

Photophysikalische Charakterisierung von Fluoreszenzmarkern insbesondere von Fluoreszenzproteinen

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

M. Sc. Dipl.-Ing. (BA), MBA

Dagmar Auerbach

Saarbrücken

2015

Tag des Kolloquiums: 14.08.2015

Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr. Gregor Jung
Prof. Dr. Ingolf Bernhardt

Vorsitz: Prof. Dr. Gerhard Wenz

Akad. Mitarbeiter: Dr. Klaus Hollemeyer

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung und Abstract	5
1 Einleitung zu Fluoreszenzmarkern und deren Eigenschaften	7
1.1 Cumarin Derivate zur Markierung von AS und Peptiden	8
1.2 Einführung einer nicht-photokonvertierbaren GFP Mutante.....	8
1.3 Chromophorbildungseffizienz der fluoreszierenden Proteine	9
1.4 Aptamere	10
2 Theorie	11
2.1 Absorption	11
2.2 Fluoreszenz.....	11
2.3 Stokes Verschiebung	13
2.4 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET).....	14
2.5 Anisotropie	16
2.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS).....	19
2.6.1 Allgemeines Prinzip.....	19
2.6.2 Konfokales Prinzip.....	20
2.6.3 Korrelationsanalyse.....	22
2.7 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC)	27
2.8 GFP und dessen Struktur	28
2.9 Photokonversion	30
2.10 Chromophorbildung und Chromophorbildungseffizienz	30
2.11 Aptamere	32
3 Material und Methoden	34
3.1 FCS	34
3.2 TCSPC	35
3.3 UV-Vis.....	36
3.4 Fluoreszenzspektrometer	36
3.5 Anisotropie	36
3.6 Proteinexpression.....	37
3.6.1 Nährmedien für <i>E. coli</i>	37
3.6.2 Kultivierung	38
3.6.3 Stammhaltung von <i>E. coli</i> Kulturen.....	38

3.6.4 Herstellung Glycerin Kulturen.....	38
3.6.5 Methode zur Isolierung der Plasmid-DNA	38
3.6.6 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	39
3.6.7 Elektroporation eines Expressionsplasmides in kompetente Zellen in <i>E. coli</i> BL21	40
3.6.8 Expression der Bakterienkultur.....	41
3.6.9 Proteinaufreinigung.....	42
3.6.10 Zellernte	42
3.6.11 Zellaufschluss mit Ultraschall.....	42
3.6.12 Affinitätschromatographie	42
3.6.13 verwendete Fluoreszenzproteine.....	43
4 Ergebnisse und Diskussion.....	44
4.1 Cumarin-derivate zur Markierung von AS und Peptiden.....	44
4.1.1 Ziel der Versuche:.....	44
4.1.2 Ergebnis und Diskussion der Cumarin-derivate	44
4.2 Einführung einer nicht-photokonvertierbaren GFP Mutante E222H	48
4.2.1 Einführung der Problematik und Ziel der Versuche	48
4.2.2 Ergebnisse und Diskussion der nicht-photokonvertierbaren GFP Mutante E222H	48
4.3 Bestimmung der CFE	58
4.3.1 Einführung in die CFE	58
4.3.2 Notwendige Schritte zur Bestimmung	58
4.3.3 Berechnung der CFE.....	65
4.4 Aptamere	66
5 Zusammenfassung und Ausblick	68
6 Referenzen.....	71
7 Anhang	84
7.1 Abbildungsverzeichnis	84
7.2 Publikationen	86
7.3 Konferenzbeiträge	87
7.4 Danksagung	88

Zusammenfassung und Abstract

Zusammenfassung

Die komplette Aufklärung der Vorgänge in Zellen ist von besonderer Bedeutung, da nur durch die gesamte Kenntnis dieser Mechanismen ein Nutzen im Bereich des Wirkstoffdesigns und des Wirkstofftransportes möglich ist. Für weitere Erkenntnisse im Bereich der Fluoreszenzmarker, und im Speziellen der Fluoreszenzproteine, werden in dieser Arbeit Cumarin-basierte Fluoreszenzmarker an Aminosäuren und Peptiden sowie Fluoreszenzproteine charakterisiert. Cumarin-basierte Farbstoffe sind extrinsische Markierer und haben dadurch Schwierigkeiten beim Einbringen des Farbstoffes in die Zelle. Als intrinsische Farbstoffe gelten Fluoreszenzproteine (FP). Auch diese werden in dieser Arbeit charakterisiert, indem eine nicht-photokonvertierbare Mutante, das eGFP E222H, eingeführt wird. Mit dieser ist eine Kontrolle bei allen Experimenten möglich, bei denen bisher die Photokonversion als störender Faktor eine genaue Analyse unmöglich machte. Ein weiterer Nachteil von FP ist die ungenaue Angabe von komplett gereiften Chromophoren in Proteinen in der Zelle im Vergleich zur Proteingesamtanzahl in der Zelle. Die Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz ist bei quantitativen Messungen unumgänglich. Einige Lösungsansätze mit gelbfluoreszierenden Proteinen und Aptameren zur Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz werden in der vorliegenden Arbeit erläutert.

Abstract

A complete knowledge of the overall processes in cells is an aim of utmost importance for the fields of drug discovery and delivery. Further research on fluorescent markers and in particular on fluorescent proteins is the main objective of this thesis. Fluorescent markers such as coumarins, classified as extrinsic dyes, are versatile tools for characterization of in-cell processes involving amino acids and peptides. A major limitation of extrinsic dyes is the ability to pass cell walls; fluorescent proteins (FP) circumvent this issue by already existing in cells through self-expressed proteins. That's why FPs are categorized as intrinsic dyes. Within this thesis a non-photoconvertible mutant of GFP was introduced and characterized. This can be used as a negative control for all experiments, where photoconversion or photoactivation leads to intrinsic inaccuracy. Another disadvantage of fluorescent proteins is the difficulty in defining the ratio of correctly folded chromophores to misfolded proteins. This so-called chromophore formation efficiency is necessary for quantitative experiments. Several approaches based on aptamers and yellow fluorescent proteins for overcoming this problem are explained in here.

1 Einleitung zu Fluoreszenzmarkern und deren Eigenschaften

Der menschliche Körper ist aus ca. 13 Billionen Zellen aufgebaut. Die Vorgänge in jeder einzelnen Zelle sind sehr vielfältig und unterschiedlich und die endgültige Aufklärung aller Mechanismen ist noch weit entfernt. Zu diesem Zweck werden häufig Fluorophore eingesetzt, welche Einblicke in das Zellinnere erlauben. Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden wie FCS und TCSPC erlauben aufgrund der Messparameter der Fluorophore einen Einblick in die Aufklärung biologischer Proben. Fluorophore können grob in zwei Klassen unterschieden werden, intrinsische und extrinsische. Intrinsische Fluorophore sind Zellbestandteile und gehören von vornherein zu dem System dazu. Das Gegenteil sind extrinsische Farbstoffe, die von außen der Zelle oder dem Zellbestandteil zugefügt werden müssen und somit einen Eingriff von außen auf das System darstellen. Allgemein kommen Fluorophore zum Einsatz, um Wechselwirkungen zwischen Molekülen aufzuklären oder biologische Prozesse im mikroskopischen Aufbau mittels einzelner Moleküle zu verstehen. Diese (Zell-)Prozesse reichen von Proteinfaltung¹, DNA Beweglichkeit², Lokalisation einzelner Zellbestandteile³, Biokatalyse^{4,5} und Genexpression⁶ bis zur qualitativen und quantitativen Bestimmung chemischer und biochemischer Analyten^{7,8}. Als Beobachtungsdimension kann beispielsweise das Fluoreszenzsignal des Fluorophors dienen. Dieses kann durch 8 unterschiedliche Dimensionen dargestellt werden: Anisotropie, Fluoreszenzlebenszeit, Fluoreszenzintensität, Zeit, Anregungsspektrum, Emissionsspektrum, Fluoreszenzquantenausbeute sowie die Entfernung zwischen den Fluorophoren⁹. Die Wellenlänge und die erforderliche Zeitauflösung des Messinstrumentes sind zum einen durch die spektralen Eigenschaften des Farbstoffes sowie durch das Messziel gegeben. Das Messziel ist hier die Bestimmung einer definierten Fluoreszenz-Dimension um eine verlässliche Aussage zu treffen. Die vom Experiment erhaltenen Informationen werden durch den Fluorophor vorgegeben, der das Messziel bezüglich der Fluoreszenz-Dimension vorgibt. Zum Beispiel können nur Proben mit einer Anisotropie ungleich null für die Bestimmung des Grades der freien Rotationsmöglichkeiten eingesetzt werden. Oder es muss die Fluoreszenzlebensdauer zur Zeitauflösung des gewünschten Experiments passen. Beispielsweise eignen sich auch nur pH-sensitive Stoffe als Sensoren zur pH-Wert Bestimmung oder Stoffe mit angemessen langen Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Anwendung in Geweben. Das optische Fenster für solche Messungen liegt im Bereich von ungefähr 400-800 nm. Hintergrund hierfür ist die Autofluoreszenz von verschiedenen Zellbestandteilen wie Tryptophan und Tyrosin, welche bei kürzeren Wellenlängen (307 nm respektive 293 nm) auftritt¹⁰. Andere

Möglichkeiten können sein, dass die Zielmoleküle nicht fluoreszierend sind oder aber die intrinsische Fluoreszenz nicht ausreichend ist für die Messungen. Beispielsweise sind die Zellbestandteile DNA und Lipide frei von intrinsischer Fluoreszenz. Deshalb sind sie für das Markieren mit extrinsischen Farbstoffen bevorzugt geeignet. Derivate von 7-Aminocumarinen sind weit verbreitet für das Markieren von Proteinen und Nukleinsäurekonjugaten¹¹.

1.1 Cumarin Derivate zur Markierung von AS und Peptiden

Im ersten Teilabschnitt dieser Arbeit wird auf die Einführung von 7-Aminocumarinen zum Markieren von Aminosäuren (AS) und Peptiden eingegangen, welche über eine Kupfer katalysierte Cycloaddition in hohen Ausbeuten durchgeführt werden kann¹². Dabei wird auf die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der verschiedenen Farbstoffe und deren Strukturunterschiede eingegangen. Nachteil dieser extrinsischen Farbstoffe ist ihre Toxizität gegenüber Zellen und Geweben. Auch müssen diese Farbstoffe zur Anfärbung von Zellkompartimenten erst noch in die Zelle eingebracht werden, was ebenfalls ein massives Eingreifen in den Metabolismus bedeutet. Für die Detektion ist auch die Photostabilität von Cumarinen ein problematischer Faktor, da diese Farbstoffklasse aus höher angeregten Zuständen in Bleichprozesse übergeht und die Fluoreszenzausbeute dadurch verringert wird und ein quantitatives Markieren nicht mehr möglich macht¹³.

1.2 Einführung einer nicht-photokonvertierbaren GFP Mutante

Ein Meilenstein in der Geschichte des Markierens von Zellkompartimenten stellt 1961 die Entdeckung des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP)¹⁴ aus der Qualle *Aequorea victoria* dar, da mit diesem Protein direkte Expression an das Zielprotein als Fusionsprotein möglich ist¹⁵. Fusionsproteine entstehen durch die gemeinsame Expression zweier Gene oder Gene-Teile. In der Biochemie werden diese künstlich erzeugten fluoreszierenden Fusionsproteine, die auch als Reporterproteine bezeichnet werden, für das Protein Engineering verwendet. Somit kann eine Überwachung des Zellmetabolismus stattfinden, ohne dass direkt in den Zellorganismus eingegriffen wird. Es muss eine genetische Veränderung vorgenommen werden, damit die Gensequenz in die genomische Information aufgenommen und exprimiert werden kann. Durch die Mutation dieses Reporterproteins können auch andere spektroskopische Eigenschaften wie unterschiedliche Fluoreszenzfarben erzielt werden. Beispiele dafür sind Blaue¹⁶, Cyane¹⁷, Gelbe¹⁸ oder Rot¹⁹ Fluoreszierende Proteine. Auch bei

der Verwendung von Fluoreszenzproteinen sind Nachteile bekannt. Beispielhaft seien hier das Photobleichen²⁰, die Photokonversion²¹, das Photoschalten²², Defizite in der Chromophorbildungseffizienz¹⁸ oder auch Schädigungen der Wirtszellen durch Überexpression des FP²³ genannt. Zur Behebung des Problems der Photokonversion, welche auf der Decarboxylierung²⁴⁻²⁷ der Glutaminsäure an der Stelle 222 im Grün fluoreszierenden Protein beruht, wird eine Mutante entwickelt, die nicht photokonvertieren kann. Dabei handelt es sich um eine Veränderung von Glutaminsäure zu Histidin an der Stelle 222.

In dieser Arbeit wird nachgewiesen, dass die Mutante E222H nicht zur Photokonversion befähigt ist. Des Weiteren wird die Mutante hinsichtlich ihrer anderen Fluoreszenzeigenschaften mit den gängigen GFPs und dessen Mutanten verglichen. Mit dieser Veränderung kann zumindest dem Problem der Photokonversion entgegengewirkt werden.

1.3 Chromophorbildungseffizienz der fluoreszierenden Proteine

Ein weiterer Nachteil der Fluoreszierenden Proteine liegt in der Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz (CFE). Dass es bei der Bestimmung der quantitativen Menge an Proteinen Differenzen gibt, zeigte bereits Ormö in der Einführung der Kristallstruktur des GFPs¹⁸, da nach seinen Aussagen in bis zu 30 % der Proteine keine Chromophorreifung stattfindet. Die Ursachen dafür liegen in der Ausbildung des Chromophors, da zuerst das Fass selbst und dann der Chromophor innerhalb des Fasses gebildet wird¹⁶. Diese Reifung dauert bis zu zwei Stunden. In dieser Arbeit wird ein Modellsystem vorgestellt, mit dem eine Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz im Küvettenexperiment möglich ist. Eine Anwendung *in vivo* erfordert neben einem nichttoxischen System auch die Notwendigkeit des Markierens innerhalb der Zelle, welches derzeit ein aktuelles Forschungsthema verschiedener Gruppen darstellt^{28,29,30}. Der in dieser Arbeit vorgestellte Ansatz beruht auf dem Markieren des Gelb Fluoreszierenden Proteins mit einem blauen Farbstoff, welcher allein nicht zur Fluoreszenz befähigt ist, sondern nur durch die kovalente Bindung an das Protein seine kovalente Doppelbindung aufbaut. Bei einer Kopplung kann FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) vom blauen Farbstoff auf den richtig gefalteten Chromophor stattfinden, und somit verringert sich die ursprünglich lange Lebensdauer des gekoppelten blauen Farbstoffs. Aus der Amplitude der kurzen Lebensdauer kann der Anteil an richtig gefaltetem Chromophor ermittelt werden.

1.4 Aptamere

Ein bereits erwähnter Nachteil ist die schwierige Übertragung des Modells der Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz auf *in vivo* Versuche. Ein möglicher Weg, dieses Problem zu lösen, ist der Einsatz von Aptameren³¹, welcher ebenfalls in dieser Arbeit beleuchtet wird. Die Idee ist das Einbringen von diesen kurzen fluoreszenzmarkierten Nukleotidsträngen³² durch die Zellmembran, da Aptamere um ein Vielfaches kleiner sind als Antikörper und somit einfacher von den Zellen aufgenommen werden. In der Zelle findet das Aptamer seine spezifische Bindungsstelle am Protein^{33,34}. Durch die Fluoreszenzmarkierung am Aptamer und in Verbindung mit dem fluoreszierenden Protein aus der Zelle ist ein erneuter Energietransfer möglich. Dieser Prozess kann durch bildgebende Versuche wie FLIM (Fluorescence lifetime Imaging Microscopy) dokumentiert und anschließend quantitativ ausgewertet werden. Es werden in dieser Arbeit verschiedene Sequenzen für verschiedene Targets am Protein ausgetestet. Eine große Applikationsmöglichkeit für Aptamere liegt im Bereich des drug delivery³⁵⁻³⁷.

2 Theorie

2.1 Absorption

Bei der Bestrahlung im sichtbaren Spektralbereich findet bei Molekülen mit einem Chromophor eine Ladungsverschiebung der Elektronen statt. Dabei gelangen sie vom Grundzustand in ein höheres Niveau. Dieser wellenlängenspezifische Vorgang wird durch das Gesetz von Lambert und Beer beschrieben, welcher die exponentielle Abnahme der Intensität des Lichtes durch die Probe beschreibt.

$$I = I_0 * 10^{-\varepsilon * c * d} \quad 1$$

Dabei bezeichnet I_0 die eingestrahelte Intensität des Lichtes auf die Probe, I die Intensität des Lichtes nach Probendurchgang, c die Konzentration des Chromophors, d die Weglänge der Probe sowie ε den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten. Meist wird ein Absorptionsspektrum abhängig von der Wellenlänge dargestellt, wofür die logarithmische Schreibweise des Lambert-Beerschen-Gesetzes zum Einsatz kommt.

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * d \quad 2$$

2.2 Fluoreszenz

Prozesse, die zwischen Absorption und Emission von Licht stattfinden, werden üblicherweise im Jablonski Diagramm dargestellt³⁸. Ein typisches Diagramm ist in folgender Abbildung 1 dargestellt, es gliedert sich in den Grundzustand S_0 , den ersten angeregten Zustand S_1 und ggf. in höhere angeregte Zustände S_n .

In jedem elektronischen Energiezustand können mehrere Schwingungsniveaus ($v=0, 1, 2, \dots$) existieren. Wegen der Boltzmann-Verteilung sind bei Raumtemperaturen nur Schwingungszustände $E \leq 25 \text{ meV}/200 \text{ cm}^{-1}$ besetzt. Somit beginnen die elektronischen / strahlenden Übergänge meistens aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes. Die vertikalen Übergänge zwischen zwei elektronischen Zuständen laufen in

Zeitspannen von rund 10^{-15} s ab. Im angeregten Zustand relaxiert das Molekül ebenso schnell wieder in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes aufgrund von Stößen mit Lösemittelmolekülen³⁹. Von dort aus findet letztlich wieder der Übergang zum Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustandes statt, welcher auf verschiedenen Wegen erfolgen kann. Strahlungslose Möglichkeiten sind die interne Konversion (IC) in den S_0 -Zustand (ohne Spinumkehr) oder das Inter System Crossing (ISC) in den Triplettzustand T_1 unter Verletzung der Auswahlregel $\Delta S = 0$. Aus diesem Zustand T_1 kann durch Phosphoreszenz das Molekül unter Spinumkehr in den Singulettzustand zurückgelangen. Der strahlende Übergang vom promovierten in den elektronischen Grundzustand wird Fluoreszenz genannt, welches dem Franck-Condon-Prinzip folgt. Dabei wird elektromagnetische Strahlung emittiert.

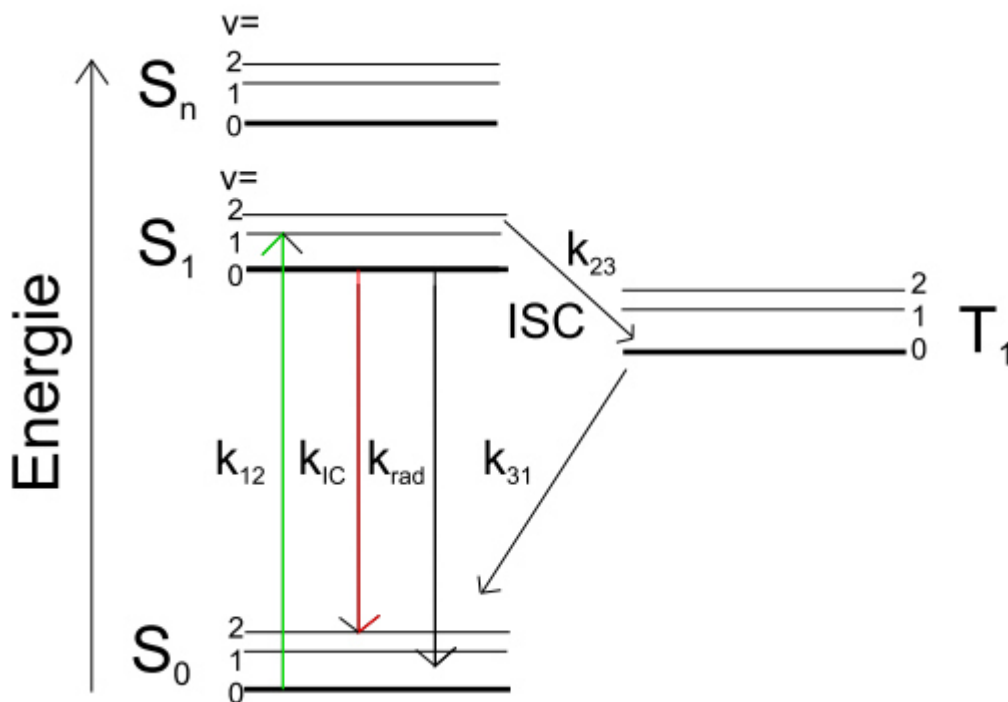


Abbildung 1: Jablonski Diagramm, S-Singulettzustände, T-Triplettzustand, k-Ratenkonstanten, k_{12} -Anregung, k_{rad} -Fluoreszenzrate, k_{IC} -interne Konversion (strahlungslos), k_{23} -InterSystemCrossing Rate (spinverboten) und k_{31} -Triplettdepopulationsrate.

Die Form des Emissionsspektrums ist häufig spiegelbildlich im Vergleich zum Absorptionsspektrum (Vgl. Abb. 2), wenn der Grund- und angeregte Zustand dieselbe Schwingungsfeinstruktur (gleiche Verteilung der Schwingungszustände in den einzelnen

elektronischen Zuständen) besitzen. Die Intensitäten der Schultern der Absorptions- und Emissionsspektren sind gemäß den Franck-Condon-Faktoren moduliert.

Um den Anteil der Fluoreszenz im Vergleich zur Anzahl der absorbierten Photonen zu ermitteln, muss die Fluoreszenzratenkonstante (k_{rad}) ins Verhältnis zur Gesamtratenkonstante (k_{fl}) von IC (k_{IC}), ISC (k_{23}) und Fluoreszenz (k_{rad}) gesetzt werden. Der relative Anteil wird als Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_{fl}) bezeichnet.

$$\Phi_{fl} = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{IC} + k_{23}} \quad 3$$

2.3 Stokes Verschiebung

Aus dem Jablonski Diagramm (Abb.1) ist ersichtlich, dass die Energie der Emission typischerweise geringer ist als die der Absorption. Fluoreszenz erscheint somit bei geringerer Energie und höheren Wellenlängen (Vgl. Abbildung1). Die Länge des grünen Pfeils ist größer als die Länge des roten Pfeils. Somit ist die Übergangsenergie für die Absorption (grüner Pfeil) größer als der Energiebetrag der Emission (roter Pfeil). Dieses Phänomen wurde erstmals von Sir G. Stokes in 1852 beschrieben⁴⁰. Es basiert auf den Wechselwirkungen des Chromophors mit dem umgebenden polaren Lösemittel. Der Grund- und der angeregte Zustand besitzen jeweils ein unterschiedliches Dipolmoment und wechselwirken somit verschieden mit dem Lösemittel. Im Grundzustand richten sich die polaren Lösemittelmoleküle antiparallel zum permanenten Chromophordipolmoment aus. Wird dieser jedoch angeregt, wie es bei der Absorption von Licht der Fall ist, kann sich das elektrische Dipolmoment in der Stärke, aber vor allem in der Orientierung ändern. Die Lösungsmittelmoleküle in der Umgebung des Chromophors müssen sich erneut antiparallel zum Chromophor ausbilden. Dies erfordert 10^{-10} s, weniger Zeit als die Fluoreszenz (10^{-8} s). Infolgedessen liegen die $0 \rightarrow 0$ Übergänge für Absorption und Fluoreszenz auf der Wellenlängen/Energieachse nicht übereinander. Jedoch ist dieser Effekt besonders in polaren Lösemitteln ausgeprägt, in unpolaren Lösemitteln ist kaum oder gar keine Verschiebung erkennbar, Beispiele dafür sind hochviskose Medien wie Gläser⁴¹. Zusammenfassend lässt sich erwarten, dass je größer die Polarität des Lösemittels ist, desto größer ist die Rotverschiebung der Fluoreszenzspektren (Vgl. Abb.2). Dies wird häufig experimentell beobachtet.

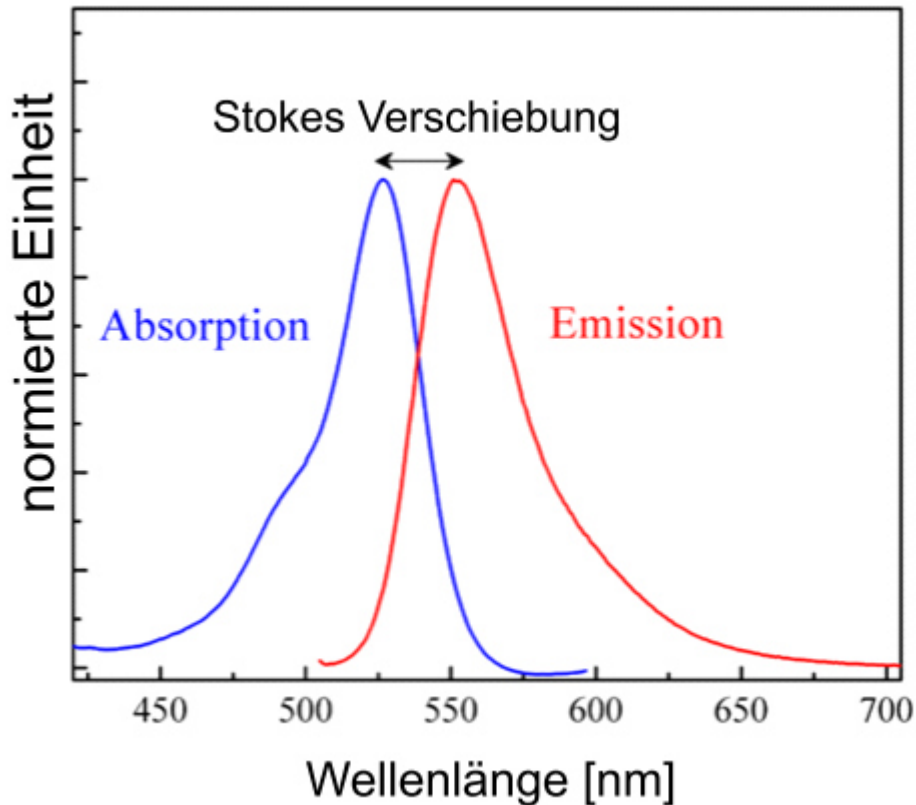


Abbildung 2: Darstellung der Stokes Verschiebung am Beispiel von Rhodamin 6G.

2.4 Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)

Neben den bereits beschriebenen möglichen Prozessen aus dem Jablonski Diagramm (Abb. 1) kann ein weiterer Prozess im angeregten Zustand stattfinden, der Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) (Abb.3). Dieses Phänomen tritt auf, wenn das Emissionsspektrum eines Fluorophors, der sogenannte Donor, mit dem Absorptionsspektrum eines anderen Moleküls, dem Akzeptor, überlappt⁴². Dabei ist zu beachten, dass der Akzeptor nicht fluoreszierend sein muss. Außerdem sollte das Emissionslicht des Donors nicht involviert sein. Abhängig ist dieser Prozess von der Konzentration des Akzeptors, des Überlappungsintegrals sowie der Distanz zwischen Donor und Akzeptor. Dieser strahlungsfreie Energietransfer findet aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen statt und kann formal in folgender Reaktionsgleichung dargestellt werden:



4

Dabei stellt k_{FRET} die Ratenkonstante des Energietransfers dar. Zur Bestimmung des Überlappungsintegrals J wird folgende Gleichung verwendet:

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad 5$$

Dabei ist $F_D(\lambda)$ das auf die Fläche normierte Emissionsspektrum des Donors. Die Akzeptorkonzentration wird durch $\varepsilon_A(\lambda)$ dargestellt. Der Energietransfer hängt vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab. Deshalb wird die Energietransferrate auch als spektroskopisches Lineal zwischen Fluoreszierenden Proteinen eingesetzt⁴³. Die Berechnung wird folgendermaßen mathematisch durchgeführt:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad 6$$

Mit der Fluoreszenzlebensdauer des Donors τ_D , dem Förster Radius R_0 und dem Abstand r zwischen Donor und Akzeptor kann die Ratenkonstante des Energietransfers bestimmt werden.

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln(10) Q_D \kappa^2}{128 \pi^5 n^4 N_A} J(\lambda) \quad 7$$

Dabei ist der Försterradius als Abstand zwischen Donor (Q_D dessen Quantenausbeute) und Akzeptor definiert, bei dem die Effizienz der Energieübertragung 50 % beträgt. Weitere Parameter sind κ der Orientierungsfaktor, n der Brechungsindex und N_A die Avogadro-Konstante. Der Försterradius liegt im Bereich von 1-10 nm, bei größeren Abständen findet kein Energietransfer statt. (Vgl. Abb. 3)

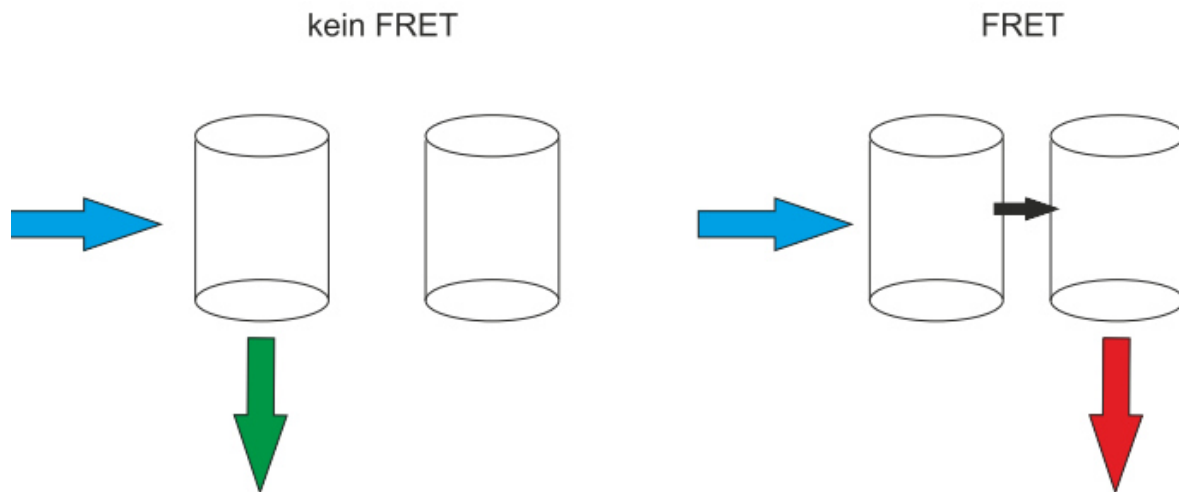


Abbildung 3: Abbildung zweier Moleküle, im linken Teil erfolgt kein Energietransfer aufgrund eines zu hohen Abstandes, im rechten Teil erfolgt bei nur minimal geringem Abstand der Energietransfer.

2.5 Anisotropie

In der Literatur werden Anisotropie und Polarisation oft gleichgesetzt, zwischen beiden Begriffen besteht jedoch ein Berechnungsunterschied, wobei beide Größen mathematisch ineinander überführbar sind. Allgemein ist zu sagen, dass eine Anisotropiemessung zur Winkelmessung zwischen Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment eingesetzt wird⁴⁴.

Bei Bestrahlung einer Fluoreszenzprobe mit polarisiertem Licht wird der Grad der Polarisation des Emissionslichtes als Anisotropie bezeichnet. Diese Messmethode ist eine der am weitest verbreiteten Messtechniken, um die Rotationsbeweglichkeit von Fluorophoren, ihre Orientierung und die Viskosität in ihrer Umgebung zu studieren⁴⁵. Begründet ist diese Messung auf den Übergangsmomenten der Absorption und Emission, welche in spezifischer Orientierung zum Molekül existieren. Bei einer Anregung werden Moleküle mit polarisiertem Licht bevorzugt angeregt, da dessen Übergangsmoment der Absorption entlang der Achse des polarisierten Lichtes liegt. Dadurch kann erreicht werden, dass der überwiegende Teil der Moleküle im ersten angeregten Zustand orientiert vorliegt und die Emission daraus resultierend gerichtet aus einer Orientierung der Moleküle abläuft. Für die Bestimmung der Anisotropie wird eine Probe mit polarisiertem Licht bestrahlt und die Polarisation der Emission der Probe parallel bzw. senkrecht zum anregenden Licht gemessen. Aus dem Unterschied der beiden Intensitäten im Vergleich zur Gesamtemission wird die Anisotropie errechnet:⁴⁶

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad 8$$

Dabei bezeichnet I_{\parallel} die Intensität der Emission, welche parallel zur Polarisation des einfallenden Lichtes gemessen wird und I_{\perp} , die senkrecht dazu gemessen wird. Mathematisch wird dabei eine kleine Differenz durch eine große Summe geteilt, welcher der Hintergrund für lange Messzeiten bei zeitaufgelösten Messungen ist (Vgl. Gleichung 8). Die Polarisation P wird folgendermaßen berechnet:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad 9$$

Die Gesamtintensität wird hier direkt als Summe der beiden Komponenten definiert, der Zusammenhang zwischen Anisotropie r und Polarisation P wird mathematisch so dargestellt:

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad 10$$

Die Wertebereiche für Anisotropie liegen zwischen -0,2 und 0,4 und die für die Polarisation zwischen -0,33 und 0,5 für Einzelphotonenanregung. Je größer der Wert für Anisotropie oder Polarisation, je geringer ist die Umorientierung des Moleküls nach der Anregung. Das bedeutet, der Wert liegt in hochviskosen Lösungen bei nahezu 0,4, da kaum eine Umorientierung nach der Anregung stattfindet. Bei der Anisotropie werden die stationäre und die zeitaufgelöste unterschieden. Die zeitaufgelöste Anisotropie kann die Größe und die Form des Fluorophors spezifischer und zeitaufgelöst untersuchen.⁴⁴

Im hier vorliegenden Fall wird jedoch nur auf die stationäre Anisotropie eingegangen, da allein diese verwendet wird. Hierbei wird die Anisotropie als zeitlicher Mittelwert angegeben. Für eine Messung der stationären Anisotropie sind vier Messungen notwendig. Zuerst wird der Gerätefaktor G mit zwei horizontalen Anregungen bestimmt.

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

11

Dabei bezeichnet I_{HV} die Intensität, die bei horizontaler Anregung und darauf senkrechter Ebene gemessen wird und I_{HH} die Intensität, die bei horizontaler Anregung auf horizontaler Ebene gemessen wird⁴⁴. Bei dieser Messung wird die unterschiedliche Durchlässigkeit der Polarisatoren und der Monochromatoren ermittelt. Nun erfolgt die eigentliche Messung der Anisotropie bei vertikaler Anregung. Demnach berechnet sich die Anisotropie unter Einbeziehung des Gerätefaktors wie folgt⁴⁴:

$$r = \frac{I_{VV} - G * I_{VH}}{I_{VV} + 2 * G * I_{VH}}$$

12

Bespielhaft wird hier die stationäre Anisotropiezunahme des Wirkstoffes (hier Idarubicin) gezeigt, wenn dieser immer stärker im Nanopartikel (hier Cyclodextrin) gebunden ist. Dabei ist zu beobachten, dass bei einer hohen Cyclodextrinkonzentration der gesamte Wirkstoff im Nanopartikel gebunden ist, die Anisotropie dementsprechend gegen 0,15 geht. Hier ist jedoch nur der Verlauf bis 0,12 gezeigt. Die Wirkstoffkonzentration ist konstant geblieben, lediglich die Konzentration an Nanopartikel (Cyclodextrin) ist variiert worden⁴⁷.

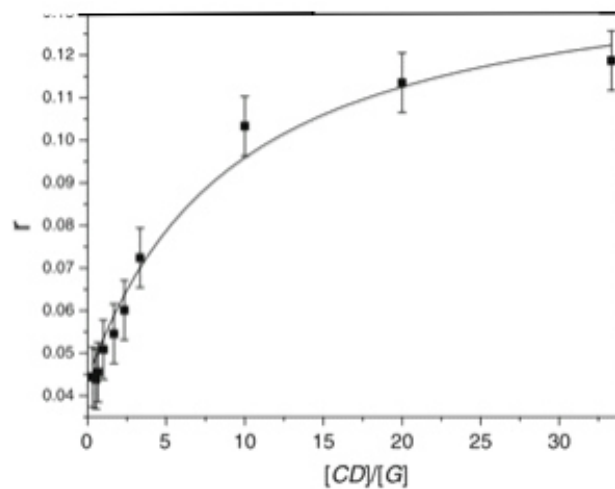


Abbildung 4: Fluoreszenzanisotropie des Idarubicin (IDA) als Funktion der CD Konzentration, in Wasser bei 25 °C. Die IDA Konzentration ist gleichbleibend für alle Messungen⁴⁷.

Die Bindungskonstante aus Abb. 4 ergibt ein K von $9,739 \text{ M}^{-1}$.

2.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

2.6.1 Allgemeines Prinzip

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine Methode, die auf der Betrachtung von einzelnen oder mehreren Molekülen in Lösung basiert. Dabei diffundieren die beobachteten Moleküle kontinuierlich in das Beobachtungsvolumen. Es gibt auch die Möglichkeit, an immobilisierten Proben zu arbeiten, das wäre die TIRF/FCS Variante⁴⁸, auf die hier nicht weiter eingegangen wird. FCS erlaubt eine kontinuierliche Detektion über längere Zeiträume und ist nicht auf die spezifische Selektion einzelner Moleküle angewiesen⁴⁹. Die FCS basiert auf einer zeitabhängigen Analyse der Intensitätsfluktuationen, welche das Ergebnis von dynamischen Prozessen darstellt⁵⁰. Wenn viele Teilchen (Teilchenanzahl N) im Fokus sind, wird ein hohes Fluoreszenzsignal erhalten, da Konzentration und Signalstärke proportional sind. Eine Analyse einzelner Moleküle ist in der FCS möglich. Die relativen Fluktuationsschwankungen sind proportional zu $N^{-1/2}$ ⁵¹, wie es in folgender Abbildung 5 verdeutlicht wird.

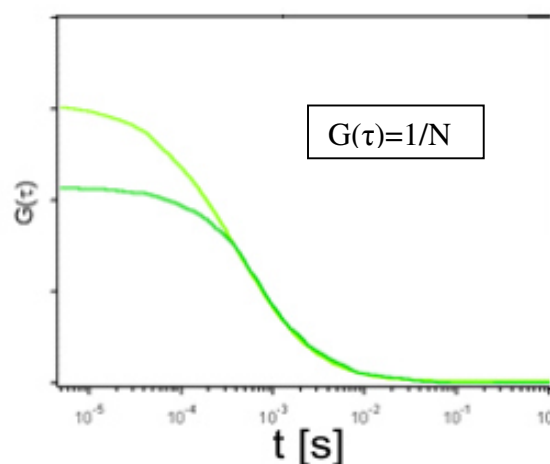


Abbildung 5: schematische FCS Kurven von zwei Proben mit unterschiedlich vielen Teilchen im Fokus (hellgrün: wenig Teilchen, dunkelgrün: viele Teilchen). Vergleich der beiden Kurven wäre durch die Normierung auf N möglich.

In der FCS werden typischerweise nanomolare Konzentrationen verwendet, somit ist die

Signalstärke sowie das damit verbundene Signal zu Rauschen Verhältnis ebenfalls limitiert. Des Weiteren ist eine Abhängigkeit vom Emitter ebenfalls gegeben. Die Untergrundstreuung resultiert aus Lösemittelmolekülen, welche zahlenmäßig den Probemolekülen weit überlegen sind. Infolgedessen müssen die fluoreszierenden Moleküle ein sehr starkes Signal aussenden, um sie detektieren zu können. Durch Anwendung des konfokalen Prinzips konnte das starke Signal zu Untergrund Verhältnis durch die Minimierung des Beobachtungsvolumens deutlich verbessert werden⁵². Artefakte in der Messung können durch ein zu starkes Signal zu Untergrund-Verhältnis hervorgerufen werden. Das würde zu einer falschen Korrelationsfunktion führen, da die Amplitude verringert ist und daraus resultierend auch die experimentelle Teilchenzahl. Somit würde die Teilchenanzahl, welche sich im Beobachtungsvolumen befindet, als scheinbar höher gesehen werden⁵³⁻⁵⁵. Die Fluoreszenzphotonen werden abhängig vom Anregungszeitpunkt im Beobachtungsvolumen detektiert, somit können sowohl Diffusionskonstanten als auch Ratenkonstanten für photophysikalische und chemische Reaktionen im Gleichgewicht bestimmt werden^{54,56}.

2.6.2 Konfokales Prinzip

Das Konfokalmikroskop wurde von Marvin Minsky im Jahre 1955 entwickelt⁵⁷. Dabei bedeutet das Wort konfokal, dass sowohl der Beleuchtungspunkt im Präparat, also die Gegenstandsebene wie auch der Punkt in der Mitte der Lochblende konfokal zu einander sind, gleichzeitig im Fokus. Dies ist in folgender Abbildung 6 in der Mitte ersichtlich.

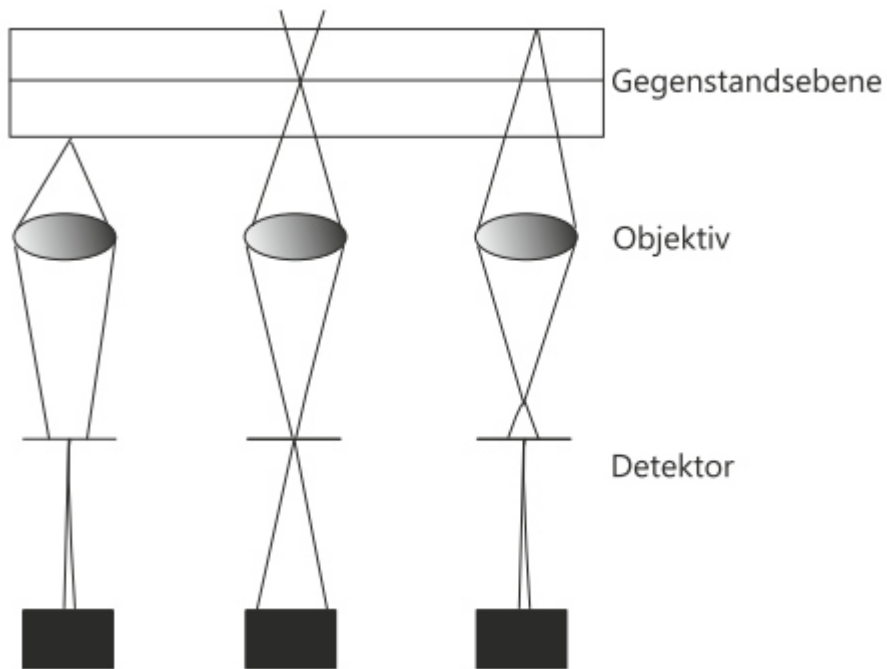


Abbildung 6: Verwendung des konfokalen Prinzips in Kombination mit einer Lochblende.

Durch dieses Herausschneiden von unscharfen Bereichen durch die Lochblende werden optische Informationen, die nicht aus der Fokalebene stammen (in Abbildung 6 das Bild links und rechts) abgetrennt. Daraus ist auch ersichtlich, wie wichtig die genaue Fokussierung des Laserstrahls in die Gegenstandsebene ist, wie es folgende Abbildung 7 zeigt.

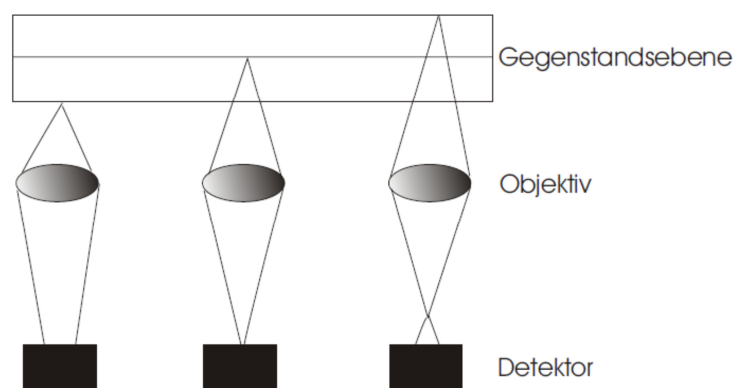


Abbildung 7: Auswirkung der Position des Flächendetektors in Bezug zur Abbildungsschärfe.

Dabei kann nur beim mittleren Aufbau in Abb. 7 ein scharfes Bild auf dem Detektor (Flächendetektor wie eine CCD-Kamera) abgebildet werden. Bei den beiden äußeren Abbildungen werden auch Bereiche außerhalb des Fokus auf dem Detektor abgebildet, welche das eigentlich interessante und scharfe Objekt überdecken.

Bei Verbindung des konfokalen Prinzips mit der richtigen Position des Flächendetektors kann ein definiertes Beobachtungsvolumen betrachtet werden. Dieses hängt von der Form sowie von der Fokussierung des Laserstrahls ab. Auch spielt die Beschaffenheit der Lochblende (Größe und Position) eine Rolle. Weitere Faktoren, die das genaue Abbilden des Fluoreszenzsignals einzelner Moleküle beeinflussen, sind die Geometrie des Laserstrahldurchmessers, der Wellenlänge des Lasers, der Brechungsindex des verwendeten Mediums, der Brennweite des Mikroskops, die Verteilung der Intensität des Laserstrahls sowie die Emissionscharakteristik des Fluorophors und die Detektionseffizienz der Detektoren.

2.6.3 Korrelationsanalyse

Die Auswertung der Fluoreszenzkorrelationsdaten erfolgt über eine Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$, wie sie hier in Abb. 8 abgebildet ist.

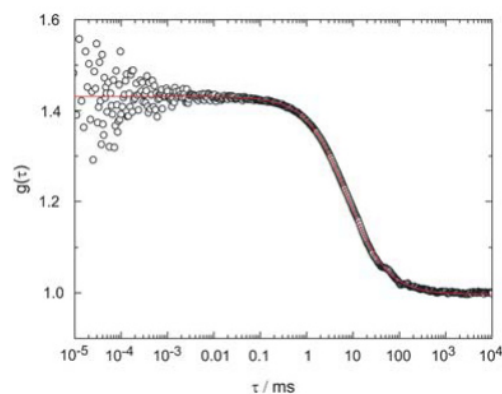


Abbildung 8: FCS Kurve der Nanopartikel mit Dihydroxyanthraquinon, die ermittelte Diffusionszeit aus der Fitkurve (rot) der Korrelationsfunktion (schwarze offene Punkte) ergibt eine τ_{diff} von $7,4 \text{ ms}^{58}$.

Für die schematische Darstellung einer Autokorrelationsfunktion ist der Wirkstoff Dihydroxyanthrachinon (DHA) ausgewählt. Dieser ist sehr stabil und leicht verfügbar, er ist

ungiftig und sehr sensitiv gegenüber UV-Vis Absorption und Fluoreszenz. Für den späteren Transport in die Zelle wird er jedoch in einem Nanopartikel gebunden. Und für die Bestimmung der Größe dieser Nanopartikel werden FCS Kurven aufgenommen. Die Größe der Nanopartikel ist entscheidend für die Möglichkeit der Membrangängigkeit der Zelle. Die gezeigte Autokorrelationskurve in Abb. 8 ist bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 590/70 nm aufgenommen. Der hydrodynamische Radius wird durch die FCS Kurven ermittelt, indem das Grün Fluoreszierende Protein als Referenz verwendet wird^{59,60}.

Die ermittelte Diffusionszeit von ~7,4 ms und der daraus resultierende hydrodynamische Durchmesser des Nanopartikel-Wirkstoff-Komplexes von 140 nm ± 30 nm entspricht den Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS).

Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ beschreibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals zu verschiedenen Zeiten t und $t+\tau$. Die Fluktuationen $\delta F(t)$ werden zu einem bestimmten Zeitpunkt t , mit den Fluktuationen des Zeitpunktes $t+\tau$ multipliziert und dann normiert⁶¹:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) * \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad 13$$

Im Zeitbereich von Mikro- und Millisekunden ist ein Abfall des Autokorrelationssignals zu beobachten, welcher Aufschluss über die gemittelte Diffusionszeit τ_{diff} gibt. Dies beschreibt die Zeit der fluoreszierenden Teilchen (Abb. 9), die sie im Durchschnitt durch das Beobachtungsvolumen diffundieren.

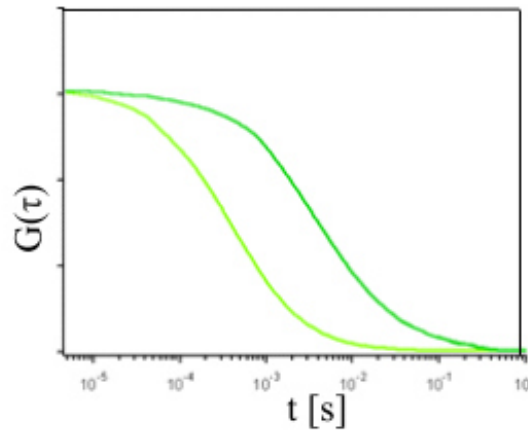


Abbildung 9: Schematische FCS Kurve von zwei unterschiedlich großen Molekülen (hellgrün: kleiner hydrodynamischer Durchmesser, kürzere Diffusionszeit und somit größerer Diffusionskoeffizient; dunkelgrün: großer hydrodynamischer Durchmesser, längere Diffusionszeit und somit kleinerer Diffusionskoeffizient).

Die bestimmte Diffusionszeit τ_{diff} hängt vom Radius des Beobachtungsvolumens r_0 und dem Diffusionskoeffizienten D ab (Gleichung 14).

$$\tau_{diff} = \frac{r_0^2}{4D} \quad 14$$

Außerdem stellt die Stokes-Einstein-Relation⁶²

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad 15$$

einen Zusammenhang zwischen dem hydrodynamischen Radius und dem Diffusionskoeffizienten her (Gleichung 14). Weitere Parameter sind die Viskosität der Lösung η , die Boltzmannkonstante k_B und die Temperatur.

Im Zeitbereich von Nano- und Mikrosekunden hingegen kann sich ein weiterer kleiner Abfall des Korrelationssignals zeigen. Dieser kann für eine Triplettkinetik sowie eine Cis-trans-Isomerisierung des Moleküls stehen⁶³. Dabei geht das zu untersuchende Molekül während der Beobachtungszeit im Beobachtungsvolumen in einen nicht mehr fluoreszierenden Zustand.

Dadurch wird fälschlicherweise eine geringere Teilchenanzahl N angenommen. Da nun wiederum der y-Achsenabschnitt indirekt proportional zu N ist, erscheint die interne Kinetik als weitere Erhöhung des Korrelationssignals.

Für die Bestimmung der Diffusionszeit sowie der internen Dynamik wird das 2D-Model⁵² verwendet, welches wie folgt (Gleichung 16) als Fitfunktion eingesetzt wird.

$$g(\tau) = \frac{1}{N} * \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff(0)}}} \right) * \left(1 + \frac{k_{23}}{k_{31}} \exp(-(k_{23} + k_{31})\tau) \right) \quad 16$$

Die Ratenkonstanten k_{23} und k_{31} charakterisieren die Konstanten für die internen Fluktuationen im Chromophor, wie aus dem Jablonski Diagramm (Abb.1) ersichtlich⁶⁴ ist.

Des Weiteren wird das Verhältnis der Ratenkonstanten k_{23}/k_{31} als Kontrast C bezeichnet, der Amplitude des schnellen Abfalls auf der Mikrosekunden Zeitskala. Die dazugehörige Kinetik kann durch FCS bestimmt werden, jedoch mit einigen Abhängigkeiten. Zum Beispiel ist die Chromophorprotonierung durch Veränderungen in der schnellen Kinetik durch pH Veränderungen gekennzeichnet⁶⁵, wobei intensitätsabhängige Veränderungen der Zerfallskonstante ein Hinweis auf Cis-trans-Isomerisierungen oder Tripletpopulationen sind, was beispielhaft in GFP gezeigt ist²⁰. Eine intensitätsabhängige Reduktion der Diffusionszeit τ_{diff} ist ein Zeichen von Photobleichen²⁰. Außerdem können weitere Informationen bezüglich der internen Dynamik aus dem Kontrast C gewonnen werden^{64,66}. Ein intensitätsabhängiger Kontrast C mit einer Sättigung nur bei Intensitäten über MW/cm^2 ist eine Kennzeichnung des InterSystemCrossing, wobei ein intensitätsunabhängiger Kontrast im Gleichgewicht von Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen zu finden ist. Mit dem Kontrast C kann auch der Anteil heller Moleküle $[B]$ bestimmt werden.

$$[B] = \frac{1}{1+C} \quad 17$$

Beispielhaft ist hier (Abb.10) eine FCS Autokorrelationskurve gezeigt, bei der durch einen Fit mit zwei Molekülen auch zwei unterschiedliche Diffusionszeiten dargestellt werden können. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch, dass aus siRNA (mit Cy3 markiert) und einem

Polymer (mit Atto647 markiert) besteht. Die siRNA kann an das Polymer binden und somit seinen hydrodynamischen Radius vergrößern. Liegt es ungebunden vor, wird als hydrodynamischer Durchmesser nur das RNA Stück detektiert. Das Gemisch wird mit 546 nm angeregt, dabei wird das Cy3 angeregt. Emission wird bei 590/70 nm detektiert. Dadurch ist sichergestellt, dass Atto647 (Anregungsmaximum liegt bei 647 nm) nicht detektiert wird.

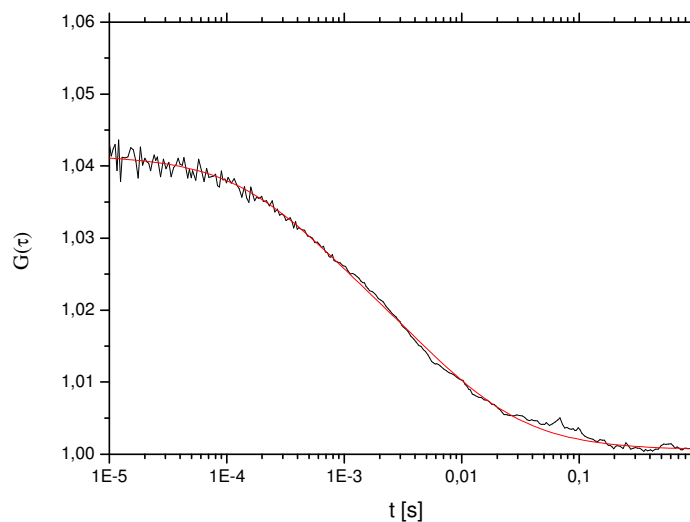


Abbildung 10: FCS Kurve bei $\lambda_{\text{Anr}} = 546 \text{ nm}$ und einem Emissionsfilter bei 590/70 nm, Probe ist das siRNA (mit Cy3)-Polymer(mit Atto647) Gemisch. Die ermittelten Diffusionszeiten betragen $514 \mu\text{s} (\pm 46 \mu\text{s})$ und $7,1 \text{ ms} (\pm 0,52 \text{ ms})$.

Damit kann gezeigt werden, dass eine Kollokalisierung der siRNA mit dem Polymer vorliegt, da die längere Diffusionszeit von $\sim 7 \text{ ms}$ der Größe des Polymers entspricht. Dafür ist die siRNA mit dem Polymer verbunden. Als Größenvergleich für die Durchmesser wird Fluoreszein verwendet mit einem Durchmesser von $1,6 \text{ nm}$ ⁶⁷. Somit entspricht die längere Diffusionszeit einem Durchmesser von $140 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$. Diese Werte stimmen auch mit den Messungen des Zetasizers überein⁶⁸. Die kürzere Diffusionszeit von $\sim 500 \mu\text{s}$ entspricht der frei vorliegenden siRNA und einem Durchmesser von $10 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$.

2.7 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC)

Das TCSPC steht für das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (englisch: time-correlated single photon counting)⁶⁹. Bei dieser Messmethode wird ein zeitabhängiges Intensitätsprofil nach einem Laseranregungspuls aufgenommen. Dadurch kann die Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} eines Farbstoffes bestimmt werden⁷⁰. Bei der Anregung des Farbstoffes erfolgt eine Anhebung von N_0 Molekülen vom elektronischen Grundzustand in den ersten angeregten elektronischen Zustand. Die Depopulation dieses Zustandes erfolgt analog zum radioaktiven Zerfall, dem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung folgend. Im Fluoreszenzexperiment wird jedoch nicht die Anzahl der angeregten Moleküle beobachtet, sondern die Intensität, welche proportional zur Anzahl N_0 ist. Somit wird folgende Gleichung 18 für die Beschreibung eines einfachen exponentiellen Abfalls erhalten:

$$I(t) = I_0 * e^{-\frac{t}{\tau}} \quad 18$$

Dabei beschreibt I_0 die Intensität zum Zeitpunkt $t=0$, $I(t)$ die zeitabhängige Intensität und τ die Lebenszeit. Der Kehrwert der Lebenszeit τ ist die Summe aller Raten, die den angeregten Zustand depopulieren (Vgl. Abb. 1). Für die Auswertung wird eine Vielzahl an Ereignissen in ein Histogramm eingetragen, bei dem die Anzahl der Photonen über der Ankunftszeit ermittelt wird. Durch Logarithmieren der Gleichung 18 wird ein linearer Zusammenhang zwischen Ankunftszeit t und der Fluoreszenzintensität I erhalten⁴⁴:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I(t)}\right) = \frac{t}{\tau} \quad 19$$

Somit ist zusammenzufassen, dass die Lebensdauer die Zeit beschreibt, welche ein Molekül durchschnittlich im angeregten Zustand verbringt.

Es gibt jedoch auch Artefakte, die diese Messung beeinflussen. Ein Beispiel ist das „Pile-up“, dadurch erscheint die Lebensdauer kürzer als sie in Wahrheit ist⁷¹. Dieses Ergebnis beruht auf dem Effekt, wenn zwei Photonen innerhalb eines Messzeitintervalls auf den Detektor treffen. Eine Vermeidung des Artefakts ist durch eine Zählrate kleiner als ein Prozent der

Anregungsfrequenz möglich. Dann tritt das Pile-up nicht mehr auf⁷².

Ein weiteres Phänomen, welches die Lebensdauer messung stören kann, ist die Reabsorption. Es wird beobachtet, wenn sich das Absorptions- und das Emissionsspektrum einer Probe überlappen. Dabei kommt es zur Anregung von Molekülen durch das emittierte Licht der Moleküle, die sich bereits im angeregten Zustand befinden. Dadurch verkürzt sich die beobachtete Lebensdauer gegenüber der tatsächlichen⁷³ bei der Messung im reverse TCSPC. Häufig tritt dieses Artefakt bei zu hohen Probekonzentrationen auf.

Wie bei der Messung der Anisotropie, gibt es auch bei der Messung des TCSPC einen Gerätefaktor, welcher als instrumentelle Antwortfunktion (IRF) in die genaue Bestimmung des wirklichen Fluoreszenzzerfalls der Probe mit eingeht. Der gemessene Zerfall beinhaltet zum einen die Faltung der IRF und zum anderen die tatsächliche Fluoreszenzfunktion. Mathematisch sind diese Größen wie folgt voneinander abhängig:

$$S(t) = \int_0^{\infty} E(t') * R(t - t') dt' \quad 20$$

Dabei entspricht $S(t)$ der Messung, $E(t')$ der IRF und $R(t-t')$ dem theoretischen Zerfall. Für eine verlässliche Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer müssten die Daten entfaltet werden.

2.8 GFP und dessen Struktur

Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) wurde von Shimomura 1962 erstmals beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliertes Protein, welches bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert⁷⁴.

Der Wildtyp dieses Proteins besteht aus 238 Aminosäuren, welche sich in einer Faltstruktur mit 11 β Faltblättern und einer entlang der Achse verlaufenden α Helix^{18,75} anordnet (Vgl. Abb. 11). Die Masse beträgt 26,9 kDa⁷⁶. Die erste Kristallisation erfolgt 1974⁷⁷, gefolgt von der Strukturaufklärung des Chromophors 1979⁷⁸ bis hin zur ersten Expression des GFP in *E. coli* und *C. elegans* 1994⁷⁹ und der ersten Kristallstruktur 1996^{18,75}.



Abbildung 11: Biologische Struktur vom GFP, PDB Eintrag 2WUR. Proteinkette ist farblich vom N-Terminus zum C-Terminus in Spektralfarben dargestellt⁸⁰.

Der Chromophor befindet sich innerhalb des Fasses, er besteht aus den drei Aminosäuren Serin65, Tyrosin66 und Glycin67¹⁷. Die Ausmaße des GFPs werden mit 4,2 nm*2,4 nm angegeben⁷⁵. Der hydrodynamische Durchmesser liegt bei 2,82 nm⁵⁹.

Das GFP ist der erste Repräsentant einer großen Vielzahl von Fluoreszenzproteinen wie das Cyan Fluoreszierende Protein (eCFP), das Gelb Fluoreszierende Protein (eYFP), das Rot Fluoreszierende Protein (dsRed) und andere^{19,81-85}. All diese Varianten zeigen vier essentielle und stark konservierte Aminosäuren. Dazu gehören Tyrosin66 und Glycin67 des Tripeptids des Chromophors sowie Arginin96 und Glutaminsäure222^{22,82,86-88}. Dabei ist zu bemerken, dass Tyrosin66 durch andere aromatische Aminosäuren getauscht werden kann, um CFP und BFP zu erhalten^{16,17}, ein Austausch von Glycin67 jedoch nicht zur Bildung des Chromophors führt⁸⁹. Für die Zyklisierungsreaktion bei Chromophorbildung ist die Aminosäure Arginin96 ein elektrostatischer Katalysator und bei Veränderung dieser Aminosäure (außer Lysin) ist der Reifungsprozess dramatisch verlangsamt^{86,90}. Der Glutaminsäure222 ist ebenso eine Schlüsselrolle in der Chromophorbildung zuzuschreiben^{88,91}, da diese genauso eine bedeutende Rolle als Katalysator spielt^{86,92}.

2.9 Photokonversion

Die Photokonversion (PC) ist ein irreversibler Prozess, bei dem die Säuregruppe der Glutaminsäure der Position 222 abgespalten wird. Die Phototransformation erfolgt durch die Bestrahlung mit Licht und ihre Effizienz bzw. Quantenausbeute ist wellenlängenabhängig²⁴⁻²⁷. Diese Aminosäure Glutaminsäure besitzt wie bereits erwähnt einen notwendigen Aminosäurerest in der Chromophorbildung^{88,91} und spielt eine wichtige Rolle in der Katalyse des Chromophors^{86,92}. Auch in anderen Fluoreszenzproteinen wurden gleiche Aminosäuren gefunden, bei denen die Funktion nahezu erhalten geblieben ist^{22,93,94}. Zum Beispiel im Rot Fluoreszierenden Protein (RFP) konnte an Stelle 215⁹⁵ eine katalytisch aktive Glutaminsäure nachgewiesen werden sowie in Dronpa an Stelle 212⁹⁶. Durch Photoaktivierung (PA) hingegen wird das Gleichgewicht von der neutralen zur anionischen Form verschoben⁹⁷. Dieser Prozess beruht ebenso wie die PC auf der Decarboxylierung von E222 im neutralen Chromophorzustand wohingegen die PC durch die Anregung des anionischen Chromophors erfolgen kann. Die Photoaktivierung von wt-GFP äußert sich demnach durch die Verschiebung des Gleichgewichtes von der neutralen RH-Form zur anionischen R⁻ Form⁹⁸.

2.10 Chromophorbildung und Chromophorbildungseffizienz

Der Chromophor ist in die entlang der Achse verlaufenden α Helix eingebettet. Die drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin bilden durch posttranslationale Zyklisierung das Konstrukt 4-(p-Hydroxybenzyliden) -imidazolinon. Für die Ausbildung eines fluoreszenzfähigen Fluorophors werden keine quallenspezifischen Enzyme⁷⁹ benötigt. Jedoch ist exogener Sauerstoff notwendig für die anschließende Oxidationsreaktion (Vgl. Abb. 12), da ansonsten kein fluoreszenzfähiger Chromophor ausgebildet wird^{17,99}.

Für die Ausbildung des Chromophors sind drei Schritte notwendig, die autokatalytisch posttranslational stattfinden, die Zyklisierung, die Wasserabspaltung sowie die Oxidation⁸⁹. Nach der Faltung der Faserstruktur ist die geometrische Voraussetzung für die Zyklisierung gegeben, das heißt es kann ein nukleophiler Angriff des Amids von Glycin67 an die Carbonylgruppe von Serin65 erfolgen. Danach schließt sich die Wasserabspaltung an, wobei zu diesem Zeitpunkt noch kein fluoreszenzfähiger Chromophor ausgebildet ist¹⁷. Durch eine anschließende Oxidation kann ein Fluorophor entstehen¹⁰⁰, da die α - β -Bindung des Restes an der Position 66 dehydrogeniert wird, so dass eine Konjugation mit dem Imidazolinon möglich ist. Andere kinetische und massenspektrometrische Untersuchungen gehen von einer

Zyklisierung mit anschließender Oxidation aus. Die Wasserabspaltung wäre in diesem Mechanismus der letzte Schritt^{81,101}.

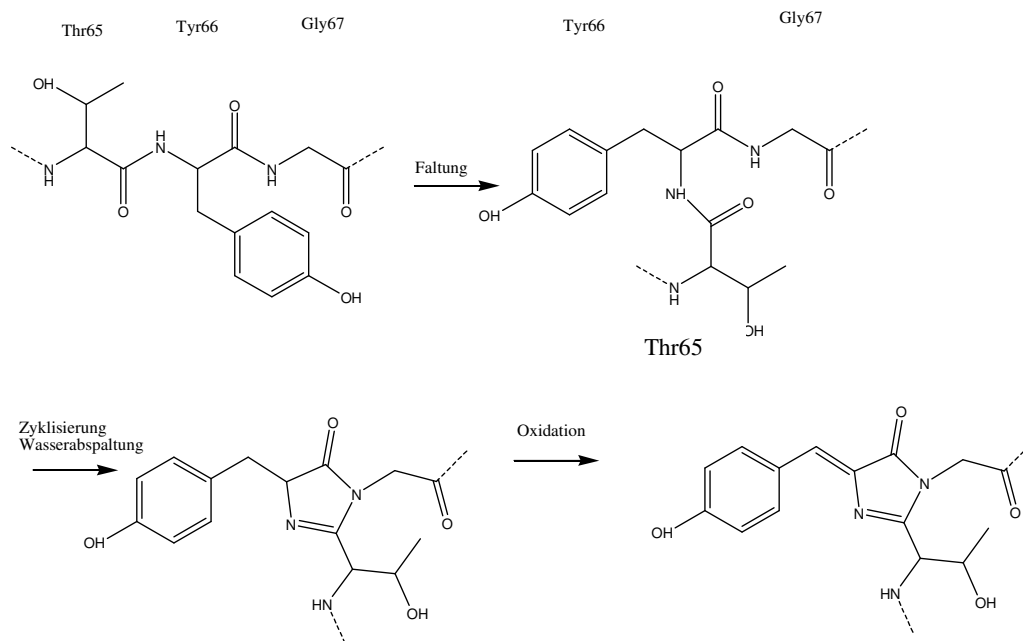


Abbildung 12: Model der Chromophorbildung in S65T- GFP^{17,89}.

Allgemein ist zu beachten, dass die Proteinfaltung ein sehr zeitintensiver Prozess ist. Allein die Ausbildung des Chromophors beim GFP benötigt ca. zwei Stunden⁸¹. Außerdem nimmt die Faltungseffizienz bei Temperaturen oberhalb der Raumtemperatur stark ab⁸¹.

Bereits in der Veröffentlichung der Röntgenstruktur wird darauf hingewiesen, dass nur etwa 70 % des Proteine einen ausgereiften Chromophor besitzen¹⁸. Die anderen 30 % besitzen einen unreifen Chromophor da ggf. die Reaktionsschritte für die Bildung nicht vollständig abgelaufen sind. Durch Mutagenese kann die Faltungsgeschwindigkeit sowie die Stabilität erhöht werden¹⁰⁰, jedoch gibt auch diese Veränderung keine hundertprozentige Ausbeute an fluoreszierenden Proteinen. Deshalb ist eine genaue Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz von Nöten um die Diskrepanz zwischen Fluoreszenzsignal und Gesamtproteinmenge aufzudecken. Der in folgender Abbildung 13 gezeigte Lösungsansatz wird in dieser Arbeit beschrieben.

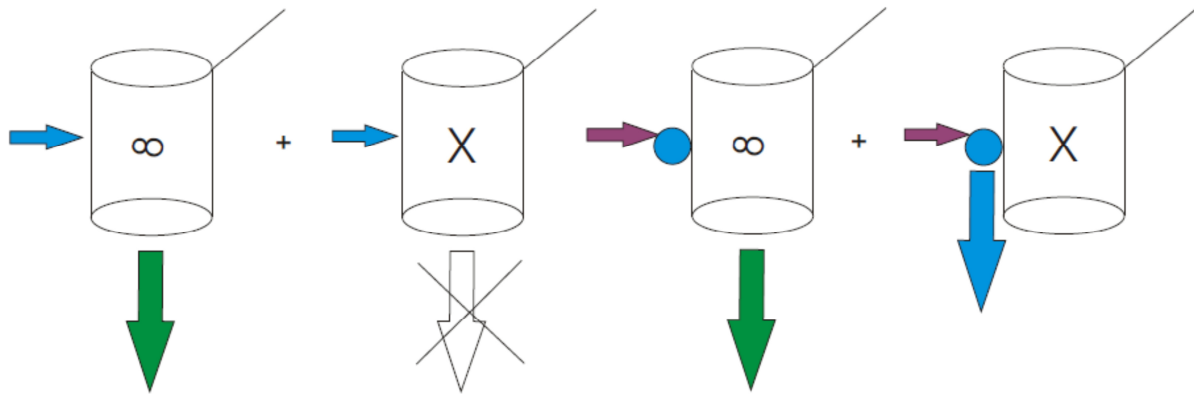


Abbildung 13: Idee der Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz mittels Markierung des Farbstoffes D22.

Dabei besteht der Proteinpool aus einem Teil Proteine mit reifem Chromophor, welche zur Fluoreszenz fähig sind und solchen, die eine falsch gefaltete Tertiärstruktur aufweisen, aber mit reifem Chromophor und der andere Teil aus Proteinen, die einen unreifen Chromophor im Fass beherbergen. Wird nun ein blau fluoreszierender Farbstoff an das GFP gebunden, kann dieser mit violetterem Licht angeregt werden. Es kann ein Energietransfer vom blauen Farbstoff auf das GFP mit reifem Chromophor stattfinden und grüne Fluoreszenz emittieren. Ist der blau fluoreszierende Farbstoff an ein Protein mit unreifem Chromophor gebunden, findet kein Energietransfer bei Bestrahlung mit violetterem Licht statt und der blau fluoreszierende Farbstoff kann blaues Licht emittieren. Aus dem Verhältnis von den verschiedenen Probenbestandteilen (Protein mit reifem Chromophor und Protein mit unreifem Chromophor) kann nun die Chromophorbildungseffizienz bestimmt werden.

2.11 Aptamere

Aptamere sind kleine, einzelsträngige Nukleinsäurestücke mit einer definierten dreidimensionalen Struktur. Deshalb können sie sich spezifisch an ein anderes Molekül binden und somit dessen biologische Funktion inhibieren. Aufgrund der Herstellungsweise durch chemische Synthese oder biologische bzw. enzymatische Produktion sowie auch eine Mischung aus beiden, werden sie als chemische sowie als biologische Substanzen angesehen. Mit der Einführung des Systems SELEX im Jahre 1990 (systematic enrichment of ligands by exponential amplification), eine systematische Identifikation von Nukleinsäuren, mit definierten Funktionen durch die Verwendung von *in vitro* Techniken, war der Grundstein für die Aptamerentwicklung gegeben¹⁰². Gleich drei verschiedene Gruppen berichten im Jahre

1990, dass sie funktionale Bindungen von Nukleinsäuresträngen an verschiedenen Moleküle beobachten, wie an organischen Farbstoffe¹⁰³ oder an Bakteriophagen T4 DNA Polymerase¹⁰², oder dass Gruppe I Ribozyme eher DNA als RNA Stücke schneiden¹⁰⁴.

Die Idee in diesem Projekt ist die spezifische Bindung von Aptameren an eGFP, um somit bei Komplexbildung der fluoreszenzmarkierten Aptamere und dem Protein FRET detektieren können. Bei erfolgreichem Energietransfer kann demnach von einem richtig gefalteten Chromophor gesprochen werden (rechter Teil der Abbildung 14).

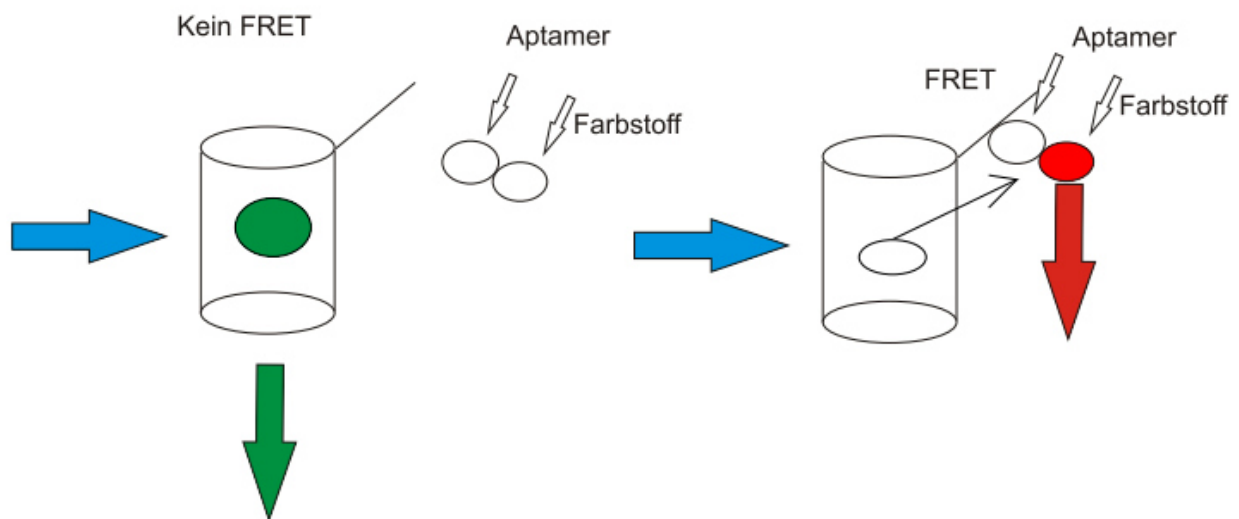


Abbildung 14: Idee des Projekts, bei Bindung des fluoreszenzmarkierten Aptamers an den His Tag des GFP FRET zu erzeugen (rechts) und links das Experiment ohne Bindung und ohne Erzeugung von Energietransfer vom GFP auf das fluoreszenzmarkierte Aptamer.

Aufgrund der geringen Größe von Aptameren wäre eine *in vivo* Bestimmung denkbar. Vorarbeiten zu dem Thema existieren bereits, jedoch konnten dabei bisher keine kurzen Aptamere (~30 Basen) für eGFP gefunden werden³⁴. Somit ist eine Bindung über eine Erkennungssequenz der nächste Schritt, wie er hier auch beschrieben wird.

3 Material und Methoden

3.1 FCS

Die Messungen der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie werden auf einem selbstgebauten System im Arbeitskreis durchgeführt (Vgl. Abb. 15). Die Anregung der Probenmoleküle erfolgt mittels eines frequenzverdoppelten Diodenlaser (Picarro, Newport) mit einer Wellenlänge von $\lambda=488$ nm. Über verschiedene Spiegel wird der Laserstrahl in ein invertiertes Mikroskop (Axiovert200, Zeiss) gelenkt und durch einen dichroitischen Spiegel (495 DLRG, Omega) in das Wasserimmersionsobjektiv (Plan Apo, 63x, NA 1,2, WI, Zeiss) reflektiert. Das Objektiv fokussiert den Laserstrahl oberhalb des dickekorrigierten Deckglases ($0,17 \text{ mm} \pm 0,01$; Assistent) auf einen beugungslimitierten Punkt. Dieser Punkt ist das Zentrum des Beobachtungsvolumens. Dieses Beobachtungsvolumen ist Teil der nanomolaren Probenlösung. Die von den Probemolekülen ausgestrahlte Fluoreszenz wird erneut vom Objektiv eingesammelt und passiert den dichroitischen Spiegel. Die anschließende Tubuslinse mit einer Brennweite von 160 mm fokussiert das Fluoreszenzlicht auf die Lochblende, die in diesen Versuchen einen Durchmesser von $50 \mu\text{m}$ aufweist. Der darauf folgende Breitbandfilter (Wellenlängenbereich abhängig vom Fluorophor, alle von AHF Analysetechnik) lässt die zu untersuchende Fluoreszenz durch und reflektiert die unerwünschte. Das Fluoreszenzlicht wird durch einen 50:50 Strahlteiler auf die zwei Avalanche Photodioden aufgeteilt und detektiert. Die Auswertung der Photonen erfolgt über einen Korrelator (FLEX02D, correlator.com), welcher die Ausgangssignale kreuzkorreliert.

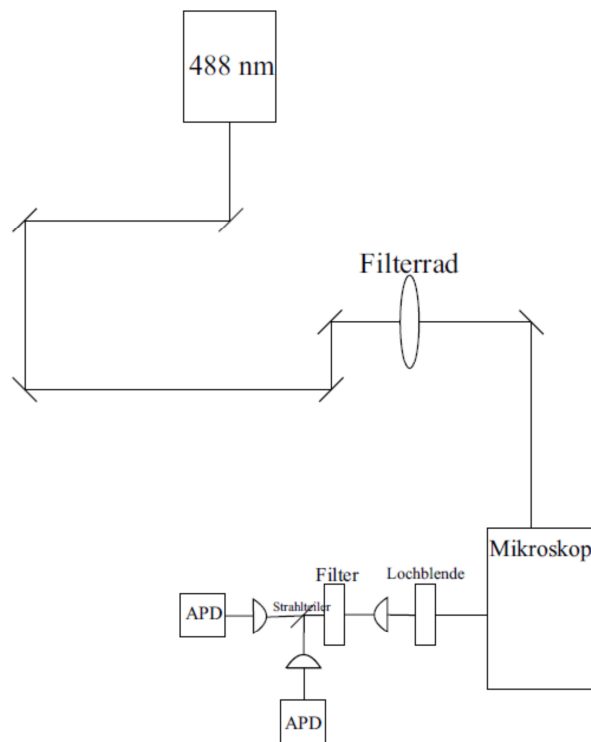


Abbildung 15 FCS Setup mit einer Anregung von $\lambda=488$ nm.

3.2 TCSPC

Die Fluoreszenzlebenszeitmessungen erfolgen auf einem im Arbeitskreis selbstgebauten System (Vgl. Abb. 16). Die Anregung erfolgt mit einem gepulsten Diodenlaser (Picosecond Pulsed Diode Laser LHD P-C-470B oder LDH-P-C-405) mit einer Wellenlänge von $\lambda=470$ nm respektive 405 nm, Pulsbreite ~ 200 -400 ps. Dieser werden über eine Faseroptik in ein Objektiv in den Strahlengang eingekoppelt. Im 90° Winkel werden die emittierten Photonen mittels eines Einzelphotonendetektors (PDM 100ct SPAD Micro Photon Devices) detektiert und gezählt mittels einer Photonenzähleinheit (Picoquant PicoHarp, Picoquant). Die Daten werden mit kommerzieller Software (Symphotime, Fluofit beide Picoquant) ausgewertet. Die verwendeten Probelösungen haben eine maximale optische Dichte von 0,1 bei der jeweiligen maximalen Absorptionswellenlänge. Zur Bestimmung der Instrumenteantwortfunktion wird mit einer Streulösung, der Ludox TM-50 colloidal von 50 Gewichtsprozent Silika in Wasser gemessen. Die Stammlösung wird in diesem Fall 20-fach verdünnt eingesetzt.

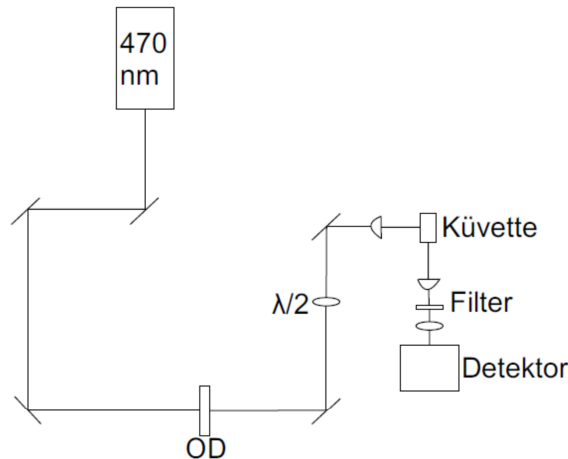


Abbildung 16: TCSPC Setup mit einer Anregung von $\lambda=470$ nm

3.3 UV-Vis

Die Absorptionsspektren werden mit einem Zweistrahl-UV/Vis Spektrophotometer V650 der Firma Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) aufgenommen. Alle Spektren werden bei einer Auflösung von 1 nm aufgenommen. Die Konzentration der Proben liegt bei den Messungen im unteren millimolaren Bereich.

3.4 Fluoreszenzspektrometer

Die Anregungs- und Emissionsspektren werden an einem Fluoreszenz-Spektrometer FP-6500 der Firma Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) aufgenommen. Alle Spektren werden bei einer Auflösung von 1 nm aufgenommen und die Konzentration der Proben liegt im oberen nanomolaren oder unteren mikromolaren Bereich.

3.5 Anisotropie

Für die Messung der stationären Anisotropie werden vier Messungen mit allen möglichen Kombinationen der zwei Stellungen der Polarisatoren am Fluoreszenz Spektrometer (FP-6500, Jasco, Groß-Umstadt, Deutschland) aufgenommen. Dafür werden die ersten zwei Messungen bei horizontaler Anregung und je einer horizontalen und vertikalen Emission zur Bestimmung des Gerätefaktors verwendet und die zwei Messungen mit vertikaler Anregung

zur Bestimmung der stationären Anisotropie (Vgl. Gleichung 7, Kap. 2.5). Für die Anisotropiemessungen werden die Polarisatoren FDP-203 (Jasco, Deutschland) verwendet.

3.6 Proteinexpression

3.6.1 Nährmedien für *E. coli*

Die verwendeten Medien für die Kultivierung von *E. coli* werden zur Sterilisation bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Den Festmedien wird vor dem Autoklavieren 20 % Agar (w/v) zugefügt. Antibiotika sowie Lösungen wie IPTG werden nicht autoklaviert, sondern steril filtriert (Sartorius Minisart, 0,2 µm) und diese dann zu gegebener Zeit zugegeben.

LB (Luria Bertani)-Medium (pH 7,0), für 1 L deionisiertes Wasser:

Pepton aus Casein	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Glucose	1 g

SOC-Medium (pH 7,0):

Pepton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

3.6.2 Kultivierung

Nach Transformation der Zellen mit Plasmid DNA werden die Suspensionen auf LB_{AMP}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C (Heraeus-Brutschrank) inkubiert. Die gewachsenen Kolonien werden auf Masterplatten überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für Flüssigkulturen werden jeweils 25 mL LB_{AMP}-Medium mit einer Kolonie von einer Agarplatte. Die Kulturen werden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm im Brutschüttelschrank (Infors) inkubiert.

3.6.3 Stammhaltung von *E. coli* Kulturen

Agarplatten mit *E. coli* BL21 (DE3) Kolonien werden mit Parafilm (PARAFILM „M“®, Pechiney Plastic Packaging) versiegelt und einige Wochen bei +4 °C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung bei -80 °C werden Zellsuspensionen mit Glycerin versetzt. Das Glycerin verhindert die Kristallbildung innerhalb der Zelle und somit das Zerreißen der Zelle und ihre Zerstörung beim Auftauen.

3.6.4 Herstellung Glycerin Kulturen

- Kolonien von den LB_{AMP}-Agarplatten in 5 mL Ampicillin-haltiges LB-Medium (oder bei *E. coli*-Zellen ohne Plasmid, nur LB) überimpfen
- Über Nacht bei 37 °C und 220 rpm auf dem Schüttler (Infors) inkubieren
- 1,5 mL Zellsuspension bei 4500 rpm für 5 min zentrifugieren (Eppendorf)
- Zellpellet in 200 µL LB_{AMP}-Medium (oder bei *E. coli*-Zellen ohne Plasmid, nur LB) resuspendieren
- Suspension mit 500 µL 87 % Glycerin vermischen und bei -80 °C lagern

3.6.5 Methode zur Isolierung der Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wird eine Kombination aus alkalischer Lyse nach Birnboim ¹⁰⁵ und das GenElute HP Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich verwendet. Ein durch Zentrifugation gewonnenes Zellpellet wird in Resuspensionslösung resuspendiert. Das darin enthaltene EDTA destabilisiert die Zellwand und komplexiert zweiwertige Kationen, wodurch eine Hemmung von DNasen erzielt wird. RNase A hydrolysiert die nach Zugabe des Lysis Puffers (enthält RNase A) freigesetzte RNA der Zelle.

Dieser Puffer lysiert die Bakterienzellen und bewirkt aufgrund des alkalischen pH-Wertes eine Denaturierung der frei werdenden DNA. Anschließend wird Neutralisationspuffer zugegeben. Dieser neutralisiert die Lösung wieder und lässt die stark aufgewickelte Plasmid-DNA renaturieren; im Gegensatz zur längeren genomischen DNA, die außerdem an der Zellwand verankert ist. Das enthaltene Kalium bildet darüber hinaus mit dem im Lysis Puffer enthaltenen SDS (Natriumdodecylsulphat) ein fast unlösliches Präzipitat, ebenso präzipitieren die Proteine. Der Überstand nach der erneuten Zentrifugation wird auf die Säule (GenElute HP Miniprep Binding Column) und durch Wasch- und Elutionsschritte eine saubere Plasmid-DNA Lösung gewonnen, welches farblos und salz- und proteinfrei ist¹⁰⁶.

Folgendes Protokoll ist durchzuführen:

- 2 mL der *E. coli* Übernachtskultur 5 min bei 4000 rpm zentrifugieren (Eppendorf)
- Überstand wird dekantiert und erneut Kulturlösung in das Reaktionsgefäß (Eppi) gegeben und zentrifugiert
- Bakterienpellet in 0,2 mL Resuspensionslösung resuspendieren
- 0,2 mL Lysis Puffer hinzugeben, mehrmals invertieren, 5 min bei RT inkubieren
- 0,35 mL Neutralisationspuffer zugeben, mehrmals invertieren
- Niederschlag 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- GenElute HP Miniprep Binding Column in ein Eppi stecken, mit 0,5 mL Säulenequilibrationlösung befüllen und den Durchfluss verwerfen.
- das Lysat nach der Zentrifugation der Probe auf die Säule geben, zentrifugieren und den Durchfluss verwerfen
- 0,5 mL Waschlösung 1 auf die Säule geben, zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- 0,75 mL Waschlösung 2 auf die Säule geben, zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- nun die Säule in ein sauberes Eppi überführen und 100 µL Elutionslösung auf die Säule geben. Das Eluat ist die saubere Plasmid-DNA Lösung, welche farblos und salz- und proteinfrei ist und kann nun bei – 20 °C gelagert werden.

3.6.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Damit *E. coli* Zellen Plasmid DNA aufnehmen, müssen sie kompetent gemacht werden; das bedeutet, sie besitzen dadurch die Fähigkeit, DNA aus dem Medium aufzunehmen. Somit sind die Bakterien transformierbar. Einige Bakterienstämme besitzen eine natürliche Kompetenz

wie *Bacillus subtilis* oder *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* gehört jedoch nicht dazu. Durch die Erzeugung einer künstlichen Kompetenz ist die Voraussetzung für eine Transformation gegeben, die Grundlage zur genomischen Veränderung des Bakteriums¹⁰⁷. Für die Herstellung elektrokompenter Zellen *E. coli* BL21 wird folgendes Protokoll verwendet.

- 400 mL LB Medium wird mit 4 mL einer frischen Übernachtskultur der *E. coli* BL21 Zellen beimpft.
- Die Zellen werden bei 37 °C und 220 rpm bis zum Erreichen einer Optischen Dichte bei 600 nm von 0,4 bis 0,5 kultiviert (Infors).
- Das Wachstum wird durch Eiskühlung gestoppt, der Kulturansatz in sterilen Zentrifugenröhrchen für 15 min bei 4 °C und 6000 rpm zentrifugiert (4K15, Sigma) und der Überstand dekantiert.
- Das Pellet wird in 35 mL H₂O_{reinst} resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert.
- Der Überstand wird erneut dekantiert und das Pellet in 30 mL einer 15 %igen Glycerinlösung (autoklaviert) resuspendiert und erneut zentrifugiert.
- Nach erneutem Dekantieren des Überstandes wird das Pellet im 1,5fachen Volumen in 15 %iger Glycerinlösung resuspendiert.
- Es werden 50 µL Aliquots abgefüllt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6.7 Elektroporation eines Expressionsplasmides in kompetente Zellen in *E. coli* BL21

Die Transformation der Plasmid-DNA erfolgt hier mittels Elektroporation und nicht mit der Hitzeschock-Transformation. Dafür werden die Elektroporationsküvetten und das Impuls aussendende Gerät (Gene Pulser und Pulse Controller, BioRad) verwendet. Die Transformation wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Die verwendete Plasmid-DNA und die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut, die Elektroporationsküvetten auf Eis vorgekühlt.
- Der Transformationsmix besteht aus 50 µL der elektrokompenten Zellen und aus 1 µL Plasmid-DNA, dieser wird in die eisgekühlte, trockene Elektroporationsküvette pipettiert und bei den Geräteeinstellungen der Spannung: 1,8 kV, Zeitkonstante 5,3 ms ein Puls ausgelöst.
- Direkt im Anschluss wird 1 mL SOC-Medium zur Regeneration der gestressten Zellen auf den Transformationsansatz gegeben.

- Die Zellen werden in ein Eppi überführt und für mindestens 45 min bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.
- Anschließend werden die Transformationsansätze auf LB_{AMP}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen. Ein positiver Befund der Transformation ist durch die vorhandenen Kolonien am nächsten Tag zu verzeichnen. Diese Bakterien sind erfolgreich transformiert und enthalten somit eine Ampicillinresistenz.

3.6.8 Expression der Bakterienkultur

Für die Expression ist zunächst eine Vorkultur notwendig, mit der dann die Hauptkultur angeimpft wird. Eine Expression des Zielproteins bedeutet die Biosynthese eines Proteins anhand der genetischen Information mitsamt allen dafür nötigen vorangehenden Prozessen. Eine Expression wird ständig vom Wirtsorganismus durchgeführt, jedoch ist die Konzentration vom Zielprotein sehr gering. Deshalb wird eine Überexpression des Zielproteins angestrebt, um eine maximale Ausbeute zu erlangen. Dafür wird während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur die Expression des Zielproteins mit IPTG¹⁰⁸ (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. IPTG ist ein künstlicher Induktor des Lactose-Operons in *E. coli*. Die Expression wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Für die Vorkultur werden in jeweils 50 mL Reaktionsgefäße 15 mL LB_{AMP}-Medium überführt und mit einer Kolonie der Bakterienkultur von einer Agarplatte beimpft.
- Über Nacht wird diese Vorkultur bei 37 °C bei 220 rpm inkubiert.
- Am nächsten Tag werden zwei sterile 1 L Erlenmeyerkolben mit je 250 mL LB_{AMP}-Medium befüllt und diese mit je 25 mL der Vorkultur angeimpft.
- Bei Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}}=0,5-0,8$ (nach ca. 2 h) bei 37 °C im Schüttler bei 220 rpm erfolgt die Induktion mit 275 μL der IPTG Stammlösung (Konzentration 100 mM, sterilfiltriert), um eine Endkonzentration von 100 μM zu erhalten.
- Nun wird die Kultur für ca. 24 h bei 28 °C im Schüttler bei 170 rpm inkubiert.

Anschließend kann die Ernte der Zellen und die Proteinaufreinigung durchgeführt werden.

3.6.9 Proteinaufreinigung

Nach der Inkubation der induzierten Hauptkultur können die Zellen geerntet werden, d.h. vom Medium getrennt werden. Anschließend werden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen. Danach erfolgt die Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie an einer IMAC Säule (GE Healthcare, HisTrap HP 1 mL).

3.6.10 Zellernte

- Die Zellsuspension wird kurzfristig auf Eis gelagert, bis die gesamte Zellsuspension in 50 mL Reaktionsgefäßen pelletiert vorliegt. Dabei wird immer nach dem Zentrifugationsschritt der Überstand dekantiert und neue Zellsuspension nachgegossen. Zentrifugiert wird bei 4 °C und 4500 rpm.
- Das Gewicht der Pellets gibt Aufschluss über die Menge an Resuspensionslösung (Binding Puffer), pro Gramm Pellet werden 4 mL Puffer verwendet.

3.6.11 Zellaufschluss mit Ultraschall

- Mit dem resuspendierten Pellet kann nun der Zellaufschluss durchgeführt werden, dafür wird die Probe 5mal für 15 s beschallt und zwischendurch je 30 s im Eis-Wasser-Bad gekühlt.
- Die aufgeschlossene Zellsuspension wird in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 4 °C und 5500 rpm für 10 min zentrifugiert.
- Der Überstand nach der Zentrifugation stellt den Rohextrakt dar und wird dekantiert und kann nun für die Affinitätschromatographie verwendet werden.

3.6.12 Affinitätschromatographie

- Für die Affinitätschromatographie mit der Säule HisTrap HP 1 mL zur Proteinaufreinigung werden zwei Puffer benötigt, den Bindungspuffer und den Elutionspuffer
- Bindungspuffer (20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 30 mM Imidazol, pH 7,4)
- Elutionspuffer (20 mM Na₃PO₄, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4)
- Nachdem die Säule mit 3-5 Säulenvolumina destilliertem Wasser gespült wurde, wird sie mit 5 Säulenvolumina mit Bindungspuffer equilibriert. Anschließend kann der

Rohextrakt auf die Säule gegeben werden.

- Als nächster Schritt wird die Säule gewaschen mit 10 Säulenvolumina Bindungspuffer.
- Die Elution des fluoreszierenden Proteins erfolgt mit 5 Säulenvolumina mit Elutionspuffer. Die Elutionsfraktion wird nun aufkonzentriert und umgepuffert, da das im Elutionspuffer enthaltene Imidazol bei verschiedenen Untersuchungen stört.
- Aufkonzentration und Umpufferung in einem für die Messungen geeigneten Puffer (PBS: 115 mm NaCl, 16 mm Na₂HPO₄, 4 mm KH₂PO₄) wird mit den Viva Spin 2 (GE Healthcare) und einer Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa realisiert.

3.6.13 verwendete Fluoreszenzproteine

In dieser Arbeit werden verschiedene Mutanten des GFP verwendet, diese werden hier aufgelistet. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäureabfolge in GFP; der erste Buchstabe vor der Zahl bezeichnet die ursprüngliche Aminosäure an dieser Stelle, der Buchstabe nach der Zahl zeigt die Mutation dieser Mutante auf^{22,93,94}.

S65T ¹⁰⁹	im CycleIII ¹¹⁰ (F99S, M153T, V163A) Mutante mit der Mutation von Serin nach Threonin an Stelle 65
E222H ¹¹¹	im wtGFP, Mutante mit der Mutation von Glutaminsäure zu Histidin an Stelle 222
T203F/E222H ¹¹¹	im wtGFP, Mutante mit den Mutationen Threonin zu Phenylalanin an Stelle 203 und von Glutaminsäure zu Histidin an Stelle 222
eYFP ¹¹²	im wt-GFP, mit den Mutationen Threonin zu Tyrosin an Stelle 203

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Cumarin-derivate zur Markierung von AS und Peptiden

4.1.1 Ziel der Versuche:

Ziel dieses Forschungsvorhabens ist das Einführen eines Fluoreszenzmarkers für Aminosäuren und Peptide mit 7-Amino-Cumarinderivaten mittels einer Kupfer-katalysierten Cycloaddition, der sogenannten Clickreaktion. Neben den bekannten Derivaten von Bodipy^{113,114} und Fluoreszein¹¹⁵ als Markierung für Aminosäuren, spielen auch Cumarine eine wichtige Rolle. Da bereits gute Quantenausbeuten mit 7-(Dialkylamino)Cumarinen beschrieben wurden¹², werden diese für die Entwicklung von Fluoreszenzmarkern eingesetzt¹¹⁶. Der Syntheseweg wird über die Huisgen-Meldal-Sharpless¹¹⁷ Reaktion durchgeführt, welche mit einem biokompatiblen Protokoll kombiniert wird¹¹⁸. Außerdem ist das verwendete Protokoll um eine besonders milde Prozedur erweitert¹¹⁹.

4.1.2 Ergebnis und Diskussion der Cumarin-derivate

Die Synthese der 7-Aminocumarine ist von Lisa Wirtz durchgeführt¹², die spektroskopische Charakterisierung wird hier gezeigt. Die Huisgen-Meldal-Sharpless¹¹⁷ Reaktion wird bei 80 °C durchgeführt, da dabei Ausbeuten von ~80 % erreicht werden. Im Folgenden werden zwei Derivate gezeigt, welche für das Markieren von Aminosäuren mittels der Huisgen-Meldal-Sharpless Reaktion eingesetzt werden können. Dabei dient der kommerziell erhältliche Farbstoff Cumarin 102 als Referenz. Die Entwicklung von verschiedenen Cumarinderivaten hat den Hintergrund, ein breites Spektrum von Farbstoffen mit gleichen fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften herzustellen. Die Vielfalt der Derivate ermöglicht somit ein breites Anwendungsspektrum.

Das erste untersuchte Derivat ist 8-But-3-ynyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on.

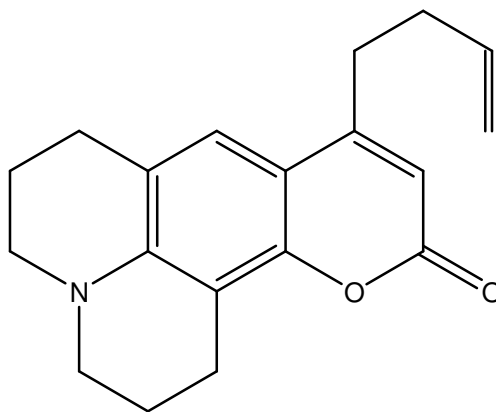


Abbildung 17: Strukturformel von 8-But-3-ynyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de] anthracen-10-on.

In der Abbildung ist die Strukturformel des Derivates 8-But-3-ynyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de] anthracen-10-on abgebildet, es hat eine Lebenszeit von $\tau = 4,1$ ns ($\Phi_{fl} = 1,04$ im Vergleich zur Referenz) und unterscheidet sich zur Referenz (Cumarin102) durch die Alkinseitenkette im Vergleich zur Methylgruppe. Die Abweichungen in den Absorptions- und Emissionsspektren im Vergleich zu Cumarin 102 ($\lambda_{abs} = 390$ nm, $\lambda_{em} = 466$ nm in Ethanol, Stokes Verschiebung $\Delta\lambda = 76$ nm) sind ebenfalls sehr gering. Die Spektren sind im Folgenden dargestellt. Die Stokes Verschiebung beträgt $\Delta\lambda = 61$ nm.

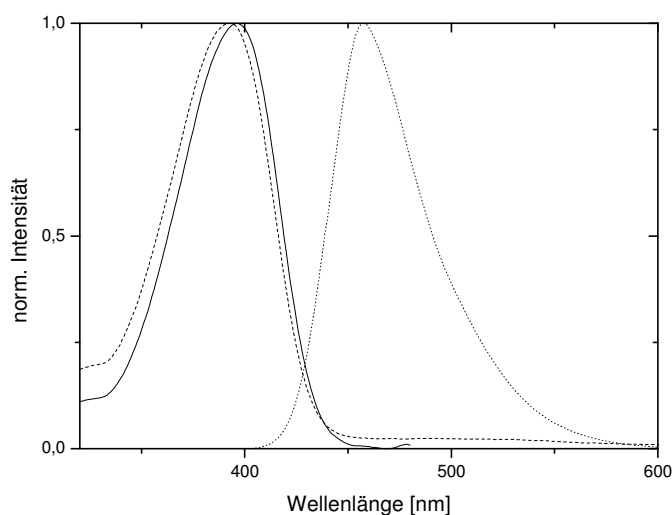


Abbildung 18: 8-But-3-ynyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de] anthracen-10-on, Absorptionsmaximum $\lambda_{abs}=392$ nm, Anregungsmaximum $\lambda_{an}=396$ nm, Emissionsmaximum $\lambda_{em}=457$ nm.

Ein weiteres Derivat ist das 8-Azidomethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on. Dieses unterscheidet sich zum Cumarin 102 nur durch die Azidseitenkette im Vergleich zur Methylgruppe.

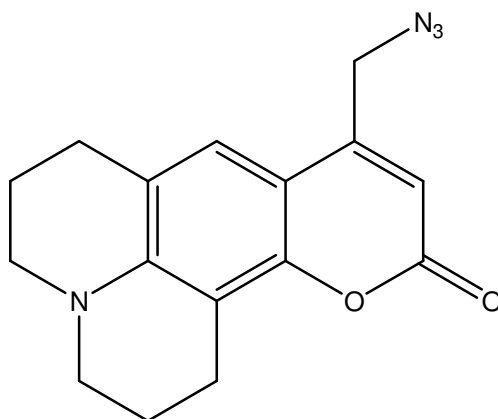


Abbildung 19: Strukturformel von 8-Azidomethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on.

Es hat eine Lebenszeit von $\tau = 3,92$ ns, was einer Quantenausbeute von $\Phi_{fl} = 0,99$ im Vergleich zu Cumarin102 entspricht. Die Absorptions- und Emissionseigenschaften sind ebenfalls vergleichbar mit der Referenz. Der Stokes Verschiebung beträgt = 77 nm.

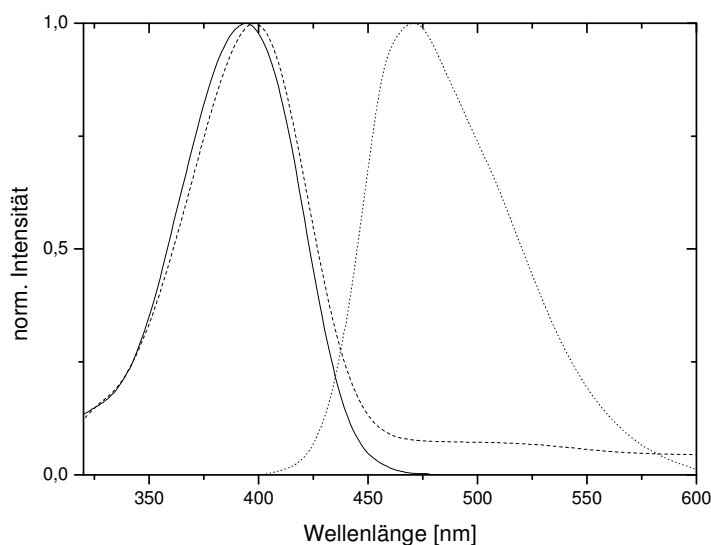


Abbildung 20: 8-Azidomethyl-2,3,5,6-tetrahydro-1H,4H-11-oxa-3a-aza-benzo[de]anthracen-10-on, Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{abs}}=398$ nm, Anregungsmaximum $\lambda_{\text{an}}=394$ nm, Emissionsmaximum $\lambda_{\text{em}}=471$ nm.

Insgesamt werden 24 verschiedene Derivate charakterisiert^{12,119}, die alle sehr ähnliche Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. Dies stellt ein sehr gutes Ergebnis hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Fluoreszenzmarker von Aminosäuren dar. Durch die verschiedenen Seitenketten ist eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten, abhängig vom umgebenden Medium denkbar, da so passend zum Reaktionspartner ein Fluoreszenzmarker ausgewählt werden kann, welcher problemlos mit den anderen austauschbar ist.

Jedoch sind Fluoreszenzfarbstoffe nicht *per se* für den Einsatz in Zellen geeignet. Zum einen weil es extrinsische Farbstoffe sind und diese als toxisch gegenüber Zellen und Geweben eingestuft werden. Zum anderen ist das Einbringen dieser Farbstoffe ein Eingriff in den Zellverband, welcher somit nicht mehr den komplett natürlichen darstellt. Somit ist die Entdeckung des GFPs ein Meilenstein bei den intrinsischen Farbstoffen. Durch die Generierung von Fusionsproteinen können *in vivo* Zellvorgänge untersucht werden¹⁵. Aber die Verwendung hat neben den überragenden Vorteilen⁸³ auch Nachteile. Im nächsten Kapitel wird das Problem der Photokonversion²¹ beleuchtet und eine Lösungsstrategie für Fluoreszenzproteine vorgestellt.

4.2 Einführung einer nicht-photokonvertierbaren GFP Mutante E222H

4.2.1 Einführung der Problematik und Ziel der Versuche

Die Photokonversion am GFP basiert auf der strukturellen Änderung, dass die Glutaminsäure an Stelle 222 der Aminosäurekette die Möglichkeit der Decarboxylierung durch Anregung des Proteins zeigt. Die Effizienz ist dabei stark wellenlängenabhängig^{24–27}. Gleichzeitig findet eine irreversible Photokonversion statt, wie z.B. die Veränderung der Fluoreszenzanregung von violett zu grün, was in der Identifizierung von Proteinen ausgenutzt wird⁹⁸. Dieses Phänomen wird durch die Abspaltung der Säurefunktion hervorgerufen, welche eine negative Ladung am Chromophor hinterlässt. Eine Idee, diese irreversible Veränderung zu umgehen, ist der Austausch der Glutaminsäure 222 mit Glutamin (GFP Mutante E222Q). Allerdings hat sich gezeigt, dass diese Veränderung für das reversible und spontane Photoschalten^{120–122,123}, ähnlich wie in Dronpa^{87,124,125}, verantwortlich ist. Außerdem besitzen die E222Q Varianten eine geringe Expressionsausbeute⁸⁶.

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion der nicht-photokonvertierbaren GFP Mutante E222H

In diesem Teil der Arbeit wird eine Mutante des GFPs vorgestellt, bei der die Glutaminsäure an Position 222 in Histidin verwandelt wurde. Dieser Austausch verändert die saure und potenziell negativ¹²⁶ geladene Aminosäure mit der photosensitiven Carboxylatgruppe in eine basische und aromatische Aminosäure. Bei der Wahl einer Aminosäure ohne Potential zur Decarboxylierung kann auch keine Photokonversion stattfinden. Dadurch ist hier eine wirklich Alternative für eGFP mit fehlenden photodynamischen Prozessen und hohen Expressionsausbeuten beschrieben, die durch rationales Design entwickelt wird.

Die Idee der Mutation der Glutaminsäure zu Histidin an Position 222 zielt in einen Ersatz, welcher ideal in den Raum passt und dabei die katalytische Funktion beibehält. Der pK_A der Seitenkette von Histidin ist ~ 6 und nahe am pK_A der Glutaminsäure ($\sim 4,1$)¹²⁷. Deshalb wird angenommen, dass Histidin die gleichen Säure-Base Reaktionen katalysiert wie Glutaminsäure. Ferner ist auch die Größe der Seitenketten (räumliche Ausdehnung) sehr ähnlich (E: 109 \AA^3 , H: 118 \AA^3)¹²⁷. Zusätzlich ist der Hydrophobizitätswert der Seitenketten sehr nah (E: $-3,5$, H: $-3,2$)¹²⁸. Hydrophobizität beschreibt das Ausmaß des hydrophoben Effektes von Molekülen. Es wird die Kyte und Doolittle Skala¹²⁸ verwendet, somit liegen hier sehr hydrophile AS vor. Diese physikalischen Eigenschaften suggerieren bereits einen perfekten Austausch. Die folgende kristallographische Struktur verifiziert den perfekten

Austausch von Histidin im Proteinfass. Alle kristallographischen Arbeiten sind vom AK Lancaster durchgeführt worden¹¹¹.

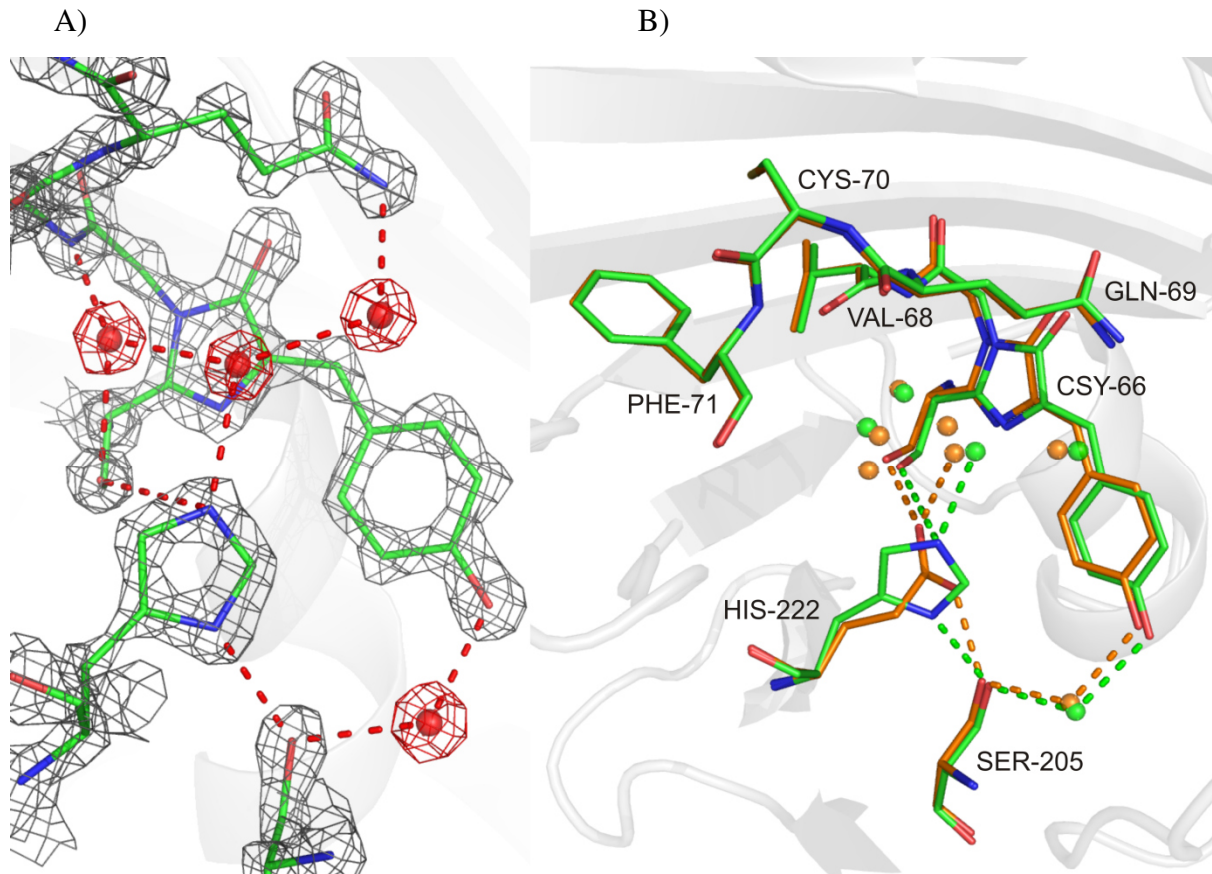


Abbildung 21: Kristallstruktur von E222H-GFP (PDB Eintrag 4P1Q; In dieser Aufnahme sind die Bindungen zwischen Kohlenstoffen grün.) Die Auflösung beträgt 1.5 Å mit Sauerstoffatomen in rot und Stickstoff in blau. In (A) ist die Elektronendichtekarte gezeigt, welche mit den Koeffizienten $2 \cdot |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|$ und Phase φ_{calc} berechnet wird. Der Kontureffekt ist bei einem Grad von 2.6 σ über der mittleren Dichte der Karte. Sauerstoffatome der engangliegenden Wassermoleküle werden als roter Bereich gezeigt. In Bereich (B) ist das gezeigt, bei dem die wtGFP (PDB Eintrag 2WUR⁸⁰; In dieser Aufnahme sind die Bindungen zwischen Kohlenstoffen orange; Sauerstoffatome der Wassermoleküle der wtGFP Struktur sind als Seitenkettenmarkierung als orangefarbener Bereich gekennzeichnet, die des E222H-GFP als grüner Bereich. Der Ausschnitt in dieser Abbildung wurde mit PyMOL angefertigt¹²⁹.

Zum besseren Vergleich zeigt die Abbildung die Überlagerung der Strukturen von E222H und wtGFP. Die gleiche Anzahl an Wassermolekülen (vier) wird auch bei eGFP und wtGFP beobachtet¹³⁰. Für die Glutaminsäure wird eine Wasserstoffbrückenbindung entweder zu Serin205 oder zu Threonin65 beschrieben¹³⁰, im Fall von Histidin222 kann eine Wasserstoffbrückenbindung zum Serin205 beobachtet werden (Vgl. Abb. 21 Teil B)

Die folgende Abbildung zeigt das Absorptionsspektrum von E222H bei pH 5 und 11. Beide Spektren haben ein Maximum bei 479 nm und eine Schulter bei 460 nm. Die gefundenen

Maxima sind sehr nah am Maximum des anionischen Zustandes von eGFP von $\lambda_{\text{max}}=484 \text{ nm}$ ⁸¹. Die Überlappung der Absorptionsspektren bei verschiedenen pH-Stufen zeigt die Unabhängigkeit gegenüber äußerer Azidität über einen großen Bereich bei dieser Mutante. Interessant ist, dass bei geringem pH keine klare Absorptionsbande bei 390-400 nm erkennbar ist. Dieser Umstand wird bei einem neutralen Chromophor und einem intakten Protein erwartet. Dafür ist ein kleines Maximum bei $\lambda_{\text{max}}=360 \text{ nm}$ bei pH 5 ersichtlich, was vergleichbar mit dem C-Zustand bei GFP ist^{131,132}. Es kann ausgeschlossen werden, dass dieses Maximum zum denaturierten Protein mit einem neutralen Chromophor gehört, da dieser bei $\lambda_{\text{max}}=372 \text{ nm}$ absorbiert¹³³. Zusammenfassend konnte weder Absorption einer neutralen Form oberhalb von pH 5 noch andere spektrale Änderungen bezüglich Protonierungsänderungen der Seitenkette gefunden werden¹³⁴. Deshalb kann ein pK_A Wert des Chromophors von unter 5 in Betracht gezogen werden¹⁶.

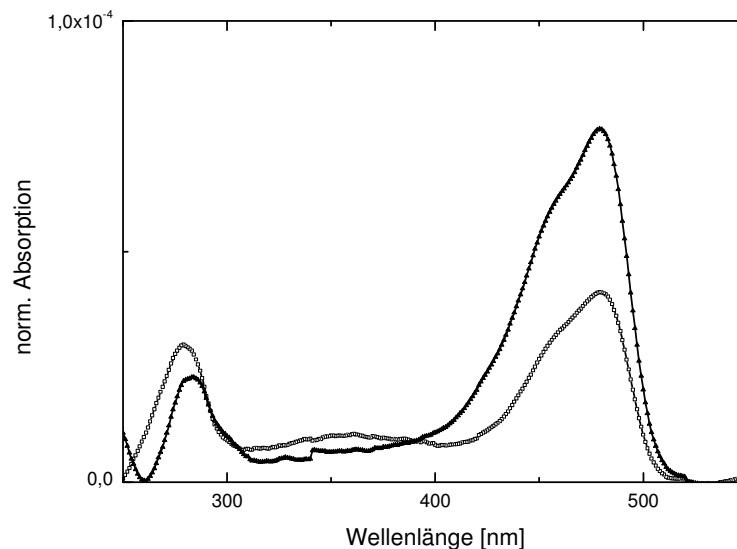


Abbildung 22: Normierte Absorptionsspektren der E222H Mutante bei pH 5 (offene Quadrate) und pH 11 (gefüllte Dreiecke). Die geringere Gesamtabsorption bei pH 5 zeigt den Beginn der Denaturierung.

Die Spektren der Anregung und der Emission betonen ebenfalls die pH Stabilität von E222H, da beide Spektren deckungsgleich bei unterschiedlichen pH-Stufen sind. Das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda_{\text{max}}=505 \text{ nm}$ und somit sehr nah am Maximum $\lambda_{\text{max}}=507 \text{ nm}$ vom eGFP ist⁸¹.

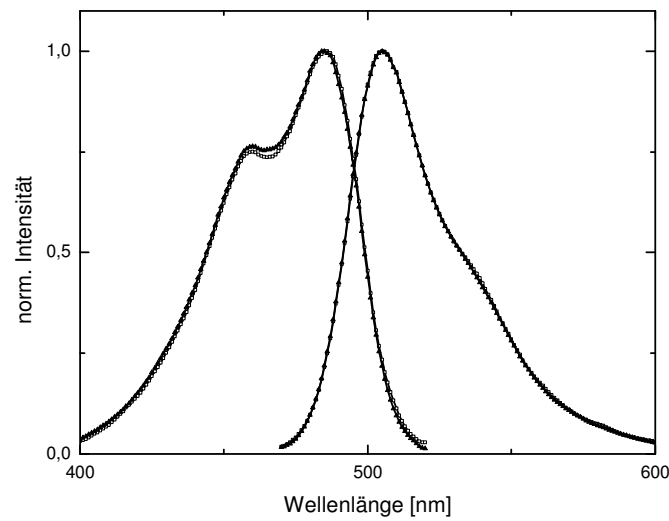


Abbildung 23: Normierte Anregungs- und Emissionsspektren der E222H Mutante bei pH 6 (offene Quadrate) und pH 11 (gefüllte Dreiecke).

Neben den unveränderten Fluoreszenzspektren ist auch die Fluoreszenzlebensdauer $\tau=2,8$ ns sehr stabil zwischen pH 6 und 10.

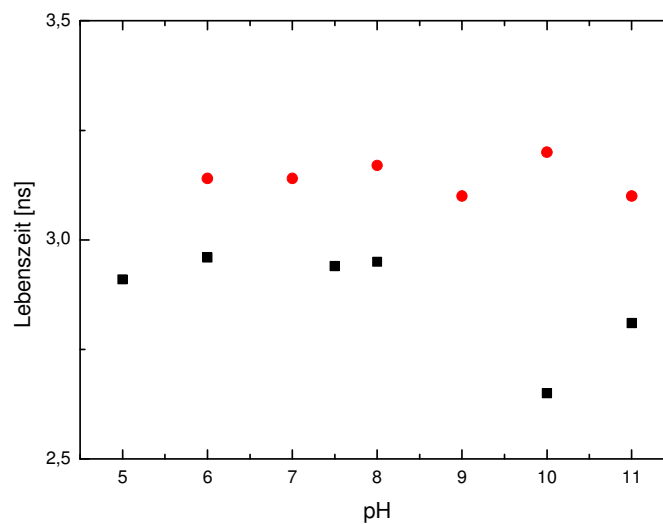


Abbildung 24: Lebenszeit der Mutante E222H (schwarz) und der Doppelmutante T203F/E222H (rot) im Vergleich in Abhängigkeit vom pH.

Es kann aus dem Vergleich mit eGFP ($\tau=2,7 \text{ ns}^{135}$) und S65T ($\tau=2,9 \text{ ns}^{20}$) geschlussfolgert werden, dass die Emission vom vorherrschenden B-Zustand von GFP stammt¹³⁶. Zusätzlich löscht Histidin hier nicht die anionische GFP Fluoreszenz, obwohl es als Fluoreszenzunterdrücker für Fluoreszenzproteine bekannt ist und auch in der direkten Nähe zum Chromophor sitzt¹³⁷.

Des Weiteren wird die interne Dynamik durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) untersucht. Es werden Autokorrelationskurven zwischen pH 6 und 11 in einem Intensitätsbereich von 10 bis 80 kW/cm^2 aufgenommen. Dabei werden die Autokorrelationsfunktionen mit dem 2 D-Modell⁵² (Vgl. Kap 2.6) analysiert und auf die Teilchenzahl N normiert.

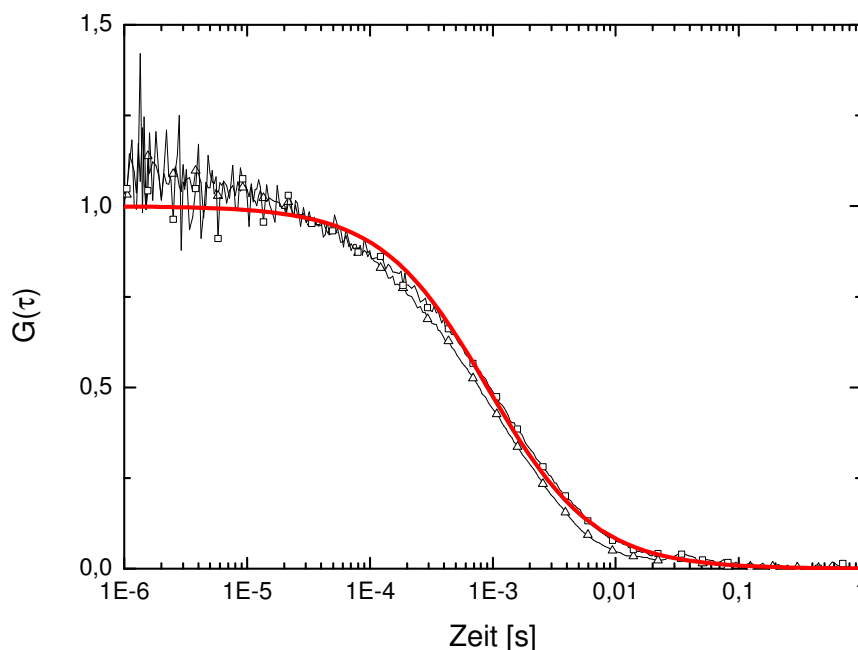


Abbildung 25: Normierte FCS Kurven von E222H bei pH 6 (offene Dreiecke) und pH 10 (offene Quadrate) bei einer Intensität von 10 kW/cm^2 ($\lambda_{\text{an}} = 488 \text{ nm}$). Die rote Kurve ist der Fit zum Diffusionsteil bei pH 10.

Wie in der obigen Abbildung ersichtlich, sind die Diffusionszeiten und entsprechenden Kurven von E222H sehr stabil über den gemessenen pH Bereich von 6-10. EGFP ist es im Gegenzug nicht¹³⁸, wie folgende zwei Abbildungen zeigen, zunächst das

Absorptionsspektrum von EGFP bei verschiedenen pH-Stufen.

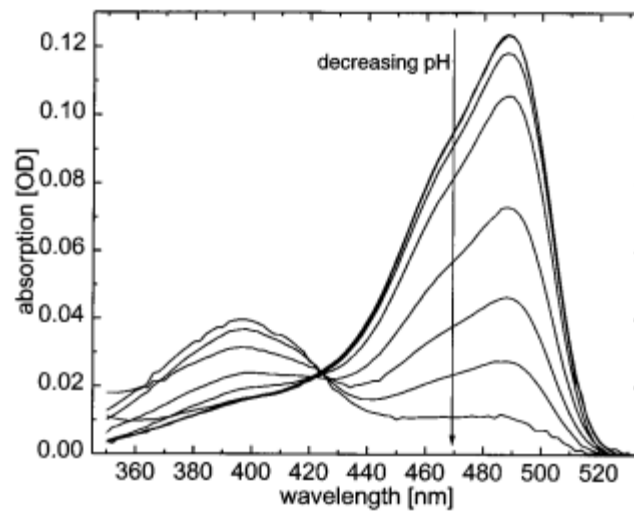


Abbildung 26: Absorptionsspektrum von EGFP bei verschiedenen pH-Stufen von pH10 bis pH 5¹³⁸.

Auch beim Vergleich der Fluoreszenzkorrelationskurven ist deutlich, dass E222H viel stabiler über den gemessenen pH-Stufen ist als EGFP.

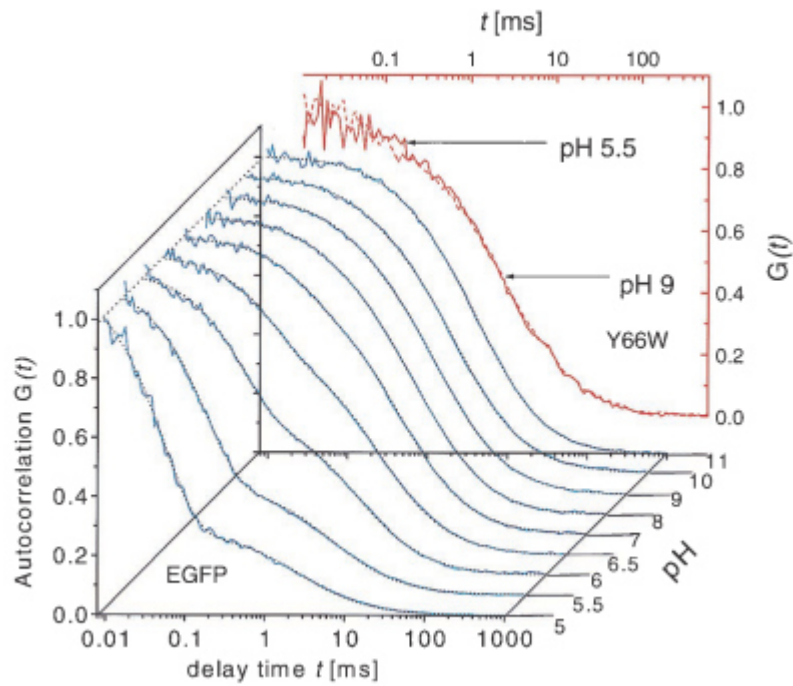


Abbildung 27: Autokorrelationskurven von EGFP bei verschiedenen pH Stufen 5-11. Bei hohen pH Stufen ist die Diffusionsrelaxation vorrangig, hingegen bei niedrigen pH Stufen die chemische Relaxation¹³⁸.

Dieser Vergleich mit EGFP zeigt, dass in E222H keine äußere Protonierung stattfindet und somit im Einklang steht zum ermittelten pK_A Wert des Chromophors unterhalb von 5.

Außerdem werden intensitätsabhängige FCS Kurven bei pH 10 in einem Bereich von 8 bis 168 kW/cm^2 aufgenommen, wie in der folgenden Abbildung 28 zu sehen ist.

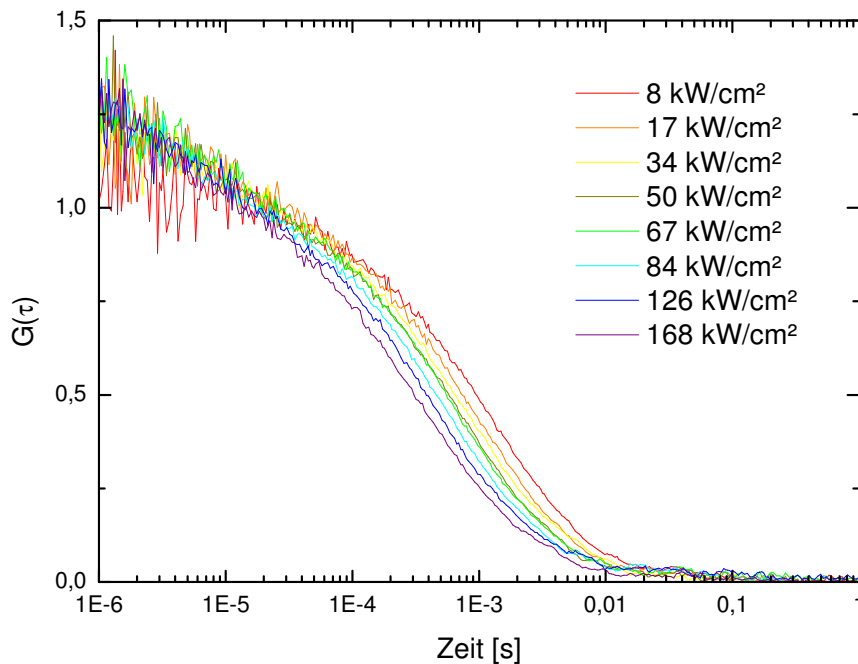


Abbildung 28: Normierte FCS Kurven von E222H bei pH 10 ($\lambda_{an} = 488 \text{ nm}$) bei verschiedenen Anregungsintensitäten. Eine Verringerung der scheinbaren Diffusionszeit aufgrund höherer Anregungsintensität kann beobachtet werden, wobei die Dynamik bei kürzeren Zeiten lediglich geringfügige lichtgetriebene Dynamik aufweist.

Dabei ist eine konstante Helligkeitsfraktion von 0,8 für E222H oberhalb von 8 kW/cm^2 zu sehen, welche leicht über der von eGFP (0,7) und eYFP (0,65)¹³⁹ liegt, jedoch signifikant höher ist als E222Q (0,35)¹²⁰. Der Kontrast C ist nahezu unabhängig von der Anregungsintensität und schließt signifikante Tripletpopulationen aus. Alle Kurven, bis auf die mit der geringsten Anregungsintensität, überlappen unterhalb von 10^{-5} s , trotz der Variation der Anregungsintensität um eine Größenordnung. Dies stellt einen Unterschied zur Mutante E222Q dar, da diese eine lichtgetriebene Dynamik zeigt¹²⁵. Auch die Variante T203Y zeigt ein schnelles lichtgetriebenes Flackern im Zeitbereich von 10^{-5} s bis 10^{-4} s ^{64,138}. Daraus ist zu schlussfolgern, dass E222H keine lichtgetriebene Dynamik unterhalb 10^{-5} s wie T203Y¹²⁰ besitzt. Diese Erkenntnis impliziert stattdessen einige Konversionsdynamiken im elektronischen Grundzustand. Effektiv kann ein sehr kleiner lichtgetriebener Prozess in E222H beziffert werden, jedoch ist dieser zehnmal kleiner als in eYFP¹²⁰. Auf der weiteren Zeitskala ist teilweise Photobleichen erkennbar^{60,139}. Des Weiteren ist die Reduktion der Diffusionszeit bei höheren Intensitäten in dem vorhandenen Ausmaß mit eYFP vergleichbar¹³⁹. Eine Erklärung für das Fehlen der Photochemie jenseits des Photobleichens

ist in der Struktur zu finden. Histidin ist geringfügig größer als Glutaminsäure. Außerdem kann Histidin nicht decarboxylieren wie Glutaminsäure. Dieser Prozess minimiert zusätzlich das notwendige Volumen und bietet somit den erforderlichen Raum für Isomerisierungsreaktionen.

Zusätzlich zur Mutation E222H wird die Mutation T203F eingeführt. Die strukturelle Veränderung beinhaltet eine aromatische Aminosäure an der 203. Position, die eine bathochrome Verschiebung aufgrund von π - π -Wechselwirkungen^{64,112,121,140} verursacht. Dies ist exemplarisch in der Mutante wtGFP T203Y¹²⁰ und anderen YFPs¹¹² gezeigt. In den Ergebnissen zur Charakterisierung dieser Mutante kann eine Rotverschiebung von 23 nm durch die zusätzliche Mutation von T203F in E222H (Doppelmutante) beobachtet werden. Das Anregungsmaximum von $\lambda_{An}=507$ nm ist im Vergleich zum Maximum von T203F ($\lambda_{An}=512$ nm⁶⁴) nur gering blau verschoben. Des Weiteren zeigt die untenstehende Abbildung die gute Vergleichbarkeit der pH Stufen 7 und 10 und somit eine pH Unabhängigkeit für die Mutante T203F/E222H. Das Emissionsmaximum von $\lambda_{Em}=519$ nm der Mutante T203F/E222H liegt nahe dem der Mutante T203F ($\lambda_{Em}=524$ nm⁶⁴). Eine interessante Diskussionsgrundlage bietet die spektrale Breite des Spektrums der Mutante T203F/E222H im Vergleich zur Mutante E222H. Die Doppelmutante zeigt ein nur halb so breites Spektrum als die Mutante mit nur einer Aminosäureänderung.

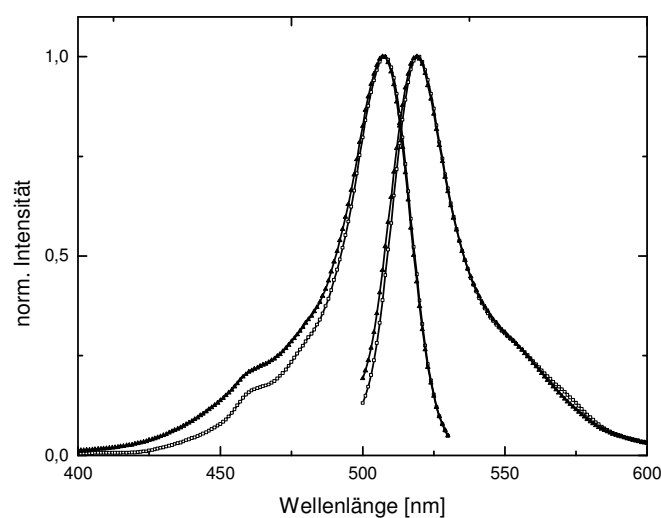


Abbildung 29: Anregungs- und Emissionsspektrum der Doppelmutante T203F/E222H bei pH 7 (Quadrate) und pH 10 (Dreiecke).

Die Doppelmutante zeigt eine stabile Lebenszeit von 3,2 ns über den gesamten pH-Untersuchungsbereich. Dies ist eine 0,4 ns längere Lebenszeit als E222H. Dieser Unterschied ist durch den Einfluss der platzraubenden aromatischen Aminosäure an Position 203 zu erklären¹²¹. Die durch die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie untersuchte Dynamik ist vergleichbar mit der bereits charakterisierten Mutante E222H. Jedoch zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mutanten in der Expressionsausbeute. Durch die zehnfach geringere Ausbeute der Mutante T203F/E222H im Vergleich zu E222H ist eine erweiterte biophysikalische Charakterisierung der Doppelmutante stark eingegrenzt.

Zusammenfassend für diesen Teil der Arbeit ist zu sagen, dass hier eine Mutation im wtGFP gezeigt wird, welche durch die Röntgenkristallstruktur einen perfekten Fit der Substitution aufweist. Vergleichbar sind die Ergebnisse bezüglich der photophysikalischen Eigenschaften mit der Mutante S65T mit dem zusätzlichen Vorteil der unterdrückten Photokonversion. Die stabilen Fluoreszenzeigenschaften werden durch die elektronischen Spektren wie auch die Fluoreszenzlebenszeiten über den untersuchten pH Bereich bestätigt. Darüber hinaus ist der Mangel an licht getriebener Dynamik ein starkes Indiz für eine stabile Fluoreszenz auch unter mikroskopischen Bedingungen. Somit ist eine zusätzliche Mutation des E222H bei allen Untersuchungen im Bereich der Decarboxylation empfehlenswert, da auch eine hohe Expressionsausbeute erwartet werden kann. Im Fall von dsRed ist die Glutaminsäure an Position 215 zu tauschen. Eine der größtmöglichen Potentiale dieser Mutante liegt in der möglichen Übertragbarkeit auf andere Fluoreszenzproteine, wie das bereits erwähnte Rot Fluoreszierende Protein⁹⁵. Die Einführung wird vermutlich die Quantenausbeute erhöhen, auch eine Entwicklung einer photostabilen Variante bei anderen Wellenlängenbereichen ist denkbar.

Somit ist die Problematik der Photokonversion bei der Verwendung von Grün Fluoreszierenden Proteinen gelöst, jedoch sind weitere Nachteile weiterhin vorhanden. Im Folgenden soll eine Modelllösung für die Quantifizierung der Chromophorbildungseffizienz vorgestellt werden. Wie bereits Ormö *et al.* beschrieben hat, sind lediglich 70 % der GFPs¹⁸ mit einem richtig gefalteten Chromophor ausgestattet, der auch zur Fluoreszenz befähigt ist.

4.3 Bestimmung der CFE

4.3.1 Einführung in die CFE

Mit fluoreszierenden Proteinen ist der Einbau von Fluorophoren über genetische Modifizierungen in Zellen möglich, ohne das weitere Substanzen zur Zelle hinzugegeben werden müssen. Die autokatalytische Bildung des Fluorophors von GFP in den Zellen macht es zu einem Nachweiswerkzeug, dessen Vorteile von keiner anderen Methode derzeit realisiert werden kann. Dieses Alleinstellungsmerkmal hat jedoch auch seine Nachteile, da aufgrund der begrenzten Faltungseffizienz vom GFP zwar eine qualitative, jedoch keine quantitative Aussage über Zellstoffwechsel verlässlich möglich ist. Für eine qualitative Aussage reichen die richtig ausgereiften GFPs sicher aus, jedoch ist für die Quantifizierung eine genaue Konzentrationsbestimmung der GFPs notwendig. Durch die Bestimmung der Fluoreszenzintensität am Fluoreszenzspektrometer ist das nicht möglich, da die Intensität vom Gerätefaktor abhängig ist und nicht ausschließlich von der Chromophorkonzentration. Und gerade bei veränderten Bedingungen wie Temperatur, osmotischer Druck der Zelle, Salzkonzentration oder andere Ionenschwankungen, ist auch die Faltungseffizienz beeinflusst¹⁰⁰. Sollen gerade diese Einflussfaktoren auf verschiedene Ligandenbindungen mittels Fluoreszenzmarkern untersucht werden, müssen auch die Verhältnisse der intakten Chromophore zu den inaktiven bestimmt werden. Es wird für die Versuche das Gelb fluoreszierende Protein verwendet, da die Anregungswellenlänge des Donors auch andere GFPs anregen würde.

4.3.2 Notwendige Schritte zur Bestimmung

Für das Markieren des Gelb Fluoreszierenden Proteins (YFP) wird der Farbstoff D22 (2-dimethylaminonaphthalen-5-sulfonylchlorid, bezogen von Invitrogen) verwendet. Dieser ist ein Dansylchlorid und die aminoreaktive Seitenkette ein Sulfonylchlorid. Der Mechanismus der Kopplung besteht aus drei Schritten, dem Angriff des freien Elektronenpaares des Amins an den Schwefel, der Elimination des Chlorids sowie die Abspaltung der Salzsäure und das D22 markierte Protein.

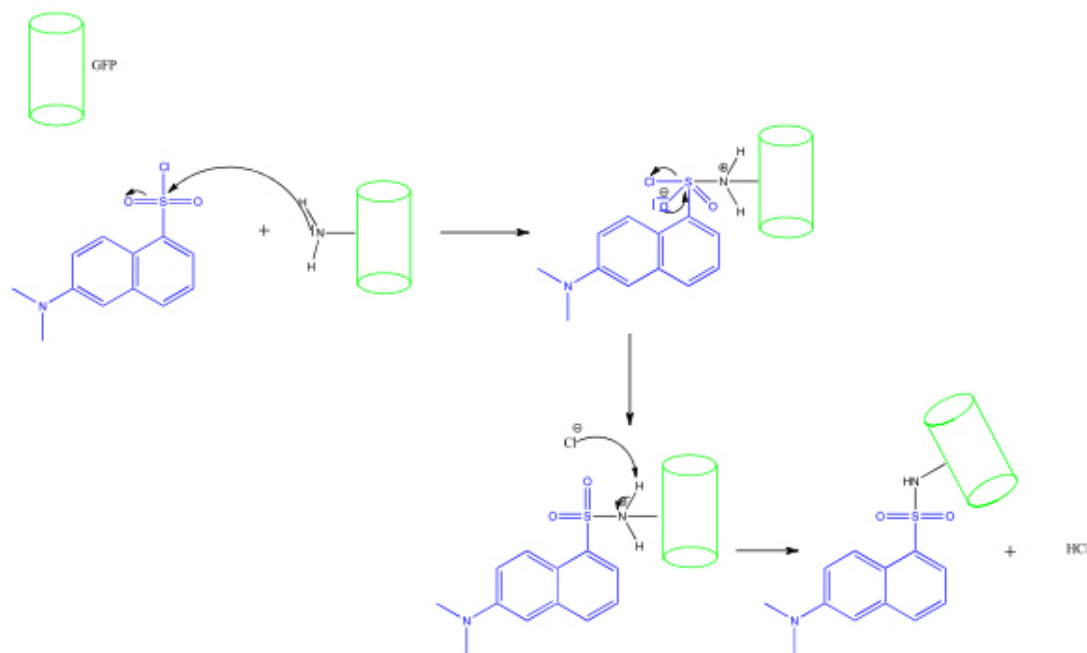


Abbildung 30: schematischer Markierungsmechanismus von D22 an GFP.

Als Negativkontrolle wird das nicht fluoreszierende Protein BSA (Bovine Serum Albumin) an den Farbstoff gebunden, um ein Anregungs- und Emissionsspektrum aufnehmen zu können. Des Weiteren wird die Lebenszeit dieses Komplexes bestimmt, um einen Vergleichswert ohne einen möglichen Akzeptor zu erhalten.

Nach der Markierungsprozedur von D22 in DMF wird schrittweise das in Na_2HCO_3 -Puffer gelöstem BSA zugegeben. Dabei wird das Gemisch bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ schüttelnd inkubiert und anschließend über eine SEC-Säule mit dem Carbonatpuffer als Laufmittel aufgereinigt. Anschließend ist der freie Farbstoff vom D22-Protein-Gemisch getrennt. Für das Binden des YFPs wird analog zur Markierungsprozedur mit BSA fortgefahren.

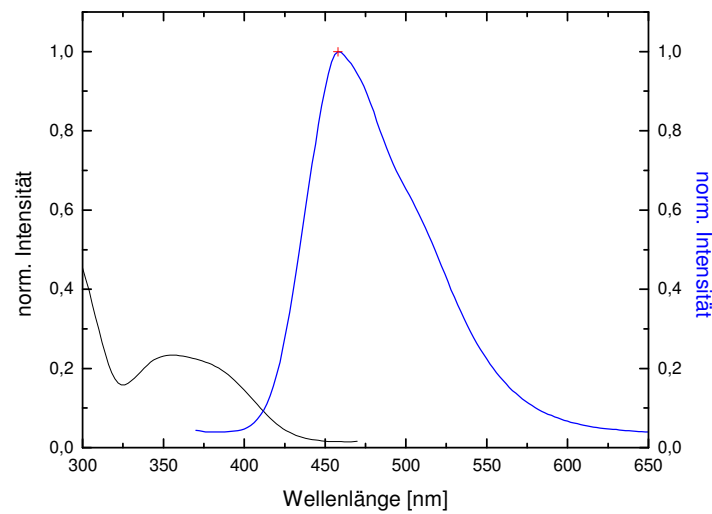


Abbildung 31: D22 an BSA, Anregungsspektrum bei 480 nm Emission (schwarz) und Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm (blau).

Das langwelligste Absorptionsmaximum von D22 liegt bei 350 nm und das Emissionsmaximum bei 458 nm. Dadurch ist sichergestellt, dass D22 als Donor für das YFP bei erfolgreicher Kopplung und intaktem Chromophor fungieren kann. Für die Bestimmung der Lebenszeit von D22 wird der Farbstoff mit 405 nm angeregt. Diese Wellenlänge würde andere GFPs ebenfalls anregen und somit ist die Beobachtung von FRET bei einem FRET-Paar D22 und GFP stark fehlerbehaftet aufgrund der Doppelanregung. Deshalb wird in diesen Versuchen das FRET-Paar D22 und YFP verwendet. Für die bildliche Darstellung des möglichen FRET-Paares sei hier die Überlappung der beiden Absorptionsspektren beider Farbstoffe gezeigt.

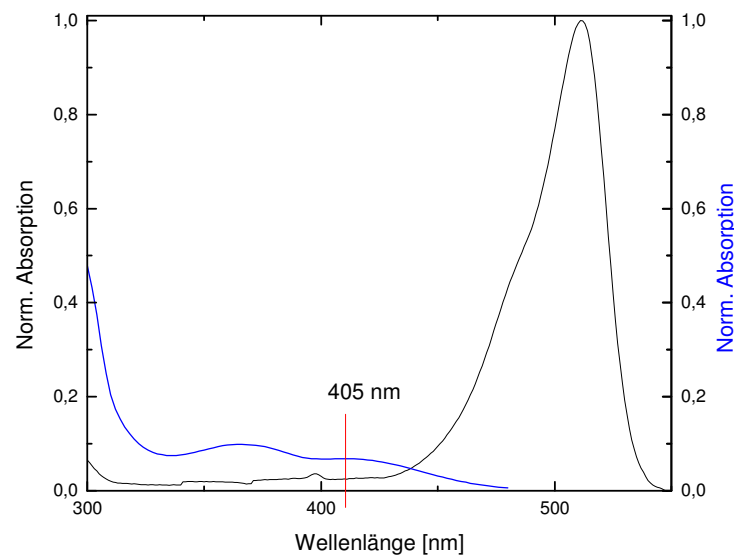


Abbildung 32: Vergleich der Absorptionsspektren von D22 und YFP.

Für die Bestimmung des Försterradius wird zuerst nach Gleichung 5 das Überlappungsintegral aus dem normierten Emissionsspektrum von D22 sowie dem Absorptionsspektrum des YFP berechnet. Das Ergebnis beträgt $0,45 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$. Die Quantenausbeute des D22 beträgt $0,76^{141}$. Damit wird analog Gleichung 7 der Försterradius bestimmt.

$$R_0 = 0,211 \left(\frac{2}{3} * 1,33^4 * 0,76 * 0,45 * 10^{14} \right)^{\frac{1}{6}} = 43 \text{ \AA} \quad 21$$

Der Försterradius liegt somit im Bereich von 1-10 nm.

Im nächsten Spektrum ist das Emissionsspektrum des D22 gekoppelt an das YFP sichtbar. Die Anregungswellenlänge beträgt, wie im Versuch der Lebensdauerbestimmung von D22, 405 nm.

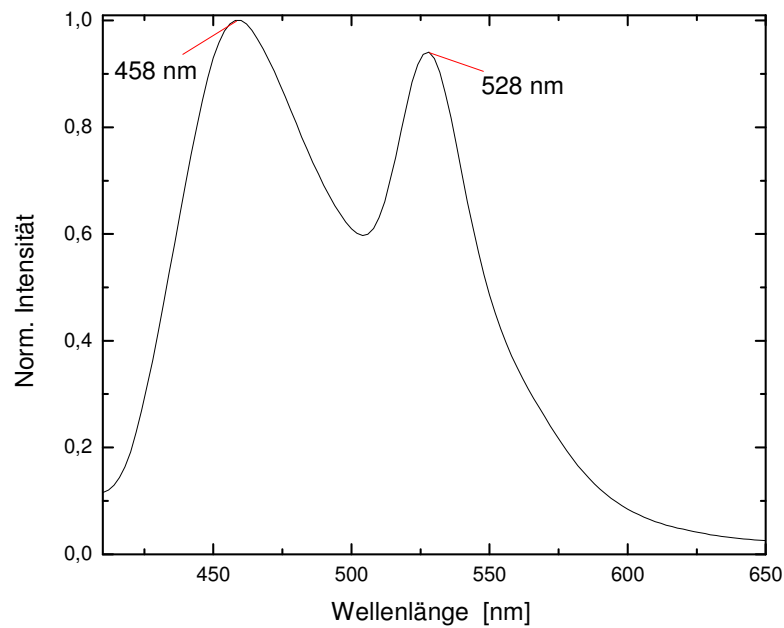


Abbildung 33: Emissionsspektrum des D22 gekoppelt an YFP, $\lambda_{\text{Anr}}=405$ nm.

Bei einer Verwendung eines 440/40 nm Emissionsfilters und $\lambda_{\text{Anr}}=405$ nm wird lediglich die Lebenszeit des D22 detektiert, da die Emissionswellenlänge für YFP außerhalb des verwendeten Emissionsfilters liegt.

Für die Verdeutlichung des FRET ist hier das 2D Spektrum des Komplexes D22-YFP gezeigt, bei dem eindeutig die FRET Emission des YFPs bei Anregung des Donors von $\lambda_{\text{ex}} \sim 250$ nm und der YFP Fluoreszenz von $\lambda_{\text{em}} \sim 530$ nm erkennbar ist. Auch die Anregung der Nebenmaxima von D22 lassen eine Emission von YFP bei 530 nm erkennen. Diese Emission beruht auf dem Energietransfer von D22 auf das YFP.

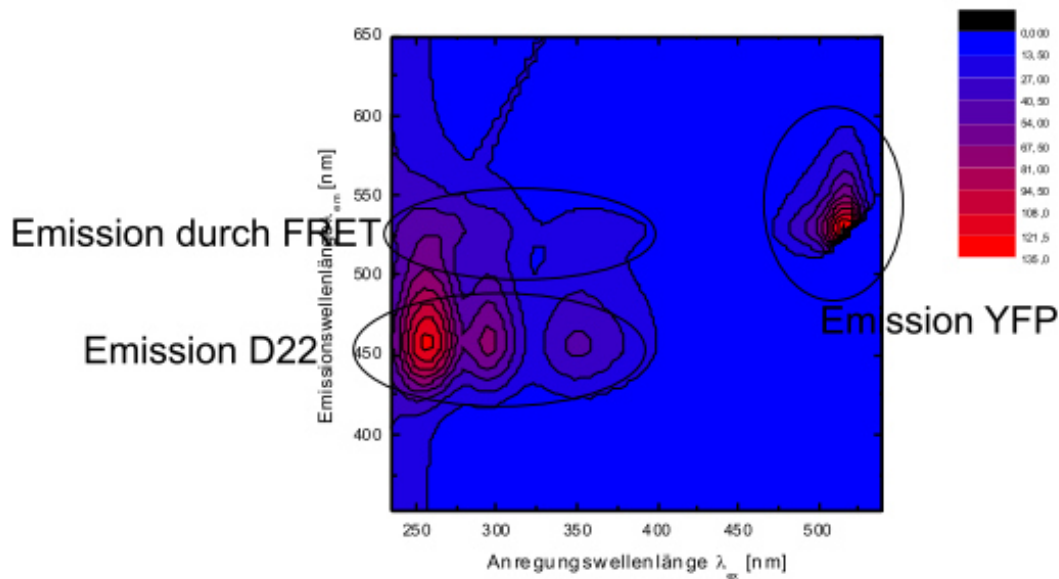


Abbildung 34: 2D Fluoreszenzspektrum des D22-YFP Komplexes.

Die Lebenszeitmessung erfolgt bei 40 MHz und zeigt einen biexponentiellen Abfall der Lebenszeiten, was auf zwei unterschiedliche Lebenszeiten in dem Gemisch hindeutet.

Aus den berechneten Lebenszeiten von $\tau_1 = 0,56$ ns und $\tau_2 = 11,50$ ns ist die Interpretation möglich, dass die kurze Lebenszeit der unterdrückten Lebenszeit von D22 zuzuordnen ist, da durch die Energieabgabe an das YFP die Lebenszeit stark verringert wird. Die lange Lebenszeit ist dem unbeeinflussten D22 zuzuordnen, das zwar an ein YFP gebunden ist, dieses aber keinen intakten Chromophor besitzt und somit nicht als Akzeptor fungieren kann und den Donor nicht quenchend kann.

Im Folgenden soll der Vergleich dieser Messung zum D22-BSA Komplex gezeigt werden.

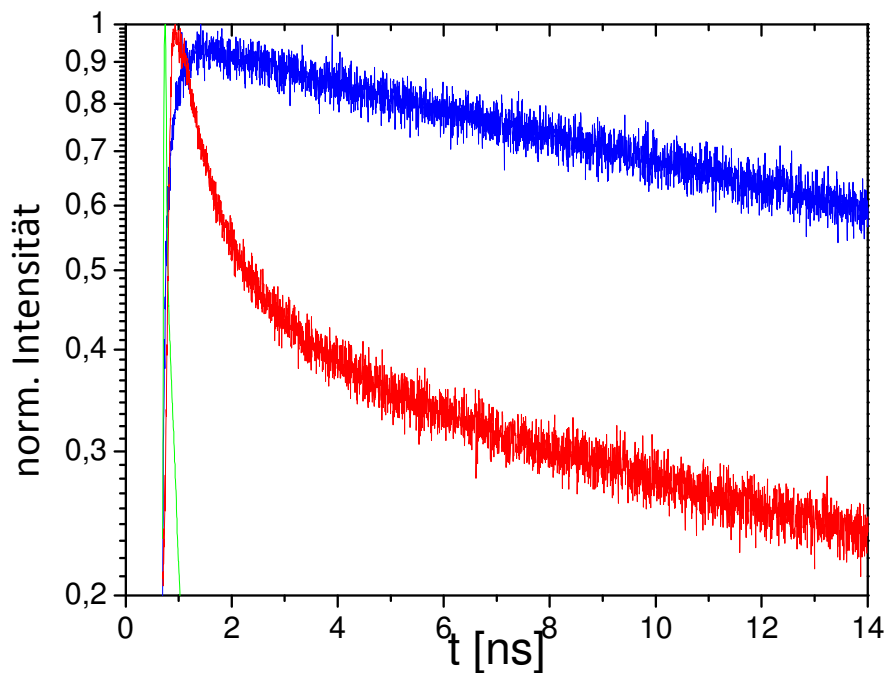


Abbildung 35: Fluoreszenzlebensdauerermessung von D22-YFP (rot), D22-BSA (blau) und der IRF (grün) des TCSPC.

Die berechnete Fluoreszenzlebensdauer vom D22-BSA Komplex beträgt 21,41 ns, gute 10 ns länger als der D22-YFP Komplex mit dem unreifen Chromophor. Diese Differenz kann aus der unterschiedlichen chemischen Struktur von BSA und dem YFP resultieren. Die lange Lebenszeit von D22 an BSA deutet auf eine eingeschränkte Drehbarkeit des Farbstoffes beim BSA hin, wobei hingegen die freie Drehbarkeit bei D22 an YFP, da es außerhalb des Fasses gebunden ist, geringer ist. Durch die freie Drehbarkeit von D22 kann die aufgenommene Energie durch die Anregung auch durch Rotationsbewegungen abgegeben werden und die Lebenszeit ist dadurch verkürzt. Beim BSA ist diese Drehbarkeit eingeschränkt, ggf. ist der Farbstoff noch andere lose Bindungen eingegangen oder ist in einer Tasche „gefangen“. Wenn die Rotationsbewegung eingeschränkt ist, kann die gesamte Energie nur in Form von Fluoreszenz abgegeben werden und es resultiert eine langes Verweilen im angeregten Zustand, ergo eine lange Lebenszeit im Vergleich zu YFP. Es sind jedoch auch andere Prozesse der Fluoreszenzlöschung beim D22 möglich.

4.3.3 Berechnung der CFE

Die verkürzte Lebensdauer des D22 bei der Vermessung des D22-YFP Komplexes ist auf die Energieabgabe an das YFP zurückzuführen. Basierend auf den Lebenszeiten von $\tau_1 = 0,56$ ns und $\tau_2 = 11,50$ ns aus den Daten aus

Abbildung 35 entsteht eine Gleichung mit folgender Form. Dabei wird die Fluoreszenzintensität analog Gleichung 18 berechnet. Dabei gibt A den Anteil der jeweiligen Probenbestandteile mit der entsprechenden Lebenszeit wieder.

$$I(t) = A_1 * e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 * e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad 22$$

Die Werte für die jeweiligen Amplituden werden für die Bestimmung der CFE von YFP im Verhältnis zueinander gesetzt.

$$CFE = \frac{A_1}{A_1 + A_2} = \frac{0,69}{0,69 + 0,31} = 0,69 = 69 \% \quad 23$$

Aus diesen Werten ist zu vermuten, dass ~70 % des YFPs in diesem Komplex mit D22 einen intakten Chromophor aufweisen. Die restlichen 30 % besitzen einen unvollständigen oder keinen Chromophor in ihrem Proteinfass.

Diese Messungen müssen für eine statistische Aussage mit mehreren YFP Chargen durchgeführt werden. Des Weiteren sollten verschiedene Markierungskonzentrationen ausgetestet werden. Eine verlässliche Bestimmung ist jedoch auch aufgrund der nicht ideal vorhandenen Negativkontrolle durch das D22-BSA gegeben. Auch sollten weitere FP getestet werden oder ggf. weitere Farbstoffe zum Markieren für die CFE ausprobiert werden. Dadurch könnten die bisherigen Werte bestätigt werden und auch eine Anwendbarkeit für alle FP erzielt werden. Diese Bestimmung ist für alle quantitativen Messungen von Nöten.

Eine weitere Realisierung der Bestimmung der CFE kann über Nanobodies erfolgen, dies sind fluoreszenzmarkierte Antikörper, die sich selektiv an GFPs und alle weiteren FP binden¹⁴². Auch gibt es experimentelle Ansätze über FCS die CFE zu bestimmen^{28,143,144}.

4.4 Aptamere

Im Folgenden wird eine weitere Möglichkeit für die Bestimmung des CFE vorgestellt. Aptamere können, wie bereits in der Einleitung erwähnt wird, für Drug Delivery, also für das Überbringen von Wirkstoffen in Zellen verwendet werden. Um so einen Wirkstofftransport bzw. in diesem Versuch den Farbstofftransport zu visualisieren und zu quantifizieren, soll hier ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Aptamer, welches spezifisch an die Struktur des GFPs bindet, entwickelt werden. Dieser Komplex soll bei einem reifen Chromophor einen FRET ermöglichen. Der Energietransfer soll in diesem Fall vom GFP auf den Farbstoff erfolgen, welcher an das Aptamer gekoppelt ist. Die Dimensionen des Proteinzylinders sind ~2 nm (Durchmesser) und ~4 nm (Höhe) mit dem Chromophor in der Mitte, so dass ein beliebiger Farbstoff bei direkter Kopplung an das Fass nicht weiter als 2-3 nm weg vom Chromophor des GFPs sein kann. Das führt zu quantitativem FRET.

Als Aptamerenauswahl stehen Variationen zur Verfügung, die entweder affin gegenüber dem HIS-tag des GFPs oder gegenüber einem Argininrest (Arg168) des GFPs sind.

Als potentielle Aptamerensequenzen werden folgende Varianten identifiziert:

Tabelle 1: Übersicht Aptamere und Sequenzen

Target	Name	Sequenz
HIS-tag	6H5 ¹⁴⁵	GGC TTC AGG TTG GTC TGG TTG GGT TTG GCT CCT GTG TAC G
HIS-tag	6H7 ¹⁴⁵	GCT ATG GGT GGT CTG GTT GGG ATT GGC CCC GGG AGC TGG C
Arginin-tag	Hairpinshort ¹⁴⁶	GGG ATC GAA ACG TAG CGC CTT CGA TCC C
Arginin-tag	G-rich ¹⁴⁷	GAC CAG GGC AAA CGG TAG GTG AGT GGT C

An diese Sequenzen wird kommerziell (Firma Sigma) der Farbstoff TAMRA gebunden. Dieser Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum von 555 nm und ein Emissionsmaximum von 580 nm. Das verwendete GFP zur Kopplung ist die Mutante S65T, mit einem

Emissionsmaximum von 510 nm. Somit ist ein möglicher Energietransfer bei Anregung von der S65T Mutante und erfolgreichem Binden des Aptamers an das Protein gegeben und eine Fluoreszenz sollte bei ~580 nm sichtbar sein.

Für die Kopplung des Proteins an das fluoreszenzmarkierte Aptamer werden mehrere Mengenverhältnisse ausprobiert, das Aptamer selbst wird dabei in verschiedenen Konzentrationen im Überschuss ausprobiert. Die Aptamere werden auf 40-50 °C erwärmt, damit die Sekundärstruktur aufbricht und eine Bindung ans Target möglich ist. Dazu wird das GFP bei ~40 °C hinzugegeben und zusammen abgekühlt. Die Inkubationszeit wird bei den Zeiten 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 80 und 60 min getestet. Diese werden bei RT durchgeführt. Bei 60 min Inkubationszeit werden ebenfalls die Temperaturen 4 °C, RT, 37 °C und auch 80 °C ausprobiert.

Der erste verwendete Puffer ist 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 70 mM NaCl, 0,2 mM EDTA. Der zweite Puffer ist ein 10 mM Hepes Puffer, pH 7,4 und 100 mM NaCl. Für beide Puffer wird die gesamte Messreihe wie oben beschrieben durchgeführt.

Leider konnte bei keinem Versuch im Fluoreszenzspektrometer wie auch im FCS (Anregung 488 nm, Emission 590/70 nm) FRET von GFP zu TAMRA nachgewiesen werden. Dies lässt die Interpretation zu, dass das Aptamer nicht an das GFP gebunden ist.

Mehrere Möglichkeiten der Versuchsoptimierung sind nicht realisiert worden, wie zum einen das Reduzieren des EDTAs im Puffer, da EDTA zur Fluoreszenzunterdrückung des Proteins beitragen kann.

Des Weiteren kann eine Denaturierung des Proteins bei der Erwärmung auf ~40 °C eingesetzt haben, die ggf. die Konzentration des intakten bzw. mit richtig gefalteten GFPs so reduziert hat, dass es unter die Nachweisgrenze der einzelnen spektroskopischen Methoden gelangt ist. Jedoch ist die Möglichkeit der Denaturierung nahezu auszuschließen, da GFP höhere Temperaturen ohne Strukturänderungen übersteht⁸⁹. Außerdem ist bei der FCS Nachweismethode keine Kreuzkorrelation mit einer gleichzeitigen Anregung des TAMRA Farbstoffes (bei der Anregungswellenlänge von beispielsweise 546 nm) durchgeführt worden. Dadurch kann nicht sichergestellt werden, dass die Farbstofffluoreszenz vorhanden ist. Der Vergleich mit bisheriger Literatur bekräftigt unsere Versuche, da dort kurze Aptamere (~30 Basen) für eGFP vergeblich gesucht wurden³⁴.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In den Lebenswissenschaften ist die Fluoreszenzmikroskopie ein wichtiges und mächtiges Werkzeug für dreidimensionale Abbildungsmethoden von Geweben und lebenden Zellen. Eine breite Palette von Fluoreszenzfarbstoffen kann für das Markieren von Proteinen und Wirkstoffen verwendet werden mit dem Ziel der Erkundung von zellulären Prozessen und Zielsequenzen.

In dieser Arbeit werden deshalb verschiedenste Fluoreszenzmarker charakterisiert. Als erstes werden 7-Aminocomarine und deren Derivate charakterisiert, die als Marker für Aminosäuren und Peptide eingesetzt werden können. Dabei konnten 24 neue Derivate dieser Farbstoffklasse charakterisiert werden, die alle sehr ähnliche Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. Alle Derivate haben unterschiedliche Seitenketten und können so eine Vielzahl von umgebenden Medien und passend zum Reaktionspartner einen optimierten Fluoreszenzmarker zur Verfügung stellen. Die ähnlichen Fluoreszenzeigenschaften wie Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie auch die ermittelte Fluoreszenzquantenausbeute bieten eine ideale Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der Daten, unabhängig vom Reaktionspartner. Für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen sind weitere Untersuchungen notwendig.

Da extrinsische Farbstoffe das Problem der Zellbarriere und der Giftigkeit gegenüber anderen Zellbestandteilen haben, werden im nächsten Schritt intrinsische Farbstoffe weiter untersucht. Zu dieser Klasse gehören die Fluoreszenzproteine. Ihr Einsatz ist aus der Mikrobiologie heute nicht mehr wegzudenken.

Trotz der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Fluoreszenzproteinen, ist auch eine Vielzahl an ungeklärten Schwierigkeiten (das Photobleichen²⁰, die Photokonversion²¹, das Photoschalten²², Defizite in der Chromophorbildungseffizienz¹⁸ oder auch Schädigungen der Wirtszellen) derzeit bekannt, die weiterhin fehlerbehaftete Ergebnisse liefern.

Für die Problemstellung der Photokonversion, welche auf der Decarboxylierung²⁴⁻²⁷ der Glutaminsäure an der Stelle 222 im Grün fluoreszierenden Protein beruht, ist eine Mutante entwickelt worden, die nicht photokonvertieren kann. Dabei handelt es sich um eine Veränderung von Glutaminsäure zu Histidin an Stelle 222. Die Mutante E222H zeigt keine Photokonversion, ist stabil über einen pH Bereich von 5-11, der Chromophor weist wahrscheinlich einen pK_A Wert von unter 5 auf¹⁶. Allgemein sind die photophysikalischen

Eigenschaften von E222H mit der Mutante S65T sehr gut vergleichbar, E222H hat jedoch den zusätzlichen Vorteil der unterdrückten Photokonversion. Die stabilen Fluoreszenzeigenschaften werden durch die elektronischen Spektren wie auch die Fluoreszenzlebenszeiten über den untersuchten pH Bereich bestätigt. Ein Einsatz unter mikroskopischen Bedingungen ist aufgrund des Mangels an lichtgetriebener Dynamik und der daraus resultierenden stabilen Fluoreszenz möglich. Die Mutante kann auch als Vergleich für Strukturuntersuchungen im Bereich der Decarboxylation verwendet werden. Zudem kann die Mutation E222H zusätzlich eingebaut werden, da auch eine hohe Expressionsausbeute erwartet werden kann. Das größtmögliche Anwendungspotential liegt in der Übertragbarkeit auf andere FP. Für die Übertragung auf andere FP muss jedoch dessen individuelle Struktur in Betracht gezogen werden. Im Fall von dsRed ist die Glutaminsäure an Position 215 zu tauschen. Die Einführung wird vermutlich die Quantenausbeute erhöhen, auch eine Entwicklung einer photostabilen Variante bei anderen Wellenlängenbereichen ist denkbar.

Ein weiterer Nachteil der fluoreszierenden Proteine, der in dieser Arbeit beleuchtet wird, liegt in der Bestimmung der Chromophorbildungseffizienz (CFE). Für die Anwendung von quantitativen Messungen mittels GFP in Zellen ist diese Problemlösung von hoher Wichtigkeit, da die CFE von äußeren Faktoren abhängig ist und ebenso von FP zu FP unterschiedlich ist.

In der Literatur ist bereits vor mehr als 20 Jahren diese Problematik angesprochen worden¹⁸, da bis zu 30 % des Proteins einen unreifen Chromophor besitzen. Ursächlich ist hier die Ausbildung des Chromophors zu sehen, da erst nach der Fassungsausreifung des Proteins die etwa 2-stündige Chromophorausbildung beginnt. Das in dieser Arbeit vorgestellte Modellsystem beruht auf der Verwendung der spektroskopischen Methode des TCSPS. Die Idee der Bindung eines blauen Farbstoffes an das gelb fluoreszierende Protein basiert auf der anschließenden Energieübertragung des Donors (blauer Farbstoff) auf den Akzeptor (YFP). Durch den Energieübertrag nimmt die Lebenszeit des Donors ab und den Amplituden des biexponentiellen Zerfalls kann der Anteil der richtig gefalteten Chromophore in den FP bestimmt werden. Dieses Küvettenexperiment wurde als Machbarkeitsversuch in dieser Arbeit gezeigt; weitere Versuche für die genaue Quantifizierung sind jedoch von Nöten, da die notwendige Negativkontrolle in Form eines definiert nicht absorbierenden Chromophores noch nicht erfolgt ist. Bei dem Modellversuch ist eine CFE von 70 % gefunden worden. Des Weiteren ist die Übertragung auf andere FP noch ausstehend, um so eine allgemeine Aussage über die CFE machen zu können. Für eine *in vivo* Anwendung muss ebenfalls der Donor, in

unserem Fall der blaue Farbstoff, gegen einen ungiftigen und zellgängigen Farbstoff ausgetauscht werden. Auch muss dieser zellgängige Farbstoff eine lange Lebenszeit aufweisen, damit eine gute Auswertbarkeit der Daten bei Abnahme der Lebenszeit gegeben ist.

Um dem Problem der oben angesprochenen Zellgängigkeit entgegenzuwirken, wird in einem nächsten Versuch die Bestimmung der CFE mit Aptameren untersucht. Dafür werden passende Aptamere gesucht, die, markiert an FP, aufgrund ihrer Sequenz an bestimmte Regionen des GFPs binden. Das stellt ein weiteres Modell für die Bestimmung des CFE dar. Die entsprechenden Aptamere zeigten laut Literatur Affinitäten gegenüber dem His-Tag oder Argininresten des GFPs. Der in diesem Fall rote Farbstoff, der an das Aptamer gekoppelt wurde, sollte den Akzeptor darstellen und das GFP den Donor. Leider waren diese Versuche erfolglos, da sich die Kopplung der verschiedenen Aptamerenvarianten an das GFP nicht nachweisen ließ. So sind weitere Versuche in diesem Bereich notwendig; jedoch sollte die Grundidee erneut intensiv überarbeitet werden, da bereits andere Literaturstellen vom Misslingen eines ähnlichen Ansatzes berichtet hatten³⁴. Jedoch haben Aptamere den Vorteil der Membrangängigkeit von Zellen, ggf. wäre ein kombinierter Einsatz über einen zusätzlichen Linker denkbar und möglich.

6 Referenzen

1. Schuler, B. & Hofmann, H. single-molecule spectroscopy of protein folding dynamics-expanding scope and timescales. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 36–47 (2013).
2. Hegner, M. & Grange, W. mechanics and imaging of single DNA molecules. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **23**, 367–375 (2002).
3. Baba, K. & Nishida, K. single-molecule tracking in living cells using single quantum dot applications. *Theranostics* **2**, 655–667 (2012).
4. Janssen, K. P. F. *et al.* single molecule methods for the study of catalysis: from enzymes to heterogeneous catalysts. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 990–1006 (2014).
5. Roeffaers, M. B. J. *et al.* single-molecule fluorescence spectroscopy in (bio)catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12603–12609 (2007).
6. Raj, A. & van Oudenaarden, A. single-molecule approaches to stochastic gene expression. *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 255–270 (2009).
7. Koren, K. *et al.* tuning the dynamic range and sensitivity of optical oxygen-sensors by employing differently substituted polystyrene-derivatives. *Sens. Actuators. B. Chem.* **176**, 344–350 (2013).
8. Wolfbeis, O. S. fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* **80**, 3269–3283 (2004).
9. Widengren, J. *et al.* single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection. *Anal. Chem.* **78**, 2039–2050 (2006).
10. Demchenko, A. P. & Sandrovskii, A. K. determination of tyrosine and tryptophan in proteins by the absorption spectra of derivatives. *Ukr. Biokhim. Zh.* **51**, 687–692 (1979).
11. De Bernardo, S. *et al.* studies on the reaction of fluorescamine with primary amines. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 390–399 (1974).

12. Wirtz, L. *et al.* fluorescence labeling of amino acids and peptides with 7-aminocoumarins. *Synthesis (Stuttg)*. **44**, 2005–2012 (2012).
13. Eggeling, C. *et al.* photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem.* **70**, 2651–9 (1998).
14. Shimomura, O. the discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.* **217**, 1–15 (2005).
15. Nomura, Y. *et al.* monitoring of in vitro and in vivo translation of green fluorescent protein and its fusion proteins by fluorescence correlation spectroscopy. *Cytometry* **44**, 1–6 (2001).
16. Wachter, R. M. *et al.* crystal structure and photodynamic behavior of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**, 9759–9765 (1997).
17. Heim, R. *et al.* wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 12501–12504 (1994).
18. Ormö, M. *et al.* crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392–1395 (1996).
19. Miyawaki, A. *et al.* red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 679–688 (2012).
20. Swaminathan, R. *et al.* photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys. J.* **72**, 1900–1907 (1997).
21. Langhojer, F. *et al.* ultrafast photoconversion of the green fluorescent protein studied by accumulative femtosecond spectroscopy. *Biophys. J.* **96**, 2763–2770 (2009).
22. Bourgeois, D. & Adam, V. reversible photoswitching in fluorescent proteins: a mechanistic view. *IUBMB Life* **64**, 482–491 (2012).
23. Griffin, B. A. specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live

- cells. *Science* **281**, 269–272 (1998).
24. Bell, A. F. *et al.* light-driven decarboxylation of wild-type green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6919–6926 (2003).
 25. Henderson, J. N. *et al.* structure and mechanism of the photoactivatable green fluorescent protein. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4176–4177 (2009).
 26. Van Thor, J. J. *et al.* phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 37–41 (2002).
 27. Habuchi, S. *et al.* evidence for the isomerization and decarboxylation in the photoconversion of the red fluorescent protein DsRed. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8977–8984 (2005).
 28. Foo, Y. H. *et al.* factors affecting the quantification of biomolecular interactions by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **102**, 1174–1183 (2012).
 29. Bag, N. & Wohland, T. imaging fluorescence fluctuation spectroscopy: new tools for quantitative bioimaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **65**, 225–248 (2014).
 30. Durisic, N. *et al.* single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate. *Nat. Methods* **11**, 156–162 (2014).
 31. Mayer, G. the chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 2672–2689 (2009).
 32. Sando, S. *et al.* light-up Hoechst-DNA aptamer pair: generation of an aptamer-selective fluorophore from a conventional DNA-staining dye. *Chembiochem* **8**, 1795–1803 (2007).
 33. Tsuji, S. *et al.* RNA aptamer binding to polyhistidine-tag. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 227–31 (2009).
 34. Stanlis, K. K. H. & McIntosh, J. R. single-strand DNA aptamers as probes for protein localization in cells. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 797–808 (2003).

35. Kong, H. Y. & Byun, J. nucleic acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **21**, 423–434 (2013).
36. Reinemann, C. & Strehlitz, B. aptamer-modified nanoparticles and their use in cancer diagnostics and treatment. *Swiss Med. Wkly*. **144**, 13908 (2014).
37. Li, X. *et al.* smart ligand: aptamer-mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. *J. Control. Release* **171**, 152–162 (2013).
38. Jabłoński, A. über den mechanismus der photolumineszenz von farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Phys.* **94**, 38–46 (1935).
39. Kasha, M. energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates. *Radiat. Res.* **20**, 55–70 (1963).
40. Stokes, G. G. on the change of refrangibility of light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **142**, 463–562 (1852).
41. Ware, W. R. nanosecond time-resolved emission spectroscopy: spectral shifts due to solvent-excited solute relaxation. *J. Chem. Phys.* **54**, 4729 (1971).
42. Förster, T. zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
43. Stryer, L. fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 819–846 (1978).
44. Princ. Fluoresc. Spectrosc., cap.: fluorescence anisotropy, 353–382 (2006).
45. Winter, R. *et al.* *methoden der biophysikalischen chemie*. in Springer vieweg, (1998).
46. Jablonski, A. on the notion of emission anisotropy. *Bull l'Acad Pol Sci, Ser A* **8**, 259–264 (1960).
47. Thiele, C. *et al.* inclusion of chemotherapeutic agents in substituted β -cyclodextrin derivatives. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **69**, 303–307 (2010).
48. Lieto, A. M. *et al.* N. L. ligand-receptor kinetics measured by total internal reflection

- with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **85**, 3294–3302 (2003).
49. Elson, E. L. & Magde, D. fluorescence correlation spectroscopy. I. conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1–27 (1974).
 50. Magde, D. *et al.* thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705–708 (1972).
 51. Orrit, M. photon statistics in single molecule experiments. *Single Mol.* **3**, 255–265 (2002).
 52. Rigler, R. *et al.* fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.* **22**, 169–175 (1993).
 53. Wohland, T. *et al.* the standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **80**, 2987–2999 (2001).
 54. Schwille, P. & Haustein, E. fluorescence correlation spectroscopy. an introduction to its concepts and applications. *Biophys. Textb. Online* 1–33 (2001).
 55. Brock, R. *et al.* rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10123–10128 (1999).
 56. Jung, G. fluorescence correlation spectroscopy: an experimentalist's view of the basics. *Mod. Res. Educ. Top. Microsc.* 855–862 (2007).
 57. Minsky, M. memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* **10**, 128–138 (1988).
 58. Thiele, C. *et al.* nanoparticles of anionic starch and cationic cyclodextrin derivatives for the targeted delivery of drugs. *Polym. Chem.* **2**, 209 (2011).
 59. Terry, B. R. *et al.* molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 21–27 (1995).
 60. Hinkeldey, B. *et al.* comparative photostability studies of BODIPY and fluorescein

- dyes by using fluorescence correlation spectroscopy. *Chemphyschem* **9**, 2019–2027 (2008).
61. Rieger, R. *et al.* fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory. *Am. J. Phys.* **73**, 1129 (2005).
 62. Einstein, A. über die von der molekularinetischen theorie der wärme geforderte bewegung von in ruhenden flüssigkeiten suspendierten teilchen. *Ann. Phys.* **322**, 549–560 (1905).
 63. Widengren, J. *et al.* fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.* **99**, 13368–13379 (1995).
 64. Schwille, P. *et al.* fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 151–156 (2000).
 65. Widengren, J. *et al.* protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS — aspects of the use of fluorescent indicators for measuring pH. *Chem. Phys.* **249**, 259–271 (1999).
 66. Widengren, J. & Schwille, P. characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **104**, 6416–6428 (2000).
 67. Banks, D. S. & Fradin, C. anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophys. J.* **89**, 2960–2971 (2005).
 68. Dandekar, P. *et al.* cellular delivery of polynucleotides by cationic cyclodextrin polyrotaxanes. *J. Control. Release* **164**, 387–393 (2012).
 69. Bollinger, L. M. & Thomas, G. E. measurement of the time dependence of scintillation intensity by a delayed-coincidence method. *Rev. Sci. Instrum.* **32**, 1044 (1961).
 70. Becker, W. fluorescence lifetime imaging--techniques and applications. *J. Microsc.* **247**, 119–136 (2012).

-
71. O'Connor, D. *Time-correlated single photon counting*. (in Elsevier, 1984).
 72. Salthammer, T. numerical simulation of pile-up distorted time-correlated single photon counting (TCSPC) data. *J. Fluoresc.* **2**, 23–27 (1992).
 73. Becker, W. *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*. 81, (Springer Berlin Heidelberg, 2005).
 74. Shimomura, O. *et al.* extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223–239 (1962).
 75. Yang, F. *et al.* the molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1246–1251 (1996).
 76. Prasher, D. C. *et al.* primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229–233 (1992).
 77. Morise, H. *et al.* intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of aequorea. *Biochemistry* **13**, 2656–2662 (1974).
 78. Shimomura, O. structure of the chromophore of aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.* **104**, 220–222 (1979).
 79. Chalfie, M. *et al.* green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805 (1994).
 80. Shinobu, A. *et al.* visualizing proton antenna in a high-resolution green fluorescent protein structure. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 11093–11102 (2010).
 81. Tsien, R. Y. the green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509–544 (1998).
 82. Remington, S. J. fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 714–721 (2006).
 83. Remington, S. J. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Sci.* **20**, 1509–1519 (2011).

-
84. Miyawaki, A. fluorescence imaging in the last two decades. *Reprod. Syst. Sex. Disord.* **62**, 63–68 (2013).
 85. Ohba, Y. *et al.* fluorescent protein-based biosensors and their clinical applications. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **113**, 313–348 (2013).
 86. Sniegowski, J. *et al.* maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of Arg96, Glu222, and Gly67 variants of green fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 657–663 (2005).
 87. Sniegowski, J. *et al.* base catalysis of chromophore formation in Arg96 and Glu222 variants of green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 26248–26255 (2005).
 88. Barondeau, D. P. *et al.* mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12111–12116 (2003).
 89. Reid, B. G. & Flynn, G. C. chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* **36**, 6786–6791 (1997).
 90. Wood, T. I. *et al.* defining the role of arginine 96 in green fluorescent protein fluorophore biosynthesis. *Biochemistry* **44**, 16211–16220 (2005).
 91. Pletneva, N. V. *et al.* structural evidence for a dehydrated intermediate in green fluorescent protein chromophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 15978–15984 (2010).
 92. Stoner-Ma, D. *et al.* observation of excited-state proton transfer in green fluorescent protein using ultrafast vibrational spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 2864–2865 (2005).
 93. Stepanenko, O. V. *et al.* fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr. Protein Pept. Sci.* **9**, 338–369 (2008).
 94. Cubitt, A. B. *et al.* understanding structure-function relationships in the aequeorea

- victoria green fluorescent protein. *Methods Cell Biol.* **58**, 19–30 (1999).
95. Shu, X. *et al.* novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**, 9639–9647 (2006).
96. Chang, H. *et al.* a unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 4455–4460 (2012).
97. Van Thor, J. J. photoreactions and dynamics of the green fluorescent protein. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 2935–2950 (2009).
98. Patterson, G. H. & Lippincott-Schwartz, J. a photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* **297**, 1873–1877 (2002).
99. Inouye, S. & Tsuji, F. I. aequorea green fluorescent protein. expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* **341**, 277–280 (1994).
100. Cubitt, A. B. *et al.* understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 448–455 (1995).
101. Pouwels, L. *et al.* kinetic isotope effect studies on the de novo rate of chromophore formation in fast-and slow-maturing GFP variants†. *Biochemistry* **47**, 10111–10122 (2008).
102. Tuerk, C. & Gold, L. systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
103. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. in vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
104. Robertson, D. L. & Joyce, G. F. selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* **344**, 467–468 (1990).
105. Birnboim, H. C. a rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243–255 (1983).

-
106. Boom, R. *et al.* rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495–503 (1990).
 107. Chen, I. & Dubnau, D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 241–249 (2004).
 108. Genetics and Molecular Biology, *The Johns Hopkins University Press*; 2nd edition, (1993).
 109. Heim, R. *et al.* improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663–664 (1995).
 110. Cramer, A. *et al.* improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* **14**, 315–319 (1996).
 111. Auerbach, D. *et al.* replacement of highly conserved E222 by the photostable non-photoconvertible histidine in GFP. *ChemBioChem* **15**, 1404–1408 (2014).
 112. Wachter, R. M. *et al.* structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* **6**, 1267–1277 (1998).
 113. Sunahara, H. *et al.* design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron-transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5597–5604 (2007).
 114. Ulrich, G. *et al.* the chemistry of fluorescent bodipy dyes: versatility unsurpassed. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 1184–1201 (2008).
 115. Ueno, T. *et al.* rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14079–14085 (2004).
 116. Yee, D. J. *et al.* new tools for molecular imaging of redox metabolism: development of a fluorogenic probe for 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 2282–2283 (2004).
 117. Himo, F. *et al.* copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 210–216 (2005).
 118. Kolb, H. C. *et al.* click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions.

- Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 2004–2021 (2001).
119. Wirtz, L. & Kazmaier, U. A mild titanium-catalyzed synthesis of functionalized amino coumarins as fluorescence labels. *European J. Org. Chem.* **2011**, 7062–7065 (2011).
 120. Jung, G. & Zumbusch, A. improving autofluorescent proteins: comparative studies of the effective brightness of green fluorescent protein (GFP) mutants. *Microsc. Res. Tech.* **69**, 175–185 (2006).
 121. Jung, G. *et al.* the photophysics of green fluorescent protein: influence of the key amino acids at positions 65, 203, and 222. *Biophys. J.* **88**, 1932–1947 (2005).
 122. Wiehler, J. *et al.* mutagenic stabilization of the photocycle intermediate of green fluorescent protein (GFP). *ChemBioChem* **4**, 1164–1171 (2003).
 123. Abbruzzetti, S. *et al.* photoswitching of E222Q GFP mutants: ‘concerted’ mechanism of chromophore isomerization and protonation. *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 1307–1319 (2010).
 124. Quercioli, V. *et al.* photoinduced millisecond switching kinetics in the GFPMut2 E222Q mutant. *J. Phys. Chem. B* **114**, 4664–4677 (2010).
 125. Jung, G. *et al.* two-color fluorescence correlation spectroscopy of one chromophore: application to the E222Q mutant of the green fluorescent protein. *J. Chem. Phys.* **114**, 3149 (2001).
 126. Jahromi, M. T. *et al.* the importance of amino acid interactions in the crystallization of hydroxyapatite. *J. R. Soc. Interface* **10**, 1-14 (2013).
 127. Taylor, W. R. the classification of amino acid conservation. *J. Theor. Biol.* **119**, 205–218 (1986).
 128. Kyte, J. & Doolittle, R. F. a simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132 (1982).
 129. DeLano, W. L. *et al.* mechanism of montmorillonite catalysis in the formation of RNA oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13369–13374 (2009).

-
130. Royant, A. & Noirclerc-Savoye, M. stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of enhanced green fluorescent protein. *J. Struct. Biol.* **174**, 385–390 (2011).
 131. Voliani, V. *et al.* cis-trans photoisomerization of fluorescent-protein chromophores. *J. Phys. Chem. B* **112**, 10714–10722 (2008).
 132. Abbandonato, G. *et al.* cis-trans photoisomerization properties of GFP chromophore analogs. *Eur. Biophys. J.* **40**, 1205–1214 (2011).
 133. Dong, J. *et al.* solvatochromism of the green fluorescence protein chromophore and its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12038–12039 (2006).
 134. Bizzarri, R. *et al.* green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 1107–1122 (2009).
 135. Suhling, K., *et al.* influence of the refractive index on EGFP fluorescence lifetimes in mixtures of water and glycerol. in *Biomarkers Biol. Spectr. Imaging* 92–101 (2001).
 136. Cotlet, M. *et al.* excited-state dynamics in the enhanced green fluorescent protein mutant probed by picosecond time-resolved single photon counting spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **105**, 4999–5006 (2001).
 137. Bastyns, K. *et al.* experimental and theoretical study of electrostatic effects on the isoelectric pH and the pKa of the catalytic residue His-102 of the recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase). *Proteins* **24**, 370–378 (1996).
 138. Haupts, U. *et al.* dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 13573–13578 (1998).
 139. Veetil, S. *et al.* photostability of green and yellow fluorescent proteins with fluorinated chromophores, investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. Chem.* **136**, 38–43 (2008).
 140. Jung, G. *et al.* efficient photoconversion distorts the fluorescence lifetime of GFP in confocal microscopy: a model kinetic study on mutant Thr203Val. *Chemphyschem* **9**,

-
- 1867–1874 (2008).
141. Fung, B. K. & Stryer, L. surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer. *Biochemistry* **17**, 5241–5248 (1978).
142. Ries, J. *et al.* a simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* **9**, 582–584 (2012).
143. Singh, A. P. & Wohland, T. applications of imaging fluorescence correlation spectroscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **20**, 29–35 (2014).
144. Bag N. *et al.* imaging fluorescence fluctuation spectroscopy: new tools for quantitative bioimaging. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **65**, 225–248 (2014).
145. Doyle, S. A. & Murphy, M. B. aptamers and methods for their in vitro selection and uses thereof. US Patent 8,105,982 (2012).
146. Cox, J. C. *et al.* automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res.* **30**, 108 (2002).
147. Bates, P. J. *et al.* discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 151–164 (2009).

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: JABLONSKI DIAGRAMM, S-SINGULETTZUSTÄNDE, T-TRIPLETTZUSTAND, K-RATENKONSTANTEN, K_{12} -ANREGUNG, K_{RAD} -FLUORESZENZRATE, K_{IC} -INTERNE KONVERSION (STRAHLUNGSLOS), K_{23} -INTERSYSTEMCROSSING RATE (SPINVERBOTEN) UND K_{31} -TRIPLETTDEPOPULATIONSRATE.	12
ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG DER STOKES VERSCHIEBUNG AM BEISPIEL VON RHODAMIN 6G.	14
ABBILDUNG 3: ABBILDUNG ZWEIER MOLEKÜLE, IM LINKEN TEIL ERFOLGT KEIN ENERGIETRANSFER AUFGRUND EINES ZU HOHEN ABSTANDES, IM RECHTEN TEIL ERFOLGT BEI NUR MINIMAL GERINGEREM ABSTAND DER ENERGIETRANSFER.	16
ABBILDUNG 4: FLUORESZENZANISOTROPIE DES IDARUBICIN (IDA) ALS FUNKTION DER CD KONZENTRATION, IN WASSER BEI 25 °C. DIE IDA KONZENTRATION IST GLEICHBLEIBEND FÜR ALLE MESSUNGEN ⁴⁷	18
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE FCS KURVEN VON ZWEI PROBEN MIT UNTERSCHIEDLICH VIELEN TEILCHEN IM FOKUS (HELLGRÜN: WENIG TEILCHEN, DUNKELGRÜN: VIELE TEILCHEN). VERGLEICH DER BEIDEN KURVEN WÄRE DURCH DIE NORMIERUNG AUF N MÖGLICH.	19
ABBILDUNG 6: VERWENDUNG DES KONFOKALEN PRINZIPS IN KOMBINATION MIT EINER LOCHBLENDE.	21
ABBILDUNG 7: AUSWIRKUNG DER POSITION DES FLÄCHENDETEKTORS IN BEZUG ZUR ABBILDUNGSSCHÄRFE.	21
ABBILDUNG 8: FCS KURVE DER NANOPARTIKEL MIT DIHYDROXYANTHRAQUINON, DIE ERMITTELTE DIFFUSIONSZEIT AUS DER FITKURVE (ROT) DER KORRELATIONSFUNKTION(SCHWARZE OFFENE PUNKTE) ERGIBT EINE T_{DIFF} VON 7,4 MS ⁵⁸	22
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE FCS KURVE VON ZWEI UNTERSCHIEDLICH GROßEN MOLEKÜLEN (HELLGRÜN: KLEINER HYDRODYNAMISCHER DURCHMESSER, KÜRZERE DIFFUSIONSZEIT UND SOMIT GRÖßERER DIFFUSIONSKOEFFIZIENT; DUNKELGRÜN: GROßER HYDRODYNAMISCHER DURCHMESSER, LÄNGERE DIFFUSIONSZEIT UND SOMIT KLEINERER DIFFUSIONSKOEFFIZIENT).	24
ABBILDUNG 10: FCS KURVE BEI $\lambda_{ANR} = 546$ NM UND EINEM EMISSIONSFILTER BEI 590/70 NM, PROBE IST DAS SIRNA (MIT CY3)-POLYMER(MIT ATTO647) GEMISCH. DIE ERMITTELTEN DIFFUSIONSZEITEN BETRAGEN 514 μ S(+/-46 μ S) UND 7,1 MS(+/-0,52 MS).	26
ABBILDUNG 11: BIOLOGISCHE STRUKTUR VOM GFP, PDB EINTRAG 2WUR. PROTEINKETTE IST FARBLICH VOM N-TERMINUS ZUM C-TERMINUS IN SPEKTRALFARBEN DARGESTELLT ⁸⁰	29
ABBILDUNG 12: MODEL DER CHROMOPORBILDUNG IN S65T- GFP ¹⁷⁸⁹	31
ABBILDUNG 13: IDEE DER BESTIMMUNG DER CHROMOPORBILDUNGSEFFIZIENZ MITTELS MARKIERUNG DES FARBSTOFFES D22.	32
ABBILDUNG 14: IDEE DES PROJEKTS, BEI BINDUNG DES FLUORESZENZMARKIERTEN APTAMERS AN DEN HIS TAG DES GFP FRET ZU ERZEUGEN (RECHTS) UND LINKS DAS EXPERIMENT OHNE BINDUNG UND OHNE ERZEUGUNG VON ENERGIETRANSFER VOM GFP AUF DAS FLUORESZENZMARKIERTE APTAMER.	33
ABBILDUNG 15 FCS SETUP MIT EINER ANREGUNG VON $\lambda = 488$ NM.	35
ABBILDUNG 16: TCSPC SETUP MIT EINER ANREGUNG VON $\lambda = 470$ NM.	36
ABBILDUNG 17: STRUKTURFORMEL VON 8-BUT-3-YNYL-2,3,5,6-TETRAHYDRO-1H,4H-11-OXA-3A-AZA-BENZO[DE] ANTHRACEN-10-ON.	45
ABBILDUNG 18: 8-BUT-3-YNYL-2,3,5,6-TETRAHYDRO-1H,4H-11-OXA-3A-AZA-BENZO[DE] ANTHRACEN-10-ON, ABSORPTIONSMAXIMUM $\lambda_{ABS} = 392$ NM, ANREGUNGSMAXIMUM $\lambda_{AN} = 396$ NM, EMISSIONSMAXIMUM $\lambda_{EM} = 457$ NM.	45
ABBILDUNG 19: STRUKTURFORMEL VON 8-AZIDOMETHYL-2,3,5,6-TETRAHYDRO-1H,4H-11-OXA-	

3A-AZA-BENZO[DE]ANTHRACEN-10-ON.	46
ABBILDUNG 20: 8-AZIDOMETHYL-2,3,5,6-TETRAHYDRO-1H,4H-11-OXA-3A-AZA-BENZO[DE]ANTHRACEN-10-ON, ABSORPTIONSMAXIMUM $\Lambda_{\text{ABS}}=398$ NM, ANREGUNGSMAXIMUM $\Lambda_{\text{AN}}=394$ NM, EMISSIONSMAXIMUM $\Lambda_{\text{EM}}=471$ NM.	47
ABBILDUNG 21: KRISTALLSTRUKTUR VON E222H-GFP (PDB EINTRAG 4P1Q; IN DIESER AUFNAHME SIND DIE BINDUNGEN ZWISCHEN KOHLENSTOFFEN GRÜN.) DIE AUFLÖSUNG BETRÄGT 1.5 Å MIT SAUERSTOFFATOMEN IN ROT UND STICKSTOFF IN BLAU. IN (A) IST DIE ELEKTRONENDICHTEKARTE GEZEIGT, WELCHE MIT DEN KOEFFIZIENTEN $2 \cdot F_{\text{OBS}} - F_{\text{CALC}} $ UND PHASE \square_{CALC} BERECHNET WIRD. DER KONTUREFFEKT IST BEI EINEM GRAD VON 2.6 Σ ÜBER DER MITTLEREN DICHTEN DER KARTE. SAUERSTOFFATOME DER ENGANLIEGENDEN WASSERMOLEKÜLE WERDEN ALS ROTER BEREICH GEZEIGT. IN BEREICH (B) IST DAS GEZEIGT, BEI DEM DIE WTGFP (PDB EINTRAG 2WUR ⁸⁰ ; IN DIESER AUFNAHME SIND DIE BINDUNGEN ZWISCHEN KOHLENSTOFFEN ORANGE; SAUERSTOFFATOME DER WASSERMOLEKÜLE DER WTGFP STRUKTUR SIND ALS SEITENKETTENMARKIERUNG ALS ORANGER BEREICH GEKENNZEICHNET, DIE DES E222H-GFP ALS GRÜNER BEREICH. DER AUSSCHNITT IN DIESER ABBILDUNG WURDE MIT PYMOL ANGEFERTIGT ¹²⁹	49
ABBILDUNG 22: NORMIERTE ABSORPTIONSSPEKTREN DER E222H MUTANTE BEI PH 5 (OFFENE QUADRATE) UND PH 11 (GEFÜLLTE DREIECKE). DIE GERINGERE GESAMTABSORPTION BEI PH 5 ZEIGT DEN BEGINN DER DENATURIERUNG.	50
ABBILDUNG 23: NORMIERTE ANREGUNGS- UND EMISSIONSSPEKTREN DER E222H MUTANTE BEI PH 6 (OFFENE QUADRATE) UND PH 11 (GEFÜLLTE DREIECKE).	51
ABBILDUNG 24: LEBENSZEIT DER MUTANTE E222H (SCHWARZ) UND DER DOPPELMUTANTE T203F/E222H (ROT) IM VERGLEICH IN ABHÄNGIGKEIT VOM PH.	51
ABBILDUNG 25: NORMIERTE FCS KURVEN VON E222H BEI PH 6 (OFFENE DREIECKE) UND PH 10 (OFFENE QUADRATE) BEI EINER INTENSITÄT VON 10 KW/CM ² ($\Lambda_{\text{AN}} = 488$ NM). DIE ROTE KURVE IST DER FIT ZUM DIFFUSIONSTEIL BEI PH 10.	52
ABBILDUNG 26: ABSORPTIONSSPEKTRUM VON EGFP BEI VERSCHIEDENEN PH-STUFEN VON PH10 BIS PH 5 ¹³⁸	53
ABBILDUNG 27: AUTOKORRELATIONSKURVEN VON EGFP BEI VERSCHIEDENEN PH STUFEN 5-11. BEI HOHEN PH STUFEN IST DIE DIFFUSIONSRELAXATION VORRANGIG, HINGEGEN BEI NIEDRIGEN PH STUFEN DIE CHEMISCHE RELAXATION ¹³⁸	54
ABBILDUNG 28: NORMIERTE FCS KURVEN VON E222H BEI PH 10 ($\Lambda_{\text{AN}} = 488$ NM) BEI VERSCHIEDENEN ANREGUNGSINTENSITÄTEN. EINE VERRINGERUNG DER SCHEINBAREN DIFFUSIONSZEIT AUFGRUND HÖHERER ANREGUNGSINTENSITÄT KANN BEOBACHTET WERDEN, WOBEI DIE DYNAMIK BEI KÜRZEREN ZEITEN LEDIGLICH GERINGFÜGIGE LICHTGETRIEBENE DYNAMIK AUFWEIST.	55
ABBILDUNG 29: ANREGUNGS- UND EMISSIONSSPEKTRUM DER DOPPELMUTANTE T203F/E222H BEI PH 7 (QUADRATE) UND PH 10 (DREIECKE).	56
ABBILDUNG 30: SCHEMATISCHER MARKIERUNGSMECHANISMUS VON D22 AN GFP.	59
ABBILDUNG 31: D22 AN BSA, ANREGUNGSSPEKTRUM BEI 480 NM EMISSION (SCHWARZ) UND EMISSIONSSPEKTRUM BEI EINER ANREGUNGSWELLENLÄNGE VON 360 NM (BLAU).	60
ABBILDUNG 32: VERGLEICH DER ABSORPTIONSSPEKTREN VON D22 UND YFP.	61
ABBILDUNG 33: EMISSIONSSPEKTRUM DES D22 GEKOPPELT AN YFP, $\Lambda_{\text{ANR}}= 405$ NM.	62
ABBILDUNG 34: 2D FLUORESZENZSPEKTRUM DES D22-YFP KOMPLEXES.	63
ABBILDUNG 35: FLUORESZENZLEBENSDAUERMESSUNG VON D22-YFP (ROT), D22-BSA (BLAU) UND DER IRF (GRÜN) DES TCSPC.	64

7.2 Publikationen

- [1] C. Thiele, **D. Auerbach**, G. Jung, and G. Wenz, "Inclusion of chemotherapeutic agents in substituted β -cyclodextrin derivatives," *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 69, no. 3–4, pp. 303–307, Feb. 2010.
- [2] C. Thiele, **D. Auerbach**, G. Jung, L. Qiong, M. Schneider, and G. Wenz, "Nanoparticles of anionic starch and cationic cyclodextrin derivatives for the targeted delivery of drugs," *Polym. Chem.*, vol. 2, no. 1, p. 209, 2011.
- [3] L. Wirtz, **D. Auerbach**, G. Jung, and U. Kazmaier, "Fluorescence Labeling of Amino Acids and Peptides with 7-Aminocoumarins," *Synthesis (Stuttg.)*, vol. 44, no. 13, pp. 2005–2012, Jun. 2012.
- [4] P. Dandekar, R. Jain, M. Keil, B. Loretz, L. Muijs, M. Schneider, **D. Auerbach**, G. Jung, C.-M. Lehr, and G. Wenz, "Cellular delivery of polynucleotides by cationic cyclodextrin polyrotaxanes.," *J. Control. Release*, vol. 164, no. 3, pp. 387–93, Dec. 2012.
- [5] X. Le Guével, V. Trouillet, C. Spies, K. Li, T. Laaksonen, **D. Auerbach**, G. Jung, and M. Schneider, "High photostability and enhanced fluorescence of gold nanoclusters by silver doping.," *Nanoscale*, vol. 4, no. 24, pp. 7624–31, Dec. 2012.
- [6] **D. Auerbach**, M. Klein, S. Franz, Y. Carius, C. R. D. Lancaster, and G. Jung, "Replacement of highly conserved E222 by the photostable non-photoconvertible histidine in GFP," *ChemBioChem*, vol. 15, no. 10, pp. 1404–1408, Jul. 2014.

7.3 Konferenzbeiträge

Poster:

B. Hötzer, D. Auerbach, S. Gerharz, S. Altmeier, G. Jung, Ultrasensitive Determination of the Chromophore Formation Efficiency of GFP, 11th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 6.-9. September 2009, Budapest.

D. Auerbach, A. Grüter, B. Hötzer, G. Jung, Ultrasensitive Determination of the Chromophore Formation Efficiency of GFP, Annual Meeting of the German Biophysical Society, 3.-6. Oktober 2010, Bochum.

D. Auerbach, B. Hötzer, G. Jung, GFP - Quantification by Fluorescent Lifetime Measurements, 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence: Spectroscopy, Imaging and Probes, 11.-14. September 2011, Strasbourg.

Vortrag:

D. Auerbach, quantification by fluorescence lifetime measurement, 15. Deutsche Physikerinnentagung, 3. bis 6. November 2011, Saarbrücken.

7.4 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Gregor Jung bin ich im Besonderen zu Dank verpflichtet. Er hat mich in seinen Arbeitskreis als vollwertiges Mitglied aufgenommen, obwohl ich keine Chemikerin bin. Danke für die vielen Diskussionen, der undurchbrechbare Wille, die Ergebnisse immer zu verbessern und die zweifellos berechtigten Stopp-Einwände.

Danke ebenso an Prof. Ingolf Bernhardt, für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für viele gute Ideen für die Umsetzung der Ionen-Messungen in Blutproben; die leider im Enddefekt nicht erfolgreich waren, durch die ich aber trotzdem viel gelernt habe.

Meinem Arbeitskreis, der mir in dieser Zeit zu einer zweiten Familie geworden ist, ein großes Dankeschön. Danke an Benjamin, Silke, Alexander, Babette, Nicole, Seena, Anh-Minh, Tobias, Christian, Björn, Michael, Andreas, Marcel, Alexandra, Caroline und natürlich unsere gute Seele Iris und all die vielen anderen Bachelor- und Hiwi- und Masterstudenten, die ich jetzt vergessen habe!

Danke an die Professoren Kazmaier, Lancaster, Lehr, Ott, Schneider und Wenz und deren Arbeitskreise für die vielen interessanten und lehrreichen Kooperationsprojekte, die auch einen großen Teil dieser Arbeit ausmachen.

Danke an die Werkstatt für die Erstellung aller Bauteile fürs Spektroskopielabor.

Meinen Eltern danke ich, dass sie an mich geglaubt haben und für die stetige Unterstützung.

Im Besonderen danke ich meinem Mann für das tagtägliche Beistehen bei allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit, für das Durchstehen dieser entbehrungsreichen Zeit und für das Genießen der schönen Seiten des Lebens.

Und zuletzt natürlich meinen Kindern, die mir tagein tagaus den Sinn des Lebens zeigen, danke das ihr so seid, wie ihr seid und die Kraft, die ihr mir abverlangt aber auch tausendfach zurückgebt.

DANKE