (PicoTA490, Picoquant, Wellenlänge 488 nm) stellt die Anregungsenergie für den FRET-Donor zu Verfügung. Die Anregung erfolgt über das Objektiv, Anregungs- und Detektionsvolumen sind somit identisch.

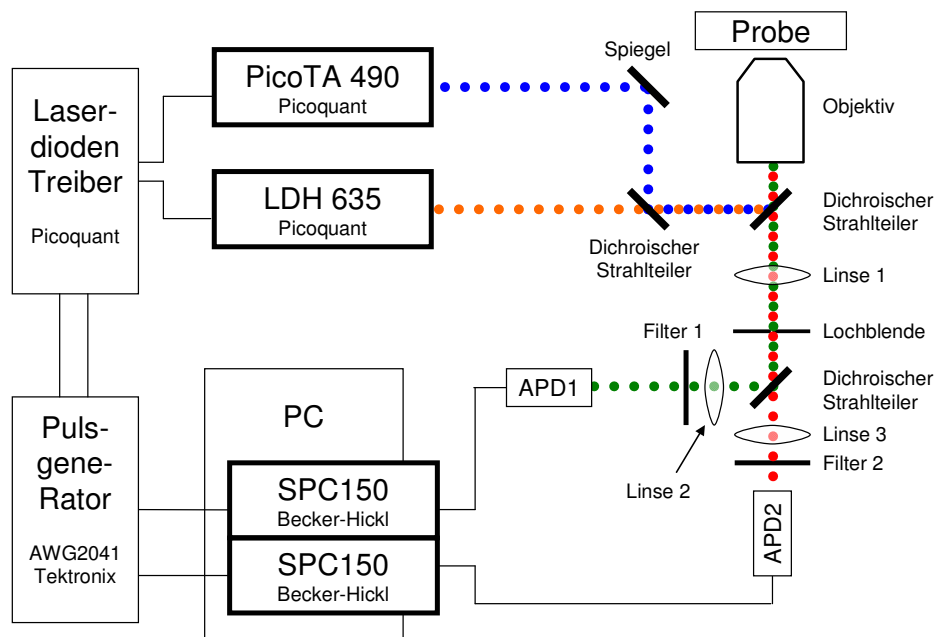
Ein dichroischer Strahlteiler im Detektionsstrahlengang teilt die Fluoreszenzphotonen spektral in zwei optische Pfade auf, die jeweils zu einer APD führen. Der elektrische TTL-Puls der APDs wird jeweils durch eine TCSPC-Karte (SPC150,

Becker&Hickl) registriert und mit einem Computer gespeichert. Jeder optische Pfad wird als Kanal bezeichnet.

Die Synchronisation beider Laser erfolgt über einen frei programmierbaren analogen Waveform-Generator (AWG2041, Tektronix, 1 GS/s), dessen 8 digitale ECL-Ausgänge alle nötigen Triggersignale generieren; somit fungiert das Gerät als Pulsgenerator.

Ein weiterer gepulster Laser (LDH635, Picoquant, Wellenlänge 635 nm) wird zur Direktanregung des FRET-Akzeptors verwendet. Damit lässt sich später in jeder einzelnen Zeitspur die Existenz des FRET-Akzeptors überprüfen.

Donor- und Akzeptor-Puls erfolgen zeitlich von einander getrennt. Detektierte Fluoreszenzphotonen stehen somit in zeitlichem Zusammenhang zu einem der beiden Laserpulse und können dadurch nicht nur spektral sondern zusätzlich auch durch ihr Zeitfenster getrennt werden. Insgesamt erhält man mit beiden Lasern und beiden APDs vier voneinander unabhängige Zeitspuren, aus denen sich jeweils zeitabhängig die

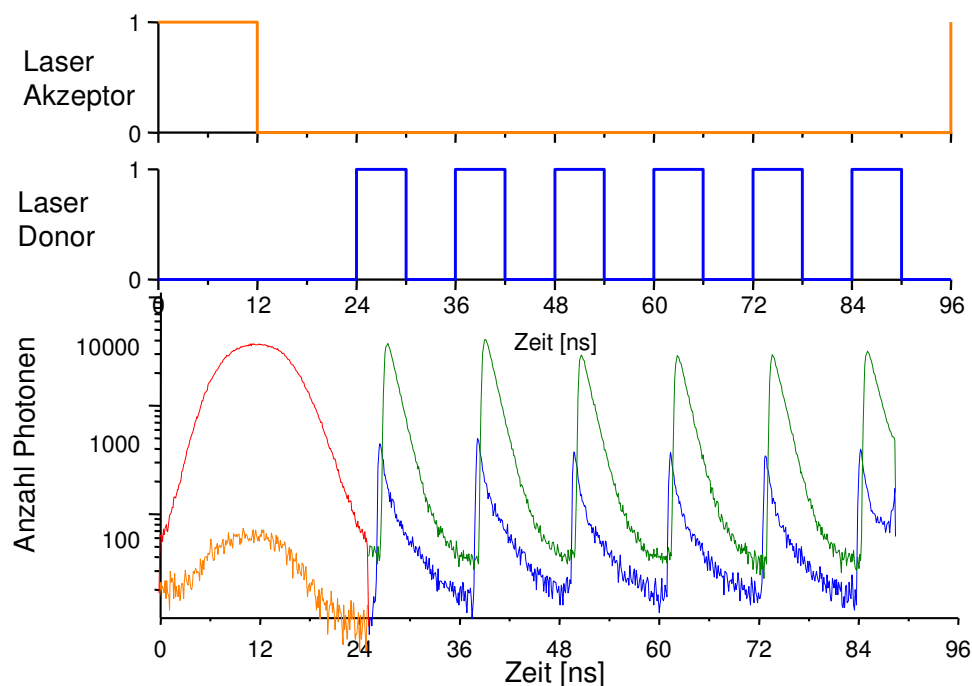


**Abbildung 5: Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit Einzelmolekül-FRET-Messungen.** Der blaue Laser PicoTA490 emittiert Licht der Wellenlänge 488 nm zur Anregung des FRET-Donors. Zur direkten Anregung des FRET-Akzeptors steht ein weiterer roter Laser LDH635 mit einer Wellenlänge von 635 nm zur Verfügung. Beide Laser werden abwechselnd gepulst betrieben; eine Synchronisation erlaubt die Zuordnung der Fluoreszenzphotonen zu den Laserpulsen. Das Licht beider Fluorophore wird spektral getrennt auf zwei unterschiedliche Detektionskanäle unabhängig von einander registriert. Jedes gemessene Photon wird mit einem Zeitstempel versehen über die Messkarten SPC150 auf einem PC zur späteren Datenanalyse gespeichert.

Fluoreszenzzählrate extrahieren lässt. Durch die gepulste Messung erhält man zudem für jede der vier Zeitspuren Informationen über die Lebensdauer.

## 2.5 Duty Cycle Optimized Alternating Laser Excitation (DCO-ALEX)

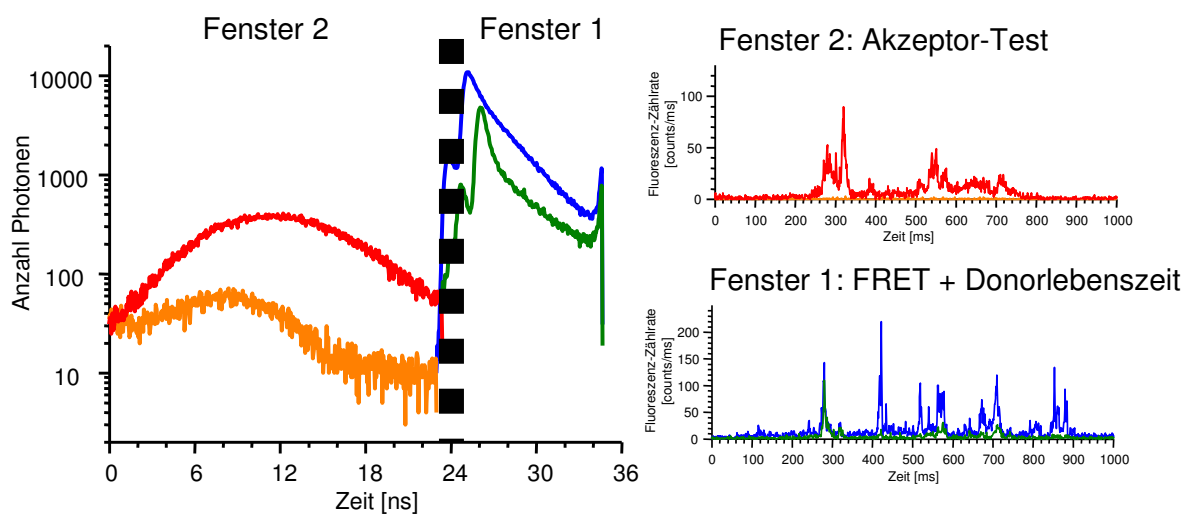
Die Verwendung des zweiten Lasers zur Direktanregung des Akzeptors bringt neben der zusätzlichen Information über den Zustand des Akzeptors den Nachteil mit sich, dass in den Zeitfenstern des Akzeptortests keine FRET-Messung stattfinden kann. Bei gleich großen Zeitfenstern sinkt die Aktivitätsdauer (duty cycle) der FRET-Messung dadurch auf 50 %, was sich durch eine entsprechende Reduktion in den Fluoreszenzzählraten bemerkbar macht. Da man in der Regel aus der FRET-Messung wesentlich mehr Informationen extrahieren möchte als aus dem Akzeptortest, ist es nahe liegend, die Aktivitätsdauer der FRET-Messung durch eine Anpassung der Pulssequenz zu optimieren. Die Größe der Zeitfenster wird durch die Lebensdauer der Fluorophore weitestgehend vorgegeben. Um beispielsweise mindestens 95 % der Photonen eines Fluorophors mit 4 ns Lebenszeit zu erfassen, muss das Zeitfenster min. 12 ns lang



**Abbildung 6: DCO-ALEX Pulsschema mit resultierender Verteilung der Photonenankunftszeiten. Von oben: Elektrisches Triggersignal für den Akzeptorlaser (orange) und für den Donor-Laser (blau). Der Akzeptorlaser triggert den Akzeptortest und erzeugt je eine Zeitspur auf den beiden optischen Kanälen (unten in rot und orange, 0-24 ns), die nachfolgenden sechs Donor-Laser-Pulse triggern sechs FRET-Experimente mit wiederum zwei Zeitspuren (blau und grün, 24-96 ns). Zwei Laser erzeugen mit optischen Kanälen somit vier Zeitspuren. DCO-ALEX optimiert hierbei die Aktivitätsdauer (duty cycle) des FRET-Experiments.**

sein. Generiert man ein Pulsschema, in dem nicht mehr Akzeptortest und FRET-Messung abwechselnd erfolgen, sondern auf einen Akzeptortest mehrere FRET-Messungen kommen, so erhöht sich der duty-cycle des FRET-Experiments, ohne dass eine Erhöhung der Laserleistung notwendig wird. Abbildung 6 zeigt das elektrische Pulsschema mit der resultierenden Verteilung der Fluorophor-Ankunftszeiten. Die vier Zeitspuren aus zwei Detektionskanälen und zwei Zeitfenstern werden durch vier unterschiedliche Farben kenntlich gemacht. Der Akzeptortest hat ein Zeitfenster von 24 ns. Experimentell wurde hier ein cw-Laser mit angeschlossenem AOM verwendet, was zu einer fast Gauß-förmigen Verteilung der Photonenankunftszeiten in diesem Zeitfenster führt. Das FRET-Experiment findet in sechs Zeitfenstern zu je 12 ns statt, hat somit eine Länge von 72 ns. Deutlich ist sechsmal die exponentiell abklingende Lebensdauer des angeregten Zustands zu erkennen. Der optimierte duty-cycle erreicht auf diese Weise einen Wert von 75 %.

Die SPC-Karte erhält zur zeitlichen Markierung der Anregungspulse gewöhnlich einen Synchronisationspuls pro Laserpuls. Für Abbildung 6 wurde jedoch mit jedem Start der Pulssequenz nur ein einziger Synchronisationspuls erzeugt. Für die Erzeugung der Messdaten wurden jedoch sechs Synchronisationspulse zeitgleich mit den Donor-Pulsen an die SPC-Karte geleitet, siehe Abbildung 7. Dadurch kommen bereits auf Hardware-Ebene alle sechs Zeitfenster aufeinander zu liegen, die weitere Software-seitige Datenanalyse erfolgt somit exakt wie bei konventionellen ALEX-Daten.

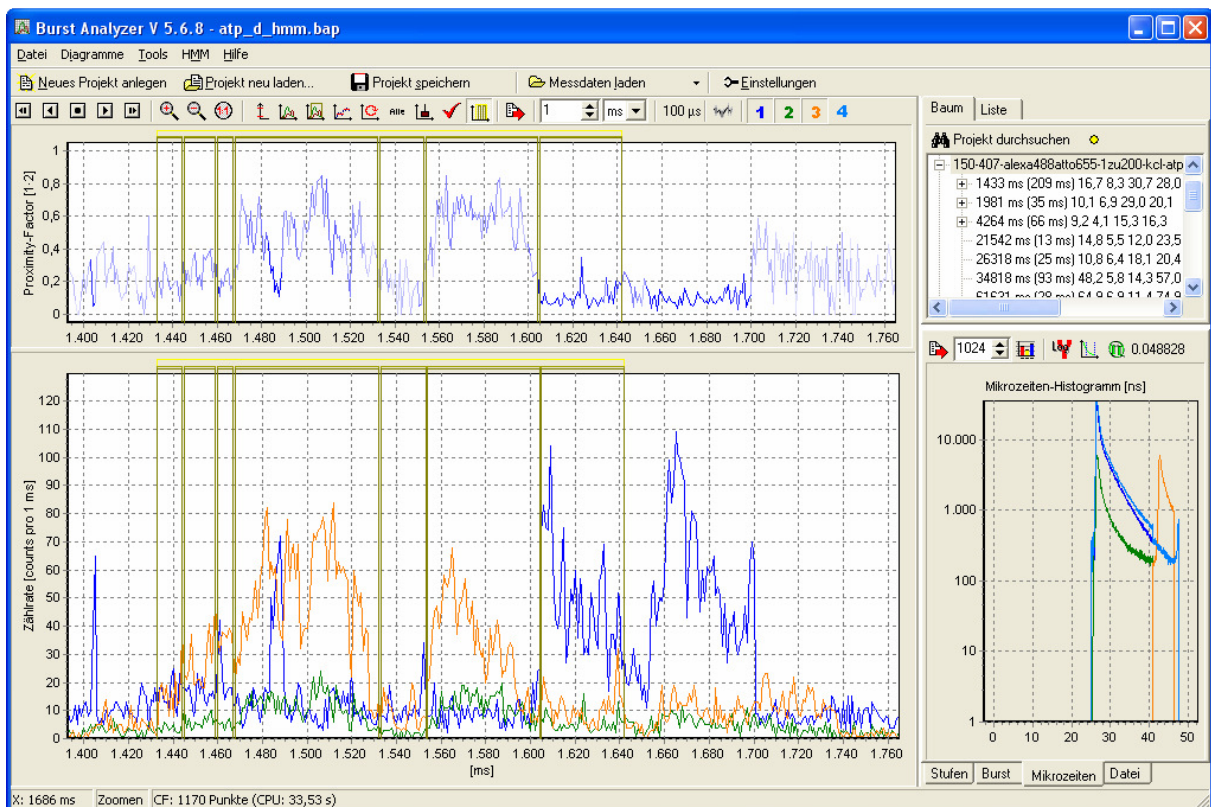


**Abbildung 7: DCO-ALEX mit synchronisierten Zählkarten eines FRET-markierten Proteoliposoms. Die multiplen FRET-Pulse wurden durch geeignete Synchronisationspulse an die SPC-Elektronik auf Hardwareebene aufeinander gelegt. Aus den beiden resultierenden Zeitfenstern (links) lassen sich die vier Zeitspuren (rechts, oben und unten) sowie die Donor-Lebensdauer extrahieren.**

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Erweiterung der ALEX-Technik (Alternating Laser-Excitation) durch ein optimiertes Pulsschema erhielt den Namen DCO-ALEX, Duty Cycle Optimized Alternating Laser Excitation [60].

## 2.6 Auswertesoftware Burst Analyzer

Ein Einzelmolekül-Fluoreszenz-Aufbau mit APDs als Detektoren erzeugt als Messsignal für jedes detektierte Photon einen TTL-Puls. Diese können mit einfachen Zählerkarten (z.B. National Instruments NI PCI-6602) in vorher festgelegten äquidistanten Zeitabschnitten auf mehreren Kanälen parallel aufaddiert werden und so direkt als Intensitätstrajektorie aufgenommen und angezeigt werden. Der volle Informationsgehalt wird aber nur dann erhalten, wenn jedes einzelne Photonen-Ereignis mit einem genauen Zeitstempel versehen wird (siehe Abschnitt 2.4). Ein genauer Zeitstempel muss die Dauer des zugehörigen angeregten Zustands auflösen



**Abbildung 8:** Screenshot der Auswerte-Software „Burst Analyzer“. Das Hauptfenster links unten zeigt drei Zeitspuren mit Burst- und Stufenmarkierungen. Das Diagramm links oben legt die Proximity-Factor-Spur aus den Zeitspuren 1 und 2 zeitlich synchron mit den Markierungen über die Messdaten. Rechts unten sind die Zeitfenster der Detektionskanäle und den Farben der daraus erstellten Zeitspuren dargestellt. Das Projektfenster rechts oben listet alle Markierungen mit ihren zugehörigen Werten auf.

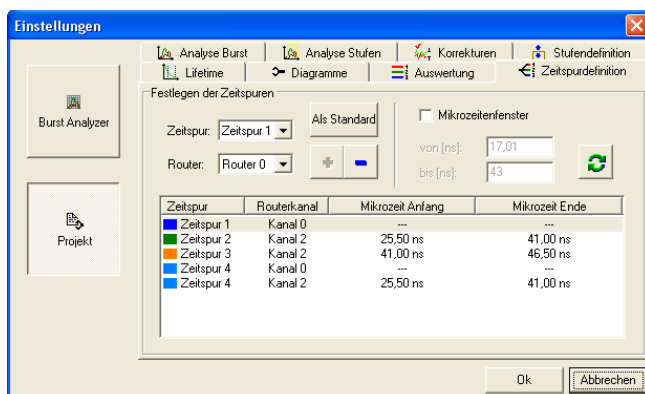
können. Die entsprechenden Messkarten (z.B. Becker&Hickl SPC 150 oder Picoquant HydraHarp 400) erzeugen Datenfiles, die die Ankunftszeiten der Photonen mit ausreichender Genauigkeit und der zugehörigen Kanalinformation speichern. Aus diesen Dateien lassen sich wiederum durch Binning mit wählbarer Zeitauflösung die oben erwähnten Intensitätstrajektorien erzeugen.

Da eine leistungsfähige Datenauswertesoftware nicht existierte, wurde die Entwicklung der Benutzeranwendung „Burst Analyzer“ gestartet (siehe Abbildung 8). Neben der einfachen Aufbereitung und Visualisierung der Daten wurde die Software mit dem Ziel entwickelt, quantitative Merkmale aus den Messdaten ableiten zu können wie z.B. die mittlere Verweilzeit eines biochemischen Zustands.

Hierzu können Zeitbereiche ähnlich wie bei einem Soundeditor (z.B. Audacity<sup>\*</sup>) markiert werden. Diese Markierungen werden als Bursts bzw. Stufen gespeichert und jeweils mit einem eigenen Satz Werte verbunden. So enthält z.B. jede Stufe Informationen wie die mittlere FRET-Effizienz, die zugehörigen Fluoreszenzintensitäten oder die Stufenlänge. Aus diesen Daten kann dann beispielsweise das Verweilzeitenhistogramm eines bestimmten biochemischen Zustands erstellt werden.

Die Burstmarkierung ist darüber hinaus durch eine Reihe einstellbarer und frei kombinierbarer Schwellenwerte automatisierbar. Eine komplette Stufenmarkierung kann aus einem externen Programm importiert werden, z.B. die HMM-Analyse aus Matlab.

Eine Besonderheit der Software ist die Möglichkeit, eine Zeitspur anhand der Messkanalinformation und eines Zeitfensters frei definieren zu können (siehe Abbildung 9). So kann bei der im vorigen Kapitel ausgeführten gepulsten Zwei-Kanal-Messung mit einem zweiten Laser ein anderer Farbstoff angeregt werden. Die



**Abbildung 9: Erzeugung von vier Zeitspuren aus zwei Kanälen. Der Detektor kanal 0 wird ganz zu Zeitspur 1 konvertiert. Der Detektor kanal 2 wird durch zwei Zeitfenster in die Zeitspuren 2 und 3 aufgeteilt. Zeitspur 4 zeigt das Summensignal aus dem Detektor kanal 0 und dem ersten Zeitfenster aus Detektor kanal 2.**

\* freier Audioeditor Audacity, <http://audacity.sourceforge.net/>

entsprechenden Fluoreszenz-Photonen können anhand ihrer Zeitdifferenz zu den beiden Laserpulsen einer eigenen Zeitspur zugeordnet werden. So lassen sich leicht aus einem Aufbau mit zwei Detektoren durch die Einführung von Zeitfenstern softwareseitig, also nach der Messung, vier Zeitspuren generieren.

Darüber hinaus lassen sich aus diesen Zeitspuren Korrelationsfunktionen berechnen. Diese können zudem aus frei wählbaren Zeitausschnitten der vorhandenen Datenmenge erstellt werden.

Aufgrund seiner universellen Einsatzmöglichkeiten und der intuitiven Benutzerführung wurde diese Anwendung in zahlreichen Projekten innerhalb ([53, 54, 61-63]) und außerhalb ([60, 64, 65]) der Gruppe eingesetzt.

## 2.7 Hellfeldmikroskopie

Um Messdaten auf Einzelmolekülniveau zu erzeugen, ist nicht unbedingt ein konfokaler Aufbau oder ein TIR-Mikroskop erforderlich. Als Alternative zu den fluoreszenzspektroskopischen Methoden können durch den Einsatz alternativer Marker auch Einzelmoleküldaten mit einem ganz gewöhnlichen Hellfeldaufbau gewonnen werden. Als Beispiel hierfür dient die  $F_1$ -ATPase, an deren  $\gamma$ -Untereinheit über His-Tags ein Bead ausreichender Größe ( $\varnothing \approx 0,5 \mu\text{m}$ ) gebunden wurde. Immobilisierte Protein-Subkomplexe sind mit typischen Größen von wenigen Nanometern zu klein, um in gewöhnlicher Hellfeldmikroskopie einen Kontrast zu liefern. Solche Beads liefern hingegen einen ausreichenden Kontrast. Deren Bewegung kann bei genügend hoher Zeitauflösung mitverfolgt werden. Diese Daten lassen Rückschlüsse auf die Kinetik des mit ihnen verbundenen Protein-Subkomplexes zu.

Skaliert man das Experiment auf makroskopische Längen, so würden Reibung mit dem umgebenden Medium sowie die Trägheit des Markers alle anderen Effekte überdecken. In der nanoskopischen Welt der Biomoleküle ist der Einfluss der Reibung mit der Pufferlösung und der Einfluss der eigenen Trägheit jedoch ausreichend gering, die charakteristische Bewegung des Enzym-Subkomplexes tritt klar aus den Einzelmolekülspuren der Markertrajektorien hervor, siehe Kapitel 6.

### 3 Hidden Markov Modelle

Hidden Markov Modelle formulieren explizit ein Modell mit Zuständen und Übergängen, welches dann über Maximum-Likelihood-Verfahren durch Variation der Parameter an die gegebenen Messdaten angepasst wird. Im folgenden Abschnitt sind alle erforderlichen Parameter, die ein Hidden Markov Modell bilden, zusammengefasst. Die darauf folgenden Abschnitte erläutern zu Beginn die klassische Maximum-Likelihood-Methode, führen über das Aufstellen der Likelihood-Funktion zum iterativen Parameter-Optimierungs-Algorithmus und schließlich auf den Formalismus der Hidden Markov Modelle. Darauf aufbauend werden im letzten Abschnitt die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Erweiterungen für eine Anwendung auf Einzelmoleküldaten beschrieben. Der letzte Abschnitt diskutiert Möglichkeiten und deren Grenzen, verschieden komplexe Modelle miteinander zu vergleichen.

#### 3.1 Grundgerüst eines Hidden Markov Modells

Ein Standard-Hidden-Markov-Modell besteht aus zwei grundlegenden Prozessen. Erstens: ein autonomer Markov Prozess erzeugt eine Zustandsfolge. Zweitens: jeder Zustand generiert eine Zufallsvariable gemäß einer den Zustand charakterisierenden Verteilungsfunktion.

Zu Erstens: Ein autonomer Markov Prozess erzeugt eine Zeitreihe  $Q=\{q_t\}$  zu den diskreten Zeiten  $t=1..N$ , aus einer begrenzten Zahl von  $M$  Zuständen. Dies geschieht durch eine Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix  $\mathbf{T}$  der Größe  $M \times M$ , die von Zeitschritt zu Zeitschritt den vorhandenen Zustand  $q$  in den nachfolgenden Zustand  $q'$  überführt:

$$Q(t) = Q(t-1) \cdot T(q_t | q_{t-1}) \quad (14)$$

Der aktuelle Zustand hängt lediglich von seinem direkten Vorgänger ab, eine Abhängigkeit von früheren Zeitschritten besteht nicht. Die sich daraus entwickelnde Zeitreihe beginnt mit dem Prior, über den Vorwissen in das System eingebracht werden muss. Ein solcher Markov-Prozess modelliert somit nur gedächtnislose Zustandstrajektorien, deren Verweildauern monoexponentiell abfallen.

Zu Zweitens: Standard Hidden Markov Modelle sehen multivariate Normalverteilungen mit  $O$  Dimensionen als Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen vor. Dabei bekommt jeder Zustand seinen eigenen Parametersatz. Diese Dichtefunktionen heißen



Emissionsfunktionen, da der autonome Markovprozess gemäß des aktuellen Zustands und seiner Emissionsfunktion eine Observable emittiert.

Es ergeben sich somit folgende zeitinvariante Parameter für das HMM:

- Eine Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix  $\mathbf{T}$  der Größe  $M \times M$
- Ein Priorvektor  $\boldsymbol{\pi}$  der Größe  $1 \times M$
- $M$  Mittelwertsvektoren  $\boldsymbol{\mu}$  jeweils der Größe  $1 \times O$
- $M$  Kovarianzmatrizen  $\boldsymbol{\Sigma}$  jeweils der Größe  $O \times O$

Des Weiteren wird eine Likelihood-Funktion formuliert, die das Likelihood der Daten in Abhängigkeit der gegebenen, oben aufgelisteten Parameterwerte ausdrückt.

Die Optimierung dieser Parameter kann durch das Steigen des Likelihood-Wertes gemessen werden. Im Zuge der Entwicklung verfügbarer Rechenleistung wurden in den 70er-Jahren leistungsfähige numerische Algorithmen entwickelt, die iterativ die Parameter durch Steigerung des Likelihoods optimieren können. Der meistverwendete Algorithmus in Zusammenhang mit Hidden Markov Modellen ist der Baum-Welch Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus (forward-backward-algorithm) [66], da er für dieses Problem außerordentlich schnell konvergiert. Hier muss jeder Iterationsschritt eine Erhöhung des Likelihood-Wertes erzeugen. Sinkt die Änderung unter einen Grenzwert, wird der Prozess beendet.

Anschließend kann mit Hilfe des Viterbi-Pfads die wahrscheinlichste Zustandstrajektorie ermittelt werden. Hidden Markov Modelle eignen sich demnach nicht nur, um die globalen statischen und dynamischen Eigenschaften auf durchgängig statistische Weise zu ermitteln, sondern man bekommt sogar für jeden Zeitschritt eine Schätzung, in welchem Zustand sich das beobachtete System befand.

### 3.2 Die klassische Maximum-Likelihood-Methode

Ausgangspunkt der Maximum-Likelihood-Methode ist die grundlegende Annahme, dass der bei einem Messvorgang gewonnene Datensatz eine Stichprobe einer Verteilungsfunktion darstellt. Die Parameter dieser Verteilungsfunktion sind zwar Ziel der Messung, können aber nicht direkt gemessen werden. Man ist auf eine Methode angewiesen, die eine Schätzung der zugrunde liegenden Parameter anhand der vorliegenden Stichprobe erlaubt. Genau das geschieht bei der Maximum-Likelihood-Methode in einer statistisch konsequenten Form, d.h. alleine die Eigenschaften der zugrunde liegenden Verteilungsfunktion bestimmen die Schätzungen der Parameter. Es müssen im Allgemeinen keine weiteren Annahmen dafür getroffen werden. Im

Gegensatz dazu steckt z.B. im sehr weit verbreiteten Levenberg-Marquardt-Fit-Algorithmus die Annahme normalverteilter Fehler.

Im Mittelpunkt der Maximum-Likelihood-Methode steht die Likelihood-Funktion. Sie stellt den Zusammenhang zwischen einer Stichprobe  $\{x_i\}$  und einem Verteilungsmodell dar und gibt die Wahrscheinlichkeit an, wie gut ein bestimmtes Modell bei gegebenen Modellparametern zur Stichprobe passt. Dabei muss die gesamte Information über die unbekannt Parameter in dieser Likelihood-Funktion enthalten sein. Aus dieser Funktion lassen sich dann Schätzer für die gesuchten Parameter ableiten.

Als Grundlage der weiteren Überlegungen bietet sich wegen seiner Einfachheit ein Gaußsches Modell an. Die allgemeinste Form davon ist das Gaußsche Mischmodell mit  $Q$  Komponenten („Gaussian Mixture Model with  $Q$  Components“). Die zugrunde liegende multivariate Normalverteilung  $f_q$  jeder Komponente  $q=1..Q$  mit  $M$  Dimensionen wird durch den  $M$ -dimensionalen Vektor für die Mittelwerte  $\boldsymbol{\mu}_q$  sowie durch die Kovarianzmatrix  $\boldsymbol{\Sigma}_q$  der Größe  $M \times M$  vollständig charakterisiert:

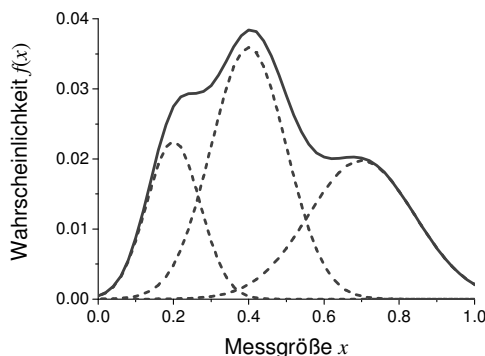
$$f_q(\mathbf{x} | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{M}{2}} \det(\boldsymbol{\Sigma}_q)^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_q) \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} (\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_q)^T\right) \quad (15)$$

Für die Bildung der gemeinsamen Dichteverteilung der  $Q$  Komponenten bietet ein weiterer Parameter  $W_q$  die Möglichkeit, den Anteil der Daten aus Komponente  $q$  zu modellieren:

$$f(\mathbf{x} | \{\boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q, W_q, q=1..Q\}) = \sum_{q=1}^Q W_q f_q(\mathbf{x} | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q) \quad (16)$$

Ein Beispiel für  $M=1$  und  $Q=3$  zeigt Abbildung 10.

Um daraus eine Likelihoodfunktion zu bekommen, die sich aus allen Datenpunkten zusammensetzt, müssen die Wahrscheinlichkeiten jedes einzelnen Datenpunktes miteinander multipliziert werden.



**Abbildung 10: Beispiel eines Gaußschen Mischmodells mit  $M$  Dimensionen und  $Q$  Komponenten ( $M=1$ ,  $Q=3$ ,  $\boldsymbol{\mu}_{q=1..3}=\{0.2, 0.4, 0.7\}$ ,  $\boldsymbol{\Sigma}_{q=1..3}=\{0.005, 0.01, 0.02\}$ ,  $W_{q=1..3}=\{0.20, 0.45, 0.35\}$ ).**

Da jeder Datenpunkt aber aus  $Q$  verschiedenen Quellen stammen kann, müssen auch alle diese Möglichkeiten entsprechend der Anteile  $W_q$  berücksichtigt werden.

Die gesamte Likelihoodfunktion bekommt also die folgende Gestalt:

$$L = p(\{\mathbf{x}_t\} | \{\boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q, w_{qt}, q=1..Q\}) = \prod_{t=1}^T \prod_{q=1}^Q [f_q(\mathbf{x}_t | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q)]^{w_{qt}} \quad (17)$$

Hierbei wird die zusätzliche Information  $w_{qt}$  benötigt, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein bestimmter Datenpunkt aus der zugehörigen Komponente  $q$  stammt. Bei einem vollständig gegebenen Parametersatz  $\{\boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q, W_q\}$  ergibt sich diese direkt aus den Daten:

$$w_{qt} = \frac{W_q f_q(\mathbf{x}_t | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q)}{\sum_{q=1}^Q W_q f_q(\mathbf{x}_t | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q)} \quad (18)$$

Diese wichtige Größe trägt den Namen „a posteriori“ Wahrscheinlichkeit („posterior probability“), mit ihr lässt sich quantitativ jeder einzelne Datenpunkt einer der Ausgangskomponenten zuordnen. Der Nenner garantiert hierbei, dass sich aus den a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten im Mittel wieder die Anteile  $W_q$  ergeben:

$$W_q = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T w_{qt} \quad (19)$$

Generell sucht man den Parametersatz, der am besten zur vorliegenden Stichprobenmenge passt, der also einen maximalen Wert des Likelihoods erzeugt. Andersherum ausgedrückt versucht man das Likelihood als Funktion der freien Parameter zu maximieren. Dabei ergibt sich gerade für normalverteilte Wahrscheinlichkeitsdichten ein Vorteil, wenn man statt der Likelihoodfunktion zu ihrem Logarithmus, also der Loglikelihoodfunktion übergeht. Dies ist erlaubt, da die Logarithmusfunktion streng monoton steigend und überall differenzierbar ist und somit auch ihr Maximum zum besten Parametersatz führt.

Durch die vielen Multiplikationen kleiner Zahlen (Funktionswerte aus Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen liegen i.Allg. zwischen 0 und Unendlich, sind i.d.R. jedoch sehr viel kleiner als 1) werden außerdem die Funktionswerte bei der Loglikelihoodfunktion auf den gesamten reellen Zahlenraum abgebildet, was eine erhebliche Verbesserung in der numerischen Stabilität mit sich bringt. Insbesondere wird dadurch das Auftreten von numerischen Unterläufen (*underflows*) verringert: positive Zahlenwerte, die kleiner als die Genauigkeit des Rechners sind und dadurch ungewollt auf 0 gerundet werden. Um Unterläufe ganz zu verhindern, bedarf es noch ein paar weiterer Tricks, doch dazu später mehr.

Durch den Logarithmus verwandeln sich schließlich die Produkte in Summen:

$$\log L = \sum_{t=1}^T \sum_{q=1}^Q w_{qt} \log(f_q(\mathbf{x}_t | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q)) \quad (20)$$

Die vorliegenden Stichprobenwerte werden also jeweils unabhängig in Wahrscheinlichkeitswerte umgerechnet und gewichtet aufaddiert. Eine ganz grundlegende Annahme dieses Ansatzes ist, dass der Informationsgehalt jeder einzelnen Stichprobe  $x_i$  den gleichen Beitrag zur Gesamtinformation der Loglikelihood-Funktion beiträgt, unabhängig davon, wie weit die Stichprobe von ihrem Mittelwert  $\mu$  entfernt ist, also egal wie schlecht der Messwert erscheint.

Gesucht ist nun der optimale Parametersatz bei gegebenen Daten, bei der die Loglikelihood-Funktion ihren höchsten Wert erreicht. Eine implizite Gleichung für jeden Parameter erhält man durch Nullsetzen der entsprechenden Ableitung der Loglikelihood-Funktion:

Für den Mittelwert  $\boldsymbol{\mu}_q$  gilt:

$$\frac{\partial \log L}{\partial \boldsymbol{\mu}_q} = 0$$

Auflösen führt zu einer expliziten Form (siehe Anhang C):

$$\hat{\boldsymbol{\mu}}_q = \frac{\sum_t w_{qt} \mathbf{x}_t}{\sum_t w_{qt}} \quad (21)$$

Für die Varianz  $\boldsymbol{\Sigma}_q$  gilt:

$$\frac{\partial \log L}{\partial \boldsymbol{\Sigma}_q} = 0$$

Auch hier kann aufgelöst werden und man erhält eine explizite Form (siehe Anhang C):

$$\hat{\boldsymbol{\Sigma}}_q = \frac{\sum_t w_{qt} \mathbf{x}_t \mathbf{x}_t'}{\sum_t w_{qt}} - \hat{\boldsymbol{\mu}}_q \hat{\boldsymbol{\mu}}_q' \quad (22)$$

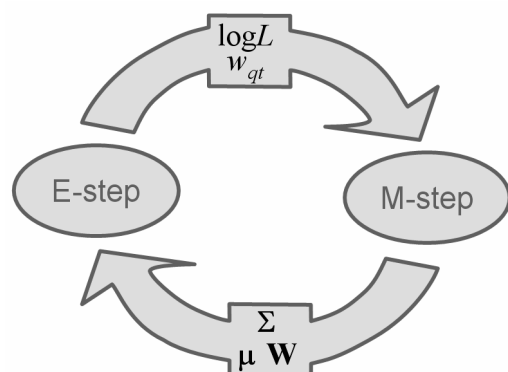
Diese beiden Gleichungen (21) und (22) nehmen eine zentrale Rolle in der multivariaten Statistik ein und sind unter den Namen *Schätzer* (estimators) bekannt. Erst sie ermöglichen es, die gesuchten Parameterwerte aus einem gegebenen Datensatz zu schätzen. Dabei müssen sie bestimmte Eigenschaften (Konsistenz, Erwartungstreue, Effizienz) erfüllen, die für jeden Schätzer einzeln zu überprüfen sind. Für das hier verwendete Gaußsche Mischmodell wurde dies in der einschlägigen Literatur gezeigt,

siehe z.B. Kapitel 6.2 in [67]. Es gibt auch andere Verfahren als die hier verwendete Maximum-Likelihood-Methode, um Schätzfunktionen zu erhalten, allerdings gewährleistet i.d.R. die Maximum-Likelihood-Methode, dass die resultierenden Schätzer die gewünschten Eigenschaften besitzen und in den allermeisten Fällen sogar die besten erwartbaren Schätzer am theoretischen Informationslimit liefern (Kapitel 6.2.4, S. 233 in [67]).

### 3.3 Der Expectation-Maximization-Algorithmus

Die durch die Schätzer bestimmbar Parameterwerte hängen nicht nur von den Daten ab, sondern allesamt auch von den a-posterior-Wahrscheinlichkeiten. Diese aber hängen wiederum von jenen gesuchten Parameterwerten ab, die ja die Schätzer liefern sollen.

Diese wechselseitige Abhängigkeit führt zu einem iterativen Algorithmus, indem man zunächst mit Startwerten für die Parameterwerte die a-posterior-Wahrscheinlichkeiten bestimmt und mit diesen über die Schätzer wiederum neue optimierte Parameterwerte erzeugt (siehe Abbildung 11). Jede Iteration erhöht das Loglikelihood, sodass das System sich dem nächsten lokalen Maximum des Loglikelihoods annähert. Fällt die Änderung des Loglikelihoods nach einigen Iterationen unterhalb eines Schwellenwertes, wird das Verfahren abgebrochen und man erhält den gesuchten Satz optimierter Parameterwerte. Durch wiederholtes Anwenden des Verfahrens mit unterschiedlichen Startwerten kann man der Gefahr, einem unbedeutenden lokalen Maximum aufzusitzen, in der Praxis wirkungsvoll entgehen. Das Ausrechnen der a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten stellt in einem übergeordneten Kontext den *expectation step* dar, das anschließende Neuberechnen der Parameterwerte nennt man *maximization step* [68]. Allgemein kann gezeigt werden, dass abwechselndes Ausführen dieser beiden Schritte stets zu einem Erhöhen des Loglikelihoods führt, bis schließlich das (lokale) Maximum als stationärer Punkt dieses iterativen Verfahrens



**Abbildung 11:** Schema des iterativen Expectation-Maximization-Algorithmus. Die a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten  $w_{qt}$  werden im Expectation-Schritt (E-step) berechnet, während die Parameterwerte im Maximization-Schritt (M-step) ermittelt werden.

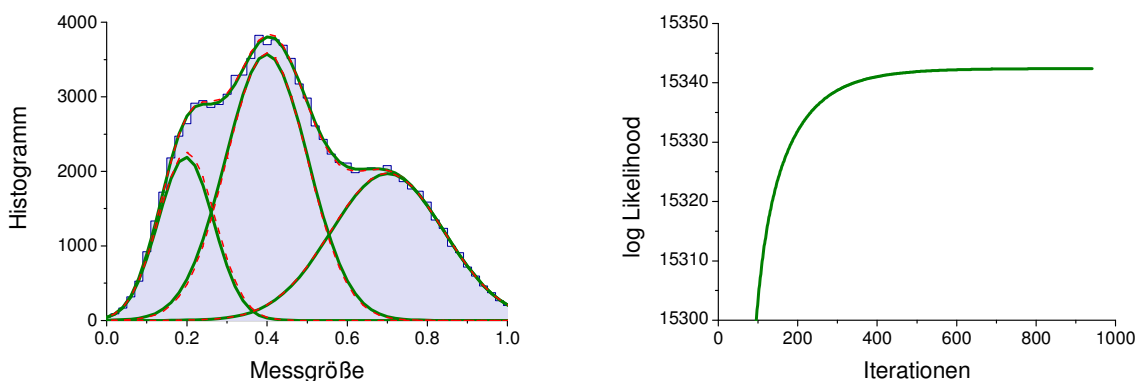
erreicht wird [26, 69].

Ein Problem besteht bezüglich numerischer Unterläufe: solange alle Einzelschritte als Logarithmus durchgeführt werden, können Unterläufe ausgeschlossen werden. Die Normierung der a-posteriori-Wahrscheinlichkeiten (siehe Gleichung (18)) allerdings erfordert eine Summierung der nicht logarithmierten Werte im Nenner, auch wenn später mit dem logarithmierten Wert der Normierung fortgefahren wird. Das erforderliche Exponentieren zur Bildung der Summe führt praktisch immer zu numerischen Unterläufen, ein anschließendes Logarithmieren ändert daran auch nichts mehr. Hier hilft jedoch folgender Trick [70]:

$$\log\left(\sum_i \exp(z_i)\right) = z_{\max} + \log\left(\sum_i \exp(z_i - z_{\max})\right) \quad (23)$$

Mit  $z_i$  werden die logarithmierten Werte bezeichnet, i.d.R. kleine Werte sehr nahe an 0,  $z_{\max}$  ist deren Maximum. Die obige Gleichung stellt sicher, dass mindestens der größte Beitrag in die logarithmierte Summe eingeht, alle anderen, die durch das Exponentieren numerisch unterlaufen, spielen sowieso keine Rolle und können vernachlässigt werden.

Abbildung 12 zeigt eindrucksvoll, wie gut das Verfahren anhand des Beispiels in Abbildung 10 funktioniert. Jede der durchgeführten Iterationen erhöht den Wert des Loglikelihoods.



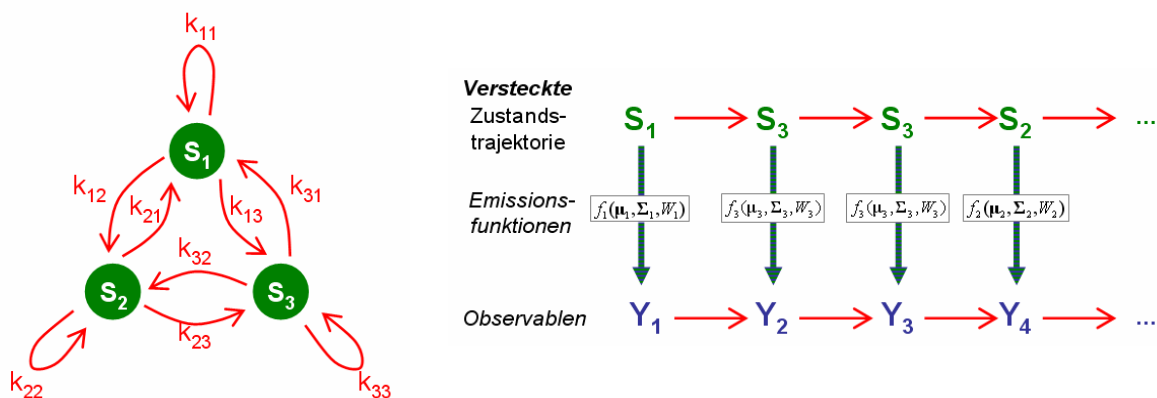
**Abbildung 12:** links: 100 000 Testdaten (blaue Kurve) aus einem 1D-Gauß-Modell mit drei Komponenten (dünne rot-gestrichelte Kurven), Ergebnis eines Maximum-Likelihood-Fits (grüne dicke Kurven). rechts: Erhöhung des Loglikelihoods mit jeder weiteren Iteration. Wenn die Änderung genügend klein ist, wird der Vorgang abgebrochen ( $\Delta \log L \leq 0.001$  nach 941 Iterationen).

### 3.4 Hidden Markov Modelle

Der gedankliche Sprung zu Hidden Markov Modellen ist nun sehr einfach: durch definierte Übergänge zwischen den einzelnen Komponenten in Form von Übergangswahrscheinlichkeit verwandeln sich die Komponenten in Zustände, die das Modell im Lauf der Zeit einnehmen kann (siehe Abbildung 13).

Jeder Zustand hat seine eigene Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, in unserem Beispiel ist das eine multivariate Normalverteilung, welche die aus dem vorherigen Beispiel bekannten freien Parameter  $\mu_i$ ,  $\Sigma_i$  und  $W_i$  besitzt. Die große Anwendungsvielfalt von Hidden Markov Modellen [71] liegt in der Freiheit der Wahl dieser Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen.

Das Markov-Modell befindet sich zu jedem Zeitschritt in einem der  $Q$  Zustände und erzeugt eine Observable gemäß der dem aktuellen Zustand zugeordneten Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, sie wird deshalb in diesem Zusammenhang *Emissionsfunktion* (*emission function*) genannt. Jeder Zustand hat zusätzlich einen eigenen Satz an Übergangswahrscheinlichkeiten in alle anderen Zustände. Die Emissionsfunktion sowie diese Übergangswahrscheinlichkeiten charakterisieren einen Zustand vollständig, alle zugehörigen Parameter sind zeitinvariant.



**Abbildung 13:** links: Schema eines Markov-Modells mit drei Zuständen  $S_1$ ,  $S_2$ , und  $S_3$  und den zugehörigen Übergangswahrscheinlichkeiten  $k_{ij}$ . rechts: Mögliche Realisation einer Markov-Kette aus dem Markov-Modell links. Das Modell emittiert gemäß der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $f_i$  des aktuellen Zustands  $S_i$  eine Observable  $Y_i$ . Dies führt zu einer Zeitreihe von Observablen. Die Zustände selbst sind nicht direkt messbar und daher *versteckt* (*hidden*).

### 3.5 Der Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus

Die hinzugefügte Dynamik in Form der Übergangswahrscheinlichkeiten schlägt sich direkt in den *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten nieder und beeinflusst dadurch die Schätzer. Für die Berechnung der *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten genügt es nun nicht mehr, einfach über alle möglichen Zustände und alle Datenpunkte zu multiplizieren, vielmehr wird jetzt der Übergang von einem Datenpunkt zum nächsten über die Übergangswahrscheinlichkeiten geregelt. Jeder Zustand kann mit jedem weiteren Datenpunkt in  $Q$  Zustände übergehen, es entsteht also ein exponentiell wachsender Entscheidungsbaum (=Ordnung  $O(Q^T)$ ), der bereits bei zwei möglichen Zuständen und einem Datensatz von nur 100 Messpunkten eine Größe von  $2^{100}$  ( $\approx 10^{30}$ ) verschiedene Pfade erreicht. (Zum Vergleich: Der schnellste zivile Supercomputer der Welt „BlueGene/P“\* mit einer Rechenleistung von  $4,5 \cdot 10^{14}$  FLOPS braucht für die Berechnung dieses kleinen Datensatzes (1 Pfad  $\approx 100$  FLOPs) etwa  $2,8 \cdot 10^{17}$  Sekunden! Alter des Universums: ca.  $4,3 \cdot 10^{17}$  Sekunden). Erst die Entwicklung effizienter Algorithmen der Ordnung  $O(Q^2T)$  in den 60er Jahren ermöglichte den Einsatz von Hidden Markov Modellen für die Datenanalyse. Der beste von ihnen trägt den Namen Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus (*forward-backward-algorithm*) und wird hier vorgestellt [29, 69, 72].

Die Idee beruht auf die Ausnutzung der Markov-Annahme: Der Übergang jedes Zustands wird ausschließlich durch seine Übergangswahrscheinlichkeiten bestimmt, dabei spielt es keine Rolle, in welchem Zustand das System in einem früheren Zeitschritt war. Man befindet sich also zu jedem Zeitschritt in der immer gleichen Situation, dass  $Q$  Zustände in  $Q$  Zustände übergehen können, es gibt also  $Q^2$  Möglichkeiten pro Zeitschritt oder  $TQ^2$  Pfade für den ganzen Datensatz. Der exponentiell wachsende Entscheidungsbaum ist also vielmehr ein Zustandsgitter mit gleich bleibender Höhe, siehe Abbildung 14.

Die Wahrscheinlichkeit  $\alpha$ , zum Zeitpunkt  $t+1$  im Zustand  $j$  zu sein, lässt sich rekursiv als Produkt der Übergangswahrscheinlichkeit  $K_{ij}$  vom vorherigen Zustand  $i$  mit der entsprechenden Emissionsfunktion  $f_j$  des jetzigen Zustands  $j$  ausdrücken. Es gibt  $Q$  verschiedene Vorgänger, also summiert man über diese  $Q$  verschiedenen Pfade und erhält die Vorwärts-Rekursiv-Gleichung (*forward recursive equation*) oder auch Vorwärts-Schätzung (*forward estimate*):

---

\* Quelle c't Newsticker, <http://www.heise.de/newsticker/meldung/109601> „Supercomputer-im-Wachstumsrausch“, Stand: 18.06.2008



$$\alpha_{t+1}(j) = \sum_{i=1}^Q \alpha_t(i) K_{ij} f_j(y_{t+1})$$

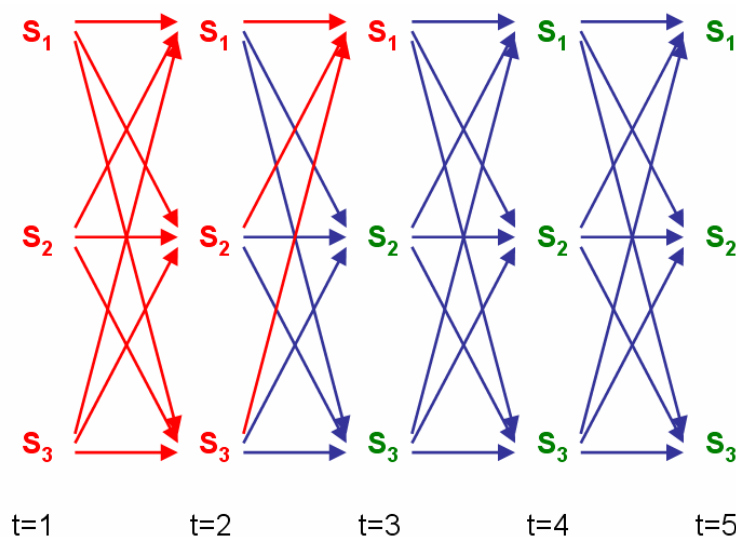
Diese Methode berücksichtigt lediglich alle Messpunkte bis zum Zeitpunkt  $t$  (Abbildung 14). Den Einfluss auf die späteren Messpunkte eines vorliegenden Datensatzes kann man jedoch auf die gleiche rekursive Weise berücksichtigen. Man braucht lediglich hinten anzufangen und sich rekursive nach vorne zu rechnen und erhält so die Rückwärts-Rekursiv-Gleichung (*backward recursive equation*) oder auch Rückwärts-Schätzung (*backward estimate*):

$$\beta_{t-1}(i) = \sum_{j=1}^Q K_{ij} f_j(y_t) \beta_t(j)$$

Schließlich ergibt sich die gesamte Wahrscheinlichkeit, dass sich das System zum Zeitpunkt  $t$  im Zustand  $i$  befindet als Produkt aus dem Vorwärts-Schätzer und dem Rückwärts-Schätzer:

$$w_t(i) = \frac{\alpha_t(i) \beta_t(i)}{\sum_{i=1}^Q \alpha_t(i) \beta_t(i)}$$

Der Nenner dient zur Normierung der Wahrscheinlichkeiten auf 1 und stellt



**Abbildung 14: Zustandsgitter für drei Zustände und 5 Zeitschritte.** Es ergeben sich somit  $3 \times 3$  Übergänge pro Zeitschritt. Dieses Gitter enthält zwar insgesamt  $3^5=243$  unterschiedliche Pfade, allerdings bestehen diese nur aus  $5 \cdot 3^2=45$  unterschiedlichen Elementen, hier durch Pfeile dargestellt. Die Darstellung der möglichen Pfade als Zustandsgitter macht die rekursive Berechnung der Wahrscheinlichkeit deutlich. Die relevanten Pfadabschnitte für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit des Systems, im Zeitschritt  $t=3$  im Zustand  $S_1$  zu sein, sind hier rot eingezeichnet.

gleichzeitig das Likelihood des gesamten Datensatzes dar. Es ist zeitunabhängig und braucht demnach nur einmal berechnet werden.

Die Schätzer der freien Parameter der Emissionsfunktionen aus dem letzten Kapitel sind nach wie vor gültig. Die neuen *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten bringen hierbei die Abhängigkeit zur Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix ein.

Ein Schätzer für die Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix  $\mathbf{K}$  selbst fehlt aber noch. Diese bekommt man nun sehr einfach nach Ausrechnen der Vorwärts- und Rückwärts-Schätzungen für die *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten. Einfaches Aufaddieren der Wahrscheinlichkeiten für einen Übergang von Zustand  $i$  zu Zustand  $j$  zum Zeitpunkt  $t$  sowie Normierung durch die aufsummierten Wahrscheinlichkeiten, im Zustand  $i$  gewesen zu sein, führen zum folgenden Bruch, der die geschätzte Übergangswahrscheinlichkeit eines Sprungs von Zustand  $i$  nach Zustand  $j$  beschreibt:

$$\hat{K}_{ij} = \frac{\sum_{t=1}^T \alpha_t(i) K_{ij} f_j(y_{t+1}) \beta_{t+1}(j)}{\sum_{t=1}^T \alpha_t(i) \beta_t(i)}$$

Mit dieser letzten Gleichung kann wieder ein Expectation-Maximization-Algorithmus (EM-Algorithmus) entworfen werden. Im Expectation-Schritt werden die *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten sowie das Loglikelihood berechnet, im Maximization-Schritt wird ein neuer Satz freier Parameter berechnet, welches stets das Loglikelihood vergrößert. Das mathematische Gerüst wurde von Baum *et al.* bereits in den späten 60er und frühen 70er Jahren gezeigt [66, 69, 72-74], wobei die Interpretation dieser Optimierungsmethode als EM-Algorithmus erst später erfolgte [68]. Es ist mit Hilfe dieses Verfahrens möglich, direkt aus den Daten den optimalsten Parametersatz eines gegebenen Modells zu bestimmen.

### 3.6 Viterbi-Pfad

Die große Stärke des Hidden Markov Ansatzes liegt nicht nur in der bloßen Bestimmung der freien Parameter. Vielmehr lässt sich zu jedem Zeitschritt eine Aussage ableiten, mit welcher Wahrscheinlichkeit das System einen bestimmten Zustand eingenommen hat. Es lässt sich also aus der Sequenz der Observablen auf die Sequenz der versteckten Zustände schließen.

Formal ist also derjenige durchgängige Weg durch das Zustandsgitter (siehe Abbildung 14) mit der höchsten Gesamtwahrscheinlichkeit gesucht. Das ist nicht

gleichbedeutend mit der Wahl des jeweiligen Zustands mit der bestpassendsten Emissionsfunktion. Es könnte sich ja im Extremfall um einen Zustand handeln, deren Übergangswahrscheinlichkeiten zu den anderen Zuständen Null wäre und das System dann in diesem Zustand hängen bleiben müsste. Vielmehr muss aus den  $Q^2$  Pfaden zwischen zwei Zeitschritten jeweils der Übergang gewählt werden, der nachhaltig den größten Beitrag zur Gesamtwahrscheinlichkeit liefert. Die nachfolgenden Wahrscheinlichkeiten müssen also wieder mit dem Gewinner ihrer Vorgänger multipliziert werden.

Die Markov-Annahme fordert lediglich, dass der Übergang von einem Zustand in den nächsten nicht von der Vergangenheit abhängt. Das Problem lässt sich also auf die Wahl des besten Vorgängers reduzieren. Es wird für jeden Zustand beginnend beim Datenpunkt  $t=2$  unter Berücksichtigung der aktuellen Emissionsfunktion  $f_j(y_t)$  und der Übergangswahrscheinlichkeit  $K_{ij}$  der beste Vorgänger  $i$  ermittelt und das Produkt der beiden gespeichert  $\delta_t(j)$ :

$$\delta_t(j) = f_j(y_t) \arg \max_{i=1..Q} (\delta_{t-1}(i) K_{ij}) \quad (24)$$

Dieser rekursive Ausdruck liefert am Ende des Datensatzes für jeden der  $Q$  letzten Zustände den wahrscheinlichsten Pfad durch den Datensatz. Schließlich wählt man den Pfad mit der höchsten finalen Wahrscheinlichkeit und erhält somit die bestmögliche Schätzung über die versteckte Zustandsfolge bei den gegebenen Daten und den geschätzten Parametern. Dieser Algorithmus wurde von Andrew James Viterbi [75, 76] vorgestellt. Der gesuchte Pfad durch das Zustandsgitter heißt deshalb auch *Viterbi-Pfad* (*Viterbi-Path*).

In den letzten Absätzen wurde das Standard-Verfahren der Hidden-Markov-Analyse zusammengefasst. Eine ausführliche Herleitung, die die einzelnen Schritte zudem anschaulich erklärt, findet sich in den Ref. [29, 77, 78].

### 3.7 Verallgemeinerung auf Semi-Markov-Prozesse

Bisher ist die Applikation von Hidden Markov Modellen naturgemäß auf Markov-Prozesse beschränkt. Proteine weisen zwar meist einige diskrete Konformationen auf, deren Reaktionszyklen auch durch Übergänge zwischen diesen Konformationen entstehen. Eine solche Konformation muss aber nicht notwendigerweise ein Markov-Prozess entsprechen. Zeigen gemessene Verweilzeithistogramme eine nicht monoexponentielle Verteilung, kann ein zugrunde liegender Markov-Prozess sogar

ausgeschlossen werden. Allerdings lassen sich durch Zusammenschluss mehrerer Markov-Zustände übergeordnete Zustände erzeugen, sogenannter Makrozustände (*macro states*). Ein Verweilzeithistogramm eines solchen Makrozustands zeigt je nach Zusammensetzung eine mehr oder weniger starke Abweichung von einer monoexponentiell abfallenden Kurve. In Kapitel 7 wurde dies für die Modellierung von Einzelmolekül-daten von  $F_1$ -ATPasen ausgenutzt.

### 3.8 Anwendung der Hidden-Markov-Modelle auf Messdaten

Ziel von Einzelmolekül-FRET-Experimenten an biologisch relevanten Systemen wie Zellmembranproteinen ist es in der Regel, bestimmte Konformationen dieser Proteine zu erkennen und deren zeitliche Dynamik zu entschlüsseln. Problematisch dabei ist jedoch, dass meist ein geringes Signal-Rausch-Verhältnis (i.d.R. unter 1:10) die objektive Erkennung der Konformationen erschwert und zudem die enorme Datenmenge eine manuelle Analyse sehr zeitaufwändig macht. Daher ist es naheliegend, eine statistische Analyse-methode zu verwenden, die in der Lage ist, die erforderlichen Aufgaben zu bewältigen. Im Prinzip sind Hidden-Markov-Modelle genau für solche Problemstellungen geeignet: die gesuchten Konformationen werden durch die Versteckten Zustände (*hidden states*), die Dynamik durch Übergangswahrscheinlichkeiten (*transition probabilities*) beschrieben. Das System muss hierzu auf die besondere Struktur der Messdaten adaptiert werden. Die hierfür nötigen Schritte werden in den folgenden zwei Abschnitten erläutert.

#### 3.8.1 Erweiterung der Hidden-Markov-Modelle auf Einzelmolekül-FRET-Daten

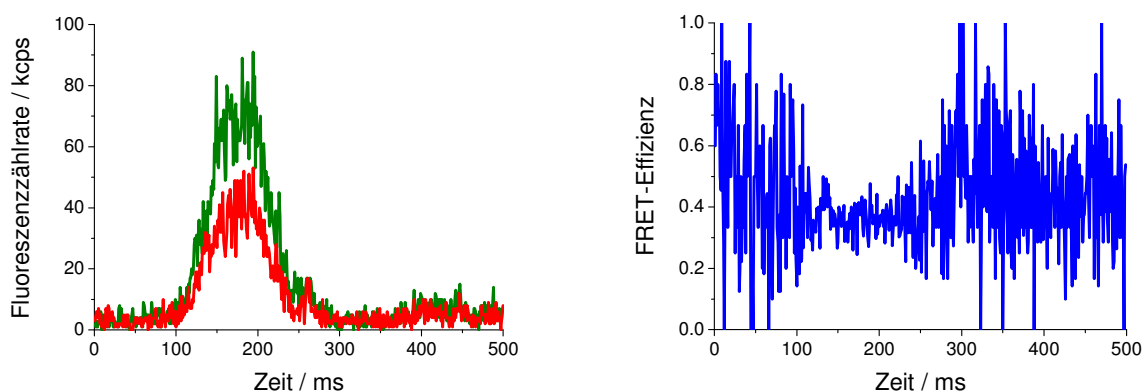
Ein Protein durchläuft während seines Reaktionszyklusses verschiedene Konformationen, deren Übergänge zwar stochastisch aber mit festgelegten Raten erfolgen. Markiert man ein Protein in geeigneter Weise mit zwei Fluorophoren, so resultieren verschiedene Konformationen in unterschiedliche Fluorophorabstände, die sich durch Einzelmolekül-FRET-Messungen zeitaufgelöst beobachten lassen.

Als messtechnisches Ausgangssignal für die Datenanalyse erhält man jedoch lediglich die Fluoreszenzzählraten beider Fluorophore inklusive Rauschen. Das einfachste und deshalb mit Abstand am häufigsten angewandte Verfahren ist, die gezählten Photonen in adäquate äquidistante Zeitabstände (Timebins) zusammenzufassen (typischerweise 1 ms) und die auf diese Weise erhaltenen

Zählraten gemäß Gleichung (9) (S. 29) für jeden Zeitschritt gesondert in FRET-Effizienzen umzurechnen (Abbildung 15). Daraus erhält man durch Umformung von Gleichung (4) (S. 27) für jeden Zeitschritt den absoluten Fluorophorabstand.

Bei einer Hidden-Markov-Analyse wird jeder Konformation ein Versteckter Zustand (*hidden state*) zugeordnet, der zum einen durch einen bestimmten Abstand, z.B. ausgedrückt durch eine FRET-Effizienz, aber auch durch eine bestimmte Varianz, also biochemische Stabilität der Konformation, charakterisiert wird – neben den zugehörigen Übergangswahrscheinlichkeiten. Zu dieser intrinsischen Varianz der FRET-Effizienz kommt bei den vorliegenden Daten eine zeitabhängige Varianz hinzu, die alleine durch die limitierte Anzahl an Fluoreszenzphotonen verursacht wird (Schrotrauschen) und mit der Konformation des Biomoleküls nichts mehr zu tun hat.

Das im Folgenden vorgestellte Verfahren zeigt, wie man die auftretenden messtechnischen Größen abschätzen kann und wie dieses Wissen dem bestehenden Formalismus der Hidden Markov Analyse hinzugefügt werden kann. Dabei wird der geringere Informationsgehalt von Datenbereichen mit verminderter Zählrate bei der Schätzung der gesuchten Parameter durch die konsequente statistische Behandlung in quantitativer Weise richtig berücksichtigt. Dadurch wird es erst möglich, zu den Mittelwerten die zugehörigen intrinsischen Varianzen der versteckten Zustände zu bestimmen.



**Abbildung 15:** links: simulierter Verlauf einer statischen Einzelmolekül-FRET-Spur mit festem Interfluorophorabstand, Fluoreszenzintensität des FRET-Donors (grün) und FRET-Akzeptors (rot); rechts: Daraus berechnete FRET-Effizienz-Spur (blau) mit konstantem Mittelwert von 0,35, deutlich sind die Verbreiterungen bei verringerten Zählraten zu erkennen (bis ~100 ms und ab ~300 ms).

### 3.8.2 Neue Schätzer für die Hidden Markov Modelle

Für einen festen Zustand bei konstanter Gesamtintensität lassen sich die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der beiden Fluoreszenzkanäle sehr gut durch Poisson-Verteilungen darstellen. Die Poissonverteilung ist eine eindimensionale Verteilungsfunktion, d.h. für die Varianz gibt es keinen zweiten unabhängigen Parameter, vielmehr ist die Varianz genau gleich dem Erwartungswert. Hat man also einen gegebenen Zustand mit einer konstanten mittleren Zählrate (und einer konstanten FRET-Effizienz), kennt man automatisch auch deren Varianz. Rauschbeiträge aus der Messapparatur, aber auch zusätzliches unkorreliertes Hintergrundrauschen sowie spektrales Übersprechen der Detektionskanäle (*crosstalk*) führen zu einer systematischen Erhöhung dieser Varianz. Bei der hier verwendeten EMCCD-Kamera [iXon DV887 ECS-BV, Andor] liefern alle kamerabedingten Rauschbeiträge eine Erhöhung der Varianz des Schrotrauschens um den Faktor 2 [79, 80], das Ausleserauschen steuert dazu den größten Beitrag bei. Die resultierende Verteilungsfunktion der Intensitätskanäle ist also eine verbreiterte Poissonverteilung. Bei den hier vorliegenden hohen Zählraten geht die zugrunde liegende Poissonverteilung in eine Normalverteilung über, sodass sich schließlich für die Verteilungsfunktion der beiden Intensitätskanäle  $I_k$  eine einparametrische Normalverteilung verwenden lässt, deren Varianz  $\sigma_k^2$  über einen festen Faktor  $\beta_k$  mit dem Erwartungswert  $\mu_{I_k}$  zusammenhängt:

$$f_{I_k}(I_k | \mu_{I_k}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_k^2}} \exp\left(-\frac{(I_k - \mu_{I_k})^2}{2\sigma_k^2}\right) \text{ mit } \sigma_k^2 = \beta_k \mu_{I_k} \quad (25)$$

Bei zwei Detektorkanälen hat man also zwei unabhängige Zufallsvariablen, deren Parameter der zugrunde liegenden Verteilungsfunktionen jedoch von einander abhängen:  $I_{Donor}$  erhöht sich bei höherer Anregungsleistung und verringert sich bei kleinerem Abstand der Fluoreszenzmarker,  $I_{Akzeptor}$  erhöht sich bei höherer Anregungsleistung und erhöht sich ebenfalls bei einem verringerten Fluorophor-Abstand.

Aus der absoluten Zählrate eines Kanals alleine kann also überhaupt keine Aussage über den Fluorophor-Abstand gemacht werden. Bildet man jedoch die beiden Zufallsvariablen durch eine Variablentransformation auf die neuen Zufallsvariablen FRET-Effizienz  $E$  und Summenintensität  $I$  mit

$$E = \frac{I_{Donor}}{I_{Donor} + I_{Akzeptor}} \quad (26)$$

$$I = I_{Donor} + I_{Akzeptor}$$

ab, so bekommt man über die FRET-Effizienz ein Maß für den gesuchten Fluorophor-Abstand und durch die Form der resultierenden Verteilungsfunktion auch deren Varianz. Nimmt man für die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für  $I_{Donor}$  und  $I_{Akzeptor}$  jeweils eine Normalverteilung an, so erhält man für die Verteilungsfunktion für  $E$  näherungsweise ebenfalls eine Normalverteilung, siehe Anhang A, die Varianz erhält die folgende Gestalt:

$$\sigma_E^2 = \frac{\beta \mu_{Donor} \mu_{Akzeptor}}{(\mu_{Donor} + \mu_{Akzeptor})^3} \quad (27)$$

Der Faktor  $\beta$  ist für Kameradaten für beide Kanäle gleich und hat den Wert 2.

Für die Summenintensität  $I$  erhält man sogar exakt eine Normalverteilung (Anhang A) mit der intuitiven Varianz:

$$\sigma_I^2 = \beta (\mu_{Donor} + \mu_{Akzeptor}) \quad (28)$$

Die zeitabhängige Varianz  $\sigma_E^2$  hat zunächst nichts mit der Varianz des Zustands selbst zu tun, sondern beschreibt vielmehr eine Verbreiterung der ansonsten als scharf angesehenen Messpunkte selbst.

In einem klassischen Hidden Markov Modell wird jedem Datenpunkt  $x_i$  gemäß der Emissionsfunktion  $f_q(x_i | \mu_q, \sigma_q^2)$  des erwarteten Zustands  $q$  eine Wahrscheinlichkeit zugeordnet. Sind die Datenpunkte selbst jedoch nicht mehr scharf wie im vorliegenden Fall, so müssen für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit die ehemals scharfen Datenpunkte  $x_t$  durch Dichtefunktionen  $f_t(x | x_t, \sigma_{x_t}^2)$  ersetzt werden. Das hat als Konsequenz, dass die Datenpunkte nicht mehr einfach in die Emissionsfunktion eingesetzt werden können, sondern dass über beide Dichtefunktionen integriert werden muss:

$$\tilde{f}_q(x_t | \mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2) = \int_{-\infty}^{\infty} f_q(x | \mu_q, \sigma_q^2) f_t(x | x_t, \sigma_{x_t}^2) dx$$

Dieses bestimmte Integral lässt sich jedoch in eine Normalverteilung überführen (siehe Abbildung 16, siehe auch Anhang B). Das Schrotrauschen der Datenpunkte überträgt sich damit direkt auf die Varianz des Markov-Zustands. Man erhält somit

eine modifizierte Emissionsfunktion, in die die Datenpunkte inklusive ihres zeitabhängigen Schrotrauschens wieder direkt eingesetzt werden können. Die Art der Berechnung *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten und die Berechnung des Loglikelihoods ändern sich dadurch also nicht:

$$\tilde{f}_q(x_t | \mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2)}} \exp\left(-\frac{(x_t - \mu_q)^2}{2(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2)}\right)$$

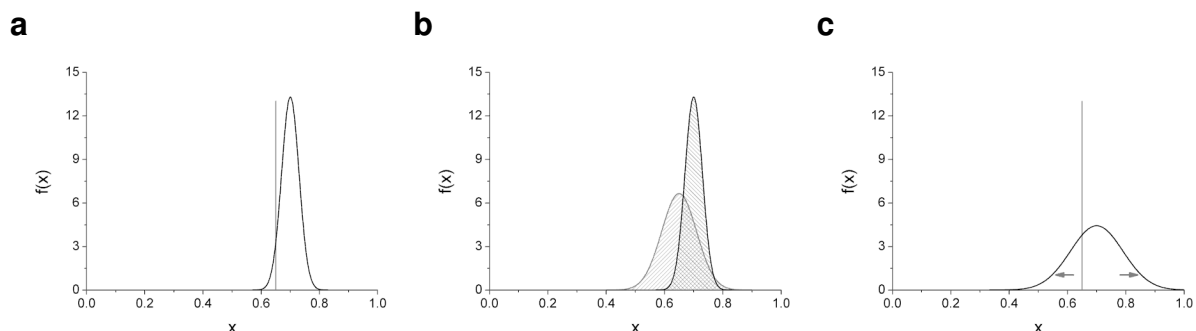
Allerdings verändert die Einführung eines zeitabhängigen Parameters die Schätzer für  $\mu_q$  und  $\sigma_q^2$ . Diese müssen neu hergeleitet werden, was formal genau so durchzuführen ist wie im klassischen Fall (siehe Anhang C): Die Ableitungen der nunmehr modifizierten Loglikelihoodfunktion  $L$  nach den gesuchten Parametern werden jeweils zu Null gesetzt, dann wird nach den jeweils gesuchten Parametern aufgelöst (siehe Anhang D).

Auf diese Weise ergibt sich der Schätzer des Mittelwertes:

$$\hat{\mu}_q = \frac{\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} x_t}{\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2}}{\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt}}{\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2}} \quad (29)$$

Für den Schätzer der Varianz lässt sich die folgende implizite Form nicht mehr nach  $\sigma_q^2$  auflösen:

$$\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} ((x_t - \mu_q)^2 - (\hat{\sigma}_q^2 + \sigma_{x_t}^2))}{(\hat{\sigma}_q^2 + \sigma_{x_t}^2)^2} = 0 \quad (30)$$



**Abbildung 16: Verbreiterung der Emissionsfunktion. (a) klassisches HMM: Likelihood für einen Datenpunkt (grauer senkrechter Strich) erhält man durch Einsetzen in die Emissionsfunktion (schwarze Normalverteilung). (b) ein verbreiteter Datenpunkt kann nicht mehr eingesetzt werden, sondern muss als Produkt mit der Emissionsfunktion integriert werden. (c) Dies lässt sich analytisch umformen in eine zeitabhängig verbreiterte Emissionsfunktion.**



An diesem Punkt muss im Expectation-Maximization-Formalismus eine numerische Nullstellensuche (in jeder Iteration) durchgeführt werden. Es stehen mittlerweile sehr effiziente Nullstellenfinder zur Verfügung, die bedeutend schneller konvertieren als z.B. das klassische Gauß-Newton-Verfahren. Von der Funktion ‚fzero‘ von *MATLAB* wurde an dieser Stelle Gebrauch gemacht, sie ist eine Kombination aus der Bisection-, Sekanten- und der inversen quadratischen Interpolationsmethode [81, 82].

Die beiden neuen Schätzer (29) und (30) unterscheiden sich durch Gewichtungsfaktoren von den klassischen Maximum-Likelihood-Schätzern (21) und (22) für multivariate Gaussverteilungen. Zeitschritte mit hoher Summenzählrate gehen demnach stärker in die Schätzung ein als dunklere Bereiche. Es handelt sich also um gewichtete Schätzer.

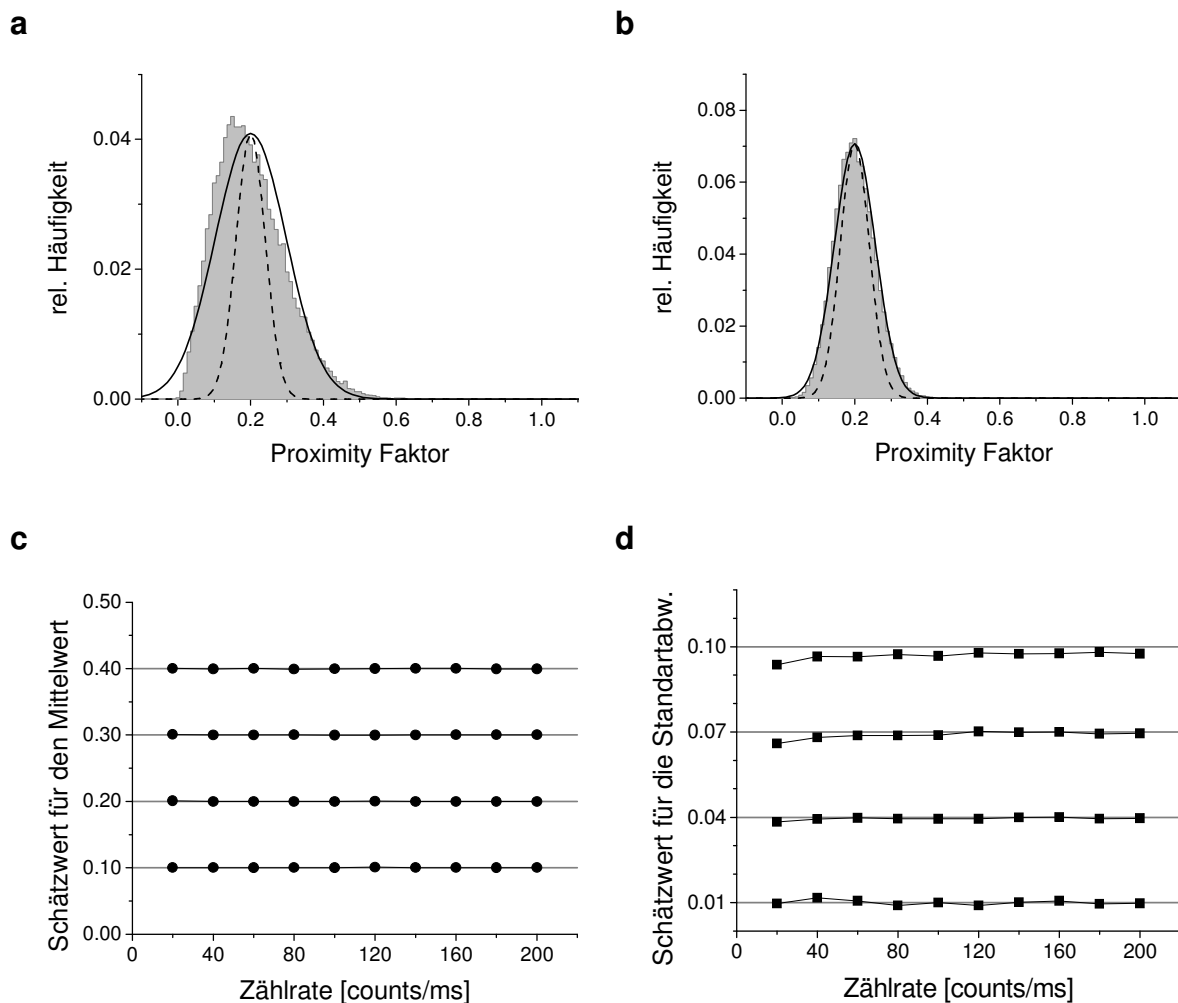
Die folgende kleine Monte-Carlo-Simulation eines einzelnen Zustands demonstriert die Genauigkeit der neuen Schätzer. Zu Beginn werden 50 000 FRET-Effizienzen  $\mu_{E,t}$  durch normalverteilte Zufallswerte mit den gegebenen Parametern  $\mu_E = 0.2$  und  $\sigma_E^2 = 0.001$  eines einzelnen Zustands erzeugt. Anschließend wird bei gegebener konstanter Summenzählrate  $\mu_I$  jeder einzelne FRET-Wert gemäß der inversen Variablentransformation von (26) in zwei neue Werte umgerechnet:

$$\begin{aligned}\mu_{D,t} &= (1 - \mu_{E,t})\mu_I \\ \mu_{A,t} &= \mu_{E,t}\mu_I\end{aligned}$$

Aus diesen 50 000 Wertepaaren wird jeweils ein Paar von Poisson-Zufallszahlen gezogen:  $I_{D,t}$  und  $I_{A,t}$ . Auf diese Weise erhält der simulierte Zustand zu seiner intrinsischen Breite eine zusätzliche Verbreiterung durch das Schrotrauschen. Dieser Vorgang wird für unterschiedliche Summenzählraten (zwischen 20 und 200 counts/ms) wiederholt.

Schließlich werden diese 50 000 Wertepaare wie Messdaten analysiert, es wird also die Koordinatentransformation auf die FRET-Effizienz  $E_t$  durchgeführt:  $E_t = I_{A,t} / (I_{D,t} + I_{A,t})$  mit zugehöriger Varianz  $\sigma_t^2 = \beta I_{D,t} I_{A,t} / (I_{D,t} + I_{A,t})^3$ . Abhängig von der vorgegebenen Summenintensität werden mit Hilfe der Schätzer schließlich die zugrunde liegenden Parameter  $\mu_k$  und  $\sigma_k^2$  bestimmt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 17.

Eine solche Monte-Carlo-Simulation ist in der Lage, systematische Abweichungen im betrachteten Wertebereich aufzudecken. Abbildung 17c zeigt die hohe Zuverlässigkeit der Mittelwertschätzung. Selbst bei kritischen Mittelwerten  $< 0.1$  (oder wg. Symmetrie  $> 0.9$ ) ergeben sich keine Abweichungen, selbst bei sehr geringen Zählraten nicht. Der Schätzer für den Mittelwert ist *unverfälscht* (unbiased). Die Schätzung der Varianz (hier dargestellt als Standardabweichung) zeigt kleine systematische Abweichungen bei hohen Varianzen und kleinen Intensitäten in



**Abbildung 17:** (a,b) gestrichelte Linie: zu Grunde liegender Zustand mit Mittelwert 0.2 und Standardabweichung von 0.04, schwarze Linie: Verbreiterung der Verteilung durch eine limitierte Summenzählrate (a = 20 counts/ms, b = 100 counts/ms), grau: Histogramm über 50000 simulierte Datenpunkte. (c) Die Schätzung der Mittelwerte 0.1, 0.2, 0.3 und 0.4 bei einer erhöhten Standardabweichung von 0.05 funktioniert über einen weiten Wertebereich sehr zuverlässig, selbst wenn die zugrunde liegende Normalverteilung über die Ränder 0 bzw. 1 hinausgeht und die Unsymmetrie der Daten durch die Schätzer nicht berücksichtigt wird. (d) Die Schätzungen der Standardabweichungen 0.01, 0.04, 0.07 und 0.10 bei einem Mittelwert von 0.2 zeigt leichte Abweichungen bei kleinen Zählraten und hohen Standardabweichungen (siehe a).

Richtung kleinerer Werte. Die tatsächliche Breite der Verteilung wird also bei sehr geringen Zählraten ( $<40$  counts/ms) und sehr breiten Verteilungen ( $\sigma > 0.07$ ) unterschätzt. Die Kosten der Näherung treten also nur bei der Varianz auf und dort auch nur bei extremen Werten.

Die erste große Näherung in diesem mathematischen Gerüst ist die Annahme einer Normalverteilung für die FRET-Effizienz. Diese Verteilung hat die FRET-Effizienz als Mittelwert, die sich bekanntermaßen durch die beiden gemessenen Intensitäten ausdrücken lässt. Doch wie groß die Varianz dieser Größe ist, kann nicht mehr einfach ermittelt werden. Eine klassische Fehlerfortpflanzungsrechnung führt zu systematisch falschen Werten [83]. Kann man jedoch auf die analytische Form der Verteilungsfunktion schließen, erhält man automatisch auch einen Ausdruck für die Varianz.

Analytisch ergibt sich durch Ausführen der Variablentransformation jedoch erst eine Normalverteilung, wenn eine konstante Summenintensität angenommen wird (Anhang A). Die relativen Intensitätsschwankungen sind jedoch durch den zugrunde liegenden Poissonprozess enorm (Varianz=Mittelwert) und werden durch die Verstärkung der EMCCD-Kamera nochmals verdoppelt. Mit steigender Summenzählrate sinkt jedoch diese relative Schwankung, bei 100 counts/ms beispielsweise hat man nur noch eine Standardabweichung von  $\sqrt{2 \cdot 100} = 14$  counts/ms. Die gemachte Näherung einer konstanten Summenzählrate wird also mit höherer Summenzählrate immer besser und erklärt somit das Verschwinden der systematischen Abweichung bei steigender Summenintensität in Abbildung 17.

Ein Versuch, die Normalverteilung zu umgehen, muss bei Poisson-Verteilten Intensitätsverteilungen starten. Für die FRET-Effizienz ergibt sich die analytisch darstellbare Binomial-Verteilung [83]. Doch die Verbreiterung einer intrinsischen Binomial-Verteilung mit einer Zählraten-limitierten Binomial-Verteilung kann nicht wieder in eine Binomial-Verteilung überführt werden, sondern führt auf eine Funktion aus Beta- und Gamma-Verteilungen, die nicht mehr differenzierbar ist. Dadurch lassen sich keine geschlossenen Schätzfunktionen mehr ableiten, spätestens hier wird also eine Gauß-Näherung nötig und man landet auf den bereits eingeschlagenen Pfad.

### 3.9 Modellauswahl-Kriterien

Jede Hidden Markov Analyse setzt immer die Vorgabe des Modells voraus. Auch wenn jeder eingeführte Parameterwert optimiert werden kann, so kann die Anzahl der Parameter selbst und damit die Anzahl der Zustände mit Hilfe der HMMs nicht aus den Daten gewonnen werden. Am Ende stellt sich somit immer die Frage nach dem besten Modell. Die Likelihoodwerte sind für einen Modellvergleich ungeeignet, weil im Allgemeinen Modelle mit mehr Parametern höhere Likelihoodwerte erzielen. Aus Kurvenanpassungen ist dieses Problem bekannt: Die Abweichung des Modells zu den Messdaten sinkt im Allgemeinen mit steigender Modellkomplexität. Dem steht jedoch der Erkenntnisgewinn diametral gegenüber. Die Wahl des besten Modells bleibt somit dem Experimentator überlassen.

Um dennoch die Anzahl der Zustände in einer HMM-Analyse nach objektiven Kriterien zu bestimmen, muss die Abnahme des Erkenntnisgewinns mit steigender Modellkomplexität berücksichtigt werden. Die Suche nach einem objektiven Modellvergleich führte 1973 durch Akaike zur Einführung des empirischen Modellselektionskriteriums AIC (Akaikes Information Criterion). Später gelang es durch Schwarz, dieses Modellselektionskriterium auf informationstheoretische Grundsätze zurückzuführen [6, 22, 84]. Ein kurzer formeller Abriss dieses Kriteriums wird hier anhand von [22] (Kapitel 11.2.2 Bayes factors) und [85] vorgestellt:

Ausgehend von zwei Modellen  $M_1$  und  $M_2$  möchte man anhand der gegebenen Daten  $\mathbf{y}$  entscheiden, welche der beiden Modelle die Daten besser beschreiben. Man ist also an den *a posteriori* Wahrscheinlichkeiten für das Modell  $M_1$   $\Pr(M_1 | \mathbf{y})$  im Vergleich zum Modell  $M_2$   $\Pr(M_2 | \mathbf{y})$  interessiert. Mit Hilfe des Satz von Bayes, Gleichung (1) S. 19, lassen sich diese *a posteriori* Wahrscheinlichkeiten durch die *a priori* Wahrscheinlichkeiten ausdrücken:

$$\Pr(M_i | \mathbf{y}) = \frac{\Pr(\mathbf{y} | M_i) \Pr(M_i)}{\sum_i \Pr(\mathbf{y} | M_i) \Pr(M_i)} \quad (31)$$

Für zwei zu vergleichende Modelle ergibt sich folgende Gleichung:

$$\underbrace{\frac{\Pr(M_1 | \mathbf{y})}{\Pr(M_2 | \mathbf{y})}}_{a \text{ posteriori Odds}} = \underbrace{\frac{\Pr(\mathbf{y} | M_1)}{\Pr(\mathbf{y} | M_2)}}_{\text{Bayes Faktor}} \times \underbrace{\frac{\Pr(M_1)}{\Pr(M_2)}}_{a \text{ priori Odds}} \quad (32)$$

Der Quotient aus Wahrscheinlichkeit und Gegenwahrscheinlichkeit trägt in der deutschen und englischen Literatur den Namen *Odds*. Somit wird der Faktor links vom Gleichheitszeichen als *a posteriori Odds* bezeichnet, der hintere Faktor rechts vom Gleichheitszeichen heißt *a priori Odds* und der verbleibende Faktor ist der sogenannte Bayes-Faktor. Ein Modellvergleich läuft also auf eine Berechnung des Bayes-Faktors hinaus. Die Dichte  $\Pr(\mathbf{y} | M_1)$  ist die marginalisierte Wahrscheinlichkeit der Daten, da sie sich aus dem Integral über den gesamten Parameterraum von  $M_1$  ausdrücken lässt:

$$\Pr(\mathbf{y} | M_1) = \int f(\mathbf{y}, \boldsymbol{\theta}_{M_1}) \pi(\boldsymbol{\theta}_{M_1}) d\boldsymbol{\theta}_{M_1} \quad (33)$$

$f$  ist wieder die Likelihoodfunktion und  $\pi$  bezeichnet wieder die *a priori* Wahrscheinlichkeit. Der Ausdruck kann auch als Voraussagewahrscheinlichkeit aufgefasst werden, dass sich bei einem gegebenen Modell  $M_1$  mit dem Parametersatz  $\boldsymbol{\theta}_{M_1}$  genau die Daten  $\mathbf{y}$  ergeben.

Die numerische Berechnung des Integrals ist in der Praxis nicht durchführbar, da der Parameterraum bereits bei moderaten Hidden Markov Modellen immens groß wird. Eine sehr gute Näherungslösung lässt sich jedoch mit Hilfe des Laplace-Ansatzes finden:

$$I_n = \int_{-\infty}^{\infty} \exp(-nh(\mathbf{u})) d\mathbf{u} \approx \left( \frac{2\pi}{n} \right)^{\frac{p}{2}} \left( \det \left( \frac{\partial^2 h}{\partial \mathbf{u} \partial \mathbf{u}'} \right)_{\hat{\mathbf{u}}} \right)^{-\frac{1}{2}} \exp(-nh(\hat{\mathbf{u}})) \quad (34)$$

$p$  bezeichnet die Anzahl der Dimensionen des Parametervektors  $\mathbf{u}$ .

Die Laplace-Näherung ist gültig, wenn die zu integrierende Funktion sehr stark um das Maximum  $\hat{\mathbf{u}}$  herum konzentriert ist und außerhalb davon kaum von Null verschieden ist [85]. Genau das ist bei Likelihoodfunktionen der Fall, denn wenn nur ein Parameterwert vom Optimum weit entfernt ist, sinkt der Funktionswert der gesamten Likelihoodfunktion auf einen Wert sehr nahe an Null.

Für die Hilfsfunktion  $h(\mathbf{u})$  setzen wir den Logarithmus des Integranden von Gleichung (33) ein:

$$h(\boldsymbol{\theta}) = -\log f(\mathbf{y} | \boldsymbol{\theta}) - \log(\pi(\boldsymbol{\theta})) \quad (35)$$

Mit Hilfe der Laplace-Näherung (34) bekommt man eine integralfreie Form für die gesuchte Dichtefunktion:

$$\Pr(\mathbf{y} | M) = I_1 = \left( \frac{2\pi}{1} \right)^{\frac{p}{2}} \det \left( \frac{\partial^2 \log f(\mathbf{y} | \hat{\boldsymbol{\theta}})}{\partial \boldsymbol{\theta} \partial \boldsymbol{\theta}'} + \frac{\partial^2 \log \pi(\hat{\boldsymbol{\theta}})}{\partial \boldsymbol{\theta} \partial \boldsymbol{\theta}'} \right)^{-\frac{1}{2}} f(\mathbf{y} | \hat{\boldsymbol{\theta}}) \pi(\hat{\boldsymbol{\theta}}) \quad (36)$$

$\hat{\theta}$  ist die beste *a posteriori* Schätzung für  $\theta$ , sie maximiert die Loglikelihood-Funktion.

Durch den Übergang zum Logarithmus zerfällt das Produkt in Summanden:

$$\log \Pr(\mathbf{y} | M) = \underbrace{\frac{p}{2} \log 2\pi}_{o(1)} - \underbrace{\frac{1}{2} \log \det \left( \frac{\partial^2 \log f(\mathbf{y} | \hat{\theta})}{\partial \theta \partial \theta'} + \frac{\partial^2 \log \pi(\hat{\theta})}{\partial \theta \partial \theta'} \right)}_{o(p)} + \underbrace{\log f(\mathbf{y} | \hat{\theta})}_{o(p)} + \underbrace{\log \pi(\hat{\theta})}_{o(1)}$$

Manche von ihnen haben eine Ordnung von 1 und spielen bei festem  $p$  keine Rolle. Der zweite Term ist die Hessematrix der Likelihood-Funktion  $f(\mathbf{y} | \theta)$  and der Stelle  $\hat{\theta}$ . Unter der Annahme, dass die Messdaten  $\mathbf{y}$  eine Folge von *unabhängig identisch verteilten* Zufallsvariablen darstellen, (*i.i.d.*, engl.: *independent and identically distributed*), lässt sich die Hessematrix näherungsweise durch den Term  $p \log N$  ersetzen.  $N$  bezeichnet hier die Anzahl der Datenpunkte, aus denen  $\mathbf{y}$  besteht. Mit diesen Näherungen gelangt man schließlich zum bekannten Modellselektionskriterium Bayes Information Criterion, BIC:

$$\text{BIC}(p) = -2 \log \Pr(\mathbf{y} | M_p) = \underbrace{-2 \log f(\mathbf{y} | \hat{\theta}_p)}_{\text{Likelihood}} + \underbrace{p \log N}_{\text{Strafterm}} \quad (37)$$

Modelle mit zusätzlichen Zuständen werden sich durch ihre zusätzlichen Parameter besser an die Daten anpassen können, was im Allgemeinen zu einem höheren Likelihood-Wert führt. Gemäß der Definition führt dies zu einem Sinken des BICs mit steigender Modellkomplexität. Der zweite Summand wirkt dem Absinken des ersten Summanden entgegen und zwar umso mehr, je mehr Zustände das komplexere Modell hat. Mit steigender Modellkomplexität erreicht das BIC beim best-passendsten Modell auf diese Weise ein Minimum und steigt anschließend wieder an. Abbildung 18 zeigt ein Beispiel aus der Literatur, die die Leistungsfähigkeit der Methode unter den typischen Einzelmolekülbedingungen mittels Monte-Carlo-Simulationen untersucht hat. Die Definition des dort verwendeten BICs unterscheidet sich im Vorzeichen, weshalb sich das „richtige“ Modell durch ein Maximum bemerkbar macht.

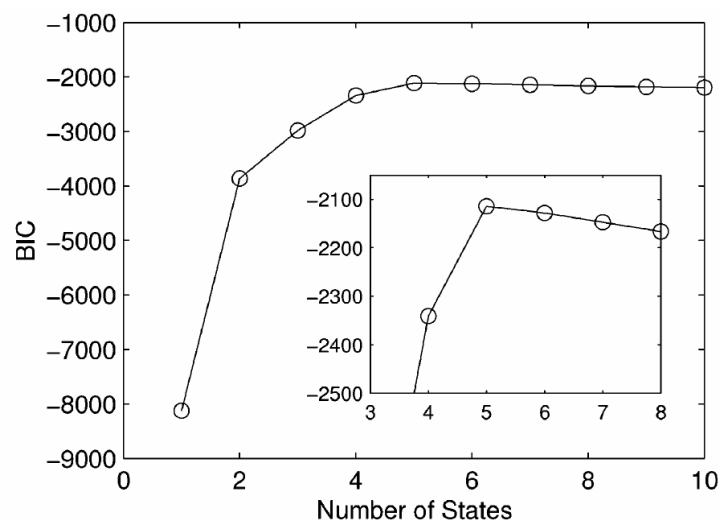
Die Kurvenform mit dem schwach ausgeprägten Extremwert ist typisch für das BIC. Für perfekte simulierte Daten ist die Extremstelle klar zu ermitteln, selbst wenn die Simulation alle typischen messtechnischen Effekte wie z.B. Hintergrundrauschen mitberücksichtigt. Beispiele für den erfolgreichen Einsatz des BICs für simulierte Einzelmolekül-daten finden sich in [10, 14].

Problematisch ist die Situation hingegen bei Daten aus echten Einzelmolekül-experimenten. Hier lässt sich nie ganz ausschließen, dass ein Teil der aufgenommenen Datenmenge von unerwünschten Fremdteilchen stammt. Dazu gehören auch erfolgreich markierte aber nicht-funktionale Enzyme oder Enzymreste. Da sich solche Störsignale in der Praxis kaum vom gewünschten Signal auseinander halten lassen, führt eine automatische Analyse z.B. mit Hidden Markov Modellen tendenziell dazu, dass komplexere Modelle mit mehr Zuständen favorisiert werden. Schließlich trägt das Verhalten dieser defekten Proteine auch zur Dynamik in den zu analysierenden Einzelmolekül-daten bei. Das nur leicht ausgeprägte Maximum verschwindet auf diese Weise ganz. Dementsprechend gibt es bisher auch keine einzige Publikation, die das *BIC* aus echten Einzelmolekül-daten zeigt. Vielmehr wurden für die Modellselektion alternative Wege gegangen [7]. Die Entwicklung robusterer und zugleich universeller Methoden, die auf Erweiterungen von BICs zielen und deshalb den Bayesschen Charakter beibehalten, ist bis heute noch nicht abgeschlossen. So wurde erst 2001 von R. A. Irizarry ein gewichtetes BIC (WBIC, weighted BIC) vorgeschlagen [86]:

$$\text{WBIC}(p) = -2 \log l_0(\hat{\boldsymbol{\beta}}_p) + \log \det \left( \frac{\partial^2}{\partial \boldsymbol{\beta} \partial \boldsymbol{\beta}'} l_0(\hat{\boldsymbol{\beta}}_p) \right) \quad (38)$$

$l_0$  inkorporiert eine gewichtete Likelihood-Funktion,  $\boldsymbol{\beta}$  ist ein Satz Hilfsparameter, der über eine Linkfunktion mit den Originalparametern  $\boldsymbol{\theta}$  verbunden ist. Der zweite Summand ist die Hessematrix der gewichteten Likelihood-Funktion.

Da die in dieser Arbeit durchgeführten Änderungen an den Hidden Markov



**Abbildung 18: BIC aus [6]. Grundlage waren simulierte Einzelphotonen-Spuren, die fünf Zustände mit unterscheidbarer mittlerer Helligkeit enthielten. Bei diesen simulierten Daten zeigt das BIC beim „richtigen“ Modell den höchsten Wert an.**

Schätzern ebenfalls zu gewichteten Likelihood-Funktionen führten, war es naheliegend, auch das WBIC als Modellselektionskriterium zu verwenden. Allerdings handelt es sich durch die Erweiterungen bereits beim klassischen BIC um eine gewichtete Likelihood-Funktion. Der Unterschied zum WBIC besteht nur noch in der den letzten Term bildenden Hesse-Matrix. Deren numerische Berechnung erforderte bei den Größen der in dieser Arbeit vorliegenden Datensätze enorm viel Rechenzeit und führte am Ende zu keinem sichtbaren Unterschied zum BIC.

Der Grund für das schlechte Funktionieren des BICs in den folgenden Anwendungen könnte in einer leichten Verschiebung der globalen Parameter über die verschiedenen Moleküle liegen. Auch eine zu große Kontamination der Probe durch inaktives Protein oder Fremdteilchen wird dazu führen, dass sich kein Minimum in der BIC-Kurve ausbildet.



## 4 Das TATA-Box Binde-Protein (TBP) und der negative Cofaktor 2 (NC2)

Die Funktionsfähigkeit einer Zelle beruht auf einer Vielzahl unterschiedlichster Proteine, die neben strukturellen Aufgaben vor allem katalytische Funktionen bereitstellen. Die Zelle synthetisiert ihre Proteine anhand Protein-codierender Basensequenzen, die sogenannten Gene. Die Herstellung eines Proteins, die Proteinsynthese, erfolgt im Wesentlichen in zwei Schritten: Auslesen des entsprechenden Gens auf der Zellkern-DNA (Transkription) in eine mobile Botschafter-Ribonukleinsäure (messenger-RNA, mRNA) und Übersetzen (Translation) in die spätere Aminosäuresequenz des Proteins (siehe Abbildung 19).

Die Transkription des Gens beginnt mit der „Suche“ der TATA-Box, eine acht Basenpaare lange Startsequenz, die in allen eukaryotischen Zellen stets mit der Basenpaarabfolge T-A-T-A beginnt. Das TATA-Box-Bindeprotein (TBP) bindet hierzu spezifisch an die TATA-Sequenz und markiert damit den Beginn (Promotor) des zu transkribierenden DNA-Abschnitts. Das TBP bildet zusammen mit weiteren Proteinen den Transkriptionsfaktor (TF) einen enzymalen Komplex, der nun die eigentliche Transkription zur Erzeugung der mRNA startet.

Die Translation in die Aminosäurekette des Proteins erfolgt im Cytoplasma der Zelle durch Ribosomen. Schließlich faltet die entstandene Peptidkette zum funktionalen Protein.

Um auf veränderte Umgebungsbedingungen reagieren zu können, sind Regulationsmechanismen zur Steuerung der Proteinbiosynthese unverzichtbar. Dabei ist es sinnvoll, möglichst früh in den Prozess eingreifen zu können, um so die Zahl unnötiger Zwischenschritte zu minimieren und dadurch Energie und Ressourcen zu sparen. Die Regulierung erfolgt daher fast ausschließlich über Cofaktoren, die auf

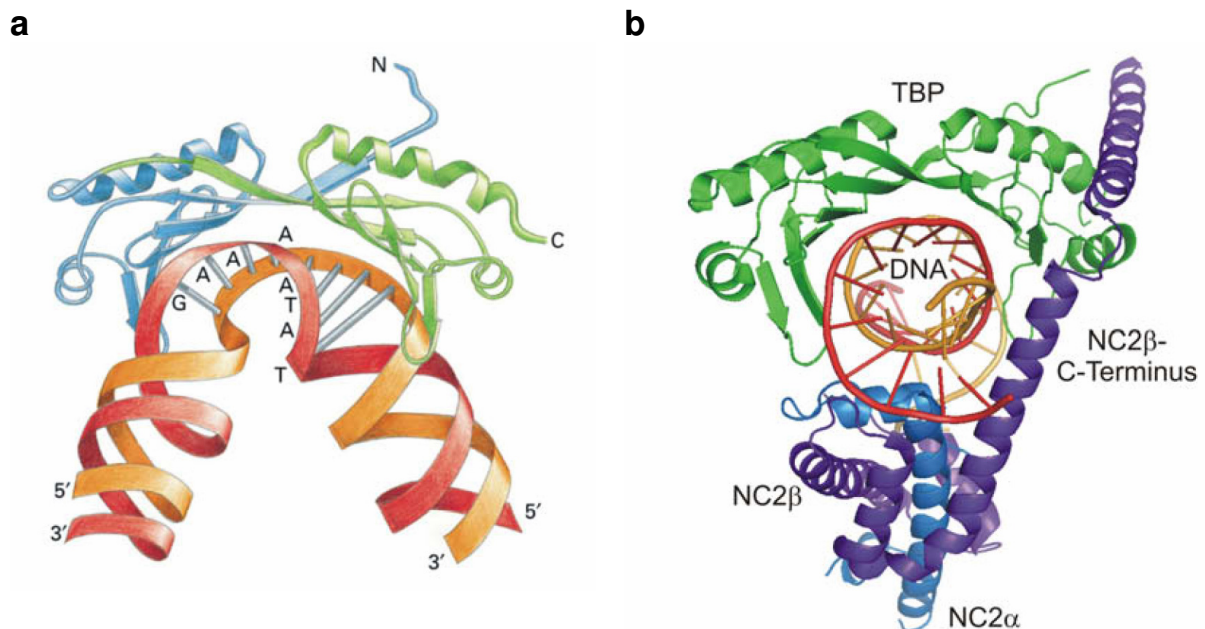


**Abbildung 19: Weg der Proteinexpression in eukaryotischen Zellen. Der proteincodierende Abschnitt in der Zellkern-DNA muss auffindig gemacht werden und anschließend in Form einer Messenger-RNA (mRNA) kopiert werden. Dieser somit mobile Ausschnitt aus der DNA-Sequenz kann schließlich im Cytoplasma der Zelle in ein Protein umgesetzt werden.**

verschiedenste Weisen die RNA-Syntheserate beeinflussen, also bereits auf den Transkriptionsschritt wirken [87].

Einer der am besten untersuchten negativ regulierenden Cofaktoren ist NC2 [90, 91]. Er hemmt die Genexpression durch direkte Bindung an den TBP-DNA-Komplex [89]. Anders als erwartet bildet der TBP-DNA-NC2-Komplex keine statische Konfiguration aus, sondern führt zu einer Delokalisierung des TBP über der TATA-Box [92]. Es ergibt sich so eine Inhibierung der Transkription durch Depopulierung der TATA-Box. Offenbar verhält sich der TBP-NC2-Subkomplex wie ein beweglicher Ring, der sich auf der DNA bis zu ihren Enden bewegen kann (Abbildung 20).

Kristallstrukturen des TBP-DNA-Komplexes zeigen, dass der ansonsten lineare DNA-Strang an der TBP-Bindungsstelle zweimal 90°-Knicke aufweist, die zusammen eine Beugung des DNA-Strangs von etwa 80° ergeben (Abbildung 21). Zwar zeigt eine Kristallstruktur des TBP-NC2-DNA-Komplexes [89] immer noch den DNA-Strang in der gebeugten Konformation, dennoch scheint ein Konformationswechsel von der geraden in die gebeugte Konformation während der Ausbildung des



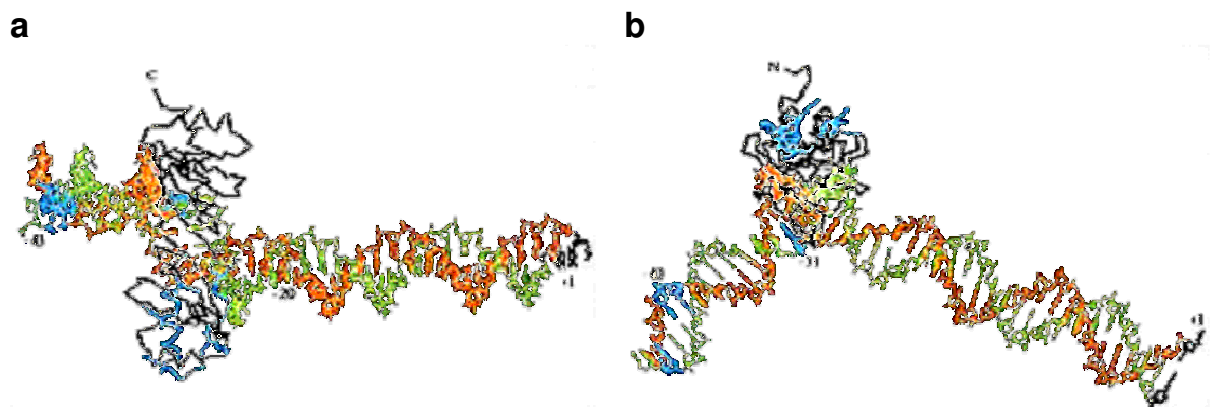
**Abbildung 20: Kristallstrukturen des TBP-DNA-Komplexes und TBP-NC2-DNA-Komplexes.** (a) TBP (in blau und grün) bindet in die kleine Furche der TATA-Box des Promotors des Adenovirus Major Late (AdML). Für die DNA (in orange und rot) ergibt sich eine ausgedehnte Beugung von insgesamt etwa 80°, die sich über mehrere Basenpaare erstreckt [88]. (b) Der negative Cofaktor 2 (NC2) bindet über die Untereinheiten NC2 $\alpha$  und NC2 $\beta$  direkt an TBP um die DNA herum und bildet so einen beweglichen ringförmigen TBP-NC2-Subkomplex aus. In der Kristallstruktur bleibt die resultierende Beugung der DNA nach Bindung von NC2 erhalten (PDB-Code 1JFI aus [89]).

ringförmigen TBP-NC2-Subkomplexes wahrscheinlich. Zu der erwarteten Bewegung des TBP-NC2-Subkomplexes entlang der DNA kann also eine DNA-Knick-Bewegung hinzukommen.

Die ersten Einzelmolekül-FRET-Daten dieses Systems zeigen hauptsächlich zwei FRET-Zustände, die möglicherweise genau von diesen beiden DNA-Konformationen herrühren [79].

Eine besondere Rolle fällt damit jener Startsequenz (Promotor) zu, die den Transkriptionsfaktor (TF) so positionieren muss, dass das Gen von Sequenzbeginn und nicht irgendwo später ausgelesen wird. Die Wirkungsweise von NC2 beruht auf eine Erhöhung der Affinitäten von TBP zu ansonsten TBP-unspezifischen Sequenzabschnitten [94] und somit zu einer Delokalisierung der TBP über der TATA-Box. Die Wirkung von NC2 wurde auch bei manipulierten Promotorsequenzen aber unveränderter TATA-Box nachgewiesen [79], weswegen eine generelle, vom Promotor weitgehend unabhängige Wirkungsweise von NC2 vermutet werden kann. Durch den quantitativen Vergleich zweier sich auch in der TATA-Box unterscheidenden Promotoren soll die allgemeinen Gültigkeit des NC2-Effekts von TBP-Promotor-Komplexe im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die von Prof. Don Lamb (LMU München) und Dr. Peter Schlüsche erzeugten und im Folgenden vorgestellten Messdaten erlauben einen direkten Einblick in die Wirkung von NC2 auf den TBP-DNA-Komplex. Der apparative Aufbau enthielt



**Abbildung 21:** Schematische Zeichnung der Interaktion von TBP mit einem AdML-codierenden DNA-Strang in der linearen B-Form (aus [93]). TBP: weiße Bänder; codierender Strang: grün; Matrizenstrang: rot; Startpunkt der Transkription: weißes Basenpaar; Kontaktstellen zu TFIIA: blau). (a) Knicke von jeweils knapp 90° stromauf- und stromabwärts verursachen eine laterale Verschiebung des DNA-Doppelstranges von 18 Å. (b) Der TBP-DNA-Komplex in einer um 90° gedrehten Ansicht. Die beiden Knicke der DNA an der TATA-Box führen zu einer Gesamtbeugung von ca. 80°.

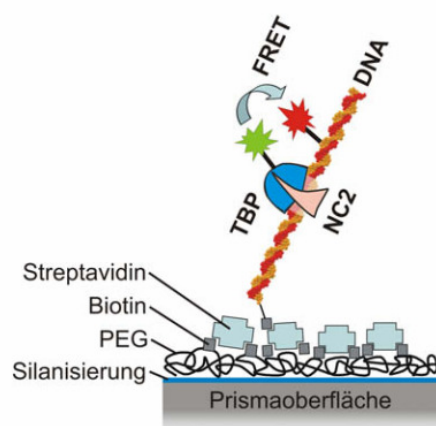
spezielle Probenkammern mit einem automatisierten Mikroflusssystem und ermöglichte so die Beobachtung einzelner TBP-DNA-Komplexe während der Zugabe von NC2.

#### 4.1 Experimentelle Realisierung

Um lange zeitaufgelöste Trajektorien zu erhalten wurde die DNA-Sequenz um ein Biotin-Molekül am 3'- bzw. 5'-Ende erweitert. Die Quarzoberfläche des Prismas wurde biofunktionalisiert, um eine unspezifische Adsorption auf dem Quarz zu vermeiden und um die Biotin-Moleküle zur gezielten Immobilisierung zu nutzen. Hierzu wurde auf silanisierte Quarzoberflächen des Prismas ein dichter, mit 2 % Biotin-PEG angereicherter PEG-Film aufgebracht. Eine weitere Streptavidin-Schicht verbindet die biotinylierten DNA-Stränge mit den biotinylierten PEG-Molekülen [95]. Das Protein Streptavidin weist vier aktive Biotin-Bindungsstellen auf, die eine Biotin-Bindung mit beinahe kovalentem Charakter ermöglicht (Dissoziationskonstante  $K_D=10^{-15}$  M). Die Immobilisierungsmethode zeigt schematisch Abbildung 22.

#### 4.2 Probenpräparation

Um Einflussfaktoren auf die Dynamik ausfindig zu machen, wurden vier verschiedene Probenpräparationen erzeugt (Abbildung 23), die sich in ihren DNA-Strängen unterscheiden. Diese wurden jeweils vor und nach Zugabe von NC2 mittels Einzelmolekül-FRET vermessen. Eine TBP-Mutante ( $\gamma$ TBP) mit nur einem einzigen



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der Immobilisierung des TBP-DNA-NC2-Komplexes an der Prismaoberfläche. Um eine unspezifische Adsorption der Probenmoleküle auf der Oberfläche zu vermeiden, wurde sie silanisiert und mit einer hohen Konzentration von PEG beschichtet. Die spezifische Bindung der Probe findet über eine Biotin-Streptavidin-Biotin-Kopplung statt.

Cystein wurde mit dem FRET-Donor Atto532 (Atto-Tec, AD 532-41) markiert [79]. Der FRET-Akzeptor Atto647 bzw. Atto647N (Atto-Tec) befindet sich auf der DNA, die jeweilige Markierungsposition zeigt Abbildung 23. Das FRET-Paar Atto532/Atto647N weist einen Försterradius von 6.0 nm auf.

Präparation 1 enthielt einen DNA-Strang mit 70 Basenpaaren (bp) bestehend aus der Promotorsequenz *Adenovirus Major Late* (AdML). Der FRET-Akzeptor befindet sich in Richtung stromaufwärts 11 Basenpaare von der TATA-Box entfernt.

Präparation 2 enthielt dieselbe Promotorsequenz AdML, jedoch um 40 bp in Richtung 3' verlängert. Zusätzlich wurde der Biotin-Anker für die Oberflächenimmobilisierung im Gegensatz zu allen anderen Proben am gegenüberliegenden Ende angebracht.

Präparation 3 enthielt einen DNA-Strang mit 80 Basenpaaren (bp) bestehend aus dem alternativen Promotor H2B, der sich auch in der TATA-Box vom Promotor AdML unterscheidet. Der FRET-Akzeptor befindet sich 12 bp von der TATA-Box entfernt in Richtung stromaufwärts.

Präparation 4 gleicht Präparation 3, allerdings befindet sich bei dieser Präparation der FRET-Akzeptor in der gleichen Entfernung (12 bp) aber auf der anderen Seite der

Präparation 1, AdML 70 bp up stream:

```
5' -GCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAAGGGGTGGGGGCGGTTTCGTCTCACTCTCTT-Biotin
3' -CGGTGCACTGGCCACAAGGACTTCCCCCGATATTTTCCCCACCCCCGCAAGCAGGAGTGAGAGAA
```

Präparation 2 (AdML 110 bp up stream):

```
Biotin-GCCACGTGACCGGGTGTTCCTGAAGGGGGGCTATAAAAAGGGGTGGGGGCGGTTTCGTCTCACTCTCTT...
CGGTGCACTGGCCACAAGGACTTCCCCCGATATTTTCCCCACCCCCGCAAGCAGGAGTGAGAGAA...
...CCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGAGTA-3'
...GGCGTAGCGACAGACGCTCCCGGTCGACAACCCCACTCAT-5'
```

Präparation 3 (H2B-J 80 bp up stream):

```
Biotin-CTTCACCTTATTTGCAAGAGCGATTCTATAAAAAGCGCCTTGTGCATACCCTGCTCACGCTGTTTTTCTTTTCGTTGGC-3'
GAAGTGAATAAACGTATTTCGCTAAGATATATTTTCGCGGAACATGATGGGACGAGTGCGACAAAAAGGAAAAGCAACCG-5'
```

Präparation 4 (H2B-J 80 bp down stream):

```
Biotin-CTTCACCTTATTTGCATAAGCGATTCTATAAAAAGCGCGTGTGCATACCCTGCTCACGCTGTTTTTCTTTTCGTTGGC-3'
GAAGTGAATAAACGTATTTCGCTAAGATATATTTTCGCGGAACATGATGGGACGAGTGCGACAAAAAGGAAAAGCAACCG-5'
```

**Abbildung 23: Verwendete DNA-Sequenzen. Die TATA-Box ist jeweils weiß eingetragen, die Position des FRET-Akzeptors ist rot markiert. Aus jeder Präparation wurden FRET-Trajektorien zunächst ohne NC2 und dann nach Zugabe von NC2 aufgenommen. Auf diese Weise standen acht Datensätze für eine Hidden Markov Analyse zur Verfügung.**

TATA-Box, in Richtung stromabwärts.

Präparation 1 und 2 unterscheiden sich sowohl in der Länge der DNA, als auch in der Richtung, mit der sie an die Oberfläche immobilisiert wurden. Die DNA-Sequenz im Bereich der TATA-Box und die Markierungspositionen der Farbstoffe sind nicht unterschiedlich. Dadurch lassen sich durch das Experiment bedingte Einflüsse auf die Proteindynamik untersuchen. Insbesondere Einflüsse der Oberfläche sollten sich bei einer Kopf-über-Version (Präparation 2) bemerkbar machen. Zeigen die Einzelmolekül-FRET-Daten beider Präparationen die gleiche Art von Dynamik, so können unerwünschte, durch das Experiment bedingte Einflüsse auf die beobachtete Proteindynamik ausgeschlossen werden.

Präparation 3 führt einen neuen Promotor ein. Hängt die beobachtete Dynamik vom Promotor ab, so sollten die FRET-Spuren signifikante Unterschiede im Vergleich zum Promotor AdML (Präparation 1 und 2) zeigen. Aus der veränderten Markierungsposition in Präparation 4 sollten sich Hinweise darauf ergeben, ob die diskreten Sprünge in den FRET-Trajektorien von einer TBP-NC2-Mobilität herrühren, oder vielmehr DNA-Knickbewegungen dafür verantwortlich sind.

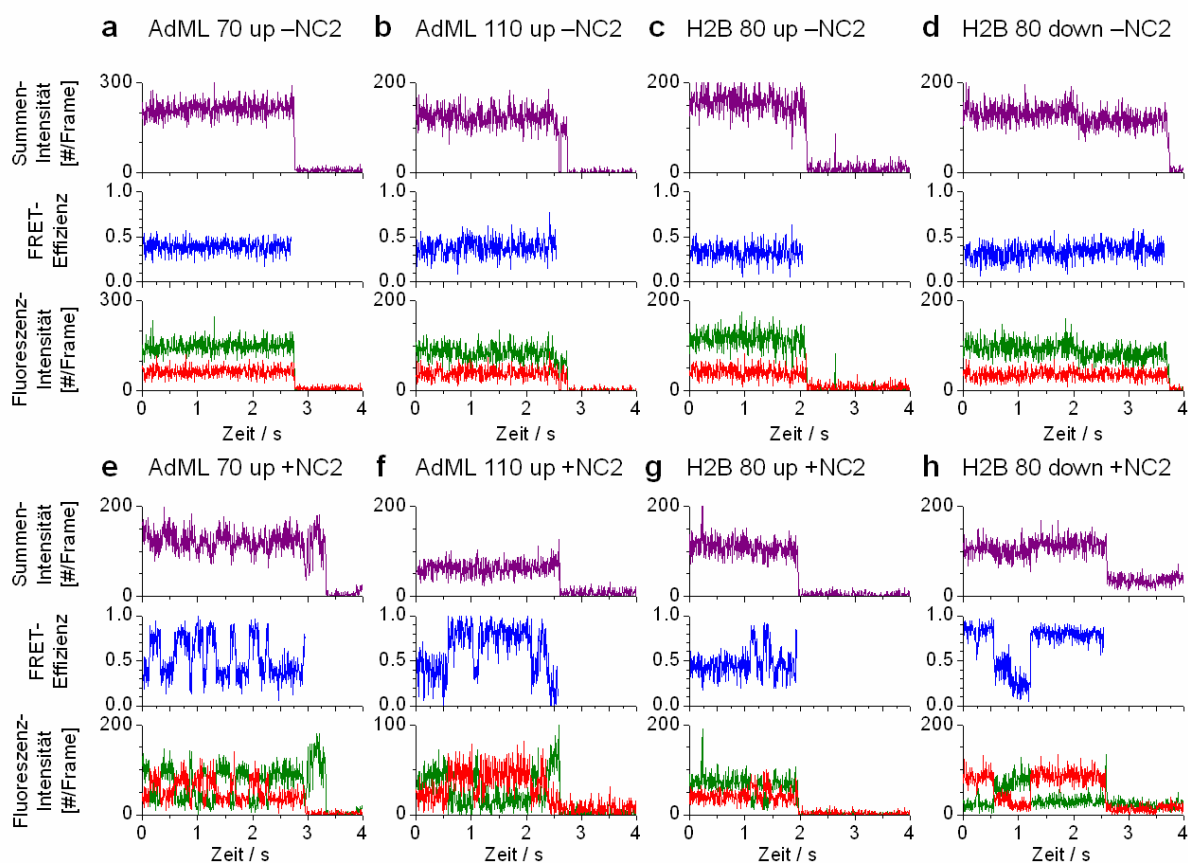
### 4.3 Beschreibung der Dynamik in den FRET-Trajektorien

Nach Zugabe von TBP auf die immobilisierten DNA-Stränge erhält man Einzelmolekül-FRET-Spuren mit konstantem FRET-Signal bei einer FRET-Effizienz von etwa 0.38 für den Promotor AdML und 0.37 bzw. 0.35 für den Promotor H2B (siehe Tabelle 4, Beispieltrajektorien in Abbildung 24 obere Zeile). Nach Zugabe von NC2 zeigen die FRET-Spuren aller vier Präparationen, also unabhängig vom

	AdML 70 bp up stream	AdML 110 bp up stream	H2B 80 bp down stream	H2B 80 bp up stream
ohne NC2	103	141	62	132
mit NC2	432	315	55	279

**Tabelle 1: Anzahl der Moleküle, die in die Hidden Markov Analyse geflossen sind. Von jedem Molekül wurde eine FRET-Trajektorie mit einer Zeitauflösung von 200 frames/sec aufgenommen. Die Dauer der Trajektorien wurde i.d.R. durch das Fotobleichen eines der beiden Fluorophore begrenzt und erreichte im Schnitt etwa 300 Frames pro Molekül.**

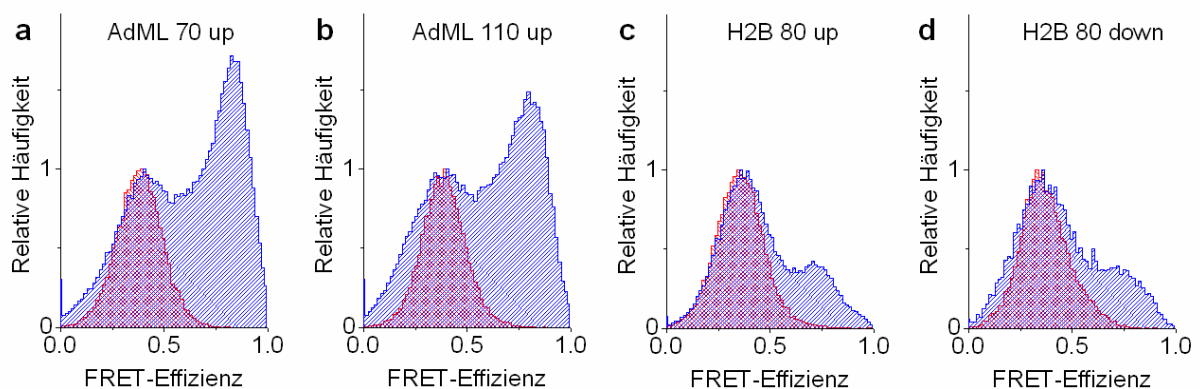
Promotor, sprunghafte Übergänge zwischen hauptsächlich zwei verschiedenen FRET-Werten (Abbildung 24 zeigt Beispieltrajektorien). Um die relativen Häufigkeiten der FRET-Zustände für alle vier Proben miteinander vergleichen zu können, wurde die FRET-Effizienz aus jedem Datenpunkt innerhalb eines Datensatzes über jeweils alle enthaltenen Moleküle zu einem Histogramm zusammengefasst (Abbildung 25 und Tabelle 1). Hier zeigen sich nach Zugabe von NC2 deutlich die Unterschiede zwischen den beiden Promotoren. Die Häufigkeitsdiagramme weisen zwei Maxima bei den FRET-Effizienzen  $\sim 0.4$  und  $\sim 0.8$  für die beiden AdML-Proben und bei  $\sim 0.4$  und  $\sim 0.7$  für die beiden H2B-Proben auf. Das Maximum bei der geringeren FRET-Effizienz liegt ziemlich genau auf den gleichen Wert wie vor Zugabe von NC2. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich um die gleiche Konformation handelt.



**Abbildung 24:** (a) Die Einzelmolekül-FRET-Trajektorie zeigt eine stabile Konformation des TBP-DNA-Komplexes in Abwesenheit von NC2, was zu einer konstanten FRET-Effizienz von  $\sim 0.4$  führt (grün: Donor-Intensität, rot: Akzeptor-Intensität, blau: FRET-Effizienz, violett: Summenintensität). (b) Nach Zugabe von NC2 beginnt die FRET-Effizienz hauptsächlich zwischen zwei Zuständen zu fluktuieren. (c-f) Histogramme der frame-weise berechneten FRET-Effizienz für alle vier Proben. Rot: ohne NC2, blau: mit NC2. Jedes Histogramm wurde jeweils über den gesamten Datensatz (bis zu 500 Moleküle) gebildet.

Die Zugabe von NC2 führt mit dem Promotor AdML häufiger in den High-FRET-Zustand als mit dem Promotor H2B. NC2 scheint demnach mit dem Promotor H2B eine verminderte Wirkung zu haben.

Es treten in den Zeitspuren noch weitere Bereiche mit anderen FRET-Effizienzen auf, allerdings weisen alle aufgenommenen Zeitspuren diskrete Sprünge zwischen wiederkehrenden FRET-Effizienzen auf. Eine Identifikation der FRET-Stufen ist eine notwendige Voraussetzung für eine quantitative Beschreibung der beobachteten Dynamik. Dafür wurde die Hidden Markov Analyse eingesetzt.



**Abbildung 25: (a-d) Histogramme der frame-weise berechneten FRET-Effizienz für alle vier Proben. Rot: ohne NC2, blau: mit NC2. Jedes Histogramm wurde jeweils über den gesamten Datensatz (bis zu 500 Moleküle) gebildet.**

#### 4.4 Hidden Markov Analyse

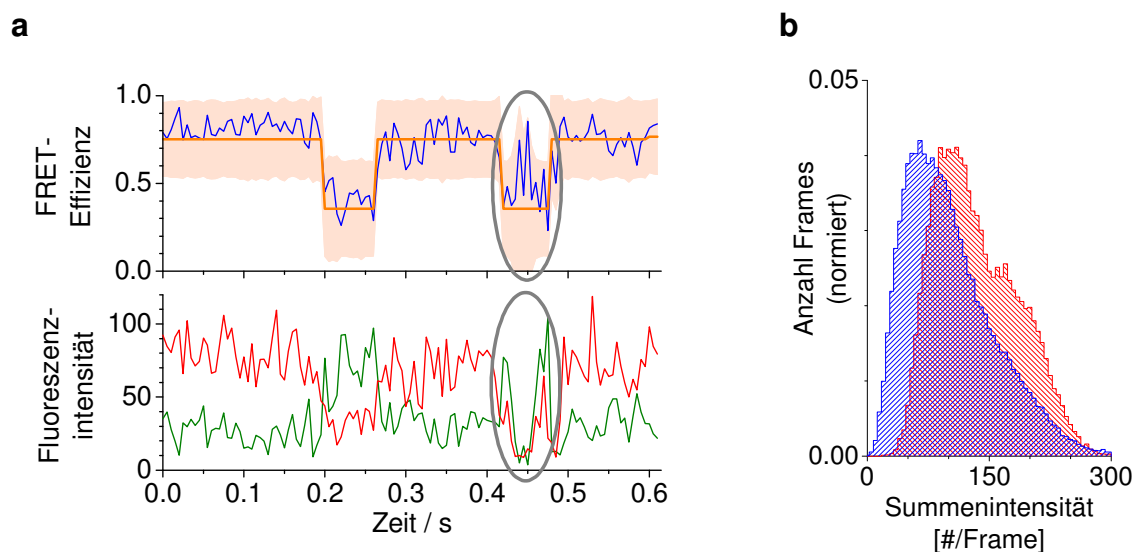
Ein Hidden-Markov-Modell geht davon aus, dass sich die Eigenschaften seiner Zustände während der gesamten Messzeit nicht ändern. Für die Zuordnung von FRET-Effizienzen zu Hidden Markov Zuständen müssen demnach die FRET-Effizienzen für die einzelnen Zustände unterscheidbare Werte annehmen und sie dürfen keinen Schwankungen unterworfen sein. Dasselbe gilt aber auch für die zugehörigen Breiten der jeweiligen Verteilungen. Die Breite einer Verteilung aus FRET-Effizienzen hängt jedoch von der Summenintensität ab. Diese ist im Laufe einer Messung in der Regel konstant, kann aber temporären Schwankungen unterworfen sein (siehe Abbildung 26a). Die Unterschiede der Summenintensitäten von Molekül zu Molekül sind jedoch groß, sie umspannen einen Bereich von 50 bis über 200 counts/(Molekül·Frame) (Abbildung 26b). Ein Standard-HMM modelliert die Breite der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion als Konstante, was hier unweigerlich zu einem Scheitern der gesamten Analyse führen würde. Jedoch die in Kapitel 3.8 vorgestellten erweiterten Schätzfunktionen berücksichtigen solche Intensitätsschwankungen: die Emissions-



funktionen passen ihre Breite anhand der Summenintensität an die gegebenen Bedingungen an. Dadurch konvergiert überhaupt erst der Optimierungsalgorithmus und man erhält Schätzwerte für alle Parameter des Hidden Markov Modells (siehe Kapitel 3.8).

Die FRET-Trajektorien wurden mit zehn verschiedenen Hidden Markov Modellen ausgewertet, die eins bis zehn versteckte Zustände enthielten. Der Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus passt iterativ für jedes Modell den jeweiligen Parametersatz derart an die gegebenen Daten an, dass der Likelihood-Wert maximal wird (siehe Kapitel 3.5). Mit den auf diese Weise optimierten Parametersatz wird anschließend für jedes Modell eine Identifikation der Stufen mit dem Viterbi-Algorithmus vorgenommen (Kapitel 3.6). Für jeden Frame wird der wahrscheinlichste Zustand ermittelt, aufeinander folgende gleiche Zustände werden zu Stufen zusammengefasst.

Die Zahl der markierten Stufen zeigt Tabelle 2.



**Abbildung 26:** (a) Beispielspur des Promotors AdML 110 bp up stream nach Zugabe von NC2, grün: Donor-Fluoreszenzintensität pro 5 ms, rot: Akzeptor-Fluoreszenzintensität pro 5 ms, blau: FRET-Effizienz, orange: HMM-Fit (2 versteckte Zustände) mit zugehöriger Breite ( $1\sigma$ ). Der plötzliche Abfall in der Donor-Zählrate bei 0.45 Sekunden führt zu hohen Fluktuationen in der blauen FRET-Effizienzspur. Die neuen Schätzer sind jedoch in der Lage, aus der Summenintensität temporär die Breite der Verteilungsdichtefunktion (orange) anzupassen und stellen auf diese Weise eine richtige Zuordnung der Zustände auch bei nicht konstanter Summenintensität sicher. (b) Verteilung der mittleren Summenintensität für alle TBP-DNA-Komplexe mit dem Promotor AdML 70 bp up stream. Die Helligkeit variiert dabei sehr stark, die meisten Bilder zeigen eine Helligkeit von 50 bis über 200 counts/(Molekül·Frame). Rote Histogramme: vor Zugabe von NC2. Blaue Histogramme: nach Zugabe von NC2.

Je komplexer das Modell, desto differenzierter können Stufen markiert werden. Bei zu komplexen Modellen besteht jedoch die Gefahr, dass eine vorhandene Konformation fälschlicherweise durch zwei versteckte Zustände mit verringerter Varianz modelliert wird. Tabelle 3 und Tabelle 4 zeigen die gefundenen Mittelwerte der normalverteilten Emissionsfunktionen mit zugehöriger Standardabweichung.

Die Frage ist nun, welches Modell beschreibt die Daten am besten?

	AdML 70 bp up stream		AdML 110 bp up stream		H2B 80 bp down stream		H2B 80 bp up stream	
	-NC2	+NC2	-NC2	+NC2	-NC2	+NC2	-NC2	+NC2
1 Zustand	103	432	141	315	62	55	132	279
2 Zustände	147	3643	217	2610	82	128	252	1113
3 Zustände	173	8146	241	4128	123	184	330	1829
4 Zustände	160	9546	252	6416	112	291	304	1966
5 Zustände	176	9786	256	6381	124	340	323	1984
6 Zustände	181	9299	234	6008	129	366	354	2031
7 Zustände	183	11797	239	6126	140	411	378	1885
8 Zustände	150	11746	262	7002	137	358	315	1853
9 Zustände	200	12688	263	6489	128	367	273	1807
10 Zustände	180	12582	296	8235	132	371	313	1930

**Tabelle 2: Anzahl der markierten Stufen verschiedener Hidden Markov Modelle für jeden Promotor jeweils vor und nach Zugabe von NC2. Die Zeile für “1 Zustand” enthält genau die Anzahl der Moleküle (siehe Tabelle 1).**

Zahl der versteckten Zustände	AdML 70 bp up stream	AdML 110 bp up stream	H2B 80 bp down stream	H2B 80 bp up stream
1	0.61±0.22	0.57±0.22	0.45±0.19	0.46±0.18
2	<b>0.39±0.12</b> 0.78±0.09	<b>0.36±0.12</b> 0.75±0.09	<b>0.33±0.10</b> 0.68±0.11	<b>0.36±0.09</b> 0.71±0.09
3	0.34±0.10 0.60±0.08 0.82±0.05	0.26±0.09 0.48±0.08 0.77±0.07	0.31±0.09 0.52±0.07 0.76±0.07	0.30±0.08 0.44±0.06 0.73±0.08
4	0.20±0.08 <b>0.40±0.07</b> 0.64±0.07 0.83±0.04	0.20±0.07 <b>0.38±0.06</b> 0.62±0.06 0.81±0.04	0.19±0.06 <b>0.36±0.06</b> 0.56±0.06 0.78±0.06	0.26±0.07 <b>0.39±0.06</b> 0.58±0.06 0.76±0.07
5	0.18±0.08 <b>0.36±0.06</b> 0.50±0.06 0.70±0.07 0.85±0.03	0.18±0.07 <b>0.35±0.05</b> 0.50±0.05 0.68±0.06 0.83±0.03	0.19±0.06 <b>0.35±0.05</b> 0.49±0.05 0.63±0.03 0.79±0.05	0.23±0.07 <b>0.36±0.06</b> 0.47±0.06 0.69±0.05 0.82±0.06
6	0.15±0.07 0.32±0.06 0.42±0.05 0.57±0.06 0.73±0.06 0.86±0.03	0.16±0.06 0.30±0.05 0.41±0.05 0.57±0.06 0.71±0.05 0.84±0.02	0.17±0.06 0.30±0.05 0.40±0.04 0.54±0.05 0.71±0.04 0.83±0.04	0.20±0.07 0.33±0.06 0.41±0.05 0.55±0.06 0.72±0.04 0.86±0.05
7	0.14±0.06 0.28±0.06 <b>0.39±0.05</b> 0.51±0.05 0.65±0.06 0.80±0.03 0.89±0.02	0.13±0.06 0.26±0.05 <b>0.37±0.05</b> 0.49±0.05 0.62±0.06 0.75±0.04 0.85±0.02	0.15±0.05 0.27±0.05 <b>0.37±0.05</b> 0.49±0.05 0.62±0.03 0.75±0.03 0.86±0.03	0.17±0.06 0.29±0.06 <b>0.37±0.05</b> 0.47±0.05 0.63±0.05 0.74±0.04 0.88±0.05
8	0.13±0.06 0.25±0.06 <b>0.36±0.05</b> 0.44±0.05 0.57±0.05 0.67±0.06 0.81±0.02 0.89±0.02	0.11±0.06 0.22±0.05 <b>0.33±0.05</b> 0.42±0.04 0.55±0.05 0.66±0.06 0.78±0.02 0.86±0.02	0.14±0.05 0.25±0.05 <b>0.35±0.05</b> 0.43±0.05 0.52±0.04 0.64±0.03 0.75±0.02 0.86±0.03	0.16±0.06 0.27±0.06 <b>0.35±0.05</b> 0.43±0.05 0.54±0.05 0.67±0.04 0.75±0.03 0.88±0.04

Zahl der versteckten Zustände	AdML 70 bp up stream	AdML 110 bp up stream	H2B 80 bp down stream	H2B 80 bp up stream
9	0.12±0.06	0.11±0.05	0.14±0.05	0.15±0.06
	0.24±0.06	0.21±0.05	0.22±0.05	0.25±0.06
	0.34±0.05	0.32±0.05	0.31±0.05	0.32±0.05
	<b>0.42±0.05</b>	<b>0.40±0.04</b>	<b>0.38±0.04</b>	<b>0.38±0.05</b>
	0.52±0.05	0.51±0.05	0.49±0.05	0.46±0.05
	0.66±0.05	0.61±0.06	0.62±0.03	0.57±0.05
	0.68±0.07	0.71±0.04	0.73±0.03	0.68±0.04
	0.82±0.02	0.80±0.02	0.80±0.01	0.76±0.03
	0.89±0.02	0.88±0.01	0.87±0.03	0.88±0.04
10	0.11±0.05	0.08±0.05	0.13±0.05	0.14±0.06
	0.21±0.06	0.19±0.05	0.20±0.05	0.23±0.05
	0.30±0.06	0.29±0.05	0.30±0.04	0.30±0.06
	<b>0.38±0.05</b>	<b>0.38±0.04</b>	<b>0.37±0.04</b>	<b>0.37±0.05</b>
	0.45±0.05	0.47±0.05	0.45±0.05	0.44±0.05
	0.56±0.05	0.59±0.05	0.53±0.04	0.54±0.05
	0.69±0.05	0.63±0.06	0.63±0.03	0.66±0.04
	0.68±0.07	0.71±0.03	0.74±0.02	0.73±0.03
	0.82±0.01	0.81±0.01	0.81±0.02	0.79±0.03
0.89±0.02	0.88±0.01	0.88±0.02	0.90±0.03	

**Tabelle 3: FRET-Effizienzen und deren Standardabweichungen der Markov-Modelle mit 1 bis 10 versteckten Zuständen für alle vier Präparationen nach Zugabe von NC2. Fett gedruckt sind jeweils die Zustände, die am nächsten der Bedingung vor Zugabe von NC2 entsprechen (siehe Tabelle 4).**

Zahl der versteckten Zustände	AdML 70 bp up stream	AdML 110 bp up stream	H2B 80 bp down stream	H2B 80 bp up stream
1	0.38±0.08	0.38±0.08	0.37±0.10	0.35±0.10

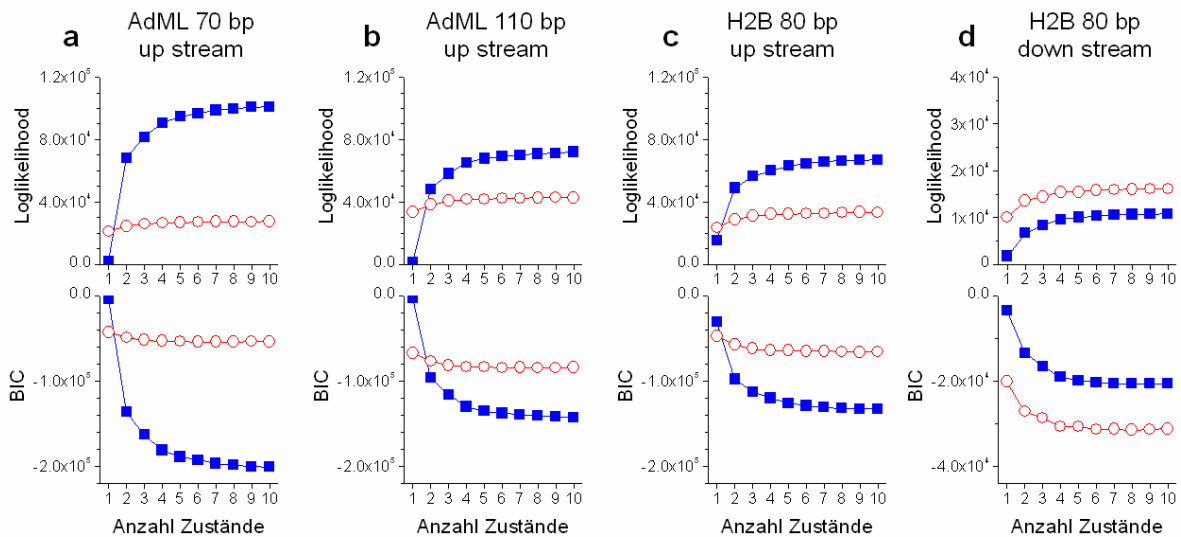
**Tabelle 4: Zum Vergleich: FRET-Effizienzen und deren Standardabweichungen des Markov-Modells mit einem versteckten Zustand für alle vier Präparationen vor Zugabe von NC2.**

### 4.5 Modellselektionskriteria

Für einen ersten Vergleich kann der Loglikelihoodwert der Daten bei gegebenen Modellparametern herangezogen werden. Er gibt an, wie wahrscheinlich die Daten zu dem gegebenen Modell passen. Für alle vier verschiedenen Promotoren steigt der Loglikelihood-Wert mit steigender Modellkomplexität (Abbildung 27, obere Zeile). Jeder weitere Zustand führt zu einer merklichen Erhöhung des Parameterraums und führt zu einer besseren Abbildung der Daten durch das Modell und erzeugt so einen höheren Loglikelihood-Wert. Um zu Erkennen, wann man durch zu viele Parameter die Daten überfittet, muss ein Modellselektionskriterium herangezogen werden, welches die Modellkomplexität selbst mitberücksichtigt. Jeder zusätzlich eingeführte Parameter muss eine bestimmte Zunahme des Loglikelihood-Wertes nach sich ziehen, anderenfalls ist der Parameter überflüssig. Ein Bayesscher Ansatz wurde von Schwarz 1978 vorgeschlagen und ist unter dem Namen *Bayes Information Criterion (BIC)* bekannt [96]:

$$BIC = -2\log L + \theta \log T \tag{39}$$

$\log L$  bezeichnet den Loglikelihood-Wert der Daten bei einem gegebenen Satz an Parametern,  $T$  sind die Anzahl an Datenpunkten und  $\theta$  ist die Zahl der freien



**Abbildung 27:** Modellvergleich auf Basis des Loglikehood-Wertes für die vier verschiedenen Promotoren jeweils vor (rot) und nach (blau) Zugabe von NC2. Obere Reihe: der Loglikelihood-Wert steigt mit wachsender Model-Komplexität, da komplexere Modelle die Daten immer genauer abbilden können. Untere Reihe: Bayesian Information Criterion (BIC) soll durch ein Minimum das optimale Modell anzeigen. Dieses Minimum bildete sich zwar nicht aus, jedoch führt eine erhöhte Parameterzahl bei den dynamischen Messdaten (+NC2) zu einer drastischeren Änderung des Likelihood-Wertes bzw. des BIC-Wertes als bei den statischen Messdaten (-NC2).

Parameter. Der zweite Summand ist ein Strafterm für die Größe des Modells, weil er mit steigender Modellkomplexität ebenfalls steigt und dadurch gegen den ersten Summand arbeitet, der bei steigender Modellkomplexität immer weiter sinkt. Diese beiden Summanden führen zu einem Minimum bei einer bestimmten Zahl an freien Parametern. Dieses Minimum zeigt eine gute Wahl für die Zahl der versteckten Zustände an, die ein Modell zur Beschreibung der Daten haben sollte. Bei den hier vorliegenden Daten war der Strafterm für alle vier Promotoren zu gering. Das BIC zeigte kein Minimum (Abbildung 27, untere Zeile). Eine ausführlichere Betrachtung über die möglichen Ursachen findet sich in Kapitel 3.9.

Alternativ lässt sich anstatt des Loglikelihood-Wertes der  $\chi^2$ -Wert für einen Modellvergleich verwenden. Der  $\chi^2$ -Wert beschreibt die summierten quadrierten Abweichungen der Messdaten vom Hidden Markov Fit.

$$\chi^2 = \frac{1}{T} \sum_{t \in T} (x_t - \mu_t)^2 \quad (40)$$

$x_t$  ist die FRET-Effizienz zum Zeitpunkt  $t$ ,  $\mu_t$  ist die FRET-Effizienz des zugehörigen Zustands,  $T$  ist Anzahl an Datenpunkten. Für die statischen FRET-Effizienz-Trajektorien aus den Messungen vor Zugabe von NC2 wird für alle zehn Markov Modelle erwartet, dass jedes Molekül mit nur einer einzigen Stufe markiert wird. Die Berechnung des  $\chi^2$ -Wertes dieser Moleküle liefert eine untere Grenze, welche weitestgehend unabhängig vom gewählten Modell ist. Im dynamischen Fall sind nur passende Modelle in der Lage, die versteckten Zustände fehlerfrei zuzuordnen. Falsch zugeordnete Stufen beinhalten entweder Sprünge in der FRET-Effizienz, was zu einer Erhöhung der Varianz dieser Stufe führt, oder spalten fälschlicherweise versteckte Stufen, was zu einer Unterschreitung der unteren Grenze führt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 28, erste Zeile, für alle vier Promotoren, jeweils vor und nach Zugabe von NC2. Die  $\chi^2$ -Kurven des dynamischen Falls suggerieren, dass bereits ein Modell mit zwei versteckten Zuständen die wesentlichen Merkmale der Konformationsdynamik abbilden kann, vor allem Sprünge zwischen dem Steady-Zustand bei  $\sim 0.4$  und dem neuen Zustand bei  $\sim 0.8$ . Zusätzliche Zustände verfeinern dieses Bild und lösen mehr und mehr kurzlebige Zwischenzustände auf.

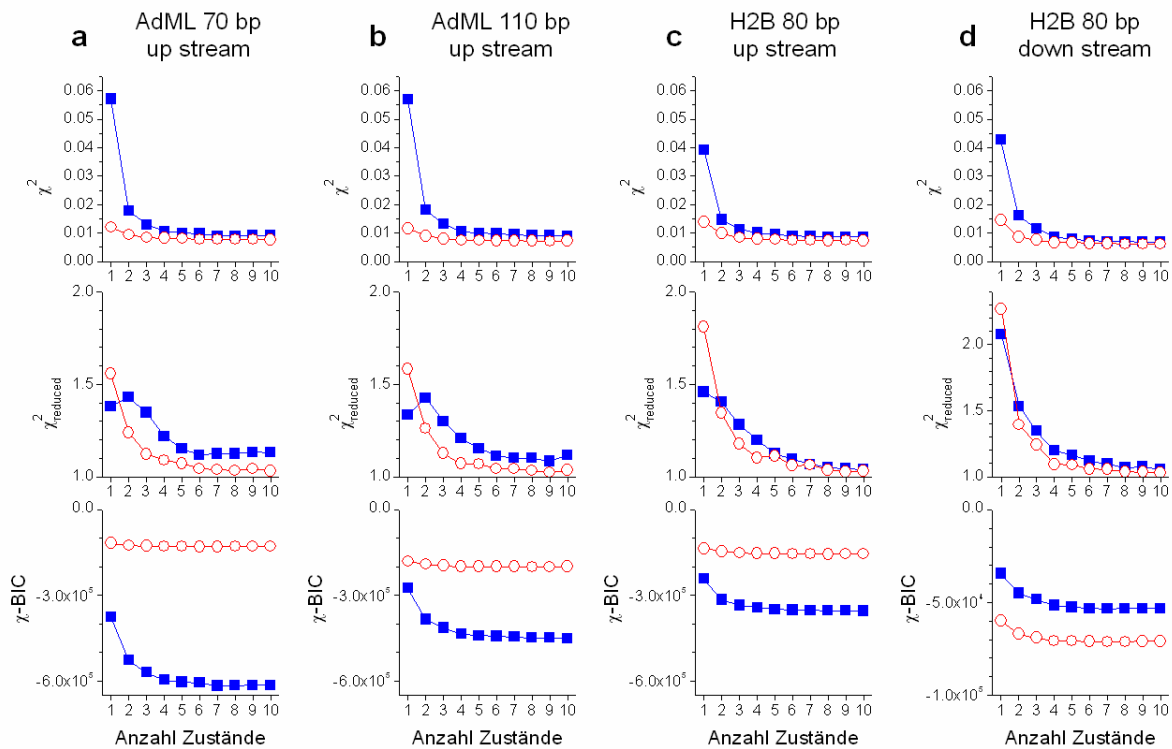
Eine ausreichende Modellkomplexität ist erreicht, wenn der  $\chi^2$ -Wert der dynamischen Messdaten auf den Wert der statischen Messdaten gesunken ist. Bei einem Hidden Markov Modell mit vier Zuständen ist dies für den Promotor AdML erreicht (Abbildung 28a,b), für den alternativen Promotor H2B ist eine ausreichende Annäherung zu sehen (Abbildung 28c,d).

Um die Frage zu beantworten, ob die Daten durch die verwendeten HMMs überfittet wurden, kann der  $\chi^2_{\text{reduced}}$ -Wert herangezogen werden. Zur Berechnung von  $\chi^2_{\text{reduced}}$  wird nicht mehr durch die Anzahl der Zeitbins geteilt, sondern durch die summierte zeitaufgelöste Varianz der Daten  $\sigma_t^2$ :

$$\chi^2_{\text{reduced}} = \frac{\sum_{t \in T} (x_t - \mu_t)^2}{\sum_{t \in T} \sigma_t^2} \quad (41)$$

Diese Varianz  $\sigma_t^2$  wurde in Anhang A hergeleitet, siehe Gleichung (A11).

Enthält ein Modell zu wenige Parameter, um die Daten ausreichend zu beschreiben, so resultiert ein  $\sigma_t^2$  von  $> 1$ , da die Varianz des Nenners die aufsummierten Varianzen im Zähler nicht kompensieren kann. Entsprechend sinkt  $\sigma_t^2$  unter 1, wenn durch zu



**Abbildung 28:** Modellvergleich auf Basis des  $\chi^2$ -Wertes für die vier verschiedenen Promotoren jeweils vor (rot) und nach (blau) Zugabe von NC2. Erste Reihe: Der absolute  $\chi^2$ -Wert lässt sich ab einer Modellkomplexität von vier versteckten Zuständen kaum weiter verringern. Zweite Reihe: Der  $\chi^2_{\text{reduced}}$ -Wert erreicht selbst beim 10-Zustandsmodell nicht den Wert 1, zeigt aber deutlich, dass weitere zusätzliche Zustände keinen Mehrwert bringen. Dritte Reihe: Der  $\chi^2$ -BIC basiert auf den modifizierten  $\chi^2$ -Wert, weist aber wie das LL-BIC auch kein Minimum auf. Bei den statischen Trajektorien ohne NC2 (rot) sind die Kurven immerhin flach, was für diese Daten ein Ein-Zustands-Modell plausibel macht.

viele Parameter die Daten überfittet wurden. Die  $\chi^2_{\text{reduced}}$ -Kurve in Abbildung 28, mittlere Zeile, ist stets größer als 1 und nähert sich mit steigender Zahl an Parametern dem Wert 1 an. Auch hier tritt der Sättigungseffekt bereits nach wenigen Zuständen auf. Dies macht deutlich, dass die bloße Hinzunahme weiterer Zustände immer uneffektiver wird.

Ausgehend vom  $\chi^2$ -Wert lässt sich ein BIC formulieren, das anstatt des Loglikelihood-Wertes  $\log \chi^2$  verwendet. Der Strafterm behält hierbei die gleiche Form:

$$BIC = T \log \frac{\chi^2}{T} + \theta \log T \quad (42)$$

Obwohl der erste Summand  $T \log \chi^2/T$  nicht so stark mit der Modell-Komplexität sinkt wie vorher  $-2 \log L$ , vermag dennoch auch hier der Strafterm nicht genügend entgegen zu wirken, um ein Minimum auszubilden (Abbildung 28, untere Zeile). Dennoch wird auch hier die Stagnation in der Abnahme bei wenigen Zuständen deutlich.

Eine eindeutige Wahl zur Zahl der Zustände konnte keines der aufgeführten Kriterien bieten. Aus der Betrachtung geht aber hervor, dass die wesentlichen Eigenschaften mit wenigen Zuständen abgebildet werden.

## 4.6 Molekülweises HMM im Vergleich zu globalen HMMs

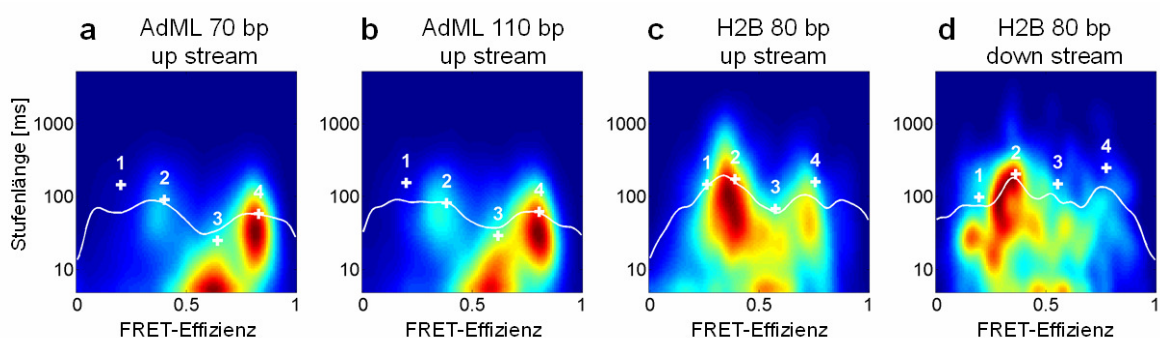
Im Hinblick auf die Frage nach dem besten Modell wurde alternativ für jedes Molekül ein eigenes 10-stufiges HMM aufgesetzt und dessen Parameter anhand der aufgenommenen Zeitspur wie beim globalen HMM zunächst mit dem Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus optimiert und anschließend eine Zustandszuordnung mit dem Viterbi-Algorithmus durchgeführt. Daraus wurde wiederum eine Stufenmarkierung erzeugt. Mit zehn Zuständen für ein einziges Molekül sollten alle Zwischenzustände erfasst werden können. Zeigt die Spur eines Moleküls weniger Zustände, so werden die übrig gebliebenen Zustände schlicht nicht besetzt und stören die weitere Analyse nicht [7]. Auf diese Weise erhält man eine Stufenmarkierung, die als Grenzwert einer globalen Hidden Markov Analyse mit unendlich vielen versteckten Zuständen gesehen werden kann. Abbildung 29 zeigt für die vier Präparationen 2D-Histogramme der Stufenlänge über die mittlere FRET-Effizienz aller markierten Stufen. (Zur Generierung der 2D-Histogramme siehe Anhang E.) Deutlich ist für alle vier Proben-Präparationen eine Anhäufung der Stufen auf drei Hauptmaxima zu erkennen. Die



weiße Linie ist der aus dem Bild spaltenweise erhobene Mittelwert der Stufenlängen. Diese Kurve gibt ein Verweildauerprofil über die FRET-Effizienz an. Zum Vergleich sind in den Abbildungen die Zustände des globalen Vier-Stufen-Modells mit weißen Kreuzen eingetragen.

Die beiden Histogramme des Promotors AdML (Bild a und b) ähneln sich sehr stark. Die Populationen bei den FRET-Effizienzen um  $\sim 0.4$  (entspr. Zustand 2) und  $\sim 0.8$  (entspr. Zustand 4) zeigen Stufenlängen zwischen 10 und 100 ms, während die dritte Population (entspr. Zustand 3) bei  $\sim 0.6$  mit einer mittleren Stufenlänge von unter 10 ms sehr kurzlebig und zudem deutlich breiter als die beiden Hauptpopulationen ist. Außerdem taucht ein weiterer Zustand bei 0.2 und 144 ms auf (Zustand 1, Tabelle 5), für den keine Population erkennbar ist. Die schlecht definierten kurzlebigen Zwischenzustände sowie der breite Low-FRET-Zustand sind die wahrscheinlichste Ursache für das Scheitern des BICs. Sie konnten mit einer breiten Verteilungsfunktion eines globalen HMMs nicht richtig abgebildet werden.

Für den Promotor H2B zeigen die beiden Hauptzustände (Zustand 2 und 4) ähnliche FRET-Effizienzen, aber längere Verweilzeiten zwischen 50 und 500 ms. Im Gegensatz zur AdML-Probe tritt Zustand 2 häufiger auf als Zustand 4. Auch hier zeigt sich ein sehr kurzer, häufiger und schlecht definierter Zwischenzustand (Zustand 3) mit einer Verweildauer von unter 10 ms und einer FRET-Effizienz zwischen 0.5 und 0.6. Der vierte Low-FRET-Zustand findet in der up-stream-Probe (Abbildung 29c) wie bei dem Promotor AdML ebenfalls keine entsprechende Population, bei der down-stream-Probe (Abbildung 29d) jedoch schon. Dafür ist hier die Population für Zustand 4 kaum zu erkennen. Wie die Stufenlängen bereits zeigen, führen die beiden



**Abbildung 29:** (a-d) 2D-Histogramme der Stufen aus dem molekulweisen Hidden Markov Modellen. Die x-Koordinate ist die mittlere FRET-Effizienz der Stufen, die y-Koordinate zeigt die zugehörige Stufenlänge. Die weiße Linie setzt sich aus den Spaltenmittelwerten entlang der x-Achse zusammen. Die überlagerten weißen Kreuze sind zum Vergleich die Ergebnisse aus dem globalen HMM mit vier Zuständen.

Promotoren zu unterschiedlicher Proteindynamik. Die DNA-Länge und die Immobilisierungsrichtung (Abbildung a und b im Vergleich) scheinen keinen Einfluss auf die Dynamik zu haben, wohingegen die Position des FRET-Labels (Abbildung c und d im Vergleich) einen entscheidenden Einfluss zu haben scheint.

FRET-Effizienz $E$ und Verweildauer $\tau$	AdML 70 bp up stream		AdML 110 bp up stream		H2B 80 bp up stream		H2B 80 bp down stream	
	$E$	$\tau$	$E$	$\tau$	$E$	$\tau$	$E$	$\tau$
4 Zustände	0.20	144 ms	0.20	154 ms	0.26	147 ms	0.19	98 ms
	0.40	90 ms	0.38	82 ms	0.39	174 ms	0.36	201 ms
	0.64	25 ms	0.62	29 ms	0.58	68 ms	0.56	149 ms
	0.83	58 ms	0.81	62 ms	0.76	157 ms	0.78	246 ms

Tabelle 5: FRET-Effizienzen und Verweilzeiten des globalen Vier-Stufen-HMMs.

### 4.7 Diskussion der Dynamik

Um einen Eindruck der Proteinkinetik zu gewinnen, werden die Übergänge zwischen den Stufen betrachtet. Die Histogramme a bis d der oberen Zeile in Abbildung 30

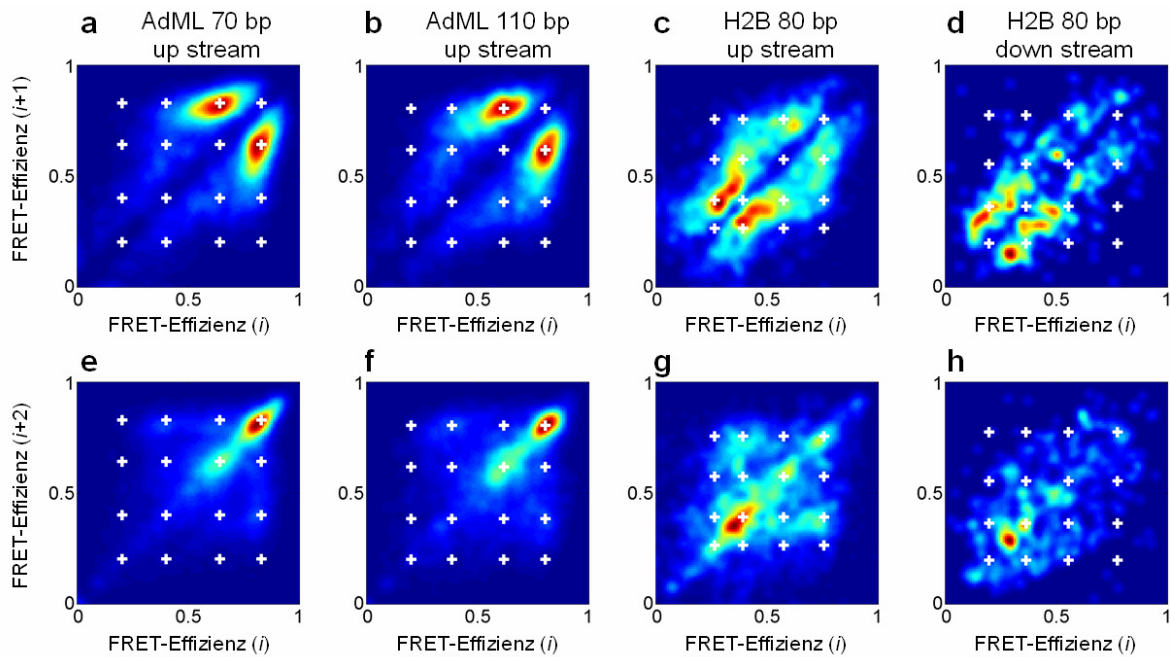


Abbildung 30: 2D-Histogramm der FRET-Effizienzen der nächsten und übernächsten Nachbarstufen aus der molekülweisen Hidden Markov Analyse. Die weißen Kreuze zeigen die FRET-Effizienzen der globalen Vier-Zustands-Modelle an. (a-d) Nächste Nachbarn: FRET-Effizienz  $E$  der Stufe  $i+1$  über  $E$  der Stufe  $i$ . (e-h) Übernächste Nachbarn:  $E$  der Stufe  $i+2$  über  $E$  der Stufe  $i$ .

zeigen je die FRET-Effizienz einer nachfolgenden Stufe über die FRET-Effizienz der Ausgangsstufe. Die Bilder der unteren Zeile e bis h zeigen jeweils die FRET-Effizienz der übernächsten Stufe über die FRET-Effizienz der Ausgangsstufe. Die Diagonalelemente in der oberen Zeile sind naturgemäß nicht besetzt, da das Diagramm gerade die Stufenwechsel zeigt. Die Diagonalelemente in der unteren Zeile sind immer dann besetzt, wenn das System zwischen zwei Zuständen fluktuiert, als nach einem Zustandswechsel wieder ein Rückwechsel in die Ausgangsstufe stattfindet. Findet ein Zustandswechsel des Systems über einen Zwischenzustand statt, so werden die Nichtdiagonalelemente der Bilder in der unteren Zeile bevölkert, direkte Zustandswechsel bevölkern die Nichtdiagonalelemente der Bilder in der oberen Reihe. Je weiter eine Population von der Diagonalen entfernt ist, desto größer der Sprung.

Für den Promotor AdML unterscheiden sich die beiden Präparationen wiederum kaum. Die häufigsten Übergänge finden zwischen Zustand 3 und 4 statt, also zwischen den FRET-Effizienzen  $\sim 0.6$  und  $\sim 0.8$ . Direkte Sprünge zwischen den Zuständen 2 ( $\sim 0.4$ ) und 4 ( $\sim 0.8$ ) kommen zwar vor, ein solcher Sprung geht aber meist über den Zwischenzustand 3 bei  $\sim 0.6$  (Bilder a, e und b, f).

Der Promotor H2B zeigt seine häufigsten Übergänge im Low-FRET-Bereich, Direkte und indirekte Sprünge zwischen den Zuständen 2 und 4 sind allerdings nur für die up-stream-Präparation erkennbar (Bilder c und g). Bei der down-stream-Präparation fehlen diese Übergänge ganz (Bilder d und f).

Die Analyse mit molekülweisen HMMs zeigt, dass die Zugabe von NC2 eine komplexe Proteindynamik auslöst, an denen viele Zustände beteiligt sind. Übergangsraten lassen sich aus einer solchen molekülweisen Analyse nicht extrahieren, da sich die Zustände der lokalen HMM für die einzelnen Moleküle nicht zwangsläufig entsprechen müssen. Ein globales Modell mit mindestens vier Zuständen scheint aber die wesentlichen Eigenschaften der Systeme zu erfassen. Darum werden im nächsten Abschnitt die Raten aus den Übergangswahrscheinlichkeitsmatrizen der globalen Modelle miteinander verglichen. Aus diesem Vergleich kann schließlich eine These für die Ursache der einzelnen Übergänge aufgestellt werden.

## 4.8 FRET-Datenanalyse der Ratenmatrizen

Aufschluss über die zugrunde liegende Dynamik der Proteinbewegung liefert ein Vergleich der Übergangsratenmatrizen aus den globalen Hidden Markov Modellen. Der zeitdiskrete Aufbau der Hidden Markov Modelle liefert zunächst eine Übergangs-

wahrscheinlichkeitsmatrix  $\mathbf{T}$ , die sich in eine Übergangsratenmatrix  $\mathbf{K}$  umformen lässt:

$$\mathbf{K} = \frac{1}{\Delta t} \log(\mathbf{T}) \quad (43)$$

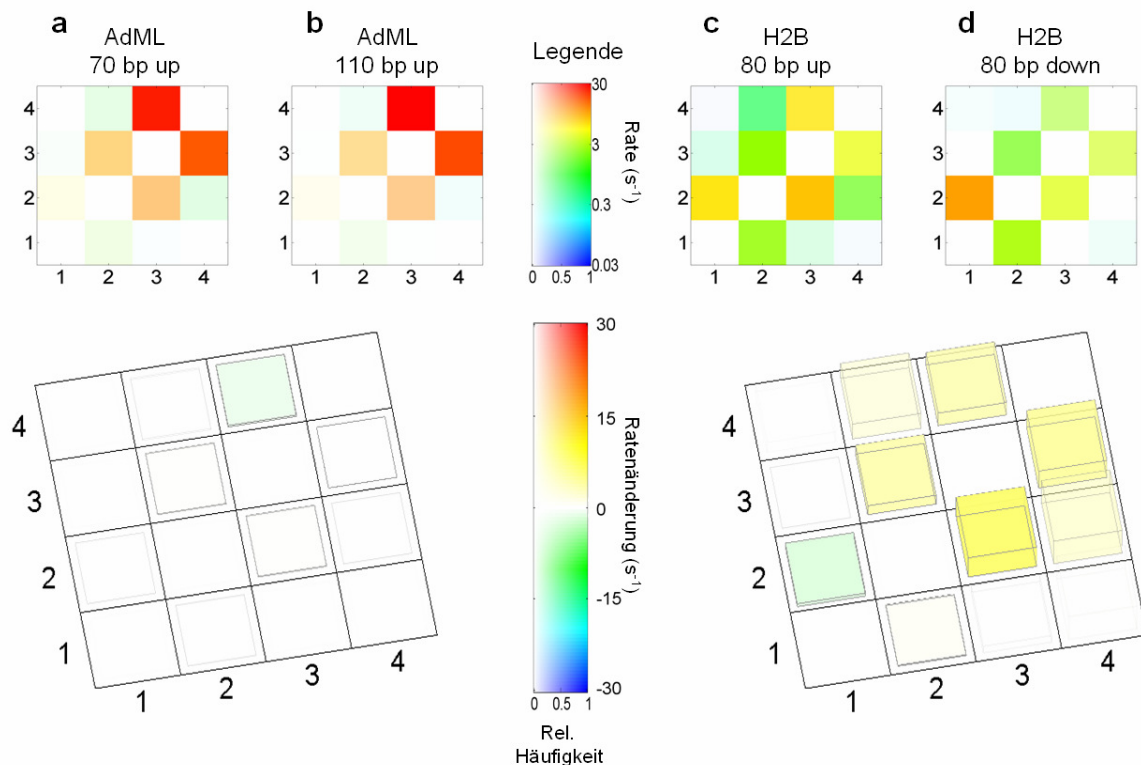
$\Delta t$  bezeichnet die Zeitauflösung der Messdaten, hier 5 ms, auf die sich die Übergangswahrscheinlichkeiten beziehen.  $\log(\mathbf{T})$  ist der Matrixlogarithmus, zur Berechnung steht der Matlab-Befehl „logm“ zur Verfügung, siehe [97]. Diese Umformung setzt naturgemäß voraus, dass die beobachteten Übergänge mit ausreichender Zeitauflösung aufgenommen wurden.

Abbildung 31, obere Zeile, zeigt die Matrizen als farbcodiertes Rasterbild für ein Vier-Zustands-System. Die Abszisse misst den Zustand zum Zeitpunkt  $t$ , die Ordinate zeigt den Zustand zum Zeitpunkt  $t+1$ . Die Rate ist als Farbton aufgetragen, schnelle Wechsel ( $>30 \text{ s}^{-1}$ ) sind rot dargestellt, langsame Wechsel ( $<0.03 \text{ s}^{-1}$ ) sind blau eingefärbt, die zwischen liegenden Farbtöne gelb, grün und türkis werden den Raten logarithmisch zugeordnet. Zudem ist die Sättigung eines Farbtons mit der aufgetretenen Häufigkeit eines Übergangs verbunden. Seltene Übergänge werden blasser dargestellt. Auf diese Weise treten die Hauptmerkmale auch visuell hervor.

Für den Promotor AdML unterscheiden sich die beiden Übergangsmatrizen kaum. Auffällig sind die schnellen und häufigen Wechsel zwischen den Zuständen 3 und 4. Der Übergang von Zustand 3 nach 4 ist noch etwas schneller als der Übergang von 4 nach 3, der kurzlebige Zwischenzustand 3 geht demnach meist in den Zustand 4 über. Deutlich seltener und mit einer geringeren Rate finden die direkten Wechsel zwischen den beiden Hauptzuständen 2 und 4 statt. Ebenfalls selten wenn auch mit etwas höherer Rate treten Sprünge zwischen den Zuständen 1 und 2 auf.

Der Promotor H2B zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen der up-stream und der down-stream Konfiguration. Die direkten Sprünge zwischen den Hauptzuständen 2 und 4 sind bei der up-stream Präparation mit Übergangsraten von um  $1 \text{ s}^{-1}$  deutlich zu erkennen, wogegen sie in der down-Konfiguration praktisch nicht auftreten und mit einer Rate von etwa  $0.1 \text{ s}^{-1}$  zudem noch deutlich langsamer ablaufen. In beiden Präparationen treten am häufigsten Übergänge zwischen benachbarten Zuständen auf. Diese haben in der up-stream-Präparation ähnliche Raten, wohingegen die Übergänge zwischen 1 und 2 in der down-Konfiguration auf Kosten der Übergänge zwischen 2 und 3 sowie 3 und 4 deutlich schneller ablaufen. Am auffälligsten ist der schnelle Übergang von 3 nach 2 in der up-stream-Konfiguration und von 1 nach 2 in der down-stream-Probe.

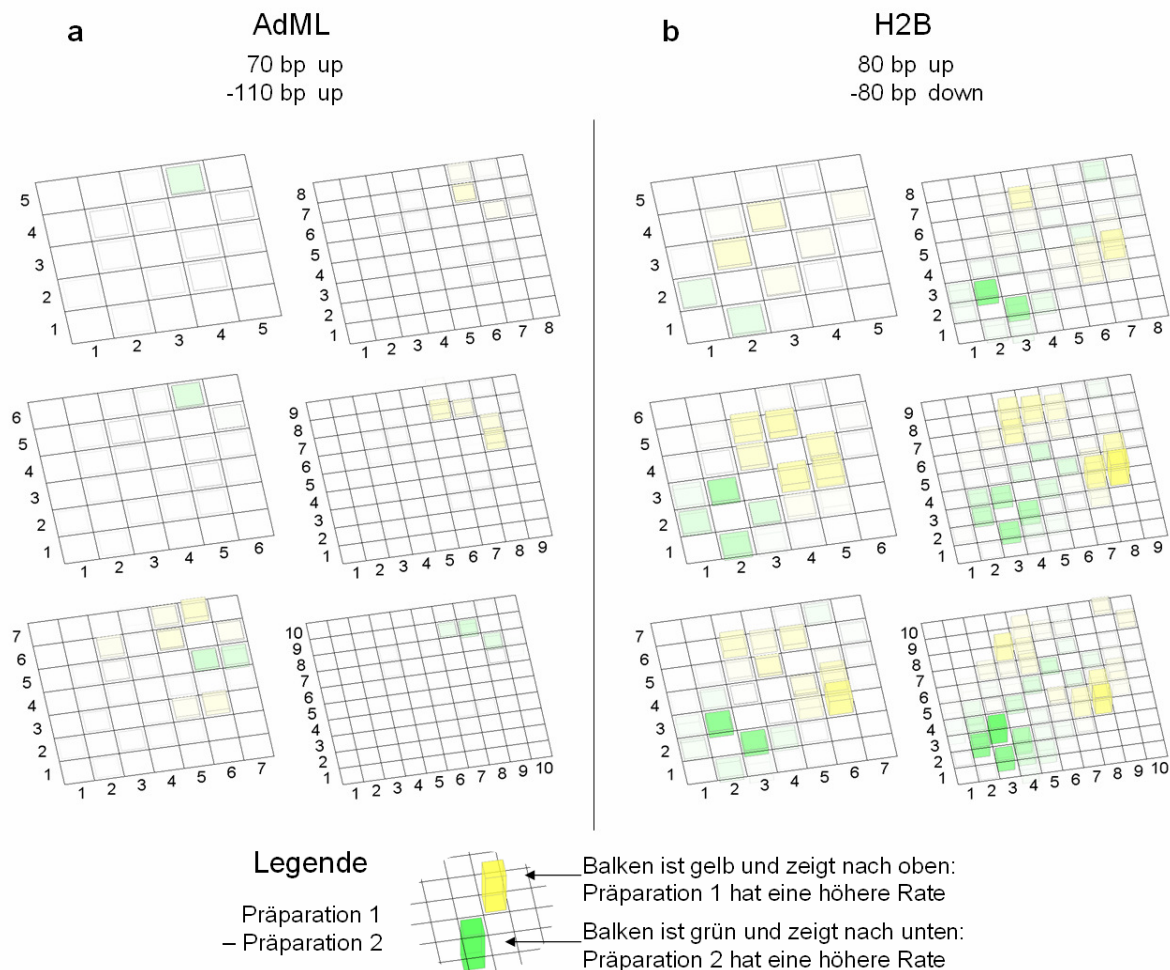
Bildet man die Differenz der beiden Ratenmatrizen gewichtet mit der Summenhäufigkeit, so ergibt sich eine neue Differenzmatrix, die die Unterschiede in den beiden Präparationspaaren deutlich zeigt. In Abbildung 31e und f sind diese Differenzmatrizen mit einem neuen Farbcode in 3D dargestellt. Mit sinkender Summenhäufigkeit steigen hier Transparenz und Blässe, so dass wiederum weniger häufige Übergänge optisch zurücktreten. Der Farbbalken in der zweiten Zeile in Abbildung 31 reicht in y-Richtung von einer Differenz von  $-30 \text{ s}^{-1}$  (blau) über 0 (weiß) bis  $+30 \text{ s}^{-1}$  (rot). Die x-Richtung zeigt die Zunahme der Farbsättigung mit steigender relativer Häufigkeit der Matrixelemente an. Ist die Rate beim Minuenden höher als beim



**Abbildung 31: Farbcodierte Ratenmatrizen des Vier-Zustands-Modells für alle vier Präparationen (Abszisse: Ausgangszustand; Ordinate: Nachfolgender Zustand). Die Farbtöne entsprechen Übergangsraten, deren Sättigung die aufgetretene Häufigkeit des Übergangs wiedergibt. (a) Präparation 1: AdML 70 bp upstream. (b) Präparation 2: AdML 110 bp upstream. (c) Präparation 3: H2B 80 bp upstream. (d) Präparation 4: H2B 80 bp downstream. (e) Die Differenzmatrix aus (a) und (b) zeigt kaum Unterschiede zwischen diesen beiden AdML-Präparationen. (f) Für die beiden H2B-Präparationen weist die Differenzmatrix hingegen große Unterschiede auf, Sprünge zwischen den Zuständen 2, 3 und 4 sind gelb dargestellt und erscheinen damit bei Präparation 3 (H2B 80 bp upstream) häufiger. Sprünge zwischen den Zuständen 1 und 2 sind grün dargestellt und erscheinen demnach bei Präparation 4 (H2B 80 bp downstream) häufiger. Einige der Sprünge aus Präparation 3 (H2B 80 bp upstream) zwischen Medium- und High-FRET tauchen in der Präparation 4 (H2B 80 bp downstream) als Sprünge zwischen Medium- und Low-FRET auf.**

Subtrahenden, zeigt der Balken mit dem Differenzwert nach oben und ist gelb bzw. rot dargestellt. Hat der Subtrahend die höhere Rate, zeigt der Balken nach unten und ist grün bzw. blau eingefärbt.

Die Differenzmatrixen beider Promotoren (Abbildung 31e und f) zeigen deutlich, dass die beiden AdML-Präparationen eine gleiche Dynamik zeigen, wohingegen die beiden H2B-Präparationen signifikante Unterschiede in der Proteindynamik offenbaren. Insbesondere zeigt sich der Trend, dass im Vergleich zur up-stream-Konfiguration Zustandswechsel zwischen Medium- und High-FRET-Zuständen bei der down-stream-Präparation langsamer sind, Zustandswechsel zwischen Medium- und Low-FRET-Zuständen hingegen schneller ablaufen. Dieser Trend tritt unabhängig

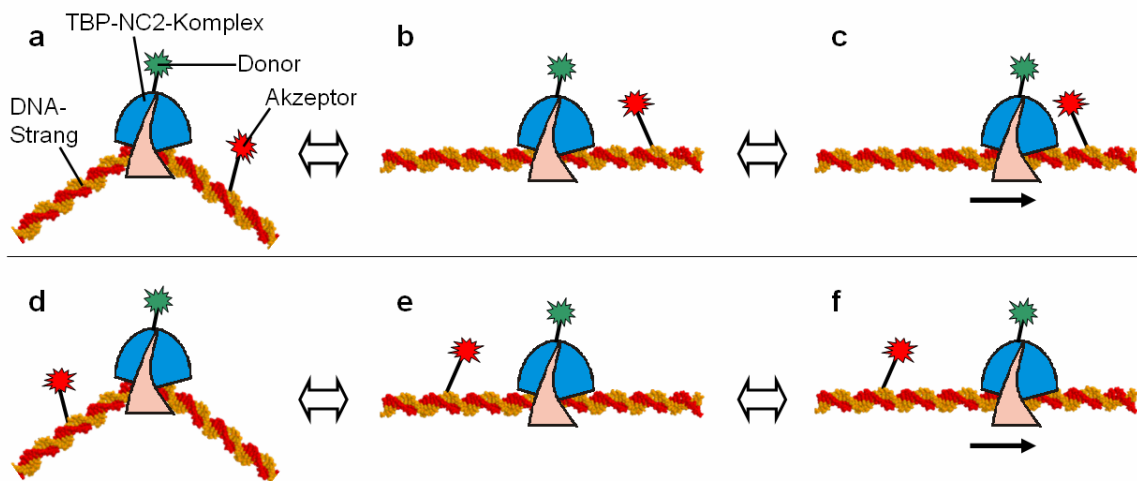


**Abbildung 32: Farbcodierte Differenz-Ratenmatrixen mit fünf bis zehn Zuständen. (a) Beide Präparationen des Promotor AdMLs im Vergleich zeigen keine signifikanten Unterschiede in den Raten. DNA-Länge und Immobilisierungsrichtung haben demnach keinen Einfluss auf die Dynamik. (b) Beide Präparationen des Promotors H2B im Vergleich zeigen unabhängig vom verwendeten Modell deutliche Unterschiede. Die unterschiedliche Labelingposition des FRET-Akzeptorfarbstoffs führt zu einer deutlichen Veränderung in der Dynamik.**

von der Komplexität des HMMs auf, siehe Abbildung 32. Die Matrixelemente der Differenzmatrizen sind jeweils mit ihren vier Nachbarn gemittelt, da die Zustandszuordnung insbesondere bei den größeren Modellen bisweilen um einen Zustand verschoben war.

## 4.9 Interpretation der Ergebnisse

Alle vier Präparationen zeigten vor Zugabe von NC2 statische FRET-Trajektorien, deren FRET-Effizienz nahezu übereinstimmt. Wie oben bereits erwähnt, kann davon ausgegangen werden, dass für alle Präparationen die DNA in der geknickten Konformation vorliegt. In Präparation 1 und 2 befindet sich der Akzeptorfarbstoff 11 bp von der TATA-Box entfernt in Richtung stromaufwärts, in Präparation 3 sind es 12 bp bei einem alternativen Promotor. In Präparation 4 befindet sich der Akzeptorfarbstoff auch 12 bp entfernt aber in Richtung stromabwärts. Da sich für alle vier Präparationen vor Zugabe von NC2 eine ähnliche FRET-Effizienz ergibt (siehe Tabelle 4), muss sich die Donor-Position etwa auf der Mitte des Knicks befinden.



**Abbildung 33: Modell für die Dynamik des TBP-NC2-Komplexes.** (a) Ausgangskonfiguration der geknickten DNA zeigt einen stabilen Medium-FRET-Zustand. (b) Übergang in die gestreckte Konformation führt zu einer Änderung der FRET-Effizienz, z.B. Erhöhung der FRET-Effizienz. (c) Bewegt sich der TBP-NC2-Komplex entlang der DNA in einer Vorzugsrichtung, so zeigt sich dies auch in der Änderung der FRET-Effizienz, z.B. weitere Erhöhung der FRET-Effizienz. (d) Trotz des FRET-Labels auf der anderen Seite zeigt die Ausgangskonfiguration praktisch die gleiche Medium-FRET-Effizienz. Der Donor muss sich demnach etwa in der Mitte des Knicks befinden. (e) Der Übergang in die gestreckte Konfiguration muss eine FRET-Effizienz in die gleiche Richtung wie bei (b) nach sich ziehen. (f) Bewegt sich aber der TBP-NC2-Komplex mit einer Vorzugsrichtung, führt dies genau zum umgekehrten Verhalten wie bei (c).

Demzufolge muss der Übergang von der geknickten in die gestreckte Konformation der DNA für alle vier Präparationen eine Änderung des Fluorophoreabstands in die gleiche Richtung zur Folge haben, da die Akzeptorposition symmetrisch zur Donor-Position gewählt wurde.

Eine Delokalisation des TBP-NC2-Subkomplexes hingegen führt zu gegenläufigen FRET-Änderungen, abhängig von der Akzeptor-Position. Eine Bewegung in Richtung High-FRET muss sich mit der alternativen Akzeptor-Position in eine Bewegung in Richtung Low-FRET bemerkbar machen und umgekehrt.

Die beobachtete Zunahme der Medium-Low-Übergänge auf Kosten der Medium-High-Übergänge bei Präparation 4 legt also eine Mobilität des TBP-NC2-Subkomplexes nahe, deren Dynamik von der DNA-Knickbewegung überlagert wird.

Die Analyse mit Hidden Markov Modellen liefert Raten, die eine Abhängigkeit vom verwendeten Promotor zeigen. Die Präparationen 1 und 2 mit dem Promotor AdML zeigen im Vergleich zu den Präparationen 3 und 4 mit dem Promotor H2B insgesamt eine deutlich höhere Dynamik. Die Wirkung von NC2 ist demnach nicht auf den Promotor AdML beschränkt, wenngleich die Dynamik mit H2B deutlich reduziert ist.

Ein Vergleich der Präparation 1 und 2, bei denen sowohl unterschiedlich lange DNA-Sequenzen verwendet wurden als auch die Immobilisierung der DNA am jeweils entgegen gesetzten Ende stattfand, liefert dieselben Zustände als auch dieselben Raten. Sowohl die Länge der DNA-Sequenz als auch die Immobilisierungsrichtung können demnach als Ursache für die beobachtete Dynamik eindeutig ausgeschlossen werden.

### **Kooperation**

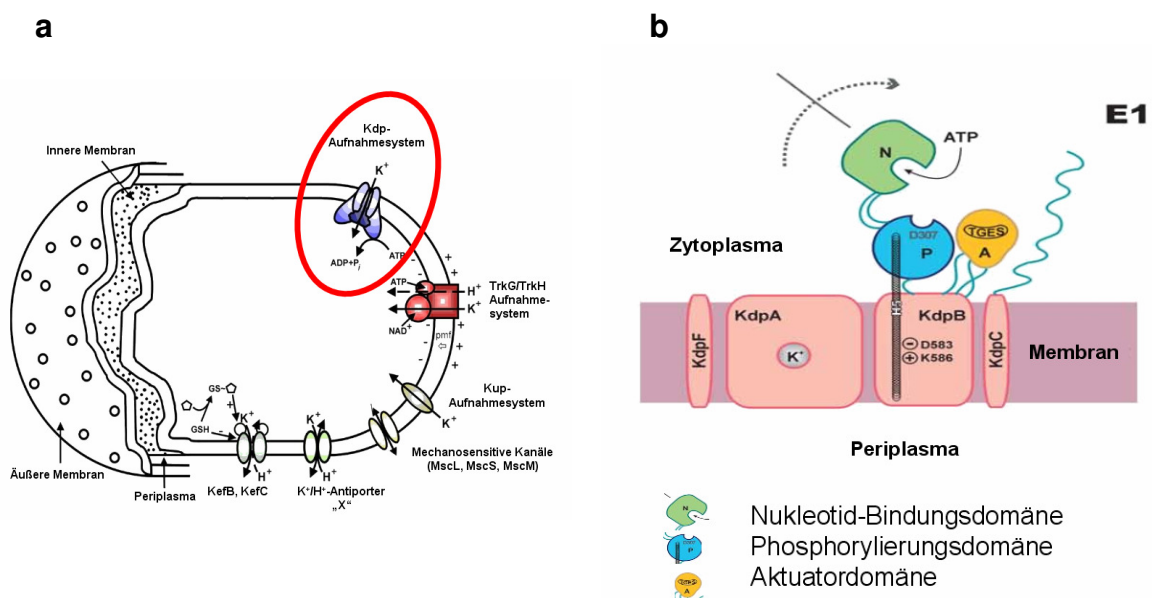
Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Schlüsche und Prof. Dr. Don C. Lamb (Ludwig-Maximilians-Universität München, Department Chemie und Biochemie, Physikalische Chemie I, Butenandtstr. 11, D-81377 München) durchgeführt. Die Messdaten wurden von Dr. Peter Schlüsche in München erzeugt, die Hidden Markov Auswertung wurde in Stuttgart durchgeführt.



## 5 Der Kdp-Transporter

Um einen Ionengradienten entlang einer biologischen Membran zu betreiben ist ein aktiv regelbarer Mechanismus für einen Ionentransport über diese Membran zwingend. Insbesondere der Transport von Kationen wird durch eine ganze Reihe verschiedener P-Typ ATPasen in Prokaryoten und Eukaryoten [98] unter Verbrauch von ATP [99] katalysiert. Aufgrund ihrer großen Bedeutung wurden insbesondere die eukaryotischen Repräsentanten wie die Sarco(endo)plasmaticum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), die  $\text{Na}^+$ -/ $\text{K}^+$ -ATPasen von Tierzellen und die  $\text{H}^+$ -/ $\text{K}^+$ -ATPasen der Magenschleimhaut (*gastric mucosa*) eingehend auf strukturelle und funktionelle Charakteristika untersucht [100-107].

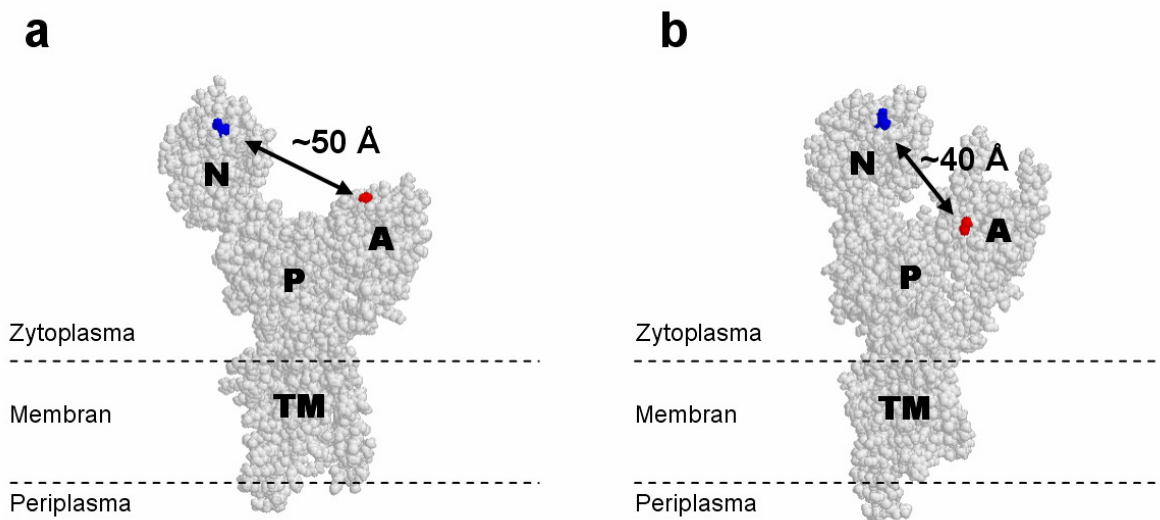
Das Kation  $\text{K}^+$  hat bei *E. coli* viele Aufgaben: Aktivierung zahlreicher Enzyme, Einhalten eines pH-Gleichgewichts (pH-Homeostase) und insbesondere die Erzeugung und Regulierung des Zellinnendrucks (Zell-Turgor), ohne den die Zelle zusammenschrumpfen würde. Daher ist eine hohe Kaliumkonzentration für *E. coli* essentiell. Abbildung 34a zeigt eine Übersicht über Kalium-Transport-Proteine in der inneren Zellmembran von *E. coli*. Als spezifischer Kalium-Abfluss steht das



**Abbildung 34:** (a) Kalium-Transporter in *E. coli*. Die Fülle verschiedener Transportsysteme, mit dem eine Zelle ausgestattet ist, demonstriert die Wichtigkeit, die Kaliumkonzentration aktiv steuern zu können. Im vorliegenden Experiment wurde der KdpFABC-Komplex untersucht. Er ist in der Lage, unter ATP-Verbrauch Kalium-Ionen aktiv in die Zelle zu befördern und gehört zu den leistungsstärksten bekannten Kalium-pumpen. (b) Die Pumpe ist ein Komplex aus mehreren Untereinheiten, die alle in der inneren Zellmembran eingebaut sind. Die B-Untereinheit ist während ATP-Hydrolyse starken Konformationsänderungen unterworfen.

KefB/KefC-System zusammen mit einem postulierten Kalium-Protonen-Antiporter zur Verfügung. Zusätzlich verhindert ein automatisches Öffnen mechano-sensitiver Kanäle ein Platzen der Zelle bei einem plötzlichen osmotischen Druckabfall. Das Kup-System, das TrkG/TrkH-System sowie das Kdp-System bilden die wichtigsten Kaliumaufnahme-Wege der Zelle. Das Kdp-System ist im Vergleich zu den beiden anderen Systemen ein Transportsystem mit hoher Affinität und wird über den Zwei-Komponenten-Signalweg KdpD/KdpE gesteuert. Demnach wird das Kdp-System erst bei einem plötzlichen osmotischen Überdruck oder bei Kaliummangel synthetisiert. Insofern bildet der Kdp-Komplex das Notstandssystem zur Kalium-Aufnahme.

Der Kdp-Komplex aus *Escherichia coli* gehört zwar zur Familie der P-Typ-ATPasen, hat aber bedingt durch seine spezielle Zusammensetzung aus vier Untereinheiten (KdpA, KdpB, KdpC und KdpF) einzigartige Eigenschaften (Abbildung 34b). Nur die Untereinheit KdpB (72 kDa) zeigt die für P-Typ-ATPasen typischen strukturellen und funktionellen Abhängigkeiten vom Zustand der ATP-Hydrolyse. Wie alle Mitglieder dieser Familie ist KdpB zusammengesetzt aus einer Transmembran-Domäne (TM) und drei wasserlöslichen Domänen: die Nukleotid-Binde-Domäne (N-Domäne), die Phosphorylierungs-Domäne (P) und die Aktuator-Domäne (A) (Abbildung 35). Darüber hinaus ermöglicht KdpB die Ausbildung eines



**Abbildung 35:** Die B-Untereinheit des Kdp-Transporters mit der Nukleotid-Bindungsdomäne (N-Domäne), Phosphorylierungsdomäne (P-Domäne) und Aktuator-domäne (A-Domäne). Es sind aus SERCA zwei Kristallstrukturen bekannt, die offene E1-Struktur mit großem Abstand zwischen N- und A-Domäne (a) und die geschlossener E2-Struktur mit einem verringertem Abstand zwischen N- und A-Domäne (b). Um die Konformationsänderungen zu verfolgen, wurde je ein Fluorophor an die N- und die A-Domäne gebunden (blau und rot) und somit ein zeitabhängiges FRET-Signal beobachtet.

transienten Phosphatintermediat durch Autophosphorylierung eines konservierten Aspariginsäurerestes, welches diese Klasse von Enzymen von anderen ATPasen trennt [108]. Das Fehlen der Ionenbindungsstelle in der TM-Domäne von KdpB und die Überantwortung der Translokation des Substrates an das Polypeptid KdpA (59 kDa) bilden einzigartige Eigenschaften dieser P-Typ-ATPase [109-112].

Der für diese Aufgabenteilung nötige Kopplungsmechanismus konnte bisher noch nicht geklärt werden. KdpB zeigt einen stark konservierten Dipol in der Transmembranhelix 5 der TM-Domäne, welche entscheidend für die Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse in KdpB und dem Ionentransport in KdpA ist [113].

Von der Untereinheit KdpC (21 kDa) wurde berichtet, dass sie für die Aktivität des Komplexes eine essentielle Rolle einnimmt [114]. Sie enthält eine N-terminale Transmembranhelix gefolgt von einer umfangreichen zytoplasmatischen Erweiterung. ATP kann an den wasserlöslichen Teil über den Riboseres des Nukleotides gebunden werden, was die Vermutung nahe legt, dass KdpC als katalytisches Chaperon fungiert und so mit KdpB eine kooperative ATP-Bindung ermöglicht [115].

Die Untereinheit KdpF (3 kDa) besteht aus nur einer Transmembranhelix ohne weitere cytoplasmatische oder periplasmatische Erweiterungen. Dennoch stellt es einen integralen Bestandteil im Gesamtkomplex dar. Man nimmt an, dass diese Untereinheit vor allem *in vitro* zur Stabilität des Komplexes beiträgt [116].

Trotz der Unterschiede in der Organisation der Untereinheiten zu anderen P-Typ-ATPasen sind deren Reaktionszyklen im Wesentlichen gleich. Zwei strukturell und biochemisch verschiedene Hauptzustände bilden das Hauptmerkmal des Reaktionszyklusses [99], der offene E1-Zustand und der geschlossene E2-Zustand (Abbildung 35). Binden von ATP im E1-Zustand und eine folgende Phosphorylierung des konservierten Aspartatrests in der P-Domäne führt zum Zustand E1~P. Die Umwandlung in den Zustand E2-P ist mit dem Ionentransport über die Membran gekoppelt. Nachfolgende Dephosphorylierung des Aspartatrests führt zur Ausbildung des Zustands E2. Man geht davon aus, dass die N- und A-Domäne während dieses Reaktionszyklusses starke Dreh- und Kippbewegungen vollführen [100, 101]. Dieser Reaktionszyklus, der sich auf zwei Hauptkonformationen inklusive Phosphorylierung, Substratbindung und -abgabe stützt, ist als Reaktionsschema unter dem Namen „Albert-Post Mechanismus“ bekannt geworden [117, 118].

Dennoch konnten bisher die Konformationsänderungen zwischen E1 und E2 nur sehr indirekt abgeleitet werden. So gelang die Kristallisation von Proteinen in

bestimmten Konformationen, welche Subschritte im Reaktionszyklus repräsentieren. Weitere Hinweise erhielt man aus der Modellierung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz oder auch durch proteolytische Verdauexperimente (für eine Übersicht, siehe Ref. [45, 119-122]). Über die Verweilzeiten der beiden Zustände E1 und E2 und die Flexibilität der N- und A-Domäne in diesen Zuständen ist sowohl für das aktive als auch für das inhibierte Enzym nur sehr wenig bekannt.

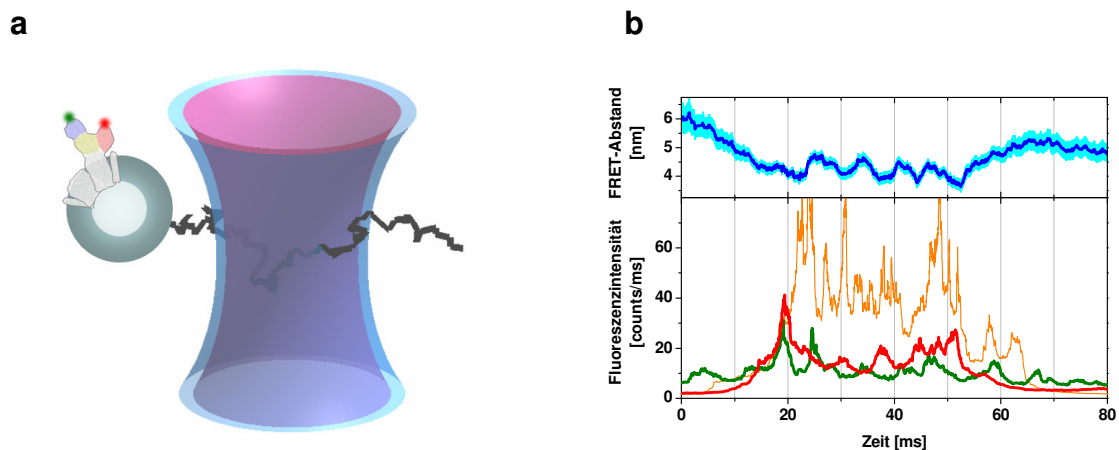
## 5.1 Einzelmolekül Daten

Um eine fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zu ermöglichen wurden aufgereinigte KdpFABC-Komplexe in Liposomen rekonstituiert und anschließend mit fluoreszierenden Maleimiden an der N- und der A-Domäne markiert. Der Einsatz kleiner fluoreszierender Maleimide für die Fluoreszenzmarkierung anstatt vergleichsweise große fluoreszierende Fusionsproteine wie z.B. GFP verringert den Einfluss auf die Proteindynamik, da auf diese Weise weitgehend native Bedingungen ermöglicht werden. Die Rekonstitution des Proteinkomplexes in Liposomen ist aus zwei Gründen erforderlich: Erstens sind Membranproteine wie die Kaliumpumpe meist nur in einer Membran stabil. Zweitens wird die Diffusionszeit der Komplexe aufgrund der Größe des Liposoms ( $\varnothing \sim 100$  nm) um etwa zwei Größenordnungen auf einige zehn Millisekunden heraufgesetzt.

Im Einzelmolekülmikroskop ergibt sich beim Durchgang eines fluoreszenzmarkierten Partikels durch den Laserfokus ein *Burst* (engl. Anhäufung) von Photonen (Abbildung 36). Alle Informationen über die momentane Konformation des Proteins müssen aus solchen Bursts extrahiert werden. Eine Hilfe dafür bietet die eigens für diese Aufgabe geschriebene Software *Burst Analyzer* [123], die im Rahmen dieser Arbeit stetig weiterentwickelt wurde (siehe Abschnitt 2.6).

Das Signal derart langsam diffundierender Partikel hebt sich deutlich von fluoreszierenden Verunreinigungen in der Lösung ab. Während des langsamen Durchgangs durch den Laserfokus können die erwarteten Konformationsänderungen direkt zeitaufgelöst aufgenommen werden. Eine funktionale Immobilisierung von Membranproteinen ist damit nicht erforderlich, auch wenn sich die Qualität der Messdaten dadurch prinzipiell verbessern ließe. Bisher sind alle Versuche zur funktionalen Immobilisierung gescheitert.

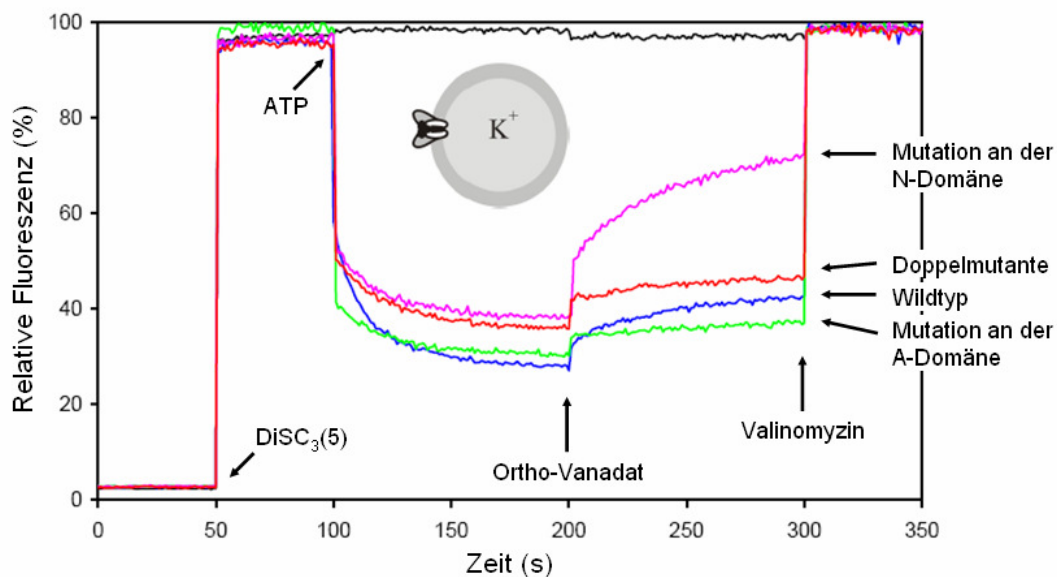
Als messtechnische Methode kam in dieser Arbeit Einzelmolekül-FRET mit alternierender Laseranregung (DCO-ALEX) zum Einsatz, um die Konformationsübergänge der Untereinheit KdpB während ATP Hydrolyse direkt messen zu können, siehe Abschnitt 2.5. Die Messung mit ALEX erlaubt die zeitaufgelöste simultane Aufnahme der Fluoreszenzintensität sowie der Fluoreszenzlebensdauer. Darüber hinaus konnten durch die alternierende Anregung des Donors als auch des Akzeptors photophysikalische Effekte von FRET-Ereignissen unterschieden und herausgefiltert werden. Spektroskopisch standen zwei Messkanäle zur Verfügung, die das Donor- und Akzeptorsignal durch entsprechende Farbfilter von einander trennten. Über die gepulste Anregung wurden zwei Zeitfenster erzeugt, die die Photonen nach Anregung des Donors von den Photonen nach Anregung des Akzeptors trennten. Insgesamt ließen sich aus den beiden spektralen Kanälen und den beiden Zeitfenstern vier Zeitspuren erzeugen, wobei drei davon relevante Messdaten enthielten: Zeitspur 1 waren die FRET-Donor-Photonen des Donorkanals nach Anregung des Donors, Zeitspur 2 waren die FRET-Akzeptor-Photonen des Akzeptorkanals nach Anregung des Donors, Zeitspur 3 waren die Akzeptortest-Photonen des Akzeptorkanals nach Direktanregung des Akzeptors.



**Abbildung 36:** (a) Schema Messprinzip. Das FRET-markierte Membranprotein ist in ein Liposom ( $\text{\O} \approx 100 \text{ nm}$ ) rekonstituiert und kann frei in der Lösung diffundieren. Zwei Laser regen in getrennten Zeitfenstern nacheinander beide Fluorophore an, den Donor für die FRET-Abstandsmessung (blauer Fokus) und den Akzeptor als Verifizierung (roter Fokus). (b) Beim Durchgang durch den konfokalen Laserfokus wird ein *Burst* erzeugt, ein FRET-Signal mit stark fluktuierender Summenintensität. Durch die Nutzung beider Laser lässt sich Fluorophor-Dynamik von FRET-Ereignissen unterscheiden. FRET-Donor-Fluoreszenz in grün, FRET-Akzeptor-Fluoreszenz in rot, Direktanregung des FRET-Akzeptors in orange, FRET-Abstand in blau mit Vertrauensintervall in hellblau.

Für die objektive Analyse der FRET-Trajektorien kamen die hier vorgestellten und weiterentwickelten Hidden-Markov-Modelle zum Einsatz, die eine Modellierung der Zustände erlauben und so FRET-Abstände, Verweildauern und Übergangsraten liefern. Dadurch gelang erstmals eine quantitative kinetische Analyse der Dynamik sowohl des aktiven Enzyms als auch des durch Ortho-Vanadat und OCS (Oligocyclic suboxides) inhibierten Enzyms.

Die spezifische Aktivität der rekonstituierten, FRET-markierten Proteinkomplexmutante darf nach allen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp nicht stark verringert sein. Ensemble-Messungen mit dem potentialsensitiven Fluorophor DiSC<sub>3</sub>(5) zeigen einwandfrei die kaliumspezifische Aktivität der Mutante (Abbildung 37, Tabelle 6). Nach Zugabe des Fluorophors baut dieser sich instantan (im Rahmen der Zeitauflösung) in die Lipiddoppelschicht der Liposomen ein (bei 50 Sekunden) und



**Abbildung 37:** Elektrogener  $K^+$ -Transport von rekonstituierten Wildtyp-KdpFABC-Komplexen und Mutanten. Die fluorometrischen Messungen wurden mit 50 mM KCl innerhalb und außerhalb der Proteoliposomen durchgeführt. Der ATP-getriebene Ausstoß von  $K^+$  durch invertiert rekonstituierte KdpFABC-Komplexe wurde durch die Zugabe von 1 mM ATP zum angegebenen Zeitpunkt ausgelöst. Die Translokation von  $K^+$  erzeugt ein Membranpotential, welches gut durch den potentialsensitiven Fluorophor DiSC<sub>3</sub>(5) detektiert wird. Die Zugabe von Ortho-Vanadat führt zur spezifischen Inhibierung der Transportaktivität und dient so als Kontrolle für den aktiven Transport durch die P-Typ ATPase. Die abschließende Zugabe von Valinomycin dient als Kontrolle der  $K^+$ -Spezifität des Signals. Farbzuordnung der vier Fluoreszenzspuren: Liposomen (schwarz), KdpFABC Wildtyp (blau), KdpFABCΔCys-KdpB:A261C/A609C/G150C (grün), KdpFABCΔCys-KdpB:A261C/A609C/A407C (magenta), KdpFABCΔCys-KdpB:A261C/A609C/G150C/A407C (rot). Alle dargestellten Mutanten zeigen eine zum Wildtyp nahezu identische Kalium-Transportkinetik.

zeigt seine maximale Fluoreszenzintensität. Nach Zugabe von ATP (bei 100 Sekunden) beginnen die Kaliumtransporter,  $K^+$  in die Liposomen zu pumpen. Dadurch bildet sich ein elektrisches Potential über die Lipiddoppelschicht aus, was zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes führt. Da die Liposomen für  $K^+$  nicht ganz dicht sind, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen ein- und austretenden  $K^+$ -Ionen, bis durch die Zugabe von Ortho-Vanadat (bei 200 Sekunden) die Kaliumtransporter inhibiert werden. Da weiter Kaliumionen aus den Liposomen austreten, baut sich das Membranpotential ab, was durch den potentialsensitiven Fluorophor angezeigt wird. Das Ionophor Valinomycin kann selektiv und sehr schnell Kaliumionen durch Komplexbildung durch die Lipidmembran transportieren. Die Zugabe von Valinomycin bei 300 Sekunden bewirkt dadurch einen schlagartigen Abbau des Membranpotentials, wodurch die Fluoreszenzintensität des Fluorophors wieder auf den Ausgangspegel zurückspringt.

KdpFABC $\Delta$ Cys- KdpB:A261C/A609C/G150C (Mutation an der A-Domäne)	Expression von kdpFAHisBC; Substitution aller Cysteine innerhalb des KdpFABC-Komplexes außer C261 und C609 von KdpB; Substitution G150C in KdpB
KdpFABC $\Delta$ Cys- KdpB:A261C/A609C/A407C (Mutation an der N-Domäne)	Expression von kdpFAHisBC; Substitution aller Cysteine innerhalb des KdpFABC-Komplexes außer C261 und C609 von KdpB; Substitution A407C in KdpB
KdpFABC $\Delta$ Cys- KdpB:A261C/A609C/G150C/A407C (Mutation an der A- und N-Domäne)	Expression von kdpFAHisBC; Substitution aller Cysteine innerhalb des KdpFABC-Komplexes außer C261 und C609 von KdpB; Substitution G150C und A407C in KdpB

**Tabelle 6: Verwendete Mutationen des KdpFABC-Komplexes**

## 5.2 Automatische Burstmarkierung

Die Rekonstitution des FRET-markierten Kdp-Transporters in frei diffundierende Liposomen führt zu einer diffusionsbegrenzten Messzeit pro Molekül von im Mittel etwa 16 ms. Diese Zahl lässt sich direkt aus der Autokorrelationsfunktion des Akzeptortestkanals bestimmen, siehe Abbildung 38a. Das folgende Modell beschreibt fluoreszierende Teilchen mit einer festen Diffusionszeit  $\tau_D$  in einem Laserfokus mit dem Formfaktor  $\omega_z$  und einer Konzentration, die im Mittel zu  $N$  Teilchen im Laserfokus führt:

$$ACF(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \omega_z^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (44)$$

Ein Levenberg-Marquardt-Fit mit dem obigen Modell liefert die Parameter:  $\tau_D=15.7$  ms,  $N=0.52$  und  $\omega_z=0.09$ .

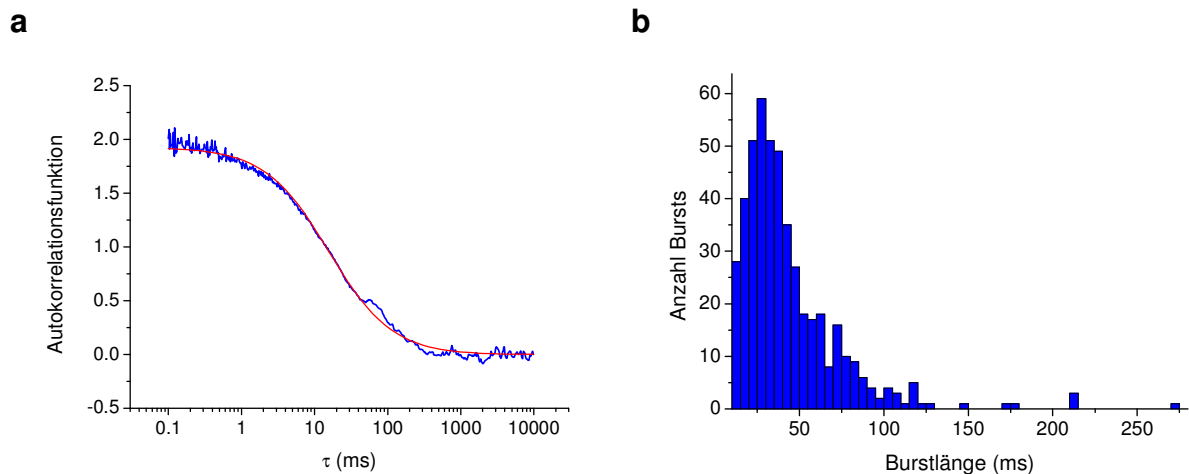
Für eine automatische Burstmarkierung wurde die Software *Burst Analyzer* verwendet, die eine automatische Burstmarkierung über Schwellenwerte erlaubt (siehe Abschnitt 2.6). Der Schwellenwertalgorithmus stellt drei Parameter für jede Zeitspur zur Verfügung sowie drei weitere Parameter, die die Dauer der Markierungen betreffen. Für die Identifizierung der Bursts wurde hier ausschließlich der Akzeptortest-Kanal (Zeitspur 3) verwendet, da er keine FRET-abhängigen Intensitätsschwankungen beinhaltet. Sobald die Zählrate über den Schwellenwert *MinPegel* steigt, wird eine Burstmarkierung erzeugt. Die Start- und Stopplanke wird von diesem Punkt an so weit ausgeweitet, bis die Zählrate mindestens für die Dauer von *DauerAus* unter den Schwellenwert *Flanken* sinkt. Die Burstmarkierung wird nur dann beibehalten, wenn eine mittlere Zählrate zwischen der Start- und Stopposition von *MinAVG* überschritten wird und zudem die Länge der Burstmarkierung zwischen den durch *DauerMin* und *DauerMax* gelegten Grenzen liegt. Die hier verwendeten Werte zeigt Tabelle 7.

Zeitspur 1	FRET-Donor, Anregung blau, kein Zeitfenster
Zeitspur 2	FRET-Akzeptor, Anregung blau, Zeitfenster 25,5...41 ns
Zeitspur 3	FRET-Akzeptor, Anregung rot, Zeitfenster 41...46,5 ns
MinPegel, Zeitspur 3	20 counts/ms
Flanken, Zeitspur 3	10 counts/ms
MinAVG, Zeitspur 3	5 counts/ms
Dauer Min	10 ms
Dauer Max	2000 ms
Dauer Aus	10 ms

Tabelle 7: Parametersatz zur automatischen Burstmarkierung der Auswertesoftware *Burst Analyzer*.

Diese Werte führen zu Bursts mit einer mittleren Länge von 43 ms, siehe Abbildung 38b. Da kurze Bursts (< 10 ms) nicht markiert werden und demnach nicht in die Verteilung einfließen, verschiebt sich der Mittelwert zu längeren Zeiten.





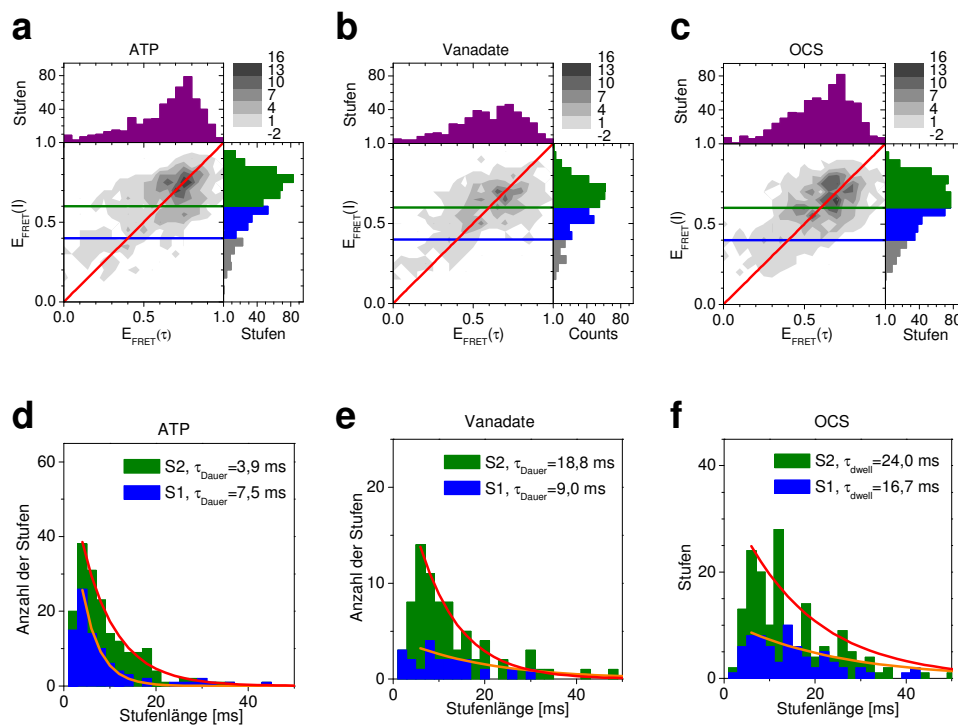
**Abbildung 38:** (a) FCS der Proteoliposomen aus der Zeitspur des Akzeptortests (blaue Kurve). Die frei diffundierenden Liposomen mit einer Größe von etwa  $\text{\O} = 100$  nm zeigen im gewählten Laserfokus eine Diffusionszeit von 15.7 ms (rote Kurve). Die rote Kurve ist eine Kurvenanpassung mit dem Modell. (b) Burstlängenverteilung der automatischen Burstmarkierung. Es ergibt sich eine mittlere Burstlänge von 43.2 ms.

### 5.3 Manuelle Auswertung

In die Bursts wurden manuell Bereiche konstanter FRET-Effizienz markiert. Dabei musste nicht jeder Zeitbin innerhalb eines Bursts erfasst werden. Über die statistischen Eigenschaften der auf diese Weise erhaltenen Stufen konnten Rückschlüsse auf die Konformationsdynamiken unter verschiedenen biochemischen Bedingungen gemacht werden.

Photophysikalische Effekte der Fluorophore können eine spektrale Verschiebung erzeugen und somit als FRET-Signale missinterpretiert werden. Eine gepulste Anregung mit Pikosekunden Pulslänge und eine anschließende zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzphotonen liefern zur Intensität auch die Lebensdauer des angeregten Zustands. Die FRET-Effizienz kann somit zum einen aus der Lebensdauer des Donors, zum anderen aus der relativen Fluoreszenzintensität beider FRET-Kanäle ermittelt werden. Da die Signale beider Methoden vollständig voneinander unabhängig sind, erhält man durch die gepulste Messung eine zusätzliche Dimension im Datenraum [124]. Korrelieren beide Größen miteinander, haben sie die gleiche Ursache. FRET-Ereignisse liegen demnach in einem Korrelationsplot von FRET-Effizienz aus Lebensdauer und FRET-Effizienz aus Intensitäten im Rahmen der Messgenauigkeit auf einer Ursprungsgeraden, was bei den hier vorliegenden Daten der Fall ist, siehe Abbildung 39a-c. Andere Ursachen führen zu Datenpunkten außerhalb dieser Geraden.

Die aus den relativen Intensitäten gewonnenen FRET-Effizienzen dienen zum Aufspüren der erwarteten Konformationen. Stufen mit FRET-Effizienzen um 70% zeugen von einem Fluorophorabstand von etwa 4 nm und entsprechen demnach der geschlossenen Konformation E2 aus der SERCA-ATPase. Für 50% FRET-Effizienz ergibt sich ein Fluorophorabstand von ca. 5 nm, somit entspricht dieser Zustand der offenen Konformation E1. Analog hierzu wurden Stufen mit einer FRET-Effizienz von über 60% dem Zustand S2 zugeordnet, Stufen mit FRET-Effizienzen zwischen 40% und 60% gehören zu S1 und Stufen mit kleineren FRET-Effizienzen werden zum Zustand S3 zusammengefasst. Aus den relevanten Populationen S1 und S2 wird je ein Stufenlängen-Histogramm erzeugt. Das monoexponentielle Verhalten des Histogramms legitimiert die Annahme eines zugrunde liegenden Markov-Prozesses. Ein



**Abbildung 39: Manuelle Stufenanalyse (a-c)** Die FRET-Effizienz lässt sich aus der Lebensdauer oder alternativ aus der Fluoreszenzintensität bestimmen. Trägt man beide gegeneinander auf, so liegen alle FRET-Ereignisse im Rahmen des Signal-Rauschens wie hier zu sehen auf einer Ursprungsgeraden, unerwünschte photophysikalische Veränderungen der Fluorophore führen zu Datenpunkten abseits der Geraden. Um die gesuchten Konformationen zu identifizieren, wurden alle Stufen mit einer FRET-Effizienz >60% der Population S2 (grün, gemäß E2 aus SERCA) und Stufen mit einer FRET-Effizienz im Bereich 40...60% der Population S1 (blau, gemäß E1 aus SERCA) zugeordnet. Die verbleibenden Low-FRET Ereignisse werden S3 zugeordnet (grau). (d-f) Histogramm über die Stufenlängen aufgeteilt nach den Populationen S1 und S2 mit monoexponentiellem Fit. Die Inhibitoren Vanadat und insbesondere OCS führen zu einer Verlängerung der Stufenlänge.

entsprechender Fit liefert die mittlere Verweildauer, die somit ein charakterisierender Parameter der verschiedenen Zustände darstellt (Abbildung 39d-f). Entgegen den Erwartungen können keine der beiden Inhibitoren die Domänenbewegung des Proteinkomplexes vollständig einfrieren.

Die Wirkung der Inhibitoren zeigt sich in einer Verlängerung der mittleren Verweildauer und führt somit zu einer moderaten Verlangsamung der Konformationskinetik.

#### 5.4 Auswertung mit Hidden Markov Modelle

Der Aufreinigungsprozess der Proteoliposomen nach der Farbstoffmarkierung konnte nicht den freien Farbstoff komplett aus der Lösung entfernen. Im Einzelmolekülsignal lassen sich kurze Spikes ( $<1$  ms) auf dem Donorkanal von freiem Alexa488 und auf dem Akzeptorkanal von freiem Atto655 wiederfinden, die den einige Millisekunden langen Bursts der Proteoliposomen überlagert sind. Solche Zeitbins verfälschen die FRET-Abstandsinformation und werden zudem durch ihre hohe Helligkeit besonders stark gewichtet. Deshalb werden die Einzelmoleküldaten vor der HMM-Analyse über Schwellenwertfilter gefiltert, um solche unbrauchbaren Zeitbins aus der Analyse auszuschließen:

- Ist das Summensignal der beiden FRET-Kanäle um mehr als 80 counts/ms größer als das Akzeptortest-Signal, so ist dem gewünschten Signal ein sogenanntes „Donor-Only“-Ereignis überlagert. Diese Zeitbins werden markiert.
- Ist das Summensignal der beiden FRET-Kanäle um mehr als 80 counts/ms kleiner als das Akzeptortest-Signal, so ist dem gewünschten Signal ein sogenanntes „Akzeptor-Only“-Ereignis überlagert. Auch diese Zeitbins werden markiert.
- Sinkt die Summenintensität auf einen Wert unter 8 counts/ms oder das Akzeptortest-Signal sinkt unter den Wert von 8 counts/ms, so werden auch diese Zeitschritte markiert. Die HMM-Analyse kommt zwar mit beliebig kleinen Zählraten zurecht, die Zustandszuordnung ist dann aber so ungenau, dass solche Zeitbins ausgeschlossen werden.
- Wenn mehr als 80% der Zeitschritte eines Bursts durch diesen Rohdatenfilter markiert wurde, so wird der ganze Burst aus der Analyse ausgeschlossen.

Für alle verbleibenden markierten Zeitschritte wird deren Varianz auf Unendlich gestellt, was einer Gewichtung von 0 entspricht. Dadurch verlieren diese Zeitbins mit den neuen Schätzfunktionen ihren Einfluss auf die Bestimmung der HMM-Parameter. Ausschneiden solcher Zeitbins würde die Stufenlängen verändern und somit zu falschen Ergebnissen führen. Nach dem Rohdatenfilter fließen ca. 60-75% der Zeitbins in die HMM-Analyse (Tabelle 8).

blank	KCL	ATP	Vanadat 50 $\mu\text{M}$	Vanadat 200 $\mu\text{M}$	OCS
70,3 %	61,6 %	69,4 %	75,6 %	73,9 %	73,8 %

**Tabelle 8: Anteil der verwendeten Zeitbins für die HMM-Analyse nach Anwendung der Rohdatenfilter.**

Für die Hidden Markov Analyse wurde zunächst ein Modell mit drei Zuständen angenommen mit normalverteilten Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen für die FRET-Effizienzen. Die modifizierten Schätzfunktionen führen anhand der Summenzählrate zu einer Anpassung der Breite dieser Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen. Nur so wird eine HMM-Analyse auf Einzelmoleküldaten in Lösung überhaupt erst möglich (siehe Abschnitt 3.8).

Für die Bestimmung der HMM-Parameter wird nun der Vorwärts-Rückwärts-Algorithmus verwendet, der iterativ durch Optimierung der Parameterwerte das Loglikelihood der Daten steigert, bis dessen Zunahme unter einen Grenzwert sinkt (Abschnitt 3.5). Auf diese Weise erhält man einen Satz von Parameterwerten, der am besten zu den Daten passt. Eine Anwendung eines klassischen HMM mit klassischen Schätzfunktionen führt nicht in jedem Iterationsschritt zu einer Erhöhung des Likelihoods, der Lernalgorithmus kann demnach nicht mehr konvergieren und das ganze Verfahren scheitert.

Die HMM-Parameter charakterisieren die Messdaten. Für die drei Zustände wurden FRET-Effizienzen ermittelt, die sich in Inter-Fluorophor-Abstände umrechnen lassen, außerdem ergibt sich eine Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix, aus der sich die Übergangsraten und die Verweildauern bestimmen lassen. Das Ergebnis ist in Tabelle 9 dargestellt. Darüberhinaus lässt sich anhand dieser Parameter für jeden Zeitbin in den Bursts mit Hilfe des Viterbi-Pfads der wahrscheinlichste Zustand festlegen (siehe Kapitel 3.6). Zusammenhängende gleiche Zustände bilden eine Stufe. Erst die Durchsicht dieser automatischen Stufenmarkierung vermittelt einen Eindruck der

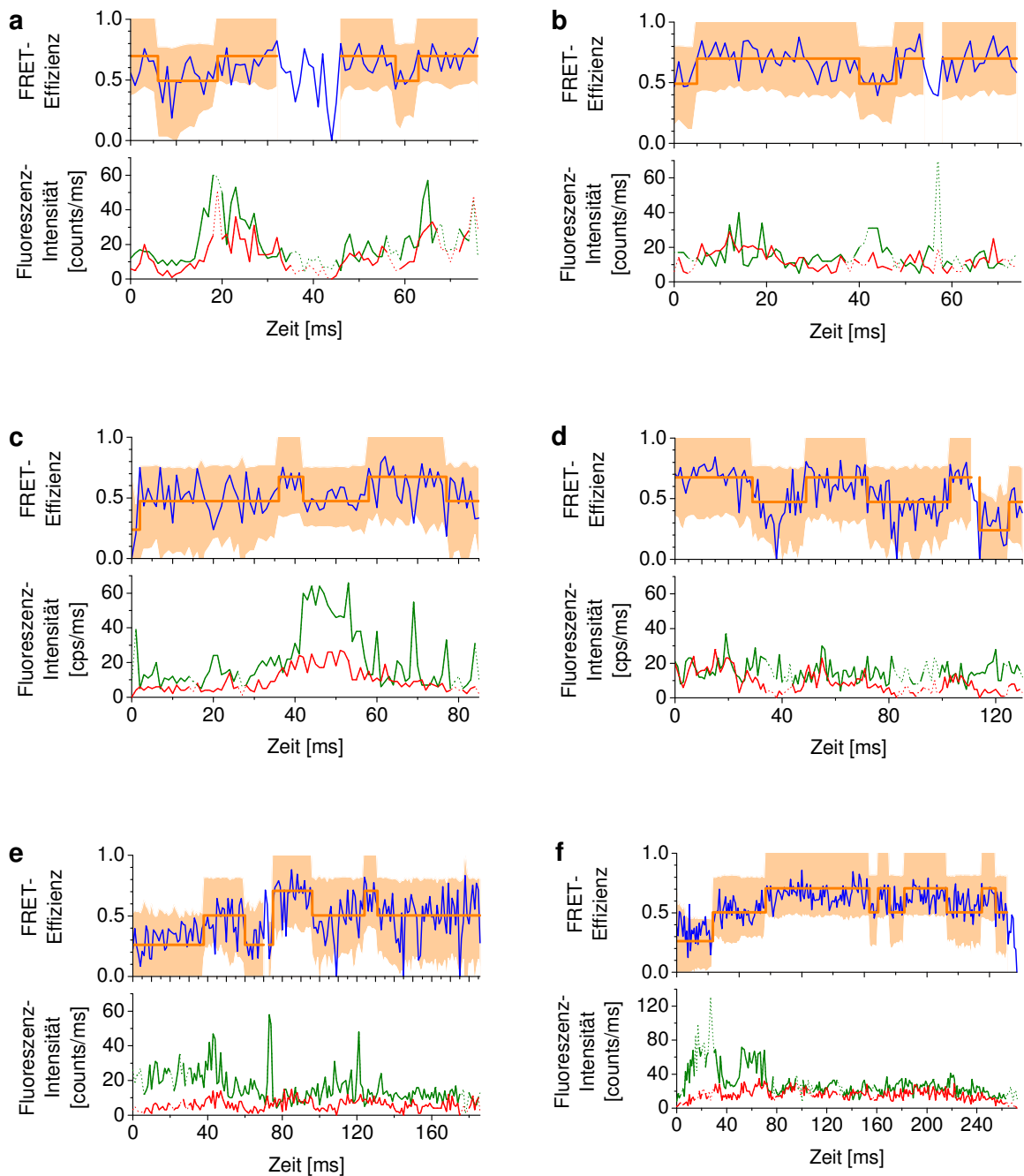
Qualität der Analyse. Der nächste Abschnitt behandelt daher die Stufenanalyse und zeigt Beispieltrajektorien.

		-/-	+KCl	+KCl +ATP	+KCl +ATP +Vanadat [50 $\mu$ M]	+KCl +ATP +Vanadat [200 $\mu$ M]	+KCl +ATP +OCS
FRET- Effizienzen	S3	25 %	24 %	22 %	26 %	24 %	26 %
	S1	51 %	53 %	49 %	49 %	47 %	50 %
	S2	71 %	73 %	70 %	69 %	67 %	71 %
Fluorophor- abstände	S3	6,0 nm	6,0 nm	6,2 nm	6,0 nm	6,1 nm	5,9 nm
	S1	5,0 nm	4,9 nm	5,0 nm	5,0 nm	5,1 nm	5,0 nm
	S2	4,3 nm	4,2 nm	4,3 nm	4,4 nm	4,4 nm	4,3 nm
Verweil- dauern	S3	13 ms	11 ms	10 ms	11 ms	12 ms	14 ms
	S1	16 ms	18 ms	15 ms	17 ms	18 ms	19 ms
	S2	16 ms	15 ms	13 ms	13 ms	15 ms	14 ms
Übergangs- raten	S1→S2	37 s <sup>-1</sup>	34 s <sup>-1</sup>	41 s <sup>-1</sup>	31 s <sup>-1</sup>	29 s <sup>-1</sup>	26 s <sup>-1</sup>
	S2→S1	61 s <sup>-1</sup>	70 s <sup>-1</sup>	79 s <sup>-1</sup>	76 s <sup>-1</sup>	69 s <sup>-1</sup>	73 s <sup>-1</sup>
	S1→S3	27 s <sup>-1</sup>	25 s <sup>-1</sup>	27 s <sup>-1</sup>	30 s <sup>-1</sup>	28 s <sup>-1</sup>	30 s <sup>-1</sup>
	S3→S1	74 s <sup>-1</sup>	87 s <sup>-1</sup>	99 s <sup>-1</sup>	88 s <sup>-1</sup>	81 s <sup>-1</sup>	68 s <sup>-1</sup>

**Tabelle 9: Die 3-Stufen-Hidden Markov Modelle im Vergleich der sechs biochemischen Umgebungen: das inaktive Protein (ohne ATP) ohne und mit KCl, nach Zugabe von ATP und nach Inkubation mit den Inhibitoren Vanadat bzw OCS.**

### 5.4.1 Beispieltrajektorien

Abbildung 40 zeigt auf 1 ms gebinnete Zeitspuren und das Ergebnis der automatischen Stufenmarkierung durch ein 3-Stufen-HMM. Im Wesentlichen sieht man Übergänge zwischen S1 (FRET-Effizienz ~50%) und S2 (FRET-Effizienz ~70%). Der Zustand S3 (~25%) wird deutlich seltener eingenommen. Die Lücken in der Trajektorie werden durch die Rohdatenfilter erzeugt. An dieser Stelle ist entweder die Summenintensität zu gering, das Akzeptortestsignal zu schwach oder ein Donor-Only bzw. Akzeptor-Only-Ereignis ist den Daten überlagert. Die durch die Summenzählrate festgelegte Varianz der berechneten FRET-Effizienz wird als oranges Band dargestellt und durch die blau dargestellte FRET-Trajektorie überlagert.

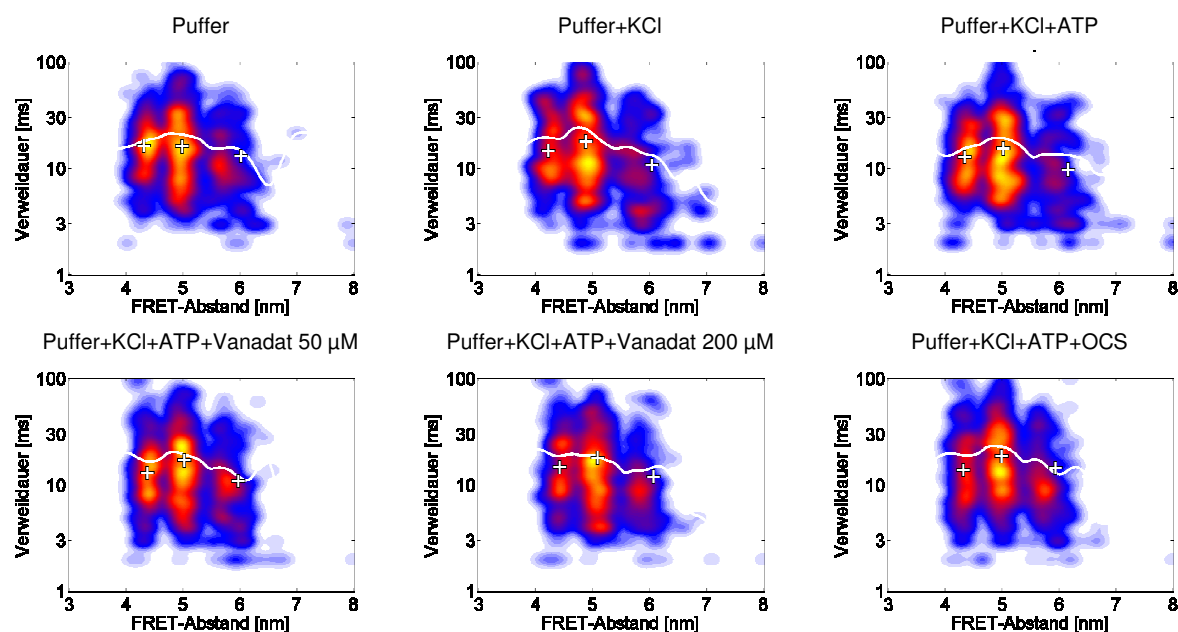


**Abbildung 40: Einzelmolekülpuren mit HMM-Analyse. Unterer Bereich: Fluoreszenz-Intensität des Donorfluorophors (grün) und des Akzeptorfluorophors (rot) eines Photonenbursts. Oberer Bereich: aus den relativen Intensitätsverhältnissen lässt sich zeitaufgelöst das FRET-Signal (blau) bestimmen und mit einem HMM auswerten. Das Ergebnis der Zustandszuordnung des HMMs sowie die vom HMM-Zustand und der Summenintensität abhängigen Breite wird in orange angezeigt. (a-b) Proteoliposomen+Puffer+KCl+ATP. (c-d) nach Zugabe von Vanadat. (e-f) nach Zugabe von OCS.**

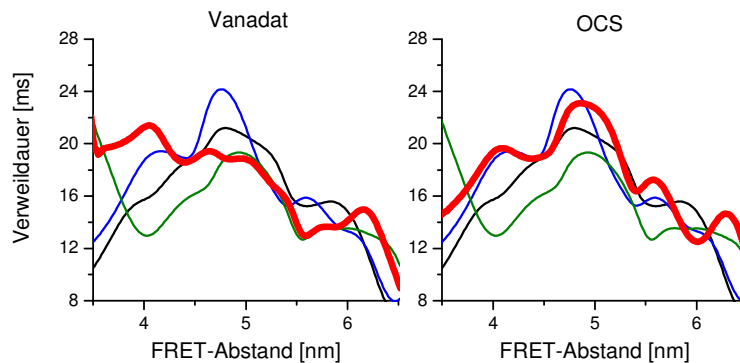
Der Vorteil der zeitabhängigen Gewichtung der Lernparameter kommt bei solchen stark fluktuierenden Trajektorien besonders stark zur Geltung. Ein konventionelles Hidden Markov Modell würde aufgrund einer immer falsch angenommenen (konstanten) Varianz in hellen Bereichen Zustände mit zu großer Länge markieren und in dunkleren Bereichen aufgrund des Rauschens zu kurze Zustände ermitteln.

Trägt man die Verweildauer der Zustände über ihren FRET-Abstand auf, so erhält man einen 2-dimensionalen Dichteplot (Abbildung 41). Die gefundenen HMM-Zustände sind zur Orientierung ebenfalls eingezeichnet. Zusätzlich lässt sich spaltenweise der Mittelwert als Maß für die Verweildauer des Enzyms in Abhängigkeit des Fluorophorabstands ermitteln.

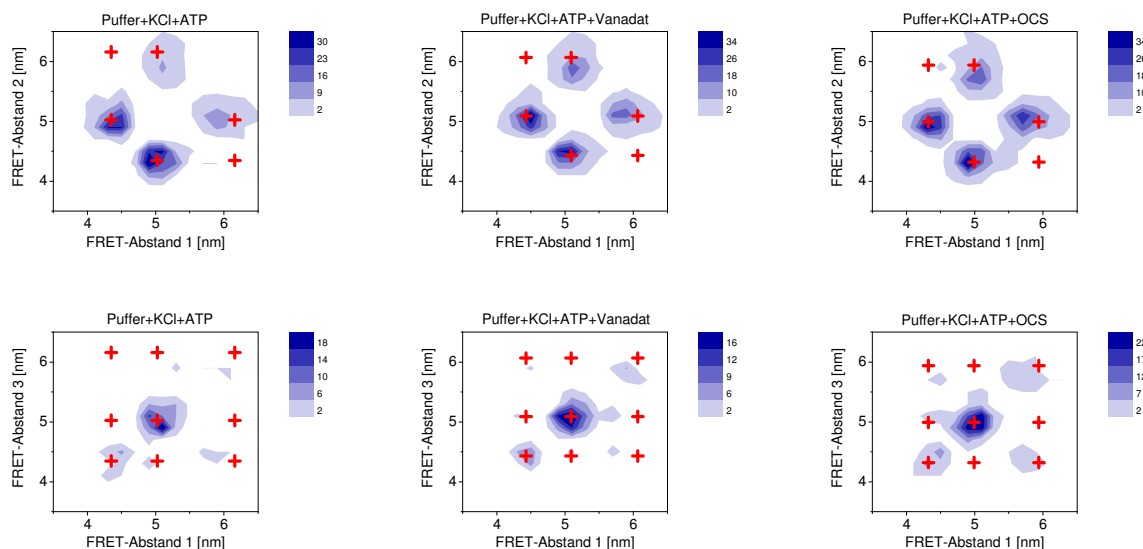
Die Wirkung der Inhibitoren wird durch die FRET-Abstands-aufgelöste Verweildauerkurve klarer. Während die Zugabe von Vanadat nur geringfügig die Verweildauer erhöht insbesondere im Zustand S2 (geschlossen, ~4 nm), führt OCS das System in den nichtaktivierten Zustand nach Zugabe von KCl aber vor Zugabe von ATP über. Die Verweildauerkurve ist nahezu deckungsgleich mit der des nichtaktivierten Systems (Abbildung 42). Auch die noch nicht aktivierten KdpFABC-Komplexe (vor Zugabe von KCl und ATP) zeigen ähnliche Domänenbewegungen. Wirklich eingefrorene Zustände tauchten unter keinen Bedingungen auf.



**Abbildung 41:** Ergebnisse der Stufenmarkierung eines 3-Stufen Hidden-Markov-Modells. Low-FRET (~6 nm) S3, Medium-FRET (~5 nm) S1, High-FRET (~4 nm) S2. Rechnet man spaltenweise die mittlere Verweilzeit aus, so ergibt sich eine Kurve (weiß), die die Verweildauer des Proteins in Abhängigkeit des Fluorophorenabstands auflöst. Für bestimmte typische Reaktionszyklen ergeben sich charakteristische Kurven.

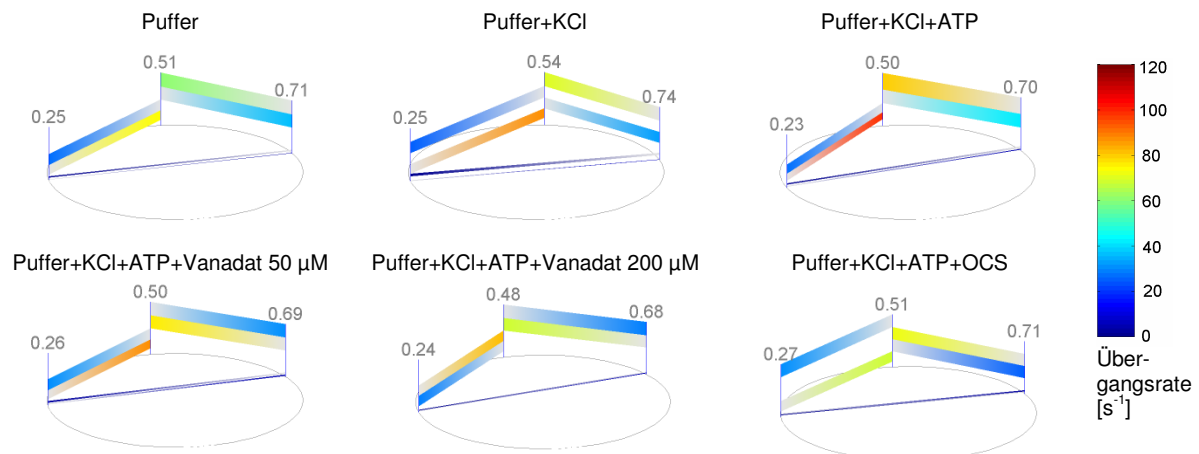


**Abbildung 42:** Verweildauer über FRET-Abstand aus Abbildung 41. Diese abstandsaufgelöste Verweildauerkurve bildet die Langlebigkeit einer Konformation über die Fluorophor-Abstands-Koordinate ab. Unterschiedliche biochemische Bedingungen verursachen verschiedene Kurvenformen. Die Wirkung der Inhibitoren Vanadat (links) und OCS (rechts) wird dadurch deutlich. Farbzunordnung: Proteoliposomen mit Puffer (schwarz), mit Puffer+KCl (blau), mit Puffer+KCl+ATP (grün), mit Puffer+KCl+ATP+Inhibitor (rot). Insbesondere der Inhibitor OCS führt zu einer deutlichen Reduktion der Enzymkinetik. Die Verweildauerkurve ähnelt der Bedingung Puffer+KCl (blau).



**Abbildung 43:** 2D-Histogramm der Sprünge von einer Stufe zu seinem nächsten (erste Zeile) und übernächsten Nachbarn (zweite Zeile) für das mit KCl und ATP aktivierte Enzym (erste Spalte) und nach Zugabe der Inhibitoren Vanadat (zweite Spalte) bzw. OCS (dritte Spalte). Für alle drei Bedingungen wurde am Häufigsten Übergänge zwischen den Zuständen S1 (Medium-FRET) und S2 (High-FRET) beobachtet. Sprünge zwischen S3 (Low-FRET) und S2 (High-FRET) wurden nicht beobachtet.

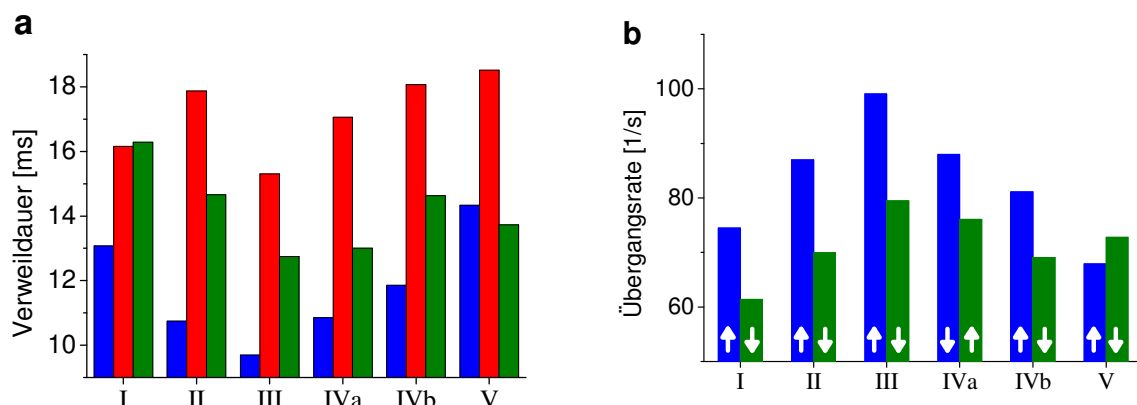




**Abbildung 44: Übergangsraten des 3-Zustands Hidden-Markov-Modells unter den sechs verschiedenen biochemischen Bedingungen. Die Zustände werden durch senkrechte Pfähle entlang eines Einheitskreises symbolisiert, ihre Position wird durch die zugehörige FRET-Effizienzen festgelegt. Die Übergangsrate selbst wird durch die Farbe der verbindenden Bänder visualisiert. Die Dicke der Bänder ist ein Maß für die Häufigkeit der aufgetretenen Übergänge.**

Die FRET-Abstände selbst sind im Wesentlichen unter allen Bedingungen gleich (Abbildung 43). Übergänge treten hauptsächlich zwischen S1 (~5 nm) und S2 (~4 nm) auf, zwischen S2 und S3 (~6 nm) wurden praktisch keine Übergänge beobachtet. Die Domänenbewegung der KdpB-Untereinheit kann den mittleren Zustand demnach nicht überspringen.

Die Übergangsraten reagieren am sensibelsten auf die Inhibitoren (Abbildung 44). Nach Zugabe von KCl steigt die Rückrate in den mittleren Zustand S1 (~5 nm, 50% FRET-Effizienz). Nach Zugabe von ATP steigen beide Rückraten schließlich auf ein Maximum an. Nach Zugabe einer 50  $\mu$ M Lösung des Inhibitors Vanadat sinken die Rückraten wieder, nach Zugabe von 200  $\mu$ M Vanadat sinken die Raten weiter. Auch OCS reduziert die Rückraten drastisch. Die Verweildauern und Übergangsraten im Vergleich liefert die Balkengrafik Abbildung 45.



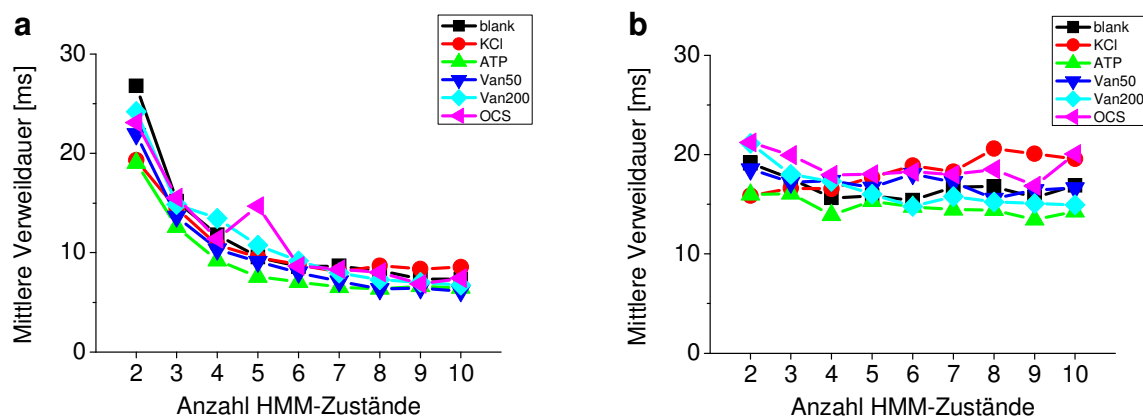
**Abbildung 45: Vergleich der Verweildauern und Übergangsraten unter verschiedenen biochemischen Bedingungen.** Alle Lösungen enthielten Proteoliposomen im Puffer, I: keine Zusätze; II: Zugabe von KCl, III: Zugabe von KCl und ATP, IV: Zugabe von KCl, ATP und 50  $\mu\text{M}$  Vanadat, IVb: Zugabe von KCl, ATP und 200  $\mu\text{M}$  Vanadat, V: Zugabe von KCl, ATP und OCS. (a) Farbzuordnung der Verweilzeiten: Low-FRET S3 blau; Medium-FRET S1 rot; High-FRET S2 grün. (b) In blau sind jeweils die Übergangsraten von Low- zu Medium-FRET (S3→S1), in grün von High- zu Medium-FRET (S2→S1) dargestellt. (a,b) Die Grafen zeigen deutlich, dass die Konformationsdynamik bei Zugabe von KCl steigt und sich weiter erhöht bei Zugabe von ATP. Die Zugabe der Inhibitoren Vanadat bzw. OCS blockieren zwar weitgehend die Enzymaktivität, führen aber überraschenderweise nicht zum Einfrieren einer bestimmten Konformation, sondern Verlangsamen lediglich die Domänenbewegungen.

### 5.4.2 Modelle mit weiteren Zuständen

Die Frage nach der richtigen Anzahl der versteckten Zustände stellt sich auch hier. Das für diese Frage entwickelte Bayessche Informations Kriterium (BIC) liefert kein Ergebnis. Mögliche Ursachen hierfür werden in Kapitel 3.9 diskutiert. Es werden zwar primär nur zwei Zustände erwartet, prinzipiell müssten sich weitere Zustände deutlich in den in dieser Arbeit erstmals erzeugten Einzelmoleküldaten bemerkbar machen. Bei sehr unscharfen Zuständen führen zusätzliche Zustände zu einer Verkürzung der ermittelten Verweilzeiten, da sich das HMM bei steigender Zahl von Zuständen eher zusätzliche Zustandswechsel leisten kann. Eine höhere Zahl an Zuständen lässt geringere Varianzen für die Emissionsfunktionen zu, das begünstigt wiederum Stufenwechsel. Je klarer die Stufen voneinander getrennt sind, desto weniger Toleranz bleibt bei der Modellierung der Emissionsfunktionen. Überflüssige Zustände gehen bei solchen Systemen dann tendenziell leer aus, die korrekte Stufenzahl wird offensichtlich. Nicht jedoch hier. Abbildung 46a zeigt, wie sich die aus den Übergangsmatrizen der Hidden Markov Modelle ermittelten Verweilzeiten mit

steigender Zustandszahl verkürzen. Die mittlere Verweildauer lässt sich ebenfalls aus den durch die Hidden Markov Modelle erzeugten Stufenmarkierungen bestimmen: werden Randstufen ausgeschlossen, braucht lediglich der Mittelwert der übrig bleibenden Stufenlängen ermittelt werden. Abbildung 46b zeigt, wie die Stufenmarkierung unabhängig von der Modellkomplexität zu immer gleichen Ergebnissen führt. Dies bedeutet, dass bedingt durch die Struktur der Daten die Verbreiterung durch die limitierte Photonenzählrate die Analyse stark prägt, sodass sogar ein HMM mit verkürzten Verweildauern lange Stufen erzeugt.

Auf die wesentliche Aussage, nämlich eine Reduktion der Enzymkinetik nach Zugabe von Inhibitoren, führen übereinstimmend alle verwendeten Hidden Markov Modelle.



**Abbildung 46: Mittlere Verweildauern verschiedener Hidden Markov Modelle im Vergleich. (a) Mittelwert über alle verfügbaren Zustände aus den Diagonalelementen der Übergangsmatrix. Mit steigender Zahl der Zustände verringern sich die gelernten Verweildauern. (b) Mittelwert über alle markierten Zustände. Hier führt die steigende Zahl der Zustände nicht zu einer Reduktion der Verweilzeiten. Ein Modell mit drei Zuständen zeigt somit die höchste Konsistenz zwischen den gelernten Parametern und der daraus erzeugten Stufenmarkierung.**

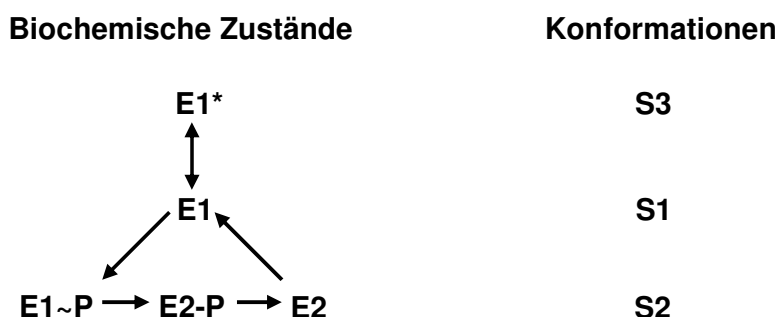
## 5.5 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten FRET-Messungen zeigen die Anwesenheit von zwei klaren Zuständen, S1 und S2. Beide treten etwa mit gleicher Häufigkeit auf. Die FRET-Abstände dieser Zustände liegen bei etwa 5 nm (S1) und 4 nm (S2) und sind somit in guter Übereinstimmung zu den erwarteten Abständen der Markierungspositionen in der KdpB-Untereinheit. Allerdings stehen zur Bestimmung der

erwarteten Markierungspositionen keine Kristallstrukturen zur Verfügung, vielmehr muss auf Homologiemodellen aus SERCA-Kristallstrukturen und den dort bekannten Zuständen E1 und E2 zurückgegriffen werden.

Die Konformationen S1 und S2 weichen jedoch von den biochemischen Zuständen E1 und E2 ab, da die phosphorylierten Zustände E1~P und E2~P ebenfalls die Konformation S2 besitzen (Abbildung 47). In der überwiegenden Mehrheit der Fälle gehen die Konformationen S1 und S2 ineinander über, was stark dem vorgeschlagenen Reaktionszyklus entspricht. Eine zusätzliche dritte Konformation S3 konnte zwar ebenfalls beobachtet werden, allerdings entspricht diese Konformation einem recht großen FRET-Abstand von ca. 6 nm. Diese Konformation konnte jedoch nicht durch den Reaktionszyklus des KdpFABC-Komplexes oder irgendeiner anderen P-Typ ATPase beschrieben werden. Die geringe Häufigkeit dieser Konformation deutet an, dass sie möglicherweise keine Rolle im Reaktionszyklus spielt. Darüber hinaus ist die Konformation S3 lediglich mit S1 verbunden, direkte Sprünge zu S2 konnten nicht beobachtet werden.

Es wird angenommen, dass die N-Domäne der P-Typ ATPasen über zwei flexible Linker mit der P-Domäne verbunden ist [101] und starken Kippbewegungen während der Hydrolyse von ATP unterliegt. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass in der offenen S1-Konformation die N-Domäne durch thermale Fluktuationen zur A-Domäne hin und



**Abbildung 47:** Zuordnung der angenommenen biochemischen Zustände *E* zu den gemessenen Konformationen *S*. Es wird angenommen, dass der KdpFABC-Komplex den typischen Reaktionszyklus von P-Typ ATPasen unterliegt. Der biochemische Zustand E1 ist konsistent mit der gemessenen offenen Konformation S1. Die geschlossene Konformation S2 besteht aus den biochemischen Zuständen E1~P, E2~P und E2. Während des Reaktionszyklusses (dargestellt durch Pfeile) gehen die Konformationen S1 und S2 ineinander über. Die seltene weit offene Konformation S3 interagiert ausschließlich mit S1 und kann durch gelegentliches Herausdrehen der flexiblen N-Domäne erklärt werden. Diese Konformation ist höchstwahrscheinlich nicht im Reaktionszyklus einbezogen, was durch den E1\*-Zustand angedeutet wird.

von ihr weg kippt, was gelegentlich zu der weit offenen Konformation S3 führt, siehe Abbildung 47.

Obgleich einige katalytische Zwischenschritte durch strukturelle Analysen insbesondere bei SERCA aufgelöst wurden [100-103, 105-107], konnten daraus keine Informationen über die Flexibilität der Domänen von P-Typ ATPasen gewonnen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass die verschiedenen Konformationen, die zu biochemischen Zuständen gehören, mit hohen Raten fluktuieren. Selbst unter Inhibitionsbedingungen wurde die Flexibilität des Enzyms kaum reduziert. Für Ortho-Vanadat ist bekannt, dass es biochemisch die  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase im Zustand E2-P durch eine enge Bindung an den konservierten Aspartatrest in der P-Domäne blockieren kann, was eine Blockierung der Dephosphorylierung nach sich zieht [125-127]. Das Überlagern der SERCA-Kristallstruktur des TNPAMP-gebundenen E1-Zustands mit der SERCA Elektronendichtekarte des Vanadat-gebundenen E2-P-Zustands [101] führte zur Identifizierung einer großen kugelförmigen Masse an der P-Domäne nahe des konservierten Aspartatrests, welches höchstwahrscheinlich ein Dekavanadat-Molekül abbildet. Eine zusätzliche Bindung des Inhibitors an die N-Domäne wurde nie gezeigt. Die hier vorliegenden Ergebnisse führen zu der Vorstellung, dass das Vanadat-Molekül zwar an die P-Domäne bindet, dabei aber nicht mit der N-Domäne interagiert. Das könnte zu einer Konformation führen, in der das Enzym durch das Vanadat-Molekül biochemisch blockiert ist, ohne dass dabei die Flexibilität der N-Domäne beeinträchtigt wäre. Dadurch kann die N-Domäne immer noch frei vor und zurück schwingen, was zu den beobachteten FRET-Abständen der Konformationen S1 und S2 führt. Das verhältnismäßig große Vanadat-Molekül könnte die N-Domäne ein wenig einengen, welches die etwas erhöhten Verweildauern der Konformationen erklären würde, insbesondere die der offene Konformation S1.

Der jüngst vorgestellte Inhibitor OCS ist in der Lage,  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasen im E1-Zustand biochemisch zu blockieren, indem es an die zytoplasmatische Seite des Proteins bindet [128]. Außerdem inhibiert es SERCA [129] und den KdpFABC-Komplex. Die Einzelmoleküldaten zeigen jedoch, dass auch OCS das Enzym nicht in einer Konformation halten kann. Inkubation mit OCS führt hier zu signifikant erhöhten Verweildauern insbesondere von S1, verhindert aber nicht den Übergang in die Konformation S2. Dies kann nur durch eine Bindungsposition von OCS erklärt werden, die das Enzym biochemisch im E1-Zustand blockiert und zusätzlich die Flexibilität der N- und A-Domäne beeinträchtigt.

Die Verweildaueranalyse während der Katalyse zeigt, dass die Konformation S2 den ratenbegrenzenden Schritt des P-Typ Reaktionsschemas darstellt. Wie in Abbildung 47 skizziert, gehören zur geschlossenen Konformation S2 die drei enzymatischen Zustände E1~P, E2-P und E2, wobei die offene Konformation S1 lediglich dem E1-Zustand entspricht. Als Folge beherbergt S2 eine höhere Zahl an katalytischen Subschritten. In Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasen wurde jedoch der E2/E1-Übergang als ratenbestimmender Schritt identifiziert [130]. Bei SERCA wird der ratenbestimmende Schritt des Reaktionszyklusses beim Übergang von E1~P/E2-P vermutet [131]. Beide Ergebnisse beziehen sich strukturell in unserem Fall auf die Konformation S2 und sind somit in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Daten.

### **Kooperation**

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jörg-Christian Greie und Dr. Thomas Heitkamp (Abteilung Biologie/Chemie, Universität Osnabrück, Barbarastraße 11, 49076 Osnabrück) durchgeführt. Die Proben wurden von Dr. Thomas Heitkamp in Osnabrück erzeugt, die Einzelmolekülmessungen wurden in Stuttgart durchgeführt.

## 6 Die EF<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase

Adenosin-Triphosphat (ATP) ist der zentrale Energieträger in allen lebenden Zellen. Die exotherme Spaltung von ATP in Adenosin-Diphosphat (ADP) und Phosphat (P) treibt nahezu alle Prozesse der Zelle an. Die F-Typ ATP-Synthase ist ein Membranprotein, das in Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien die Versorgung von ATP durch Rephosphorylierung von ADP sicherstellt. Sie koppelt hierzu einen exergonischen Protonenfluss mit der endergonischen ATP-Synthese und schließt auf diese Weise den Kreislauf ständiger De- und Rephosphorylierung von ATP.

### 6.1 Struktur und Funktion der F-Typ ATP-Synthase aus *E. coli*

Der hydrophobe, membranständige F<sub>o</sub>-Teil setzt sich aus den Untereinheiten  $ab_2c_{10}$  zusammen und beinhaltet einen Protonenkanal zwischen der  $a$ -Untereinheit und dem  $c$ -Ring. Der hydrophile F<sub>1</sub>-Teil bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  stellt insgesamt drei katalytische Nukleotid-Bindungsplätze zur Verfügung und ragt in das Cytosol (siehe Abbildung 48a). Im Gegensatz zum F<sub>o</sub>-Teil gelang für den F<sub>1</sub>-Teil die Erstellung einer hochauflösende Röntgenstruktur [132]. Das nur wenige Nanometer große Enzym stellt einen molekularen Motor dar. Die katalytische Funktion geht mit einer Drehbewegung der rotierenden Untereinheiten  $c_{10}\gamma\epsilon$  in Bezug auf die statischen Untereinheiten  $ab_2\alpha_3\beta_3\delta$  einher. Der Motor wird unter physiologischen Bedingungen durch einen Protonenfluss in einem Kanal zwischen  $a$ -Untereinheit und  $c$ -Ring im F<sub>o</sub>-Teil angetrieben. Dies induziert über die zentrale  $\gamma\epsilon$ -Achse Konformationsänderungen in der F<sub>1</sub>-Domäne und führt sukzessive zur katalytischen Synthese von ATP in je einem Bindungsplatz. Dieser Prozess kann auch umgekehrt ablaufen, in diesem Fall treibt der F<sub>1</sub>-Teil unter ATP-Hydrolyse den Motor in umgekehrter Drehrichtung an verbunden mit einem Pumpen von Protonen zurück in das Periplasma.

Bereits ein Subkomplex des Enzyms bestehend aus dem Hexamer  $(\alpha\beta)_3$  und der  $\gamma$ -Untereinheit ist in der Lage, ATP zu hydrolysieren und die freiwerdende Energie in eine Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit umzuwandeln (siehe Kapitel 7).

Paul Boyer stellte einen hypothetischen Reaktionsmechanismus auf, in denen die drei katalytischen Bindungstaschen während der Katalyse in kooperativer Weise unterschiedliche Zustände durchlaufen [133]. Zur Aufklärung des genauen Katalysemechanismus gelang Noji *et. al* 1997 durch ein Einzelmolekülexperiment den entscheidenden Durchbruch [134]. Es ermöglichte erstmals die direkte Beobachtung

der Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit eines  $\alpha_3\beta_3\gamma$ -Subkomplexes per Videofluoreszenzmikroskopie und offenbarte eine Rotationsbewegung in diskreten  $120^\circ$ -Schritten. Der hexagonale Aufbau des  $F_1$ -Teils macht  $120^\circ$ -Schritte plausibel.

Die Struktur des  $F_o$ -Teils mit dem 10-zähligen c-Ring des Enzyms wirft dabei die Frage auf, wie sich die  $120^\circ$ -Schritte auf den  $F_o$ -Motor übertragen.

Die in dieser Arbeitsgruppe entwickelte fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungsmethode zielte langfristig auf die Klärung des genauen Katalysemechanismus dieses wichtigen Enzyms. Darüber hinaus konnten aber auch strukturelle Fragen aufgeklärt werden. Alle im Folgenden verwendeten Enzympräparationen wurden aus Mutanten des Darmbakteriums *Escherichia coli* isoliert.

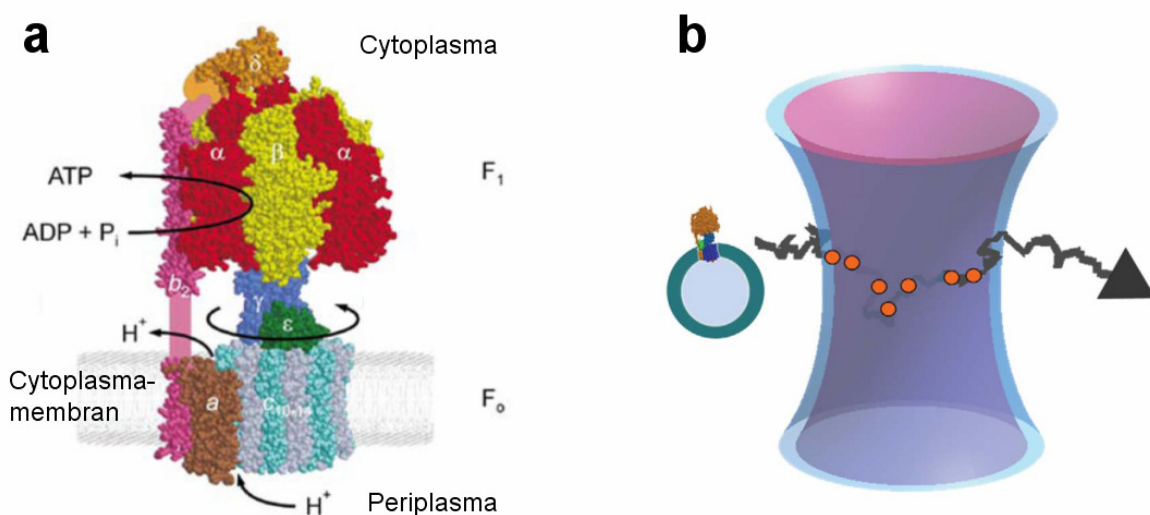
## 6.2 Enzympräparation für fluoreszenz-spektroskopische Untersuchungen

Einzelmolekül-FRET (Förster Resonanz Energie Transfer) erlaubt die Abstandsmessung zweier geeigneter Fluorophore im Bereich von ca. 1 bis 10 nm (siehe Kapitel 2.2). Um die Rotation der Untereinheiten der ATP-Synthase mit FRET beobachten zu können, muss einer der beiden Fluorophore an den Rotor, der andere an den Stator gebunden werden. Die aufgezeichnete FRET-Effizienz sollte also entsprechend der Konformationsänderungen moduliert sein. Je nach Position der Fluoreszenz-Marker kann die Bewegung im  $F_o$ -Teil oder im  $F_1$ -Teil beobachtet werden. Durch gentechnisch erzeugte Veränderungen in der DNA-Sequenz wurden Bakterienstämme hergestellt, deren ATP-Synthasen ausschließlich mit einem freien Cystein an der gewünschten Position versehen waren. Auf diese Weise ließ sich selektiv je ein organischer Farbstoff an einem freien Cystein binden, um schließlich ein FRET-markiertes Gesamtzym zu erhalten. Die fluoreszenz-spektroskopische Messung erfolgte an in Liposomen rekonstituierten Enzymen wie bereits in Kapitel 5 beschrieben. Dieses Verfahren hat zum einen den Vorteil, dass der Katalysemechanismus am Gesamtzym studiert werden kann. Zum anderen lässt sich die Drehrichtung des Enzyms vorgeben. Bei Zugabe von ATP in hoher Konzentration wird die ATP-Hydrolyse-Reaktion initiiert, der Doppelmotor bewegt sich unter ATP-Verbrauch in Hydrolyse-Richtung und pumpt gleichzeitig Protonen in die Liposomen. Möchte man den Doppelmotor in Synthese-Richtung betreiben, ist zunächst eine Vorinkubation der Proteoliposomen in einem Puffer mit niedrigem pH-Wert nötig, um eine hohe Protonendichte in den Liposomen einzustellen. Ein plötzlicher Puffer-



wechsel durch einen Puffer mit hohem pH-Wert und den Nukleotiden ADP und Phosphat in hoher Konzentration startet die ATP-Synthese-Reaktion, bis der pH-Gradient wieder (nach wenigen Minuten) abgebaut ist.

Die Liposomen wurden nicht immobilisiert, sondern konnten frei im offenen Tropfen durch das konfokale Volumen diffundieren. Jeder Durchgang eines rekonstituierten Proteoliposoms durch das Anregungsvolumen erzeugte einen Photonenburst, aus dessen stark schwankenden Fluoreszenz-Intensitäten eine FRET-Effizienz-Trajektorie gebildet wurde (siehe Abbildung 48b). Eine schrittweise Rotation der Untereinheiten erzeugt Stufen mit konstanter FRET-Effizienz in der FRET-Effizienz-Trajektorie, die durch sprunghafte Änderungen ineinander übergehen. Allein aus den statistischen Eigenschaften dieser Stufen lässt sich z.B. die Schrittweite der Rotation extrahieren oder die Wirkung von Inhibitoren studieren. Für alle weiteren Betrachtungen ist deshalb eine zuverlässige Identifikation dieser Stufen in den aufgenommenen Datensätzen Voraussetzung. Aus diesem Grund wurde mit der Entwicklung der Datenanalyse-Software „Burst-Analyzer“ begonnen (siehe Abschnitt 2.6). Mit Hilfe dieser Benutzeranwendung konnten die fluoreszenz-spektroskopisch erzeugten Einzelmolekül-Daten erstmals in großem Rahmen gesichtet, Bursts und Stufen markiert und daraus Statistiken erstellt werden. Daher bildet sie die Grundlage der Datenanalyse für die im Folgenden vorgestellten Teilprojekte.



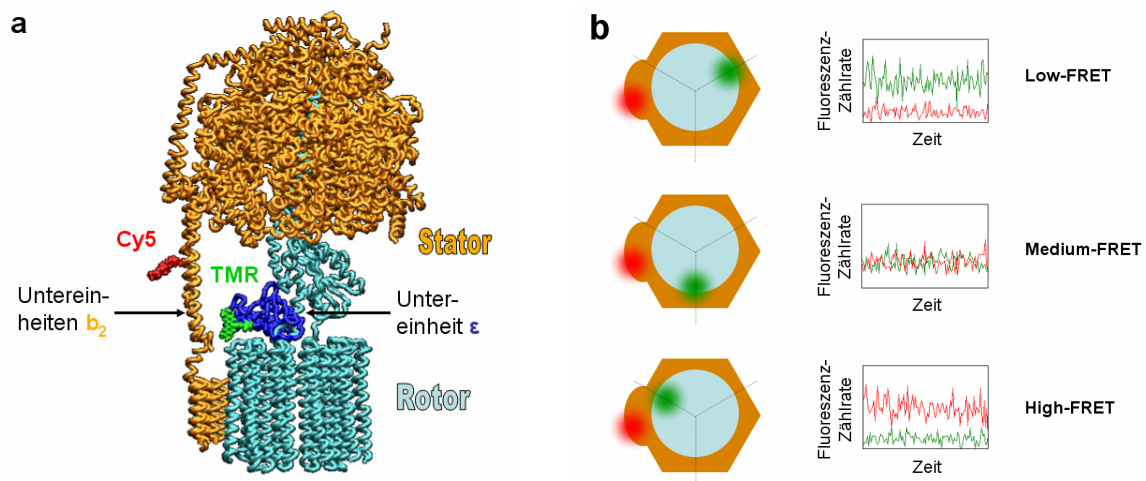
**Abbildung 48:** (a) F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Synthase aus *E. coli* aus [135]. Sie besteht aus dem membranintegrierten F<sub>0</sub>-Teil mit den Untereinheiten  $ab_2c_{10}$ , der den Protonenkanal beherbergt, sowie dem hydrophilen F<sub>1</sub>-Teil mit den Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ , der drei katalytische Nukleotid-Bindungsplätze zur Verfügung stellt. (b) FRET-markierte und in Liposomen rekonstituierte EF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthasen diffundieren frei in Lösung und erzeugen beim Durchgang durch das konfokale Volumen einen Photonenburst.

### 6.3 Konformationsänderungen der $\epsilon$ -Untereinheit durch Aktivierung der ATP-Synthase

Eine Fluoreszenz-Markierung der  $\epsilon$ -Untereinheit mit einem FRET-Donor und die Verlinkung der beiden  $b$ -Untereinheiten mit einem FRET-Akzeptor erlauben die Untersuchung der Rotation der F<sub>1</sub>-Domäne. Eine spezielle Version des organischen Farbstoffes Cy5 mit zwei Maleimid-Funktionen [136] wurde spezifisch an die beiden  $b$ -Untereinheiten gebunden und bildet so das Bezugssystem für die FRET-Messung. Der Farbstoff Tetramethylrhodamin (TMR) wurde an die  $\epsilon$ -Untereinheit gebunden und bewegt sich mit der Rotation der Untereinheiten des Enzyms (siehe Abbildung 49).

Bei Zugabe des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogs AMPPNP zeigten sich drei verschiedene statische Konformationen des Enzyms. AMPPNP bindet in dieselbe Bindungstasche wie ATP, kann jedoch nicht hydrolysiert werden. Es blockiert somit die Rotationsbewegungen innerhalb der ATP-Synthase. Die drei Konformationen zeigten sich durch Bursts mit unterschiedlichen konstanten FRET-Effizienzen: Low-FRET (L), Medium-FRET (M) und High-FRET (H), siehe Abbildung 50.

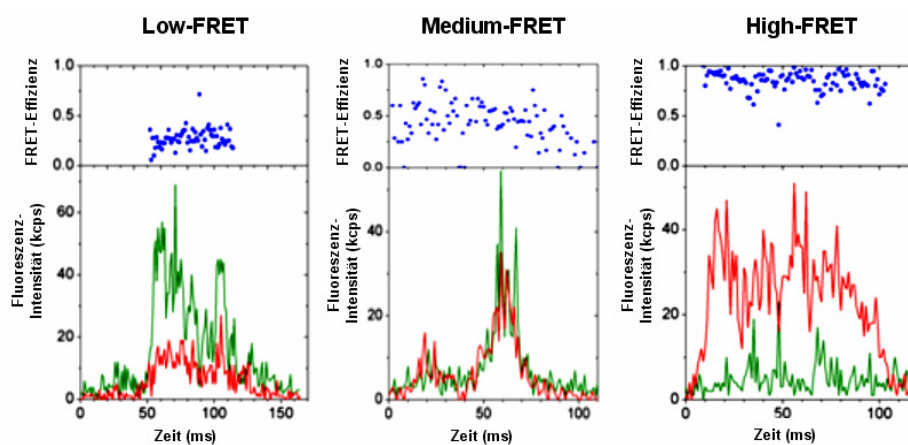
Bei 1 mM ATP in der Pufferlösung zeigten die Bursts Stufen, die aus Sequenzen der drei FRET-Effizienzen bestanden. Es wurden jeweils nur Bursts berücksichtigt, die eine Mindestlänge von 20 ms hatten, eine Mindesthelligkeit von 400 Photonen



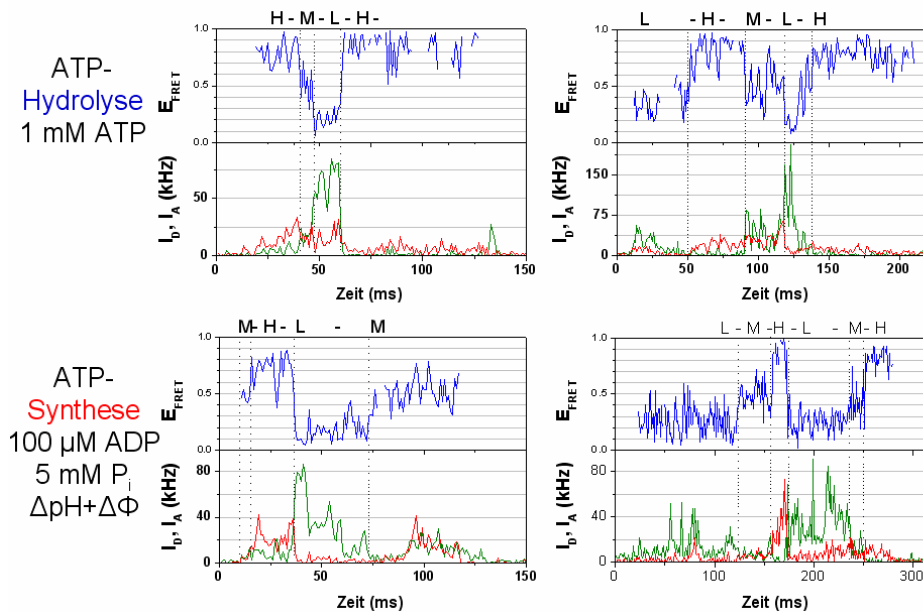
**Abbildung 49:** (a) EF<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase mit dem FRET-Donor-Farbstoff TMR an der  $\epsilon$ -Untereinheit und dem FRET-Akzeptor-Farbstoff Cy5 an den Untereinheiten  $b_2$ . Die rotierenden Untereinheiten sind hellblau dargestellt, die statischen Untereinheiten sind gelb angefärbt. (b) Links ist das Enzym schematisch mit Sicht auf den  $c$ -Ring beim Durchlaufen der drei 120°-Positionen zusehen. Der Abstand zwischen beiden FRET-Farbstoffen ist in der ersten Zeile am größten und wird in der zweiten und dritten Zeile kleiner. Rechts ist schematisch die Fluoreszenz-Zählrate beider Farbstoffe im Zusammenhang mit den Konformationen des Enzyms dargestellt. Die Zählrate des Donors sinkt von Zeile 1 zu 3, die des Akzeptors steigt.

aufweisten und mindestens einen Stufenübergang zeigten. 81 % der aufgenommenen Bursts mit diesen Kriterien zeigten Ausschnitte aus der Stufenfolge  $\rightarrow H \rightarrow M \rightarrow L \rightarrow H \rightarrow \dots$  und protokollierten somit eindeutig die Drehrichtung der ATP-Synthase unter Hydrolysebedingungen. Messungen unter Synthesebedingungen zeigten eine umgekehrte Vorzugsdrehrichtung  $\rightarrow L \rightarrow M \rightarrow H \rightarrow L \rightarrow \dots$  bei 84 % aller Bursts mit den obigen Kriterien. Eine Stufe konnte erst zuverlässig identifiziert werden, wenn sie mindestens 4 ms anhielt. Kürzere Stufen werden unweigerlich übersehen, was gelegentlich zu Abweichungen in den beobachteten Stufenfolgen führt. In Abbildung 51 sind für beide Drehrichtungen jeweils zwei Beispielbursts abgebildet. Die Drehung in diskreten  $120^\circ$ -Schritten und die Umschaltbarkeit der Drehrichtung zeigten sich in diesem Experiment in eindeutiger Weise.

Aus den Verweildauer-Histogrammen (siehe Abbildung 52) ergeben sich die charakteristischen Verweildauern durch eine Kurvenanpassung mit einer monoexponentiell fallenden Funktion. Diese entsprechen direkt den Hydrolyse- bzw. Syntheseraten des gesamten Reaktionszyklus. Die Hydrolyserate aus dem Einzelmolekülexperiment mit  $70 \text{ s}^{-1}$  ist um 23 % höher als die durch eine Ensemblemessung bestimmte Rate von  $57 \text{ s}^{-1}$ . Für Synthesebedingungen ergibt sich eine Rate aus dem Einzelmolekülexperiment von  $55 \text{ s}^{-1}$ , diese ist sogar 2,6-fach höher als die Ensemblerate von  $21 \text{ s}^{-1}$ . Die Raten aus dem Einzelmolekülexperiment bilden einen Durchschnitt über aktive Enzyme, da blockierte Enzyme keine Stufenwechsel zeigen und damit nicht mehr in die Statistik einfließen. Raten aus Ensemble-Messungen hingegen mitteln stets über alle vorhandenen ATP-Synthasen und resultieren somit in niedrigeren Zahlenwerten.

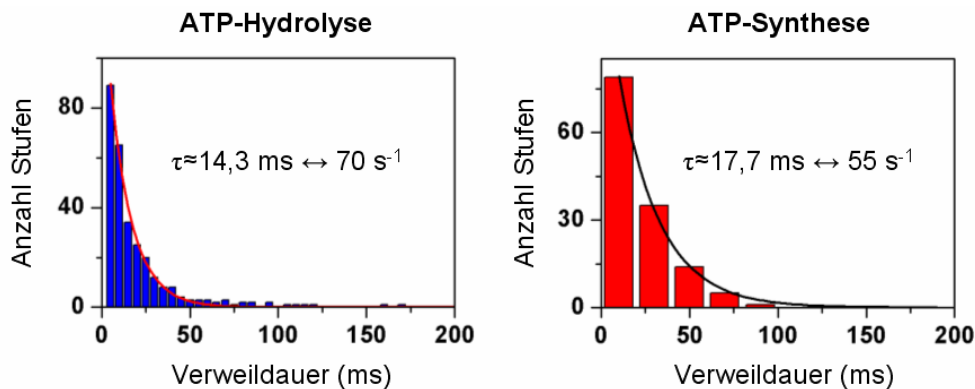


**Abbildung 50:** Fluoreszenz-Intensität des Donor (grün) und des Akzeptors (rot) sowie die daraus berechnete FRET-Effizienz (blau) einzelner  $F_0F_1$ -ATP-Synthasen beim Durchgang durch den Laserfokus. Die Zugabe des Inhibitors AMPPNP führt zu einer Blockade des Enzyms. Von links nach rechts die drei Zustände Low-FRET, Medium-FRET und High-FRET.



**Abbildung 51:** Beispielbursts für die katalytische Hydrolyse von ATP (oben) und Synthese von ATP (unten). Die schrittweise Rotation der  $\epsilon$ -Untereinheit in Bezug auf die  $b$ -Untereinheiten erfolgt in beiden Fällen in drei diskreten Schritten.

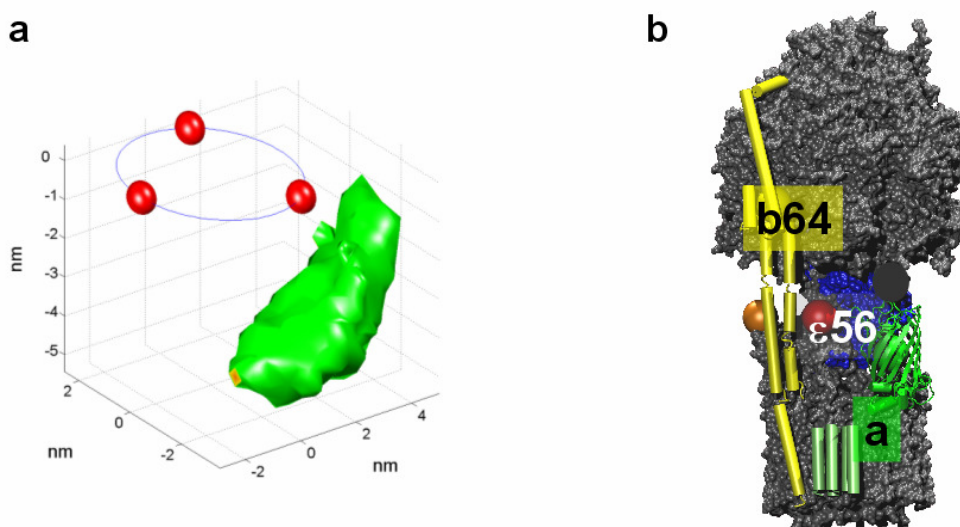
Eine Aktivierung des Enzyms mittels pH-Gradienten ohne Zugabe von Nukleotiden führte zu einem Protonentransport ohne Katalyse. Die Bewegung der  $\epsilon$ -Untereinheit wurde dadurch verlangsamt; die überwiegende Zahl der Bursts zeigte eine Stufenabfolge in Syntheserichtung an. Es ergaben sich kleine Unterschiede in den mittleren FRET-Effizienzen der drei Stufen mit und ohne Aktivierung. Diese Unterschiede legen den Schluss nahe, dass sich die Aktivierung durch eine Konformationsänderung der  $\epsilon$ -Untereinheit bemerkbar macht. Diese Ergebnisse wurden 2005 veröffentlicht in Ref. [53] und [137].



**Abbildung 52:** Die Histogramme zeigen eine monoexponentiell abfallende Stufenlängenverteilung, aus denen sich die Nukleotid-Umsatzraten pro Enzym ergeben.

## 6.4 Position der $\alpha$ -Untereinheit

Schlüsselt man die Verweilzeiten der drei Zustände einzeln auf, ergibt sich stets eine charakteristisch kürzere Stufe für alle Bedingungen. Zwar sind die drei  $\beta$ -Untereinheiten mit den zugehörigen ATP-Bindungsplätzen identisch, so erfolgt dennoch die Katalyse in stark kooperativer Weise [133]. Die Bindung des peripheren  $b_2\delta$ -Strangs an eine bestimmte  $\beta$ -Untereinheit des  $F_1$ -Teils könnte diese Unsymmetrie auslösen. Diese charakteristische Verkürzung der Verweilzeit lässt sich auch in anderen Enzympräparationen wieder finden. So zeigte eine Präparation mit dem autofluoreszierenden Protein GFP als Fluoreszenzmarker an der  $\alpha$ -Untereinheit und dem organischen Fluorophor Alexa568 an der  $\varepsilon$ -Untereinheit eine charakteristische Verkürzung der „Low“-Stufe. Eine andere Präparation mit demselben autofluoreszierenden Protein GFP an der  $\alpha$ -Untereinheit und Alexa568 an der  $\gamma$ -Untereinheit zeigte die Verkürzung bei der „High“-Stufe. Aus der Zuordnung der drei Stufen anhand ihrer Verweilzeiten konnte über eine Fehlerrechnung die Position des GFP-Farbstoffs eingegrenzt werden (siehe Abbildung 53a). Eine genaue Fehlerbetrachtung findet sich in [138]. Dies ließ den Schluss zu, dass sich die  $\alpha$ -Untereinheit in Bezug auf den peripheren  $b_2$ -Strang bei Sicht von der Cytoplasmaseite aus asymmetrisch rechts davon befinden muss (siehe Abbildung 53b). Dieses Ergebnis wurde 2008 veröffentlicht in Ref. [62].



**Abbildung 53:** (a) Rote Kugeln: aus den ATP-Synthase-Präparationen  $\alpha$ GFP- $\gamma$ Alexa586 und  $\alpha$ GFP- $\varepsilon$ Alexa568 übereinander gelegte Akzeptorpositionen. Grüne Wolke: Berechnete Aufenthaltsdichte der GFP-Position. (b) Der eingeschränkte Aufenthaltsbereich des GFP-Farbstoffs ließ die Lokalisation der  $\alpha$ -Untereinheit im Bezug auf den  $b$ -Dimer am Gesamtzym zu.

## 6.5 Wirkung des Inhibitors Aurovertin

Aufgrund der weiten Verbreitung der ATP-Synthase in den verschiedensten Organismen und der damit verbundenen großen Bedeutung stellt dieses Enzym ein viel versprechendes Ziel für die medizinische Forschung dar. Inhibitoren, die an einer bestimmten Stelle im Reaktionszyklus eingreifen und dabei hoch spezifisch nur diesen Enzymtyp treffen, sind Hoffnungsträger für die Bekämpfung von zahlreichen Krankheiten. Der Inhibitor Aurovertin stammt aus dem Pilz *Calcaris-poriumarbuscula* und inhibiert die oxidative Phosphorylierung durch Binden an die  $\beta$ -Untereinheit von ATP-Synthasen aus den Mitochondrien von Rinderherzen und von Hefe, sowie der Cytoplasma-Membran von *Escherichia coli*.

Ensemble-Messungen zur ATP-Synthase und -Hydrolyse mit Sub-Mitochondrialen Partikeln (SMP) aus Rinderherzen zeigten mit steigender Konzentration des Inhibitors Aurovertin eine zunehmende Reduktion sowohl der katalytischen Synthese- als auch der Hydrolyse-Aktivität von ATP. Der Inhibitor zeigt allerdings eine deutlich stärkere Wirkung auf die Synthese-Reaktion und bringt diese bei ausreichender Konzentration vollständig zum Erliegen. Die Hydrolyse-Reaktion der ATP-Synthase konnte der Inhibitor selbst in gesättigter Konzentration nie vollständig blockieren. Durch diese Ensemble-Experimente kann jedoch nicht entschieden werden, ob das Binden des Inhibitors an die ATP-Synthase stets zu einer Blockierung des Enzyms führt oder lediglich die katalytische Reaktion stört. Beide Wirkungsweisen äußern sich in Ensemble-Experimenten mit steigender Konzentration des Inhibitors durch sinkende Nukleotid-Umsatzraten.

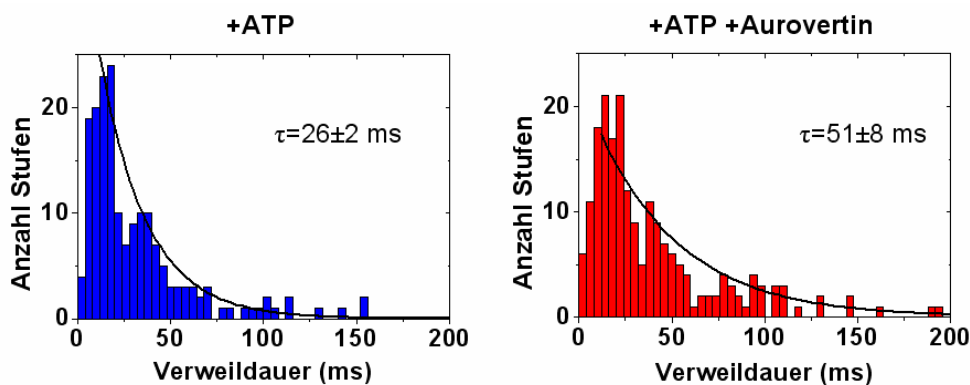
Die Frage nach dem richtigen Reaktionsschema kann eindeutig nur durch ein Einzelmolekülexperiment beantwortet werden. Die Wirkungsweise des Inhibitors macht sich hier direkt in der Modulation der aufgenommenen FRET-Effizienz-Trajektorien der einzelnen Proteoliposomen bemerkbar. Deren Photonenbursts zeigen ohne Inhibitor Sprünge zwischen drei wiederkehrenden Stufen in der FRET-Effizienz gemäß den  $120^\circ$ -Schritten der  $\gamma$ -Untereinheit. Blockiert Aurovertin die ATP-Synthase, muss sich die Anzahl der Bursts, die Sprünge zwischen den Stufen zeigen, reduzieren. Verringert Aurovertin hingegen die Fähigkeit des Enzyms zur Katalyse, so muss dies zu einer Verlängerung der einzelnen Stufen führen.

Hierzu wurde der bereits in Ref. [136] verwendete Einzelmolekül-FRET-Ansatz mit FRET-markierten, in Liposomen rekonstituierten  $F_0F_1$ -ATP-Synthasen aus der inneren Zellmembran von *E. coli* verwendet, dessen FRET-Donor TMR an der rotierenden  $\gamma$ -Untereinheit gebunden ist und dessen FRET-Akzeptor bisCy5 an nicht

mitrotierenden  $b_2$ -Dimer gebunden ist. Während der katalytischen Hydrolyse von ATP dreht sich die  $\gamma$ -Untereinheit in diskreten  $120^\circ$ -Schritten und verändert somit in zyklischer Weise den Abstand zwischen FRET-Donor und -Akzeptor, was sich direkt in der FRET-Effizienz-Trajektorie zeigt. Mit Hilfe von Schwellenwerten lassen sich in den Zeitspuren Photonenbursts definiert, in denen die weitere Datenanalyse erfolgt. Bereiche mit konstanten FRET-Effizienzen wurden anschließend manuell mit der eigens für diesen Zweck entwickelten Datenanalyse-Software *Burst Analyzer* markiert und zu Stufen zusammengefasst (siehe Abschnitt 2.6). Bei 1 mM ATP und 20  $\mu$ M Aurovertin hatten 10,4 % von 3685 Bursts drei und mehr Stufen. Die Vergleichsmessung ohne Aurovertin enthielt 11,5 % von 3381 Bursts mit drei und mehr Stufen. Der Inhibitor führt demnach nicht zu einer vollständigen Blockade des Enzyms, da sich die relative Anzahl von Bursts mit drei und mehr Stufen durch Aurovertin nicht verringert hat. Die Kurvenanpassungen einer monoexponentiell abfallenden Funktion an die Stufenlängen-Histogramme beider Datensätze liefert für die Messung ohne Aurovertin eine charakteristische Stufenlänge von 27 ms, für die Messung mit Aurovertin eine Stufenlänge von 42 ms. Eine Erhöhung der mittleren Stufenlänge reduziert erwartungsgemäß die Anzahl der Bursts mit drei und mehr Stufen, da im Mittel weniger Stufen in einen Burst passen. Eine Monte-Carlo-Simulation zeigt, dass die relative Anzahl an Bursts mit drei und mehr Stufen bei einer mittleren Stufenlänge von 27 ms  $14.8 \pm 0.2$  % beträgt und auf  $11.5 \pm 0.3$  % sinkt, wenn die mittlere Stufenlänge auf 42 ms steigt. (Hierfür wurde näherungsweise eine monoexponentiell abfallende Burstlängenverteilung angenommen, für deren mittlere Burstlänge die gemessene Diffusionszeit der Proteoliposomen von 35 ms verwendet wurde. Für die Verteilung der Stufenlängen wurde ebenso eine monoexponentiell abfallende Funktion vorausgesetzt.) Die Zahlen aus der manuellen Analyse sind demnach plausibel. Dennoch bleibt der stark subjektive Charakter dieser Analyse, da die Entscheidung, wann tatsächlich ein Stufenwechsel vorliegt, personenabhängig ausfallen kann.

Deshalb wurde zusätzlich eine automatische, algorithmus-basierende Stufenmarkierung auf Grundlage des Viterbi-Pfads (siehe Abschnitt 3.6) vorgenommen. Ziel war es, mit einem universellen Algorithmus die Stufenmarkierung zu reproduzieren, um die Glaubwürdigkeit der manuellen Analyse zu stützen. Aus der auf diese Weise erzeugten automatischen Stufenmarkierung sollte sich ein Unterschied in der mittleren Stufenlänge zwischen den beiden Datensätzen mit und ohne Aurovertin feststellen lassen.

Ausgangspunkt für die Berechnung des Viterbi-Pfads ist ein Hidden-Markov-Modell (HMM). Es wurden vier Zustände vorgegeben, die mit je einer normalverteilten Emissionsfunktion über die FRET-Effizienz-Trajektorie mit den Messdaten verknüpft werden. Drei dieser Zustände sollen den drei unterschiedlichen Haltepositionen der  $\gamma$ -Untereinheit durch deren mittleren FRET-Effizienzen „Low“ ( $E_{\text{low}}=0,30$ ), „Medium“ ( $E_{\text{medium}}=0,52$ ) und „High“ ( $E_{\text{high}}=0,80$ ) zugeordnet werden. Durch zeitweises Quenchen oder irreversibles Bleichen des Akzeptors tauchen auch FRET-Effizienzen zwischen 0 und 0,10 im Datenstrom auf, die einem vierten „Donor-Only“-Zustand mit dem Mittelwert  $E_{\text{DO}}=0,07$  zugeordnet werden sollen. Alle vier Zustände erhalten dieselbe Breite von  $\sigma=0,14$  und gleiche Übergangswahrscheinlichkeiten in alle andern Zustände. Die mittlere Verweildauer des Donor-Only-Zustands wurde mit 100 ms vorgegeben, die anderen drei Zustände erhalten einen Wert von 30 ms. Diese Werte stammen aus dem Ergebnis der manuellen Analyse. Sie müssen nicht exakt den tatsächlich herrschenden Bedingungen entsprechen. Wichtig ist lediglich, dass der gleiche Parametersatz für die beide Datensätze mit und ohne Aurovertin verwendet wird, um sicher zu stellen, dass beide Datensätze auf die genau gleiche Weise ausgewertet werden. Der Viterbi-Algorithmus ist in der Lage, für jeden einzelnen Zeitpunkt in der gemessenen FRET-Effizienz-Trajektorie den wahrscheinlichsten Zustand des HMMs zu ermitteln. Der Algorithmus erkennt also automatisch die Stufen im Datenstrom. Das Resultat in Form eines Stufenlängen-Histogramms zeigt Abbildung 54 mit und ohne Aurovertin. Eine Kurvenanpassung des Histogramms mit einer monoexponentiell abfallenden Funktion liefert eine charakteristische Stufenlänge von 26 ms für die katalytische ATP-Hydrolyse-Reaktion (Abbildung 54a). Mit Aurovertin ergibt die Kurvenanpassung eine Stufenlänge von



**Abbildung 54:** Histogramme der Stufenlängen aus der automatischen Stufenmarkierung durch den Viterbi-Algorithmus unter ATP-Hydrolyse-Bedingungen. Links: die Reaktionskinetik wird durch Zugabe des Inhibitors Aurovertin (rechts) fast auf die Hälfte verlangsamt.

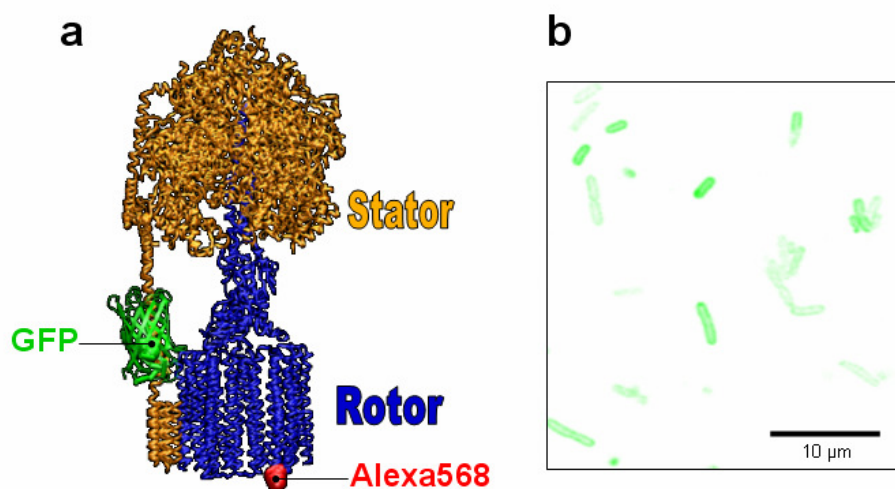


51 ms. Die Zahlen reproduzieren damit in guter Übereinstimmung das Ergebnis der manuellen Analyse und zeigen deutlich, dass Aurovertin die katalytische ATP-Hydrolyse-Reaktion verlangsamt, aber nicht blockiert. Diese Ergebnisse wurden 2009 in Ref. [61] veröffentlicht.

## 6.6 Rotation des *c*-Rings

Eine der zentralen Fragen zum Mechanismus an der F-Typ ATP-Synthase ergibt sich aus der schrittweisen Rotation des F<sub>1</sub>-Motors. Die 6-zählige Symmetrie des F<sub>1</sub>-Teils mit den drei Nukleotid-Bindungstaschen macht die beobachteten 120°-Schritte der  $\epsilon$ - und  $\gamma$ -Untereinheit plausibel. Doch wie wird diese Bewegung auf den F<sub>o</sub>-Motor übertragen, wenn dessen Rotor aus einem Ring von zehn *c*-Untereinheiten besteht?

Zur Beantwortung dieser Frage und mit dem Potential, eine Reihe weiterer Erkenntnisse über den deutlich unbekannteren F<sub>o</sub>-Teil des Enzyms zu erlangen, wurde zunächst eine ATP-Synthase mit einer Mutation entwickelt, die das grün-fluoreszierende Protein EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) am C-Terminus der *a*-Untereinheit trägt [62, 138]. Eine fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von *E. coli*-Bakterien mit EGFP-markierten ATP-Synthasen zeigt Abbildung 55b. Der für Einzelmolekül-FRET-Messungen benötigte zweite Farbstoff Alexa568 wurde spezifisch an eine der zehn *c*-Untereinheiten gebunden. Ein Schema des FRET-markierten Gesamtzyms zeigt Abbildung 55a. Für die Einzelmolekül-FRET-Messungen wurden die so präparierten ATP-Synthasen wie bereits beschrieben in



**Abbildung 55:** (a) Für smFRET vorbereitete EF<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase mit dem Fusionsprotein EGFP an der *a*-Untereinheit und dem Farbstoff Alexa568 an einer *c*-Untereinheit. (b) Funktionale *E. coli* mit EGFP-markierten ATP-Synthasen (aus [138]).

vorgeformte Liposomen rekonstituiert. Auf diese Weise kann die Rotation des *c*-Rings sowohl unter Hydrolyse- als auch unter Synthesebedingungen beobachtet werden. Es ermöglichte erstmals eine Messung mit ausreichender Auflösung in Syntheserichtung, um die Schrittweite dieser Rotationsbewegung zu bestimmen.

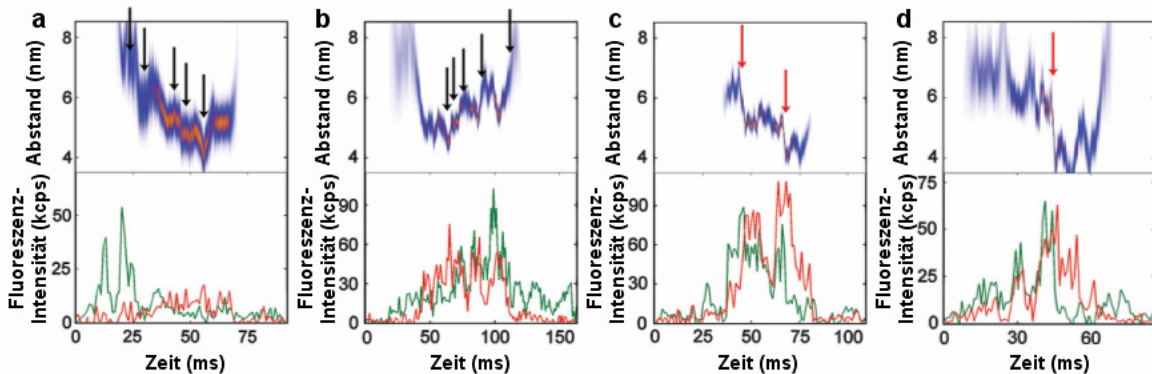
Für die FRET-Messungen wurden der Donor- und der Akzeptor-Farbstoff durch ein speziell optimiertes Schema alternierend gepulst angeregt, um so gezielter photo-physikalische Effekte identifizieren und aussortieren zu können (siehe Abschnitt 2.5).

Die gemessenen Photonenankunftszeiten wurden in Form von zeitabhängigen Fluoreszenz-Intensitäts-Trajektorien mit einem Zeitbinning von 1 ms dargestellt Abbildung 56. Aus jeweils 50 aufeinander folgenden Photonen wird der FRET-Abstand berechnet:

$$d = R_0 \gamma^{1/6} \left( \frac{1}{P} - 1 \right)^{1/6} \quad (45)$$

$R_0$  ist der Förster-Radius,  $\gamma$  ist der Korrekturfaktor aus Gleichung (10) S. 29,  $P$  ist der Abstandsfaktor, der sich aus den gemessenen Zählraten nach Gleichung (8) S. 29 ergibt. Die Genauigkeit der Abstandsinformation wird durch das Schrotrauschen der gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten begrenzt. Sie lässt sich aus der Verteilungsfunktion des Abstandsfaktors ableiten, welche sich durch eine Beta-Verteilung beschreiben lässt [139]. Deren Varianz  $\sigma^2$  lässt sich durch die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten  $I_D$  und  $I_A$  ausdrücken:

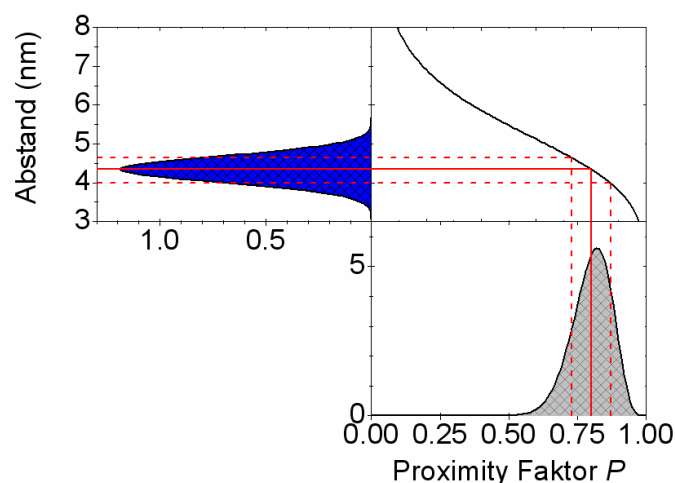
$$\sigma_P^2 = \frac{I_A I_D}{(I_D + I_A)^2 (I_D + I_A - 1)} \quad (46)$$



**Abbildung 56:** Untere Reihe: Fluoreszenz-Intensitäten des FRET-Donors (grün) und FRET-Akzeptors (rot) einzelner  $F_0F_1$ -ATP-Synthasen unter ATP-Synthese-Bedingungen. Obere Reihe: Intramolekulare Abstandsinformation des FRET-Paares. Die FRET-Abstands-Trajektorien enthalten sowohl kleine Sprünge (schwarze Pfeile in a, b) als auch große Sprünge (rote Pfeile in c, d).

Um die Genauigkeit der Abstandsinformation zu erhalten, werden zusätzlich zum Abstandsfaktor  $P$  auch die  $1\sigma$ -Grenzen des Abstandsfaktors  $P_1=P+\sigma_P$  bzw.  $P_2=P-\sigma_P$  über Gleichung (46) in absolute Abstandswerte  $d_1$  bzw.  $d_2$  umgerechnet. Für eine Visualisierung des Abstands  $d$  wird schließlich eine Normalverteilung um den Wert  $d$  mit den symmetrischen  $1\sigma$ -Grenzen  $(d_1+d_2)/2$  verwendet, siehe Abbildung 57. Ein Farbverlauf von orange über blau nach weiß gemäß der erwarteten Wahrscheinlichkeitsdichte der Normalverteilung visualisiert die Abstandsinformation in Abbildung 56.

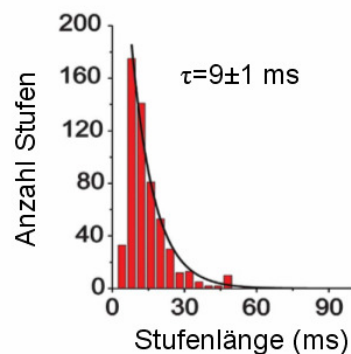
In den Daten sind deutlich sowohl kleine Abstandsänderungen als auch große Sprünge in der Abstands-Trajektorie zu sehen. Für eine weitergehende quantitative Analyse ist die Identifikation der FRET-Stufen in den FRET-Trajektorien notwendig. Hierzu wurden wie zuvor Bursts per Schwellenwerte automatisch festgelegt und diese anschließend manuell gesichtet. Bereiche gleich bleibender FRET-Effizienz wurden durch eine Stufe markiert. Aus 11959 aufgezeichneten Bursts kamen 3128 Bursts für eine weitere Analyse in Betracht, die anderen zeigten beispielsweise photo-physikalische Effekte oder es fehlte einer der beiden Fluorophore. Aus den übrig gebliebenen Stufen lassen sich die Änderungen im FRET-Abstand aus paarweise benachbarten Stufen eines Bursts bilden. Das Histogramm dieser Abstandsänderungen zeigt Abbildung 60a, obere Reihe. Abbildung 60a untere Reihe zeigt ein 2D-



**Abbildung 57:** Beispiel eines Zeitbins mit einem Proximity Factor von  $P=0.80$  (durchgängige rote Linie) und einer Summenzählrate von 30 counts pro ms. Unten: Entsprechende Beta-Verteilung mit den  $1\sigma$ -Rändern  $P_1$  und  $P_2$  (gestrichelte rote Linien). Oben rechts: Transferfunktion  $d=f(P)$ , die den Proximity Factor  $P$  sowie die beiden Ränder  $P_1$  und  $P_2$  in die Abstandsinformation  $d$ ,  $d_1$  und  $d_2$  umrechnet. Oben links: Die beiden umgerechneten Abstandsinformationen  $d_1$  und  $d_2$  sind näherungsweise symmetrisch um  $d$  verteilt. Die resultierende Verteilungsfunktion für den Abstand  $d$  wird daher durch eine Normalverteilung mit  $\sigma=(d_1+d_2)/2$  genähert (blau gefüllte Kurve).

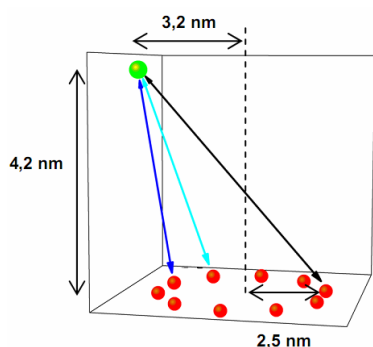
Histogramm der Sprünge paarweise benachbarter Stufen. Der FRET-Abstand der Zielstufe wird über den FRET-Abstand der Startstufe aufgetragen und in einem 2D-Array aufaddiert. Die Häufigkeit eines Übergangs wird farblich dargestellt. Häufige Übergänge sind auf diese Weise gut zu erkennen.

Zwei aufeinander folgende Stufen mit genau dem gleichen FRET-Abstand würden einen Punkt auf der Ursprungsgeraden des 2D-Histogramms erzeugen. Je größer der Abstandsunterschied zwischen dem Stufenpaar, umso weiter von der Ursprungsgeraden entfernt ist seine Entsprechung im 2D-Histogramm. Es ist deutlich zu sehen, dass sich der überwiegende Anteil der Punkte recht nahe an dieser Geraden befindet und es sich daher vornehmlich um kleine Schritte der  $c$ -Untereinheit handeln muss. Die mittlere Stufenlänge von 9 ms (Abbildung 58) ist deutlich kürzer als die beobachtete mittlere Stufenlänge aus den  $120^\circ$ -Rotationen des  $F_1$ -Motors von 18 ms [53] bis 51 ms [136]. Um daraus eine verbindliche Aussage über die Schrittweite der Rotationsbewegung in Syntheserichtung ableiten zu können, wurden Monte-Carlo-Simulationen erzeugt und zum Vergleich herangezogen.



**Abbildung 58: Stufenlängen-Histogramm aus den manuell markierten Stufen. Ein monoexponentieller Fit ergibt eine charakteristische Stufenlänge von 9 ms.**

Ausgangspunkt der Monte-Carlo-Simulation ist ein geometrisches Modell der Bewegung der beiden FRET-Farbstoffe: Der FRET-Akzeptor bewegt sich auf einem



**Abbildung 59: Monte-Carlo-Simulation. Die grüne Kugel markiert die Position des FRET-Donors, die zehn rote Kugeln zeigen die möglichen Startpositionen des FRET-Akzeptors an.**

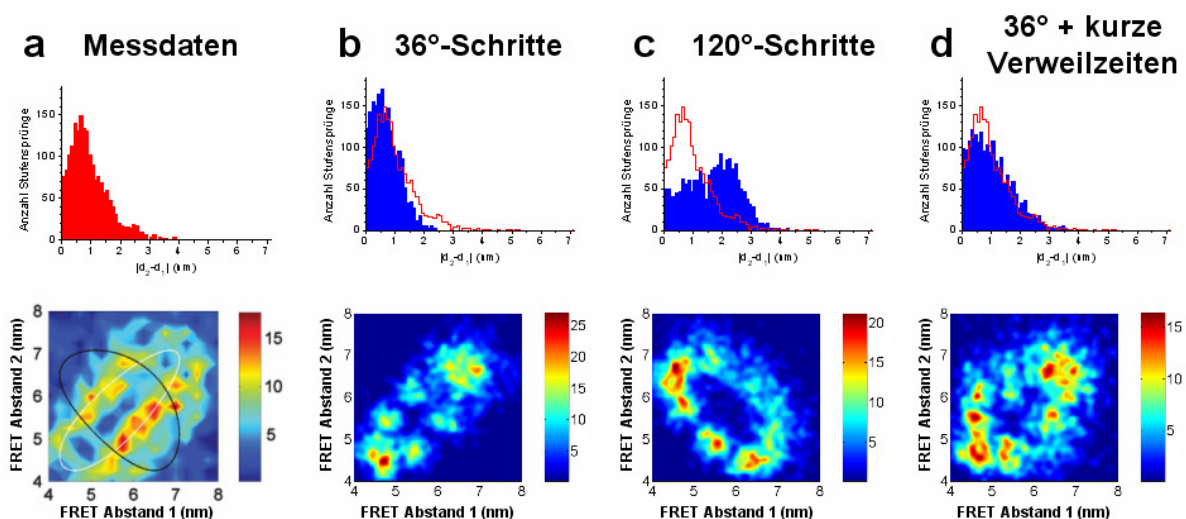
Kreis mit einem Durchmesser von 5 nm und kann als Startposition gemäß der Konformation des  $c$ -Rings nur einen von zehn Positionen einnehmen. 3,2 nm von der Rotationsachse und 4,2 nm über der Rotationsebene entfernt befindet sich der FRET-Donor, dessen Position sich im Folgenden nicht ändert (siehe Abbildung 59). Um die auftretenden Sprünge in der FRET-Trajektorie zu reproduzieren, werden FRET-Abstandspaare erzeugt, in dem ausgehend von einer der zehn möglichen Startpositionen der Akzeptor sich um einen festen vorgegebenen Winkel weiterdreht. Die Zielposition

des Akzeptors kann dabei einen beliebigen Winkel auch zwischen den zehn Ausgangspositionen einnehmen, z.B. bei einer Drehung um  $120^\circ$ . Der räumliche Abstand zwischen Donor und Akzeptor vor und nach der Akzeptorbewegung ergibt ein Abstandspaar, wie es im realen FRET-Experiment erhalten wurde. Allerdings sind die realen Abstandsinformationen bedingt durch die begrenzte Fluoreszenz-Zählrate mit recht hohen Fehlern behaftet. Diese Fehler müssen für einen Vergleich der simulierten Daten mit den realen Daten der Simulation hinzugefügt werden. Hierzu wird der absolute Fluorophor-Abstand aus der Simulation anhand der fluoreszenzspektroskopischen Parameter in einen simulierten Abstandsfaktor  $P$  umgerechnet:

$$P = \left( \frac{d^6}{\gamma R_0^6} + 1 \right)^{-1} \quad (47)$$

$P$  ist der resultierende Abstandsfaktor,  $d$  der simulierte Fluorophor-Abstand,  $R_0$  ist der Förster-Abstand und  $\gamma$  ist der Korrekturfaktor aus Gleichung (10), S. 29.

Die Experimente zeigten eine durchschnittliche mittlere Summenzählrate von  $I=40$  counts/ms. Der tatsächlich gemessene Abstandsfaktor kann bedingt durch das Schrotrauschen als Zufallsvariable ausgedrückt werden, die Messwerte gemäß einer Beta-Verteilung  $f_{Beta}(I_1, I_2)$  mit den Parametern  $I_1 = PI$  und  $I_2 = (1-P)I$  erzeugt. Daher wird  $P$  in der Simulation durch eine Zufallsvariable  $P^* = f_{Beta}(PI, (1-P)I)$  ersetzt und gemäß Gleichung (45) wieder in einen absoluten Abstand zurück



**Abbildung 60:** (a) Histogramme aus der manuellen Stufenmarkierung. (b-d) Monte-Carlo-Simulationen der Histogramme. Obere Zeile: Histogramme der Abstandsänderungen zweier aufeinander folgender Stufen in einem Burst. Zum Vergleich wurde das rote Histogramm aus den Messdaten den aus der Simulation erstellten Histogrammen überlagert. Untere Zeile: 2D-Histogramme der Stufenübergänge.

transformiert. Auf diese Weise erhält man die gleiche Verbreiterung auf die Abstandswerte wie im Experiment. Aus den 1879 beobachteten Stufenpaaren wurde ein Histogramm der Abstandsänderungen erzeugt (Abbildung 60a oben). Zusätzlich wurde ein 2D-Histogramm der Stufensprünge aus den Stufenpaaren gebildet, der absolute Abstand der Zielstufe wurde jeweils über den absoluten Abstand der Startstufe aufgetragen, siehe Abbildung 60a unten. Es wurden Simulationen mit ebenso vielen Stufenwechseln erzeugt, die sich im vorgegebenen Drehwinkel des Akzeptors unterschieden. Abbildung 60b zeigt das Ergebnis für eine Drehbewegung des *c*-Rings in ausschließlich 36°-Schritten. Bereiche mit hoher Häufigkeit des 2D-Histogramm liegen auf einer Ellipse, welche nahe an der Ursprungsgeraden des Diagramms verläuft. Zum Vergleich mit den Messdaten ist das Histogramm der Abstandsänderungen Abbildung 60a oben als rote Linie den Histogrammen aus den Simulationen überlagert (Abbildung 60b-d). Die Simulation mit 36°-Schritten erzeugt zu viele Abstandspaare mit Abstandsänderungen unter 1,5 nm und zu wenige mit größeren Abstandsänderungen. Abbildung 60c zeigt das Ergebnis für eine Bewegung in ausschließlich 120°-Schritten. Hier liegen die Bereiche mit hoher Häufigkeit ebenfalls auf einer Ellipse, diese hat jetzt jedoch einen deutlich größeren Abstand zur Ursprungsgeraden. Hier kommen Abstandsänderungen größer 1,5 nm viel zu häufig vor auf Kosten der Abstandsänderungen unter 1,5 nm. Beide Modi zeigen demnach keine ausreichende Übereinstimmung mit den experimentellen Daten, wenn auch die Simulation mit 36°-Schritten den Messdaten deutlich ähnlicher ist als die Version mit 120°-Schritten.

Bei diesen Überlegungen wurde davon ausgegangen, dass bei der manuellen Stufenmarkierung alle tatsächlich auftretenden Stufenwechsel auch als solche erkannt und markiert wurden. Unterschreitet eine Stufe jedoch eine kritische Länge, so kann sie nicht mehr wahrgenommen werden und wird übersehen. Auf diese Weise gelangen, von übersehenen Stufen verursachte, größere Abstandswechsel in die Histogramme. Ausgangspunkt einer quantitativen Überprüfung ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $p(t)$  der Stufenlängen:

$$p(t) = \frac{1}{t_0} \exp(-t/t_0) \quad (48)$$

$t$  ist die Zeit,  $t_0$  ist die charakteristische mittlere Stufenlänge.

Können aufgrund der Messbedingungen Zustände nur ab einer Mindestlänge  $t_{\text{Stufe}}$  zuverlässig erkannt werden, berechnet sich der Anteil an nicht sichtbaren Stufen aus dem bestimmten Integral  $P_{\text{kurz}}$  der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion von 0 bis  $t_{\text{Stufe}}$ :

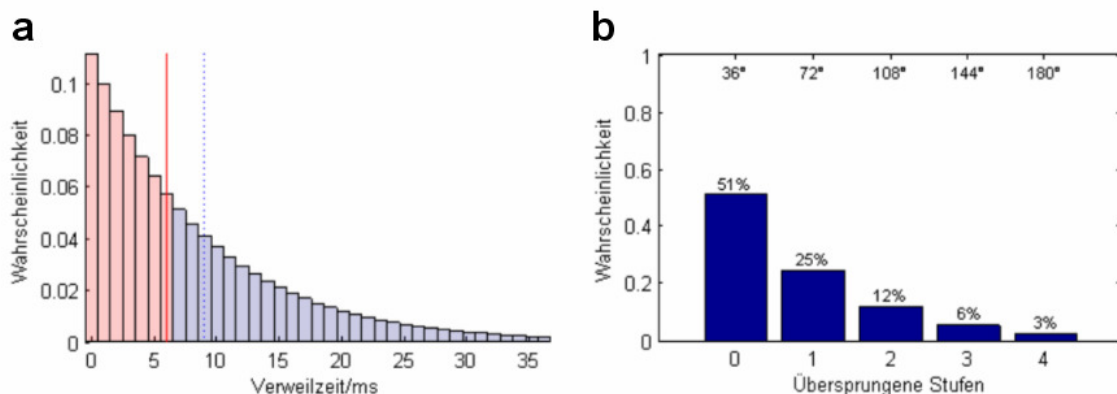
$$P_{\text{kurz}} = \int_0^{t_{\text{Stufe}}} \frac{1}{t_0} \exp(-t/t_0) dt = 1 - \exp(-t_{\text{Stufe}}/t_0) \quad (49)$$

Nun kann man die Wahrscheinlichkeit angeben, ob vor einer sichtbaren Stufe  $n$  zu kurze Stufen vorhanden waren. Sie setzt sich aus  $n$  mal der Wahrscheinlichkeit  $P_{\text{kurz}}$  eine Stufe zu übersehen, und die Wahrscheinlichkeit  $1 - P_{\text{kurz}}$  für die sichtbare Stufe zusammen:

$$a_n = P_{\text{kurz}}^n (1 - P_{\text{kurz}}) \quad (50)$$

Das Ergebnis für eine mittlere Stufenlänge von 9 ms zeigt Abbildung 61a. Werden Stufen erst ab einer Länge von 6 ms zuverlässig erkannt, führt dies zu 50 % missinterpretierter Stufenwechsel. Die genauen Anteile scheinbarer Stufenwechsel zeigt Abbildung 61b. Die Monte-Carlo-Simulation aus ausschließlich  $36^\circ$ -Schritten (Abbildung 60b) muss also erweitert werden: 25 % der  $36^\circ$ -Schritte werden durch  $72^\circ$ -Schritte ersetzt, 12 % werden zu  $108^\circ$ -Schritten und 6 % werden zu  $144^\circ$ -Schritten. Das Ergebnis dieser Monte-Carlo-Simulation zeigt Abbildung 60d. Die hohe Übereinstimmung zu den Messdaten ist gut zu erkennen. Dies liefert die zentrale Erkenntnis, dass der  $F_0$ -Motor ausschließlich in  $36^\circ$ -Schritten rotiert. Größere Schritte wurden aufgrund übersprungener Stufen gefunden. Dieses Ergebnis wurde 2009 in Ref. [54] veröffentlicht.

Eine Hidden-Markov-Analyse ist prinzipiell in der Lage, auch kürzere Stufen zu identifizieren [140]. Zwar werden sich auch hier abhängig vom Signal-Rausch-Verhältnis falsche Stufenzuordnungen ergeben, die Stufenerkennung ist allerdings

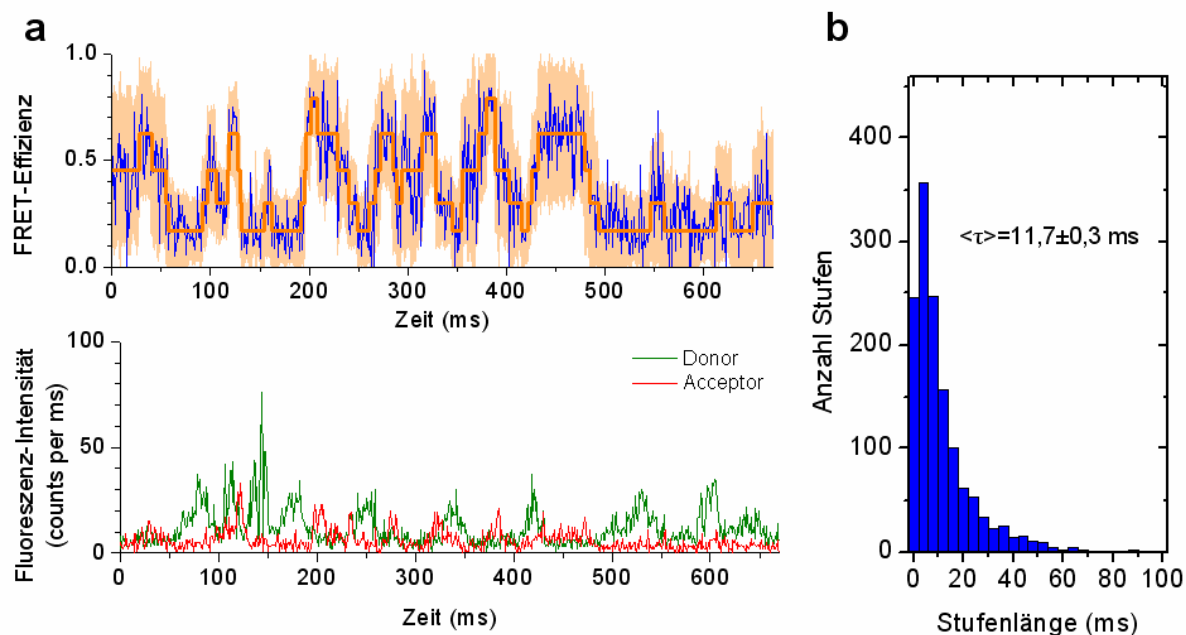


**Abbildung 61: Wahrscheinlichkeit für das Übergehen von kurzen Stufen.** (a) Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion für die Verteilung der Stufenlängen mit einem Mittelwert (blaue gepunktete Linie) von 9 ms. Die rote Linie bei 6 ms markiert die Grenze der zuverlässigen Erkennung eines Zustands. Die in hellrot markierten Stufen werden nicht mehr zuverlässig als solche erkannt. (b) Daraus ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit eine, zwei oder mehr Stufen zu übergehen.

deutlich robuster gegenüber kurzen Stufenlängen, da als zusätzliche Information die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den Stufen hinzugenommen wird. Mit Hilfe der in dieser Arbeit weiterentwickelten Hidden-Markov-Analyse mit gewichteten Schätzern (siehe Kapitel 3) wurde ein HMM mit 5 Zuständen auf die Daten angewendet. Die Modell-Parameter wurden zunächst vorinitialisiert und dann anhand der Messdaten optimiert. Abbildung 62a zeigt resultierende Stufenzuordnung an einem Beispielburst. Die blaue FRET-Effizienz wird durch den HMM-Fit (Viterbi-Pfad) als orange Kurve überlagert. Die Breite der zugehörigen Emissionsfunktion wird durch ein oranges Band verdeutlicht. Die Dicke dieses Bandes sinkt mit steigender Summenzählrate. Das Histogramm über die Stufenlängen aus der Stufenmarkierung durch den Viterbi-Pfad (siehe Abschnitt 3.6) zeigt Abbildung 62b. Auch hier ergibt sich wieder eine monoexponentiell abfallende Form als Stufenlängen-Verteilung mit einem Einbruch der Häufigkeit bei sehr kurzen Stufenlängen.

Der Mittelwert der Stufenlängen beträgt  $11,7 \pm 0,3$  ms. Die Fehlerangabe ergibt sich aus der Standardabweichung der Stufenlängen (12,7 ms) geteilt durch die Wurzel der Anzahl markierter Stufen (1369).

Abbildung 63a, erste Reihe, zeigt das Histogramm der Abstandsänderungen. Die rot überlagerte Kurve ist das Ergebnis der manuellen Stufenmarkierung zum Vergleich. Die Verteilung des HMMs ist deutlich enger, Stufensprünge von über

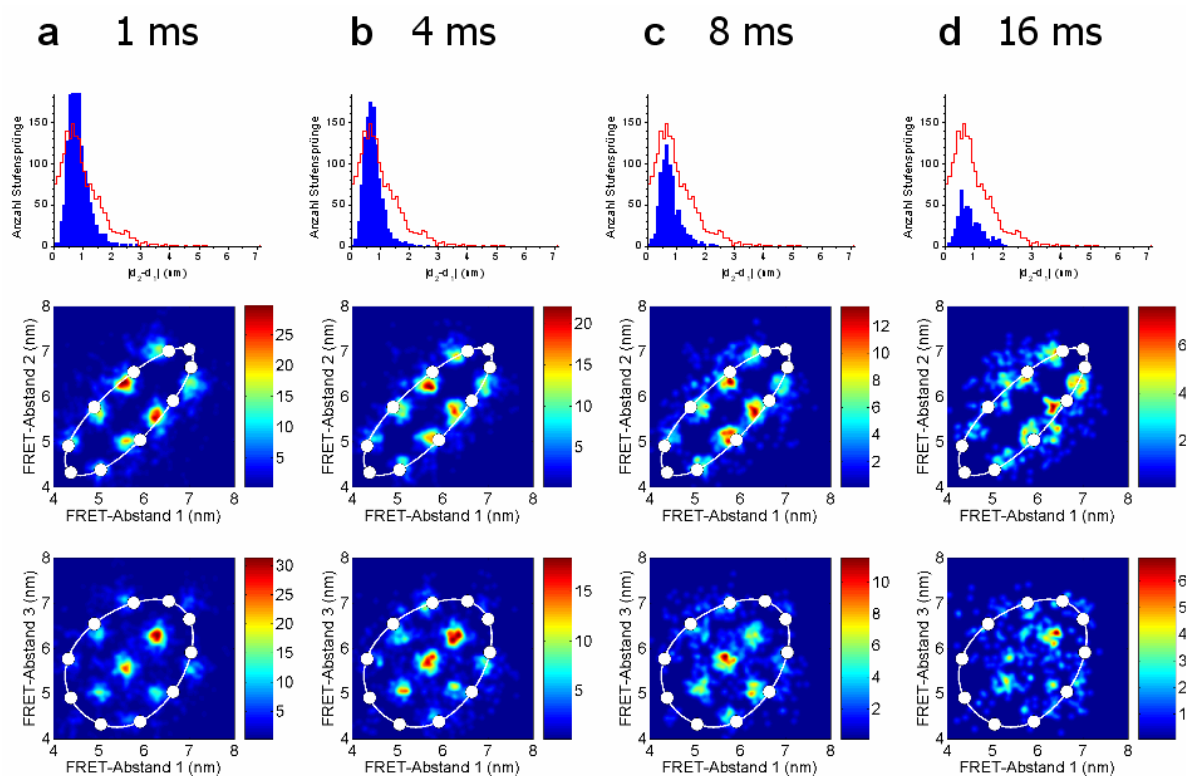


**Abbildung 62:** (a) Beispielburst mit der Auswertung eines HMM mit 5 Zuständen. Donor-Intensität (grün) und Akzeptor-Intensität (rot) im unteren Bild, FRET-Effizienz (blau) und HMM-Fit (orange) (b) Das daraus resultierende Stufenlängen-Histogramm zeigt einen monoexponentiellen Abfall mit einer mittleren Stufenlänge von  $\sim 12$  ms.



1,5 nm kommen praktisch nicht vor. Die Diagramme darunter zeigen Übergangsplots der FRET-Abstände für den nächsten (zweite Reihe) und übernächsten Stufennachbarn (dritte Reihe). Alle Häufungspunkte liegen auf der  $36^\circ$ -Ellipse für den nächsten Nachbarn und auf der  $72^\circ$ -Ellipse für den übernächsten Nachbarn. Die Häufungspunkte auf der Ursprungsgeraden für die Diagramme in der dritten Reihe zeigen Hin- und Hersprünge zwischen der Startstufe und dem übernächsten Nachbarn. Um eine mögliche Limitierung durch die gewählte Zeitauflösung auszuspüren, wurde die Zeitauflösung des Datensatzes vor einer HMM-Auswertung verdoppelt. Abbildung 63b, c und d zeigen die Ergebnisse für die Zeitauflösungen 4 ms, 8 ms und 16 ms. Die Identifikation der Zustände funktioniert selbst bei einer Zeitauflösung von 8 ms, hier sind bereits die meisten Stufen nur noch einen Zeitschritt lang.

Die Rotation der *c*-Untereinheit ruft an den Umkehrpunkten beim höchsten und geringsten Abstand beider FRET-Farbstoffe geringere Abstandsänderungen hervor als im mittleren Bereich. Die HMM-Zustände 1 und 5 werden den Stufen an den Umkehr-



**Abbildung 63: Ergebnisse der HMM Analyse mit unterschiedlichem Zeitbinning. Obere Zeile: 2D-Histogramme der Abstandsänderungen. Zum Vergleich ist in rot das Histogramm aus der manuellen Stufenmarkierung überlagert. Das HMM ist in der Lage, deutlich geringere Abstandsänderungen aufzufinden. Zweite Zeile: Übergangsdigramme von einer Stufe zum nächsten Nachbarn mit eingezeichneten Soll-Haltepositionen bei einer Rotation in  $36^\circ$ -Schritten (weiße Ellipse). Dritte Zeile: Übergangsdigramme zum übernächsten Nachbarn mit Soll-Haltepositionen nach entsprechend  $72^\circ$ .**

punkten zugeordnet, der HMM-Zustand 3 wird den Stufen mit mittleren FRET-Abständen zugeordnet. Tabelle 10 zeigt die Stufenlängen aufgelöst nach den HMM-Zuständen. Die Verlängerung der Stufenlängen für die äußeren HMM-Zustände spiegelt die geometrische Anordnung der FRET-Farbstoffe im Enzym wider. Der Vergleich mit unterschiedlichen Zeitaufösungen zeigt, dass die gewählte Zeitauflösung auch auf die Bestimmung der Stufenlängen nur minimale Auswirkung hat, solange die mittlere Stufenlänge nicht unter die Zeitauflösungsgrenze fällt.

Zeitauflösung	1 ms	2 ms	4 ms	8 ms	16 ms
Stufenlänge Zustand 1	16.4 ms	18.2 ms	22.1 ms	26.1 ms	21.8 ms
Stufenlänge Zustand 2	11.9 ms	12.3 ms	11.5 ms	15.4 ms	14.5 ms
Stufenlänge Zustand 3	<b>8.7 ms</b>	<b>8.8 ms</b>	<b>8.9 ms</b>	10.3 ms	22.3 ms
Stufenlänge Zustand 4	13.0 ms	13.7 ms	12.4 ms	13.4 ms	16.2 ms
Stufenlänge Zustand 5	17.5 ms	20.7 ms	20.2 ms	22.4 ms	28.6 ms

**Tabelle 10: HMM-Stufenmarkierung mit unterschiedlicher Zeitauflösung im Vergleich. An den Umkehrpunkten der Rotationsbewegung sind die FRET-Abstandsänderungen minimal, aufeinander folgende Stufen können nicht mehr unterschieden werden. Die HMM-Zustände 1 und 5 zeigen dementsprechend deutlich längere Zeiten als der mittlere Zustand 3, bei dem sich die Stufen am besten voneinander trennen lassen. Nur die Stufenlängen dieses Zustands kann die Haltezeit des Enzyms während der ATP-Synthese korrekt abbilden (fett gedruckt). Der Vergleich der verschiedenen Zeitaufösungen dokumentiert, dass die ermittelte Stufenlänge von ~9 ms nicht von der Zeitauflösung abhängt, sofern sie höher als die erwartete Stufenlänge ist.**

## 6.7 Zusammenfassung

Mit Hilfe der Einzelmolekül-Spektroskopie konnte ein direkter Einblick in die Funktionsweise der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase erhalten werden. Bedingt durch diese Messmethode können in kurzer Zeit große Datenmengen erzeugt werden. Eine weiterführende Auswertung ist jedoch nur möglich, wenn die gesuchten Zustände in den Datenmengen identifiziert werden können. Eine manuelle Markierung der Stufen in den Daten stellt in der Praxis einen erheblichen Aufwand dar und beinhaltet stets ein subjektives Moment. Die in diesem Kapitel vorgestellten Teilprojekte demonstrieren,

wie dieses Problem durch eine Hidden-Markov-Analyse zuverlässig gelöst wird und wie daraus beachtliche Erkenntnisse über die Funktion und Struktur des Enzyms F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase gewonnen werden konnten.

### **Kooperationen**

Die beiden ATP-Synthase-Präparationen mit dem organischen Fluorophor bisCy5 am *b*<sub>2</sub>-Dimer und TMR an der  $\gamma$ -Untereinheit bzw. TMR an der  $\epsilon$ -Untereinheit wurden von Dr. Manuel Diez und Dr. Boris Zimmermann in Kooperation mit Prof. Dr. Peter Gräber (Institut für Physikalische Chemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Albertstr. 23a, 79107 Freiburg) erzeugt und gemessen. Die drei ATP-Synthase-Präparationen mit dem Fusionsprotein EGFP an der *a*-Untereinheit und Alexa568 an der  $\gamma$ -,  $\epsilon$ - bzw. an der *c*-Untereinheit wurden von Dr. Monika Düser in Kooperation mit Yumin Bi und Prof. Dr. Stanley Dunn (Department of Biochemistry, University of Western Ontario, London N6A 5C1, Canada) erzeugt. Die Arbeiten mit dem Inhibitor Aurovertin wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gary Glick (Department of Chemistry, University of Michigan, 930 N. University Ave., Ann Arbor, MI 48109-1055) durchgeführt.

## 7 Die F<sub>1</sub>-ATPase

Die Markov-Annahme ist die Unabhängigkeit der Übergangsraten eines Zustands von der Vergangenheit des Systems. Diese äußert sich zum einen dadurch, dass zur Quantifizierung eines jeden Übergangs lediglich eine einzige Konstante, die Übergangswahrscheinlichkeit, notwendig ist. Zum anderen wird die Markov-Annahme in der rekursiven Berechnung des Likelihoods verwendet. Kann das System denselben Zustand auf unterschiedlichen Pfaden erreichen, werden die Zerfälle dieses Zustands unabhängig der eingeschlagenen Pfade nur einmal berechnet. Erst diese Annahme umgeht ein mit der Datenmenge exponentielles Anwachsen des Berechnungsaufwands des Likelihoods und ermöglicht dadurch überhaupt erst den Gebrauch von Hidden Markov Modellen (siehe Kapitel 3).

In der Zustandszuordnung durch ein HMM tritt die intrinsische Markov-Annahme durch monoexponentiell abfallende Verweilzeit-Histogramme der einzelnen Zustände in Erscheinung, vorausgesetzt, die behandelten Daten spiegeln tatsächlich einen Markov-Prozess wider. Für Quantensysteme stellt die Markov-Annahme i.d.R. keine Einschränkung dar, da meist nur wenige Freiheitsgrade zur Verfügung stehen: oft eine Hand voll Zustände mit zugehörigen Zerfallsraten.

Biomoleküle sind jedoch Makromoleküle und haben eine entsprechend gewaltige Anzahl an Freiheitsgraden. Dennoch spielen zur Beschreibung der Funktionsweise eines Enzyms oft nur wenige Molekül-Konformationen eine Rolle. Um die Dynamik eines Enzyms zu beschreiben, identifiziert man deshalb i.d.R. typische Konformationen und versucht, den Einfluss äußerer biochemischer Bedingungen auf deren Übergangsraten zu verstehen. Konformationen sind dadurch Zustände, die nicht zwangsläufig der Markov-Annahme genügen müssen. Elastische Energiespeicherung könnte z.B. ein wichtiger Bestandteil in der Beschreibung von Enzymkinetiken sein. Konformationsänderungen und die damit verbundenen Übergangsraten wären auf diese Weise unmittelbar von der Vergangenheit abhängig und genügen dadurch nicht der Markov-Annahme.

Enzyme sind jedoch hochspezialisierte Maschinen, die oft nur eine einzige Aufgabe haben. So durchläuft die ATP Synthase bei der Synthese von ATP aus ADP und P<sub>i</sub> zyklisch eine immer gleiche Konformationsabfolge [133, 141]. Es müssen also spätestens nach einem Zyklus dieselben Bedingungen wieder vorliegen. Aufgrund der 3-zähligen Symmetrie dieser Enzyme kann man sogar davon ausgehen, dass bereits nach einem 120°-Schritt gleiche Bedingungen vorliegen müssen, da nach einem jeden

solchen Schritt ein ATP-Molekül synthetisiert werden kann. Monoexponentielle Verweilzeit-Histogramme wurden für alle drei 120°-Schritte gefunden [53, 136], womit sich die Markov-Annahme für jeden der drei Zustände rechtfertigen lässt.

Der F<sub>1</sub>-ATPase Sub-Komplex bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma$  ist der kleinste Sub-Komplex der F-Typ-ATP Synthasen, der noch in der Lage ist, eine ATP getriebene Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit ausführen zu können [142-144]. Hier konnte gezeigt werden, dass bei verringerter ATP-Konzentration (< 1 mM) der 120°-Schritt in einen 40°- und 80°-Schritt unterteilt ist [143, 145].

## 7.1 Probenpräparation

Es wurde ein Subkomplex der F<sub>1</sub>-ATPase verwendet bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha_3\beta_3\gamma$  von *Bacillus PS3*. 10 Histidinreste waren zudem an den N-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit gebunden, zusätzlich enthielt die  $\gamma$ -Untereinheit die Mutation S106C [143]. Über die Histidine konnte das Enzym unspezifisch an die unbehandelte Glasoberfläche binden. Das einzelne freie Cystein in der veränderten  $\gamma$ -Untereinheit wurde mit Biotin PEAC5-Maleimid biotinyliert. Die Enzympräparation wurde wie in [144, 146] durchgeführt. Eine Lösung aus den F<sub>1</sub>-ATPase-Subkomplexen (20 nM) und Puffer I (10 mM MOPS pH 7.0, 50 mM KCL, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde in eine Flusskammer bestehend aus zwei Matsunami Deckgläser mit 50  $\mu$ m Abstandhalter geleitet. Nach zwei Minuten wurde die Flusskammer mit Puffer II (Puffer I + 10 mg/ml BSA) gespült, um ungebundene F<sub>1</sub>-ATPase-Subkomplexe zu entfernen und die restliche Glassfläche mit BSA zu bedecken. Anschließend wurde die Kammer mit im Puffer II gelösten Streptavidin-beschichteten Polystyrol-Kugeln (Durchmesser 0.56  $\mu$ m, Bangs Labs, ~200 pM) gefüllt. An eine  $\gamma$ -Untereinheit konnte so eine Kugel über die stabile Biotin-Streptavidin-Verbindung gebunden werden. Um das Rotieren der  $\gamma$ -Untereinheit zu ermöglichen, wurde die Flusskammer mit Puffer II mit 1 mM ATP gefüllt. Ein Schema der Probe zeigt Abbildung 64a. Während der Datenaufnahme konnten die ATP/ADP/P<sub>i</sub>-Konzentrationen durch einen Pufferaustausch mit entsprechenden Puffern (siehe Tabelle 11) verändert werden, wobei immer dasselbe ATPase-Molekül beobachtet wurde. Die Bewegung der Kugel wurde mit dem Olympus IX71 Mikroskop (Japan) in Hellfeldtechnik mithilfe der CMOS-Kamera LOGLUX® i5 CL (Kamera Werk Dresden, Germany) mit einer Zeitauflösung von 5 ms aufgenommen. Aus den Filmen wurde anschließend die Kugelposition extrahiert,

diese bildet die zweidimensionale Trajektorie (x- und y-Position) für die HMM-Analyse.

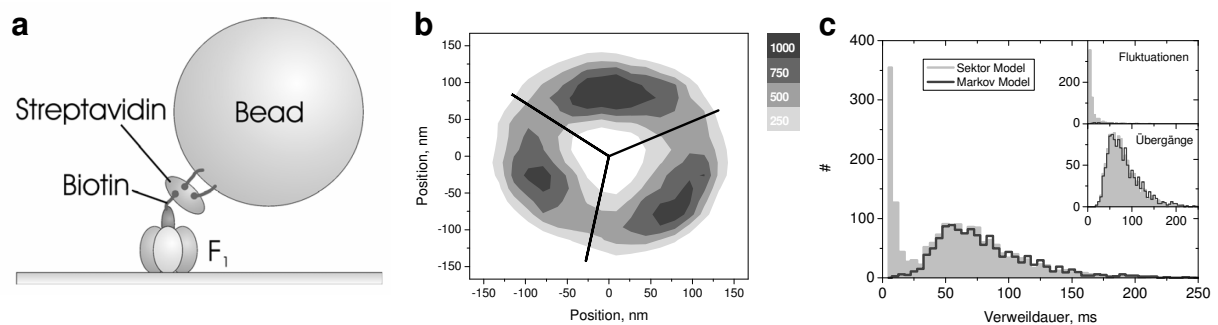
## 7.2 Ausgangspunkt der Datenanalyse

Der schrittweisen Bewegung der  $\gamma$ -Untereinheit ist die Brownsche Bewegung überlagert. Deshalb können die drei Haltepositionen mit einem Schwellenwert-Algorithmus nur unter optimalen Bedingungen aufgelöst werden, d.h. eine kleine Kugel und langsame Bewegung durch geringe ATP-Konzentrationen. Lässt man den F<sub>1</sub>-Subkomplex bei hohen ATP-Konzentrationen unter großer Last bedingt durch eine große Kugel laufen, so gehen die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der Zustände ineinander über (Abbildung 64b). Ein Schwellenwert-Algorithmus vermag dann nicht mehr die Zustände zuverlässig voneinander zu trennen. Aus den Schwellenwerten für den Winkel leiten sich Sektoren ab, aufeinander folgende Kugel-Positionen innerhalb des gleichen Sektors werden zu einer Stufe zusammengefasst.

Ein Histogramm aus diesen Verweildauern (=Stufenlängen) aller Stufen zeigt ein ausgeprägtes Maximum bei einer Verweilzeit größer als Null und weist dadurch auf einen Nicht-Markov-Prozess hin (Abbildung 64c). Der Grund hierfür ist möglicherweise der flexible Linker zwischen der  $\gamma$ -Untereinheit der ATPase und der im Vergleich zur ATPase etwa 100-mal größeren Polystyrol-Kugel. Diese Last führt zu einer Rückkopplung der Kugelposition auf die  $\gamma$ -Untereinheit und somit zu einer insgesamt verlangsamten Rotationsgeschwindigkeit. Sehr schnelle Fluktuationen werden durch das Linker-Kugel-System weggedämpft und führen somit zur Formung eines Maximums im Verweildauer-Histogramm.

Zusätzlich zeigt sich ein sehr hohes, schnell abfallendes Maximum bei einer Verweilzeit von 0 ms. Die Ursache für dieses Maximum bei sehr kurzen Verweilzeiten wird offensichtlich, wenn man alle Stufen anhand der vorhergehenden und nachfolgenden Nachbarstufe in zwei Populationen aufteilt: stammen beide Nachbarn aus demselben Sektor, werden sie zur Population 1 zugeordnet; die Kugel fluktuiert dann von Sektor A zu Sektor B und wieder zurück zu Sektor A; es handelt sich also um Fluktuationen anstatt einer gerichteten Bewegung. Stammen beide Nachbarn hingegen aus unterschiedlichen Sektoren, hat die Bewegung eine Richtung: Sektor A  $\rightarrow$  Sektor B  $\rightarrow$  Sektor C. Im Verweildauer-Histogramm aus den Stufen der ersten Population findet man bei einer Verweilzeit von 0 ms das erste Maximum wieder, Population zwei liefert das zweite Maximum bei etwa 60 ms. Die Ursache für das erste

Maximum ist also ein Überlappen der Emissionsfunktionen, also Artefakte bedingt durch die Brownsche Bewegung der Kugel. Ein Hidden Markov Modell mit drei Stufen für die drei Sektoren ist resistent gegen dieses Fluktuations-Artefakt. Bemerkenswert ist hier die Fähigkeit des Hidden Markov Modells, den nicht-monoexponentiellen Verlauf des Verweildauer-Histogramms richtig wiederzugeben, obwohl das zugrunde liegende Modell mit einer einzigen Übergangswahrscheinlichkeit zu schlicht ist, um dieses Merkmal beschreiben zu können.



**Abbildung 64: Probenpräparation und Messdaten.** (a) Über His-Tags an den  $\beta$ -Untereinheiten wurden Subkomplexe der F<sub>1</sub>-ATPase kovalent an ein Deckglas immobilisiert. Eine biotinylierte Polystyrol-Kugel ( $\text{\O} = 0,5 \mu\text{m}$ ) wurde über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an die  $\gamma$ -Untereinheit des Subkomplexes gebunden. In einem Hellfeldmikroskop konnte mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (200 Bilder/s) die ATP-getriebene Bewegung der  $\gamma$ -Untereinheit aufgenommen werden. (b) 2-dimensionaler Dichteplot der Kugelposition während Rotation der  $\gamma$ -Untereinheit in Gegenwart von 1 mM ATP, 1  $\mu\text{M}$  ADP und 1  $\mu\text{M}$  P<sub>i</sub> (grau). Die schwarzen Linien zeigen die Grenzmarkierungen des Sektormodells. Die PDF der drei Haltepositionen überlappen, was zu einer falschen Zustandszuordnung durch das Sektor-Modell führt. (c) Verweildauer-Histogramm eines Zustands gemäß des Sektor-Modells (grau) und des Hidden Markov Modells (schwarz) bei 1 mM ATP, 1  $\mu\text{M}$  ADP und 1  $\mu\text{M}$  P<sub>i</sub>. Eingefügte Graphen: Die Separation fluktuationsbedingter Stufenfolgen von echten Übergängen entlarven falsche Zustandszuordnungen als Fluktuationen in der Nähe der Zonenränder.

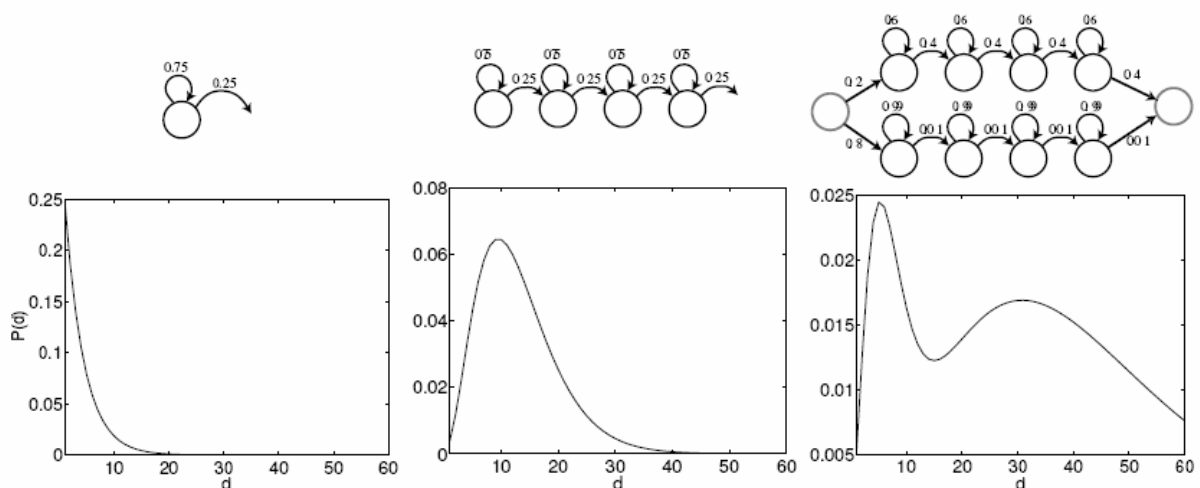
### 7.3 Eine erweiterte HMM-Architektur

HMMs haben in den letzten Dekaden große Erfolge in der automatischen Spracherkennung gefeiert [29, 77]. Dort sind die Verweildauer-Histogramme der Zustände, meist Silben, faktisch nie monoexponentiell verteilt. Um dieses Problem zu lösen, wurde die HMM-Architektur erweitert: schaltet man mehrere Sub-Zustände mit jeweils nur einem erlaubten Übergang zum nächsten Nachbarn in Reihe, so erhält man für die ganze Zustandsreihe ein Verweildauer-Histogramm mit einem Maximum bei einer positiven Verweilzeit. Mit jedem zusätzlich parallel angeordneten Zweig lassen

sich weitere Maxima modellieren (Abbildung 65). Auf diese Weise lassen sich praktisch beliebige Formen von Verweildauer-Histogrammen erzeugen. Alle Sub-Zustände teilen sich dabei eine gemeinsame Emissionsfunktion, sie werden sich also alleine aufgrund der Messwerte nicht mehr zuordnen lassen, dies gelingt vielmehr ausschließlich über die Vorgeschichte. Solche HMM werden unter dem Begriff *aggregated Markov states* oder *Hidden semi-Markov Models* (HSMM) [147] geführt und haben sich in der automatischen Spracherkennung bewährt [148], wurden aber erst in jüngster Zeit auf Einzelmoleküldaten angewandt [149]. Im Folgenden wird der Begriff „Mikrozustand“ (*microstate*) für einen einzelnen Zustand verwendet, um ihn gegen den Zustandscluster „Makrozustand“ (*macrostate*) abzugrenzen, dem eine Emissionsfunktion zugeordnet ist.

Umfasst die Abhängigkeit eines Zustands von seiner Vorgeschichte nur eine begrenzte Zahl an Zeitschritten, so kann man an der Markov-Annahme festhalten, wenn man alle auftretenden Zustandsfolgen als neuen Superzustand definiert und diese als Grundlage eines Markov-Modells nimmt. Ein Markov-Modell höherer Ordnung lässt sich auf diese Weise auf die Ordnung 1 abbilden, die Bedeutung dieser neuen Superzustände ist aber meist nicht mehr intuitiv [77], zudem steigt die Zahl der erforderlichen Superzustände exponentiell mit der Länge der zusammenzufassenden Zustandsfolgen.

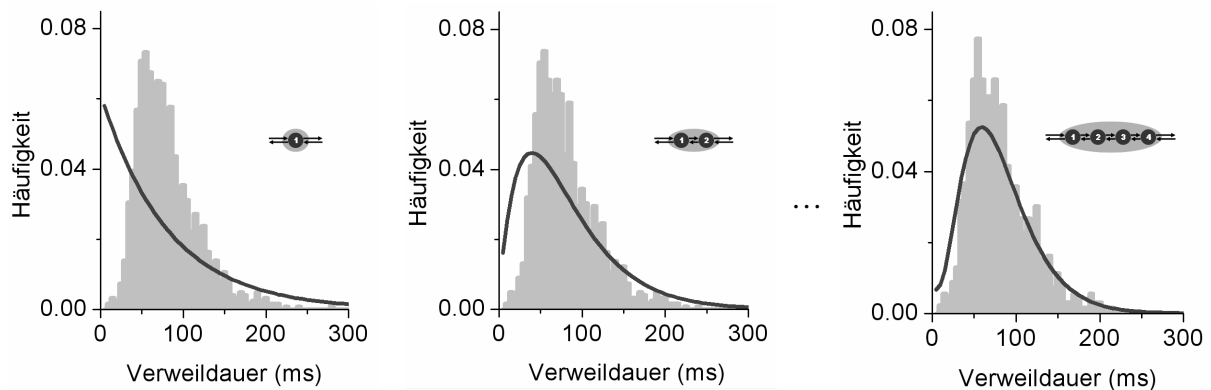
Die vorliegende Form des Verweildauer-Histogramms legt eine lineare Anordnung mehrerer Mikrozustände nahe. Die Zahl richtiger Zustände lässt sich ermitteln, wenn



**Abbildung 65:** Drei unterschiedliche Verweilzeit-Histogramme und deren zugehörige Markov-Ketten-Topologien, aus [77].



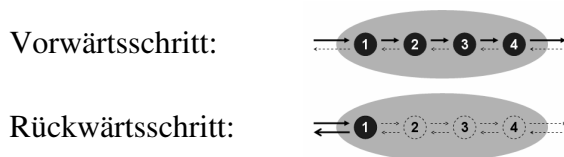
man aus dem HMM die theoretische Form des Verweildauer-Histogramms mit dem aus der Zustandszuordnung des Viterbi-Pfads vergleicht. Quantitativ gelingt dies, in dem die mittlere quadratische Abweichung (*root mean squares, RMS*) zwischen beiden Verweildauer-Histogrammen verwendet wird. Ein Modell mit einem Mikrozustand erzeugt erwartungsgemäß eine monoexponentiell abfallende Funktion und führt hier zu einem großen RMS. Mit zwei Mikrozuständen erhält man bereits ein Maximum bei einer Verweilzeit größer null. Jeder weitere Zustand senkt die Wahrscheinlichkeit für sehr kurze Stufen und führt zu einem immer engeren Maximum (Abbildung 66) und kleineren RMS-Werten.



**Abbildung 66:** Verweildauer-Histogramme der Makrozustände aus dem Viterbi-Pfad (grau) und berechnet aus der Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix (schwarze Linie) desselben HMMs bei 1 mM ATP, 1  $\mu$ M ADP und 1  $\mu$ M P. Jeder Makrozustand (graue Ellipse) besteht aus ein bis fünf Mikrozustände (schwarze Kreise 1 bis 5) in einer Zeile.

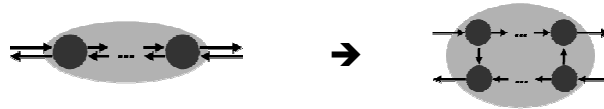
## 7.4 Korrekte Modellierung der Rückwärtsschritte

Ändert sich jedoch die Drehrichtung der Rotation, so werden die Mikrozustände des betreffenden Makrozustands nicht durchlaufen. Für all diese Zustände mit nachfolgender Drehrichtungsänderung wird nur der erste Mikrozustand verwendet, da nach Ablauf der Stufenlänge aus diesem wieder in den Vorgängerzustand zurück gesprungen werden kann. Diese eine Rücksprungrate bestimmt somit alleine die Form des Verweildauer-Histogramms.

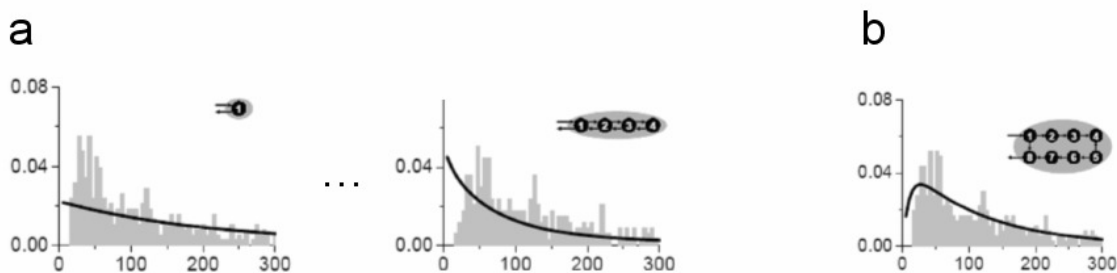


Aber auch dieses Problem kann durch geeignetes Hinzufügen von Mikrozuständen behoben werden. Eine zweite Reihe von Mikrozuständen verdoppelt zwar zunächst die

Anzahl der Mikrozustände, wenn man jedoch die Vorwärtsraten in der ersten Zeile belässt und die Rückwärtsraten in die zweite Zeile verschiebt, benötigt man nur zwei zusätzliche Übergänge als Verbindung zwischen beiden Zeilen trotz Verdopplung der Mikrozustände:

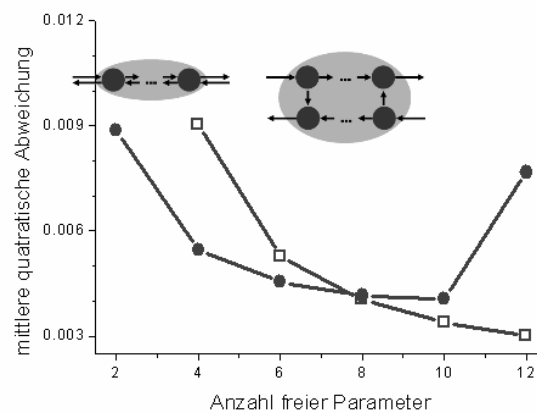


Das entsprechende Verweildauer-Histogramm bekommt wieder ein Maximum bei einer von null verschiedenen Verweilzeit und passt bereits mit zwei Zeilen ausreichend gut zum Histogramm aus der Zustandszuordnung durch das HMM (Abbildung 67).



**Abbildung 67:** (a) Verweildauer-Histogramme der Makrozustände nach dem Vorwärtsschritt und vor dem Rückwärtsschritt aus dem Viterbi-Pfad (grau) und berechnet aus der Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix (schwarz) desselben HMMs bei 0.01 mM ATP, 0.99 mM ADP und 0.99 mM Pi. Trotz steigender Modellkomplexität behält die resultierende Kurvenform ihren monoexponentiellen Verlauf, da bei einer Richtungsänderung stets nur der erste Mikrozustand verwendet wird. (b) Hinzufügen einer zweiten Reihe von Mikrozuständen erlaubt auch hier eine bessere Kurvenanpassung ohne drastische Erhöhung der freien Parameter.

Abbildung 68 zeigt das RMS von HMMs mit Ein-Zeilen und Zwei-Zeilen Makrozuständen im Vergleich. Das RMS für das Ein-Zeilen-HMM steigt ab 10 freien Parametern (5 Mikrozuständen) wieder an, da dann die durch die hohe Zahl aufeinander folgender Mikrozustände verursachte Mindestverweildauer zu lang wird. Bei Zwei-Zeilen-HMMs besteht ein Makozustand mit 10 freien Parametern aus 8 Mikrozuständen, davon befinden sich nur vier in einer Reihe und der Effekt tritt noch nicht auf. Ab 10 freien Parametern übertrifft die Qualität der Kurvenanpassung des Zwei-Zeilen-Modells die des Ein-Zeilen-Modells (siehe Abbildung 68).



**Abbildung 68: Zwei-Zeilen-Modell und mittlere quadratische Abweichung zwischen dem Verweildauer-Histogramm der Makrozustände und dem berechneten Verlauf aus der Übergangswahrscheinlichkeitsmatrix. Im Zwei-Zeilen-Modell sind die Vorwärtswahrscheinlichkeiten ausschließlich auf der oberen Zeile und die Rückwärtswahrscheinlichkeiten auf der unteren Zeile zu finden. Vergleich des Ein-Zeilen-Modells (●) mit dem Zwei-Zeilen-Modell (□) für Nukleotid-Konzentrationen von 0.5 mM ATP, 0.5 mM ADP und 0.5 mM  $P_i$ .**

## 7.5 Abhängigkeit der Übergangsraten von Nukleotid- und Phosphatkonzentration

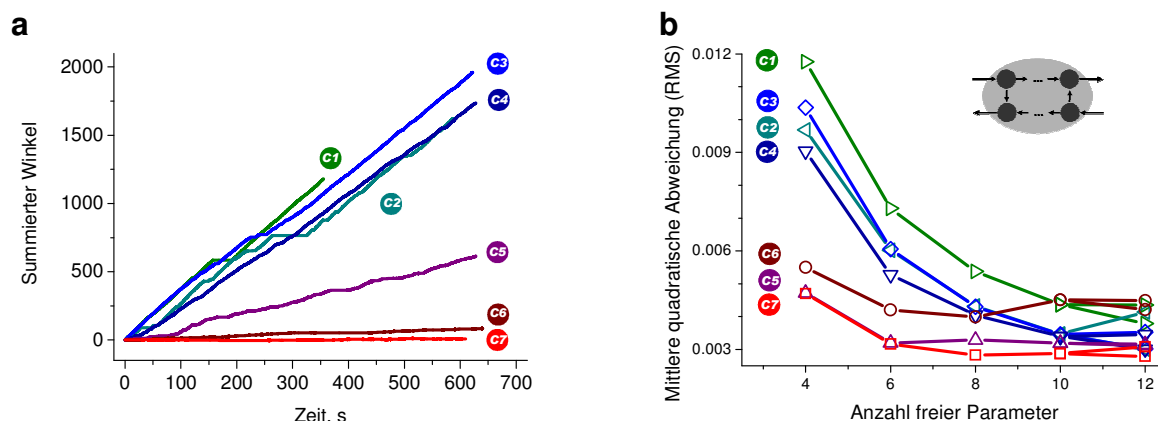
Mit dieser HMM-Architektur können nun die Übergangsraten in Abhängigkeit der Nukleotid- und Phosphatkonzentrationen untersucht werden. Um während der Messung einen Pufferaustausch zu ermöglichen, wurde ein Flusskammersystem installiert. Dasselbe ATPase-Molekül konnte so mit sieben verschiedenen Puffern untersucht werden, deren Konzentrationsverhältnissen von ATP zu ADP und  $P_i$  einen Bereich von sechs Größenordnungen umfassten (Tabelle 11).

	[ATP], mM	[ADP], mM	[ $P_i$ ], mM
C 1	1	0.001	0.001
C 2	0.99	0.01	0.01
C 3	0.9	0.1	0.1
C 4	0.5	0.5	0.5
C 5	0.1	0.9	0.9
C 6	0.01	0.99	0.99
C 7	0.001	1	1

**Tabelle 11: Konzentrationen der Nukleotide ATP und ADP sowie von  $P_i$ . Das Konzentrationsverhältnis von ATP zu ADP und  $P_i$  wurde in einem Bereich von sechs Größenordnungen variiert.**

Die Abhängigkeit der Zahl durchgeführter Umdrehungen des ATPase-Moleküls von der ATP-Konzentration ist deutlich zu erkennen, siehe Abbildung 69a. Im beobachteten Zeitraum von 10 Minuten konnte das betrachtete ATPase-Molekül bei ATP-Konzentrationen von über 0.5 mM ein- bis zweitausend Umdrehungen vollziehen, mit sinkender ATP-Konzentrationen sank auch die Zahl der vollen Umdrehungen. Bei der geringsten Konzentration von 1  $\mu$ M wurden kaum zehn volle Umdrehungen registriert.

Abbildung 69b zeigt das Resultat des Zwei-Zeilen HMMs mit ein bis fünf Mikrozuständen pro Zeile (4 bis 12 freien Parametern). Aufgetragen ist das RMS aus dem theoretischen Verweilzeit-Histogramm und dem Histogramm aus der Stufenmarkierung durch das entsprechende HMM für alle sieben Zeitspuren. Je höher die Umdrehungsrate des Moleküls, desto wichtiger ist die korrekte Modellierung des Verweildauer-Histogramms. Eine ausreichende Modellkomplexität ist ab vier Mikrozuständen pro Zeile erreicht, ein weiteres Hinzufügen von Mikrozuständen zeigt keinen weiteren Gewinn des RMS-Werts. Ein solches Modell ist in der Lage, alle sieben Konzentrationen gleich gut zu beschreiben und gewinnt damit einen universellen Charakter.



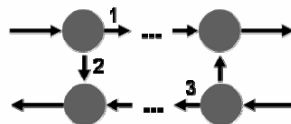
**Abbildung 69:** (a) Summierter Winkel aufgetragen über die Zeit, gemessen an der selben F1-ATPase unter verschiedenen Nukleotid- und Phosphat-Konzentrationen. (b) Abhängigkeit des mittleren quadratischen Fehlers von der Anzahl freier Parameter bei verschiedenen Nukleotid- und Phosphat-Konzentrationen, siehe auch Tabelle 11. Die Streuung zwischen den sieben Kurven erreicht ein Minimum bei ausreichender Modellkomplexität.

Dieses Modell ist nun in der Lage, Rückschritte zu detektieren und die charakteristischen Übergangsraten zu liefern.

## 7.6 Zuordnung der Mikrozustände und Übergangsraten

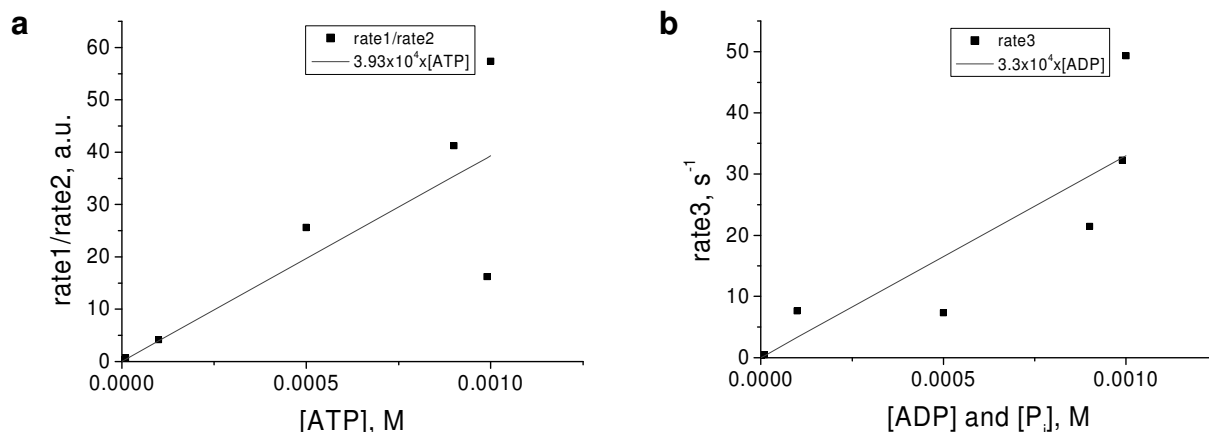
Verweilt das ATPase-Molekül für z. B. 20 Zeitschritte in einem Makrozustand und macht anschließend einen Übergang in Vorwärtsrichtung, so erfolgt die Zuordnung der z. B. 4 Mikrozustände in der Weise, dass die Zeitschritte 1 bis 17 dem ersten Mikrozustand zugeordnet werden, und die verbleibenden Zeitschritte 18, 19 und 20 mit den Mikrozuständen 2, 3 und 4 verknüpft werden. Auf diese Weise erhalten die Mikrozustände 2, 3 und 4 Verweilwahrscheinlichkeiten von 0 (Übergangswahrscheinlichkeiten von 1), während hingegen der erste Mikrozustand die Verweilwahrscheinlichkeit des Makrozustands repräsentiert. Alternativ könnte die Zustandszuordnung auch gleichmäßiger auf die Mikrozustände verteilt werden. Doch da der Vorwärts-Rückwärts-Lernalgorithmus das Likelihood der Daten durch Variation der Parameter zu maximieren versucht und die Übergangswahrscheinlichkeiten direkt dort einfließen, wird dieses Schema mit hohen Übergangswahrscheinlichkeiten für die Folgezustände (1 ist der Maximalwert) einer Gleichverteilung bevorzugt.

Somit drückt die Übergangswahrscheinlichkeit des ersten Mikrozustands in den zweiten jeder Zeile umgerechnet in eine entsprechende Rate direkt die Häufigkeit aus, mit der dieser Weg eingeschlagen wird und steht somit für die Zahl der Übergänge über diesen Pfad:



Der mit einer „1“ markierte Übergang gibt die Rate der Vorwärtsschritte an, der Übergang „3“ markiert die Rate der Rückwärtsschritte und „2“ markiert einen Rückwärtsschritt nach einem Vorwärtsschritt.

Der Quotient aus Übergangsrate „1“ zu Übergangsrate „2“ ist in Abbildung 70a über die ATP-Konzentration aufgetragen. Abbildung 70b zeigt die Übergangsrate „3“ über die Phosphatkonzentration. Deutlich ist die steigende Determiniertheit der Vorwärtsrichtung bei steigender ATP-Konzentration zu sehen. Ein linearer Fit liefert einen Proportionalitätsfaktor von  $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Die Zahl aufeinander folgender Rückwärtsschritte steigt ebenso deutlich mit steigender ADP- bzw.  $P_i$ -Konzentration. Hier ergibt ein linearer Fit eine Proportionalitätskonstante von  $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Ref. [150] findet eine vergleichbare Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration.



**Abbildung 70: Abhängigkeit der Nukleotid-Konzentration von (a) Quotient aus Rate 1 und 2. (b) Rate 3. Der Proportionalitätsfaktor aus dem linearen Fit ist  $3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (a) und  $3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (b).**

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die HMMs keinerlei Schwierigkeiten mit den überlappenden Emissionsfunktionen hatten und darüber hinaus auch nicht auf monoexponentielle Verweildauer-Histogramme beschränkt sind.

### Kooperationen

Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Dirk Bald, Prof. Dr. Holger Lill und Dr. Zorica Ristic (Department of Structural Biology, Faculty of Earth and Life Science, Vrije Universiteit Amsterdam, De Boelelaan 1085, 1081 HV Amsterdam, Netherlands) durchgeführt. Die Experimente führten Dr. Alexander Kovalev und Dipl.-Phys. Florian Werz aus der AG von Dr. Carsten Tietz am 3. Physikalischen Institut der Universität Stuttgart aus.

## 8 Diskussion

Die Anwendungsbeispiele in den vorigen Kapiteln lassen bereits die Stärken und Schwächen der Hidden Markov Modelle erahnen. In den folgenden Abschnitten werden deshalb das Potential und die Grenzen der Hidden Markov Modelle gegenübergestellt. Eine naheliegende Erweiterung der Methode auf Photonenankunftszeiten sowie alternative Analyseverfahren werden diskutiert. Ein Abschnitt über Robustheit rundet dieses Kapitel ab.

### 8.1 Stärken der Hidden Markov Analyse

Daten mit geringen Signal-Rausch-Verhältnissen legen den Einsatz statistischer Methoden zur Auswertung nahe. Klassischerweise gelangt man erst zu Aussagen, in dem gemittelte Datensätze erzeugt und erst diese modelliert werden. Beispiele hierfür sind FCS (Fluoreszenz Correlation Spectroscopy), PCH (Photon Counting Histogram), FPT (First Passage Time, Verweilzeitenanalyse) und alle weiteren Methoden, die die Erstellung eines Histogramms beinhalten.

Eine Auswertung der Daten mit Hidden Markov Modellen basiert hingegen auf einer Likelihood-Funktion. Prinzipiell wird hier von zufallsbehafteten Messdaten ausgegangen, die direkt auf unterster Ebene als Zufallsvariablen modelliert werden. Die Modellierung ordnet den beobachteten Zufallsvariablen (Messwerten) bestimmte Wahrscheinlichkeitsverteilungen zu. Eine Mittelung erfolgt hier implizit über die mit der Datenmenge steigende Genauigkeit der Schätzwerte und nicht explizit über eine Histogrammierung. Daten mit geringem Signal-Rausch-Verhältnis lassen sich so wesentlich besser handhaben, insbesondere dann, wenn die Signalqualität nicht konstant ist aber bekannt ist, wie das bei Einzelmoleküldaten typischerweise der Fall ist. Eine Analyse mit Hidden Markov Modells ist eine lückenlos statistische Betrachtung. Daraus ergeben sich die Vorteile:

- kleine Signal-Rausch-Verhältnisse der Daten können durch längeres Messen kompensiert werden
- Zusätzlich zu den Schätzwerten selbst erhält man auch ein sinnvolles Vertrauensintervall. Die Qualität der Aussage ist also aus den Daten extrahierbar
- Die Rechenzeit steigt linear mit der Datenmenge, so lassen sich auch große Datenmengen nutzen

## 8.2 Grenzen der Hidden Markov Analyse

Eine unvollständige Modellierung der Messdaten kann beliebig fatale Folgen auf das Ergebnis haben, ohne dass dies immer sofort offensichtlich ist. Beinhaltend z.B. Daten aus fluoreszenzspektroskopischen Experimenten zusätzliche photophysikalische Effekte, so wird sich der beobachtbare Zustandsraum vergrößern. Leicht können solche zusätzlichen Zustände für Proteindynamik gehalten werden. Ist das Signal-Rausch-Verhältnis so schlecht, dass inaktive oder nur bedingt aktive Moleküle vor der HMM-Analyse nicht mehr aussortiert werden können, dann muss eine HMM-Analyse scheitern. Das Verhalten mehrerer Molekülspezies mit jeweils unterschiedlichen Zuständen und Raten in einem Modell zu implementieren ist zwar prinzipiell möglich, bringt aber eine hohe Zahl an Parametern mit sich. Die für ein Bestimmen der Parameter notwendige Datenmenge kann dann schnell unrealisierbar große Werte annehmen.

Ein weiteres sehr großes Problem sind auch zeitliche langsame Veränderungen der Umgebungsbedingungen. So können leichte Temperaturschwankungen die Übergangsraten des untersuchten Systems ändern. Solche Effekte sind nur schwer auszuschließen. Sie machen sich durch Schwankungen des Loglikelihoods während des iterativen Optimierungs-Algorithmus bemerkbar und führen zu einer Übervorteilung von Modellen mit zusätzlichen Zuständen.

## 8.3 Photonweise Hidden Markov Modelle

Im Gegensatz zu Kameradaten ist die zeitliche Auflösung von Daten aus konfokalen Einzelmolekülaufbauten mit APDs oder Photomultiplier als Detektoren nicht mehr durch die Messtechnik selbst begrenzt. Vielmehr wird der Zeitstempel jedes einzelnen Photons erfasst, sodass sich sogar die Lebensdauer des angeregten Zustands photonweise erstellen lässt. Eine Intensitätstrajektorie lässt sich durch einfaches Binning in beliebigen Zeitauflösungen erstellen. Bei typischen Zählraten der Fluorophore von  $10^4$  bis  $10^5$  detektierten Photonen pro Sekunde (counts/ms) führt ein Binning von 1 ms zu einer Trajektorie mit einer Zählrate von 10 bis 100 Photonen pro Zeitbin. Diese Trajektorie ist für einen Menschen aussagekräftig, manuell lassen sich bei ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis Stufen in der FRET-Trajektorie erkennen und mit der algorithmischen Analyse vergleichen. Allerdings bleibt eine Analyse, die auf gebinnete Daten beruht, natürlich in der Zeitauflösung auf dieses willkürlich eingeführte Zeitbinning beschränkt. Ein Algorithmus, der direkt auf die Photonen-



ankunftszeiten wirkt, ist von dieser Beschränkung befreit. Für eine nachfolgende Verifizierung automatisch ermittelter Stufen lassen sich die Daten immer noch binnen. Andrec *et. al.* hat 2003 einen solchen Algorithmus entwickelt, der in der Lage ist, Übergangsraten aus Markov Prozessen direkt aus den Photonankunftszeiten zu extrahieren und anhand von Monte-Carlo-Simulationen seine Leistungsfähigkeit demonstriert [10]. Das kürzlich erschienene Paper (Juli 2009) von Jäger *et. al.* verwendet diese Methode, um aus echten Einzelmolekülzeiten Übergangsraten zu extrahieren [51] und die Hidden-State-Trajektorie in voller Zeitauflösung zu rekonstruieren.

Dem Vorteil der hohen Zeitauflösung steht jedoch der um den Faktor 10 bis 100 größeren Datenmenge gegenüber. Die in dieser Arbeit vorgestellten Datenmengen benötigten auf einen Standard-PC (AMD Athlon XP 3000+) eine Rechenzeit von einigen Stunden, die HMM-Berechnungen konnten also über Nacht erfolgen. Da die Rechenzeit linear mit der Datenmenge skaliert [29], würde ein photonenweise funktionierender Algorithmus die 10 bis 100-fache Zeit benötigen, also einige Wochen in Anspruch nehmen oder den Einsatz eines Clusters mit z. B. 32 Knoten erfordern. Die Genauigkeit der Übergangsraten lässt sich auf diese Weise aber kaum erhöhen, lediglich die Stufenzuordnung in den Zeitspuren behält die Möglichkeit, bei ausreichender Zählrate mit höherer Zeitauflösung zu erfolgen. Nicht ohne Grund beschränken sich die vorgestellten Datenmengen in diesen Papern lediglich auf ein paar Bursts.

Da diese Arbeit auf eine automatische Analyse großer Datenmengen zielte, wurde dieser Weg nicht eingeschlagen. Ein Algorithmus, der gebinnte Daten auswerten kann, ist zudem ohne weiteres auch auf Kameradaten anwendbar und dadurch aus experimenteller Sicht universeller [7].

#### **8.4 Vergleich mit anderen Analyseverfahren**

Neben der Anwendung von Hidden Markov Modellen zur Analyse von Intensitätstrajektorien möchte man oft die *a priori* Modellinitialisierung durch modellfreie Verfahren umgehen. Ein auf informationstheoretische Überlegungen basierender Vorschlag wurde 2005 von Watkins [6] formuliert. Dieser Algorithmus ist in der Tat in der Lage, sprunghafte Änderungen der Intensität ohne die Vorgabe eines expliziten Modells zu erkennen. In der Publikation von Messina [9] werden Hidden Markov Modelle zur Analyse von Sprüngen in Intensitätstrajektorien verwendet und

anschließend mit dem Algorithmus von Watkins verglichen. Messina kommt zum Schluss, dass der bei Hidden Markov Modellen verwendete klassische Optimierungsalgorithmus einen sehr deutlichen Geschwindigkeitsvorteil zeigt und überdies wesentlich mehr Informationen extrahieren kann. Überdies ist das HMM auch in der Lage, sehr kurze Bereiche eines Zustands in der Intensitätstrajektorie zu identifizieren, was der Watkins-Algorithmus nicht vermag. Da die Verweilzeiten meist monoexponentiell verteilt sind, ist das ein wesentlicher Aspekt. Diese Fähigkeit der HMMs beruht eben auf die explizite Vorgabe eines Modells.

Allgemeine Likelihood-Ansätze, die lediglich die Photophysik modellieren, können direkt auf Einzelmolekülspuren angewendet werden. In [151] wird demonstriert, wie über einen Likelihood-Ansatz prinzipiell aus Einzelmolekülspuren nicht immobilisierter Proben Übergangsraten bestimmt werden können. Ein anderer Likelihood-Ansatz generiert aus einer Einzelmolekülspur zeitaufgelöst die wahrscheinlichste Distanzkurve inklusive Fehlergrenzen [16].

Algorithmen basierend auf Wavelet-Transformationen bieten prinzipiell die Möglichkeit, korrelationsfreie Bereiche in Zeitreihen aufzuspüren und diese Bereiche Zuständen zuzuordnen. Eine bemerkenswerte Kombination aus Wavelet-Transformationen und Informationstheorie wurde 2008 von Li vorgestellt [5]. Li zeigt, wie direkt aus den Einzelmolekülspuren das gesamte Zustandsnetzwerk (state space network) extrahiert werden kann.

Auch aus Korrelationsfunktionen ließen sich aus experimentell gewonnenen Einzelmolekülspuren Zustände und Raten extrahieren (z. B. [152]). Eine Korrelationsanalyse und das Problem der optimalen Binweite werden in Ref. [153] vor informationstheoretischem Hintergrund und mit Hilfe von Monte-Carlo-Simulationen diskutiert.

Bei ausreichend hohem Signal-Rausch-Verhältnis sind die Zustände so gut zu unterscheiden, dass Schwellenwert-Ansätze völlig ausreichend sind (z.B. [154, 155]). Ist man in der Lage, eine solche Zustandsspur aus den Daten zu generieren, bleibt aber immer noch die Ermittlung des zugrunde liegenden kinetischen Schemas. Flomenbom demonstriert in [13, 156], wie aus solchen idealisierten Trajektorien auf das zugrunde liegende Bewegungsmodell (kinetic scheme) geschlossen werden kann.

Aber nicht nur auf die Einzelmolekülspur selbst muss ein Verfahren zielen, um die enthaltenen Informationen zu extrahieren. So wurde in der Vergangenheit die Form der Verweilzeithistogramme verwendet, um aus Kurvenanpassungen Übergangsraten

auch komplexerer Bewegungsmodelle zu erhalten (z.B. [157]). Trotz der neueren Likelihood-Methoden wird die Analyse der Verweilzeithistogramme immer noch weiterentwickelt. Tsygankov stellte 2007 ein Übersicht vor, wie aus derartigen Histogrammen auf die Existenz von nicht mehr auflösbaren Subschritten geschlossen werden kann [158].

Im Vergleich zu all diesen Methoden bietet eine Hidden Markov Analyse den großen Vorteil, dass sie Einzelmoleküldaten umfassend modellieren kann, dabei bis an die informationstheoretische Grenze vorstößt und trotzdem verhältnismäßig wenig Computerzeit benötigt, da die Rechenzeit aller erforderlichen Algorithmen lediglich linear mit der Datenmenge steigt. Dadurch hat eine Hidden Markov Analyse das Potential, zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Einzelmolekülspektroskopie zu werden.

## 8.5 Robustheit

Ein bisher kaum beachteter Punkt ist die Robustheit. Bei Einzelmolekülexperimenten kann man in der Regel nicht davon ausgehen, dass sich das Signal ausschließlich aus nicht korreliertem Hintergrundrauschen und der farbstoffmarkierten Probe zusammensetzt. Zwar lassen sich eine Reihe unerwünschter photophysikalischer Effekte durch experimentellen Mehraufwand gut identifizieren und können so von der Datenanalyse ausgeschlossen werden [124], auch die Abhängigkeit der geschätzten Parameterwerte vom Rauschanteil wurde eingehend untersucht [10]. Hingegen lassen sich erfolglos markierte Moleküle oder Molekülreste kaum herausfiltern und tragen somit zum Messsignal bei. Die ermittelten Zustände und Übergangsraten können sich auf diese Weise verfälschen. In der Literatur der Einzelmolekülspektroskopie finden sich bisher keinerlei Beiträge, die die Robustheit der Parameterschätzung unter Berücksichtigung typischer Einzelmolekülartefakte untersuchen. Dabei gibt es bereits Konzepte, die eine Verbindung zwischen der Reduzierung in der Genauigkeit der Parameterschätzung mit dem Anteil von Störungen in den Daten herstellt [159-161]. Für eine Adaption auf Einzelmolekülexperimente müssen die typischerweise auftretenden Artefakte identifiziert und generalisiert werden. Der Erfolg neuer Konzepte zur algorithmischen Datenauswertung wird langfristig immer an seiner Robustheit gemessen.

## 9 Zusammenfassung

Das zentrale Analyseproblem für Daten aus einem Einzelmolekülexperiment ist die Identifizierung bestimmter wiederkehrender Zustände in der aufgenommenen Trajektorie. Das Design des Experiments hat dabei zum Ziel, durch geeignete Wahl und Positionierung der Marker die auftretenden Proteinkonformationen eindeutig auf die Observablen des Experiments abzubilden. In so einem Fall lassen sich alle relevanten Informationen allein aus den statistischen Eigenschaften der gefundenen Zustände ableiten. Insbesondere die Histogramme aus den Verweildauern der auftretenden Zustände liefern die gesuchten Übergangsraten. Die Identifizierung dieser Zustände kann jedoch bei zunehmender Anzahl an Zuständen oder einem geringen Signal-Rausch-Verhältnis sehr schwierig werden. Hier ist es von großem Vorteil, wenn sich die zugrunde liegende Zustandsfolge des Enzyms als Markov-Prozess auffassen lässt. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn das Histogramm aus den Verweildauern eine monoexponentiell abfallende Form ausweist. Mit Hilfe von Hidden Markov Modellen (HMM) lässt sich dann die Zustandsfolge aus der Trajektorie der Observablen im Prinzip rekonstruieren. Darüber hinaus lassen sich auch die Zustände selbst sowie deren Übergangsraten bestimmen. Ein HMM beruht auf einer Likelihood-Funktion, die abhängig von Modellparametern ein Likelihood zu den gegebenen Messdaten liefert. Die globalen Modellparameter lassen sich mit Hilfe von sogenannten „Schätzfunktionen“ durch ein iteratives Verfahren so lange verändern, bis das Likelihood maximal wird. Auf diese Weise „lernt“ das HMM automatisch die Modellparameter, die am besten zu den gegebenen Daten passen.

Die Parameter eines Standard-HMMs sind jedoch immer global und zeitinvariant. In Einzelmolekül-FRET-Messungen hingegen ist die Genauigkeit der aufgenommenen Messgröße, die FRET-Effizienz, jedoch zeitlich starken Fluktuationen unterworfen, die sich direkt aus einer fluktuierenden Summenintensität ergibt. Eine Analyse solcher Daten mit einem Standard-HMM und dem damit verbundenen starren Parametersatz führt unweigerlich zu einem Versagen des iterativen Optimierungsalgorithmus. Aus diesem Grund wurde das Gerüst der HMMs derart erweitert, dass zeitabhängige Genauigkeitsangaben aus den Daten berücksichtigt werden können. Dies hat umfassende Auswirkungen auf die Form der Likelihood-Funktion und führt zu neuen Schätzfunktionen der Modellparameter. Das auf diese Weise erweiterte HMM wurde anhand von Monte-Carlo-Simulationen auf seine Grenzen überprüft und auf drei verschiedene Einzelmolekül-Experimente angewandt.

Weist das Histogramm aus den Verweildauern eine von der monoexponentiell abfallenden Funktion abweichende Form auf, so kann nicht mehr von einem Markov-Prozess ausgegangen werden. Unter bestimmten Umständen können jedoch weitere „Mikrozustände“ dem Modell hinzugefügt werden und so das HMM auf ein semi-Markov-Modell erweitert werden. Diese in der Literatur als „aggregated states“ bezeichnete Hinzunahme und Gruppierung zusätzlicher Zustände wurde auf ein viertes Einzelmolekül-Experiment angewandt.

Im ersten Projekt wurde der DNA-Transkriptionsprozess von Zellen betrachtet. Dessen erster Schritt ist das Binden des TATA-Box Binde-Proteins (TBP) an die TATA-Box der DNA, welche zu einem stabilen TBP-DNA-Komplex führt. Die Anwesenheit des Negativen Cofaktors 2 (NC2) führt zu einer vorher nicht vorhandenen Mobilität von TBP auf den DNA-Strang. Eine mögliche Erklärung für diese Mobilität ist die Bildung eines ringförmigen TBP-NC2-Subkomplexes um die DNA herum, welcher sich entlang der DNA bewegen kann. Der Abstand zwischen TBP und dem immobilisierten DNA-Strang wurde mittels Einzelmolekül-FRET in kamerabasierter TIR-Mikroskopie aufgenommen. Acht verschiedene Datensätze standen für die Analyse mit den erweiterten HMMs zur Verfügung mit dem Ziel, den Einfluss des alternativen Promotors H2B-J auf das dynamische Verhalten des TBP-NC2-DNA-Komplexes im Vergleich zum Promotor AdML zu untersuchen.

Die neuen erweiterten HMMs mit dynamischen Modellparametern konnten sehr kurze Zwischenzustände genauso wie Übergangsraten erkennen. Dadurch zeigte sich die Abhängigkeit der Wirkung von NC2 von der Promotorsequenz. NC2 verursachte mit dem alternativen Promotor H2B-J eine verringerte Dynamik. Als Grund für die beobachtete Dynamik wurde postuliert, dass die Mobilität des TBP-NC2-Subkomplexes eine DNA-Knickbewegung überlagert ist.

Das zweite Projekt ging um einen Kaliumtransporter aus *Escherichia coli*, der KdpFABC-Komplex. Diese starke Kaliumpumpe ist in der Lage, Kalium-Ionen durch die innere Zellmembran in das Cytosol unter Verbrauch von ATP zu pumpen. Die Untereinheit KdpB beinhaltet die ATP-Bindungstaschen und offenbart starke Interdomänen-Bewegungen während der ATP-Hydrolyse. Durch FRET-Marker an zwei Domänen wurde diese Bewegung mittels Einzelmolekül-FRET aufgezeichnet. Hierzu wurde der komplette KdpFABC-Komplex inklusive der FRET-markierten Untereinheit KdbB in Liposomen rekonstituiert und in Lösung gemessen. Die

einzelnen Konformationen konnten per HMM-Analyse identifiziert werden, was schließlich die Aufstellung eines Reaktionszyklus des Enzyms erlaubte. Zudem konnte die Wirkung der Inhibitoren OCS und Ortho-Vanadat beobachtet werden. Obwohl beide Inhibitoren die Pumpleistung des Kaliumtransporters aufheben, führt dies nicht zu einem Aussetzen der Inter-Domänen-Bewegung der KdpB-Untereinheit, sondern lediglich zu einer Reduktion der Bewegungsdynamik.

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase war Gegenstand des dritten Projekts. Dieses Enzym katalysiert die ATP-Synthese-Reaktion durch Rephosphorylierung von ADP, in dem es den Protonenfluss über die Zellmembran nutzt. Untereinheiten des Enzyms erzeugen während der Katalyse eine schrittweise Rotationsbewegung. Mit  $F_0F_1$ -ATP-Synthasen aus *Escherichia coli* kann diese Reaktion auch rückwärts ablaufen, wobei sich in diesem Fall die Drehrichtung des Motors umgekehrt.

Die Rotationsbewegung des  $F_1$ -Teils des Enzyms in Hydrolyserichtung besteht aus drei symmetrischen Haltepositionen und ist mittlerweile hinreichend untersucht worden. Über den experimentell schwerer zugänglichen membrangebundenen  $F_0$ -Teil jedoch ist bisher wenig bekannt. Durch FRET lässt sich die Rotationsbewegung des Gesamtzyklus beobachten. Für die FRET-Messungen wurden die entsprechend markierten Enzyme in Liposomen rekonstituiert, die sich in freier Diffusion durch das Anregungsvolumen eines konfokalen Fluoreszenz-Mikroskops bewegten. Dies erlaubte eine Beobachtung beider Drehrichtungen des molekularen Motors auf Einzelmolekül-Niveau. Einzelmolekül-FRET-Messungen mit Markern an unterschiedlichen Positionen ließen folgende Antworten auf offene strukturelle und funktionale Fragen zu:

Die  $F_0F_1$ -ATP-Synthase zeigt einen aktivierten Zustand, aus dem heraus es in der Lage ist, die Synthese von ATP zu katalysieren. Diese Aktivierung zeigt sich durch eine leichte Verschiebung der gemittelten FRET-Effizienzen der Haltepositionen im Vergleich zu dem Fall ohne Aktivierung.

Die Position der  $\alpha$ -Untereinheit des  $F_0$ -Teils wurde durch FRET-Triangulationen der Daten zweier Datensätze mit FRET-Markern an unterschiedlichen Positionen bestimmt.

Das wichtigste Ergebnis war die Bestimmung der Schrittgröße der Drehbewegung des  $F_0$ -Teils während der Synthese von ATP. In Unterschied zu den  $120^\circ$ -Schritten in ATP-Hydrolyserichtung wurde eine Schrittgröße von  $36^\circ$  gefunden und mit Monte-Carlo-Simulationen verifiziert.

Im Rahmen des vierten Projekts wurde die schrittweise Rotation des  $F_1$ -Teils der ATP-Synthase beobachtet. Die Bewegung der  $\gamma$ -Untereinheit von immobilisierten  $F_1$ -ATPasen wurde durch eine gebundene Polysterol-Kugel mittels kamerabasierter Hellfeldmikroskopie verfolgt. Unterschiedliche Datensätze des gleichen Enzyms mit steigender Rotationsgeschwindigkeit zeigten die erwarteten drei  $120^\circ$ -Haltepositionen, allerdings überlappten deren Verteilungen so stark, dass eine Zustandszuordnung per Schwellenwert misslang. Ein globales HMM mit „aggregated states“ hingegen konnte die drei Haltepositionen in allen Datensätzen finden und konnte weiter die Abhängigkeit der auftretenden Übergangsraten von der Nukleotidkonzentration klären.

Die Erforschung der Reaktionszyklen von Proteinen innerhalb der letzten Dekaden hat zu einem besseren Verständnis zahlreicher zellulärer Prozesse geführt. Trajektorien von komplexen enzymatischen Reaktionen sind heutzutage durch viele verschiedene Messverfahren leicht zu erzeugen, doch die Interpretation dieser Daten bleibt immer noch eine große Herausforderung. In dieser Arbeit wurden Erweiterungen zur Methode der Hidden Markov Modelle präsentiert und erfolgreich angewendet. Dadurch steht die leistungsfähige Hidden Markov Analyse nun auch für Einzelmolekül-FRET-Daten zur Verfügung.

## Anhang A Verteilungsfunktion der FRET-Effizienz aus Normalverteilungen

Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen der beiden Fluoreszenzkanäle gehen bei genügend hohen Zählraten von Poissonverteilungen in Normalverteilungen über. Die gemeinsame Dichtefunktion beider Kanäle ist dann das Produkt der beiden Normalverteilungen  $f_{I_D} = \mathcal{N}(\mu_{I_D}, \sigma_{I_D}^2)$  und  $f_{I_A} = \mathcal{N}(\mu_{I_A}, \sigma_{I_A}^2)$  und ist wiederum eine Normalverteilung:

$$f_{I_D} \otimes f_{I_A} = \frac{1}{2\pi\sigma_{I_D}\sigma_{I_A}} \exp\left(-\frac{(I_D - \mu_{I_D})^2}{2\sigma_{I_D}^2} - \frac{(I_A - \mu_{I_A})^2}{2\sigma_{I_A}^2}\right)$$

$I_D$  und  $I_A$  sind die zeitabhängigen Photonenzählraten des Donor- bzw. Akzeptor-Kanals mit den Mittelwerten  $\mu_{I_D}$  und  $\mu_{I_A}$  und den Varianzen  $\sigma_{I_D}^2$  und  $\sigma_{I_A}^2$ . Die einparametrische Poissonverteilung erzeugt eine Varianz, die gleich dem Mittelwert ist. Durch Einführen eines Vorfaktors  $k_D$  bzw.  $k_A$  können zusätzliche Rauschquellen berücksichtigt werden:

$$\sigma_{I_D}^2 = k_D \mu_{I_D} \text{ und } \sigma_{I_A}^2 = k_A \mu_{I_A} \quad (\text{A1})$$

Üblicherweise kommt Hintergrundrauschen  $I_D^{noise}$  bzw.  $I_A^{noise}$  sowie intensitätsabhängiges Übersprechen  $I_D^{cross}$  hinzu, für EMCCD-Kameras führt der Verstärker zusätzlich zu einer Verdopplung der Varianz [80]:

$$\sigma_{I_D}^2 = 2 (\mu_{I_D} + \mu_{I_D}^{noise}) \quad (\text{A2})$$

$$\sigma_{I_A}^2 = 2 (\mu_{I_A} + \mu_{I_A}^{noise} + \mu_{I_D}^{cross})$$

Aus den Gleichung (A1) und (A2) ergibt sich ein zeitabhängiger Korrekturfaktor:

$$k_D = 2 (1 + \mu_{I_D}^{noise} / \mu_{I_D}) \quad (\text{A3})$$

$$k_A = 2 (1 + \mu_{I_A}^{noise} / \mu_{I_A} + \mu_{I_D}^{cross} / \mu_{I_A})$$

Für Messungen mit APDs entfällt der Vorfaktor 2.



Die folgende Koordinatentransformation bildet die beiden Fluoreszenz-Intensitäten  $I_D$  und  $I_A$  auf die interessierenden Größen FRET-Effizienz  $E$  und Gesamtintensität  $I$  ab:

$$\begin{aligned} E = g_1(I_D, I_A) = \frac{I_A}{I_D + I_A} & \Leftrightarrow I_D = h_1(E, I) = (1 - E)I \\ I = g_2(I_D, I_A) = I_D + I_A & I_A = h_2(E, I) = E I \end{aligned}$$

Die neue gemeinsame Verteilungsfunktion in Abhängigkeit der neuen Größen  $E$  und  $I$  ist mit der alten gemeinsamen Verteilungsfunktion über die Jacobi-Determinante verknüpft:

$$f_{E,I}(E, I) = |\mathbf{J}| f_{I_D, I_A}(I_D, I_A)$$

Diese nimmt hier die folgende Gestalt an:

$$|\mathbf{J}| = \begin{vmatrix} \frac{\partial h_1}{\partial E} & \frac{\partial h_1}{\partial I} \\ \frac{\partial h_2}{\partial E} & \frac{\partial h_2}{\partial I} \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} -I & 1 - E \\ I & E \end{vmatrix} = |I|$$

Es ergibt sich:

$$f_{E,I}(E, I) = \frac{|I|}{2\pi\sigma_{I_D}\sigma_{I_A}} \exp\left(-\frac{((1-E)I - \mu_{I_D})^2}{2\sigma_{I_D}^2} - \frac{(EI - \mu_{I_A})^2}{2\sigma_{I_A}^2}\right) \quad (\text{A4})$$

Die beiden gesuchten Verteilungsfunktionen für  $E$  und  $I$  sind die Randdichten der gemeinsamen Dichtefunktion:

$$f_E(E) = \int_{-\infty}^{\infty} f_{E,I}(E, I) dI$$

und

$$f_I(I) = \int_{-\infty}^{\infty} f_{E,I}(E, I) dE$$

Betrachten wir zunächst  $f_I(I)$ . Die Integrationsvariable  $E$  taucht ausschließlich als Polynom zweiten Grades im Exponenten auf, es handelt sich demnach um eine Normalverteilung in  $E$ , deren bestimmtes Integral eine Konstante ergibt und somit analytisch lösbar ist. Diese Konstante hat wiederum die Form einer Normalverteilung in Bezug auf den Parameter  $I$ :

$$f_I(I | \mu_I, \sigma_I^2) = \frac{1}{\sigma_I \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(I - \mu_I)^2}{2\sigma_I^2}\right) \text{ mit } \mu_I = \mu_{I_D} + \mu_{I_A} \text{ und } \sigma_I^2 = \sigma_{I_D}^2 + \sigma_{I_A}^2 \quad (\text{A5})$$

Die Mittelwerte und Varianzen der beiden Fluoreszenzintensitäten addieren sich einfach bei der Koordinatentransformation, was auch intuitiv plausibel ist.

Für die FRET-Effizienz  $E$  sieht der Fall schon etwas komplizierter aus.  $I$  taucht hier nicht nur als Polynom zweiten Grades im Exponenten auf, sondern zusätzlich erscheint es durch die Jacobi-Determinante als Vorfaktor, zudem noch im Betrag. Die Lösung dieses allgemeinen Falls ist also gesucht:

$$h(x | \mu, \sigma^2) = \int_{-\infty}^{\infty} |x| \mathcal{N}(\mu, \sigma^2) dx \quad (\text{A6})$$

Da wir wissen, dass die resultierende Funktion besser durch eine Beta-Verteilung beschrieben werden kann (ausgehend von poissonverteilten Fluoreszenzintensitäten), können wir davon ausgehen, dass der Wertebereich für  $x$  zwischen 0 und 1 liegt. Der Betrag um  $x$  kann demnach in guter Näherung weggelassen werden. Das resultierende Integral ist die Definitionsgleichung für den Erwartungswert  $\mu$ :

$$\mu = \int_{-\infty}^{\infty} x \mathcal{N}(\mu, \sigma^2) dx \quad (\text{A7})$$

Setzt man die Parameter wieder ein und verwendet zusätzlich noch die Äquivalenzen von Gleichung (A1), so erhält man folgende Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion:

$$f_E(E | \mu_E, \sigma_E^2) = \frac{v(E)}{u(E)} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_E(E)} \exp\left(-\frac{(E - \mu_E)^2}{2\sigma_E^2(E)}\right) \quad (\text{A8})$$

mit

$$\mu_E = \frac{\mu_{I_A}}{\mu_{I_D} + \mu_{I_A}},$$

$$\sigma_E^2(E) = \frac{u(E)}{\mu_I}$$

und

$$u(E) = k_A \mu_E (1 - E)^2 + k_D E^2 (1 - \mu_E)$$

$$v(E) = \mu_E (1 - \mu_E) (k_A (1 - E) + k_D E)$$

Numerische Simulationen zeigen, dass dies einer Normalverteilung in  $E$  schon sehr nahe kommt. Formal hängen allerdings die Vorfaktoren  $v$ ,  $u$  und  $\sigma_E$  von  $E$  ab, wenn auch diese Abhängigkeit nicht sehr stark zu sein scheint. Klarheit gibt folgende Taylorentwicklung um den Punkt  $\mu_E$ :

$$Taylor\left(\frac{v(E)}{u(E)}, E = \mu_E\right) = 1 - \frac{k_A - k_D}{k_A(1 - \mu_E) - k_D\mu_E}(E - \mu_E) + O((E - \mu_E)^2) \quad (A9)$$

und für den Exponent:

$$Taylor\left(-\frac{\mu_I(E - \mu_E)^2}{2(k_A\mu_E(1 - E)^2 + k_D(1 - \mu_E)E^2)}, E = \mu_E\right) =$$

$$-\frac{\mu_I}{2\mu_E(1 - \mu_E)(k_A(1 - \mu_E) + k_D\mu_E)}(E - \mu_E)^2 + \dots \quad (A10)$$

$$\frac{(k_A - k_D)\mu_I}{\mu_E(1 - \mu_E)(k_A(1 - \mu_E) + k_D\mu_E)^2}(E - \mu_E)^3 + O((E - \mu_E)^4)$$

Die von  $E$  abhängigen Argumente  $u$  und  $v$  lassen sich durch die ersten von Null verschiedenen Glieder der Taylorentwicklung ersetzen. Der Nullte Term im Vorfaktor, Gleichung (A9), ist nicht von  $E$  abhängig sondern ist vielmehr gleich 1 und verschwindet beim Ersetzen in Gleichung (A8). In der Taylorentwicklung des Exponenten (A10) ist sogar erst das zweite Glied von Null verschieden und auch noch von  $E$  abhängig. Sie lässt sich sogar als Varianz der neuen Verteilungsfunktion identifizieren:

$$\sigma_E^2 = (k_A(1 - \mu_E) + k_D\mu_E) \frac{\mu_E(1 - \mu_E)}{\mu_I} \quad (A11)$$

Schließlich ergibt sich für die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion  $f(E)$  eine Normalverteilung:

$$f_E(E | \mu_E, \sigma_E^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_E}} \exp\left(-\frac{(E - \mu_E)^2}{2\sigma_E^2}\right) \quad (A12)$$

Wenn  $k_A$  und  $k_D$  gleich sind, verschwinden sogar der erste Term von (A9) und dritte Term von (A10), was in der Praxis oft der Fall ist. Demnach ist die hier

verwendete Näherung durch Berücksichtigung der ersten Taylortermine völlig ausreichend.

Die hier durchgeführte Koordinatentransformation zeigt, wie sich aus zwei normalverteilten Fluoreszenzintensitäten die Verteilungsfunktionen für die Summenintensität und die FRET-Effizienz ergeben. Die Summenintensität entspricht analytisch exakt einer Normalverteilung, die FRET-Effizienz lässt sich in sehr guter Näherung durch eine Normalverteilung beschreiben. Dieser Ansatz liefert zudem auch Ausdrücke für die FRET-Effizienz  $\mu_E$ , Gleichung (A8), und ihre Varianz  $\sigma_E^2$ , Gleichung (A11). Unter idealisierten Bedingungen ist  $k_A$  und  $k_D$  gleich eins und es ergibt sich folgender Spezialfall für die Varianz  $\sigma_E^2$ :

$$\sigma_E^2 = \frac{\mu_E(1-\mu_E)}{\mu_I} \quad (\text{A13})$$

Das entspricht fast der Varianz einer Beta-Verteilung:

$$\tilde{\sigma}_E^2 = \frac{\mu_E(1-\mu_E)}{\mu_I + 1} \quad (\text{A14})$$

## Anhang B Verbreiterung der Emissionsfunktion

In diesem Abschnitt werden die formalen Änderungen besprochen, die sich ergeben, wenn zur Unschärfe der Markov-Zustände auch noch eine zeitabhängige Unschärfe der Datenpunkte selbst hinzukommt.

Ausgangspunkt dieser Betrachtung ist eine normalverteilte Emissionsfunktion eines Markovzustands  $q$ :

$$f_{HMM}(x | \mu_q, \sigma_q^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_q^2}} \exp\left(-\frac{(x - \mu_q)^2}{2\sigma_q^2}\right)$$

Die Wahrscheinlichkeit  $p$  an einer Stelle  $x_t$  bei einer gegebenen Wahrscheinlichkeitsdichte  $f_q$  ist allgemein schlicht der Funktionswert der Wahrscheinlichkeitsdichte an der Stelle  $x_t$ , hier erhält man diese einfach durch Einsetzen des Datenpunktes in die Emissionsfunktion:

$$p(\mu_q, \sigma_q^2 | x_t) = f_q(x_t | \mu_q, \sigma_q^2)$$

Sind die Datenpunkte selbst jedoch mit unterschiedlicher Varianz behaftet, verbreitert sich der Messwert  $x_t$  und kann ebenfalls als Normalverteilung um  $x_t$  mit der Varianz  $\sigma_{x_t}^2$  beschrieben werden:

$$f_{data}(x | x_t, \sigma_{x_t}^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{x_t}^2}} \exp\left(-\frac{(x - x_t)^2}{2\sigma_{x_t}^2}\right)$$

Die Wahrscheinlichkeit ist dann nicht mehr der Funktionswert der Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion, sondern das Integral des Produkts beider Verteilungsfunktionen:

$$p(\mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2 | x_t) = \int_{-\infty}^{\infty} f_{HMM}(x | \mu_q, \sigma_q^2) f_{data}(x | x_t, \sigma_{x_t}^2) dx$$

In diesem bestimmten Integral taucht die Integrationsvariable  $x$  im Exponenten als Polynom zweiten Grades auf. Dies lässt sich bis auf einen konstanten Faktor wiederum als Normalverteilung umformen, das Integral von minus Unendlich bis plus Unendlich gibt demnach 1 und verschwindet, es bleibt nur der konstante Faktor übrig, der von den drei Parametern  $\mu_q$ ,  $\sigma_q^2$  und  $\sigma_{x_t}^2$  abhängt und wiederum eine Normalverteilung ergibt:

$$p(x_t | \mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2)}} \exp\left(-\frac{(x_t - \mu_q)^2}{2(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2)}\right)$$

Diese Verteilungsfunktion hat denselben Mittelwert wie vorher mit einer um  $\sigma_{x_t}^2$  vergrößerten Breite. Für den Formalismus der Hidden Markov Analyse bedeutet das, dass keine numerische Integration für jeden Datenpunkt notwendig ist. Darüber hinaus braucht lediglich zur alten Varianz  $\sigma_q^2$  die neue zeitabhängige Varianz  $\sigma_{x_t}^2$  als Parameter der Emissionsfunktion hinzuaddiert werden. Diese neue Zeitabhängigkeit verändert jedoch die Maximum-Likelihood-Schätzer, siehe Anhang D.

Es gibt einen tieferen Grund, warum das obige Integral wieder eine Gaußverteilung ergibt, sofern die Funktionen im Integral Gaußverteilungen sind:

Die einzige Invariante einer Fouriertransformation ist eine Gaußverteilung, deshalb gibt auch eine Faltung zweier Gaußverteilungen wieder eine Gaußverteilung, siehe z.B. [162]:

$$\begin{aligned} f_A(x | \mu_A, \sigma_A^2) \otimes f_B(x | \mu_B, \sigma_B^2) &= \int_{-\infty}^{\infty} f_A(\xi | \mu_A, \sigma_A^2) f_B(x - \xi | \mu_B, \sigma_B^2) d\xi \\ &\propto f_{A \otimes B}(x | \mu_A + \mu_B, \sigma_A^2 + \sigma_B^2) \end{aligned}$$

Das obige Integral entspricht im Wesentlichen einer Faltung mit anschließender Reparametrisierung. Bemerkenswert ist hier, dass das Integral über zwei normierte Gaußfunktionen wiederum eine *normierte* Gaußfunktion ergab, was allgemein jedoch nicht gelten muss.

## Anhang C Herleitung der klassischen Schätzfunktionen

Ausgangspunkt ist die allgemeine Loglikelihood-Funktion:

$$\log L(\boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q, w_{qt} | \{\mathbf{x}_t\}) = \sum_{t=1}^T \sum_{q=1}^Q w_{qt} \log(f_{HMM}(\mathbf{x}_t | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q))$$

Als Emissionsfunktion  $f_{HMM}$  wird hier die allgemeine multivariate Gaußverteilung für  $M$  Dimensionen verwendet:

$$f_{HMM}(\mathbf{x} | \boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q) = \frac{1}{(2\pi)^{\frac{M}{2}} \det(\boldsymbol{\Sigma}_q)^{\frac{1}{2}}} \exp\left(-\frac{1}{2}(\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_q)' \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} (\mathbf{x} - \boldsymbol{\mu}_q)\right)$$

Dann ergibt sich für die Loglikelihood-Funktion:

$$\log L(\boldsymbol{\mu}_q, \boldsymbol{\Sigma}_q, w_{qt} | \{\mathbf{x}_t\}) = \sum_{t=1}^T \sum_{q=1}^Q w_{qt} \left( -\frac{M}{2} \log(2\pi) - \frac{1}{2} \log \det(\boldsymbol{\Sigma}_q) - \frac{1}{2} (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)' \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q) \right)$$

Um die Schätzer zu erhalten, werden nun die Ableitungen der Loglikelihood-Gleichung nach den gesuchten Größen gebildet und diese Terme gleich Null gesetzt. Auflösen nach den jeweils gesuchten Größen führen direkt zu den Schätzfunktionen. Ableitungen nach Vektoren oder Matrizen sind nicht ganz einfach zu bilden, dafür wurden gemäß [163] ein paar wenige Sätze aus [164] genutzt.

Für die Ableitung nach  $\boldsymbol{\mu}_q$  muss die folgende Ableitung durchgeführt werden:

$$\frac{\partial \log L}{\partial \boldsymbol{\mu}_q} = -\frac{1}{2} \sum_{t=1}^T w_{qt} \frac{\partial}{\partial \boldsymbol{\mu}_q} \left( (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)' \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q) \right)$$

Das gelingt mit der Identität (5g) aus [164]:

$$\frac{\partial ((\mathbf{X}\mathbf{a} + \mathbf{b})' \mathbf{C} (\mathbf{X}\mathbf{a} + \mathbf{b}))}{\partial \mathbf{X}} = (\mathbf{C} + \mathbf{C}') (\mathbf{X}\mathbf{a} + \mathbf{b}) \mathbf{a}'$$

Einsetzen für  $\mathbf{X}=\boldsymbol{\mu}_q$ ,  $\mathbf{a}=1$ ,  $\mathbf{b}=\mathbf{x}_t$  und  $\mathbf{C}=\boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}$  ergibt:

$$\frac{\partial \log L}{\partial \boldsymbol{\mu}_q} = -\frac{1}{2} \sum_{t=1}^T w_{qt} (-2) \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)$$

Schließlich kann nach Nullsetzen der Ableitung ganz konventionell nach  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_q$  aufgelöst werden und es ergibt sich der Markov Schätzer des Zustands  $q$  für den Mittelwert von multivariaten Gaußfunktionen:

$$\hat{\boldsymbol{\mu}}_q = \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \mathbf{x}_t}{w_{qt}}. \quad (\text{C1})$$

Für den Schätzer der Kovarianzmatrix  $\boldsymbol{\Sigma}_q$  muss folgende Ableitung durchgeführt werden:

$$\frac{\partial \log L}{\partial \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}} = -\frac{1}{2} \sum_{t=1}^T w_{qt} \frac{\partial}{\partial \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}} (\log \det \boldsymbol{\Sigma}_q + (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)' \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q))$$

Für den ersten Teil helfen die folgende Identitäten (4b) [164]

$$\frac{\partial \ln \det \mathbf{X}}{\partial \mathbf{X}} = (\mathbf{X}')^{-1}$$

und (2b) [164] weiter:

$$\ln \det \mathbf{X} = -\ln \det \mathbf{X}^{-1}$$

$$\frac{\partial}{\partial \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}} \ln \det \boldsymbol{\Sigma}_q = -\frac{\partial}{\partial \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}} \ln \det \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1} = -\boldsymbol{\Sigma}_q$$

Für den zweiten Teil wird die Ableitung mit der Identität (5c) aus [164] durchgeführt:

$$\frac{\partial (\mathbf{a}' \mathbf{X} \mathbf{b})}{\partial \mathbf{X}} = \mathbf{a} \mathbf{b}'$$

Setzt man für  $\mathbf{a}' = \mathbf{b} = \mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q$  und für  $\mathbf{X} = \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}$  ergibt sich:

$$\frac{\partial \log L}{\partial \boldsymbol{\Sigma}_q^{-1}} = \frac{1}{2} \sum_{t=1}^T w_{qt} (\boldsymbol{\Sigma}_q - (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)(\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)')$$



Schließlich kann auch hier nach Nullsetzen der Ableitung ganz konventionell nach  $\hat{\Sigma}_q$  aufgelöst werden:

$$\hat{\Sigma}_q = \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} (\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)(\mathbf{x}_t - \boldsymbol{\mu}_q)'}{w_{qt}}$$

oder ausmultipliziert:

$$\hat{\Sigma}_q = \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \mathbf{x}_t \mathbf{x}_t'}{w_{qt}} + \boldsymbol{\mu}_q \boldsymbol{\mu}_q' - \boldsymbol{\mu}_q \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \mathbf{x}_t'}{w_{qt}} - \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \mathbf{x}_t}{w_{qt}} \boldsymbol{\mu}_q'$$

Hierin lässt sich der Schätzer für den Mittelwert einsetzen (C1) und man erhält schließlich den Markov Schätzer des Zustands  $q$  für die Kovarianzmatrix von multivariaten Gaußfunktionen:

$$\hat{\Sigma}_q = \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \mathbf{x}_t \mathbf{x}_t'}{w_{qt}} - \boldsymbol{\mu}_q \boldsymbol{\mu}_q' \quad (\text{C2})$$

Betrachtet man den eindimensionalen Spezialfall verwandeln sich die Vektoren bzw. Matrizen in Skalare, verringert man zudem noch die Anzahl der Zustände auf einen, dann werden die *a-posterior*-Wahrscheinlichkeiten alle zu eins und man bekommt die vertrauten Formeln zur Berechnung von Mittelwert:

$$\hat{\mu} = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T x_t$$

und Varianz:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T x_t^2 - \mu^2.$$

Die klassische Form der Varianz  $\hat{\sigma}^2 = \frac{1}{T} \sum_{t=1}^T (x_t - \mu)^2$  lässt sich durch ausmultiplizieren und Einsetzen von  $\hat{\mu}$  in die obige Form umrechnen.

Diese Herleitung in allgemeinerer Form findet man bei [163].

## Anhang D Herleitung der modifizierten Schätzfunktionen

Die modifizierten Maximum-Likelihood-Schätzer gelten speziell für FRET. Da dies eine eindimensionale Größe ist und eine multivariate Form an keiner Stelle der Arbeit gebraucht wurde, geht die folgende Herleitung der Schätzfunktionen von univariaten Verteilungen und Zufallszahlen aus. Dies reduziert an einigen Stellen den mathematischen Aufwand und erhöht die Lesbarkeit im Allgemeinen beträchtlich.

Ausgangspunkt der Betrachtung ist auch hier die jetzt modifizierte Loglikelihood-Funktion:

$$\log L(\mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2, w_{qt} | \{x_t\}) = \sum_{t=1}^T \sum_{q=1}^Q w_{qt} \log(f_{HMM}(x_t | \mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2))$$

Wie in Anhang B gezeigt, verbreitert sich die Wahrscheinlichkeitsdichte des Markov-Zustands um die Breite des Schrotrauschens der Daten. Diese kann über die Varianz  $\sigma_{x_t}^2$  nach Gleichung A4 wie folgt ausgedrückt werden:

$$\sigma_{x_t}^2 = \frac{E_t(1-E_t)}{I_t} \text{ mit } E_t = \frac{I_{A,t}}{I_{D,t} + I_{A,t}} \text{ und } I_t = I_{D,t} + I_{A,t}$$

Der Nenner  $I_t$  leistet dabei die geforderte Verbreiterung, eine halbierte Summenzählrate verdoppelt die Varianz. Der Zähler schnürt die Funktion abhängig vom Mittelwert zusammen, und zwar umso mehr, je näher sie an einen der beiden Ränder 0 bzw. 1 liegt.

Hierin liegt aber ein Problem:  $E_t(1-E_t)$  ist unsymmetrisch um  $E_t$ , das führt zu einer unterschiedlichen mittleren Varianz rechts und links von  $E_t$ . Das wiederum verzerrt die Loglikelihood-Funktion in einer Weise, dass der Schätzer für  $\mu_q$  systematisch zum näheren Rand 0 bzw. 1 hingezogen wird. Dabei sollte diese Maßnahme lediglich die bekannte Verbreiterung der Verteilungsfunktion durch das Schrotrauschen inkorporieren.

Abhilfe würde der Mittelwert von  $E_t$  schaffen, aber der sollte über jede Stufe getrennt ermittelt werden und diese sind wiederum während des Lernprozesses des Hidden Markov Modells nicht bekannt! Der stufenweise erzeugte Mittelwert ist aber bekannt, er ist nämlich genau  $\mu_q$ . Ersetzt man  $E_t$  also mit  $\mu_q$ , so erhält man eine unverzerrende zeitabhängige Verbreiterung  $\sigma_{x_t}^2$  der Verteilungsfunktion:

$$\sigma_{x_t}^2 = \frac{\mu_q(1-\mu_q)}{I_t}$$

Bemerkenswert ist hierbei, dass diese Verbreiterung nicht mehr nur von den Daten alleine abhängt, sondern auch, welchen Zustand er verbreitern soll. Dies ist im Grunde nur eine weitere Auswirkung davon, dass sich die Varianz bei unserer Koordinationstransformation von  $I_{D,t}$  und  $I_{A,t}$  auf  $E_t$  und  $I_t$  eine Abhängigkeit vom Mittelwert, hier  $\mu_q$ , eingehandelt hat.

Schließlich ergibt sich folgende Loglikelihood-Funktion:

$$L(\mu_q, \sigma_q^2, \sigma_{x_t}^2, w_{qt} | \{x_t\}) = -\frac{N}{2} \ln(2\pi) - \sum_{t=1}^T \left( \frac{w_{qt}(x_t - \mu_q)^2}{2(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2)} + \frac{1}{2} \ln(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2) \right)$$

Die Ableitungen nach  $\mu_q$  und  $\sigma_q^2$  haben die folgenden Formen:

$$\frac{\partial L}{\partial \mu_q} = \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt}(x_t - \mu_q)}{\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2}$$

$$\frac{\partial L}{\partial \sigma_q^2} = \frac{1}{2} \left( \sum_{t=1}^T \frac{w_{qt}((x_t - \mu_q)^2 - (\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2))}{(\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2)^2} \right)$$

Nullsetzen und Auflösen sollen jeweils die neuen Schätzfunktionen liefern. Das klappt auch gut beim Mittelwert:

$$\hat{\mu}_q = \frac{\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} x_t}{\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2}}{\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt}}{\sigma_q^2 + \sigma_{x_t}^2}} \quad (\text{D1})$$

Doch für die Varianz lässt sich die implizierte Form nicht nach  $\hat{\sigma}_q^2$  auflösen:

$$\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \left( (x_t - \mu_q)^2 - (\hat{\sigma}_q^2 + \sigma_{x_t}^2) \right)}{(\hat{\sigma}_q^2 + \sigma_{x_t}^2)^2} = 0 \quad (\text{D2})$$

Dies ist allerdings kein großes Problem, das Finden von Nullstellen einparametrischer kontinuierlicher Funktionen kann man iterativ mit dem Newton-Verfahren lösen. MATLAB stellt sogar einen eigenen Befehl zur Verfügung („fzero“, Version 7.0, im Standard-Paket enthalten), welcher zwar auch iterativ arbeitet aber schneller konvergiert. Dieser wurde bei der Implementierung verwendet.

Für eine analytische Näherungsform kann man eine Taylorentwicklung bemühen:

$$f(x) = f(x_0) + \frac{x-x_0}{1!} f'(x_0) + \frac{(x-x_0)^2}{2!} f''(x_0) + \dots + \frac{(x-x_0)^n}{n!} f^{(n)}(x_0) + \dots$$

Entwickelt bis zur ersten Ordnung um den Punkt  $\sigma_{q0}^2$  und aufgelöst nach  $\hat{\sigma}_q^2$  ergibt sich folgende Näherungslösung für die Varianz:

$$\hat{\sigma}_q^2 = \frac{\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \left( (x_t - \mu_q)^2 - (\sigma_{q0}^2 + \sigma_{x_t}^2) \right)}{(\sigma_{q0}^2 + \sigma_{x_t}^2)^2}}{\sum_{t=1}^T \frac{w_{qt} \left( 2(x_t - \mu_q)^2 - (\sigma_{q0}^2 + \sigma_{x_t}^2) \right)}{(\sigma_{q0}^2 + \sigma_{x_t}^2)^3}} \quad (\text{D3})$$

Eine Näherungsformel ist in einem iterativen Prozess i.d.R. ausreichend. Während der iterativen Parameterbestimmung der Hidden Markov Analyse wird für  $\sigma_{q0}^2$  der Wert aus der vorhergehenden Iteration eingesetzt, dadurch konvergiert der Schätzer genauso zu seinem Zielwert, wie mit einer exakten Gleichung, nur dass je nach Qualität der Näherung etwas mehr Iterationen benötigt werden. Da die implizierte

Nullstellenbestimmung aber auch in jeder Iteration des HMMs zusätzliche Zeit benötigt, wäre das Verwenden der Näherungsformel also nicht unbedingt langsamer. Trotzdem wurde auf diese Methode verzichtet, da die Funktionen, um die es hier geht, besonders an den Definitionsgrenzen bei 0 und 1 sehr hohe Werte für die Ableitungen bekommen und dadurch die Näherung von oben beliebig schlecht werden kann.

## Anhang E 2D-Histogramme

Üblicherweise werden 2D-Histogramme als Höhenlinienplot oder auch Contourplot erstellt. Man muss zu Beginn wie bei einem 1D-Histogramm für beide Dimensionen die Binbreite wählen, dann wird jeder Datenpunkt einem Bin zugeordnet. Die Bingröße kann umso kleiner gewählt werden, je mehr Datenpunkte vorliegen. Anschließend werden daraus Kurven generiert, die als Höhenlinien Bins mit gleichen Werten verbinden. Dieser Schritt ist für hochauflösende Bilder mit engen Höhenlinien sehr rechenintensiv und verbraucht zudem viel Speicher, da die Höhenlinien alle einzeln im Speicher abgelegt werden müssen. Deshalb wurden alternativ dazu alle 2D-Histogramme in dieser Arbeit nach dem folgenden Verfahren erstellt:

Die Größe des Bildes muss zu Beginn festgelegt werden, z.B. 300x300 Bildpunkte. Im nächsten Schritt werden die Datenpunkte in das 2D-Histogramm eingeordnet, was bei den üblichen Datengrößen (<300x300) lediglich zu einzelnen Punkten führt. Nun wird dieses Bild mit einer 2D-Gauß-Funktion gefaltet, die einzelnen Punkte werden auf diese Weise verschmiert. Die Breite der Gauß-Funktion kann vorgegeben werden und entspricht dem Binning-Parameter im klassischen Fall. Je mehr Datenpunkte vorliegen, desto schmaler darf die Gauß-Funktion sein. Das Ergebnis ist ein einziges Bild mit der vorgegeben Größe und dem exakt gleichen Ergebnis wie ein Höhenlinienbild mit extrem vielen Höhenlinien, ohne dass jemals irgendwelche Höhenlinien generiert werden mussten. Neben dem geringeren Speicherverbrauch besticht dieses Verfahren hauptsächlich durch die wesentlich kürzere Rechenzeit.

Aus dem fertigen Bild kann zusätzlich für jede Bildzeile bzw. Bildspalte der Mittelwert berechnet werden, indem der zugehörige x- bzw. y-Wert mit der normierten zeilen- bzw. spaltenweise normierten Häufigkeit gewichtet aufaddiert wird. Diese Werte wurden oft verbunden zu einer weißen Linie in die Diagramme eingetragen.

## Literaturverzeichnis

1. Moerner, W.E. and L. Kador, *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid*. Physical Review Letters, 1989. **62**(21): p. 2535.
2. Orrit, M. and J. Bernard, *Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal*. Physical Review Letters, 1990. **65**(21): p. 2716.
3. Petrášek, Z. and P. Schwille, *Fluctuations as a source of information in fluorescence microscopy*. Journal of The Royal Society Interface, 2009. **6**(Suppl 1): p. S15.
4. Talaga, D.S., *Markov processes in single molecule fluorescence*. Current opinion in colloid & interface science., 2007. **12**(6): p. 285.
5. Li, C.B., H. Yang, and T. Komatsuzaki, *Multiscale complex network of protein conformational fluctuations in single-molecule time series*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 536-41.
6. Watkins, L.P. and H. Yang, *Detection of intensity change points in time-resolved single-molecule measurements*. J Phys Chem B, 2005. **109**(1): p. 617-28.
7. McKinney, S.A., C. Joo, and T. Ha, *Analysis of single-molecule FRET trajectories using hidden Markov modeling*. Biophysical Journal, 2006. **91**(5): p. 1941-1951.
8. Beausang, J.F. and P.C. Nelson, *Diffusive hidden Markov model characterization of DNA looping dynamics in tethered particle experiments*. Physical Biology, 2007. **4**(3): p. 205-219.
9. Messina, T.C., et al., *Hidden Markov model analysis of multichromophore photobleaching*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(33): p. 16366-16376.
10. Andrec, M., R.M. Levy, and D.S. Talaga, *Direct determination of kinetic rates from single-molecule photon arrival trajectories using hidden Markov models*. Journal of Physical Chemistry A, 2003. **107**(38): p. 7454-7464.
11. Watkins, L.P. and H. Yang, *Information bounds and optimal analysis of dynamic single molecule measurements*. Biophys J, 2004. **86**(6): p. 4015-29.
12. Zhang, K. and H. Yang, *Photon-by-photon determination of emission bursts from diffusing single chromophores*. J Phys Chem B, 2005. **109**(46): p. 21930-7.
13. Flomenbom, O., J. Klafter, and A. Szabo, *What can one learn from two-state single-molecule trajectories?* Biophysical journal, 2005. **88**(6): p. 3780-3783.

14. Milescu, L.S., et al., *Maximum likelihood estimation of molecular motor kinetics from staircase dwell-time sequences*. Biophysical journal, 2006. **91**(4): p. 1156-1168.
15. Talaga, D.S., *Information theoretical approach to single-molecule experimental design and interpretation*. J Phys Chem A, 2006. **110**(31): p. 9743-57.
16. Schröder, G.F. and H. Grubmüller, *Maximum likelihood trajectories from single molecule fluorescence resonance energy transfer experiments*. J. Chem. Phys., 2003. **119**: p. 9920-9924.
17. Joo, C., et al., *Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 51-76.
18. Weisstein, E.W. *Likelihood*. From MathWorld--A Wolfram Web Resource 2009 [cited; Available from: <http://mathworld.wolfram.com/Likelihood.html>].
19. Zech, G., *Einführung in Statistik und Messwertanalyse für Physiker*. FB-Physik, Universität Siegen, 2004.
20. Bayes, T., *An essay towards solving a problem in the doctrine of chances*. Phil. Trans, 1763.
21. Malakoff, D., *STATISTICS: Bayes Offers a'New'Way to Make Sense of Numbers*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1460.
22. Davison, A.C., *Statistical models*. 2003, Cambridge: Cambridge University Press. 726 S.
23. Ephraim, Y. and N. Merhav, *Hidden markov processes*. IEEE Transactions on Information Theory, 2002. **48**(6): p. 1518-1569.
24. Raviv, J., *Decision making in Markov chains applied to the problem of pattern recognition*. IEEE transactions on information theory, 1967. **13**(4): p. 536-551.
25. Jelinek, F., *Continuous speech recognition by statistical methods*. Proceedings of the IEEE, 1976. **64**(4): p. 532-556.
26. Baker, J., *The DRAGON system--An overview*. IEEE Transactions on Acoustics, Speech and Signal Processing, 1975. **23**(1): p. 24-29.
27. Jelinek, F., L. Bahl, and R. Mercer, *Design of a linguistic statistical decoder for the recognition of continuous speech*. IEEE Transactions on Information Theory, 1975. **21**(3): p. 250-256.
28. Bahl, L. and F. Jelinek, *Decoding for channels with insertions, deletions, and substitutions with applications to speech recognition*. IEEE Transactions on Information Theory, 1975. **21**(4): p. 404-411.
29. Rabiner, L.R., *A Tutorial on Hidden Markov-Models and Selected Applications in Speech Recognition*. Proceedings of the Ieee, 1989. **77**(2): p. 257-286.
30. Gish, H. and M. Schmidt, *Text-independent speaker identification*. IEEE signal processing magazine, 1994. **11**(4): p. 18-32.



31. Lee, C.H., F.K. Soong, and K.K. Paliwal, *Automatic Speech and Speaker Recognition: Advanced Topics*. 1996: Springer.
32. Couvereur, C., *Environmental sound recognition: a statistical approach*. Doctorat en sciences appliquees, Faculte Polytechnique de Mons, Mons, Belgium, 1997.
33. Gaunard, P., et al. *Automatic classification of environmental noise events by hiddenMarkov models*. 1998.
34. Streit, R.L., et al., *Frequency line tracking using hidden Markov models*. IEEE Transactions on Acoustics, Speech and Signal Processing, 1990. **38**(4): p. 586-598.
35. Xie, X. and R.J. Evans, *Multiple target tracking and multiple frequency line tracking using hidden Markov models*. IEEE Transactions on signal processing, 1991. **39**(12): p. 2659-2676.
36. White, L.B., *Cartesian hidden Markov models with applications*. IEEE Transactions on Signal Processing, 1992. **40**(6): p. 1601-1604.
37. Coast, D.A., G.G. Cano, and S.A. Briller, *Use of hidden Markov models for electrocardiographic signal analysis*. Journal of electrocardiology, 1990. **23**: p. 184.
38. Thoraval, L., G. Carrault, and J.J. Bellanger, *Heart signal recognition by Hidden Markov Models: the ECG case*. Methods of information in medicine, 1994. **33**(1): p. 10.
39. Koski, A., *Modelling ECG signals with hidden Markov models*. Artificial Intelligence in Medicine, 1996. **8**(5): p. 453-471.
40. Albert, P.S., *A two-state Markov mixture model for a time series of epileptic seizure counts*. Biometrics, 1991: p. 1371-1381.
41. Le, N.D., et al., *Exact likelihood evaluation in a Markov mixture model for time series of seizure counts*. Biometrics, 1992: p. 317-323.
42. Ball, F.G. and J.A. Rice, *Stochastic models for ion channels: introduction and bibliography*. Mathematical biosciences, 1992. **112**(2): p. 189.
43. Churchill, G.A., *Stochastic models for heterogeneous DNA sequences*. Bulletin of Mathematical Biology, 1989. **51**(1): p. 79-94.
44. Krogh, A., et al., *Hidden Markov models in computational biology. Applications to protein modeling*. Journal of Molecular Biology, 1994. **235**(5): p. 1501-1531.
45. Lukashin, A.V. and M. Borodovsky, *GeneMark. hmm: new solutions for gene finding*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(4): p. 1107-1115.
46. Chung, S.H., et al., *Characterization of single channel currents using digital signal processing techniques based on hidden Markov models*. Philosophical Transactions: Biological Sciences, 1990: p. 265-285.

47. Chung, S.H., V. Krishnamurthy, and J.B. Moore, *Adaptive processing techniques based on hidden Markov models for characterizing very small channel currents buried in noise and deterministic interferences*. Philosophical Transactions: Biological Sciences, 1991: p. 357-384.
48. Venkataramanan, L., R. Kuc, and F.J. Sigworth, *Identification of hidden Markov models for ion channel currents. II. State-dependent excess noise*. IEEE Transactions on Signal Processing, 1998. **46**(7): p. 1916-1929.
49. Venkataramanan, L., et al., *Identification of hidden Markov models for ion channel currents. I. Colored background noise*. IEEE Transactions on Signal Processing, 1998. **46**(7): p. 1901-1915.
50. Joo, C., et al., *Real-time observation of RecA filament dynamics with single monomer resolution*. Cell, 2006. **126**(3): p. 515-527.
51. Jäger, M., et al., *Analysis of Single-Molecule Fluorescence Spectroscopic Data with a Markov-Modulated Poisson Process*. Chemphyschem, 2009.
52. Beausang, J.F., et al., *DNA looping kinetics analyzed using diffusive hidden Markov model*. Biophysical Journal, 2007. **92**(8): p. L64-L66.
53. Zimmermann, B., et al., *Movements of the epsilon-subunit during catalysis and activation in single membrane-bound H(+)-ATP synthase*. Embo J, 2005. **24**(12): p. 2053-63.
54. Düser, M.G., et al., *36 degrees step size of proton-driven c-ring rotation in FoF1-ATP synthase*. Embo J, 2009. **28**(18): p. 2689-96.
55. Heitkamp, T., et al., *K<sup>+</sup>-translocating KdpFABC P-type ATPase from Escherichia coli acts as a functional and structural dimer*. Biochemistry, 2008. **47**(11): p. 3564-75.
56. Lakowicz, J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2. Edition ed. 1999, New York: Kluwer Academic.
57. Förster, T., Discuss. Faraday Soc., 1959. **27**: p. 7-17.
58. Wazawa, T. and M. Ueda, *Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005. **95**: p. 77-106.
59. Wilhelm, S., et al., *Confocal Laser Scanning Microscopy*. Carl Zeiss Brochure.
60. Zarrabi, N., et al., *Monitoring the conformational dynamics of a single potassium transporter by ALEX-FRET*. Proc. SPIE, 2008. **6862**.
61. Alberts, B.J., A. ; Lewis, J. ; Raff, M. ; Roberts, K. ;Walter, P., *Molecular Biology of the Cell, 4. ed.* 2002, New York: Garland Pub.
62. Duser, M.G., et al., *The proton-translocating a subunit of FOF1-ATP synthase is allocated asymmetrically to the peripheral stalk*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33602-10.

63. Peneva, K., et al., *Exploiting the nitrilotriacetic acid moiety for biolabeling with ultrastable perylene dyes*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(16): p. 5398-+.
64. Schafer, I.B., et al., *Crystal structure of the archaeal AIAo ATP synthase subunit B from Methanosarcina mazei Go1: Implications of nucleotide-binding differences in the major AIAo subunits A and B*. J Mol Biol, 2006. **358**(3): p. 725-40.
65. Krebstakies, T., et al., *Both rotor and stator subunits are necessary for efficient binding of F1 to F0 in functionally assembled Escherichia coli ATP synthase*. J Biol Chem, 2005. **280**(39): p. 33338-45.
66. Baum, L.E., et al., *A Maximization Technique Occurring in Statistical Analysis of Probabilistic Functions of Markov Chains*. Annals of Mathematical Statistics, 1970. **41**(1): p. 164-171.
67. Schlittgen, R., *Statistische Inferenz*. 1996, München, Wien, Oldenbourg: Oldenbourg Verlag GmbH, München. 411.
68. Dempster, A.P., N.M. Laird, and D.B. Rubin, *Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm*. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 1977: p. 1-38.
69. Baum, L.E. and G.R. Sell, *Growth functions for transformations on manifolds*. Pac. J. Math, 1968. **27**(2): p. 211-227.
70. Press, W.H., et al., *Numerical recipes the art of scientific computing, 3rd ed.* 2007, New York, NY [u.a.]: Cambridge Univ. Press. XXI, 1235 S.
71. Cappé, O. *Ten years of HMMs*. 2001 [cited; Available from: <http://www.tsi.enst.fr/~cappe/docs/hmmbib.html>].
72. Baum, L.E. and J.A. Eagon, *An inequality with applications to statistical estimation for probabilistic functions of Markov processes and to a model for ecology*. Bull. Amer. Math. Soc, 1967. **73**(360-363): p. 212.
73. Baum, L.E. and T. Petrie, *Statistical inference for probabilistic functions of finite state Markov chains*. The Annals of Mathematical Statistics, 1966: p. 1554-1563.
74. Baum, L.E., *An inequality and associated maximization technique in statistical estimation for probabilistic functions of Markov processes*. Inequalities, 1972. **3**(1): p. 1-8.
75. Viterbi, A.J., *Error Bounds for Convolutional Codes and an Asymptotically Optimum Decoding Algorithm*. Ieee Transactions on Information Theory, 1967. **It13**(2): p. 260-269.
76. Forney Jr, G.D., *The viterbi algorithm*. Proceedings of the IEEE, 1973. **61**(3): p. 268-278.
77. Bilmes, J.A., *What HMMs can do*. Ieice Transactions on Information and Systems, 2006. **E89D**(3): p. 869-891.

78. Murphy, K.P., *Fitting a Conditional Linear Gaussian Distribution*. 1998.
79. Schlüsche, P., *Untersuchung der Funktion und Dynamik von DNA-Transkriptionsfaktoren mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie*. 2007, Ludwig-Maximilians-Universität München: München.
80. Pawley, J.B., *Handbook of biological confocal microscopy, Third edition*. Handbook of biological confocal microscopy, Third edition. 2006, New York: Springer.
81. Brent, R.P., *Algorithms for Minimization Without Derivatives*. 1973, Prentice-Hall.
82. Forsythe, G.E., M.A. Malcolm, and C.B. Moler, *Computer methods for mathematical computations*. 1977: Prentice Hall Professional Technical Reference.
83. Dahan, M., et al., *Ratiometric measurement and identification of single diffusing molecules*. Chemical Physics, 1999. **247**(1): p. 85-106.
84. Lanterman, A.D., Schwarz, Wallace, and Rissanen: *Intertwining themes in theories of model selection*. International Statistical Review/Revue Internationale de Statistique, 2001: p. 185-212.
85. Kass, R.E. and A.E. Raftery, *Bayes factors*. Journal of the American Statistical Association, 1995. **90**(430): p. 773-795.
86. Irizarry, R.A., *Information and Posterior Probability Criteria for Model Selection in Local Likelihood Estimation*. Journal of the American Statistical Association, 2001. **96**(453): p. 303-315.
87. Sims, R.J., 3rd, S.S. Mandal, and D. Reinberg, *Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(3): p. 263-71.
88. Alberts, B., et al., *Molecular biology of the cell*. 2002. New York: Garland Science.
89. Kamada, K., et al., *Crystal structure of negative cofactor 2 recognizing the TBP-DNA transcription complex*. Cell, 2001. **106**(1): p. 71-81.
90. Maldonado, E., M. Hampsey, and D. Reinberg, *Repression: targeting the heart of the matter*. Cell, 1999. **99**(5): p. 455.
91. Goppelt, A., et al., *A mechanism for repression of class II gene transcription through specific binding of NC2 to TBP-promoter complexes via heterodimeric histone fold domains*. Embo J, 1996. **15**(12): p. 3105-16.
92. Schluesche, P., et al., *NC2 mobilizes TBP on core promoter TATA boxes*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(12): p. 1196-201.
93. Kim, J.L., D.B. Nikolov, and S.K. Burley, *Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 520-7.

94. Gilfillan, S., et al., *Efficient binding of NC2.TATA-binding protein to DNA in the absence of TATA*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 6222-30.
95. Ha, T., *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer*. Methods, 2001. **25**(1): p. 78-86.
96. Schwarz, G., *Estimating the dimension of a model*. The annals of Statistic, 1978. **6**: p. 461-464.
97. van Loan, C.F. and G.H. Golub, *Matrix computations*. 1983: John Hopkins University Press.
98. Axelsen, K.B. and M.G. Palmgren, *Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily*. J Mol Evol, 1998. **46**(1): p. 84-101.
99. Møller, J.V., B. Juul, and M. le Maire, *Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases*. BBA-Reviews on Biomembranes, 1996. **1286**(1): p. 1-51.
100. Toyoshima, C. and T. Mizutani, *Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue*. Nature, 2004. **430**(6999): p. 529-35.
101. Toyoshima, C., et al., *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution*. Nature, 2000. **405**(6787): p. 647-55.
102. Toyoshima, C. and H. Nomura, *Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium*. Nature, 2002. **418**(6898): p. 605-11.
103. Toyoshima, C., H. Nomura, and Y. Sugita, *Crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in various physiological states*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **986**: p. 1-8.
104. Olesen, C., et al., *Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion*. Science, 2004. **306**(5705): p. 2251-5.
105. Olesen, C., et al., *The structural basis of calcium transport by the calcium pump*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1036-42.
106. Rice, W.J., et al., *Structure of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca<sup>2+</sup>-ATPase in E1 and E2 states*. Biophys J, 2001. **80**(5): p. 2187-97.
107. Morth, J.P., et al., *Crystal structure of the sodium-potassium pump*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1043-9.
108. Pedersen, P.L. and E. Carafoli, *Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function*. Trends in Biochemical Sciences, 1987. **12**: p. 146-150.
109. Bertrand, J., K. Altendorf, and M. Bramkamp, *Amino acid substitutions in putative selectivity filter regions III and IV in KdpA alter ion selectivity of the KdpFABC complex from Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004. **186**(16): p. 5519-22.
110. Buurman, E.T., K.T. Kim, and W. Epstein, *Genetic evidence for two sequentially occupied K<sup>+</sup> binding sites in the Kdp transport ATPase*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6678-85.

111. Schrader, M., et al., *Replacement of glycine 232 by aspartic acid in the KdpA subunit broadens the ion specificity of the K(+)-translocating KdpFABC complex*. Biophys J, 2000. **79**(2): p. 802-13.
112. van der Laan, M., M. Gassel, and K. Altendorf, *Characterization of amino acid substitutions in KdpA, the K<sup>+</sup>-binding and -translocating subunit of the KdpFABC complex of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(19): p. 5491-4.
113. Bramkamp, M. and K. Altendorf, *Single amino acid substitution in the putative transmembrane helix V in KdpB of the KdpFABC complex of Escherichia coli uncouples ATPase activity and ion transport*. Biochemistry, 2005. **44**(23): p. 8260-6.
114. Gassel, M. and K. Altendorf, *Analysis of KdpC of the K(+)-transporting KdpFABC complex of Escherichia coli*. Eur J Biochem, 2001. **268**(6): p. 1772-81.
115. Ahnert, F., et al., *ATP binding properties of the soluble part of the KdpC subunit from the Escherichia coli K(+)-transporting KdpFABC P-type ATPase*. Biochemistry, 2006. **45**(36): p. 11038-46.
116. Gassel, M., et al., *The KdpF subunit is part of the K(+)-translocating Kdp complex of Escherichia coli and is responsible for stabilization of the complex in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37901-7.
117. Albers, R.W., *Biochemical aspects of active transport*. Annu Rev Biochem, 1967. **36**: p. 727-56.
118. Post, R.L., C. Hegyvary, and S. Kume, *Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase*. J Biol Chem, 1972. **247**(20): p. 6530-40.
119. Kubala, M., *ATP-binding to P-type ATPases as revealed by biochemical, spectroscopic, and crystallographic experiments*. Proteins, 2006. **64**(1): p. 1-12.
120. Horisberger, J.D., *Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 377-87.
121. Kanazawa, T., et al., *Fluorometric study on conformational changes in the catalytic cycle of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase*. Biosci Rep, 1995. **15**(5): p. 317-26.
122. Karlsh, S.J., et al., *Identification of the cation binding domain of Na/K-ATPase*. Acta Physiol Scand Suppl, 1992. **607**: p. 69-76.
123. Zarrabi, N., *Mechanik eines Nanomotors: die FoF1 ATP-Synthase in Lipiddoppelschichten*. 2003, Universität Stuttgart: Stuttgart, 2003.
124. Zarrabi, N., et al. *Simultaneous monitoring of the two coupled motors of a single FF-ATP synthase by three-color FRET using duty cycle-optimized triple-ALEX*. 2009.

125. Cantley, L.C., Jr., L.G. Cantley, and L. Josephson, *A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. Mechanistic and regulatory implications.* J Biol Chem, 1978. **253**(20): p. 7361-8.
126. Karlsh, S.J., L.A. Beauge, and I.M. Glynn, *Vanadate inhibits (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)ATPase by blocking a conformational change of the unphosphorylated form.* Nature, 1979. **282**(5736): p. 333-5.
127. Smith, R.L., K. Zinn, and L.C. Cantley, *A study of the vanadate-trapped state of the (Na,K)-ATPase. Evidence against interacting nucleotide site models.* J Biol Chem, 1980. **255**(20): p. 9852-9.
128. Stimac, R., F. Kerek, and H.J. Apell, *Mechanism of the Na,K-ATPase inhibition by MCS derivatives.* J Membr Biol, 2005. **205**(2): p. 89-101.
129. Kerek, F., et al., *Characterization of the macrocyclic carbon suboxide factors as potent Na,K-ATPase and SR Ca-ATPase inhibitors.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1567**(1-2): p. 213-20.
130. Lupfert, C., et al., *Rate limitation of the Na(+),K(+)-ATPase pump cycle.* Biophys J, 2001. **81**(4): p. 2069-81.
131. Champeil, P., et al., *Kinetic characterization of the normal and detergent-perturbed reaction cycles of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Rate-limiting step(s) under different conditions.* J Biol Chem, 1986. **261**(35): p. 16372-84.
132. Abrahams, J.P., et al., *Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria.* Nature, 1994. **370**(6491): p. 621-8.
133. Boyer, P.D., *The Binding Change Mechanism for ATP Synthase - Some Probabilities and Possibilities.* Biochim. Biophys. Acta., 1993. **1140**: p. 215-250.
134. Noji, H., et al., *Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase.* Nature, 1997. **386**(6622): p. 299-302.
135. Senior, A.E., S. Nadanaciva, and J. Weber, *The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase.* BBA-Bioenergetics, 2002. **1553**(3): p. 188-211.
136. Diez, M., et al., *Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase.* Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(2): p. 135-41.
137. Zarrabi, N., et al. *Asymmetry of rotational catalysis of single membrane-bound F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase.* in *Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE.* 2005.
138. Düser, M., *Der Fo-Motor der H<sup>+</sup>-ATPsynthase aus Escherichia coli: Strukturelle und mechanistische Untersuchungen mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie,* in *Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften.* 2008, Albert-Ludwigs Universität: Freiburg. p. 198.

139. Eigen, M. and R. Rigler, *Sorting Single Molecules - Application to Diagnostics and Evolutionary Biotechnology*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(13): p. 5740-5747.
140. Zarrabi, N., et al., *Detecting substeps in the rotary motors of FoF1-ATP synthase by Hidden Markov Models*. Proc. SPIE, 2007. **6444**.
141. Boyer, P.D., *What makes ATP Synthase spin*. Nature, 1999. **402**: p. 247-249.
142. Hirono-Hara, Y., et al., *Activation of pausing F-1 motor by external force*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(12): p. 4288-4293.
143. Shimabukuro, K., et al., *Catalysis and rotation of F-1 motor: Cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40 degrees substep rotation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(25): p. 14731-14736.
144. Bald, D., et al., *Redox regulation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATP synthase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(43): p. 39505-39507.
145. Kinoshita, K., Jr., K. Adachi, and H. Itoh, *Rotation of F<sub>1</sub>-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2004. **33**: p. 245-68.
146. Pavlova, P., et al., *Complete inhibition and partial re-activation of single F-1-ATPase molecules by tentoxin - New properties of the re-activated enzyme*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(11): p. 9685-9688.
147. Natarajan, P. and R. Nevatia, *Hierarchical Multi-channel Hidden Semi Markov Models*. International Joint Conferences on Artificial Intelligence, 2007: p. 2562-2567.
148. Bonafonte, A., J. Vidal, and A. Nogueiras. *Duration modeling with expanded HMM applied to speech recognition*. in *Spoken Language, 1996. ICSLP 96. Proceedings., Fourth International Conference on*. 1996.
149. Wang, H. and H. Qian, *On detailed balance and reversibility of semi-Markov processes and single-molecule enzyme kinetics*. Journal of Mathematical Physics, 2007. **48**(1): p. 013303-15.
150. Adachi, K., et al., *Coupling of rotation and catalysis in F-1-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation*. Cell, 2007. **130**(2): p. 309-321.
151. Gopich, I.V. and A. Szabo, *Single-molecule FRET with diffusion and conformational dynamics*. J Phys Chem B, 2007. **111**(44): p. 12925-32.
152. Wallace, M.I., et al., *Non-Arrhenius kinetics for the loop closure of a DNA hairpin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5584-9.
153. Yang, H. and S. Xie, *Probing single-molecule dynamics photon by photon*. The Journal of Chemical Physics, 2002. **117**(24): p. 10965-10979.



154. Tan, E., et al., *A four-way junction accelerates hairpin ribozyme folding via a discrete intermediate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(16): p. 9308-13.
155. Henzler-Wildman, K.A., et al., *Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory*. Nature, 2007. **450**(7171): p. 838-44.
156. Flomenbom, O. and R.J. Silbey, *Utilizing the information content in two-state trajectories*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 10907-10.
157. Liao, J.C., et al., *Extending the absorbing boundary method to fit dwell-time distributions of molecular motors with complex kinetic pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3171-6.
158. Denis Tsygankov, M.L., Michael E. Fisher, *Back-stepping, hidden substeps, and conditional dwell times in molecular motors*. 2006.
159. Hampel, F.R., et al., *Robust statistics: the approach based on influence functions*. 1986: John Wiley & Sons New York.
160. Huber, P.J. and E.M. Ronchetti, *Robust statistics*. 2009: Wiley-Blackwell.
161. Jureková, J. and P.K. Sen, *Robust statistical procedures: asymptotics and interrelations*. 1996: Wiley-Interscience.
162. Roweis, S. *Gaussian Identities*. 1999 [cited; Available from: [www.cs.toronto.edu/~roweis/notes/gaussid.pdf](http://www.cs.toronto.edu/~roweis/notes/gaussid.pdf)].
163. Murphy, K.P. *Fitting a Conditional Linear Gaussian Distribution*. 2003 [cited; Available from: <http://people.cs.ubc.ca/~murphyk/Papers/learnCG.pdf>].
164. Roweis, S. *Matrix Identities*. 1999 [cited; Available from: [www.cs.toronto.edu/~roweis/notes/matrixid.pdf](http://www.cs.toronto.edu/~roweis/notes/matrixid.pdf)].

## Eigene Publikationen und Tagungsberichte

*Analyzing the Dynamics of Single TBP-DNA-NC2 complexes by Hidden Markov Models*, N. Zarrabi, P. Schlüsche, M. Meisterernst, D.C. Lamb, M. Börsch, *manuscript in preparation*

*The conformational dynamics of a single potassium transporter*, T. Heitkamp, N. Zarrabi, M. Börsch, J.-C. Greie, *manuscript in preparation*

*Regulatory assembly of the vacuolar proton pump  $V_0V_1$ -ATPase in yeast cells by FLIM-FRET*, S. Ernst, C. Batisse, N. Zarrabi, B. Böttcher, M. Börsch, Proc. SPIE 7569, 75690W, **2010**

*36° step size of proton-driven c-ring rotation in  $F_0F_1$ -ATP synthase*, M. G. Düser, N. Zarrabi, D. J. Cipriano, S. Ernst, G. D. Glick, S. D. Dunn and M. Börsch, EMBO Journal 28, 2689-2696, **2009**

*Mechanistic basis for differential inhibition of the  $F_1F_0$ -ATPase by Aurovertin*, K. M. Johnson, L. Swenson, A. W. Opipari, R. Reuter, N. Zarrabi, C. A. Fierke, M. Börsch, G. D. Glick, Biopolymers 91, 830-840, **2009**

*Simultaneous monitoring of the two coupled motors of a single  $F_0F_1$ -ATP synthase by three-color FRET using duty cycle-optimized triple-ALEX*, N. Zarrabi, S. Ernst, M. G. Düser, A. Golovina-Leiker, W. Becker, R. Erdmann, S. D. Dunn, and M. Börsch, Proc. SPIE 7185, 718505, **2009**

*The proton-translocating a subunit of  $F_0F_1$ -ATP synthase is allocated asymmetrically to the peripheral stalk*, M. G. Düser, Y. Bi, N. Zarrabi, S. D. Dunn, M. Börsch, J. Biol. Chem. 283, 33602-33610, **2008**

*Exploiting the nitrilotriacetic acid moiety for biolabeling with ultrastable perylene dyes*, K. Peneva, G. Mihov, A. Herrmann, N. Zarrabi, M. Börsch, T. M. Duncan, K. Müllen, J. Am. Chem. Soc. 130, 5398-5399, **2008**

*Monitoring the conformational dynamics of a single potassium transporter by ALEX-FRET*, N. Zarrabi, T. Heitkamp, J.-C. Greie, and M. Börsch, Proc. SPIE 6862, 68620M, **2008**

*Monitoring the rotary motors of single  $F_0F_1$ -ATP synthase by synchronized multi channel TCSPC*, N. Zarrabi, M. G. Düser, S. Ernst, R. Reuter, G. D. Glick, S. D. Dunn, J. Wrachtrup, and M. Börsch, Proc. SPIE 6771, 67710F, **2007**

*Detecting substeps in the rotary motors of  $F_0F_1$ -ATP synthase by Hidden Markov Models*, N. Zarrabi, M. G. Düser, R. Reuter, S. D. Dunn, J. Wrachtrup, and M. Börsch, Proc. SPIE 6444, 64440E, **2007**

*3D-localization of the a-subunit in  $F_0F_1$ -ATP synthase by time resolved single-molecule FRET*, Monika G. Düser, Nawid Zarrabi, Yumin Bi, Boris Zimmermann, Stanley D. Dunn, and Michael Börsch, Proc. SPIE 6092, 60920H, **2006**

*Proton-driven subunit rotation within a single ATP synthase*, M. G. Düser, N. Zarrabi, Y. Bi, S. D. Dunn, M. Börsch, 'Proceedings of the VIII. Linz Winterworkshop - Advances in Single Molecule Research for Biology and Nanoscience', invited paper, 13-18, **2006**

*Movements of the  $\epsilon$ -subunit during catalysis and activation in single membrane-bound  $H^+$ -ATP synthase*, B. Zimmermann, M. Diez, N. Zarrabi, P. Gräber, M. Börsch, EMBO Journal 24, 2053-2063, **2005**

*Asymmetry of rotational catalysis of single membrane-bound  $F_0F_1$ -ATP synthase*, Nawid Zarrabi, Boris Zimmermann, Manuel Diez, Peter Gräber, Jörg Wrachtrup, and Michael Börsch, Proc. SPIE 5699, 175, **2005**

## Tagungsbeiträge, Auswahl

- |   |   |
|---|---|
| <b>Vortrag</b><br>17.09.2008<br>Berlin                        | Single Molecule Workshop (Picoquant)<br>Titel: „ <i>Monitoring the Conformational Dynamics of a Single Potassium Transporter by ALEX-FRET</i> “   |
| <b>Eingeladener Vortrag</b><br>27.05.2008<br>Shenzhen (China) | 3rd Annual Advanced Optical Methods Workshop (Becker & Hickl), Shenzhen University, eingeladen von Dr. W. Becker<br>Titel: „ <i>Monitoring single ion transporters at work: proton-driven rotation in <math>F_0F_1</math>-ATP synthase and domain swapping in P-type ATPase</i> “ |
| <b>Vortrag</b><br>27.02.2008<br>Berlin                        | Deutsche Physikalische Gesellschaft (DPG)<br>Frühjahrstagung 2008<br>Titel: „ <i>Data Analysis with Hidden Markov Models on a single Kdp-ATPase</i> “   |
| <b>Vortrag</b><br>21.09.2007<br>Berlin                        | Single Molecule Workshop (Picoquant)<br>Titel: „ <i>Statistical Data Analysis with Hidden Markov Models on A Single Rotary Motor of ATP Synthase</i> “  |
| <b>Vortrag</b><br>13.09.2007<br>Bosten (USA)                  | 1st Boston Workshop on Advanced TCSPC Techniques (Becker & Hickl)<br>Titel: „ <i>Time-Resolved Single-Molecule Spectroscopy</i> “   |
| <b>Vortrag</b><br>09.09.2007<br>Bosten (USA)                  | SPIE Optics East 2007<br>Titel: „ <i>Monitoring the rotary motors of single <math>F_0F_1</math>-ATP synthase by synchronized multichannel TCSPC</i> “   |
| <b>Vortrag</b><br>29.03.2007<br>Regensburg                    | Deutsche Physikalische Gesellschaft (DPG)<br>Frühjahrstagung 2007<br>Titel: „ <i>Data Analysis with Hidden Markov Models on a single rotary motor <math>F_0F_1</math>-ATP synthase</i> “  |

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all denjenigen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank geht an Prof. Dr. Jörg Wrachtrup für die Aufnahme an seinem Institut und die damit verbundene Möglichkeit zu promovieren.

Für die Übernahme des Mitberichts danke ich Prof. Don. C. Lamb und für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes Prof. Dr. Holm.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Gruppe von Dr. Michael Börsch an der Universität Stuttgart. Er gab mit der Idee, Methoden aus der Künstlichen Intelligenz für die Modellierung der Einzelmoleküldaten zu verwenden, den entscheidenden Ausschlag für diese Arbeit. Ich danke ihm für das entgegengebrachte Vertrauen und den großen Freiraum, den er mir während der ganzen Zeit gewährte. Seine Tatkraft und sein Enthusiasmus sind einzigartig.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kooperationspartnern Prof. D. C. Lamb und Dr. Peter Schlüsche der LMU München. Deren großes Interesse an der Methode der Hidden Markov Modelle und die sich daraus entwickelte enge Zusammenarbeit machten das TBP-Projekt zu einem zentralen Standbein dieser Arbeit und wurden darüber hinaus für mich eine wichtige Motivationsquelle. Peter Schlüsche danke ich dafür, dass er diese Kooperation nicht nur mitinitiiert hat, sondern auch mit Leben gefüllt hat. Die zahlreichen Telefonkonferenzen und gegenseitigen Treffen waren mir eine große Bereicherung und werden mir in lebhafter Erinnerung bleiben.

Mein Dank geht auch an meine Kooperationspartner Dr. Jörg-Christian Greie und Dr. Thomas Heitkamp der Universität Osnabrück. Thomas Messaufenthalte bei uns in Stuttgart z.B. während der Fußball-WM 2006 machte diese Kooperation zu einem Erlebnis.

Für die gemeinsame Zeit danke ich Dr. Carsten Tietz und dafür, dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Er hat zu allen Fragen des Lebens einen interessanten Gedanken und würzte zudem die Kaffeepausen mit unerreichem Witz.

Eine sehr abwechslungsreiche Zeit verbrachte ich mit meinen Zellengenossen Stefan Ernst, Torsten Rendler und Dr. Rolf Reuter. Sie verwandelten unsere Viererzelle zu einem Ort der Erholung bei Forschungsrückschlägen aller Art.

Des Weiteren geht mein Dank an die vielen Institutsmitglieder des 3. Physikalischen Instituts, die zum einen mit ihrem Knowhow viele Alltagsprobleme lösen halfen und die mir darüber hinaus mit ihren vielseitigen Ideen und Interessen eine überaus inspirierende Zeit bescherten. Viele einmalige Erlebnisse innerhalb und außerhalb der Uni verbinden mich seither mit Dr. Andrew Aird, PhD Gopi Balasubramanian, Adam Muschielok, Dr. Felix Neugart, Philipp Neumann, Dr. Sebastian Schuler, Steffen Steinert, Dr. Elmar Thews und Christoffer Wittmann. An dieser Stelle vielen Dank für das Korrekturlesen an Andrew, Steffen und Felix.

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern und an meine Schwester, die mich durch Ihre Unterstützung manche Durststrecke überwinden ließen.

Einen unschätzbaren Beitrag zu dieser Arbeit haben meine Schwiegereltern geleistet, indem sie zahllose Male meine Kinder zu sich nahmen. Für ihre Umsicht und Zuversicht danke ich ihnen.

Schließlich gebührt meiner Familie einen ganz besonderen Dank. Meiner Frau Dr. Monika Düser danke ich neben ihren fachlichen Beiträgen für Ihre Geduld und dem Gespür fürs Wesentliche. Meinem Sohn Pascal und meiner Tochter Linda danke ich dafür, dass sie mich nach manch durchtippter Nacht mit ihrer Fröhlichkeit überschütteten und mit ihrer Unbeschwertheit anstecken konnten.