

Entwicklung eines fern-rot fluoreszierenden Proteins für die Anwendung in der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie



Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte
DISSERTATION
von
M.Sc. Anika Hense
aus
Soest

Dekan:	Professor Dr. Willem Klopper
Referent:	Professor Dr. G. Ulrich Nienhaus
Korreferent:	Professor Dr. Peter Nick
Tag der mündlichen Prüfung:	23. Oktober 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Fluoreszierende Proteine	3
2.1	Struktur der fluoreszierenden Proteine der GFP-Familie	4
2.1.1	3-dimensionale Struktur	4
2.1.2	Bildung des GFP-Chromophors	5
2.1.3	Variationen des GFP-Chromophors und seiner Umgebung	6
2.2	Rot fluoreszierende Proteine	7
2.2.1	Der DsRed-Chromophor	8
2.2.2	eqFP611 und seine Varianten	10
2.3	Spektroskopische Eigenschaften der RFPs mit DsRed-Chromophor	12
2.3.1	Absorption und Fluoreszenz	12
2.3.2	Protonierungszustände des Chromophors	12
2.3.3	ESPT - <i>Excited State Proton Transfer</i>	13
2.4	Anwendung fluoreszierender Proteine in der Zellmikroskopie	15
2.4.1	Photostabilität und Helligkeit	16
2.4.2	Thermostabilität und Maturierungseffizienz	17
2.4.3	Toxizität und Oligomerisierungszustand	18
3	Materialien und Methoden	19
3.1	Molekularbiologie	19
3.1.1	Ortsspezifische Mutagenese	19
3.1.2	Herstellung der rekombinanten Proteine	21
3.1.3	Klonierung	23
3.2	Spektroskopische Charakterisierung	24
3.2.1	Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie	25
3.2.2	Absorptionsspektroskopie	28
3.2.3	Fluoreszenzspektroskopie	31
3.3	Fluoreszenzmikroskopie	34
3.3.1	Konfokalmikroskopie	34

3.3.2	Auflösungsbegrenzung	35
3.3.3	STED-Mikroskopie	37
3.3.4	Probenpräparation	40
3.3.5	Nicht-bildgebende Mikroskopietechniken	41
4	Rationales Design einer rotverschobenen mRuby Variante	43
4.1	Isomerisierung des Chromophors	44
4.1.1	Mutation von Asparagin 143 und Threonin 158	44
4.1.2	Der Austausch von Threonin 158 gegen Asparagin	46
4.1.3	Beeinflussung der Umgebung der Aminosäuren 143 und 158	50
4.1.4	Diskussion	52
4.2	Erweiterung des Wasserstoffbrückennetzwerks	54
4.2.1	Mutation von Methionin 41	54
4.2.2	Stabilisierung der Aminosäure 41 durch Mutation von Glycin 28	56
4.2.3	Beeinflussung der Umgebung von Glycin 28 und Methionin 41	60
4.2.4	Diskussion	61
4.3	Mutationen in der Chromophorumgebung innerhalb des β -Fasses	63
4.3.1	Mutationen in der Helix oberhalb des Chromophors	63
4.3.2	Mutationen an den β -Faltblattsträngen	64
4.3.3	Diskussion	66
4.4	Änderung der π - π -Wechselwirkungen	66
4.4.1	Mutation von Arginin 67 und Histidin 197	69
4.4.2	Absenkung des pK_s	73
4.4.3	Diskussion	77
5	Eigenschaften und Anwendung von mGarnet	79
5.1	Charakterisierung von mGarnet	79
5.2	mGarnet als fluoreszenter Marker in der STED-Mikroskopie	86
5.3	Diskussion	93
6	Ausblick	99
7	Zusammenfassung	101
	Abkürzungsverzeichnis	103
	Literaturverzeichnis	105

1 Einleitung

Die meisten biologischen Prozesse laufen innerhalb der verschiedenen Zellkompartimente im Nano- bis Mikrometerbereich ab. Um die zellulären Abläufe zu verstehen, ist es essentiell, diese zu visualisieren und zu lokalisieren. Eine Schlüsselmethode zur Sichtbarmachung biologischer Strukturen und Reaktionen stellt die optische Mikroskopie dar. Besonders die Fluoreszenzmikroskopie ist seit vielen Jahren eine Standardmethode, um Vorgänge in Zellen und Organismen zu untersuchen, da sie nicht invasiv ist und Teile der Zelle sichtbar gemacht werden können, die unter dem klassischen Lichtmikroskop aufgrund des fehlenden Kontrastes unsichtbar bleiben.^[1,2] Dazu ist es notwendig, die zu untersuchenden Strukturen mit Hilfe von Fluorophoren zu markieren. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Markierung umzusetzen. Zum einen können fluoreszierende Proteine (FPs) in Form von Fusionsproteinen verwendet werden, zum anderen können organische Farbstoffe, z.B. über Antikörper, an bestimmte Proteine gebunden werden. Aber auch die Markierung mit Quantenpunkten, welche intrinsisch fluoreszente Nanokristalle darstellen, ist möglich. Der Nachteil der Quantenpunkte ist, dass sie sehr groß sind und oft toxisch auf lebende Zellen wirken. Damit organische Farbstoffe in die Zelle gelangen können, muss die Zellmembran in den meisten Fällen permeabilisiert werden. Dies bedeutet, dass die Zellen fixiert werden müssen, sodass, mit wenigen Ausnahmen, Farbstoffe nicht für intrazelluläre Untersuchungen an lebenden Zellen verwendet werden können. Des Weiteren kommt es häufig zu Artefakten durch unspezifische Bindung. Zwar sind organische Farbstoffe und Quantenpunkte um ein Vielfaches heller und photostabiler als fluoreszierende Proteine, trotzdem sind FPs die beste Wahl für Untersuchungen an lebenden Zellen. Als Fusionskonstrukt kann die DNA in die Zelle eingebracht und so die Proteine von dieser selbst hergestellt werden.^[2,3]

Durch die stetige Weiterentwicklung der fluoreszenzmikroskopischen Methoden zu z.B. immer höherem Auflösungsvermögen, ist auch der Anspruch an die Eigenschaften der FPs gestiegen. So wurden höchstauflösende Mikroskopietechniken entwickelt, die sich das reversible und irreversible An- und Ausschalten von Fluorophoren zu nutze machen.^[4] Für einige dieser Methoden wie z.B. STED sind hohe Laserintensitäten notwendig, sodass die fluoreszenten Marker eine hohe Photostabilität aufweisen müssen. Aus diesem

Grund steht die Entwicklung neuer, verbesserter FPs seit Jahren im Fokus der Forschung. So wurden z.B. photoaktivierbare FPs entwickelt, die zwischen einem Aus- und einem An-Zustand geschaltet werden können^[5]. Eine weitere bedeutende Eigenschaft ist die Emissionswellenlänge eines FPs. Durch die Entdeckung und Weiterentwicklung verschiedener FP-Typen sind inzwischen FPs mit Anregungs-, und Emissionswellenlängen über den gesamten sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums verfügbar. Dabei sind insbesondere die FPs im roten und fern-roten Bereich von Interesse, da das Anregungslicht in diesem Spektralbereich energieärmer und damit weniger photo-toxisch für lebenden Zellen und Organismen ist. Außerdem wird das rote Licht weniger vom Gewebe gestreut und absorbiert und ist spektral gut trennbar von der grünen Autofluoreszenz der Zellen. Gerade jedoch im fern-roten Bereich des Spektrums gibt es nur eine Hand voll FPs, die für die Anwendung in der Zelmikroskopie geeignet sind.^[6,7]

Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin mit Hilfe von rationalem Proteindesign aus dem monomeren roten FP mRuby^[8] ein fern-rotes fluoreszierendes Protein für die Anwendung in der hochauflösenden Mikroskopie zu entwickeln. Besonders für die Anwendung in der STED-Mikroskopie sind FPs mit fern-roter Absorption und Emission gefragte Marker. Kommerzielle STED-Mikroskope sind üblicherweise mit einem 633–640 nm Anregungslaser und einem 750–800 nm Abregungslaser ausgestattet, sodass es möglich sein sollte, das FP mit diesen Wellenlängen an- und abzuregen.

2 Fluoreszierende Proteine

Fluoreszierende Proteine (FPs) der GFP-Familie sind eine Gruppe homologer Proteine aus marinen Lebewesen, die sich in den letzten 20 Jahren als ideale Markerproteine für die mikroskopische Untersuchung von Zellen bzw. Organismen erwiesen haben und stetig weiterentwickelt wurden. Das erste grün fluoreszierende Protein (*avGFP*) wurde 1962 von Osamu Shimomura in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und als Nebenprodukt des Photoproteins Aequorin isoliert.^[9] Erst 1979 entdeckte Shimomura den Chromophor und beschrieb die fluoreszenten Eigenschaften von *avGFP*.^[10] Nach seiner Entdeckung blieb GFP in der Wissenschaft 30 Jahre lang ungenutzt, bis 1992 Prasher *et al.*^[11] die Primärstruktur aufklären und die cDNA von *avGFP* isolieren konnten. So gelang Chalfie *et al.*^[12] 1994, das *avGFP*-Gen in prokaryotischen (*Escherichia coli*) und eukaryotischen (*Caenorhabditis elegans*) Zellen zu klonieren und zu exprimieren. Seitdem wurden die Eigenschaften des *avGFP* verbessert und weiterentwickelt^[13–18], sodass FPs heute vielerlei Anwendungen in der biologischen und medizinischen Forschung finden. 2008 erhielten schließlich Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien den Nobelpreis für Chemie für "die Entdeckung und Weiterentwicklung des grün fluoreszierenden Proteins".^[19,20] Die FPs verdanken ihre Erfolgsgeschichte vor allem der Tatsache, dass sie für ihre Faltung keine Chaperone oder Kofaktoren benötigen und der Chromophor allein mit Hilfe von molekularem Sauerstoff autokatalytisch gebildet wird. Außerdem sind sie relativ stabil gegen Hitze, chemisch induzierte Denaturierung und Proteasen.^[21] Dadurch eignen sie sich als Fusionspartner zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen bei *in vivo* Zellexperimenten.

Neben den in den letzten Jahren aus *avGFP* entwickelten blau (BFP), cyan (CFP) und gelb (YFP) emittierenden Varianten wurde auch eine neue Klasse FPs aus Korallen isoliert, die im orangenen und roten Bereich emittieren.^[22] Damit sind FPs in allen Bereichen des sichtbaren Spektrums verfügbar.^[23–25] Neben den FPs der GFP-Familie wurden auch Phytochrom-basierte FPs aus Bakterien gewonnen, deren Absorptions- und Emissionswellenlängen sogar im nah-infraroten Bereich liegen.^[26,27]

Alle FPs der GFP-Familie können auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeführt werden.^[28–30] Die Struktur dieser FPs ist hochkonserviert, was darauf hinweist, dass

sie eine essentielle Rolle für ihren Wirt besitzen. Ihre genaue Aufgabe ist jedoch unklar, allerdings gibt es verschiedene Vorschläge für die physiologische Bedeutung der FPs. So könnten sie möglicherweise Sonnenlicht in Licht für die Photosynthese umwandeln^[30–32] oder zur Kommunikation^[28], als Photorezeptor^[30,32], als photochemischer Stoff im Metabolismus^[33,34] oder als Antioxidant^[35,36] dienen.

2.1 Struktur der fluoreszierenden Proteine der GFP-Familie

2.1.1 3-dimensionale Struktur

Die 3-dimensionale Struktur der fluoreszierenden Proteine ist hochkonserviert. Die 220–240 Aminosäuren (25–30 kDa) falten autokatalytisch, ohne Einwirkung von Kofaktoren in eine sogenannte β -Fasstruktur, die aus elf antiparallel angeordneten β -Faltblattsträngen besteht (Abbildung 2.1 a). Das β -Fass hat eine Höhe von 42 Å und einen Durch-

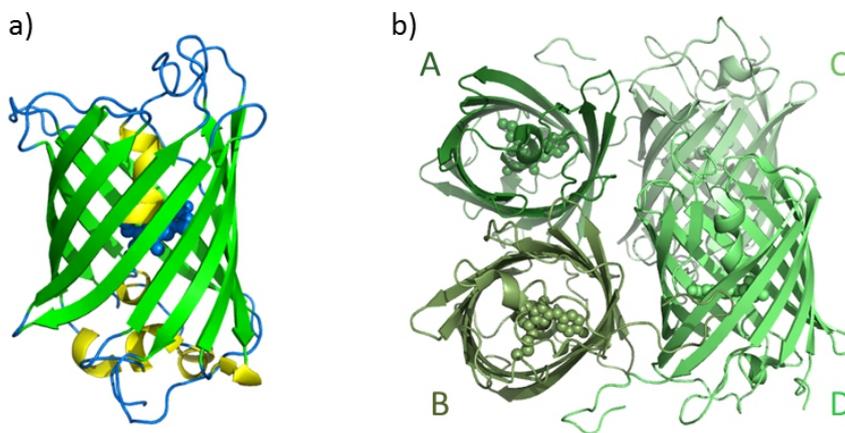


Abbildung 2.1: Struktur der fluoreszierenden Proteine. a) Kristallstruktur eines FP-Protomers. Das elfsträngige β -Fass (grün) umgibt die zentrale α -Helix (gelb) mit dem Chromophor (blaue Kugeln) (*protein data bank*, PDB, Zugangscode: 1GFL). b) Zwei Dimerpaare bilden ein Tetramer mit A/B (C/D) und A/C (B/D) Grenzflächen (PDB: 3E5W).

messer von 24 Å.^[37,38] Oben und unten wird das Fass von je einer α -Helix verschlossen. Im Zentrum befindet sich eine weitere Helix und die Aminosäuren, die den Chromophor bilden.^[39,40] Die meisten FPs, insbesondere solche aus Korallen und Anemonen, haben die Tendenz zu oligomerisieren.^[41,42] So bilden FPs häufig Tetramere, die aus antiparallel

angeordneten Dimerpaaren bestehen (Abbildung 2.1 b). Jedes Monomer interagiert dabei mit zwei weiteren Monomeren, sodass zwei Sorten Grenzflächen entstehen. Während die A/B-Grenzfläche hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen zusammengehalten wird, besitzt die A/C Grenzfläche viele elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen polaren Aminosäuren und Wassermolekülen.^[39,40]

Da viele FPs aus Lebewesen stammen, die in kalten Gewässern beheimatet sind, ist in den meisten Fällen die Proteinfaltung bei Temperaturen unter Raumtemperatur sehr effizient, während sie bei 37°C kaum oder gar nicht stattfindet.^[37,43] Die Fähigkeit, auch bei höheren Temperaturen optimal zu falten, kann jedoch häufig durch die Mutation einzelner Aminosäuren erlangt werden.^[44,45]

2.1.2 Bildung des GFP-Chromophors

Der GFP-Chromophor, 4-(p-Hydroxybenzyliden)-5-imidazolinon (p-HBI), ist in allen natürlich vorkommenden Proteinen der GFP-Unterfamilie konserviert. Er wird autokatalytisch, ohne die Beteiligung von Kofaktoren, aus dem Tripeptid S65-Y66-G67 (Nummerierung nach GFP) gebildet.^[14] Im ersten Schritt der Chromophorbildung greift das N α -Atom des Glycins nukleophil die Carbonylgruppe des Serins an, sodass ein heterozyklisches Intermediat entsteht (Abbildung 2.2). Anschließend wird ein Wassermolekül abgespalten und die C α -C β -Bindung oxidiert.^[46] Dieser letzte Schritt kann nur in Anwesenheit von Sauerstoff stattfinden, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird. Der reife Chromophor kann in protonierter (neutraler) Form oder in deprotonierter (geladener) Form vorliegen. Zur Maturierung des Chromophors ist die strukturierte Proteinumge-

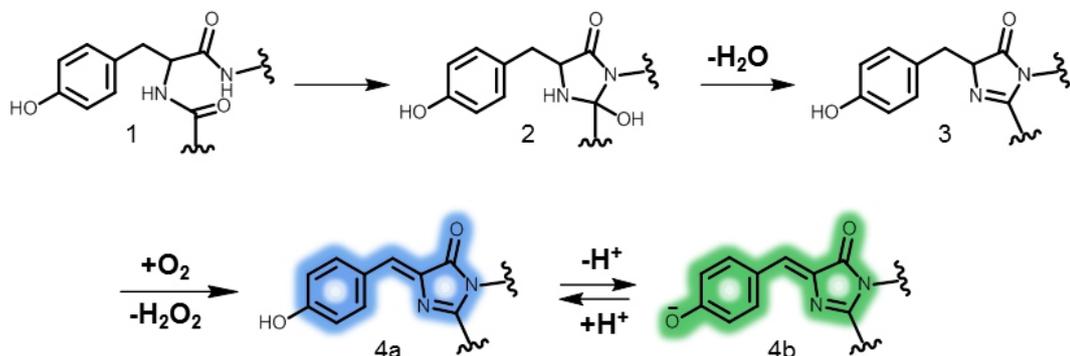


Abbildung 2.2: Mechanismus der Chromophorbildung in GFP. Ausgehend von dem Tripeptid Serin-Tyrosin-Glycin, entsteht durch Zyklisierung, Dehydrierung und Oxidation der p-HBI-Chromophor. Dieser kann in protonierter und deprotonierter Form vorliegen.

bung notwendig sowie zwei konservierte Reste, Arginin 96 und Glutaminsäure 222.^[47–50] R96 und E222 sind an der Katalyse der Zyklisierung des Chromophors beteiligt. Mit seiner positiven Ladung bildet R96 eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Imidazolinonrings, wodurch der nukleophile Charakter des Glycin-Stickstoffatoms verstärkt wird. E222 könnte als Base fungieren und die Abspaltung eines Protons vom heterozyklischen Intermediat beschleunigen.^[51,52] Eine Ausnahme bildet *acGFPL*, welches ursprünglich nicht fluoreszent ist und erst durch den Austausch von E222 gegen Glycin grün fluoresziert.^[53] Je nach FP braucht die Chromophormaturierung Minuten bis Stunden.

2.1.3 Variationen des GFP-Chromophors und seiner Umgebung

Der Chromophor aller fluoreszierenden Proteine besteht aus einem Tripeptid X-Z-G. Dabei ist die erste Aminosäure (X) variabel, die zweite Aminosäure (Z) eine aromatische Aminosäure und die dritte Aminosäure das konservierte Glycin, ohne das keine Chromophormaturierung stattfinden kann. Zwar ist Y66, als zweite Aminosäure im Chromophor, in allen GFP-Verwandten ebenfalls konserviert, aber nicht essentiell für die Bildung des Chromophors. So kann es gegen andere aromatische Aminosäuren ausgetauscht werden, was zur Veränderung des π -Elektronensystems des Chromophors und damit zu einer Änderung in der Fluoreszenz führt.^[15,54–56] Durch den Austausch des Tyrosins gegen Histidin bzw. Tryptophan entstehen blau fluoreszierende Proteine (BFP) bzw. cyan fluoreszierende Proteine (CFP) (Abbildung 2.3).^[17,57] BFPs und CFPs besitzen meist eine viel geringere Helligkeit und Photostabilität als GFPs. Durch Änderung der Chromophorumgebung ist es jedoch gelungen, diese Eigenschaften zu verbessern. So konnte durch zwölf Mutationen in Chromophornähe, die die Bewegungen des Chromophors einschränken, Azurit, ein BFP mit verbesserter Helligkeit und Photostabilität entwickelt werden.^[58] Auch bei GFP selbst konnte die Helligkeit durch den Austausch von S65 im Chromophor gegen Threonin erhöht werden. Während im GFP-Wildtyp (Wt) der Chromophor bei physiologischem pH sowohl neutral als auch anionisch vorliegt, befindet er sich in der verbesserten Variante (EGFP, *enhanced* grün fluoreszierendes Protein) hauptsächlich in der anionischen (helleren) Form.^[13,59] Es ist auch möglich, die Emission des GFP-Chromophors bathochrom zu verschieben. Diese Rotverschiebung wurde im gelb fluoreszierenden Protein (YFP) durch die Mutation T203Y erzeugt. Der Phenylring des Tyrosins geht π - π -Wechselwirkungen mit dem Phenylring des Chromophors ein und erweitert dadurch dessen π -Elektronensystem.^[60] Mit 530 nm hat YPet, eine verbesserte Variante des YFPs, die längste Emissionswellenlänge aller aus *avGFP* entwickelten FPs.^[22,55] Damit emittieren die Proteine der GFP-Unterfamilie zwischen

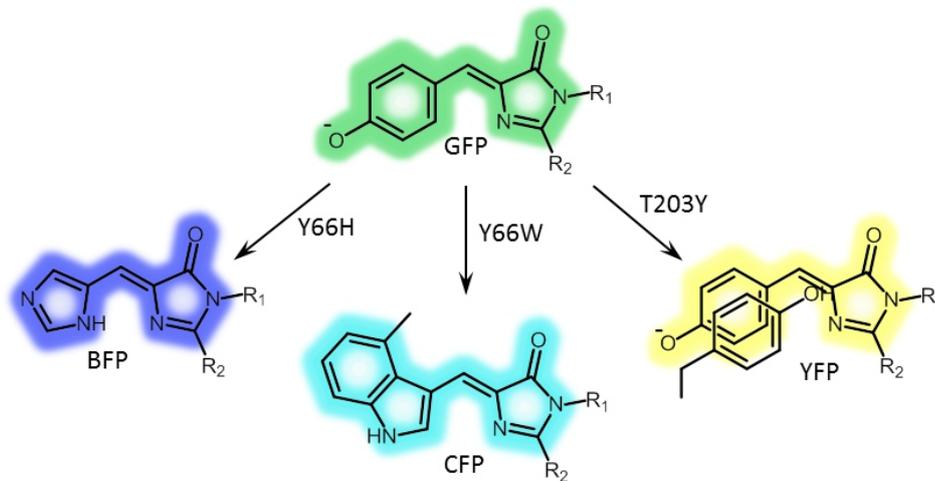


Abbildung 2.3: Variationen des GFP Chromophors. Durch Austausch von Tyrosin 66 im GFP-Chromophor gegen Histidin oder Tryptophan entsteht ein blau- bzw. cyan-fluoreszierender Chromophor. Die Mutation T203Y ermöglicht π - π -Wechselwirkungen mit dem p-HBI-Chromophor, sodass die Fluoreszenz bathochrom verschoben wird.

440 nm und 530 nm und erreichen eine Emission von cyan bis gelb, aber nicht orange oder rot.^[61–63] Erst 1997 wurden neue FPs in Korallen entdeckt, die grundlegend andere spektrale Eigenschaften als GFP zeigten und eine Emission im roten Spektralbereich aufweisen und daher als rot fluoreszierende Proteine (RFP) bezeichnet werden.^[64]

2.2 Rot fluoreszierende Proteine

Rot fluoreszierende Proteine stammen aus Blumentieren (*Anthozoa*), wie Korallen und Anemonen. Sie besitzen ein Emissionsmaximum über 560 nm und sind damit orange, rot und fern-rot. Zwar sind nur 20–30% der Aminosäuren bei GFPs und RFPs identisch, trotzdem ist die 3-dimensionale β -Fasstruktur hochkonserviert. Während GFPs von oben betrachtet rund sind, haben RFPs jedoch eher eine elliptische Form.^[38] Die meisten RFPs sind Tetramere.^[65,66] Die Oligomerisierung kann durch Mutationen im Grenzflächenbereich verhindert werden, was jedoch oft die Chromophormaturierung negativ beeinflusst und somit zum Verlust der Fluoreszenz bzw. Helligkeit führt.^[41,67] Es erwies sich als äußerst schwierig aber möglich, RFPs zu monomerisieren ohne die Fluoreszenz zu zerstören.^[8] Ein weiteres Problem zeigt sich in der Tendenz der RFPs zu aggregieren. Dadurch besitzen sie eine geringe Toleranz als Fusionsproteine, da die Aggregate für die Zellen toxisch wirken.^[68,69] Doch auch hier zeigten sich mehrere Möglich-

keiten, das Problem zu umgehen. So kann die Aggregation z.B. durch den Austausch von positiv geladenen Aminosäuren am N-Terminus durch neutrale oder negativ geladene Aminosäuren verringert werden.^[38] Oder es können intramolekulare FP-Dimere (*head-to-tail-cross-linking*) als Fusionsprotein verwendet werden. Diese haben meist dieselben Eigenschaften wie das Original, aber eine geringere Aggregationstendenz. Beispiele hierfür sind HcRed^[70], mKeima^[71], Katushka2^[72] und DsRed^[41,73].

Die ersten RFPs wurden 1997 aus der Artengruppe *Anemonia sp.*^[74] und 1999 aus der nicht-biolumineszenten Scheibenanemone *Discosoma sp.*^[64] isoliert. Aus einem von ihnen, genannt drFP583, entstand das optimierte, erste kommerziell erhältliche RFP DsRed.^[64] Im Vergleich zu GFP-ähnlichen FPs zeigt DsRed deutlich andere spektrale Eigenschaften, was in erster Linie auf die unterschiedliche Chromophorstruktur zurückzuführen ist.

2.2.1 Der DsRed-Chromophor

Die Chromophore der RFPs sind in zwei Klassen eingeteilt, die Kaede-Typen^[75] und die DsRed-Typen^[76], benannt nach den Proteinen, in denen sie zuerst gefunden wurden. Die meisten Anthozoen-FPs besitzen einen DsRed Chromophor. Dieser kann wiederum in drei Typen unterteilt werden (*kindling fluorescent proteins* (KFP)^[77-79], zFP538^[64,80] und mOrange/KO^[81-83]), mit mindestens einem FP als Vertreter. Im Vergleich zum p-HBI-Chromophor weist der DsRed-Chromophor eine zusätzliche $C_{\alpha}=N$ -Doppelbindung in der ersten Aminosäure auf.^[84-88] Absorption und Fluoreszenz des DsRed-Chromophors sind aufgrund der daraus resultierenden N-Acyliminbindung ($C=N-C=O$) rotverschoben.^[89] Die erste Aminosäure des chromophorbildenden Tripeptids ist variabel und im Falle von DsRed und vielen anderen RFPs ein Glutamin. Aber auch Methionin, Lysin und Phenylalanin wurden an dieser Stelle gefunden. Die zweite (Tyrosin) und dritte (Glycin) Aminosäure im Chromophor sind konserviert. Im Gegensatz zu den GFP-verwandten Proteinen maturieren die meisten RFPs deutlich besser bei 37°C als bei niedrigeren Temperaturen. Ausnahmen bilden eqFP578 und eqFP611.^[43,67,90]

Die mechanistischen Details der Bildung des DsRed-Chromophors in RFPs wurden kontrovers diskutiert.^[91-95] Da DsRed und viele andere RFPs eine grün fluoreszierende Spezies enthalten, die während des Maturierungsprozesses zeitlich vor der roten Spezies auftaucht, wurde zunächst angenommen, dass der rote Chromophor aus dem anionischen grünen Chromophor durch einen zusätzlichen Oxidationsschritt entsteht.^[40,76,96] Allerdings wurde auch beobachtet, dass der Chromophor während der Maturierung auf einer Zwischenstufe (z.B. grün) stehen bleibt.^[97] So wurde alternativ vorgeschlagen, dass der neutrale grüne Chromophor, der auch als Intermediat im Maturierungsprozess

auftaucht, oxidiert und anschließend deprotoniert wird.^[92] Nachdem während der Chromophormaturierung auch blau fluoreszierende Intermediate identifiziert wurden,^[95,98,99] wurde ein neues Modell entwickelt (Abbildung 2.4).^[94] Durch Zyklisierung, Oxidation und Dehydrierung entsteht zunächst der Imidazolinonring (Abbildung 2.4, Spezies 3). Durch anschließende Dehydratisierung und Deprotonierung wird eine weitere Doppelbindung gebildet. Diese entsteht entweder zwischen C_α63–N63 (N-Acyliminbindung) (Nummerierung nach eqFP611) oder zwischen C_α64–C_β64, sodass dieser Schritt in einer grünen (Abbildung 2.4, Spezies 4) bzw. blauen (Abbildung 2.4, Spezies 5) Chromophorspezies resultiert. Die blaue Spezies kann dann weiter in den rot fluoreszierenden Chromophor (Abbildung 2.4, Spezies 6) oxidiert werden, während die grüne Spezies unvollständig maturiert bleibt. Die Bildung der N-Acyliminbindung ist langsam und

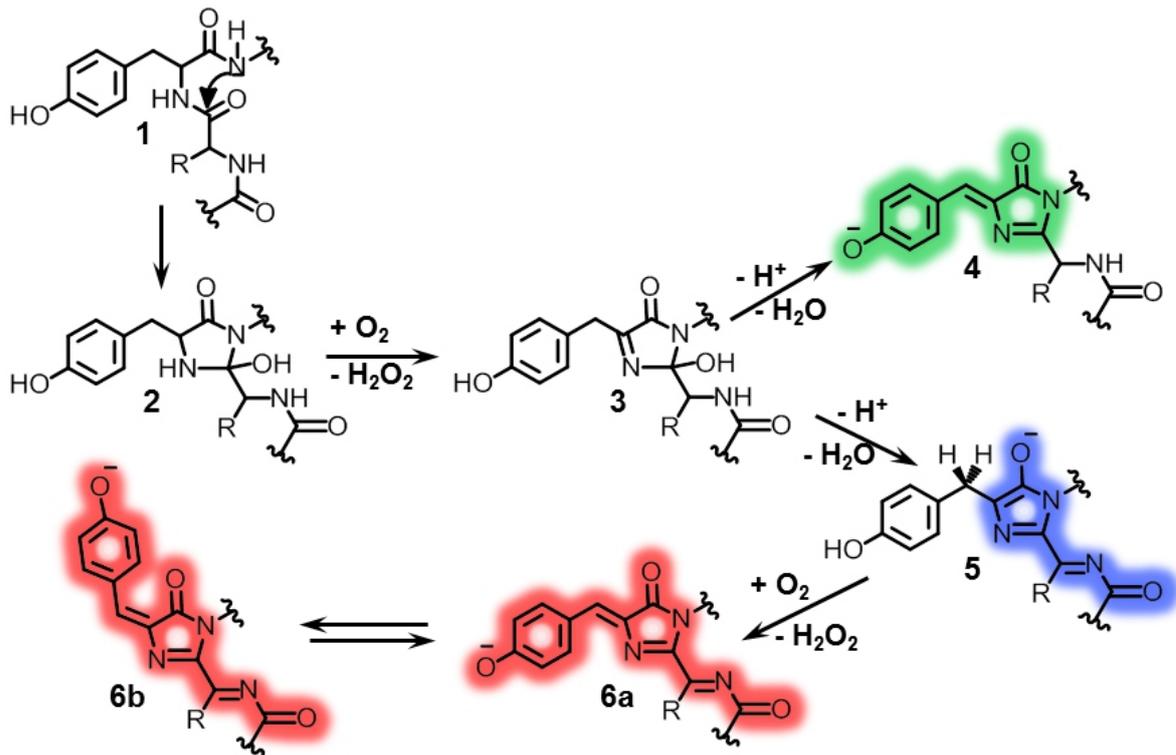


Abbildung 2.4: Möglicher Weg zur Bildung des DsRed-Chromophors. Aus dem Tripeptid X63-Y64-G65 (Nummerierung nach eqFP611) entsteht durch Zyklisierung, Oxidation und Dehydratation eine Vorstufe des Chromophors (1-3). Aus diesem Vorläufermolekül entsteht durch alternative Einführung einer Doppelbindung entweder eine grüne (4) oder eine blaue (5) Chromophorspezies. Die blaue Spezies kann durch einen weiteren Oxidations-/Dehydratationsschritt und den rot fluoreszierenden Chromophor (6) maturieren. Dieser kann in *cis*- oder *trans*-Konformation vorliegen.

stellt den zeitlich limitierenden Schritt bei der Maturierung des roten Chromophors dar.^[24] Neben den chromophorbildenden Aminosäuren Y64 und G65 sind zwei weitere Aminosäuren nahe des Chromophors, R92 und E215, konserviert und für die Chromophorbildung notwendig.^[38] R92 fungiert als elektrostatischer Katalysator, der das Enolat-Intermediat im ersten Schritt der Chromophorbildung stabilisiert. Jeder Austausch gegen eine andere Aminosäure mit Ausnahme von Lysin resultiert in einer Verzögerung der Chromophormaturierung bis hin zu Monaten.^[49] E215 dient wahrscheinlich als Basenkatalysator, der die Amid-Gruppe von G65 deprotoniert.^[50] In z2FP574 entsteht die N-Acyliminbindung durch gekoppelte Oxidation-Decarboxylierung der ersten Aminosäure D66 im Chromophor.^[87,100] Durch solche autokatalytischen, posttranslationalen Reaktionen an der N-Acyliminbindung entstehen auch Proteine wie zFP538^[80], mOrange^[73] oder asFP595^[77].

Der Chromophor kann zwei Konformationen annehmen, *cis* (Abbildung 2.4 Spezies 6a) oder *trans* (Abbildung 2.4 Spezies 6b). Isoliert betrachtet ist die *cis*-Konformation gegenüber der *trans*-Konformation energetisch bevorzugt.^[78] In allen RFPs mit DsRed-Chromophor liegt dieser in der *cis*-Form vor^[84–87] mit Ausnahme von eqFP611, welches einen planaren *trans*-Chromophor besitzt.^[101] Die Planarität ist hierbei entscheidend für die Fluoreszenz. Dies zeigen Kristallstrukturen nicht-fluoreszierender Chromoproteine, die alle einen nicht-planaren *trans*-Chromophor aufweisen.^[84,86] Auch die Photoaktivierbarkeit von ursprünglich nicht-fluoreszierenden Anthozoen-Chromoproteinen (KFP, asFP595) wird auf die *trans-cis*-Isomerisierung zurückgeführt^[102], ähnlich dem Mechanismus von photoaktivierbaren GFPs.^[103]

2.2.2 eqFP611 und seine Varianten

Das aus der Blasenanemone (*Entacmaea quadricolor*) isolierte eqFP611 hat von allen bisher bekannten natürlich vorkommenden FPs die Emission mit der längsten Wellenlänge (611 nm) und die größte Stokes-Verschiebung (52 nm).^[43,104] Der Chromophor (2-Iminomethyl-5-(4-hydroxybenzyliden)-imidazolinon) wird autokatalytisch aus dem Tripeptid M63-T64-G65 gebildet und liegt in einer koplanaren *trans*-Konformation vor.^[101,105] Der *trans*-Chromophor wird durch Wasserstoffbrücken zwischen dem O-Atom der Hydroxybenzylgruppe und den Aminosäuren S158 und N143 stabilisiert (Abbildung 2.5 a). Außerdem wird der Chromophor durch ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken zwischen den umliegenden Aminosäuren K67, E145, Y178, H197, E215 und Wassermolekülen in seiner planaren Struktur gehalten (Abbildung 2.5 b). Das hochplanare Wasserstoffbrückennetzwerk ist auch für die große Stokes-Verschiebung in eqFP611 verantwortlich.^[106] Dass hauptsächlich die Aminosäure 143 für die Stabilisierung des

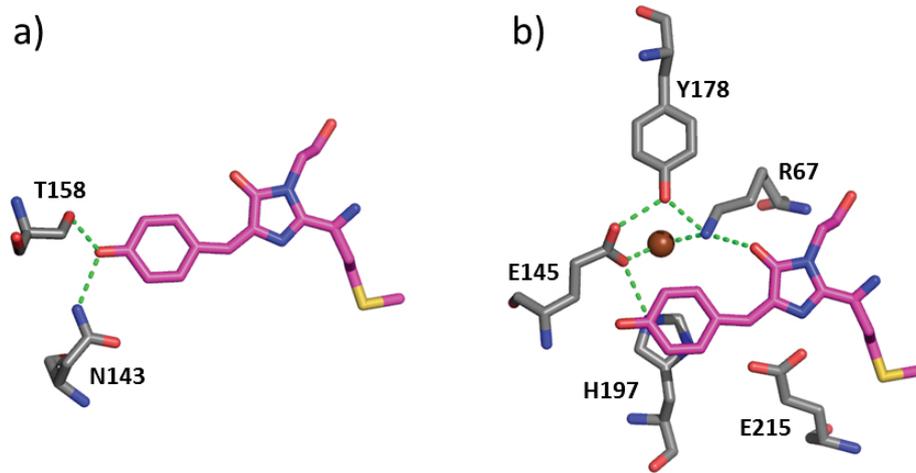


Abbildung 2.5: Chromophorumgebung in eqFP611. a) Der Chromophor wird durch Wasserstoffbrücken zwischen dem O-Atom der Hydroxybenzylgruppe und den Seitenketten der Aminosäuren N143 und T158 in *trans* Konformation stabilisiert. b) Ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Aminosäuren unter dem Chromophor halten diesen in seiner planaren Struktur (PDB: 1UIS).

cis-Chromophors verantwortlich ist, zeigt die eqFP611-Variante RFP630. Durch die Mutation N143S liegt in dieser Variante der Chromophor sowohl in *trans*- als auch in *cis*-Konformation vor.^[44] Die Emission ist zu 630 nm rotverschoben, was zeigt, dass der *cis*-Chromophor eine längere Emissionswellenlänge besitzt als der *trans*-Chromophor. Durch zwei zusätzliche Mutationen, S171F und V184D, konnte die Faltung von RFP630 verbessert werden. Gleichzeitig ist das Emissionsmaximum zu 618 nm verschoben, sodass diese Variante als RFP618 bezeichnet wurde. Bei RFP618 konnte beobachtet werden, dass das Verhältnis von *cis*- und *trans*-Chromophor durch die Expressionsbedingungen beeinflusst wird. So ist, je nachdem welche Spezies überwiegt, die Emission in Richtung 611 nm bzw. 630 nm verschoben. Durch Mutation der Aminosäure 158 konnte der Chromophor schließlich vollständig in die *cis*-Konformation gebracht werden. So entstanden die Varianten RFP637 (S158A) und RFP639 (S158C), die beide jedoch auch geringe Mengen einer grünen Chromophorspezies enthalten.^[44] Somit ist eqFP611 das einzige FP, in dem *cis*- und *trans*-Chromophor planar stabilisiert werden können und dadurch fluoreszent sind.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Anthozoen-FPs faltet eqFP611 nur bei einer Temperatur unter 30°C. Durch die zwei Mutationen I57V und F102I wird jedoch die Faltung bei 37°C möglich. Es hat sich gezeigt, dass besonders die Aminosäure 102 stark zur Verbesserung der Thermostabilität beiträgt, wenn es sich um eine kleine aliphatische Aminosäure handelt.^[44] Wie alle in der Natur vorkommenden RFPs ist eqFP611 ein Te-

tramer. Zwei funktionelle Dimere, d1eqFP611 bzw. d2eqFP611, konnten aber durch die Mutationen V124T bzw. T122R in der A/B-Grenzfläche generiert werden.^[67] Auch die Monomerisierung gelang durch nur zwei Mutationen (T122R in der A/B-Grenzfläche und F194A in der A/C-Grenzfläche). Dies führte jedoch zum vollständigen Verlust der Fluoreszenz. Erst durch 20 weitere Mutationen konnte die Fluoreszenz wieder hergestellt werden. Daraus entstand das monomere RFP mRuby, das im Vergleich zu eqFP611 insgesamt 28 Mutationen beinhaltet und vier Aminosäuren kürzer ist.^[8,67]

2.3 Spektroskopische Eigenschaften der RFPs mit DsRed-Chromophor

2.3.1 Absorption und Fluoreszenz

Der rote DsRed-Chromophor absorbiert im Bereich zwischen 560 nm und 590 nm und emittiert zwischen 590 nm und 670 nm. Varianten mit Anregungs-/Emissionsmaxima über 590/630 nm werden als fern-rote RFPs bezeichnet.^[93] Der Chromophor kann in *trans*- oder *cis*-Konformation vorliegen, wobei der Chromophor in der *cis*-Form bei längeren Wellenlängen absorbiert und emittiert als in der *trans*-Form.^[107] Der Unterschied wird durch den Vergleich der Spektren der eqFP611 Varianten mRuby und RFP639 deutlich (Abbildung 2.6). In mRuby liegt der Chromophor in der *trans*-Form vor. Das Absorptions- bzw. Anregungsmaximum liegt bei 558 nm, das Emissionsmaximum bei 605 nm. In RFP639 ist der Chromophor in der *cis*-Form und hat Anregungs-/Emissionsmaxima bei 588/639 nm und ist damit deutlich rotverschoben im Vergleich zum *trans*-Chromophor in mRuby. Außerdem zeigen die Absorptions- und Anregungsspektren von RFP639 neben der Hauptbande bei 588 nm auch noch eine kleine Bande bei 340 nm. Diese wird dem $S_0 \rightarrow S_2$ Übergang zugeordnet und ist typisch für den *cis*-Chromophor und damit ein Unterscheidungsmerkmal zwischen *trans* und *cis*.

2.3.2 Protonierungszustände des Chromophors

Die Hydroxyphenylgruppe des Tyrosins im Chromophor kann protoniert (neutral) oder deprotoniert (anionisch) vorliegen. Bei neutralem pH-Wert liegt der DsRed-Chromophor in den meisten RFPs ausschließlich im anionischen Zustand vor. Denn anders als der pK_s -Wert von GFPs und YFPs, der im Bereich zwischen 5 und 7 liegt, ist er bei RFPs mit Werten von unter 5 meist deutlich niedriger.^[28] Der neutrale Chromophor absorbiert bei 440–460 nm (A-Bande) und emittiert bei 470–490 nm. Der anionische Chromophor

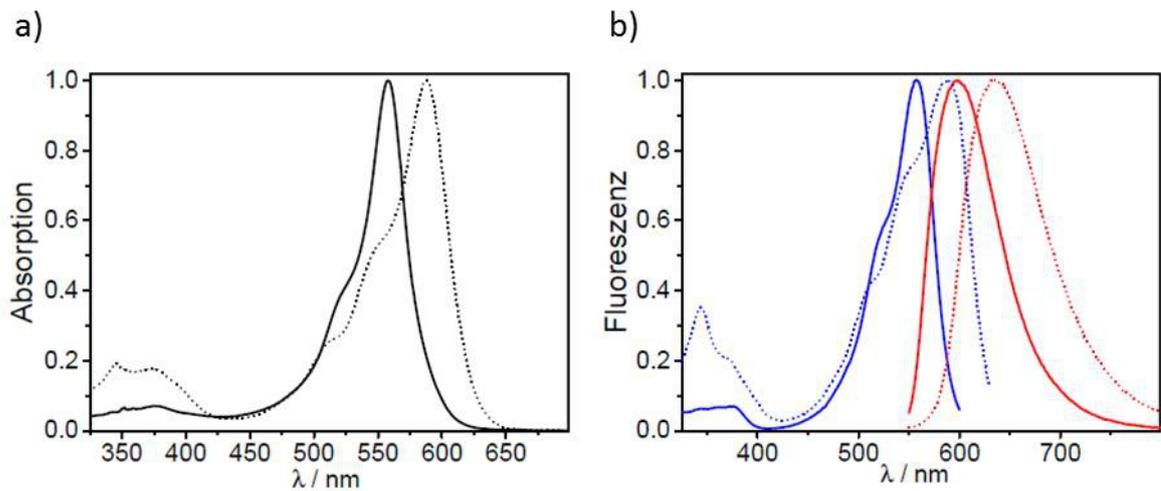


Abbildung 2.6: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von RFPs mit *trans*- und *cis*-Chromophor. a) Der *trans*-Chromophor in mRuby (durchgezogene Linie) hat ein Absorptionsmaximum von 558 nm. Das Absorptionsmaximum des *cis*-Chromophors in RFP639 (gepunktete Linie) liegt bei 588 nm und ist damit um 30 nm rotverschoben. b) Die Anregungs- (blau) und Emissionsspektren (rot) des *trans*-Chromophors in mRuby (durchgezogene Linie) zeigen Maxima bei 558 nm und 605 nm, während die Maxima des *cis*-Chromophors in RFP639 (gepunktete Linie) mit 588 nm und 639 nm ebenfalls rotverschoben sind.

absorbiert bei 560–590 nm (B-Bande) und emittiert bei 590–670 nm; d.h., die rote Fluoreszenz erfolgt nach Anregung des anionischen Chromophors.^[40]

Unter denaturierenden Bedingungen, wie z.B. bei pH > 12, bildet der DsRed-Chromophor eine grüne Spezies mit $A_{\max} = 445 \text{ nm}$.^[76] In Abbildung 2.7 sind die Absorptionsspektren von mRuby bei pH 3,5 und pH 7,0 dargestellt. Bei pH 3,5 liegt der Chromophor hauptsächlich in protonierter (neutraler) Form vor und hat ein Absorptionsmaximum bei 454 nm. Der deprotonierte (anionische) Chromophor bei pH 7,0 zeigt ein Absorptionsmaximum bei 558 nm.

2.3.3 ESPT - Excited State Proton Transfer

In einigen RFPs wurden ungewöhnlich große Stokes-Verschiebungen von über 100 nm beobachtet. Zu den Vertretern dieser Gruppe der LSS (*large Stokes shift*)-RFPs gehören z.B. mKeima^[108,109] ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$) und LSSmKate1^[110,111] ($\lambda_{\text{ex}} = 463 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 624 \text{ nm}$). Die große Stokes-Verschiebung resultiert aus einem Protonentransfer im angeregten Zustand (*engl. excited state proton transfer, ESPT*). Der ESPT wurde schon

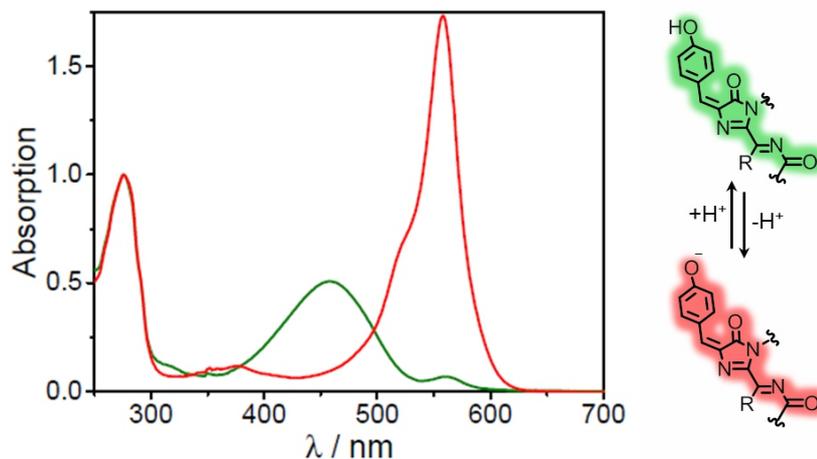


Abbildung 2.7: Absorptionsspektren von mRuby bei verschiedenen pH-Werten. Bei pH 7,0 zeigt der deprotonierte Chromophor (rot) ein Absorptionsmaximum von 558 nm. Bei pH 3,5 liegt der Chromophor hauptsächlich in protonierter Form (grün) vor und besitzt ein Absorptionsmaximum von 454 nm.

bei *avGFP* beobachtet und genauer beschrieben. Der Chromophor in *avGFP* liegt bei pH 7 sowohl in neutraler als auch anionischer Form vor. Das Absorptionsspektrum zeigt daher zwei Banden. Die dominante A-Bande bei 395 nm entspricht dem neutralen Chromophor, die kleinere B-Bande bei 475 nm kann dem anionischen Chromophor zugeordnet werden. Erwartet würde, dass die Anregung des neutralen Chromophors durch UV-Licht zu blauer Fluoreszenz (~450 nm) führt. Jedoch resultiert die Anregung mit 395 nm in heller grüner Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 508 nm.^[112–114] Grund hierfür ist der ESPT. Im angeregten Zustand wird das Tyrosin im Chromophor zu einer starken Säure und überträgt ein Proton auf die benachbarte Aminosäure E222, sodass die Fluoreszenz vom deprotonierten, anionischen Chromophor ausgeht.^[115] Bei den LSS-RFPs tritt so auch nach Anregung des neutralen Chromophors Fluoreszenz im roten Bereich auf.^[114,116,117] Durch Mutationen, die einen ESPT blockieren, entstehen blau emittierende Varianten (440–470 nm).^[113] In *avGFP* führt z.B. der Austausch von E222Q zum Verlust der grünen Fluoreszenz, da kein ESPT mehr stattfinden kann. Durch die zusätzliche Mutation H148D kann die grüne Fluoreszenz regeneriert werden, da nun der ESPT auf D148 stattfindet.^[118–120] Das ortho-Derivat der GFP-Chromophors (4(2-Hydroxybenzyliden)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-on) bildet eine interne Wasserstoffbrücke vom Phenyl-OH zum N(2) des Imidazolinonrings, wodurch ein sehr effizienter ESPT stattfindet. Dies resultiert in einer hohen Quantenausbeute und einer ungewöhnlich großen Stokes-Verschiebung ($\lambda_{\text{ex}} = 385 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$).^[121] Auch im grün fluoreszierenden Protein *asFP499* findet ein ESPT über sehr kurze Distanz (*engl.*

short-distance ESPT) zwischen D158, S143 und dem Chromophor statt. Dabei liegen der neutrale und der anionische Chromophor über einen großen pH Bereich vor.^[122]

2.4 Anwendung fluoreszierender Proteine in der Zellmikroskopie

Die Entdeckung fluoreszierender Proteine eröffnete neue Möglichkeiten in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere für *in vivo* Experimente. Genetisch kodierte FPs können spezifisch Proteine, Organellen, Zellen, Gewebe oder ganze Organismen fluoreszent markieren. Als Fusionsprotein werden sie ohne zusätzliche Enzyme oder Kofaktoren, nur mit Hilfe von Sauerstoff, in den Zellen exprimiert. Sowohl der C- sowie der N-Terminus eignen sich zur Fusion.

Durch die Entwicklung von FPs mit roter und fern-roter Emission wurden auch spezielle Mikroskopietechniken weiterentwickelt, die sich die speziellen Eigenschaften der RFPs zunutze machen. Allgemein haben RFPs gegenüber BFPs, CFPs, GFPs und YFPs bei der Mikroskopie von Zellen den Vorteil, dass aufgrund der längeren Anregungswellenlänge ein geringerer Photoschaden in der Probe entsteht und das Emissionslicht weniger stark gestreut wird. Außerdem gibt es nur ein geringes Hintergrundsignal, da die Anregung und Emission im roten Bereich von der hauptsächlich grünen Autofluoreszenz der Zellen spektral abgegrenzt ist.^[123,124] So eignen sich RFPs besonders gut für die Bildaufnahme von lebenden Zellen oder ganzen Organismen, sowie für Messungen in tiefer liegenden Gewebeschichten. Auch für Anwendungen, die ein besonders geringes Hintergrundsignal benötigen, wie z.B. hochauflösende Einzelmolekültechniken, sind sie nützliche Marker.^[22,124] Für die Markierung und Bildgebung ganzer Organismen, wie z.B. Fröschen oder Mäusen, eignen sich am besten nah-infrarote FPs (NirFPs) mit einer Anregungs- und Emissionswellenlänge zwischen 650 nm und 950 nm. In diesem Bereich liegt das nah-infrarote optische Fenster, in dem Hämoglobin, Melanin und Wasser ihre geringste Absorption aufweisen. Da besonders Hämoglobin als Hauptbestandteil der roten Blutkörperchen unter 650 nm stark absorbiert, wird das Gewebe bei längeren Wellenlängen deutlich transparenter.^[125] So ist aufgrund der hohen Gewebeabsorption die effektive Helligkeit eines an sich dunkleren NirFPs höher als die eines eigentlich sehr hellen GFPs.^[126] Bisher wurde jedoch noch kein NirFP mit einem Anregungsmaximum über 650 nm auf Basis eines DsRed-ähnlichen FPs entwickelt.^[124] Allerdings gibt es NirFPs, die aus bakteriellem Phytochrom entstanden sind, wie z.B. IFP1.4^[26] und iRFP^[27]. Die Fluoreszenz dieser NirFPs beruht auf dem exogenen Tetrapyrrol Biliverdin und besitzt eine geringe Intensität. Das NirFP mit dem höchsten Fluoreszenzsignal bei *in vivo* Ex-

perimenten in Mäusen ist eqFP650 mit Anregungs- und Emissionsmaxima von 592 nm und 650 nm.^[127] NirFPs können auch für die hochauflösende Mikroskopiemethode STED (*engl. stimulated emission depletion*) genutzt werden. Kommerzielle STED-Mikroskope sind mit einem ~640 nm Anregungslaser und einem 750 nm Abregungslaser ausgestattet, sodass FPs mit Anregungs- und Emissionsmaxima in diesem Bereich besonders effizient sind.^[128, 129] Voraussetzung für eine verbesserte Auflösung ist auch eine hohe Photostabilität der FPs, da die Auflösung durch die Intensität des Abregungslasers und somit auch durch einen möglichen Photoschaden der Probe begrenzt ist.^[130, 131] Es konnte gezeigt werden, dass bei der Markierung mit FPs eine Auflösung von 50 nm möglich ist.^[132] Die Erweiterung des spektralen Bereichs durch die Entwicklung von FPs mit fern-roter Emission ermöglicht neue Kombinationen bei der Bildgebung mit mehreren Farben. So können fern-rote FPs zusammen mit orangenen FPs verwendet werden. Als Alternative zu CFP/YFP, können fern-rote FPs außerdem als Akzeptor in neuen FRET (Förster-Resonanz-Energietransfer)-Paaren dienen.^[133, 134] Für die Anwendung in der Zellmikroskopie sind neben der Photostabilität und Helligkeit vor allem die Thermostabilität, die Maturierungseffizienz, die zelluläre Toxizität und der Oligomerisierungszustand von Bedeutung. Diese Eigenschaften werden im Folgenden genauer erläutert.

2.4.1 Photostabilität und Helligkeit

Photostabilität und Helligkeit sind wichtige Parameter, die darüber entscheiden, ob ein FP in bestimmten Experimenten anwendbar ist. Vor allem für die Anwendung in bildgebenden Verfahren wie z.B. die hochauflösende Mikroskopie sind eine hohe Photostabilität und Helligkeit Voraussetzung für kontrastreiche Aufnahmen. Die Photostabilität gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit welcher der Fluorophor nach Absorption eines Photons z.B. durch Photobleichen zerstört wird. Da sie u.a. stark von den Messbedingungen abhängt, ist die Bestimmung bzw. der Vergleich verschiedener Fluorophore nicht trivial.^[28] In der Weitfeldmikroskopie ist z.B. das RFP mPlum photostabiler als das RFP mRaspberry, während es sich bei der Konfokalmikroskopie genau umgekehrt verhält.^[72] Außerdem hängt die Photostabilität von der O₂-Konzentration in der FP-Umgebung ab, da O₂ das Photobleichen beschleunigt.^[135] Umgekehrt kann die Photostabilität durch Entfernen von O₂ aus der Lösung gesteigert werden.^[34]

Die Helligkeit eines FPs ist definiert als Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient.^[124] Über das gesamte Spektrum betrachtet sind FPs mit Emission im grünen und gelben Bereich am hellsten, während die FPs mit blauer und fern-roter Emission im Randbereich des sichtbaren Spektrums dunkler sind.^[136] Selbst das hellste RFP mit fern-roter Emission, E2-Crimson^[137], ist nicht so hell wie organische Farbstoffe mit ver-

gleichbarer Emissionswellenlänge.^[138] Die geringere Helligkeit ist nicht nur auf den meist kleineren Extinktionskoeffizienten, sondern vor allem auf die niedrige Quantenausbeute zurückzuführen. Besonders die RFPs mit fern-roter Emission erreichen oft nur Quantenausbeuten von 10%. Bei RFPs mit höheren Quantenausbeuten bleibt der Chromophor länger im angeregten Zustand, sodass auch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass der Übergang in den Dunkelzustand durch Photobleichen erfolgt.^[139] Für eine hohe Quantenausbeute ist die Planarität des Chromophors entscheidend. Dies zeigt sich in den nicht-fluoreszenten Chromoproteinen, bei denen die Ringe des Chromophors zueinander verdreht vorliegen.^[140] Wird der Chromophor vom Proteingerüst jedoch in seiner Rotationsfreiheit soweit eingeschränkt, steigt auch die Quantenausbeute.^[141] Je flexibler der Chromophor ist, desto wahrscheinlicher werden nicht-radiative Abregungsprozesse wie Schwingungsrelaxation und interne Konversion. Die Einschränkung der Chromophorbewegung erfolgt hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Chromophor und den Aminosäureseitenketten des Proteingerüsts. Dadurch ist der Chromophor im Protein viel heller als der synthetische isolierte Chromophor.^[121,142] Der synthetische Chromophor ohne Proteingerüst in Lösung hat nur eine Quantenausbeute von 10^{-4} . Erst bei Temperaturen unter dem Glasübergang des Lösungsmittels steigt die Fluoreszenzintensität an.^[143] Dies verdeutlicht die Bedeutung der Proteinumgebung für die Fluoreszenz des Chromophors. RFPs besitzen meist eine geringere Quantenausbeute als z.B. GFPs. Ihr Chromophor ist größer und damit schwieriger im Proteingerüst zu verankern wodurch er eine höhere Flexibilität aufweist.

2.4.2 Thermostabilität und Maturierungseffizienz

Für die Anwendung in der Zellmikroskopie ist es notwendig, dass die FPs bei 37°C falten und der Chromophor maturiert, da sie bei dieser Temperatur in den Zellen exprimiert werden. Viele RFPs sind naturgemäß in der Lage, bei 37°C zu maturieren, andernfalls kann diese Thermostabilität oft durch Mutation einzelner Aminosäuren erreicht werden.^[8,45] Neben der Temperatur ist auch die Sauerstoffkonzentration entscheidend für die Effizienz der Chromophormaturierung. Die vollständige Maturierung kann von Minuten bis hin zu Stunden oder Tagen dauern.^[43,144,145] Bei 37°C besitzen die meisten FPs eine Maturierungshalbwertszeit von etwa einer Stunde. Es gibt jedoch auch FPs, sogenannte TurboFPs, die innerhalb von 20 min maturieren und sich so für spezielle Anwendungen wie z.B. die Verfolgung der Promotoraktivität eignen.^[29,90]

Eine weitere interessante Gruppe von FPs sind die sogenannten *Fluorescent Timers*. Diese ändern ihre Farbe während der Maturierung von z.B. grün oder blau zu rot, so-

dass sie dazu verwendet werden können, das Alter von Zellorganellen zu visualisieren oder die Zelldifferenzierung zu verfolgen.^[98,146,147]

2.4.3 Toxizität und Oligomerisierungszustand

Die Fusion eines FPs an das Zielprotein beeinflusst dessen Funktionalität meist nicht und hat eine geringe toxische Wirkung auf die Zellen.^[38,124] Während die Markierung mit organischen Farbstoffen auf fixierte, d.h. tote Zellen, begrenzt ist, werden durch die FPs Lebendzellmessungen möglich. Ein Problem der FPs ist, dass sie bei wiederholter Anregung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden können, die hochreaktiv sind und dadurch die Zellen schädigen.^[96,148] Auch der Oligomerisierungszustand des FPs kann von Bedeutung sein. Zwar können für viele Anwendungen wie z.B. die Markierung von ganzen Organismen, Zellen oder Zellstrukturen auch Dimere und Tetramere Proteine verwendet werden, für die Markierung einzelner Proteine sind diese jedoch ungeeignet.^[149] Die Fusion mit oligomeren FPs kann die Funktionalität oder Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle beeinflussen oder Aggregation auslösen, was sich wiederum toxisch auf die Zelle auswirken kann. Deshalb gelten monomere FPs als bevorzugte Fusionspartner für Funktionsstudien.

3 Materialien und Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Ortsspezifische Mutagenese

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Proteine diente das Plasmid pQE32 (Qiagen, Hilden), in welches die cDNA von mRuby^[8] inkloniert wurde. Um Varianten des Proteins mRuby zu erhalten, wurden einzelne Aminosäuren mittels ortsspezifischer Mutagenese ausgetauscht. Dazu wurde der QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

Polymerase-Kettenreaktion. In einer Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction*, PCR) wurde das Ausgangsplasmid amplifiziert und dabei die Mutation eingeführt. Hierfür wurden Primer (Biomers, Ulm), die die gewünschte Mutation enthielten, verwendet. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Mastercycler[®] Personal, Eppendorf, Hamburg) nach dem in Tabelle 3.1 dargestellten Schema.

Tabelle 3.1: PCR-Protokoll der ortsspezifischen Mutagenese.

Komponente	Volumen	Temperatur und Zeit
10 x Reaction Buffer	5 µL	30 s bei 95°C
dsDNA Template (50 ng/µL)	1 µL	
Forward Primer (125 ng/µL)	1 µL	
Reverse Primer (125 ng/µL)	1 µL	
dNTP Mix	1 µL	
ddH ₂ O	40 µL	
PfuUltraHF DNA Polymerase (25 U/µL)	1 µL	30 s bei 95°C 1 min bei 55°C x 25 4.5 min bei 68°C
Ansatz 1 min auf 10°C abkühlen		
DpnI Restriktionsenzym	1 µL	1 h bei 37°C

Agarose-Gelelektrophorese. Zur Überprüfung der Amplifikationseffizienz der PCR wurden 10 μL des PCR-Produkts mit 2 μL DNA-Dye NonTox (AppliChem, Darmstadt) gemischt und auf ein 1,5%iges Agarose-Gel geladen. Als Marker diente der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). Das Gel wurde 90 min bei 120 V in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA) in einem Owl EasyCast B1A Mini Gel Electrophoresis System (Thermo SCIENTIFIC, Dreieich) laufen gelassen. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Molecular Imager (Gel Doc™ XR System, BIO-RAD, München) unter UV-Licht dokumentiert (Abbildung 3.1).

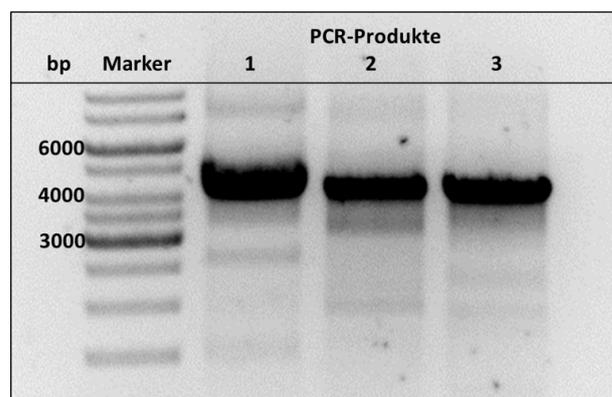


Abbildung 3.1: Beispiel für ein Agarosegel. Die Produkte von drei verschiedenen PCRs zeigen deutliche Banden bei ca. 4500 bp. Dies entspricht der Größe des pQE32-Plasmides mit eingebrachter mRuby cDNA.

Transformation. Nach dem Restriktionsverdau mit DpnI wurde das PCR-Produkt in *E. coli* XL1-Blue Supercompetent Cells (Agilent, Böblingen) transformiert. Dazu wurden 5 μL PCR-Produkt mit 50 μL Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 s und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Nach der Zugabe von 0,5 mL Double-Yeast-Tryptone-Medium (DYT, 16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl) und einstündiger Inkubation bei 37°C und 220 rpm im Schüttler (Multitron Standard, Infors HT, Einsbach) wurden 250 μL der Zellsuspension auf ampicillinhaltigen (75 mg/L) LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Plasmidpräparation und Sequenzierung. Je 4 mL ampicillinhaltiges (75 mg/L) DYT-Medium wurde mit einer Kolonie der transformierten Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgte nach dem Protokoll

des Pure Yield™ Plasmid Miniprep System Kit (Promega, Mannheim). Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop® 2000c (PEQLAB, Erlangen) bestimmt und 30 µL der DNA mit einer Konzentration von 30–100 ng/µL zur Sequenzierung zur GATC Biotech AG (Konstanz) geschickt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm ApE - A plasmid Editor (v8.5.2.0) ausgewertet.

3.1.2 Herstellung der rekombinanten Proteine

Bevor die Proteine exprimiert und aufgereinigt werden konnten, wurde die entsprechende Plasmid-DNA nach dem in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Protokoll in *E.coli* XL1 Zellen transformiert.

Expression und Zellernte. Eine Mischung aus 150 mL DYT-Medium und 150 µL Ampicillin-Lösung (75 mg/mL) wurde mit einer Kolonie der transformierten *E.coli* Zellen angeimpft. Diese Vorkultur wurde 16 h bei 37°C und 160 rpm im Schüttler inkubiert. Für die Expression wurden 50 mL Vorkultur zu 1 L ampicillinhaltigem (75 mg/L) DYT-Medium gegeben. Die Hauptkultur wurde bei 37°C und 160 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte (OD)₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Durch Zugabe von 200 µL Isopropylthiogalactosid (IPTG, 100 mM) wurde die Expression induziert. Anschließend erfolgte die Expression bei 37°C über Nacht oder bei 18°C für 48–72 h bei 160 rpm.

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (Sigma 4-16 K, SIGMA, Osterode am Harz) bei 5000 × g und 4°C für 20 min geerntet. Die Zellpellets wurden bei –20°C gelagert.

Zellaufschluss und Aufreinigung. Das gefrorene Zellpellet wurde mit Natriumphosphat-Puffer (40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 7,4, 4 mL/g), Proteaseinhibitor (eine Cocktail Tablette SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets, EDTA-Free, Sigma-Aldrich, Steinheim pro 100 mL Puffer) sowie eine Spatelspitze Lysozym (aus Hühnereiweiß, Sigma-Aldrich) versetzt und unter langsamer Rotation aufgetaut und resuspendiert. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend mittels Ultraschall (Sonoplus HS2070, Bandelin, Hagen) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Die Zellen wurden je 2 min mit 85% der Maximalleistung beschallt und anschließend 4 min gekühlt. Die Gesamtdauer betrug 1 min/mL Suspension. Durch Zentrifugation (Sigma 3-30 K, SIGMA) bei 20000 × g und 4°C für 1 h wurden die Zellfragmente vom Lysat, welches das Protein enthielt, getrennt. Der Überstand wurde durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert (Spartan 30 mm Syringe Filter, Whatman, Dassel), um Verunreinigungen und größere Aggregate zu entfernen, die die

anschließende Chromatographie stören könnten.

Das Protein wurde über eine TALON[®] Metal Affinity Resin Säule (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) aufgereinigt. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen bidestilliertem Wasser und für die Equilibrierung mit demselben Volumen Natriumphosphat-Puffer gewaschen. Das filtrierte Lysat wurde auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit etwa 5 Säulenvolumen Natriumphosphat-Puffer gewaschen und das Protein mit ca. 40 mL Elutionspuffer (40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 7,4) eluiert. Die gesammelten Proteinfractionen wurden kombiniert und in einem Konzentrator (10 MWCO, Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) bei 7000 × g und 4°C auf 1–2,5 mL aufkonzentriert. Die Protein-Lösung wurde abschließend über eine Disposable PD-10 Desalting Column (GE Healthcare Life Sciences, München) in Natriumphosphat-Puffer ohne Imidazol umgepuffert und bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die einzelnen Schritte der Aufreinigung wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verfolgt und so die Reinheit des Proteins am Ende der Aufreinigung bestätigt (Abbildung 3.2). Dazu wurden die Proben mit 2× Probenpuffer

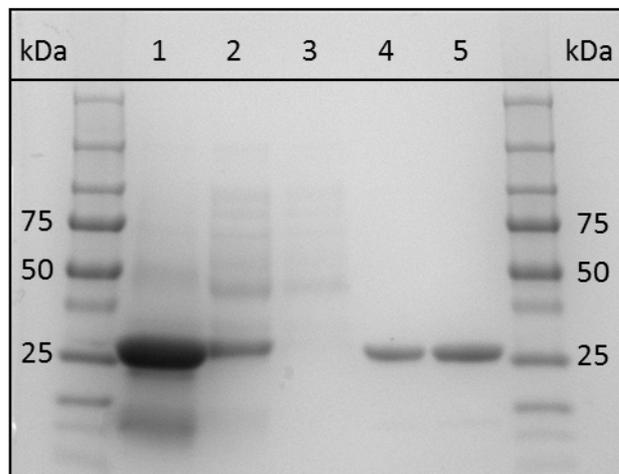


Abbildung 3.2: Beispiel für ein SDS-Gel. Aufgetragen wurde je eine Probe des Pellets (1), des Lysats (2), des Durchflusses (3) und des Eluats mit verschiedenen Konzentrationen (4+5). In der Spur des Eluats ist nur eine Proteinbande bei etwas über 25 kDa zu erkennen, die der aufgereinigten mRuby-Variante zugeordnet werden kann.

(90 mM Tris/HCl, 2% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenol Blau, 100 mM DTT, pH 8,3) gemischt, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf ein Polyacrylamidgel (4–20% Mini-PROTEAN[®]TGXTM Precast Gel, BIO-RAD) aufgetragen. Als Marker diente der *Precision Plus Protein[™] Standard* (BIO-RAD). Der

Gellauf erfolgte in 25 mM Tris/HCl-Puffer mit 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS bei pH 8,4.

Native Gelelektrophorese. Zur Überprüfung des Oligomerisierungszustandes wurde eine native PAGE durchgeführt. Die Proben wurden mit 3× Probenpuffer (50 mM Bis-Tris, 45% (v/v) Glycerin, pH 7,0) gemischt und auf ein Polyacrylamidgel (4-20% Mini-PROTEAN®TGXTM Precast Gel, BIO-RAD) aufgetragen (Abbildung 3.3). Es wurden verschiedene Puffer für Anode (15 mM Bis-Tris, 5 mM Tricin, 0,02% (w/v) Serva Blau G250, pH 7,0) und Kathode (50 mM Bis-Tris, pH 7,0) verwendet. Als Referenzproben wurden das dimere eqFP670^[127] und das monomere wt-mRuby verwendet.

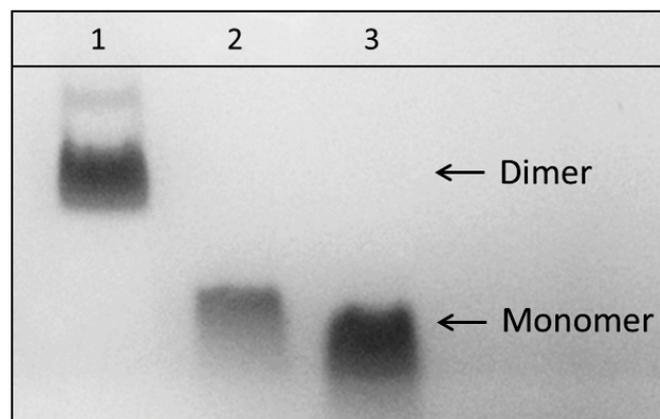


Abbildung 3.3: Ergebnis der nativen PAGE. Aufgetragen wurden das dimere eqFP670 (1) und das monomere wt-mRuby (2) als Referenz. Die Lage der Bande der mRuby-Mutante (3) zeigt, dass das Protein auch nach der Mutation noch als Monomer vorliegt.

3.1.3 Klonierung

Für die mikroskopische Untersuchung verschiedener Fusionskonstrukte in eukaryotischen Zellen wurde die cDNA des ausgewählten FPs in den Plasmidvektor pcDNA3.1, welcher die cDNA des jeweiligen Fusionspartners enthielt, kloniert. Dazu wurden zunächst die Restriktionsschnittstellen in einer PCR (Tabelle 3.2) mit Hilfe entsprechender Primer (Biomers) sowohl an die cDNA des FPs als auch an die gewünschten Stellen im Vektor eingefügt. Dabei wurde die *annealing*-Temperatur T_a an die jeweilige Primerschmelztemperatur T_P angepasst. Anschließend wurde nach dem Protokoll des Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen) eine PCR Clean Up durchgeführt. Für den Restriktionsverdau

Tabelle 3.2: PCR-Protokoll zur Einfügung der Restriktionsschnittstellen.

Komponente	Volumen	Temperatur und Zeit
Q52 x Master Mix (Biomers)	12,5 μL	30 s bei 98°C
dsDNA Template (25 ng/ μL)	1 μL	30 s bei 95°C
Forward Primer (125 ng/ μL)	1,25 μL	60 s bei $T_a = T_P - 5^\circ\text{C}$
Reverse Primer (125 ng/ μL)	1,25 μL	30 s/1 kb bei 72°C
ddH ₂ O	9 μL	2 min bei 72°C
Ansatz auf 4°C abkühlen		

wurde der Puffer sowie alle Restriktionsenzyme von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M.) bezogen. Der Verdau (Tabelle 3.3) erfolgte für 1 h bei 37°C. Der

Tabelle 3.3: Ansatz für den Restriktionsverdau.

Komponente	Volumen
10 x Cut smart	5 μL
PCR Produkt (200 ng/ μL)	5 μL
Restriktionsenzym 1 (20000 U/mL)	1 μL
Restriktionsenzym 2 (20000 U/mL)	1 μL
ddH ₂ O	38 μL

Verdauungsansatz wurde über ein 1%iges Agarosegel laufen gelassen (Abschnitt 3.1.1) und das PCR-Produkt mit Hilfe des Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) isoliert und aufgereinigt. Die Ligation wurde anschließend nach dem Protokoll des Quick Ligation Kit (NEB) durchgeführt. Die Transformation in *E.coli* XL1 Zellen, die Plasmidpräparation und die Sequenzierung des Ligationsproduktes erfolgte wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Mit der aufgereinigten DNA aus der Plasmidpräparation wurde ein Kontrollverdau durchgeführt und das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Sequenziert wurden die Proben, die auf dem Gel zwei Banden mit der zu erwartenden Größe zeigten.

3.2 Spektroskopische Charakterisierung

Das Phänomen der Fluoreszenz ist seit fast 200 Jahren bekannt. 1845 berichtete Sir John Frederick William Herschel von seiner Beobachtung, dass eine an sich farblose Chininlösung unter Einstrahlung von Sonnenlicht blau erscheint.^[150] Herschels Beobachtung konnte jedoch erst einige Jahre später durch Sir George Gabriel Stokes erklärt werden und wurde von ihm als Fluoreszenz bezeichnet.^[151] In diesem Unterkapitel werden die Grundlagen der Fluoreszenz sowie die in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden erläutert.

3.2.1 Wechselwirkungen zwischen Licht und Materie

Wird Licht im UV/vis Bereich (200–800 nm) von einem Molekül absorbiert, werden Elektronen vom Grundzustand in einen angeregten Zustand gebracht. Dabei entspricht der Energieunterschied ΔE zwischen dem Grundzustand S_0 und dem angeregten Zustand S_1 genau der Energie des absorbierten Photons. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der Planck-Einstein-Relation und wird durch die Bohr'sche Frequenzbedingung beschrieben,^[152]

$$\Delta E = E_{S_1} - E_{S_0} = h\nu = \frac{hc}{\lambda}, \quad (3.1)$$

wobei h das Plancksche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit, ν die Frequenz und λ die Wellenlänge des Photons ist. Wird beim Übergang des angeregten Moleküls zurück in den Grundzustand Energie in Form eines Photons abgegeben, dann wird dieser Prozess als Fluoreszenz bezeichnet. Fluoreszenz findet z.B. in organischen Molekülen mit delokalisiertem π -Elektronensystem statt. Je größer das konjugierte π -Elektronensystem des Moleküls ist, desto geringer ist die benötigte Anregungsenergie und desto größer die Wellenlänge des emittierten Photons.

Jablonski-Diagramm. Die Prozesse, die beim Übergang zwischen Grund- und angeregtem Zustand stattfinden, sind im Jablonski-Diagramm^[153] zusammengefasst (Abbildung 3.4). Die Absorption vom Grundzustand S_0 in einen elektronisch angeregten Zustand S_1 , S_2 , usw. erfolgt sehr schnell in etwa 10^{-15} s. Dabei gelangt das Elektron in einen der höheren Schwingungszustände ν' bzw. ν'' des elektronisch angeregten Zustandes. Durch innere Umwandlung gelangen die angeregten Moleküle in den Schwingungsgrundzustand des ersten elektronisch angeregten Zustands $S_1(\nu' = 0)$. Dabei wird innerhalb von 10^{-12} s die überschüssige Energie durch Stöße mit Lösungsmittelmolekülen an die Umgebung in Form von Wärme abgegeben. Da der Prozess der Fluoreszenz auf der Nanosekundenzeitskala stattfindet ($\tau_F \approx 10^{-9}$ s), geht er überwiegend vom $S_1(\nu' = 0)$ Niveau aus. Somit folgt die Fluoreszenz Kashas-Regel^[154], die besagt, dass die Lage des Emissionsspektrums eines Fluorophors unabhängig von der Anregungsenergie bzw. -wellenlänge ist. Außerdem ist die Emission im Vergleich zur Absorption durch den Energieverlust bei der inneren Umwandlung rotverschoben (Stokes-Verschiebung). In Konkurrenz zur Fluoreszenz stehen strahlungslose Prozesse, bei denen es zur Desaktivierung in den Grundzustand ohne Aussendung eines Photons kommt. Dazu gehört beispielsweise die Fluoreszenzlöschung (*engl. Quenching*), bei der ein Energieübertrag auf ein benachbartes Molekül stattfindet. Beim *Quenching* wird generell zwischen stati-

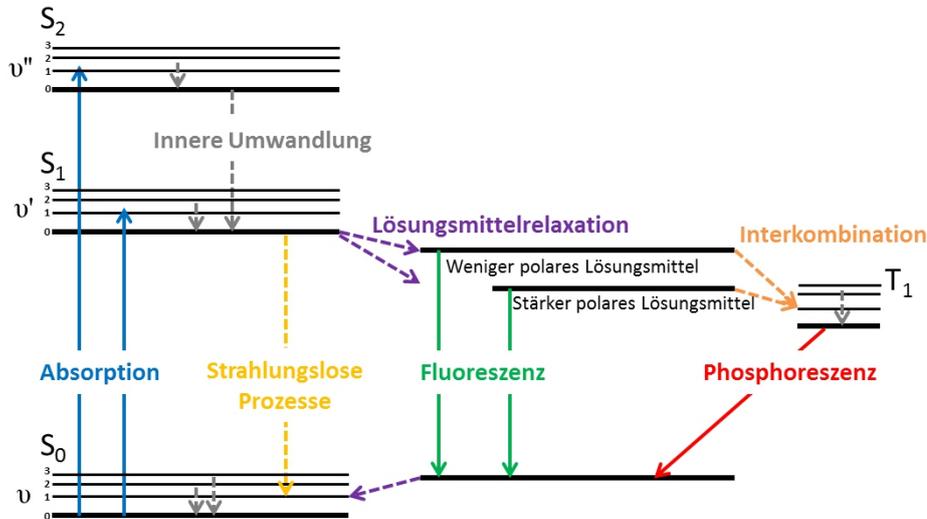


Abbildung 3.4: Jablonski Diagramm. Durch Absorption eines Photons kann ein Elektron aus dem Grundzustand S_0 in einen höheren Energiezustand S_1 , S_2 , usw. gebracht werden. Dabei stellen $\nu = 0,1,2,3,\dots$ verschiedene Schwingungszustände dar. Durch innere Umwandlung gelangen alle Moleküle zunächst in den Zustand $S_1(\nu' = 0)$. Aus diesem Zustand können die Moleküle durch Fluoreszenz oder strahlungslose Prozesse in den Grundzustand zurückkehren oder durch Spinumkehr in den Triplettzustand T_1 übergehen, aus dem sie über Phosphoreszenz in den Grundzustand gelangen. Durch Lösungsmittelrelaxation kann die Energiedifferenz zwischen Grund- und angeregtem Zustand verringert werden, wodurch es zu einer größeren Stokes-Verschiebung kommt.

schem und dynamischem *Quenching* unterschieden. Beim dynamischen *Quenching* findet der Energieübertrag während einer Kollision der Moleküle statt. Beim statischen *Quenching* hingegen bilden die beiden Moleküle einen nicht-strahlenden Komplex. Handelt es sich bei Fluorophor und Quenchpartner um das gleiche Molekül, wird dieser Komplex Excimer genannt, entspricht der Quenchpartner nicht dem Fluorophor, bezeichnet man ihn als Exciplex. Ein natürlich vorkommender Quencher ist z.B. Tryptophan. Weitere Möglichkeiten für strahlungslose Übergänge sind z.B. chemische Reaktionen oder der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

Durch Spinumkehr können Moleküle aus dem S_1 in den ersten Triplettzustand T_1 übergehen. Dieser sogenannte Interkombinationsübergang ist quantenmechanisch verboten, erfolgt jedoch auf einer Zeitskala zwischen 10^{-10} s und 10^{-8} s, wenn der Energieunterschied zwischen S_1 und T_1 sehr gering ist. Der Übergang zurück in den Grundzustand S_0 ist ebenfalls verboten und erfolgt daher langsamer mit $\tau_P \leq 10^{-2}$ s in Lösung bis $\tau_F \approx 10^2$ s in Feststoffen. Dieser Prozess wird Phosphoreszenz genannt und ist im Ver-

gleich zur Fluoreszenz rotverschoben, da der T_1 -Zustand energieärmer ist als der S_1 -Zustand.

Franck-Condon-Prinzip und Stokes-Verschiebung. Im elektronisch angeregten Zustand S_1 ist der Kernabstand größer als im Grundzustand S_0 (Abbildung 3.5). Da die Kernschwingungsdauer mit etwa 10^{-13} s deutlich langsamer ist, als der elektronische Übergang von S_0 nach S_1 ($\tau_A \approx 10^{-15}$ s), ändert sich der Kernabstand während der Absorption nicht. Es handelt sich um einen sogenannten vertikalen Übergang. Dies wird als Franck-Condon-Prinzip bezeichnet. Quantenmechanisch betrachtet kann ein

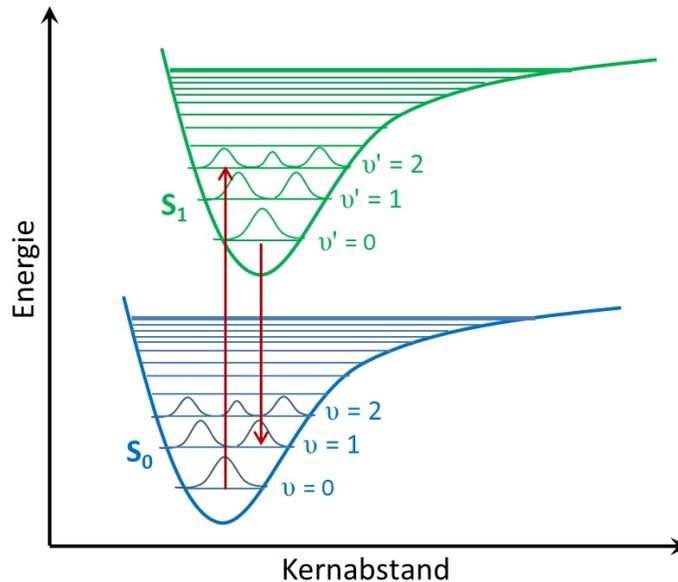


Abbildung 3.5: Franck-Condon-Prinzip. Die Potentialkurven des elektronischen Grundzustandes S_0 und des ersten angeregten Zustandes S_1 sind mit den jeweiligen Schwingungsniveaus ν und ν' für ein zweiatomiges Molekül dargestellt. Der Gleichgewichtskernabstand ist im angeregten Zustand größer als im Grundzustand. Für die ersten Schwingungsniveaus sind die Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Elektronen eingezeichnet. Die vertikalen Pfeile stellen den Übergang zwischen den Niveaus mit dem größten Franck-Condon-Faktor dar.

Molekül nur diskrete Zustände mit entsprechender Energie einnehmen, die durch die Wellenfunktion Ψ beschrieben werden. Das Quadrat dieser Wellenfunktion stellt die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Elektrons dar. Je größer der Überlapp der Vibrations-Wellenfunktion in Grund- und angeregtem Zustand, desto größer ist das Überlappungsintegral (Franck-Condon-Faktor) der beiden Funktionen, und desto wahrscheinlicher

ist der Übergang von einem in den anderen Zustand. Sind die Absorptions- und Fluoreszenzübergangswahrscheinlichkeiten zu denselben Franck-Condon-Faktoren proportional, d.h., Grund- und angeregter Zustand besitzen dieselbe Schwingungsfineinstruktur, ist das Emissionsspektrum das Spiegelbild des Absorptionsspektrums. Mit Hilfe des Franck-Condon-Prinzips kann die Intensität der verschiedenen Übergänge berechnet werden. Diese diskreten Vibrationsübergänge sind in Lösung jedoch nicht aufgelöst. Die Spektren erscheinen stark verbreitert. Grund hierfür sind vor allem Lösungsmittelleffekte. Im angeregten Zustand besitzen die Fluorophore meist ein anderes Dipolmoment als im Grundzustand. Da im Gegensatz zur Absorption die Fluoreszenz ein relativ langsamer Prozess ist, haben die Lösungsmittelmoleküle Zeit, ihre Dipole antiparallel zum Dipolmoment des Fluorophors auszurichten. Dadurch wird die Energie des angeregten Zustandes abgesenkt. Dieser Effekt wird Lösungsmittelrelaxation genannt und geschieht auf einer Zeitskala von etwa 10^{-10} s. Der Effekt ist umso größer, je polarer das Lösungsmittel ist (Abbildung 3.4). Zurück im Grundzustand besitzen die Fluorophore wieder ihr ursprüngliches Dipolmoment, während die umgebenden Lösungsmittelmoleküle zunächst ihre nun energetisch ungünstige Ausrichtung beibehalten. Der erreichte Grundzustand besitzt eine höhere Energie als der Gleichgewichtsgrundzustand. Aus den Wechselwirkungen der Fluorophore mit den Lösungsmittelmolekülen ergibt sich eine zusätzliche Rotverschiebung der Fluoreszenz. Die Verschiebung des Emissionsspektrums zum Absorptionsspektrum wird allgemein als Stokes-Verschiebung bezeichnet und hat eine Größenordnung von 20 – 50 nm.^[155–157]

3.2.2 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektroskopie liefert Informationen über den Grundzustand eines Licht absorbierenden Moleküls. Dabei ist das Absorptionsspektrum häufig abhängig vom umgebenden Lösungsmittel. So beeinflussen z.B. Viskosität und Polarität des Lösungsmittels die Bandenbreite, die Intensität und die Lage des Absorptionsmaximums. Das Messprinzip ist relativ einfach. Das von einer Lichtquelle ausgesendete weiße Licht wird in einem Monochromator spektral zerlegt. Das Licht einer bestimmten Wellenlänge mit der Intensität I_0 wird auf dem Weg der Länge d durch die Probe absorbiert. Anschließend wird das nicht absorbierte Licht der Intensität I von einem Detektor wellenlängenabhängig aufgezeichnet (Abbildung 3.6). Die Intensität des transmittierten Lichts auf dem Weg durch die Probe lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes (Gleichung 3.2) beschreiben

$$I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon \cdot c \cdot d}, \quad (3.2)$$

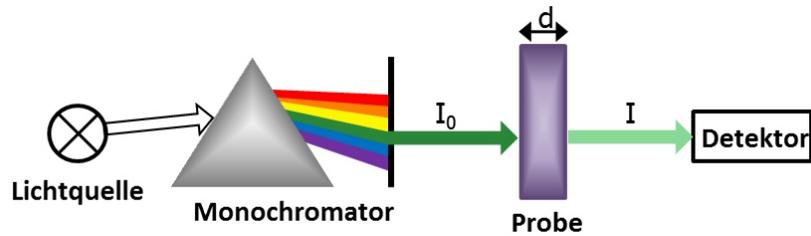


Abbildung 3.6: Prinzip der Absorptionsmessung. Das von der Lichtquelle ausgesendete Licht wird durch einen Monochromator spektral zerlegt und trifft mit der Intensität I_0 auf die Probe. Auf dem Weg der Länge d durch die Probe wird das Licht wellenlängenabhängig absorbiert und gelangt anschließend mit der Intensität I auf den Detektor.

wobei c die Konzentration der Probe und ϵ der wellenlängenabhängige dekadische molare Extinktionskoeffizient ist. Für die Absorption A ergibt sich daraus

$$A = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d. \quad (3.3)$$

Der Extinktionskoeffizient ist somit direkt verknüpft mit der Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon einer bestimmten Wellenlänge und Polarisation gemäß des Franck-Condon-Prinzips (Abbildung 3.5) absorbiert wird. Veränderungen des Extinktionskoeffizienten weisen auf eine strukturelle Änderung im Molekül hin. Die Lage des Absorptionsmaximums wird durch die Energiedifferenz zwischen S_0 - und S_1 -Zustand bestimmt, d.h., eine Verschiebung der Absorption bedeutet eine Änderung der Energiezustände. So verschiebt sich z.B. das Absorptionsspektrum eines FPs, wenn sich die Polarität, Konformation oder Konstitution von Aminosäuren in unmittelbarer Chromophorumgebung ändern.

Die Absorptionsmessungen wurden am UV/vis Spektralphotometer Cary 100 (Varian, Darmstadt) durchgeführt. Es wurde eine QS-Ultra-Mikro-Küvette (Hellma, Mülheim) mit einer Weglänge von 10 mm verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Proben in Natriumphosphat-Puffer (40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, pH 7,4) bei 20°C gemessen.

pH-Titration. Der Protonierungszustand des Chromophors ist abhängig vom pH-Wert der Umgebung. Allgemein kann die pH-Abhängigkeit vom Gleichgewicht zwischen pro-

tonierter Form OH und deprotonierter Form O⁻ durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 3.4) beschrieben werden.

$$pH = pK_s + \lg \left(\frac{[O^-]}{[OH]} \right) \quad (3.4)$$

Hierbei ist pK_s der negative dekadische Logarithmus der Säurekonstanten K_s . Daraus ergibt sich, dass bei gleicher Konzentration von protonierter und deprotonierter Form der pH-Wert dem pK_s -Wert entspricht. Um den pK_s des Chromophors zu bestimmen, wurde die Absorption bei pH-Werten zwischen 3,0 und 11,0 gemessen. Dazu wurde die Protein-stammlösung in den jeweiligen Puffern so verdünnt, dass Protein- und Chromophorabsorption bei pH 7,4 zwischen 0,2 und 0,8 lagen. Für die pH-Werte zwischen 3,0 und 6,1 wurde Natriumcitrat-Puffer (40 mM C₆H₈O₇/NaC₆H₇O₇, 300 mM NaCl) verwendet, für pH-Werte zwischen 6,2 und 8,7 Natriumphosphat-Puffer (40 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl) und für pH-Werte zwischen 8,8 und 11,0 Natriumcarbonat-Puffer (40 mM NaHCO₃/Na₂CO₃, 300 mM NaCl). Für die Auswertung wurden alle Spektren auf die Proteinabsorption bei 280 nm normiert. Durch Auftragen der Absorption der deprotonierten Chromophorbande über den pH-Wert und anschließender Anpassung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung in der Form

$$A_{O^-} = \left(\frac{1}{1 + 10^{n(pK_s - pH)}} \right) \quad (3.5)$$

kann der pK_s -Wert aus dem Wendepunkt der Anpassungsfunktion bestimmt werden. Der Koeffizient n gibt an, ob es sich um eine einfache Protonierung-Deprotonierung handelt ($n = 1$) oder ob weitere Faktoren wie eine pH-abhängige Quantenausbeute die Absorption beeinflussen ($n \neq 1$).

Bestimmung des Extinktionskoeffizienten. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ ist eine stoffspezifische Konstante, die angibt, wie viel elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge ein Molekül in molarer Konzentration bei einer Durchtrittslänge von 1 cm absorbiert. Der Extinktionskoeffizient kann mit Hilfe einer umgewandelten Form des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 3.6) berechnet werden,

$$\epsilon = \frac{A}{c \cdot d}, \quad (3.6)$$

wobei A die Absorption, c die Konzentration und d die Weglänge der Probe ist. Ist die Konzentration des roten, deprotonierten Chromophors in einer Probe bekannt, kann aus dem Absorptionsspektrum dessen Extinktionskoeffizient berechnet werden. Um die

Konzentration des Chromophors der Probe zu bestimmen, wurde zunächst ein Absorptionsspektrum bei pH 7,4 aufgenommen. Anschließend wurde die Probe unter alkalischen Bedingungen durch Zugabe von 1 M NaOH denaturiert und erneut ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Bei basischem pH denaturiert der Chromophor in eine Spezies, die bei einer Wellenlänge von 447 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $44100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ absorbiert.^[59] Sind alle Chromophore der Probe vollständig denaturiert, kann deren Konzentration aus dem Wert der Absorption und dem Extinktionskoeffizienten bei 447 nm berechnet werden. Ausgehend von dieser Konzentration kann mit Hilfe des Verdünnungsfaktors und dem pK_s der Probe die Konzentration des roten, deprotonierten Chromophors bei pH 7,4 und somit auch dessen Extinktionskoeffizient bestimmt werden.

3.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Während die Absorption in sehr kurzer Zeit ($\tau_A \approx 10^{-15} \text{ s}$) abläuft, in der das Molekül kaum Zeit hat, mit seiner Umgebung wechselzuwirken, erfolgt die Fluoreszenz erst nach Nanosekunden ($\tau_F \approx 10^{-9} \text{ s}$). Dadurch wird die Emission stark durch die Wechselwirkung mit der Umgebung des Moleküls beeinflusst. Im Falle der FPs bedeutet dies, dass neben der Chromophorstruktur selbst die Chromophorumgebung in Form von benachbarten Aminosäureseitenketten für Form und Lage des Emissionsspektrums verantwortlich ist. Änderungen in der Chromophorumgebung, z.B. durch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen, können so zur Änderung der Stokes-Verschiebung führen. Des Weiteren ist es möglich verschiedene Chromophorspezies innerhalb einer Probe zu identifizieren. Nach Kashas Regel^[154] sollte das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge sein. Verschiebt sich jedoch die Lage des Emissionsspektrums bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen, kann dies anzeigen, dass sich mindestens zwei Chromophore mit unterschiedlichen Anregungsmaxima in der Probe befinden. So ist die Fluoreszenzspektroskopie eine sensitive Methode, unterschiedliche Chromophore und Veränderungen der Umgebung aufzuzeigen.

Die Fluoreszenzmessungen wurden am Fluorolog-3 Spektrofluorometer FL3-22 (HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching) durchgeführt (Abbildung 3.7). Als Lichtquelle dient in diesem Fluorometer eine 450 W Xenon-Hochdruck-Bogenlampe, das Anregungs- und Emissionslicht wird durch jeweils einen Doppelspaltmonochromator spektral zerlegt, sodass Anregungs- und Detektionswellenlängen frei gewählt werden können. Die Detektion erfolgt mit einer Photomultiplieröhre R928P im 90° -Winkel zur Anregung, damit kein Anregungslicht auf den Detektor gelangt. Bei der Aufnahme der Anregungsspektren wird die Detektionswellenlänge des zweiten Monochromators festgesetzt, wäh-

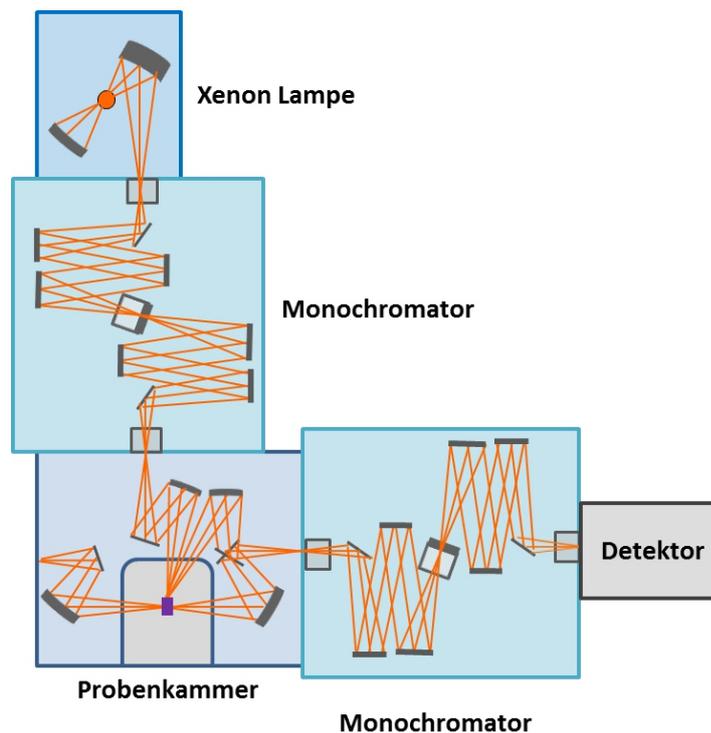


Abbildung 3.7: Aufbau des Fluorolog-3 Fluoreszenzspektrometers. Das von einer Xenon-Lampe ausgesendete Licht wird durch den ersten Monochromator spektral zerlegt, sodass eine bestimmte Anregungswellenlänge gewählt werden kann. Das von der Probe emittierte Licht wird im 90°-Winkel von einem zweiten Monochromator spektral aufgespalten und anschließend wellenlängenabhängig von einer Photomultiplieröhre detektiert.

rend der erste Monochromator die Anregungswellenlänge in 1 nm Schritten abfährt. Bei der Aufnahme der Emissionsspektren wird die Anregungswellenlänge durch den ersten Monochromator festgesetzt, und der zweite Monochromator durchläuft in 1 nm-Schritten die Detektionswellenlänge. Dabei wird nicht bei der Detektionswellenlänge angeregt bzw. bei der Anregungswellenlänge detektiert, um die Detektion von Rayleigh-Streuung zu vermeiden. Die Spaltbreite der Monochromatoren wird jeweils so gewählt, dass die Intensität des Signals den Wert $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ nicht überschreitet, da hier die Sättigung des Detektors erreicht ist. Die Signalintensität wird auf die wellenlängenabhängige Effizienz der Photomultiplieröhre und auf Fluktuationen des Anregungslichtes korrigiert. Zur Messung der Anregungs- und Emissionsspektren wurde eine QS-Ultra-Mikro-Küvette (Hellma) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Proben in Natriumphosphat-Puffer (40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 300 mM NaCl, pH 7,4) bei 20°C gemessen.

Bestimmung der Quantenausbeute. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ gibt das Verhältnis von der Anzahl emittierter Photonen N_A zu der Anzahl absorbierter Photonen N_F an (Gleichung 3.7).

$$\Phi = \frac{N_F}{N_A} \quad (3.7)$$

Für den idealen Fall, dass alle von einem Molekül absorbierten Photonen beim Übergang zurück in den Grundzustand wieder emittiert werden, wäre $\Phi = 1$. In Konkurrenz zum Übergang durch Fluoreszenz stehen jedoch strahlungslose Übergänge. So wird die Quantenausbeute durch Prozesse wie Fluoreszenzlöschung, innere Konversion oder Interkombinationsübergänge verringert. Die Quantenausbeute lässt sich somit durch die Relaxationsraten beschreiben

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}}, \quad (3.8)$$

wobei k_F die Fluoreszenzrelaxationsrate und k_{NR} die Relaxationsrate aller nicht-radiativen Prozesse darstellt.

Die Quantenausbeuten wurden experimentell nach der Methode von Williams *et al.*^[158] bestimmt. Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe mit einer Referenzprobe mit bekannter Quantenausbeute Φ_R und ähnlichem Absorptionsspektrum verglichen. Dabei wird vorausgesetzt, dass beide Proben bei gleicher Absorption und gleicher Anregungswellenlänge die gleiche Anzahl an Photonen absorbieren. Daraus folgt, dass unter identischen Messbedingungen das Verhältnis der integrierten Emission der beiden Proben gleich dem Verhältnis der Quantenausbeuten ist.

Von Referenzprobe und zu untersuchender Probe wurde jeweils eine Messreihe aus 15 Lösungen verschiedener Konzentrationen aufgenommen. Zunächst wurde ein Absorptionsspektrum jeder Probe gemessen, wobei das Absorptionsmaximum der Chromophorbande zwischen 0,02 und 0,1 liegen muss, um Selbstquenching und nicht-lineare Effekte bei der anschließenden Fluoreszenzmessung zu vermeiden. Von jeder Probe wurde ein Emissionsspektrum aufgenommen. Die integrierte Intensität der Emission wurde dann gegen die Absorption bei der Anregungswellenlänge aufgetragen und eine lineare Anpassung vorgenommen. Die Quantenausbeute der Probe Φ_P ist gegeben durch

$$\Phi_P = \Phi_R \cdot \left(\frac{m_P}{m_R} \right) \cdot \left(\frac{\eta_P^2}{\eta_R^2} \right), \quad (3.9)$$

wobei m_P und m_R die Steigungen der jeweiligen linearen Anpassung und η_P und η_R die Brechungsindizes der jeweiligen Lösungsmittel sind. Da alle Messungen in der glei-

chen wässrigen Pufferlösung durchgeführt wurden, geht der Brechungsindex nicht in die Berechnung ein.

Maturierungszeit. Um die Maturierungszeit zu bestimmen, wurde eine Übernachtskultur mit *E. coli* M15 Zellen (100 mL DYT Medium, 75 mg/L Ampicillin, 25 mg/L Kanamycin), die das Plasmid zur Proteinexpression enthielten, angesetzt. Nach 16 h wurde die Kultur auf einen Wert $OD_{600} = 1$ verdünnt und die Expression mit IPTG (1 mM) induziert. Das Protein wurde für 1 h bei 37°C unter Ausschluss von Sauerstoff exprimiert. Anschließend erfolgte die Zellernte, der Zellaufschluss und die Aufreinigung wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben innerhalb von 40 min bei 4°C.

Die Maturierung des Chromophors wurde durch die Messung der Fluoreszenz verfolgt. Dazu wurden 100 μ L der aufgereinigten Probe in eine QS-Ultra-Mikro-Küvette (Hellma) mit einer Weglänge von 3 mm gefüllt und auf 37°C temperiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte alle 60 s bei 670 nm mit einer Anregungswellenlänge von 590 nm und einer Spaltbreite von 3 nm.

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine etablierte Methode, um in biologischen Proben zelluläre Strukturen und Prozesse auf molekularer Ebene sichtbar zu machen. Die Technik besitzt eine große Eindringtiefe, ist kompatibel mit physiologischen Bedingungen und beeinflusst die Probe nur in geringem Maße. Durch die Verwendung genetisch codierter Marker werden sogar Untersuchungen an lebenden Zellen bzw. Organismen möglich.^[159] Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte FP wurde als Marker zellulärer Strukturen mittels hochauflösender Mikroskopie getestet.

3.3.1 Konfokalmikroskopie

Bereits 1908 wurde das Fluoreszenzmikroskop von August Köhler und Henry Siedentopf vorgestellt und bis heute stetig weiterentwickelt.^[160] Eine dieser Weiterentwicklungen ist die Kontrastverbesserung in axialer Richtung durch die Einführung konfokaler Optiken (Abbildung 3.8). Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie, bei der das gesamte Objekt auf einmal beleuchtet wird, handelt es sich bei der Konfokalmikroskopie um eine Punktrastermethode. Dabei wird das Anregungslicht auf die Probe fokussiert und alle Fluorophore innerhalb des Anregungsvolumens zur Fluoreszenz angeregt. Das emittierte Licht gelangt zurück durch das Objektiv auf den Detektor. So wird die Probe

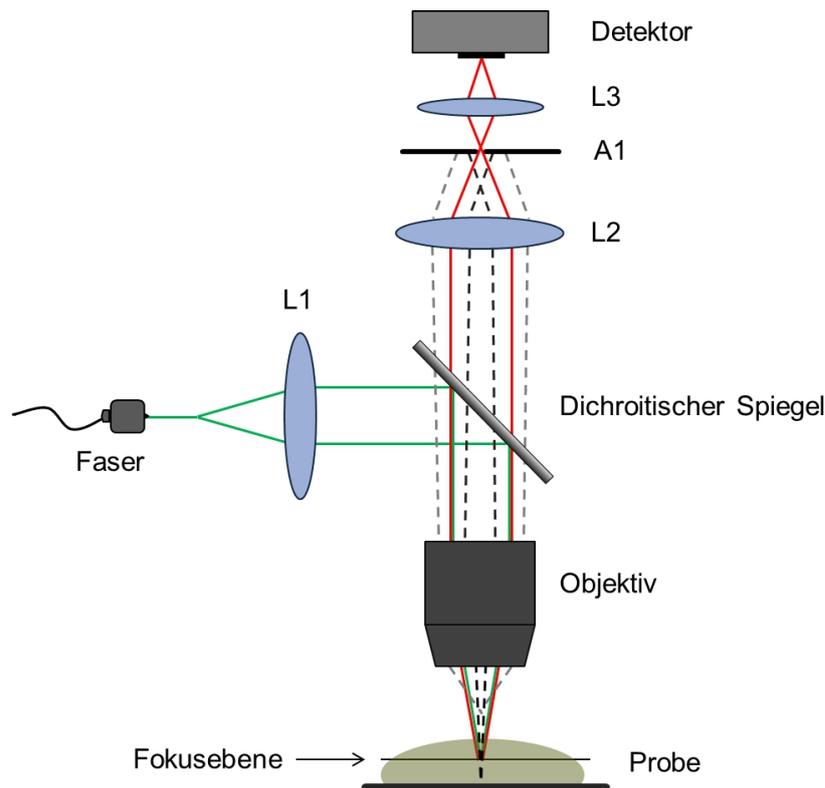


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung eines Konfokalmikroskops. Das Anregungslicht des Lasers (grün) gelangt durch eine Faser und eine Linse (L1) auf einen dichroitischen Spiegel. Dieser reflektiert das Anregungslicht, ist aber für das Emissionslicht längerer Wellenlänge durchlässig. Durch das Objektiv wird das Licht auf die Probe fokussiert. Die Emission fällt zurück durch das Objektiv und wird von einer zweiten Linse (L2) fokussiert, sodass nur das Licht aus der Fokusebene (rot) die Lochblende (A1) passieren kann.

Punkt für Punkt abgerastert und das Bild anschließend mit Hilfe der Fokusposition rekonstruiert. Da auch Fluorophore außerhalb des konfokalen Volumens zur Fluoreszenz angeregt werden, verhindert der Einbau einer konfokalen Apertur vor dem Detektor, dass Licht aus anderen Fokusebenen als der ausgewählten auf den Detektor gelangt. Dies führt zu einer Verringerung des axialen Detektionsvolumens und somit zu einem besseren Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis.^[161–163]

3.3.2 Auflösungsbegrenzung

Die Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops wird als der Abstand d definiert, den zwei Fluorophore haben müssen, um als getrennte Objekte erkennbar zu sein. Sie ist allgemein beschränkt durch die Beugung von Licht. Die Auflösungsbegrenzung optischer

Mikroskope wurde Ende des 19. Jahrhunderts von Ernst Abbe und Sir Rayleigh diskutiert.^[164–166]

Ein Fluorophor kann als Punktlichtquelle betrachtet werden, welche ein Bild mit definierter Intensitätsverteilung generiert. Diese Intensitätsverteilung ist abhängig von der Beugung des Lichts und wird durch die sogenannte Punktspreizfunktion (*engl. point spread function*, PSF) beschrieben. Innerhalb der Fokusebene wird die Intensität I durch die *Airy*-Verteilung (Gleichung 3.10) definiert. Der Bereich zwischen dem zentralen Maximum und dem ersten Minimum wird als *Airy-Scheibchen* (*engl. Airydisc*) bezeichnet.

$$I(\nu) = (\pi N^2) \cdot \left[\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2 \quad (3.10)$$

Hierbei ist J_1 die Bessel-Funktion erster Ordnung. Die Fresnel-Zahl N und die radiale optische Koordinate $\nu(r)$ werden beschrieben durch

$$N = \frac{(NA)^2}{f\lambda}, \quad (3.11)$$

$$\nu(r) = \frac{2\pi NA}{\lambda} \cdot r, \quad (3.12)$$

wobei λ die Wellenlänge des Lichts und f die Fokusslänge ist. Die numerische Apertur NA wird durch Gleichung 3.13 definiert,

$$NA = n \cdot \sin\alpha, \quad (3.13)$$

wobei n der Brechungsindex und α der halbe Öffnungswinkel des Objektivs ist.

Rayleigh definierte, dass zwei Objekte noch unterschieden werden können, wenn das Maximum der *Airy-Scheibe* des einen Objekts mit dem ersten Minimum der *Airy-Scheibe* des anderen Objekts überlagert. Der minimale Abstand d dieser zwei Objekte ist nach dem Rayleigh Kriterium^[167] (Gleichung 3.14) definiert durch die Wellenlänge λ und die numerischer Apertur NA ,

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA}. \quad (3.14)$$

Dies bedeutet, dass der Abstand d mit größerer numerischer Apertur kleiner wird. Der Öffnungswinkel eines Objektivs ist technisch durch den Abstand von Objektiv und Probe begrenzt. Wird Öl mit einem Brechungsindex von $n = 1,515$ anstelle von Luft mit einem Brechungsindex von $n = 1,0$ als Immersionsmedium verwendet, so kann die NA um 47% erhöht werden. Die zurzeit besten auf dem Markt erhältlichen Ölimmersions-

objektive haben eine NA von 1,46, was einem Öffnungswinkel von $\sim 70^\circ$ entspricht. Für die Detektion von Licht mit $\lambda = 550 \text{ nm}$ ergibt sich daraus eine Auflösung von $\sim 230 \text{ nm}$.

In den letzten Jahren wurde durch die Entwicklung neuer Mikroskopietechniken die Bilddarstellung unter der Auflösungsgrenze möglich. So erhielten erst 2014 Eric Betzig, William Moerner und Stefan Hell den Nobelpreis in Chemie für "die Entwicklung von supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie". Die Grundlage vieler dieser hochauflösenden Methoden basiert auf dem Phänomen des molekularen Schaltens.^[4] Diese Methoden können allgemein in zwei Kategorien eingeteilt werden, die stochastischen und die nicht-stochastischen Methoden.^[168] Stochastische Methoden wie PALM^[169], (d)STORM^[170,171], PALMIRA^[172] und GSDIM^[173] nutzen die zeitliche Separation der Fluoreszenz benachbarter Emitter durch zufälliges An- und Ausschalten der Fluorophore. Das Bild wird anschließend aus einer großen Anzahl an lokalisierten Fluorophoren rekonstruiert. Bei den nicht-stochastischen Methoden wie SSIM^[174,175], RESOLFT^[176–179], GSD^[180,181] und STED^[129,182] basiert das Prinzip auf der Manipulation der PSF, die die Auflösung des Systems repräsentiert. Der Vorteil bei diesen Methoden ist, dass keine mathematische Nachbearbeitung notwendig ist.

3.3.3 STED-Mikroskopie

Die STED-Mikroskopie (*engl. stimulated emission depletion microscopy*) war die erste Technik, die das Auflösungslimit umgangen hat.^[129] Das Prinzip beruht auf der selektiven Deaktivierung von Fluorophoren durch stimulierte Emission, wodurch verhindert wird, dass diese an der Bildgebung beteiligt sind. Praktisch wird dies durch einen sogenannten Abregungslaser (STED-Laser) realisiert, der mit dem Anregungslaser überlagert wird. Besitzt der STED-Strahl ein ringförmiges Profil mit der Intensität 0 im Zentrum (Torus-Form), so wird die effektive PSF, mit der die Fluorophore angeregt werden, kleiner (Abbildung 3.9 a). Bei der stimulierten Emission regt ein einfallendes Photon einen Fluorophor zur Emission an (Abbildung 3.9 b). Das emittierte Photon hat dabei dieselben Eigenschaften (Wellenlänge, Polarisation und Ausbreitungsrichtung) wie das einfallende Photon. Praktisch bedeutet dies für die Messung an einem invertierten Mikroskop, dass das Licht der stimulierten Emission nicht auf den Detektor gelangt, sondern sich in die entgegengesetzte Richtung ausbreitet. Zusätzlich wird der STED-Laser bei einer Wellenlänge betrieben, die im Vergleich zur spontanen Emission rotverschoben ist, sodass sich stimulierte und spontane Emission spektral voneinander abgrenzen lassen.

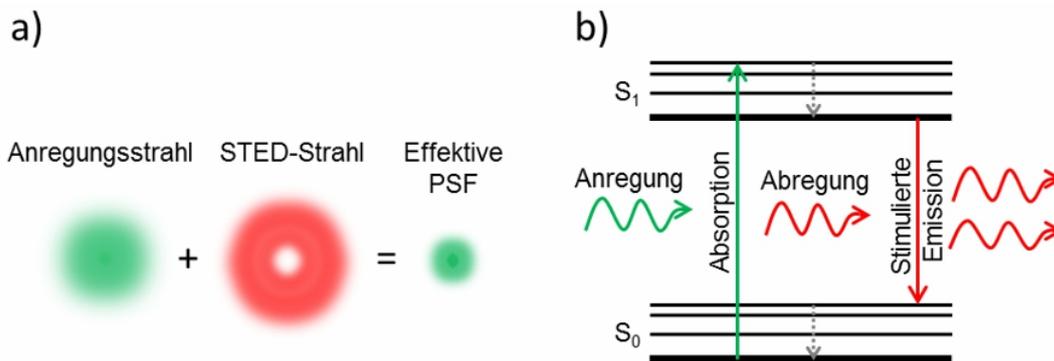


Abbildung 3.9: Prinzip der stimulierten Emission. a) Wird der Anregungsstrahl mit dem STED-Strahl überlagert, so erscheint die effektive PSF kleiner. b) Anstelle der spontanen Emission, wird ein Photon durch ein einfallendes Photon zur Emission stimuliert.

Die Abregungseffizienz hängt von der Anzahl einfallender Photonen ab, d.h., von der Intensität des STED-Lasers. Die Auflösung d ist definiert durch

$$d = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha) \cdot \sqrt{1 + \frac{I}{I_{sat}}}}, \quad (3.15)$$

wobei I die maximale Intensität des Abregungspulses und I_{sat} die Sättigungsintensität des Fluorophors, d.h., die Laserintensität, bei der die Fluoreszenzwahrscheinlichkeit auf 50% abgefallen ist, darstellt.^[183,184] Für unendlich hohe Intensitäten ist die Auflösung theoretisch nicht begrenzt. So wurden schon Bilder mit einer Auflösung von 2,4 nm realisiert.^[185] Für biologische Proben wurden Auflösungen von 30 – 80 nm in lateraler und 100 nm in axialer Richtung erreicht.^[186]

Im Experiment wird die Auflösung vor allem durch die Photostabilität des Fluorophors begrenzt. Je langsamer ein Fluorophor bleicht, desto höher kann die verwendete Intensität des STED-Lasers sein und desto besser ist die Auflösung.^[187,188] Das Problem besteht vor allem darin, dass die STED-Mikroskopie eine sogenannte *scanning* Methode ist, bei der die Probe Punkt für Punkt abgerastert wird, um ein vollständiges Bild zu erhalten. Dadurch wird ein Fluorophor mehrmals während der Bildaufnahme durch den STED-Laser abgeregt.

Die STED-Messungen wurden an einem in der Arbeitsgruppe gebauten Mikroskop durchgeführt (Abbildung 3.10). Für die Anregung der Probe wurde ein 640 nm gepulster Diodenlaser (LDH-P-C-640B, PicoQuant, Berlin) benutzt, der Pulse mit einer Länge von 100 ps und einer Frequenz von 80 MHz generiert. Das Anregungslicht

wird durch einen Bandpassfilter mit Zentrum bei 640 nm und einer spektralen Breiten von 14 nm (FF01-640/14-25, Semrock, Rochester, USA) und eine 2 m polarisationserhaltene Einzelmoden-Faser (PMJ-A3HPC, OZ Optics, Ottawa, Canada) geleitet. Der STED-Strahl mit einer Wellenlänge von 780 nm wird von einem Ti:Sa Laser (Mai Tai HP, Newport Spectra-Physics, Darmstadt) generiert. Die Pulse des Ti:Sa Lasers haben

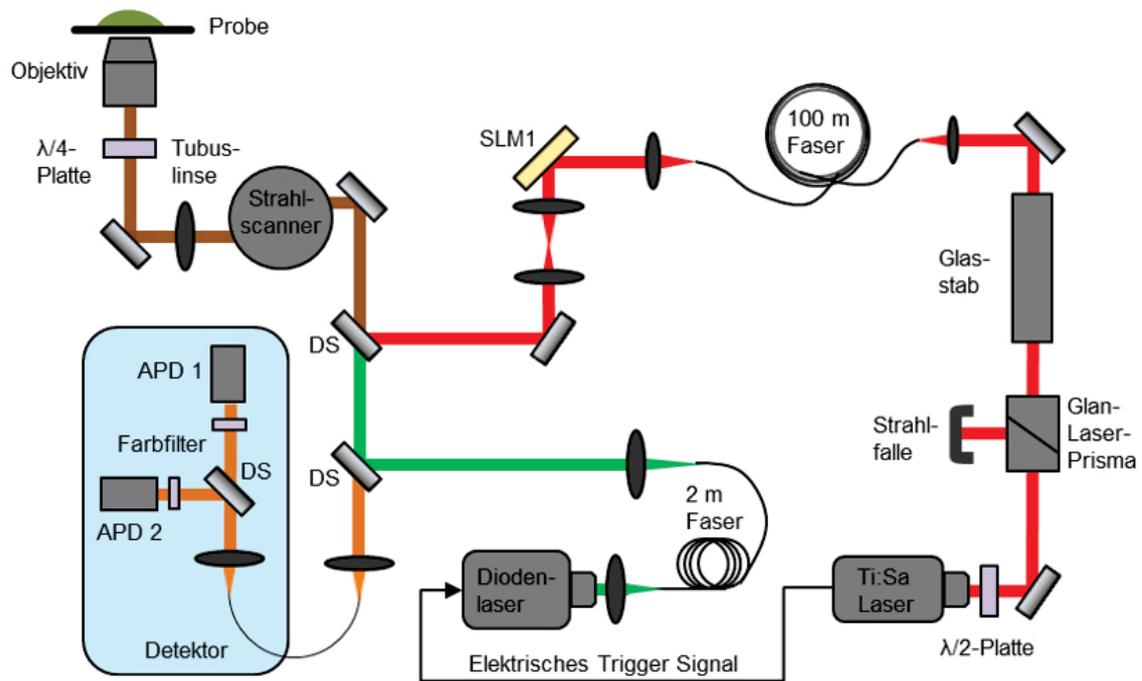


Abbildung 3.10: Aufbau des STED-Mikroskops. Der prinzipielle Aufbau entspricht dem eines Konfokalmikroskops. Der vom Ti:Sa Laser generierte und durch einen SLM modulierte STED-Strahl wird über einen dichroitischen Spiegel (DS) in das System eingekoppelt und ermöglicht die Messung im STED-Modus.

eine Länge von 100 fs und werden nachträglich durch einen 60 cm Schwertflintglasstab und eine 100 m lange Monomodenfaser (PMJ-A3HPC, OZ Optics) auf 300 ps verlängert. Die Torus-Form des STED-Strahls in lateraler Richtung wird durch einen *spatial light modulator* (SLM, LETO Phase Only, HOLOEye, HOLOEYE Photonics AG, Berlin) generiert. Der STED-Strahl wird über einen 730 nm dichroitischen Kurzpassspiegel (z730sprdc, Chroma, Bellow Falls, USA) mit dem Anregungsstrahl überlagert. Anschließend werden beide Strahlen mittels eines Strahl-Scanners (Yanus V, Till Photonics, Gräfelfing) durch eine $\lambda/4$ Phasenplatte und das Objektiv (HCX PLATO CS X100/1.46, Leica, Wetzlar) auf die Probe fokussiert. Das Emissionslicht wird von einem dichroitischen Quadbandspiegel (zt405/488/561/640rpc, Chroma) vom Anregungslicht getrennt und in eine Multimodenfaser, welche als konfokale Lochblende dient, fokussiert.

Anschließend gelangt es durch einen 700 nm Kurzpass Filter (ET700SP, Chroma) und einen Bandpassfilter (HC 676/37, Semrock) auf die Avalanche-Photodioden (APD, tau-SPAD-50, PicoQuant).

3.3.4 Probenpräparation

Für die mikroskopischen Messungen wurden verschiedene Strukturen in COS-7 Zellen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) markiert. Dazu wurde die cDNA der entwickelten mRuby-Variante mit der cDNA entsprechender Markerproteine fusioniert und über ein Plasmid transient in die Zellen eingebracht.

Kultivierung der COS-7 Zellen. Die Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, Kanada) mit 10% fötalem Kälberserum und Antibiotikum (60 mg/mL Penicillin, 100 ng/mL Streptomycin) in Zellkulturflaschen (12,5 cm², VWR International GmbH, Darmstadt) bei 37°C, 5% CO und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (HeraCell 150, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) kultiviert. Die Zellen wurden passagiert, sobald etwa 80% der Oberfläche bedeckt waren. Dazu wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen mit 5 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS 1 x ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, pH 7,4, Sigma-Aldrich) gewaschen. Durch Zugabe von 500 µL Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin-EDTA, Phenol Red, Invitrogen, Grand Island, USA) und anschließender Inkubation für 5 min im Brutschrank wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit 5 mL Medium (37°C) gemischt, um das Trypsin zu inhibieren. Anschließend wurden 250 µL der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit 5 mL frischem Medium gegeben.

Transfektion. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in Kammerdeckgläsern (Labtek Chamber Slides, Thermo Scientific, Langenselbold) gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Für die Transfektion wurde Lipofectamine[®] (Invitrogen) verwendet. Dazu wurden 500 µL Opti-Mem mit 10 µL LTX-Lösung und 500 µL Opti-Mem mit 10 µL Plus[™]-Reagent und 3 µg Plasmid-DNA gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die beide Mischungen wurden vereinigt und 35 min bei Raumtemperatur und 5 min bei 37°C inkubiert, um die Lipidvesikel zu bilden. Die Zellen wurden mit PBS (37°C, pH 7,4) gewaschen und anschließend in jede Kammer 100 µL des Lipidvesikel-Mix gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde in jede Kammer 300 µL Medium ohne Antibiotikum zugegeben, und die Zellen wurden für mindestens weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

3.3.5 Nicht-bildgebende Mikroskopietechniken

Neben den oben beschriebenen bildgebenden Techniken können auch nicht-bildgebende Experimente an Mikroskopen durchgeführt werden. Zwei in dieser Arbeit verwendete Methoden werden in diesem Abschnitt beschrieben.

Fluoreszenzlebensdauer Die Fluoreszenzlebensdauern wurden an einem Konfokalmikroskop (Microtime 200, PicoQuant, Berlin) mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung gemessen. Dazu wurde eine Lösung des Proteins mit einer Konzentration von ~ 100 nM mit einem gepulsten 640 nm Laser (LDH-P-C-640B, PicoQuant) mit 8 μ W bei 40 MHz angeregt. Das emittierte Licht wurde durch einen Langpassfilter auf Wellenlängen >655 nm begrenzt und auf eine Avalanche Photodiode (SPCM-AQR-13, Perkin Elmer, Rodgau) fokussiert. Die Datenaufnahme erfolgte mit Hilfe einer kommerziellen Software (SymPhoTime, PicoQuant). Die erhaltenen Abklingkurve der Fluoreszenzintensität wurde mit einem in MATLAB R2014 (The Mathworks, Natick, USA) geschriebenen Routineprogramm, welches auf der Faltung eines monoexponentiellen Abfalls und der Antwortfunktion der Apparatur (*engl. instrument response function*, IRF) basiert, kompiliert und angepasst.

Einzelmolekül-Photobleichen Um die Photonenzahl zu bestimmen, die ein einzelnes FP-Molekül emittiert, bevor es bleicht, wurden diese einzeln auf einem polymerbeschichteten Quarzobjektträger (30:1 mPEG-SVA1:biotin-PEG_SC (w/w), MW 5000, Laysan Bio Inc., Arab, USA) über Neutravidin/Biotin immobilisiert und an einem invertierten Weitfeldmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) unter objektivbasierter totaler interner Reflexion vermessen.^[189] Für die Biotinylierung der Proteine wurde eine 25 μ M FP-Lösung mit 250 μ M NHS-PEG4-Biotin (EZ-LinkTM NHS-PEG4-Biotin, Life Technologies, Darmstadt) in PBS gemischt. Anschließend wurde NaHCO_3 zugegeben, sodass die Endkonzentration 100 mM und der pH-Wert der Lösung 7,4 betrug. Nach 2 h Inkubation im Rotator wurde das freie PEG4-Biotin mit Hilfe einer Entsalzungssäule (Micro Bio-Spin, BIO-RAD) entfernt. Der mit Biotin-PEG/PEG beschichtete Objektträger wurde mit 100 nM Neutravidin-Lösung (PierceTM Neutravidin, Life Technologies) 5 min inkubiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Lösung biotinylierter FPs (40 – 100 pM) zugegeben und für 15 min inkubiert. Der Überschuss an nicht gebundenen FP-Molekülen wurde mit PBS weg gewaschen.

Die Probe wurde mit einem 561 nm-Laser (GCL-150-561, 272 W/cm², CrystaLaser, Reno, USA) im internen Totalreflexionsmodus beleuchtet (256 \times 256 Pixel, 28,2 \times 28,2 μ m²). Die emittierten Photonen wurden durch ein Ölimmersionsobjektiv (alpha

Plan-Apochromat 63x/1.46 OilCorr M27, Zeiss) gesammelt und durch einen 561 nm Langpassfilter (EdgeBasic, AHF, Tübingen) auf eine EMCCD-Kamera (iXon Ultra 897, Andor Technology Ltd., Belfast, UK) geleitet. Die Belichtungszeit betrug 50 ms/Bild. Die Laseranregung wurde dabei mit der Datenaufnahme synchronisiert. Die Daten wurden mit einem in MATLAB R2014 (The Mathworks) geschriebenen Programm ausgewertet. Einzelne FPs in den einzelnen Bildern wurden mit Hilfe des Programms a-livePALM^[190] identifiziert. Moleküle, die in verschiedenen Bildern identifiziert wurden, wurden als dasselbe betrachtet, wenn sie innerhalb von 100 nm lokalisiert wurden. Aus den detektierten Ereignissen mit mehr als 300 emittierten Photonen wurde ein Histogramm der Anzahl dieser Ereignisse gegen die Anzahl emittierter Photonen pro FP-Molekül erstellt.

4 Rationales Design einer rotverschobenen mRuby Variante

Beim rationalen Design werden durch den Austausch von bestimmten Aminosäuren die Eigenschaften eines Proteins gezielt verändert. Eine Rotverschiebung der Fluoreszenz von FPs kann dabei durch verschiedene Strategien erreicht werden. Allgemein gilt es, das konjugierte π -Elektronensystem des Chromophors zu erweitern, den Grundzustand zu destabilisieren oder den angeregten Zustand zu stabilisieren. Der Grundzustand des anionischen Chromophors kann z.B. durch hydrophobe Aminosäuren nahe des Phenolat-Sauerstoffs destabilisiert werden. Im angeregten Zustand erfolgt eine Verschiebung der Elektronendichte vom Hydroxyphenylring zum Imidazolinonring. Interaktionen, die diese Verschiebung begünstigen, würden demzufolge den angeregten Zustand stabilisieren und somit eine Rotverschiebung hervorrufen. Im Falle des DsRed-Chromophors wird dies z.B. durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Acylimin-Sauerstoff und benachbarten Aminosäuren, wie V13^[191,192] oder M41^[193], oder Wassermolekülen^[127,194] realisiert. Außerdem kann dadurch das π -Elektronensystem erweitert werden. Eine weitere Möglichkeit, den angeregten Zustand zu stabilisieren, besteht darin, π - π -Wechselwirkungen des Chromophors mit nahegelegenen Aminosäuren einzufügen, z.B. an der Position 197.^[128,137,195]

Des Weiteren kann der Chromophor zwei verschiedene Konformationen annehmen, *trans* oder *cis*, wobei es viele FPs gibt, in denen beide Isomere existieren. Es konnte gezeigt werden, dass die *cis*-Form im Vergleich zur *trans*-Form rotverschoben absorbiert und emittiert.^[107] Für das Verhältnis der beiden Isomere in einem Protein mit DsRed-Chromophor und damit auch für dessen Absorptions- und Emissionseigenschaften sind vor allem die Aminosäuren an Position 143 und 158 verantwortlich.^[106,127,196,197] Eine große Aminosäure wie Cystein oder Asparagin an Position 158 blockiert durch sterische Hinderung die *trans*-Position des Chromophors, während polare Aminosäuren wie Serin oder Asparagin an Position 143 die *cis*-Konformation durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Phenolat-Sauerstoff des Chromophors stabilisieren.^[106,196]

In diesem Kapitel sind die spektroskopischen Eigenschaften ausgewählter mRuby Mu-

tanten zusammengefasst, bei denen die verschiedenen Strategien zur Rotverschiebung von Absorption und Emission angewendet wurden.

4.1 Isomerisierung des Chromophors

Der erste Schritt zu einer rotverschobenen mRuby-Variante war die Isomerisierung des Chromophors von der *trans*- in die *cis*-Konformation. Die Kristallstrukturen von mRuby zeigen, dass das Proteingerüst in der Lage ist, sowohl den planaren *trans*- (PDB 3U0M, pH 8.5), als auch den *cis*- (PDB 3U0L, pH 4,5) Chromophor zu stabilisieren. Abbildung 4.1 zeigt den *trans*-Chromophor von mRuby und die Lage der Aminosäuren, deren Mutationen in diesem Unterkapitel behandelt werden.

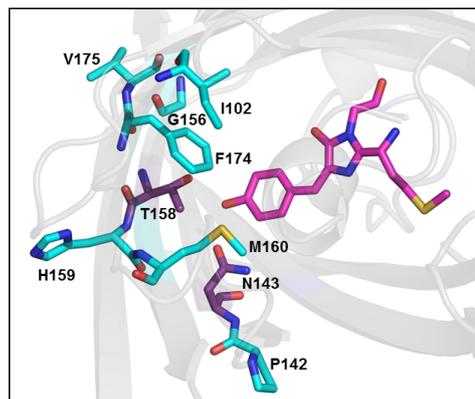


Abbildung 4.1: Kristallstruktur des Chromophors und benachbarter Aminosäuren in mRuby. Der Chromophor (magenta) befindet sich im Zentrum des β -Fasses. Aminosäuren, deren Mutationen in diesem Unterkapitel besprochen werden, sind in blau dargestellt (PDB: 3U0M).

4.1.1 Mutation von Asparagin 143 und Threonin 158

In eqFP611 wurden, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, durch die teilweise bzw. vollständige Isomerisierung des Chromophors die rotverschobenen Varianten RFP630 bzw. RFP639 erhalten.^[44] In mRuby wurden nach dem Vorbild von RFP630 und RFP639 die Aminosäuren N143/T158 durch Serin/Serin und Serin/Cystein ausgetauscht (Abbildung 4.2). Die Anregungs- und Emissionsmaxima von mRuby-N143S-T158S liegen bei 556 nm und 602 nm und sind somit im Vergleich zum Wildtyp leicht blauverschoben. In mRuby-N143S-T158C sind die Absorptions- und Anregungsmaxima auf 577 nm und das Emissionsmaximum auf 610 nm rotverschoben. Außerdem erscheint in

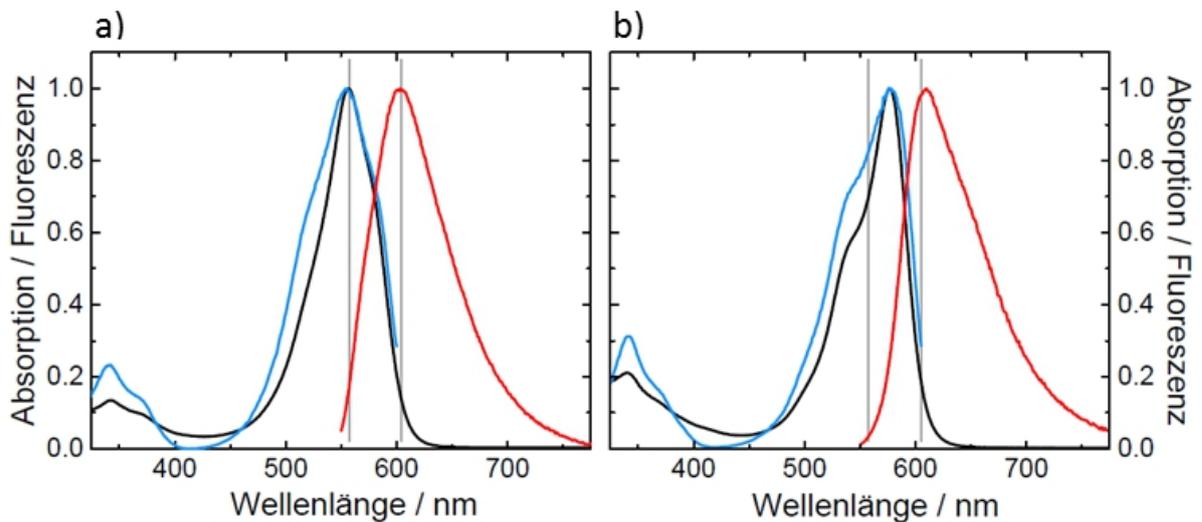


Abbildung 4.2: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-N143S-T158S und mRuby-N143S-T158C. a) Die Maxima von Absorption (schwarz), Anregung (blau) und Emission (rot) der N143S-T158S Variante unterscheiden sich kaum von denen des Wildtyps (graue Linien). b) Die Maxima der N43S-T158C Variante sind hingegen leicht rotverschoben.

den Absorptions- bzw. Anregungsspektren beider Mutanten eine Bande bei 342 nm, die dem S_0 nach S_2 Übergang des *cis*-Chromophors zugeordnet wird.^[193] Wird mRuby-N143S-T158S bei verschiedenen Wellenlängen angeregt, ändert sich die Form des Emissionsspektrums (Abbildung 4.3 a). Ebenso ist im Anregungsspektrum bei Detektionswellenlängen über 600 nm eine Schulter bei ~580 nm zu erkennen. Diese verschwindet, wenn eine Detektionswellenlänge unter 600 nm gewählt wird. Auch die Intensität der Anregungsbande bei 342 nm wird geringer, wenn unter 600 nm detektiert wird. Dieses Verhalten zeigt, dass mindestens zwei unterschiedliche Chromophorspezies mit unterschiedlichen Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften vorliegen. Unter alkalisch denaturierenden Bedingungen bei pH 13 nimmt die Absorption des roten anionischen Chromophors mit der Zeit ab. Im Falle von mRuby-N143S-T158S ist dabei zunächst eine Abnahme der Intensität an der langwelligen Flanke des Spektrums zu erkennen, anschließend erfolgt eine Intensitätsabnahme im Maximum (Abbildung 4.3 b). Beim Vergleich des achten Spektrums der Reihe mit dem Differenzspektrum zwischen erstem und siebtem Spektrum wird deutlich, dass die Abnahme der Absorption zunächst hauptsächlich bei 586 nm erfolgt, d.h., 14 nm vom eigentlichen Absorptionsmaximum bei 562 nm entfernt. In mRuby-N143S-T158C konnte kein solches Verhalten beobachtet werden. Auch die Lage und Form von Anregung und Emission bleibt bei Änderung

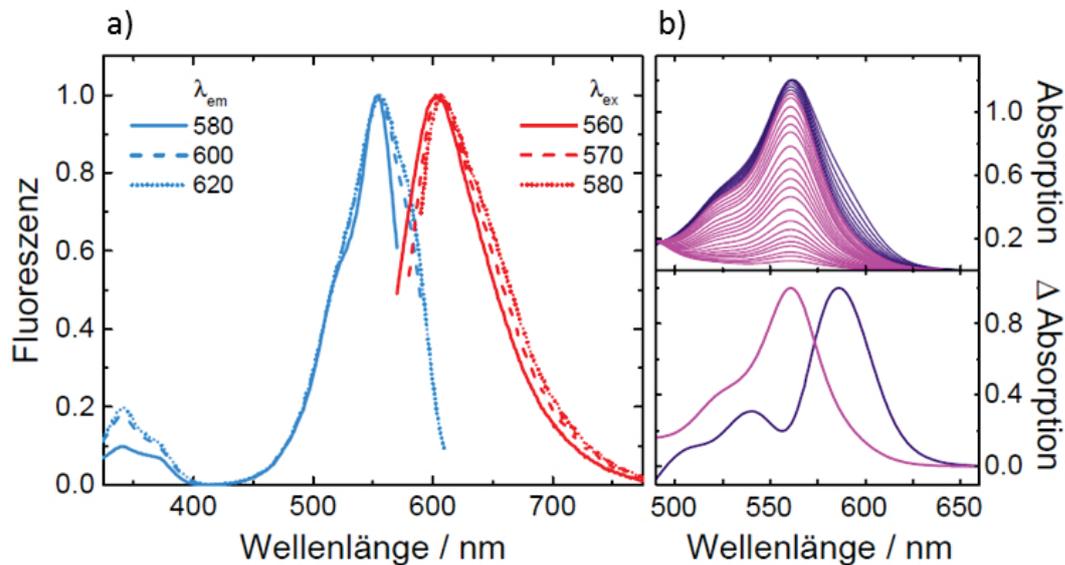


Abbildung 4.3: Spektrale Eigenschaften von mRuby-N143S-T158S. a) Die Lage von Anregungs- (blau) bzw. Emissionsspektrum (rot) verschiebt sich je nach Detektions- bzw. Anregungswellenlänge. b) Unter denaturierenden Bedingungen (pH 13) ist eine zeitliche Abnahme der Absorption des anionischen roten Chromophors zu beobachten (oben). Die ersten sieben Spektren (violett) zeigen eine Abnahme der Absorption bei ca. 580 nm. Der Vergleich des achten Spektrums (magenta) mit dem normierten Differenzspektrum aus erstem und siebtem Spektrum (violett) zeigt, dass sich die Lage der Maxima mit 562 nm und 586 nm deutlich unterscheiden (unten).

von Detektions- und Anregungswellenlänge gleich. Daraus lässt sich schließen, dass der Chromophor nur in einer Konformation vorliegt.

4.1.2 Der Austausch von Threonin 158 gegen Asparagin

Um auf alternativem Weg die Isomerisierung des Chromophors zu erreichen, wurden zum einen andere FPs mit DsRed Chromophor in der *cis*-Konformation als Vorbild genommen, zum anderen wurden weitere Kombinationen von Aminosäuren an Position 143 und 158 getestet, die bisher noch in keinem RFP zu finden sind (Tabelle 4.1). Die erfolgreichste Kombination dabei, in Bezug auf Rotverschiebung und Proteinfaltung, war die nach dem Vorbild von eqFP670^[127] und TagRFP675^[193]. In eqFP670^[127] und TagRFP675^[193] wird der *cis*-Chromophor jeweils durch Asparagine an den Positionen 143 und 158 stabilisiert. Da sich in mRuby an Position 143 schon ein Asparagin befindet, wurde zusätzlich noch die Mutation T158N eingeführt. Im Vergleich zum Wildtyp sind Absorptions- und Emissionsmaximum von mRuby-T158N um etwa 20 nm rotver-

Tabelle 4.1: Liste der Varianten mit Mutation an Position 143 und 158 mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
N143C	403 + 583	576	612
N143D	477	450-566	602-608
N143S	580	581	612
N143D-T158N	476	476	602
N143S-T158N	577	577	609-610
N143S-T158F	579	585	615
N143S-T158R	403 + 577	576	610-612
N143S-T158C	577	577	610
N143S-T158S	556	556	602
T158C	577	574-575	608-618
T158D	475 + 584	584	598-629
T158E	404 + 580	580	616
T158H	581	560-578	608-634
T158M	404 + 480 + 581	570-590	555-624
T158N	403 + 581	579-583	621-627
T158Q	404 + 480 + 585	530-588	607-636
T158R	404 + 578	576	608
T158A-F174L	550	551	593-601
N143S-T158C-F174A	405 + 577	575	607-611
N143S-T158C-F174K	405 + 577	577	608-610
N143S-T158C-F174L	405 + 581	580	612-616
N143S-T158C-F174S	575	573-575	608-614
T158N-F174L	578	578-582	614-623
I102F	559	558	600
I102F-T158N	585	563-585	626-630
I102F-T158N-F174L (mRuby625 ^[198])	582	584	625
I102F-N143A-T158N-F174L	563	575-580	604-610
I102F-N143C-T158N-F174L	566	584-586	622-624
I102F-N143D-T158N-F174L	479 + 569	476	608-610
I102F-N143E-T158N-F174L	404 + 563	567-575	601-605
I102F-N143F-T158N-F174L	580	578	614
I102F-N143G-T158N-F174L	404 + 574	580	610
I102F-N143H-T158N-F174L	580	579	619
I102F-N143I-T158N-F174L	404 + 561	559-567	607-618
I102F-N143K-T158N-F174L	563	567	602
I102F-N143L-T158N-F174L	404	560-566	580-628
I102F-N143M-T158N-F174L	563	581	620
I102F-N143Q-T158N-F174L	564	567-578	603-612
I102F-N143R-T158N-F174L	563	573	604
I102F-N143S-T158N-F174L	580	578-582	616-621
I102F-N143T-T158N-F174L	563	579-580	613-619
I102F-N143V-T158N-F174L	380 + 400 + 561	557	607

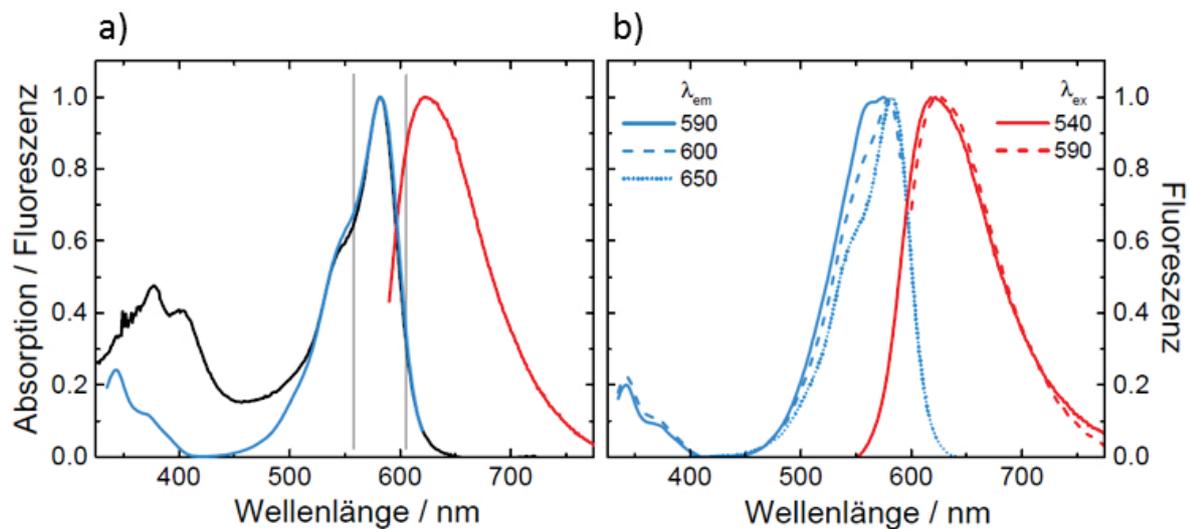


Abbildung 4.4: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-T158N. a) Die Maxima von Absorption (schwarz), Anregung (blau) und Emission (rot) der T158N Variante sind im Vergleich zu denen des mRuby Wildtyps (graue Linien) deutlich rotverschoben. Es erscheint zusätzlich eine breite Absorptionsbande bei 400 nm. b) Die Detektion bzw. Anregung bei verschiedenen Wellenlängen zeigt eine klare Verschiebung der Anregungs- bzw. Emissionsmaxima.

schoben (Abbildung 4.4 a). Die Anregungsbande bei 342 nm gibt einen Hinweis darauf, dass sich zumindest ein Teil des Chromophors in der *cis*-Konformation befindet. Außerdem erscheint eine Absorptionsbande bei 400 nm, die von nicht vollständig maturiertem Chromophor stammt (vgl. Unterkapitel 5.1, Abbildung 5.2 b). Wird die Fluoreszenz bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert, verändert sich die Lage des Anregungsmaximums (Abbildung 4.4 b). Das Anregungsspektrum mit Detektion bei 590 nm zeigt zwei Maxima bei 562 nm und 575 nm, die einen deutlichen Hinweis darauf geben, dass der Chromophor in mehreren Konformationen vorliegt. Es liegt nahe, dass es sich bei den verschiedenen Konformationen um die *trans*- und die dazu rotverschobene *cis*-Spezies handelt. Das Emissionsmaximum verschiebt sich nur leicht von 622 nm ($\lambda_{ex} = 540$ nm) nach 627 nm ($\lambda_{ex} = 590$ nm). Da die Kombination von N143 und N158 in mRuby die größte Rotverschiebung zusammen mit einer hohen Proteinstabilität zeigte, wurde versucht, die Maturierungseffizienz des Chromophors durch weitere Mutationen zu steigern (Tabelle 4.1). Am erfolgreichsten war dabei die Mutation F174L. Ein Leucin an dieser Position ist auch in RFPs wie eqFP670^[127] oder TagRFP675^[193] zu finden. Im Absorptionsspektrum von mRuby-T158N-F174L ist die Bande bei 400 nm nahezu vollständig

verschwunden, während sich die Lage von Anregungs- und Emissionsmaximum im Vergleich zu mRuby-T158N kaum verändert (Abbildung 4.5 a). Auch das zweite Maximum im Anregungsspektrum mit Detektion bei 590 nm ist verschwunden. Das Anregungsmaximum liegt hier nun bei 578 nm und stimmt mit dem Wert überein, der in der T158N Mutante dem *cis*-Chromophor zugeordnet wurde. Der Austausch von F174 gegen Leucin scheint somit die Maturierung des *cis*-Chromophors zu unterstützen. Allerdings ist die Verschiebung des Emissionsmaximums bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 614 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm) nach 623 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm) etwas größer als in mRuby-T158N, was zeigt, dass sich immer noch ein Teil der Chromophore in der *trans*-Konformation befindet.

Zusätzlich zu T158N und F174L wurde noch die Mutation I102F eingeführt (Tabel-

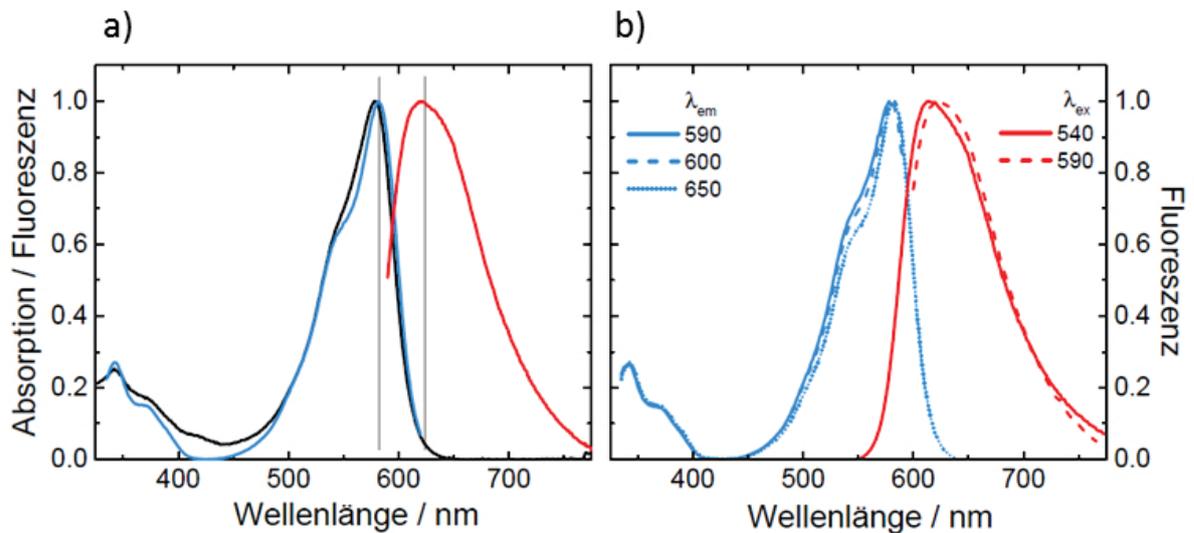


Abbildung 4.5: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-T158N-F174L.
 a) Die Maxima von Absorption (schwarz), Anregung (blau) und Emission (rot) sind vergleichbar mit denen der T158N Mutante (graue Linien). Allerdings ist die Absorptionsbande bei 400 nm nahezu verschwunden. b) Die Verschiebung des Anregungsmaximums aufgrund verschiedener Detektionswellenlängen ist viel geringer als bei der Variante ohne die Mutation F174L.

le 4.1). In eqFP611^[43] befindet sich an Position 102 ein Phenylalanin. Der Austausch von F102 gegen Isoleucin bewirkt eine Steigerung der Thermostabilität. Während eqFP611 nur bei Temperaturen unter 30°C faltet, falten Varianten, die die Mutation F102I enthalten auch bei 37°C. Die Mutation F102I ist in mRuby vorhanden, nicht jedoch im weiter rotverschobenen RFP639^[44]. Um auszuschließen, dass das Isoleucin in mRuby eine größere Rotverschiebung der *cis*-Spezies verhindert, wurde I102 in Phenylalanin

zurück mutiert. In mRuby-I102F-T158N-F174L konnte im Vergleich zur Variante ohne Mutation I102F trotzdem nur eine geringfügige Verschiebung von Absorption und Emission um 4 bzw. 2 nm beobachtet werden. Da das Emissionsmaximum dieser Variante bei 625 nm liegt, wurde sie als mRuby625 bezeichnet.^[198] mRuby625 wurde, genau wie mRuby-T158N und mRuby-T158N-F174L, als Ausgangspunkt für weitere Mutationen verwendet.

4.1.3 Beeinflussung der Umgebung der Aminosäuren 143 und 158

In mRuby liegt neben der Aminosäure 143 auf dem siebten β -Faltblattstrang ein Prolin an Position 142. Dies ist die Stelle, an der sich die Faltblattstruktur aufwindet. Da Prolin dafür bekannt ist, dass es die Proteinfaltung beeinflusst und Sekundärstrukturelemente stört^[199], könnte es das benachbarte Asparagin an Position 143 in eine ungünstige Konformation bringen, die die Wechselwirkung mit dem *cis*-Chromophor verhindert. Da in anderen RFPs wie mPlum^[200], mRouge^[195], eqFP670^[127] und TagRFP675^[193] sich an Position 142 ein Alanin befindet, wurde die Mutation P142A eingeführt. Diese hat jedoch keinen Einfluss auf die Lage der Absorptions- und Fluoreszenzspektren. Beim Vergleich der Kristallstrukturen von mRuby (PDB 3U0L) und z.B. TagRFP675 (PDB 4KGE) ist zu erkennen, dass beide Proteine eine Störung des β -Faltblattes um die Aminosäure 142 aufweisen, was zeigt, dass das Prolin allein nicht die Ursache für den Bruch in der Sekundärstruktur ist und so wenig Einfluss auf die Orientierung von N143 nimmt. Des Weiteren wurde H159 mutiert, dessen Seitenkette zwar an der Außenseite des β -Fasses, aber auf dem achten β -Faltblattstrang direkt neben der Aminosäure 158 liegt. Da sich in TagRFP675^[193] an Position 159 ein Tyrosin und in eqFP670^[127] und RFP639^[44] ein Glutamin befindet, wurden diese beiden Aminosäuren ebenfalls in verschiedenen mRuby-Varianten getestet. Der Austausch gegen Glutamin hat eine geringfügige Blauverschiebung der Emission zur Folge. In der Variante mit Tyrosin variiert das Anregungsmaximum je nach Detektionswellenlänge zwischen 561 nm und 585 nm und das Emissionsmaximum je nach Anregungswellenlänge zwischen 617 nm und 640 nm. Die Ausgangsvariante ohne Mutation H159Y hat ein Emissionsmaximum von 625 nm. Es scheint, als würde durch die Mutation wieder mehr Chromophor in der *trans*-Konformation vorliegen; gleichzeitig verschiebt sich aber die Emission des *cis*-Chromophors in den langwelligeren Bereich.

Naheliegender war auch die Mutation der Aminosäuren G156 und M160, die innerhalb des β -Fasses ober- und unterhalb der Aminosäure an Position 158 auf demselben β -Strang liegen. Beide Aminosäuren sind in nahezu allen RFPs konserviert. Lediglich in TagRFP657^[128] ist M160 durch Leucin ersetzt. So wiesen die Varianten, in denen G156

durch die größeren, polaren Aminosäuren Asparagin, Glutamin und Glutaminsäure ausgetauscht wurde, eine mangelhafte Proteinfaltung, einen hohen Anteil an unmatu-riertem Chromophor und eine Blauverschiebung von Absorption und Emission im Vergleich zur Ausgangsvariante auf. M160 wurde durch kleinere, zum Teil unpolare Aminosäuren ersetzt. Aber auch diese Varianten zeigten einen großen Anteil an nicht vollständig ma-turiertem Chromophor und ebenfalls keine Rotverschiebung. Dies zeigt, dass das Glycin an Position 156 und das Methionin an Position 160 essentiell für eine erfolgreiche Pro-teinfaltung und Chromophormaturierung sind.

Wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, hat die Mutation F174L einen erheblichen Einfluss auf die Maturierung des Chromophors. So wurde das zu dieser Aminosäure benachbarte Valin 175 ebenfalls ausgetauscht. Da in eqFP611^[43] ursprünglich eine Glutaminsäure an Position 175 zu finden ist, wurde die Mutation V175E in die Varianten mRuby-T158N und mRuby-T158N-F174L eingeführt. In beiden Varianten kam es dadurch zu einer Blauverschiebung. Als Gegensatz zu der negativen Ladung der Glutaminsäure wurde mit Arginin eine positive Ladung eingefügt. Die Varianten mit Mutation V175R zeigten allerdings eine ineffiziente Proteinfaltung und keine weitere Rotverschiebung. Die spek-troskopischen Eigenschaften aller Varianten mit den im diesem Abschnitt beschriebenen Mutationen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

**Tabelle 4.2: Liste der Varianten mit Mutation in der Umgebung der Aminosäu-
ren 143 und 158 mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und
Emissionsmaxima.**

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
P142A-T158N	578	577-582	614-622
P142A-T158N-F174L	577	578-583	613-623
I102F-G156E-T158N-F174L	404 + 586	577-581	605-613
I102F-G156N-T158N-F174L	379 + 400 + 473 + 566	576-585	612-621
I102F-G156Q-T158N-F174L	404 + 568	562-672	608-620
T158N-H159Q	578	578-582	607-622
I102F-T158N-H159Y-F174L	581	561-585	617-640
I102F-T158N-M160A-F174L	408 + 574	576	619-623
I102F-T158N-M160C-F174L	414 + 566	565-573	612-623
I102F-T158N-M160D-F174L	406 + 470 + 577	577	619-624
I102F-T158N-M160N-F174L	416 + 568	560-577	614-627
I102F-T158N-M160V-F174L	408 + 563	577	615
T158N-V175E	579	561-589	611-620
T158N-V175R	580	560-590	614-621
T158N-F174L-V175E	578	580-584	613-618
T158N-F174L-V175R	404 + 579	558-582	611-622

4.1.4 Diskussion

mRuby-N143S-T158S zeigt neben der dominanten Absorptionsbande des roten anionischen *trans*-Chromophors bei 556 nm eine kleinere Schulter im Absorptionsspektrum bei etwa 580 nm. Dies ist ein Hinweis darauf, dass, wie im analogen Tetramer RFP630, der Chromophor sowohl in der *cis*- als auch in der *trans*-Konformation vorliegt. Gestützt wird diese Vermutung durch das Denaturierungsexperiment bei pH 13, in dem, neben der Hauptfraktion mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm, eine zweite Spezies mit einem Absorptionsmaximum von 586 nm identifiziert werden konnte. Diese beiden Absorptionsmaxima stimmen gut mit denen überein, die in RFP630 dem *trans*- (559 nm) und dem *cis*- (583 nm) Chromophor zugeordnet wurden.^[44] Auch die Verschiebung des Emissionsmaximums bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen stützt die These, dass ein Teil der Chromophore in *cis* vorliegt. Da diese Verschiebung mit 6 nm im Vergleich zu RFP630 eher gering ausfällt, kann daraus geschlossen werden, dass die *trans-cis*-Isomerisierung im Monomer weniger effizient ist als im Tetramer.

In mRuby-N143S-T158C stimmen die Maxima von Anregung und Emission mit den Werten überein, die in mRuby-N143S-T158S dem *cis*-Chromophor zugeordnet wurden. Daraus lässt sich schließen, dass in mRuby-N143S-T158C eine vollständige Isomerisierung des Chromophors nach *cis* vorliegt, zumal keine Verschiebung der Fluoreszenzspektren abhängig von Anregungs- und Detektionswellenlänge zu beobachten ist. Obwohl sich in mRuby-N143S-T158C dieselben Aminosäuren an Position 143 und 158 befinden wie in RFP639 und der Chromophor vollständig in der *cis*-Konformation vorliegt, sind Absorption ($\lambda_A = 577$ nm) und Emission ($\lambda_{Em} = 610$ nm) weniger rotverschoben als im analogen Tetramer RFP639 ($\lambda_A = 588$ nm, $\lambda_{Em} = 639$ nm). Es scheint, als könnte im Monomer der *cis*-Chromophor im angeregten Zustand nicht so gut vom Proteingerüst stabilisiert bzw. im Grundzustand destabilisiert werden wie im Tetramer. Die spektralen Eigenschaften des *trans*-Chromophors und damit auch dessen Stabilisierung sind in Monomer und Tetramer nahezu gleich. Die unterschiedliche Stabilisierung hängt somit mit der Stabilisierung der Hydroxyphenylgruppe des Chromophors zusammen. Diese wird in der *cis* Form durch die Wasserstoffbrücke zu S143 stabilisiert. Die Monomerisierung hat offensichtlich einen signifikanten Effekt auf die Dynamik von S143 und dessen Interaktion mit dem Chromophor. Die Aminosäure 143 befindet in der Mitte des siebten β -Faltblattstranges in der A/C-Grenzfläche. Dies ist die Region im β -Fass, in der die β -Faltblattstruktur von mRuby gestört ist, sodass durch die erhöhte Flexibilität eine Lücke zwischen siebten und zehnten Strang entsteht. Durch diese Lücke könnten z.B. Wassermoleküle in das Fass eindringen. Im Monomer ist, im Gegensatz zum Tetramer, die A/C-Grenzfläche direkt dem Lösungsmittel ausgesetzt, sodass die Wahrscheinlichkeit,

dass Wassermoleküle in das Fass gelangen, erhöht wird. Die Wassermoleküle könnten ebenfalls Wasserstoffbrücken mit S143 oder der Hydroxyphenylgruppe des Chromophors eingehen und dadurch die direkte Interaktion der beiden verhindern.

In mRuby-T158N verschiebt sich das Anregungsmaximum deutlich in Abhängigkeit von der Detektionswellenlänge. Dies zeigt, dass es unterschiedliche Absorptionsbanden von zwei fluoreszenten Spezies vorhanden sind, die unterschiedlich angeregt werden. Der Chromophor konnte offensichtlich nur teilweise von der *trans*- in die *cis*-Konformation gebracht werden, wobei beide Formen fluoreszent sind. Anscheinend kann der *cis*-Chromophor durch die beiden Asparagine an Position 143 und 158 nicht so gut in seiner Position fixiert werden wie in der Variante mit Serin und Cystein. Allerdings sind sowohl die Absorption als auch die Emission um etwa 20 nm rotverschoben. Dies bedeutet, dass der angeregte Zustand des *cis*-Chromophors besser stabilisiert wird als in der N143S-T158C Variante. Die Maturierung erfolgt in mRuby-T158N nicht vollständig, was an der großen Absorptionsbande bei 400 nm zu erkennen ist. Dies zeigt, dass die Proteinumgebung die Maturierung nicht optimal katalysiert. Die Maturierungseffizienz kann durch den Austausch von F174 gegen Leucin gesteigert werden. F174 liegt innerhalb des β -Fasses direkt neben der Aminosäure R92, welche als Katalysator in der Chromophorbildung fungiert.^[49] Mit seiner positiven Ladung an der Guanidiniumgruppe bildet R92 eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Imidazolinonrings und verstärkt dadurch den nukleophilen Charakter des Glycin-Stickstoffatoms. In mRuby-T158N könnte diese Wechselwirkung z.B. durch sterische Umordnung geschwächt sein, sodass die katalytische Wirkung ebenfalls schwächer ist. Durch die Mutation F174L würde dann eine Reorientierung stattfinden, sodass R92 und die Aminosäuren des Chromophors wieder optimal miteinander wechselwirken können und der Chromophor vollständig in seine rote Form maturiert.

Die Quantenausbeuten aller hier beschriebenen Varianten sind deutlich kleiner als die des mRuby Wildtyps ($\Phi = 0,35$). mRuby-N143S-T158C hat eine Quantenausbeute von 0,14. Diese ist vergleichbar mit der von RFP639 ($\Phi = 0,18$). Dies zeigt, dass der *cis*-Chromophor eine geringere Quantenausbeute als der *trans*-Chromophor besitzt, was daran liegen könnte, dass der Hydroxyphenylring in der *cis*-Konformation geringfügig aus der planaren Ebene herausgedreht ist.^[201] In den Varianten mit T158N ist die Quantenausbeute mit 0,04 nochmals geringer. Diese geringe Quantenausbeute ist typisch für fern-rote FPs und wird wahrscheinlich durch eine hohe Flexibilität des Chromophors hervorgerufen.^[136]

4.2 Erweiterung des Wasserstoffbrückennetzwerks

Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Aminosäureseitenketten und dem N-Acyliminende des Chromophors kann die Ladungsverschiebung im angeregten Zustand begünstigt werden. Dies würde den angeregten Zustand stabilisieren und somit eine Rotverschiebung der Emission hervorrufen. Strategien zur Realisierung dieser Wechselwirkung werden in diesem Unterkapitel behandelt. In Abbildung 4.6 sind die Aminosäuren dargestellt, die dazu mutiert wurden.

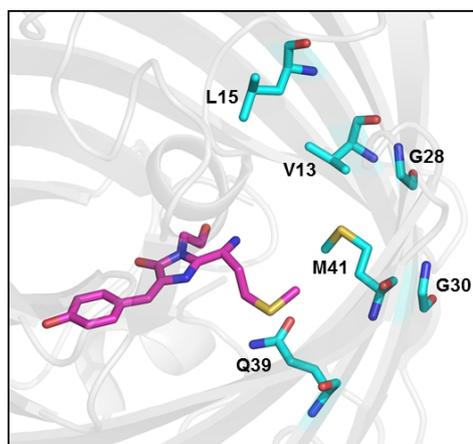


Abbildung 4.6: Kristallstruktur von mRuby mit dem Chromophor und dazu benachbarten Aminosäuren am N-Acyliminende. Der Chromophor (magenta) und Aminosäuren (blau), die zur Erweiterung des Wasserstoffbrückennetzwerkes am N-Acyliminende beitragen können, sind in der *stick*-Darstellung gezeigt (PDB: 3U0M).

4.2.1 Mutation von Methionin 41

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure 41 durch Wechselwirkungen mit der Acyliminingruppe des Chromophors einen hohen Einfluss auf die Rotverschiebung der Emission hat. In mKate-S158C führte der Austausch von M41 gegen Glycin zu einer Rotverschiebung von 18 nm.^[194] In den fern-roten FPs E2-Crimson^[137] und eqFP650^[127] befindet sich ein Alanin an Position 41 und in eqFP670^[127] ein Cystein. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Mutationen von M41 in mRuby vorgenommen (Tabelle 4.3). Als Beispiel sind in Abbildung 4.7 die Spektren von mRuby-M41C und mRuby-M41C-N143S-T158C gezeigt. Sowohl in der Variante mit *trans*-Chromophor (mRuby-M41C) als auch in der Variante mit *cis*-Chromophor (mRuby-M41C-N143S-T158C) entsprechen die Absorptions- und Anregungsmaxima denen der Varianten ohne

Tabelle 4.3: Liste der Varianten mit Mutation von Methionin 41 mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
M41A	559	558	590
M41C	558	558	590
M41D	558	562	590-622
M41G	559	558	590
M41Q	559	559	604
M41S	500 + 558	558	595
M41T	558	558	595
M41C-N143S	580	580	607
M41C-N143S-T158C	576	577	607
M41C-N143S-T158S	556 + 576	556 + 576	602-605
M41C-T158N	581	580-583	612-617
M41D-N143S-T158C	404 + 577	561-567	586-615
M41Q-T158N-H159Y	378 + 568	564-581	597-646
M41Q-I102F-T158N-F174L	571	572-581	601-635
M41R-I102F-T158N-F174L	404 + 587	561	574
M41K-I102F-T158N-F174L	404 + 587	583	623

Mutation von M41. Die Emissionsmaxima sind hingegen um 15 nm in mRuby-M41C und 4 nm in mRuby-M41C-N143S-T158C blauverschoben. Auch der Austausch von M41 gegen Glycin, Alanin, Serin oder Threonin führte zu einer geringen Blauverschiebung der Emission (Daten nicht gezeigt).

In TagRFP675 resultierte aus der Mutation Q41M eine 32 nm Blauverschiebung,^[193] während die Mutation G41Q in mNeptune zu der 8 nm rotverschobenen Variante mCardinal führte.^[202] Aus diesem Grund wurde die Mutation M41Q in mRuby eingeführt, um ebenfalls eine Rotverschiebung zu erzielen. In Abbildung 4.8 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-M41Q und mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L dargestellt. Die Mutation I102F hat nur einen geringen bathochromen Effekt im Vergleich zu mRuby-T158N-F174L (Abschnitt 4.1.2) und hat keine Auswirkung auf die Mutation M41Q. Während sich die optischen Eigenschaften von mRuby-M41Q nicht von denen des Wildtyps unterscheiden, verschiebt sich in mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L das Anregungsmaximum abhängig von der Detektionswellenlänge von 572 nm nach 581 nm. Auch die Lage und Form des Emissionsspektrums variiert mit der Anregungswellenlänge. So verschiebt sich das Emissionsmaximum um 34 nm von 601 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm) nach 635 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 600$ nm), was ein Hinweis darauf ist, dass das Glutamin mehr als eine Konformation einnehmen kann und so unterschiedliche Auswirkungen auf die Fluoreszenzeigenschaften hat.

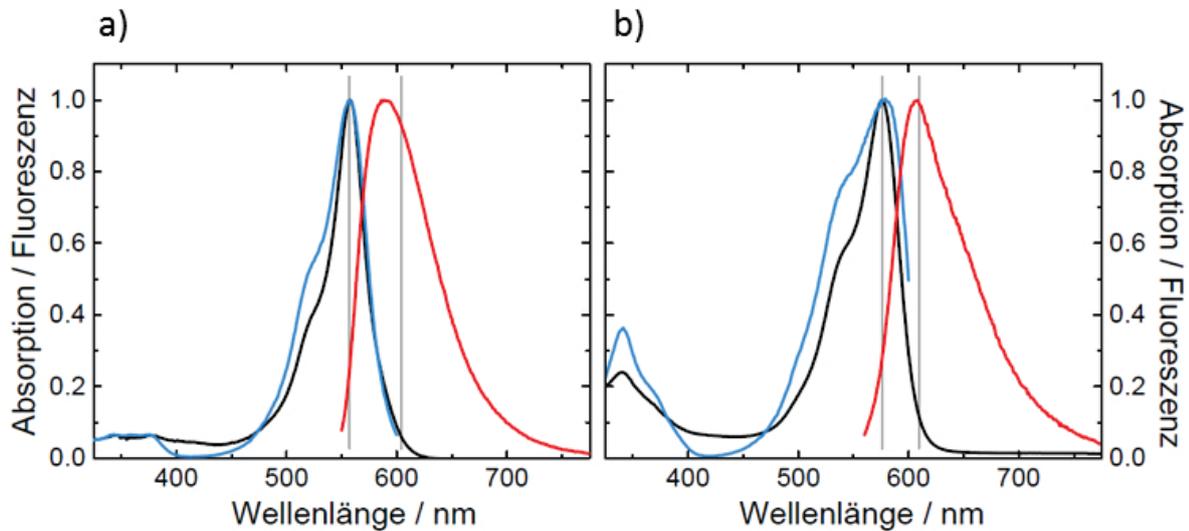


Abbildung 4.7: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von a) mRuby-M41C und b) mRuby-M41C-N143S-T158C. Die Maxima von Absorption (schwarz) und Anregung (blau) werden durch die Einführung der M41C Mutation nicht beeinflusst. Die Emission (rot) hingegen wird im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsvarianten (Wildtyp und N143S-T158C, graue Linien) blauverschoben.

4.2.2 Stabilisierung der Aminosäure 41 durch Mutation von Glycin 28

Die Aminosäure 41 kann mit der benachbarten Aminosäuren an Position 28 interagieren. In TagRFP675 bildet die Seitenkette des Serins an Position 28 eine Wasserstoffbrücke zum Q41.^[193] In mCardinal übernimmt ein Threonin dieselbe Funktion.^[202] In mRuby hingegen befindet sich an Position 28 ein Glycin, welches keine Wasserstoffbrückenbindungen über die Seitenkette eingehen kann. Deshalb wurde das G28 gegen Aminosäuren ausgetauscht, die diese Fähigkeit besitzen. In Abbildung 4.9 sind exemplarisch die Spektren der Mutationen G28S und G28N in verschiedenen mRuby Varianten gezeigt. Der Austausch von Glycin gegen Serin hat auf Absorption und Fluoreszenz von mRuby-M41C keinen Einfluss (Abbildung 4.9 a). In mRuby-G28S-M41Q-I102F-T158N-F174L liegt das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum bei 570 nm bzw. 591 nm, unabhängig von der Detektions- bzw. Anregungswellenlänge (Abbildung 4.9 c). Damit ist die Fluoreszenz im Vergleich zur Ausgangsvariante mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L blauverschoben. In den mRuby-Varianten M41C-I102F-T158N-F174L und M41Q-I102F-T158N-F174L führt der Austausch von G28 gegen Asparagin zum Verlust der Absorption des Chro-

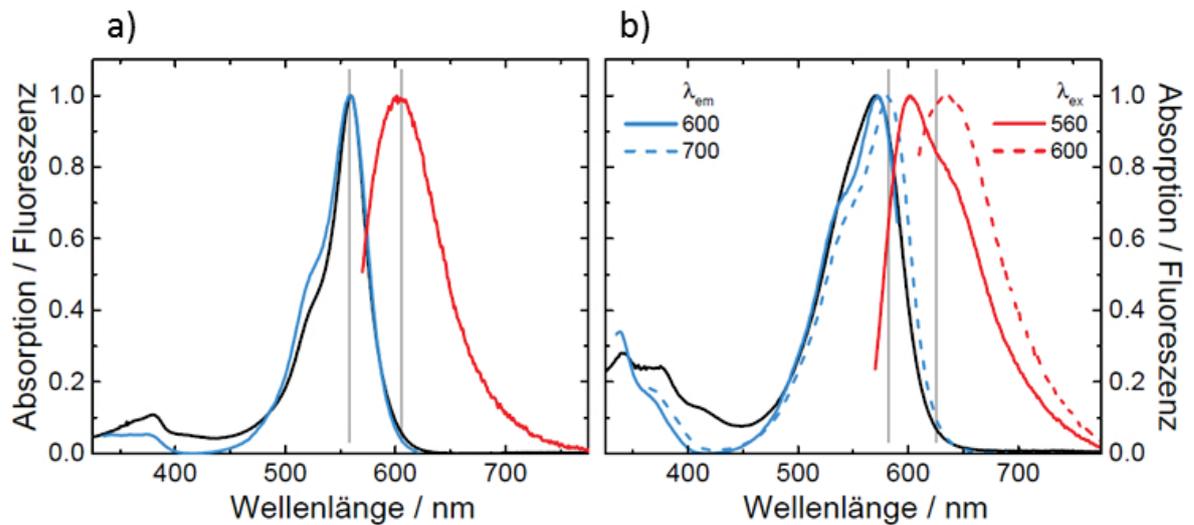


Abbildung 4.8: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-M41Q und mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L. a) Die Mutation M41Q beeinflusst die Lage von Absorption (schwarz), Anregung (blau) und Emission (rot) im Vergleich zum Wildtyp (graue Linien) nicht. b) In der M41Q-I102F-T158N-F174L Mutante wird durch Detektion bzw. Anregung bei längeren Wellenlängen eine Verschiebung des Anregungs- bzw. Emissionsspektrums im Vergleich zur Variante ohne Mutation M41Q (graue Linien) sichtbar.

mophors und damit auch zu einer geringen Fluoreszenzintensität, was sich in dem geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Anregungs- und Emissionsspektrum widerspiegelt (Abbildung 4.9 b und d). Die Anregungsmaxima beider Varianten liegen im Bereich von 450 nm und sind damit um mehr als 100 nm blauverschoben; die Lage der Emission hat sich hingegen kaum geändert.

Neben den in Abbildung 4.9 dargestellten Varianten wurden weitere Kombinationen von Aminosäuren an Position 28 und M41 getestet (Tabelle 4.4), die jedoch alle ähnliche Ergebnisse lieferten. Die Varianten mit der Mutation G28S resultierten alle in blauverschobener Absorption und Emission, während die Varianten mit größeren Aminosäuren wie Asparagin, Arginin, Lysin und Glutamin eine unzureichende Proteinfaltung zeigten. Trotzdem konnte in der Variante mRuby-G28N-I102F-T158N-F174L eine rotverschobene Spezies mit Emissionsmaximum bei 670 nm identifiziert werden. Um die Faltungseffizienz dieser Variante zu verbessern, wurden weitere Mutation innerhalb des β -Fasses, insbesondere von Aminosäuren in der Umgebung von N28, wie T27 oder I43, hinzugefügt. Keine dieser Varianten zeigte jedoch eine Proteinfaltung, die die vollständige Chromophorbildung ermöglichte (Tabelle 4.4).

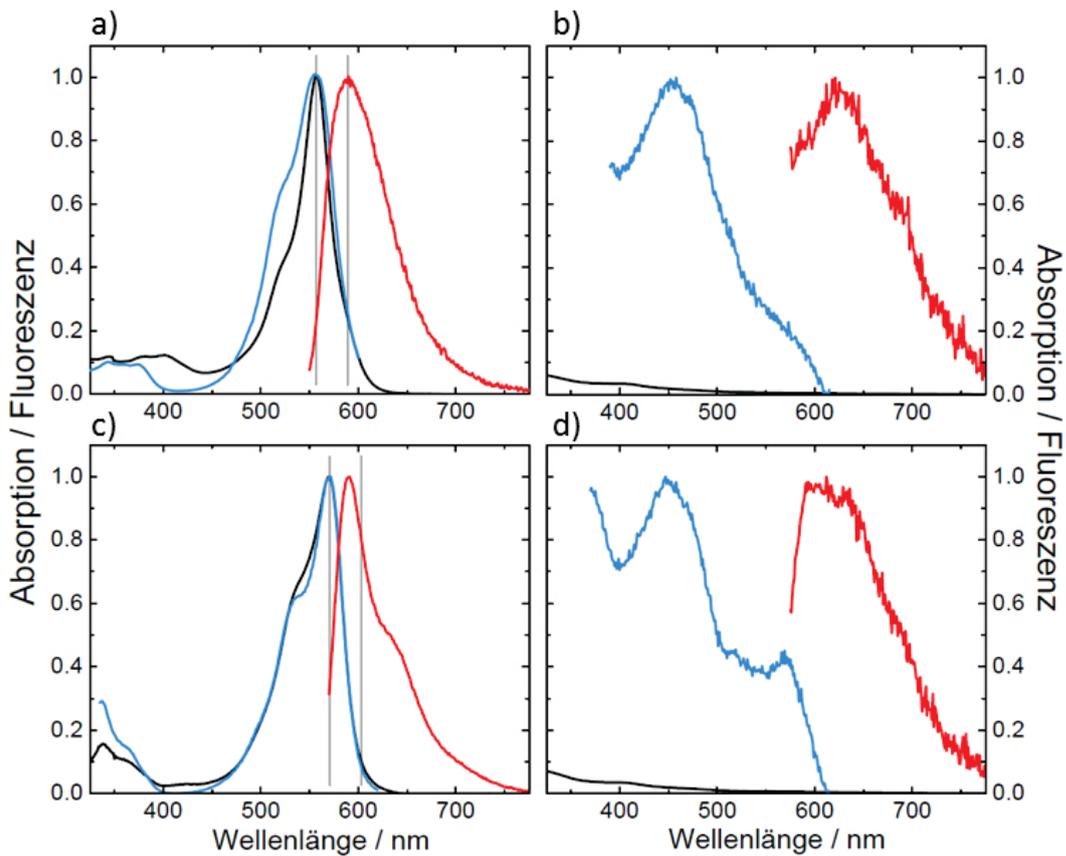


Abbildung 4.9: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von a) mRuby-G28S-M41C, b) mRuby-G28N-M41C-I102F-T158N-F174L, c) mRuby-G28S-M41Q-I102F-T158N-F174L und d) mRuby-G28N-M41Q-I102F-T158N-F174L. Während die Einführung eines Serins an Position 28 eine Stabilisierung der blauverschobenen Spezies zur Folge hat, führt der Austausch gegen Asparagin zu einem Verlust der Absorption (schwarz) des Chromophors und einer geringen Fluoreszenzintensität (Anregung (blau) und Emission (rot)). Die grauen Linien zeigen die Positionen der Anregungs- und Emissionsmaxima der Varianten ohne die G28S Mutation.

Tabelle 4.4: Liste der Varianten mit Mutation von Glycin 28 mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
G28S-M41C	557	556	590-600
G28S-M41D	404 + 558	558	593
G28S-M41G	405 + 559	559	590-620
G28S-M41S	404 + 559	558	592
G28S-M41Q-I102F-T158N-F174L	570	570	591
G28N-M41Q-I102F-T158N-F174L	-	592	639
G28N-M41A-I102F-T158N-F174L	404	576	613
G28N-M41C-I102F-T158N-F174L	404	576	609
G28N-M41G-I102F-T158N-F174L	404	575	614
G28N-M41S-I102F-T158N-F174L	404	504	515
G28N-M41R-I102F-T158N-F174L	404	560	575
G28N-I102F-T158N-F174L	404 + 585	560	606-669
G28K-I102F-T158N-F174L	404 + 587	561 + 650	575 + 660
G28R-I102F-T158N-F174L	404 + 585	560 + 650	574 + 666
G28Q-I102F-T158N-F174L	404 + 585	578	604-648
T27R-G28N-I102F-T158N-F174L	-	568	574-643
G28N-M36N-I102F-T158N-F174L	-	558	574 + 644
G28N-I102F-H118R-T158N-F174L	404 + 586	569	614-631
V14E-T27R-G28N-I102F-T158N-F174L	404	570	614-652
V14E-G28N-M36N-I102F-T158N-F174L	404 + 587	575	615-629
T27R-G28N-M36N-I102F-T158N-F174L	404 + 588	570	600-653
V14E-G28N-I102F-H118R-T158N-F174L	404	570-579	620-629
T27R-G28N-I102F-H118R-T158N-F174L	404	451-600	609-655
G28N-M36N-I102F-H118R-T158N-F174L	404	447-600	598-651
G28N-I43G-I102F-T158N-F174L	404 + 586	561-681	577-628
G28N-I43S-I102F-T158N-F174L	404 + 586	581	621
G28N-W90A-I102F-T158N-F174L	-	560 + 658	582 + 671
G28N-I102F-T158N-F174L-T176Y	404 + 583	570	591
G28N-I102F-T158N-F174L-E215V	-	560 + 658	575 + 671

4.2.3 Beeinflussung der Umgebung von Glycin 28 und Methionin 41

Es konnte gezeigt werden, dass die Seitenketten der Aminosäuren an Position 28 und 41 einen großen Einfluss auf die Faltung und auf die spektroskopischen Eigenschaften des Proteins besitzen. Ein weiterer Schritt bestand deshalb darin, Mutationen in der direkten Umgebung dieser beiden Aminosäuren durchzuführen (Tabelle 4.5). Innerhalb

Tabelle 4.5: Liste der Varianten mit Mutation in Umgebung von Glycin 28 und Methionin 41 mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A _{max} / nm	E _{xmax} / nm	E _{mmax} / nm
V13E	-	-	-
V13E-G28N-I102F-T158N-F174L	405 + 580	583	606
V13G-G28N-I102F-T158N-F174L	405 + 580	581-583	604-607
V13S-G28N-I102F-T158N-F174L	404 + 587	577	602
V13D	404 + 556	556	587-595
V13D-N143S-T158C	403 + 571	563-567	594-603
V13D-T158N	576	558	596-608
V13K-I102F-T158N-F174L	405 + 584	580-583	621-626
V13L-V14Y-T158N-F174L	572	577-578	609-614
V13L-L15M-I102F-T158N-F174L	582	586	624
V13L-G28S-M41Q-I102F-T158N-F174L	392 + 530 + 571	572	592
V13L-L15M-G28S-M41Q-I102F-T158N-F174L	571	570	594
V13R-I102F-T158N-F174L	404	599	574
G30E-I102F-T158N-F174L	-	-	-
G30K-I102F-T158N-F174L	404 + 587	570	616-650
G30Q-I102F-T158N-F174L	404 + 581	577-583	620-627
G30R-I102F-T158N-F174L	404 + 587	578	616-650
Q39D-I102F-T158N-F174L	-	577	616-620
Q39G-I102F-T158N-F174L	-	575	616-621
Q39N-I102F-T158N-F174L	389 + 580	577-580	599-603

des β -Fasses liegt neben G28 die hochkonservierte Aminosäure G30. Der Austausch gegen größere, polare oder geladene Aminosäuren resultierte in einem hohen Anteil an unmaturiertem Chromophor und einer geringen Proteinstabilität in Lösung. Dasselbe ist auch für Varianten mit Mutation des ebenfalls konservierten Q39, der Aminosäure, die innerhalb des β -Fasses neben M41 liegt, zu beobachten. Durch den Austausch von Q39 gegen Glycin oder Asparaginsäure faltet das Protein so schlecht, dass auch der Chromophor nicht gebildet wird und keine Chromophorabsorptionsbande zu erkennen ist.

Am N-Acyliminende des Chromophors befindet sich neben M41 auf dem benachbarten β -Strang an Position 13 ein Valin. Diese Aminosäure ist in den meisten RFPs,

z.B. mNeptune^[194] und eqFP670^[127], ein Leucin. Der Austausch von V13 gegen Leucin zeigte in mRuby jedoch keinen Einfluss auf die Absorption und Fluoreszenz. Da sich in den RFPs mit L13 an der benachbarten Position 15 ein Methionin anstatt wie in mRuby ein Leucin befindet, wurde die Mutation L15M zusätzlich eingeführt. Aber auch dies zeigte keinen Einfluss auf die Lage der Spektren. In mPlum^[200] befindet sich an Position 13 ein Glutamin, welches eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Chromophors ausbildet. Diese Wechselwirkung ist dynamisch, da durch die Ladungsverschiebung im angeregten Zustand die Glutaminseitenkette in eine andere Konformation rotiert und dadurch in erster Linie das Emissionsspektrum beeinflusst wird.^[24] Es konnte gezeigt werden, dass in mPlum die Stokes-Verschiebung von der Flexibilität der Chromophorumgebung anhängt.^[191,192] Die Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und der Glutaminseitenkette ändert sich schnell zwischen einer direkten Wasserstoffbrückenbindung und einer indirekten Wasserstoffbrückenbindung über ein zwischengelagertes Wassermolekül. Diese Dynamik am Acyliminende könnte die Flexibilität der Methylenbindung zwischen Phenolat- und Imidazolinonring einschränken und so den angeregten Zustand stabilisieren. Durch die Mutation V13E in mRuby konnte der Chromophor jedoch nicht maturieren, da die Proteinfaltung nicht mehr funktionierte. Auch der Austausch gegen das kleinere Asparagin führte nur zu einem geringen Anteil an maturiertem Chromophor und einer Blauverschiebung. Um den Einfluss einer positiven Ladung an Position 13 zu testen, wurden die Mutationen V13K und V13R eingeführt. Während die Variante mit Arginin nicht faltete, zeigte die Variante mit Lysin keine Verschiebung der Absorption und Emission.

4.2.4 Diskussion

Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum N-Acylimin-Sauerstoff wird die Ladungsverschiebung vom Hydroxyphenylring zum Imidazolinonring begünstigt und dadurch der angeregte Zustand stabilisiert. Dies hat eine Rotverschiebung der Emission zur Folge. Die Aminosäure, die dem N-Acyliminende des Chromophors am nächsten ist, ist im Falle von mRuby M41. Um eine Erweiterung des Wasserstoffbrückennetzwerkes zu erreichen, existieren zwei verschiedene Möglichkeiten. Entweder wird eine große polare Aminosäure an Position 41 gesetzt, die eine direkte Wasserstoffbrücke zum Chromophor ausbilden kann^[193], oder die Aminosäure wird so klein gewählt, dass Platz für ein zusätzliches Wassermolekül geschaffen wird, welches dann eine Wasserstoffbrücke zum Chromophor ausbildet^[127,137,194]. Letzteres führte in mRuby nicht zur gewünschten Rotverschiebung. Der Austausch von M41 gegen kleinere Aminosäuren wie z.B. Cystein beeinflusste Absorption und Anregung nicht und hatte einen geringen hypsochromen

Effekt auf die Emission. Dies zeigt, dass die Ladungsstabilisierung am N-Acyliminende des Chromophors durch den Austausch reduziert wird, was wiederum ein Hinweis darauf ist, dass kein zusätzliches Wassermolekül an den freien Platz gelangt.

Um eine direkte Wasserstoffbrücke zum N-Acylimin-Sauerstoff auszubilden, wurde M41 gegen Glutamin ausgetauscht. In mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L führt dies zur Verbreiterung der Absorptionsbande und zur Verschiebung von Anregung und Emission je nach Detektions- und Anregungswellenlänge. Dieses Verhalten deutet auf mehrere Konformationen der Glutaminseitenkette hin. Die Konformationen, bei denen eine Wasserstoffbrücke gebildet wird, erzeugen eine Rotverschiebung, andere Konformationen haben eine Blauverschiebung zur Folge. In mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L liegt der Chromophor in der *cis*-Konformation vor, mRuby-M41Q besitzt einen Chromophor in *trans*-Konformation. Da in mRuby-M41Q keine Verschiebung beobachtet werden kann, ist davon auszugehen, dass sich die Mutation M41Q nur auf den *cis*-Chromophor, nicht aber auf den *trans*-Chromophor auswirkt.

In TagRFP675 bildet das Serin an Position 28 eine Wasserstoffbrücke zu Q41, welches wiederum ein Wasserstoffbrücke zum Chromophor ausbildet, sodass ein stabiles Wasserstoffbrückennetzwerk entsteht.^[193] In mRuby-M41Q-I102F-T158N-F174L führt die Mutation G28S dazu, dass Anregungs- und Emissionsmaximum bei 570 nm und 591 nm liegen, unabhängig von der Detektions- und Anregungswellenlänge. Dies zeigt, dass auch in mRuby eine Wasserstoffbrücke zwischen S28 und Q41 ausgebildet wird. Das Glutamin wird dadurch in einer Position stabilisiert, die die Interaktion mit dem Chromophor aber verhindert, was wiederum zu einer Blauverschiebung der Fluoreszenz führt. Auf mRuby-M41C hat die Mutation G28S keinen Einfluss, da das Cystein ohnehin keine Wasserstoffbrücke mit dem Chromophor eingeht.

Der Versuch, Q41 in eine bessere Position für die Ausbildung einer direkten Wasserstoffbrücke zum Chromophor zu bringen, indem G28 durch Asparagin ausgetauscht wurde, gelang nicht. Da Asparagin sehr viel größer ist als Glycin oder Serin, wird wahrscheinlich durch sterische Hinderung die Proteinfaltung und dadurch auch die Chromophormaturierung gestört. Dadurch ist keine deutliche Absorptionsbande des roten anionischen Chromophors erkennbar. Trotzdem war es möglich, Fluoreszenz geringer Intensität zu detektieren, was zeigt, dass ein geringer Teil an funktionellem Protein gebildet wurde, der jedoch ebenfalls keine Rotverschiebung der Fluoreszenz aufweist.

Weitere Mutationen an nahegelegenen Aminosäuren wie V13 und Q39 konnten ebenfalls keine Rotverschiebung herbeiführen. Der Austausch an diesen Positionen führte dazu, dass das Protein nicht mehr in der Lage war, korrekt zu falten, sodass dadurch auch die Chromophormaturierung beeinträchtigt wurde.

4.3 Mutationen in der Chromophorumgebung innerhalb des β -Fasses

Neben den Aminosäuren, die direkt benachbart zur Phenolat- bzw. N-Acylimino-Gruppe des Chromophors liegen, wurden einige Mutationen von Aminosäuren vorgenommen, die sich an anderen Positionen innerhalb des β -Fasses in der Nähe des Chromophors und in der Helix oberhalb des Chromophors befinden (Abbildung 4.10). Dabei handelt es sich um Aminosäuren, die in den meisten RFPs konserviert vorliegen. Eine Strategie, die gewählt wurde, um den Chromophor zu beeinflussen, war, aromatische durch nicht-aromatische Aminosäuren zu ersetzen und umgekehrt.

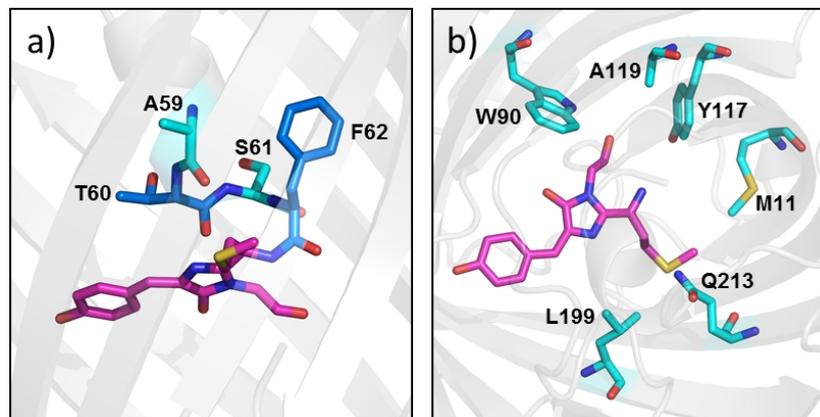


Abbildung 4.10: Kristallstruktur des Chromophors und der Aminosäuren in dessen Umgebung. Der Chromophor (magenta) und ausgewählte Aminosäuren (blau) sind als *sticks* dargestellt. a) Darstellung der letzten zwei Aminosäuren in der Helix und der zwei Aminosäuren, die diese mit dem Chromophor verbinden. b) Aminosäuren innerhalb des β -Fasses nahe dem Chromophor (PDB: 3U0M).

4.3.1 Mutationen in der Helix oberhalb des Chromophors

Der Chromophor ist in allen FPs direkt mit einer innerhalb des β -Fasses liegenden Helix verbunden. In mRuby läuft diese Verbindung von den letzten beiden Aminosäuren der Helix, A59 und T60, über S61 und F62 zum Chromophor. So können diese Aminosäuren einen Einfluss auf die Orientierung des Chromophors im Proteingerüst haben. Die vier genannten Aminosäuren sind in allen aus eqFP611^[43] und mKate^[203] entwickelten Varianten konserviert. In mNeptune^[194] ist hingegen an Position 61 ein Cystein anstelle eines

Serins. In E2-Crimson^[137] sind A59, T60 und S61 durch Serin, Prolin und Glutamin ersetzt. Dasselbe gilt für mPlum^[200], wobei sich hierbei an Position 62 zusätzlich noch ein Isoleucin anstelle eines Phenylalanins befindet. So wurden mRuby-Varianten hergestellt, die dieselben Aminosäuren an den Positionen 59-62 besitzen wie die zuvor genannten Proteine sowie weitere Kombinationsmöglichkeiten (Tabelle 4.6). Während die meisten Mutationen an Position 61 und 62 keine Auswirkung auf die Proteinfaltung und die Lage von Absorptions- und Emissionspektrum zeigten, wiesen die Varianten mit Mutation von T60 eine mangelhafte Chromophormaturierung und dadurch eine nur schwache Fluoreszenzintensität auf.

Tabelle 4.6: Liste der Varianten mit Mutation in der α -Helix innerhalb des β -Fasses mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
A59S-T60P-S61Q-I102F-T158N-F174L	580	579	603-608
A59S-T60P-S61Q-I102F-T158N-F174L-H197N	400 + 515 + 591	590	626
T60F-I102F-T158N-F174L	404 + 567	572	596
T60G-I102F-T158N-F174L	404 + 567	574-580	616-627
T60W-I102F-T158N-F174L	-	648	619-662
T60Y-I102F-T158N-F174L	-	417 + 565-569	607-617
T60Y-S61Q-I102F-T158N-F174L	404	571	596
T60Y-I102F-T158N-M160A-F174L	408 + 565	574	610
T60Y-I102F-T158N-M160V-F174L	408	564	613
S61C-T158N	581	580-583	620-629
S61Q-I102F-T158N-F174L	404 + 580	584	621-628
F62A-T158N	579	578-582	610-615
F62V-T158N	581	580-583	612-616
F62I-T158N	580	579-584	619-621
V13E-F62I-T158N	404	-	-

4.3.2 Mutationen an den β -Faltblattsträngen

Innerhalb des β -Fasses befinden sich Aminosäuren in Reichweite zum Chromophor, die in den meisten RFPs konserviert vorliegen. Trotzdem wurden einige Mutationen an diesen Positionen durchgeführt, um deren Einfluss auf den Chromophor zu testen (Tabelle 4.7). So wurden z.B. M11 und Y117 nahe dem N-Acyliminende des Chromophors gegen positiv geladene Aminosäuren ausgetauscht, die die Verschiebung der negativen Ladung

Tabelle 4.7: Liste der Varianten mit Mutation innerhalb des β -Fasses um den Chromophor herum mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
M11K-I102F-T158N-F174L	-	560-581	606-622
M11R-I102F-T158N-F174L	-	559 + 656	574 + 667
W90A-I102F-T158N-F174L	404 + 584	450-580	604-608
W90L-I102F-T158N-F174L	404 + 580	455-580	613-630
W90Q-I102F-T158N-F174L	404	578	607
I102F-Y117A-T158N-F174L	393 + 549	574	601
I102F-Y117K-T158N-F174L	380 + 576	581-583	610-617
I102F-Y117N-T158N-F174L	577	574	597-602
I102F-Y117Q-T158N-F174L	382 + 578	579	602
I102F-Y117R-T158N-F174L	380 + 516 + 550 + 580	580	609
I102F-A119Q-T158N-F174L	564	564-576	602-621
I102F-A119V-T158N-F174L	579	586	612
I102F-T158N-F174L-T176D	404	450-580	610-640
I102F-T158N-F174L-T176Y	404	450-580 + 650	610-660
I102F-T158N-F174L-L199G	565	571-582	621-632
I102F-T158N-F174L-L199R	-	560-562	613-628
I102F-T158N-F174L-L199W	-	578-580	613-625
I102F-T158N-F174L-Q213G	-	578-581	615-630
I102F-T158N-F174L-Q213N	404 + 581	578-583	611-626
I102F-T158N-F174L-Q213V	574	575-580	611-629

im angeregten Zustand begünstigen könnten. Der Austausch führte jedoch dazu, dass das Protein nicht mehr in der Lage war, korrekt zu falten, sodass auch keine eindeutige Absorptionsbande des Chromophors messbar war. Ähnlich verhielt es sich mit Varianten mit Mutationen von L199 oder Q213. Zwar war in allen Varianten Fluoreszenz messbar, diese zeigte jedoch keine Rotverschiebung. Ein Austausch von Y117 gegen Alanin, Asparagin oder Glutamin führte zu einer großen Fraktion von nicht vollständig maturiertem Chromophor. Der rote Chromophor zeigte eine deutliche Blauverschiebung der Fluoreszenz im Vergleich zur jeweiligen Ausgangsvariante. In Varianten, in denen das Tryptophan an Position 90 gegen nicht-aromatische Aminosäuren ausgetauscht wurde, lag das Emissionsmaximum zwar im Bereich von mRuby und mRuby625, jedoch zeigte das Spektrum eine breite Schulter an der langwelligen Flanke. Dies zeigt, dass zwar der Großteil des Chromophors in der weniger rot emittierenden *trans*-Form vorliegt, es jedoch außerdem eine Fraktion an rotverschobenen *cis*-Chromophor gibt. Allerdings war die Maturierung des roten Chromophors in Varianten mit Mutation von W90 weniger stark ausgeprägt, sodass die Fluoreszenzintensitäten ebenfalls nur sehr schwach waren. Als letztes wurde noch A119 mutiert. Außer in eqFP11 und seinen Varianten befindet

sich in allen RFPs ein Valin an dieser Position. So wurde auch in mRuby A119 gegen ein Valin ebenso wie gegen ein Glutamin ausgetauscht. In beiden Fällen führte dies zu einer Blauverschiebung.

4.3.3 Diskussion

Fast alle Varianten zeigen eine ausgeprägte Absorptionsbande im UV-Bereich, die auf nicht vollständig maturierten Chromophor zurückzuführen ist. Der Grund für die schlechte Chromophormaturierung liegt in der Proteinfaltung. Viele der Varianten mit Mutation von z.B. T60, M11 oder L199 falten fast gar nicht, was sich daran zeigt, dass das Protein in Pufferlösung nicht stabil ist und aggregiert. Ist die Proteinfaltung nicht korrekt, kann auch der Chromophor nicht gebildet werden. Die meisten der in diesem Kapitel beschriebenen Aminosäuren sind in RFPs konserviert, d.h. sie scheinen eine wichtige Rolle für die Stabilität der β -Fasstruktur zu spielen. So ist es nicht verwunderlich, dass ein Austausch dieser Aminosäuren zur Missfaltung führt. Trotzdem konnte in fast allen Varianten Fluoreszenz detektiert werden, auch wenn keine Absorptionsbande des Chromophors erkennbar war. Dies zeigt, dass zumindest ein geringer Teil an gefaltetem Protein mit maturiertem roten Chromophor vorlag. Eine deutliche Rotverschiebung von Absorption und Emission konnte jedoch nicht beobachtet werden. Eine Ausnahme bildet hier die Variante mRuby-T60W-I102F-T158N-F174L. Es konnte zwar keine Chromophorabsorption gemessen werden, da das Tryptophan viel größer als Threonin ist und somit durch sterische Hinderung die Proteinfaltung stört. Die Fluoreszenzmessung lieferte jedoch Spektren geringer Intensität. Das Anregungsmaximum liegt dabei bei 648 nm und das Emissionsmaximum verschiebt sich je nach Anregungswellenlänge von 616 nm nach 662 nm. In mRuby liegt T60 direkt über dem Chromophor. Ein Tryptophan an dieser Position könnte somit π - π -Wechselwirkungen mit dem Chromophor eingehen, was die Rotverschiebung erklären würde. Gegen diese Theorie spricht, dass ein Tyrosin an Position 60 keine solche Verschiebung auslöst.

4.4 Änderung der π - π -Wechselwirkungen

In RFPs wird der planare Chromophor durch ein dichtes Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Aminosäuren unterhalb des Chromophors stabilisiert. In mRuby sind die Aminosäuren R67, E145, Y178, H197 und E215 an dieser Stabilisierung beteiligt (Abbildung 4.11). An all diesen Positionen wurden verschiedene Mutationen ausprobiert (Tabelle 4.8). Mutationen an den Positionen E145, Y178 und E215 führten allerdings zu

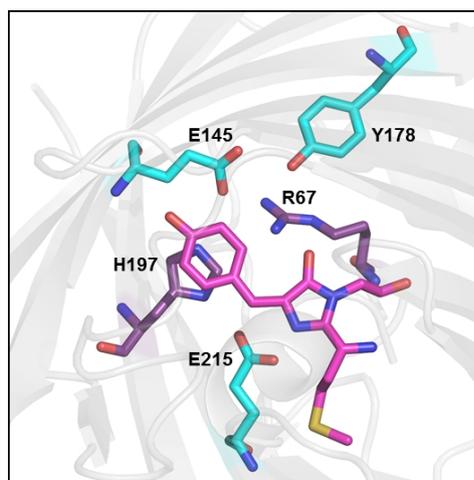


Abbildung 4.11: Kristallstruktur des Chromophors und der Aminosäuren, die diesen durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisieren. Die Aminosäuren E145, Y178 und E215 (blau), sowie R67 und H197 (violett) befinden sich unterhalb des Chromophors (magenta) (PDB: 3U0M).

Problemen bei der Proteinfaltung. Die Chromophormaturierung wurde dadurch teilweise so stark beeinträchtigt, dass keine Absorption des Chromophors messbar war. Interessant war jedoch der Austausch von R67 und H197 (Abbildung 4.11, violett). Die Mutationen dieser Aminosäuren erzeugten teilweise eine große Rotverschiebung und werden in diesem Unterkapitel ausführlicher dargestellt.

Tabelle 4.8: Liste der Varianten mit Mutationen unterhalb des Chromophors mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A_{\max} / nm	Ex_{\max} / nm	Em_{\max} / nm
I102F-E145Q-T158N-F174L	404 + 586	591	631-634
T158N-E215D	400 + 580	573-579	612-624
T158N-E215F	400 + 578	575-580	612-629
T158N-E215Y	400	446	464-650
I102F-T158N-F174L-E215G	-	576-582	617-629
I102F-T158N-F174L-E215Q	400	576-586	576-638
I102F-T158N-F174L-E215V	-	449-604	609-647
I102F-T158N-F174L-Y178E	-	576	620-648
I102F-T158N-F174L-Y178T	-	572-583	604-622
R67E-I102F-T158N-F174L	404	570-580	613-617
R67L-I102F-T158N-F174L	-	561 + 594	621-643
R67Q-I102F-T158N-F174L	400	558-587	575-648
R67K-T158N	405 + 580	580	624
R67K-R122T-T158N	410 + 580	584	624-627

4 Rationales Design einer rotverschobenen mRuby Variante

Variante	A _{max} / nm	Ex _{max} / nm	Em _{max} / nm
R67K-R122T-T158N-A194F	404 + 581	580	624-627
R67K-T158N-A194F	404 + 582	580	621-627
G28S-M41Q-R67K-I102F-T158N-F174L	395 + 530 + 568	569	598
V13L-G28S-M41Q-R67K-I102F-T158N-F174L	600	569-601	670-673
V13L-L15M-G28N-M41Q-R67K-I102F-T158N-F174L	393 + 570	569	597
V13L-L15M-G28S-M41Q-R67K-I102F-A119V-T158N-F174L	392 + 530 + 571	571-576	595
V13L-L15M-G28S-M41Q-I102F-A119V-T158N-F174L-H197R	-	-	-
I102F-T158N-F174L-H197A	592	590-600	642
I102F-T158N-F174L-H197L	589	589	634
I102F-T158N-F174L-H197N	589	591-595	638-640
T158N-H197F	405 + 582	579-581	617-621
T158N-H197Y	406	-	-
N143S-T158C-H197Q	414 + 577	574-577	611-615
N143S-T158F-H197Q	404 + 577	565-576	610-615
N143S-T158C-H197R	501 + 576	576	611-615
N143S-T158F-H197R	499 + 576	576	613
T158N-H197R	585	585-588	625-631
T158N-F174L-H197R	582	568-582	624-630
G28N-M41Q-I102F-T158N-F174L-H197R	-	592	639-643
V13L-L15M-G28S-M41Q-I102F-T158N-F174L-H197R	407	448 + 582-596	608-650
R67K-H197R	389 + 463 + 556	556	577-623
R67K-T158N-H197R	453 + 585	588	577 + 650
R67K-T158N-H197F	405 + 558	590	639
R67K-T158N-H197Y	405	-	-
R67K-E145K-T158N-H197R	-	552-563	600-643
R67K-E145Q-T158N-H197R	-	584	636-639
R67K-T158N-H197R-E215D	-	576-588	639-654
R67K-T158N-H197R-E215Q	-	588-597	665-673

4.4.1 Mutation von Arginin 67 und Histidin 197

In mRuby liegt der *trans*-Chromophor genau über dem Imidazolring von H197, sodass die Möglichkeit einer π - π -Wechselwirkung besteht. R67 liegt H197 gegenüber und bildet eine direkte Wasserstoffbrücke zum Imidazolinon-Sauerstoff des Chromophors. So wurden in Kombination mit der Mutation T158N diverse Aminosäuren an Position 67 (E, K, L und Q) und Position 197 (A, F, L, N, R und Y) getestet. In Abbildung 4.12 sind exemplarisch die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Varianten mRuby-R67K-T158N und mRuby-T158N-H197R dargestellt. Die Lage des Absorptionsmaximums

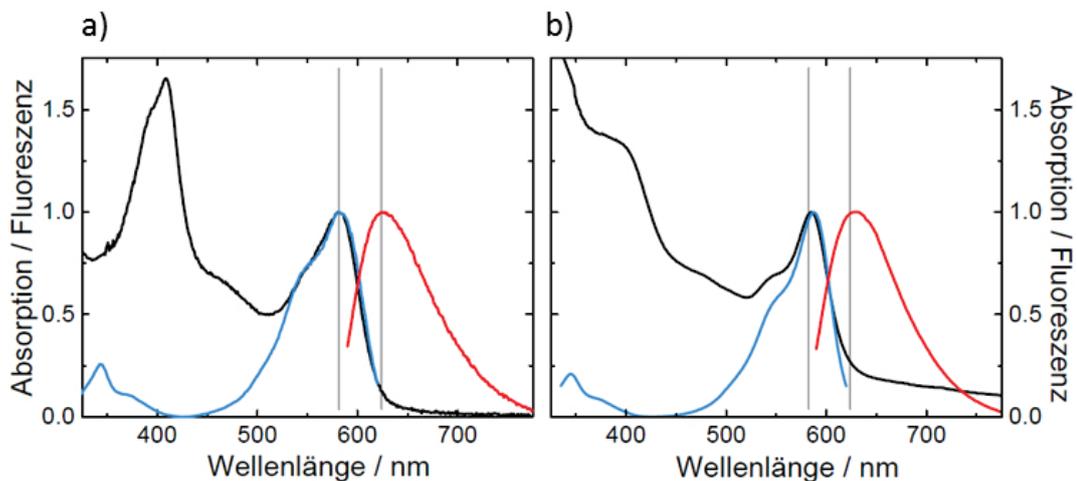


Abbildung 4.12: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-R67K-T158N und mRuby-T158N-H197R. a) In mRuby-R67K-T158N ist die Intensität der Absorption (schwarz) des Chromophors bei 582 nm deutlich geringer als die der Absorptionsbande bei 409 nm. Anregung (blau) und Emission (rot) verschieben sich im Vergleich zu mRuby-T158N (graue Linien) kaum. b) In mRuby-T158N-H197R ist eine starke Streuung der Probe in der Absorptionskurve erkennbar. Die Fluoreszenz ist im Vergleich zu mRuby-T158N leicht rotverschoben.

bei 582 nm von mRuby-R67K-T158N ist identisch mit dem der Variante ohne Mutation von R67. Auch die Anregungs- und Emissionsmaxima bei 582 nm und 624 nm sind nicht verschoben. Allerdings erscheint eine neue intensive Absorptionsbande bei 409 nm. Im Vergleich zur Gesamtproteinabsorption ist die Intensität der Absorptionsbande des roten anionischen Chromophors relativ gering. Auch im Absorptionsspektrum von mRuby-T158N-H197R ist eine Schulter bei 400 nm zu erkennen, die durch die Streuung der Probe jedoch nicht als klare Bande erkennbar ist. Anregungs- und Emissionsmaximum liegen bei 587 nm und 629 nm und sind im Vergleich zu mRuby-T158N jeweils um 5 nm rotverschoben.

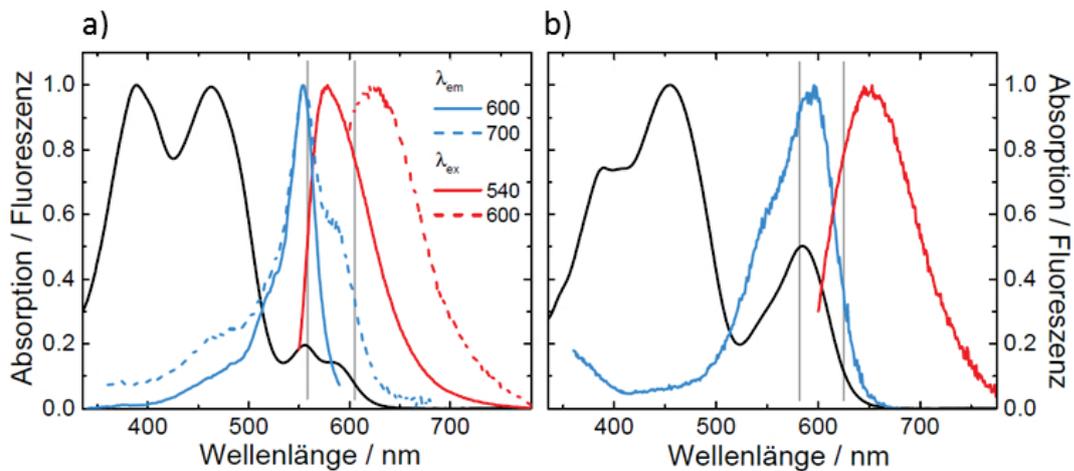


Abbildung 4.13: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mRuby-R67K-H197R und mRuby-R67K-T158N-H197R. a) Das Absorptionsspektrum (schwarz) von mRuby-R67K-H197R zeigt zwei große Absorptionsbanden bei 389 nm und 463 nm und eine kleine Absorptionsbande bei 556 nm mit einer Schulter bei 585 nm. Anregung (blau) und Emission (rot) verschieben sich bei unterschiedlichen Detektions- bzw. Anregungswellenlängen. b) mRuby-R67K-T158N-H197R zeigt eine größere Absorptionsbande bei 455 nm mit einer Schulter bei 397 nm und eine kleinere Absorptionsbande bei 585 nm. Anregungs- und Emissionsmaximum liegen bei 594 nm bzw. 653 nm.

Zusätzlich zu den Einzelmutationen wurde noch eine Kombination aus beiden Mutationen erzeugt. In Abbildung 4.13 sind die Absorptions- und Fluoreszenzspektren der Variante mRuby-R67K-H197R mit und ohne Mutation T158N gezeigt. Die Absorptionsbande des roten anionischen Chromophors liegt in mRuby-R67K-H197R bei 556 nm mit einer Schulter bei 585 nm, ist im Vergleich zu den beiden Absorptionsbanden bei 389 nm und 463 nm jedoch von sehr geringer Intensität. Das Anregungsmaximum liegt ebenfalls bei 556 nm und ist somit im Vergleich zum Wildtyp leicht blauverschoben. Bei einer Detektionswellenlänge von 700 nm zeigt sich außerdem eine Schulter im Spektrum bei etwa 585 nm. Das Emissionsmaximum verschiebt sich deutlich mit unterschiedlicher Anregungswellenlänge von 577 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$) zu 623 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$), was auf die Anwesenheit mehrerer Chromophorspezies schließen lässt.

Auch im Absorptionsspektrum von mRuby-R67K-T158N-H197R (Abbildung 4.13 b) zeigt die Bande bei 455 nm mit einer Schulter bei 389 nm eine höhere Intensität als die Bande des roten anionischen Chromophors bei 585 nm. Dennoch sind sowohl Anregungs- als auch Emissionsmaximum mit 593 nm und 653 nm deutlich rotverschoben. Eine Absorptionsbande bei ~450 nm stammt in RFPs mit DsRed Chromophor üblicherweise vom

protonierten, d.h., neutralen roten Chromophor.^[40] Um zu zeigen, dass es sich in mRuby-R67K-T158N-H197R bzw. mRuby-R67K-H197R bei der bei 455 nm bzw. 463 nm absorbierenden Spezies ebenfalls um den neutralen roten Chromophor handelt, wurden Absorptionsspektren bei unterschiedlichen pH-Werten aufgenommen (Abbildung 4.14). Bei

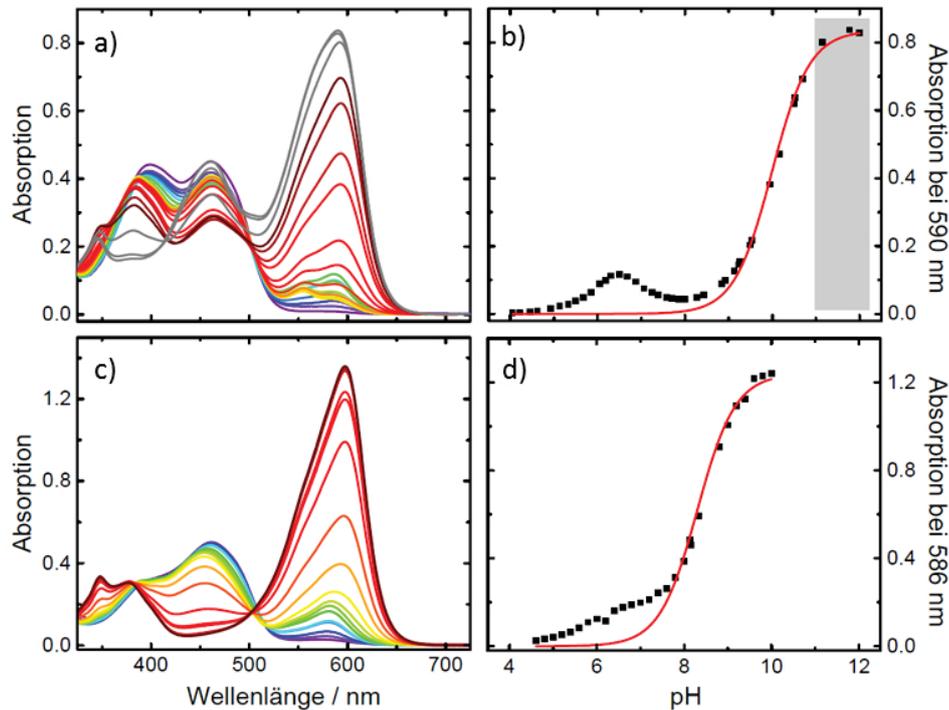


Abbildung 4.14: Absorption von mRuby-R67K-H197R und mRuby-R67K-T158N-H197R bei unterschiedlichen pH-Werten. a) Absorptionsspektren von mRuby-R67K-H197R von pH 4,6 (violett) bis pH 10,7 (dunkelrot). Für eine weitere Erhöhung des pH Wertes auf pH 12,0 wurde NaOH verwendet (grau). b) Die Absorptionswerte bei 590 nm (schwarze Punkte) wurden gegen den pH-Wert aufgetragen und mit einer einfachen Hendersson-Hasselbalch-Funktion angepasst (rote Linie). Der graue Bereich kennzeichnet die pH-Werte, bei denen NaOH verwendet wurde. c) Absorptionsspektren von mRuby-R67K-T158N-H197R von pH 4,6 (violett) bis pH 10,7 (dunkelrot). d) Die Absorptionswerte bei 586 nm (schwarze Punkte) wurden gegen den pH-Wert aufgetragen und mit einer einfachen Hendersson-Hasselbalch-Funktion angepasst (rote Linie).

der Betrachtung der Absorptionsbande des roten anionischen Chromophors in mRuby-R67K-H197R (Abbildung 4.14 a) fällt auf, dass sich das Absorptionsmaximum sowie die Form der Bande während der pH-Titration stetig ändert. Zwischen pH 4,6 (Abbildung 4.14 a, violett) und pH 6,5 (Abbildung 4.14 a, grün) liegt das Absorptionsmaximum bei 586 nm und steigt mit zunehmendem pH an. Zwischen pH 6,5 und pH 8,5 (Abbildung 4.14 a, orange) fällt dieses Maximum wieder ab und ein zweites Maximum bei

555 nm erscheint. Ab einem pH von 8,8 (Abbildung 4.14 a, rot) steigt die Absorption bei 586 nm wieder an. Zusätzlich verschiebt sich das Absorptionsmaximum zu 593 nm bei pH 10,7 (Abbildung 4.14 a, dunkelrot). Gleichzeitig nimmt mit steigendem pH-Wert die Absorption bei ~563 nm ab, was darauf hindeutet, dass es sich bei dieser Spezies tatsächlich um den protonierten Chromophor handelt, der zunehmend deprotoniert wird. Dass diese Deprotonierung auch bei pH 10,7 noch nicht vollständig erfolgt ist, ist daran zu erkennen, dass die Absorption bei 563 nm nicht auf Null abnimmt. Um eine weitere Deprotonierung zu erreichen, wurde durch Zugabe von NaOH der pH-Wert bis auf 12,0 erhöht (Abbildung 4.14 a, grau). Zwar steigt dadurch die Absorption bei 593 nm weiter an, jedoch nimmt gleichzeitig auch die Absorption bei 563 nm zu, was auf eine alkalische Denaturierung des Chromophors hindeutet.^[204] Die Chromophorspezies, die als erstes denaturiert, scheint die unvollständig maturierte Spezies zu sein, da die Absorption bei 389 nm nach Zugabe von NaOH abnimmt. Die Anpassung der Absorptionswerte bei 590 nm mit einer einfachen Hendersson-Hasselbalch-Funktion (Abbildung 4.14 b) zur Bestimmung des pK_s des roten Chromophors scheitert daran, dass offensichtlich mehr als zwei Chromophorspezies vorliegen, die pH-abhängig ineinander umgewandelt werden. Des Weiteren ist die Deprotonierung auch bei einem pH von 10,7 noch unvollständig. Es ist jedoch zu erkennen, dass der pK_s in einem Bereich über 10,0 liegt.

Bei mRuby-R67K-T158N-H197R nimmt die Intensität der Absorptionsbande bei 586 nm mit steigendem pH zu, während sich gleichzeitig das Maximum von 577 nm bei pH 4,6 (Abbildung 4.14 c, violett) auf 598 nm bei pH 10,7 (Abbildung 4.14 c, dunkelrot) verschiebt. Die Verschiebung des Maximums zeigt, dass mehr als eine Chromophorspezies vorliegt, wobei der pK_s der weiter rot absorbierenden Spezies höher ist als der pK_s der weniger rot absorbierenden Spezies. Ebenso erscheint ab einem pH von 8,0 eine Bande bei 348 nm, deren Intensität mit zunehmendem pH steigt. Diese Bande kann dem roten anionischen *cis*-Chromophor zugeordnet werden, woraus sich schließen lässt, dass es sich bei der weiter rot absorbierenden Spezies mit hohem pK_s um eben diesen handelt. Dass die Bande bei 455 nm bei hohem pH verschwindet, zeigt, dass der Chromophor vollständig deprotoniert vorliegt. Auch bei mRuby-R67K-T158N-H197R kann die Anpassung mit einer einfachen Hendersson-Hasselbalch-Funktion an die pH-abhängigen Absorptionswerte bei 586 nm nur als Annäherung an den pK_s betrachtet werden. Die Absorptionswerte bei 586 nm steigen zwischen pH 4,6 und pH 7,6 nahezu linear an (Abbildung 4.14 d). Dies liegt daran, dass der pK_s der zweiten Chromophorspezies, wobei es sich wahrscheinlich um den *trans*-Chromophor handelt, in diesem Bereich liegt. Die Absorptionsbanden von *cis*- und *trans*-Chromophor überlappen im Bereich um 586 nm, sodass eine eindeutige Zuordnung beim Anstieg der Absorption mit steigendem pH nicht

möglich ist. Mit einem angenäherten Wert von $\sim 8,3$ ist der pK_s jedoch deutlich niedriger als in der Variante ohne die Mutation T158N.

4.4.2 Absenkung des pK_s

mRuby-R67K-T158N-H197R stellte mit einem Emissionsmaximum von 653 nm bei pH 7,4 die bis dahin am weitesten rotverschobene mRuby-Variante dar (Abbildung 4.13 b). Aus diesem Grund wurde durch weitere Mutationen versucht (Tabelle 4.9), den pK_s des *cis*-Chromophors zu senken und die Effizienz der Chromophormaturierung zu steigern, damit unter physiologischen Bedingungen ein möglichst hoher Chromophoranteil im roten deprotonierten Zustand vorliegt. Naheliegend war es, zunächst die Mutationen I102F und F174L einzuführen, die auch in mRuby625^[198] für eine leichte Rotverschiebung und eine bessere Chromophormaturierung verantwortlich sind. Bei Betrachtung der Absorptionsspektren bei verschiedenen pH-Werten und der Anpassung mit der Henderson-Hasselbalch-Funktion an die Absorptionswerte aufgetragen gegen den pH wird deutlich, dass I102F den pK_s erhöht und F174L den pK_s absenkt (Abbildung 4.15). Im Fall von mRuby-R67K-I102F-T158N-H197R steigt zwischen pH 3,7 (Abbildung 4.15 a, violett) und pH 7,0 (Abbildung 4.15 a, dunkelgrün) zuerst die Absorption bei 585 nm an. Zwischen pH 7,0 und pH 7,6 (Abbildung 4.15 a, hellgrün) ändert sich die Absorption nicht. Bei weiterer Erhöhung des pH-Werts verschiebt sich das Absorptionsmaximum langsam zu 599 nm, und die Intensität der Bande steigt weiter an. Offensichtlich liegen zwei verschiedene Chromophorspezies vor, wobei es sich vermutlich um den *trans*-Chromophor mit Absorption bei 585 nm und den *cis*-Chromophor mit Absorption bei 599 nm handelt. So ergeben sich zwei unterschiedliche pK_s -Werte von 6,3 für den *trans*- und 8,7 für den *cis*-Chromophor.

Tabelle 4.9: Liste der Varianten mit Mutationen zur Absenkung des pK_s mit den jeweiligen Absorptions-, Anregungs- und Emissionsmaxima.

Variante	A_{\max} / nm	$E_{x\max}$ / nm	$E_{m\max}$ / nm
R67K-I102F-T158N-H197R	385 + 457 + 586	590	648
R67K-I102F-T158N-F174L-H197R	596	596	665
R67K-T158N-F174L-H197R	598	598	670
R67K-P142A-T158N-F174L-H197R	384 + 450 + 594	599	665
R67K-N143A-T158N-F174L-H197R	382 + 443 + 576	578	602
R67K-N143C-T158N-F174L-H197R	448 + 569	560	603
R67K-N143E-T158N-F174L-H197R	385 + 450 + 570	450-480	600-643
R67K-N143F-T158N-F174L-H197R	398 + 575	578	605
R67K-N143G-T158N-F174L-H197R	386 + 450 + 576	578	605

4 Rationales Design einer rotverschobenen mRuby Variante

Variante	A_{\max} / nm	$E_{x_{\max}}$ / nm	$E_{m_{\max}}$ / nm
R67K-N143H-T158N-F174L-H197R	396 + 569	578	632
R67K-N143I-T158N-F174L-H197R	438 + 564	564	636
R67K-N143K-T158N-F174L-H197R	377 + 570	572	605
R67K-N143L-T158N-F174L-H197R	437 + 568	572	636
R67K-N143M-T158N-F174L-H197R	444 + 566	582	627-643
R67K-N143Q-T158N-F174L-H197R	405	580	639
R67K-N143R-T158N-F174L-H197R	382 + 574	577	605
R67K-N143S-T158N-F174L-H197R	454 + 582	585	642
R67K-N143T-T158N-F174L-H197R	451 + 577	582	642
R67K-N143V-T158N-F174L-H197R	406	581	647
R67K-M147L-T158N-F174L-H197R	383 + 446 + 592	597	664
G28N-R67K-T158N-F174L-H197R	-	585-588	637-658
T60K-R67K-T158N-H197R	-	569-576	618-629
R67K-P73T-T158N-F174L-H197R	389 + 451 + 594	599	668
R67K-K138L-T158N-F174L-H197R	386 + 451 + 594	600	664
R67K-T158N-D165V-F174L-H197R	384 + 451 + 594	594	665
R67K-T158N-F174L-T183P-G185K-H197R	384 + 451 + 594	596	664
R67K-P73T-T158N-D165V-F174L-H197R	384 + 451 + 595	599	657
R67K-P73T-T158N-F174L-T183P-G185K-H197R	384 + 451 + 596	597	665
R67K-P73T-K138L-T158N-D165V-F174L-H197R	382 + 450 + 595	596	667
R67K-P73T-K138L-T158N-D165V-F174L-T183P-G185K-H197R	381 + 451 + 594	596	667
R67K-K138L-T158N-D165V-F174L-H197R	384 + 451 + 595	598	657
R67K-K138L-T158N-D165V-F174L-T183P-G185K-H197R	389 + 451 + 593	595	667
R67K-T158N-H197R-R201Q	406 + 453 + 583	578-594	643-649
G28N-M41Q-R67K-F68L-I102F-T158N-F174L-H197R	383 + 604	575-605	674-678
V13L-G28S-M41Q-R67K-I102F-T158N-F174L-H197R	600	569-601	670-673
V13L-L15M-G28S-M41Q-R67K-I102F-T158N-F174L-H197R	599	567-600	597 + 671

Variante	A_{\max} / nm	$E_{x_{\max}}$ / nm	$E_{m_{\max}}$ / nm
V13L-L15M-G28N-M41Q-R67K-I102F-A119V-T158N-F174L-H197R	-	-	-
R67K-T158N-F174L-H197R-H216V	388 + 450 + 589	590	663
A59K-R67K-T158N-H197R	-	574-578	638-647

Auch bei mRuby-R67K-T158N-F174L-H197R liegt das Absorptionsmaximum bei pH-Werten unter 6,0 zunächst bei 568 nm, jedoch verschiebt es sich zwischen pH 6,0 (Abbildung 4.15 c, hellblau) und 7,4 (Abbildung 4.15 c, gelb) zu 595 nm, und die Intensität der Bande steigt in diesem Bereich deutlich mehr an als bei mRuby-R67K-I102F-T158N-H197R. Die maximale Intensität ist bei pH 9,6 (Abbildung 4.15 c, rot) erreicht, wobei das Maximum bei 598 nm liegt. Der pK_s ist 7,4 und damit deutlich niedriger als der von mRuby-R67K-T158N-H197R ($pK_s = 8,3$). Ab pH 9,3 (Abbildung 4.15 c, hellrot) erscheint außerdem eine Bande bei 496 nm, während die Absorption bei 390 nm abnimmt. Dies lässt auf eine grüne Chromophorspezies schließen, die bei pH 7,0 ausschließlich protoniert vorliegt und einen deutlich höheren pK_s hat als der rote Chromophor. Dieselbe Beobachtung kann für mRuby-R67K-I102F-T158N-F174L-H197R (Abbildung 4.15 e und f) gemacht werden. Jedoch nimmt hier ab einem pH von 10,0 (Abbildung 4.15 c, rot) die Absorption bei 600 nm ab und die Form der Absorptionsbande verändert sich. Es scheint, als ob der hohe pH-Wert eine Umwandlung des deprotonierten *cis*-Chromophors in eine andere Chromophorspezies auslöst. Die Absorptionswerte bei pH-Werten über 10,0 wurden deshalb bei der Anpassung mit Hendersson-Hasselbalch nicht berücksichtigt (Abbildung 4.15 f)). Der pK_s liegt, wahrscheinlich aufgrund der Mutation I102F, mit 7,6 etwas höher als in mRuby-R67K-T158N-F184L-H197R.

Weitere Versuche, den pK_s herabzusenken, waren nicht erfolgreich (Tabelle 4.9). So wurden z.B. nach dem Vorbild von TagRFP675 die Mutationen P73T, K138L, D165V, T183P und G185K in unterschiedlichen Kombinationen eingefügt. Diese hatten jedoch weder Einfluss auf die Chromophormaturierung und Lage von Absorption und Emission noch auf den pK_s . Auch weitere Mutationen, z.B. an Position 142 oder 143, konnten den pK_s nicht senken.

Aus allen im Rahmen dieser Arbeit entstandenen mRuby-Varianten ist mRuby-R67K-T158N-F174L-H197R die am weitesten rotverschobene Mutante. Sie wurde in Anlehnung an mRuby (engl. für Rubin) mGarnet (engl. für Granat) genannt. Die Charakterisierung von mGarnet wird in Unterkapitel 5.1 ausführlich beschrieben.

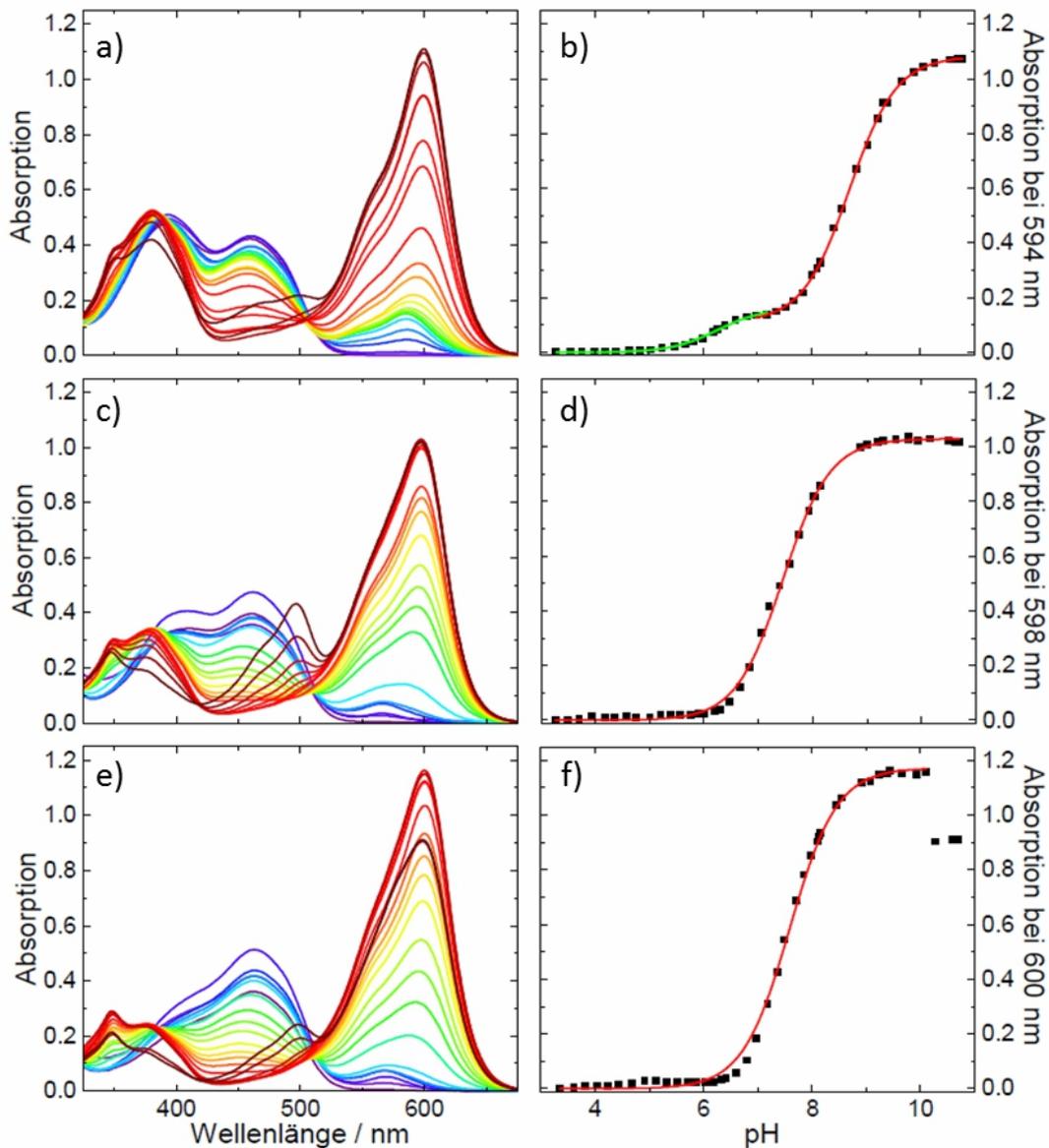


Abbildung 4.15: Änderung des pK_s durch Mutation von I102F und F174L. Die Absorptionsspektren von a) mRuby-R67K-I102F-T158N-H197R, b) mRuby-R67K-T158N-F174L-H197R und c) mRuby-R67K-I102F-T158N-F174L-H197R bei pH-Werten zwischen pH 3,7 (violett) und 10,7 (dunkelrot) zeigen mit zunehmendem pH einen Anstieg der Bande des deprotonierten Chromophors und eine Abnahme der Bande des protonierten Chromophors. Bei der Auftragung der jeweiligen Absorptionsmaxima gegen den pH (schwarze Punkte) wird deutlich, dass die Protonierung/Deprotonierung des Chromophors in den verschiedenen Varianten bei unterschiedlichen pH-Werten erfolgt. Die Anpassung mit Hendersson-Hasselbalch (grüne und rote Linie) ergibt für b) mRuby-R67K-I102F-T158N-H197R zwei pK_s -Werte von 6,3 und 8,7, d) mRuby-R67K-T158N-F174L-H197R einen pK_s von 7,4 und f) mRuby-R67K-I102F-T158N-F174L-H197R einen pK_s von 7,6.

4.4.3 Diskussion

In mRuby befindet sich unterhalb des Chromophors die Aminosäure H197, die mit dem *trans*-Chromophor π - π -Wechselwirkungen eingehen kann. Da es sich bei Histidin um eine basische Aminosäure handelt, kann diese möglicherweise durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der negativen Ladung des Phenolations den Grundzustand stabilisieren. Eine Stabilisierung des Grundzustands führt zu einer Blauverschiebung der Absorption. In nahezu allen RFPs mit rotverschobener Fluoreszenz ist H197 durch Tyrosin (E2-Crimson^[137], TagRFP657^[128], mRojoA^[195]) oder Arginin (mKate^[203], mNeptune^[194], eqFP670^[127], TagRFP675^[193]) ersetzt. Tyrosin kann π -Wechselwirkungen mit dem Chromophor eingehen und dadurch eine Rotverschiebung auslösen. Die Guanidinium-Gruppe des Arginins kann den Imidazolring ersetzen und deren Wasserstoffbrückenbindungen übernehmen. Auch π -Kation-Wechselwirkungen zwischen Guanidinium-Gruppe und Chromophor, die das Phenolation stabilisieren und dadurch eine Rotverschiebung hervorrufen, sind denkbar. So wurden diese beiden Mutationen auch in Varianten von mRuby getestet.

Der Austausch von H197 gegen Tyrosin erzeugt in mRuby-T158N unvollständig gefaltete Proteine und nicht-matürte Chromophore, was an einer geringen Proteinstabilität in Pufferlösung und einer einzigen Chromophorabsorptionsbande im UV-Bereich zu erkennen ist (Daten nicht gezeigt). Die Proteinfaltung wird wahrscheinlich durch sterische Effekte gestört. Falten die Proteine nicht in ihre native Konformation, hat dies wiederum eine unvollständige Chromophormaturierung zur Folge. Dasselbe kann auch beim Austausch von H197 gegen Arginin beobachtet werden. Der Effekt ist jedoch nicht so stark wie bei Tyrosin, sodass in mRuby-T158N-H197R (Abbildung 4.12 b) neben Streuung und Absorption im UV-Bereich auch noch eine Bande des roten anionischen Chromophors bei 585 nm erkennbar ist. Da Absorption und Emission von mRuby-T158N-H197R im Vergleich zu mRuby-T158N rotverschoben sind, wurde durch weitere Mutationen versucht, die Proteinfaltung zu verbessern. Zur Aminosäure 197 benachbart liegt R67. Durch die Mutation H197R liegen dadurch zwei Arginine nebeneinander, die sich gegenseitig sterisch behindern. Durch den zusätzlichen Austausch von R67 gegen Lysin wird somit Platz geschaffen für die Guanidinium-Gruppe des neu eingefügten Arginins. Dadurch wird die Proteinfaltung erleichtert und die Chromophormaturierung unterstützt. Die erhaltene mRuby-Variante zeigt eine enorme Rotverschiebung der Emission von ~50 nm (Abbildung 4.13 b). Die Mutation R67K allein hat hingegen keine Auswirkung auf die Lage von Absorptions- und Emissionsspektrum (Abbildung 4.12 a).

All dies zeigt, dass die Aminosäure an Position 197 sowohl eine Verschiebung von Absorption und Emission auslösen kann als auch die Proteinfaltung beeinflusst. So wurden

auch kleinere aliphatische Aminosäuren wie Alanin und Leucin an Position 197 getestet. Diese führten ebenfalls zu einer Rotverschiebung von mehr als 30 nm (Daten nicht gezeigt). Die Varianten mit H197A und H197L weisen jedoch sehr geringe Quantenausbeuten auf, die sie für die Anwendung als Fluoreszenzmarker unbrauchbar machen. Die mRuby-Varianten mit R67K und H197R zeigen einen ungewöhnlich hohen $pK_s \geq 8,0$. Zwar konnte dieser durch die Einführung der Mutation F174L gesenkt werden, es gelang jedoch nicht, durch weitere Mutationen den pK_s unter 7,0 herabzusenken, also in einen Bereich, in dem die pK_s -Werte der meisten RFPs liegen.^[28] Eine mögliche Erklärung für den hohen pK_s des Chromophors in mRuby-R67K-T158N-H197R sind Umstrukturierungen unterhalb des Chromophors. Ändern sich dadurch die Abstände zwischen der Hydroxyphenylgruppe und benachbarten Aminosäuren, kann sich auch die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen ändern. Möglicherweise wird die Chromophorumgebung auch so flexibel, dass zusätzliche Wassermoleküle eindringen können. Den Grund für den erhöhten pK_s könnte eine Kristallstrukturanalyse liefern. In der YFP-Variante Citrine^[205] konnte z.B. gezeigt werden, dass durch Mutation von Q67M der pK_s stärker erniedrigt wird als durch die Mutation Q67K. Anhand der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass sich das neutrale Methionin besser in die Chromophorumgebung einfügen kann als das zu große, positiv geladene Lysin. Dies zeigt, dass nicht nur die Ladung der umgebenden Aminosäuren eine Rolle für den pK_s des Chromophors spielt, sondern auch deren Größe bzw. wie stark sie die Konformation um den Chromophor herum beeinflussen.

5 Eigenschaften und Anwendung von mGarnet

5.1 Charakterisierung von mGarnet

Die optischen Eigenschaften von mGarnet (mRuby-R67K-T158N-F174L-H197R) sind in Abbildung 5.1 dargestellt. Das Absorptionsspektrum von mGarnet bei pH 7,4 zeigt neben der Bande des anionischen roten Chromophors bei 596 nm auch eine Bande des neutralen roten Chromophors bei 453 nm und eine Bande bei 384 nm, die eine Überlagerung der Absorption des nicht vollständig maturierten Chromophors und des S_0 - S_2 -Übergangs des roten *cis*-Chromophors darstellt. Das Anregungsmaximum bei 598 nm ($\lambda_{em} = 670$ nm) ist im Vergleich zur Absorption leicht rotverschoben. Dies ist ein Hinweis auf einen geringen Anteil an verbliebenem *trans*-Chromophor in der Probe, da dieser bei kürzeren Wellenlängen als der *cis*-Chromophor absorbiert und so das Maximum des Absorptionsspektrums blauverschiebt. Das Emissionsmaximum liegt bei 670 nm ($\lambda_{ex} = 598$ nm), sodass mGarnet eine große Stokes-Verschiebung von 72 nm besitzt. Bei Detektion bzw. Anregung mit verschiedenen Wellenlängen ist eine Verschiebung der Anregungs- bzw. Emissionsspektren um wenige Nanometer zu beobachten (Abbildung 5.1 b). Auch dieses Verhalten ist, ebenso wie der Unterschied von Absorptions- und Anregungsmaximum, darauf zurückzuführen, dass noch ein geringer Anteil an *trans*-Chromophor vorhanden ist, dessen Absorption und Fluoreszenz im Vergleich zum *cis*-Chromophor blauverschoben ist.

Um die Zeit zu bestimmen, die der Chromophor braucht, um vollständig zu maturieren, wurde mGarnet unter Sauerstoffausschluss exprimiert und unter Kühlung auf Eis aufgereinigt. Der Sauerstoffausschluss verhindert eine vorzeitige Chromophormaturierung während der Expression. Anschließend wurde die Chromophormaturierung bei 37°C und in Anwesenheit von Sauerstoff fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (Abbildung 5.2 a). Die Intensität der Emission des roten deprotonierten Chromophors nimmt mit der Zeit zu und erreicht eine Sättigung bei etwas mehr als 300 min. Die Maturierungshalbwertszeit, d.h. die Zeit, bei der die Hälfte der Chromophore maturiert sind,

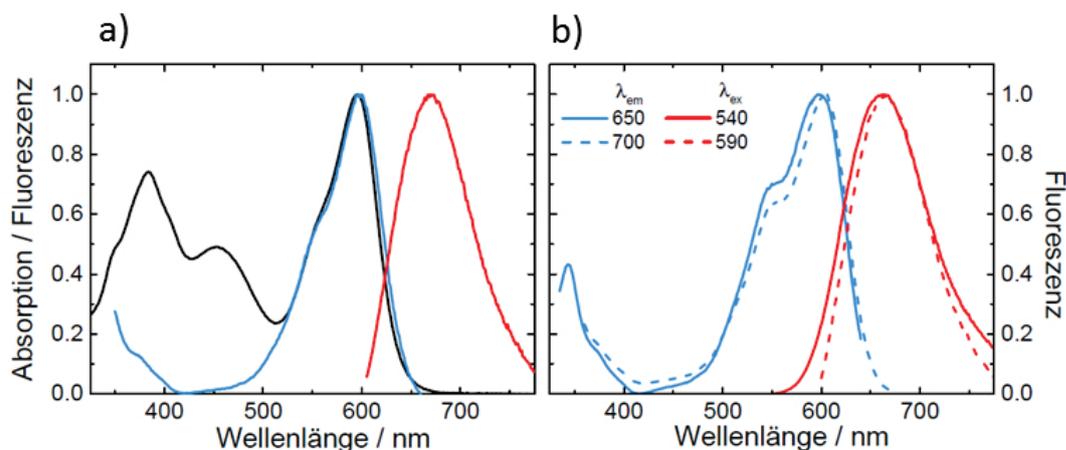


Abbildung 5.1: Spektroskopische Eigenschaften von mGarnet. a) Das Absorptionsspektrum (schwarz) bei pH 7,4 zeigt drei lokale Maxima bei 384 nm, 453 nm und 596 nm, die dem nicht vollständig maturierten, dem protonierten roten und dem deprotonierten roten Chromophor zugeordnet werden können. Das Anregungs- (blau) und Emissionsspektrum (rot) zeigen Maxima bei 598 nm ($\lambda_{em} = 670$ nm) und 670 nm ($\lambda_{ex} = 598$ nm). b) Mit unterschiedlichen Detektions- und Anregungswellenlängen ist eine Verschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima um wenige Nanometer zu beobachten.

beträgt 112 ± 5 min und liegt damit im durchschnittlichen Rahmen der Maturierungshalbwertszeiten von RFPs.^[28] Es konnte außerdem beobachtet werden, dass sich das Absorptionsspektrum von mGarnet über einen längeren Zeitraum verändert. In Abbildung 5.2 b) sind die Absorptionsspektren einer Probe von mGarnet direkt nach der Aufreinigung und nach zweimonatiger Lagerung bei 4°C dargestellt. Die Intensität der Bande bei 384 nm ist im Spektrum der frisch aufgereinigten Probe größer als bei der gelagerten Probe; mit den Banden bei 453 nm und 596 nm verhält es sich genau umgekehrt. Die Veränderung in der Bandenintensität ist mit der Nachmaturierung des roten Chromophors aus noch nicht vollständig maturierter Spezies mit Absorption im UV-Bereich zu erklären. Zudem sind die Banden im Spektrum der gelagerten Probe um 2 nm rotverschoben, was darauf hindeutet, dass hauptsächlich der Chromophor in der weiter rotverschobenen *cis*-Konformation nachmaturiert.

Für die Analyse der pH-Abhängigkeit von Absorption und Emission wurde die nachmaturierte Probe von mGarnet verwendet. Das Absorptionsspektrum bei pH 5,0 (Abbildung 5.3 a, dunkelblau) zeigt eine größere Bande bei 463 nm mit Schulter bei 409 nm und eine Bande mit geringer Intensität bei 565 nm. Letztere stimmt mit der Absorption des *trans*-Chromophors in mRuby überein. Ab pH 6,5 (Abbildung 5.3 a, grün) verschiebt sich das Absorptionsmaximum des anionischen roten Chromophors von 569 nm

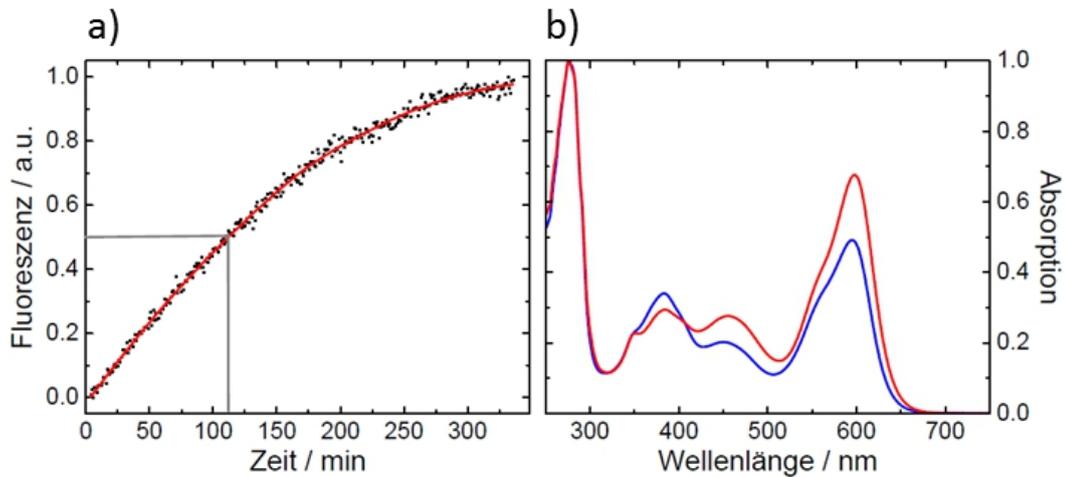


Abbildung 5.2: Maturierung von mGarnet. a) Aus der Auftragung der Emissionsintensität bei 670 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm) gegen die Zeit kann die Maturierungshalbwertszeit von 112 min abgeschätzt werden. b) Der Vergleich der Absorption von mGarnet direkt nach der Expression und Aufreinigung (blau) und nach zwei Monaten bei 4°C (rot) zeigt eine Intensitätsabnahme der Bande bei 384 nm, eine Zunahme bei 453 nm und 596 nm, sowie eine leichte Rotverschiebung der Banden bei 453 nm und 596 nm.

zu 598 nm bei pH 10,0 (Abbildung 5.3 a, dunkelrot), was auf eine zunehmende Deprotonierung des *cis*-Chromophors zurückzuführen ist. Dies ist auch am Anstieg der Bande des S_0 - S_2 -Übergangs des deprotonierten *cis*-Chromophors bei 349 nm zu erkennen. Ab pH 8,9 sinkt die Absorption bei 382 nm; gleichzeitig erscheint eine Bande bei 498 nm, die dem grünen anionischen Chromophor zugeordnet werden kann. Dies zeigt, dass die verbliebene Absorptionsbande bei 382 nm in der nachmaturierten mGarnet-Probe ausschließlich auf die neutrale grüne Spezies zurückzuführen ist. Aus der Auftragung der Absorption bei 598 nm gegen den pH und der Anpassung mit einer einfachen Hendersson-Hasselbalch-Relation (Gleichung 3.5) kann ein pK_s des roten *cis*-Chromophors von $7,40 \pm 0,05$ bestimmt werden (Abbildung 5.3 b). Die Anwesenheit der anderen Chromophorspezies stört dabei nicht, da sie nicht zur Absorption bei 598 nm beitragen. Bei der Betrachtung der Emission in Abhängigkeit vom pH fällt auf, dass anders als bei der Absorption die maximale Intensität schon bei pH 8,0 (Abbildung 5.3 c, rot) erreicht ist und bei höheren pH-Werten wieder abnimmt. Außerdem verschiebt sich das Emissionsmaximum von 644 nm bei pH 6,0 (Abbildung 5.3 c, grün) zu 670 nm bei pH 8,0. Dies ist, wie schon bei der Verschiebung der Absorption, auf die Anwesenheit der weniger rotverschobenen *trans*-Spezies zurückzuführen.

Neben der Absorption wurden auch die Emissionswerte bei 670 nm gegen den pH aufge-

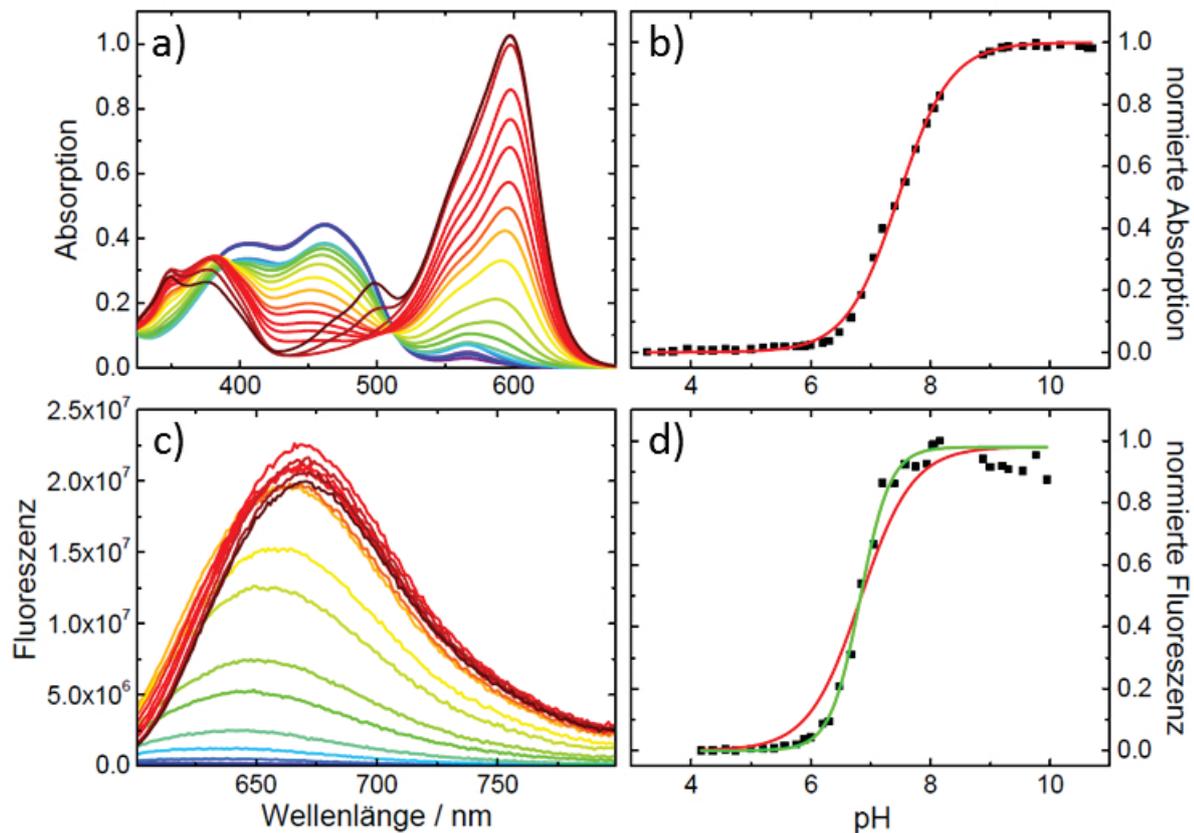


Abbildung 5.3: pH-Abhängigkeit von Absorption und Emission in mGarnet. a) Mit steigendem pH-Wert nimmt die Absorption des deprotonierten roten Chromophors bei 598 nm zu, während die Absorption des protonierten roten Chromophors bei 455 nm abnimmt. Ab einem pH-Wert von 9,3 (dunkelrot) erscheint außerdem eine Absorptionsbande bei 496 nm. b) Aus der Auftragung der Absorptionen bei 598 nm (schwarz) gegen den pH und der Anpassung mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (rot) kann ein pK_s von 7,4 ermittelt werden. c) Die Emissionsintensität bei 670 nm ($\lambda_{ex} = 590$ nm) des roten deprotonierten Chromophors nimmt mit steigendem pH zu. Außerdem verschiebt sich das Maximum von 644 nm bei pH 6,0 (grün) zu 670 nm bei pH 8,0 (rot). Ab einem pH-Wert von 8,0 nimmt die Intensität wieder ab. d) Die Auftragung der Emission bei 670 nm (schwarz) gegen den pH und die Anpassung mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ($n = 1,0$, rot und $n = 1,7$, grün) ergibt ein pK_s von 6,8.

tragen (Abbildung 5.3 d). Die Anpassung mit einer einfachen Hendersson-Hasselbalch-Gleichung ($n = 1$) spiegelt hierbei nicht den Verlauf der pH-abhängigen Emissionswerte wider und liefert, anders als die Anpassung an die Absorption, einen pK_s von $6,80 \pm 0,05$. Die Werte werden besser mit einer Hendersson-Hasselbalch-Gleichung und $n = 1,7$ (Abbildung 5.3 d, grün) repräsentiert. Dies zeigt, dass es sich nicht um eine einfache Protonierungs-Deprotonierungs-Reaktion handelt, sondern weitere Effekte berücksichtigt werden müssen, wie in diesem Fall die pH-abhängige Quantenausbeute. Die Quantenausbeute wird aus der Steigung der linearen Anpassung aus der Auftragung der integrierten Emission gegen den Absorptionswert bei der Anregungswellenlänge und der bekannten Quantenausbeute einer Referenzprobe bestimmt (Gleichung 3.9). Für mGarnet wurden als Referenzproteine die beiden RFPs mit ähnlichen Absorptions- und Emissionsspektren, eqFP670 ($\Phi = 0,06^{[127]}$) und TagRFP657 ($\Phi = 0,10^{[128]}$), verwendet (Abbildung 5.4 a). Nach Berechnung mit Gleichung 3.9 ergibt sich für mGarnet bei pH

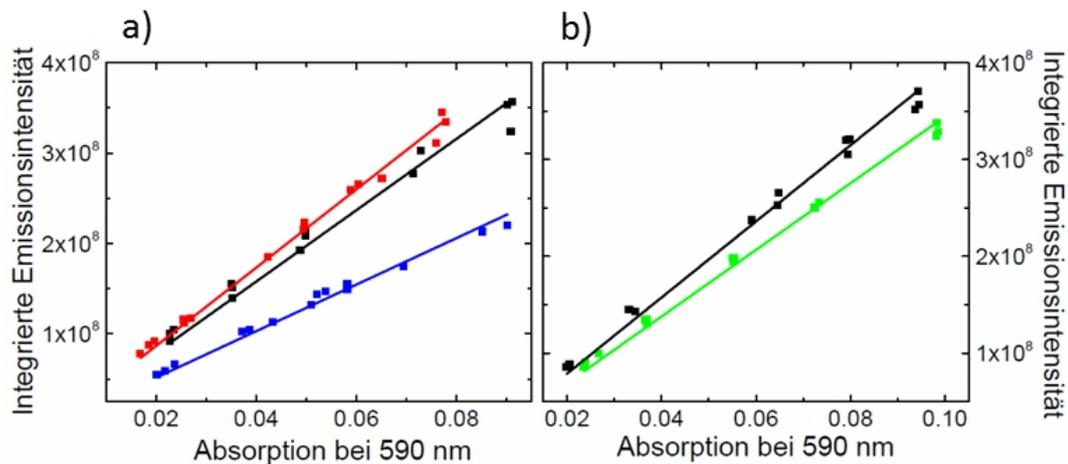


Abbildung 5.4: Bestimmung der Quantenausbeute von mGarnet. Durch Auftragung der integrierten Emission gegen die Absorption bei der Anregungswellenlänge lassen sich aus dem Verhältnis der Steigungen und der Quantenausbeute der Referenzprobe die Quantenausbeute von mGarnet berechnen. a) Messwerte von mGarnet (schwarz) bei pH 7,4 im Vergleich zu den Referenzproben TagRFP657 (rot) und eqFP670 (blau). b) Messwerte von mGarnet bei pH 7,4 (schwarz) und pH 9,0 (grün).

7,4 eine Quantenausbeute von $0,0091 \pm 0,0001$, etwa 4 mal geringer als die von mRuby. Beim Vergleich der Messwerte von mGarnet bei pH 7,4 und pH 9,0 (Abbildung 5.4 b) zeigt sich, dass die Quantenausbeute bei pH 9,0 mit $\Phi = 0,08$ geringer ist als bei pH 7,4. Die relativ geringe Quantenausbeute ist typisch für RFPs mit Absorption- und Emissionsmaxima über 600 nm, da das große π -Elektronensystem sehr flexibel im Vergleich zu den π -Elektronensystemen von z.B. GFPs ist, was zu einer höheren Abregungsrate

ohne Emission eines Photons führt.^[136]

Die Fluoreszenzlebensdauer hängt genau wie die Quantenausbeute von den Relaxationsraten ab. Deshalb ist es nicht überraschend, dass wie die Quantenausbeute auch die Lebensdauer von mGarnet mit $\tau = 0,82 \pm 0,01$ ns sehr viel geringer ist als die von mRuby ($\tau = 2,6 \pm 0,1$ ns). In Abbildung 5.5 sind die Fluoreszenzintensitätsabfälle von mGarnet und mRuby dargestellt und monoexponentiell angepasst. Aus der Anpassung ergeben sich die oben genannten Lebensdauern. Für die Helligkeit eines FP's ist neben

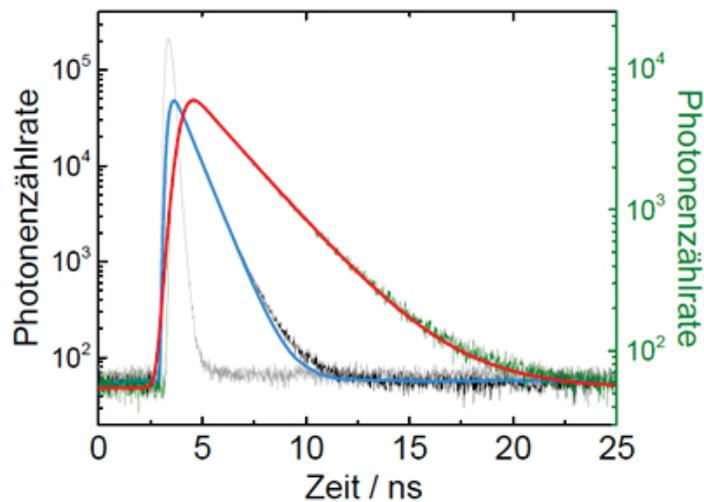


Abbildung 5.5: Fluoreszenzintensitätsabfall von mGarnet und mRuby. Nach Anregung mit einem Laserpuls wurde der Abfall der Fluoreszenzintensität mit der Zeit von mGarnet (schwarz) und mRuby (grün) gemessen. Der Abfall wurde exponentiell angepasst, wobei die Exponentialfunktion mit der IRF (grau) gefaltet wurde. Aus der exponentiellen Anpassung wurden Fluoreszenzlebenszeiten von $2,6 \pm 0,1$ ns für mRuby (rot) und $0,82 \pm 0,01$ ns für mGarnet (blau) erhalten.

der Quantenausbeute auch der Extinktionskoeffizient verantwortlich. Dieser kann mit Hilfe der alkalischen Denaturierungsmethode bestimmt werden.^[76] Bei pH 13,0 wird in mGarnet ausschließlich der grüne Chromophor denaturiert (Abbildung 5.6 a). Dies zeigt sich durch das Verschwinden der Banden bei 389 nm und 496 nm, während die Banden des roten Chromophors bei 342 nm und 598 nm unverändert bleiben. Die Bande bei 450 nm im Spektrum der denaturierten Spezies (Abbildung 5.6 a, blau) kann somit ausschließlich dem grünen Chromophor zugeordnet werden. Bei pH 13,4 wird in mGarnet eine vollständige Denaturierung des roten und grünen Chromophors erreicht (Abbildung 5.6 b). Mit der Zeit nimmt die Absorption bei 598 nm und 342 nm bis auf einen Wert von 0 ab, während die Absorption bei 450 nm steigt. Letztere Bande resultiert aus der Absorption von denaturiertem roten und grünen Chromophor. Da die Konzentra-

tion an grünem Chromophor aus dem Spektrum der bei pH 13,0 denaturierten Probe bestimmt werden kann, kann diese von der bei pH 13,4 bestimmten Gesamtkonzentration abgezogen werden. Dadurch kann auch die Konzentration des roten Chromophors bestimmt werden. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gleichung 3.2) und dem Wissen, dass bei pH 7,4 die Hälfte der Chromophore deprotoniert vorliegen ($pK_s = 7,4$), kann daraus der molare Extinktionskoeffizient bei 598 nm bestimmt werden. Für mGarnet ergibt sich so ein Extinktionskoeffizient von $95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dieser ist damit nur unwesentlich geringer als der von mRuby ($\epsilon = 112000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

In einem Einzelmolekül-Photobleichexperiment wurde die Photostabilität von mGarnet

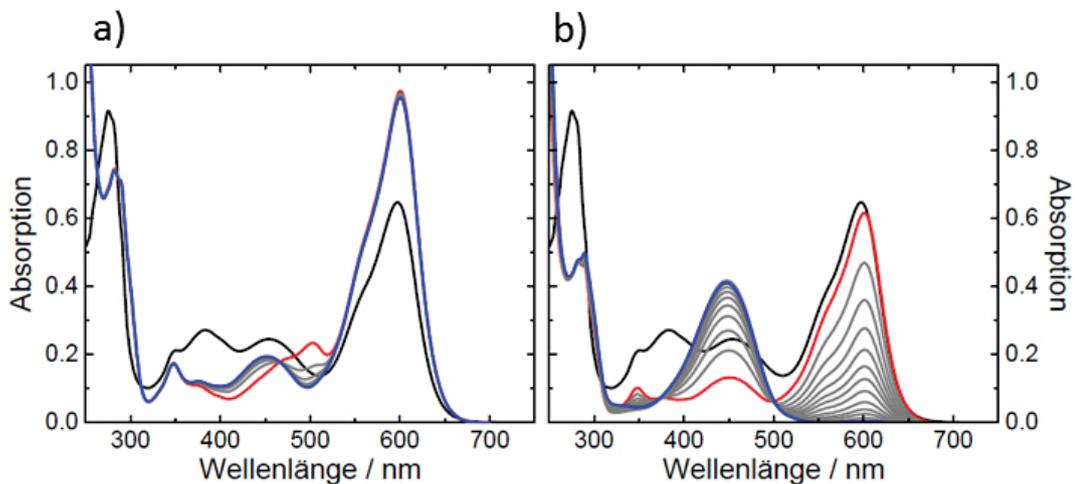


Abbildung 5.6: Alkalische Denaturierung von mGarnet. a) Durch Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert einer mGarnet-Lösung (schwarz) auf pH 13,0 erhöht (rot). Mit der Zeit nimmt die Intensität der Bande bei 496 nm ab, während eine neue Bande bei 450 nm erscheint. Die Bande bei 598 nm bleibt unverändert. b) Durch Zugabe von 1 M NaOH wurde der pH-Wert einer mGarnet-Lösung (schwarz) auf pH 13,4 erhöht (rot). Die Intensität der Bande bei 598 nm nimmt mit der Zeit ab, während die Absorption bei 450 nm zunimmt.

mit der von mRuby und TagRFP657 verglichen. Dazu wurden einzelne Moleküle auf einer PEG-Oberfläche immobilisiert und Bilder der Oberfläche an einem Weitfeldmikroskop mit Einzelmolekülsensitivität^[189] im TIRF-Modus aufgenommen. Die Moleküle wurden mit einem 561 nm-Dauerstrichlaser angeregt und die Photonen detektiert, die ein Molekül bis zum Photobleichen aussendet. Aus ~2000 Einzelmolekülen pro FP wurde ein Photonenhistogramm erstellt (Abbildung 5.7). An die Histogramme wurden einfache Exponentialfunktionen angepasst, die die durchschnittliche Anzahl emittierter Photonen pro Molekül liefern. Photonenzahlen unter 300 wurden für die Anpassung nicht berück-

sichtigt, da sie von anderen Prozessen, wie molekulares Schalten oder Verunreinigungen in der Probe beeinflusst werden. So wurden mittlere Photonenzahlen von 3189 ± 29 für mRuby, 989 ± 26 für mGarnet und 823 ± 24 für TagRFP657 erhalten. Somit ist die Photostabilität von mGarnet viel geringer als die von mRuby, jedoch emittiert mGarnet immer noch 20% mehr Photonen als TagRFP657, bevor es gebleicht wird.

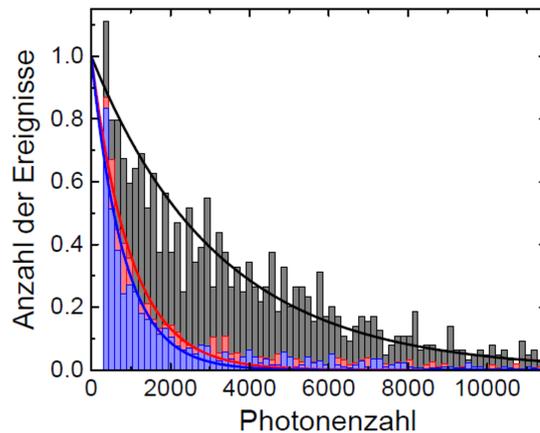


Abbildung 5.7: Normiertes Histogramm der Anzahl von FP-Molekülen gegen die Gesamtanzahl an detektierten Photonen vor dem Photobleichen des jeweiligen FPs. Die Daten von mRuby (schwarz), mGarnet (rot) und TagRFP657 (blau) wurden in Gruppen von je 150 Photonen eingeteilt und exponentiell angepasst (durchgezogenen Linien). Photonenzahlen unter 300 wurden von der Anpassung ausgeschlossen, da sie von Molekülen stammen, die in einen nicht-fluoreszenten Übergangszustand schalten. So wurden aus der exponentiellen Anpassung mittlere Photonenzahlen von 3189 ± 29 für mRuby, 989 ± 26 für mGarnet und 823 ± 24 für TagRFP657 erhalten.

5.2 mGarnet als fluoreszenter Marker in der STED-Mikroskopie

Um mGarnet für die Anwendung in der Zellmikroskopie zu testen, wurden zunächst konfokale Fluoreszenzmikroskopiebilder von lebenden COS-7 Zellen aufgenommen, die mit mGarnet-Fusionskonstrukten transfiziert waren (Abbildung 5.8). Fluoreszent markiert wurden die Strukturproteine des Cytoskeletts, F-Aktin (LifeAct^[206]-mGarnet), α -Actinin (α -Actinin-mGarnet) und Tubulin (mGarnet-*RBP-J interacting and tubulin associated* (RITA) *protein*^[207]), sowie die Mitochondrien (mito-mGarnet) und der Zellkern

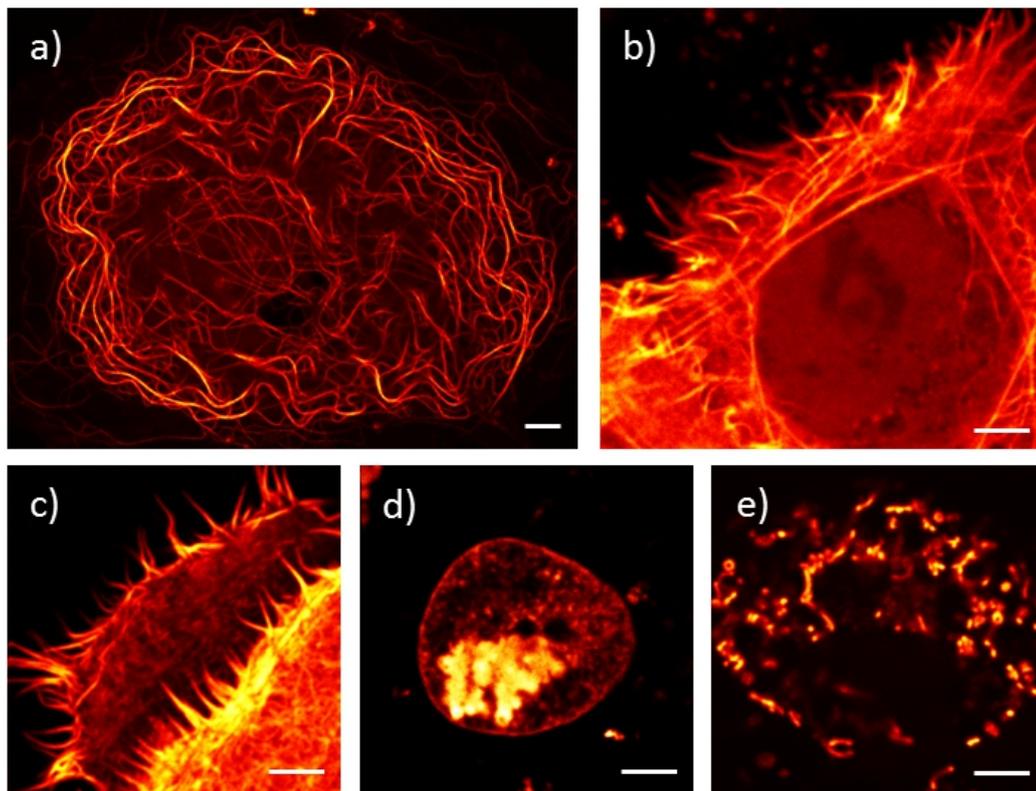


Abbildung 5.8: Konfokale Mikroskopiebilder von lebenden COS-7 Zellen, die verschiedene mGarnet-Fusionsproteine exprimieren. Die Zellen wurden transfiziert mit a) mGarnet-RITA b) Lifeact-mGarnet c) α -Actinin-mGarnet d) Histon-2B-mGarnet und e) mito-mGarnet, Maßstab: 5 μ m.

(Histon-2B-mGarnet). Zur Anregung wurde ein gepulster 640 nm-Diodenlaser verwendet. Obwohl dies eine Anregung auf der langwelligen Flanke des Absorptionsspektrums bedeutet, sind die markierten Strukturen sehr gut zu erkennen.

Der nächste Schritt bestand darin, mGarnet auch in der hochauflösenden Mikroskopie einzusetzen, die es erlaubt Strukturen unterhalb der Beugungsbegrenzung aufzulösen. Verwendet wurde dazu die STED-Mikroskopie, wobei die stark rotverschobene Emission ideal für die Abregung durch stimulierte Emission bei einer Wellenlänge von 780 nm ist. So wurden sowohl Konfokal- als auch STED-Bilder von unterschiedlich transfizierten, lebenden Zellen aufgenommen und die Auflösungsverbesserung bestimmt. Die Struktur, die sich am besten für einen Vergleich des Auflösungsvermögens eignet, sind die Mikrotubuli, da diese Filamente einen definierten Durchmesser von 25 nm haben.^[208,209] Beim Vergleich der Bilder von mit mGarnet-RITA transfizierten Zellen ist die Auflösungsverbesserung deutlich zu erkennen (Abbildung 5.9). Im STED-Bild sind an zahlreichen Stellen zwei parallel laufende Filamente zu erkennen, die im Konfokalbild als ein Fila-

ment erscheinen. In Abbildung 5.9 e) und f) sind die Intensitätsverteilungen entlang der längeren Seite des Rechtecks in Abbildung 5.9 c) und d), gemittelt über die kürzere Seite, dargestellt. Aus der Anpassung mit einer Gauss-Verteilung können die Halbwertsbreiten ermittelt werden, die die Auflösung wiedergeben. Während für das Konfokalbild nur eine Auflösung von 330 ± 34 nm erreicht wird, ist die Auflösung im STED-Bild 71 ± 6 nm. Wird davon ausgegangen, dass die eigentliche Größe der abgebildeten Mikrotubulinfilamente 25 nm beträgt, bedeutet dies eine Auflösungsverbesserung von ungefähr einem Faktor 6.

Mit Hilfe von LifeAct-mGarnet wird F-Aktin markiert. So können die Aktinfilamente des Cytoskeletts visualisiert werden. Diese Mikrofilamente bestehen aus zwei umeinander gewickelte Ketten aus Aktinmolekülen, die einzeln betrachtet einen Durchmesser von etwa 8 nm besitzen.^[210] Da sich jedoch meistens mehrere einzelne Filamente zusammen mit anderen Proteinen zu einem Bündel zusammenlagern, kann der Durchmesser wesentlich größer sein.^[211] Aus diesem Grund ist es schwer, eine exakte Auflösungsverbesserung zu bestimmen. In Abbildung 5.10 a) und b) sind Ausschnitte einer mit LifeAct-mGarnet transfizierten COS-7 Zelle abgebildet. Während die Strukturen im Konfokalbild (Abbildung 5.10 a) verwaschen wirken und wenig einzelne Filamente erkennbar sind, sind die Strukturen im STED-Bild (Abbildung 5.10 b) wesentlich klarer. So kann an die Intensitätsverteilung über die lange Seite des weißen Rechtecks, gemittelt über die kurze Seite, im Konfokalbild lediglich eine Gaussverteilung angepasst werden (Abbildung 5.10 c), während die gleiche Position im STED-Bild eine Anpassung mit zweifacher Gaussverteilung zulässt (Abbildung 5.10 d). Die Halbwertsbreite im Konfokalbild liefert eine Filamentdicke von 402 ± 25 nm. Die Gaussanpassungen im STED-Bild zeigen Halbwertsbreiten von 264 ± 24 nm und 125 ± 15 nm. Dabei haben die Maxima der Gaussverteilungen, welche die Zentren der Aktinfilamente wiedergeben, eine Distanz von 181 nm.

Für die Bestimmung der Auflösung bei den mit α -Actinin-mGarnet transfizierten COS-7 Zellen wurde eine Stelle gewählt, die außerhalb der Zelle liegt (Abbildung 5.11). Hier gibt es deutlich weniger Hintergrundfluoreszenz als innerhalb der Zelle (vgl. Abbildung 5.10). An der Spitze des Aktinfilaments ist im STED-Bild (Abbildung 5.11 b) eine Aufspaltung in zwei Filamente zu erkennen, markiert durch das weiße Rechteck. Wird an dieser Stelle die Intensitätsverteilung betrachtet, kann diese mit zwei Gaussfunktionen angepasst werden (Abbildung 5.11 d). Für die beiden Filamente ergeben sich so Halbwertsbreiten von 164 ± 11 nm und 186 ± 8 nm. Im Konfokalbild (Abbildung 5.11 a) hingegen erscheint nur ein Filament mit einer Halbwertsbreite von 436 ± 29 nm (Abbildung 5.11 c). Die Intensitätsprofile in Abbildung 5.10 und Abbildung 5.11 zeigen nur zwei Beispiele, in denen das STED-Bild eine viel detailliertere Darstellung der Aktin-

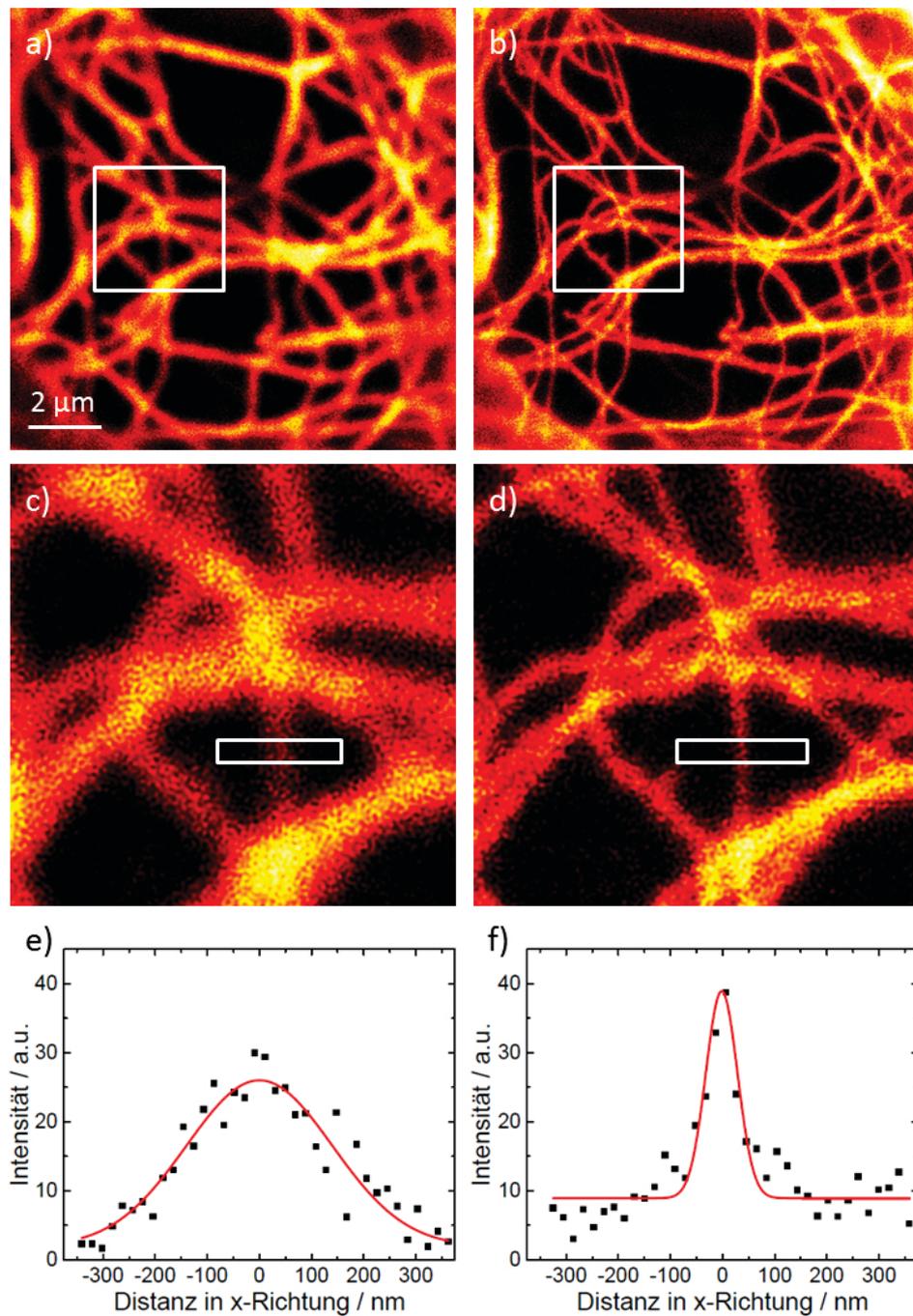


Abbildung 5.9: mGarnet als fluoreszenter Marker von Mikrotubuli in lebenden COS-7 Zellen. a) Konfokal- und b) STED-Bild einer mit mGarnet-RITA transfizierten Zelle. c) und d) Vergrößerte Ausschnitte der durch den weißen Kasten markierten Region in a) und b). e) und f) Die Intensitätsprofile entlang der langen Seite der weißen Kästen in c) und d) gemittelt über die kurze Seite, lassen sich mit einer Gaussfunktion anpassen (rote Linie). Daraus lassen sich Halbwertsbreiten von 330 ± 34 nm für das Konfokalbild und 71 ± 6 nm für das STED-Bild ermitteln.

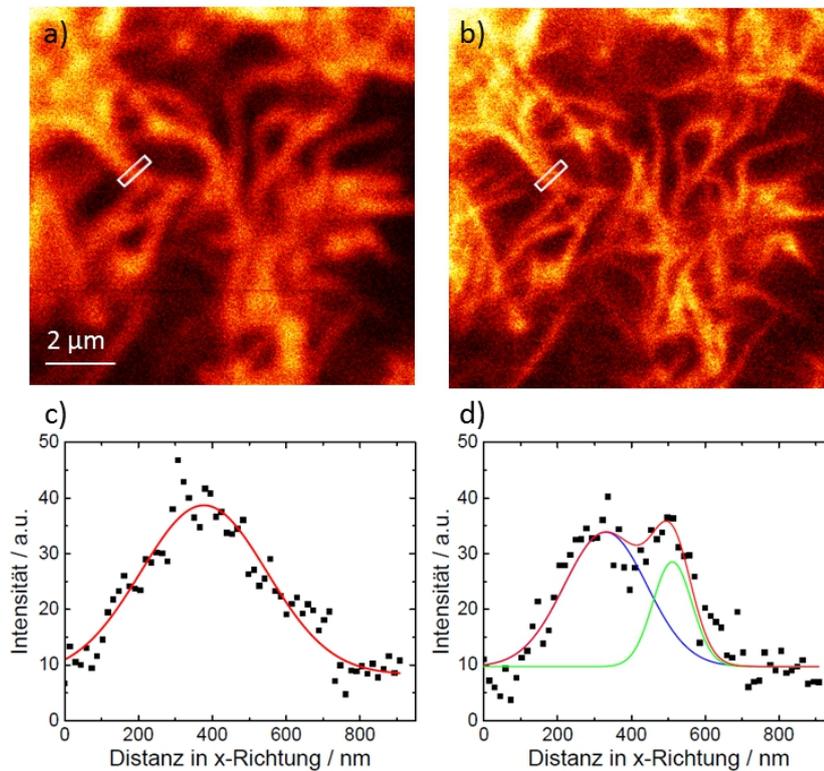


Abbildung 5.10: Markierung von F-Aktin in lebenden COS-7 Zellen mit mGarnet.

a) Konfokal- und b) STED-Bild einer mit LifeAct-mGarnet transfizierten Zelle. c) und d) Intensitätsprofile entlang der langen Seite der weißen Kästen in a) und b) gemittelt über die kurze Seite. Im STED-Bild können zwei nebeneinanderliegende Filamente mit Halbwertsbreiten von 264 ± 24 nm und 125 ± 15 nm und einem Abstand von 181 nm unterschieden werden, während die Gaussanpassung im konfokalen Bild nur ein Filament mit einer Halbwertsbreite von 402 ± 25 nm zeigt.

strukturen liefert als das Konfokalbild.

Die Auflösungsverbesserung kann neben dem Cytoskelett aber auch in anderen Teilen der Zelle beobachtet werden. Mit Histon-2B-mGarnet wurden die Chromatinstrukturen im Zellkern fluoreszent markiert (Abbildung 5.12). Die fluoreszent markierten Strukturen sind über den gesamten Zellkern verteilt mit einer hohen Dichte in DNA-reichen Regionen. Für die Verifizierung der Auflösungsverbesserung eignet sich besonders die Kernhülle. In der Interphase heftet sich das Chromatin an die an der Innenseite der Kernhülle befindlichen Kernlamina,^[211] wodurch diese im Fluoreszenzbild gut als Struktur erkennbar ist. Die Gaussanpassung an die Intensitätsprofile (Abbildung 5.12 c und d) liefert für das Konfokalbild eine Halbwertsbreite von 356 ± 21 nm und für das STED-Bild eine Halbwertsbreite von 211 ± 20 nm. Damit ist die Auflösungsverbesserung nicht so gut zu erkennen, wie im Fall von z.B. Mikrotubulin. Dies liegt vor allem daran, dass

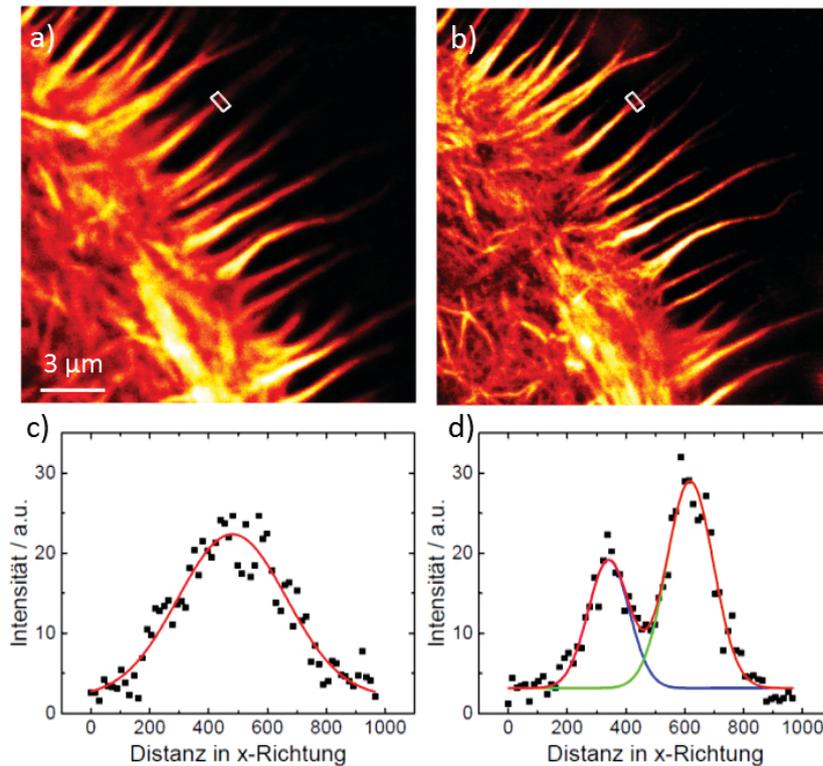


Abbildung 5.11: Fluoreszenzbilder von α -Actinin-mGarnet transfizierten COS-7 Zellen. a) Konfokal- und b) STED-Bild einer lebenden Zelle. c) und d) Intensitätsprofile entlang der langen Seite der weißen Kästen in a) und b) gemittelt über die kurze Seite. c) Die Gaußanpassung des Konfokalsbildes liefert eine Halbwertsbreite von 436 ± 29 nm. d) Die Gaußanpassung des STED-Bildes liefert zwei Gaußprofile mit Halbwertsbreiten von 164 ± 11 nm und 186 ± 8 nm.

die Chromatinstrukturen an sich größer sind als die Filamente des Cytoskeletts. Als letzte Struktur wurden Mitochondrien mit Hilfe von mito-mGarnet fluoreszent markiert (Abbildung 5.13), wobei mito die mitochondriale Signalsequenz der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit VIII, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist^[212], darstellt. Mitochondrien haben eine Größe zwischen $0,5 \mu\text{m}$ und $1 \mu\text{m}$.^[213] Es konnte jedoch beobachtet werden, dass sie innerhalb der Zelle keine gleichmäßig ovale Form einnehmen, sondern in Länge und Ausdehnung variieren und sogar fadenförmige Strukturen mit Längen bis zu $5 \mu\text{m}$ bilden.^[214] Dadurch wird der Abstand der beiden inneren Membranen sehr gering, wodurch es schwer ist, diese getrennt aufzulösen. Das Querschnittsprofil des Mitochondriums besteht daher nicht nur aus einer, sondern immer aus mindestens zwei Membranen. Mittels Gaußanpassung an die Intensitätsprofile werden Halbwertsbreiten von 297 ± 8 nm für das Konfokalsbild (Abbildung 5.13 a und c) und 210 ± 11 nm für das STED-Bild (Abbildung 5.13 b und d) erhalten. Der Unterschied in

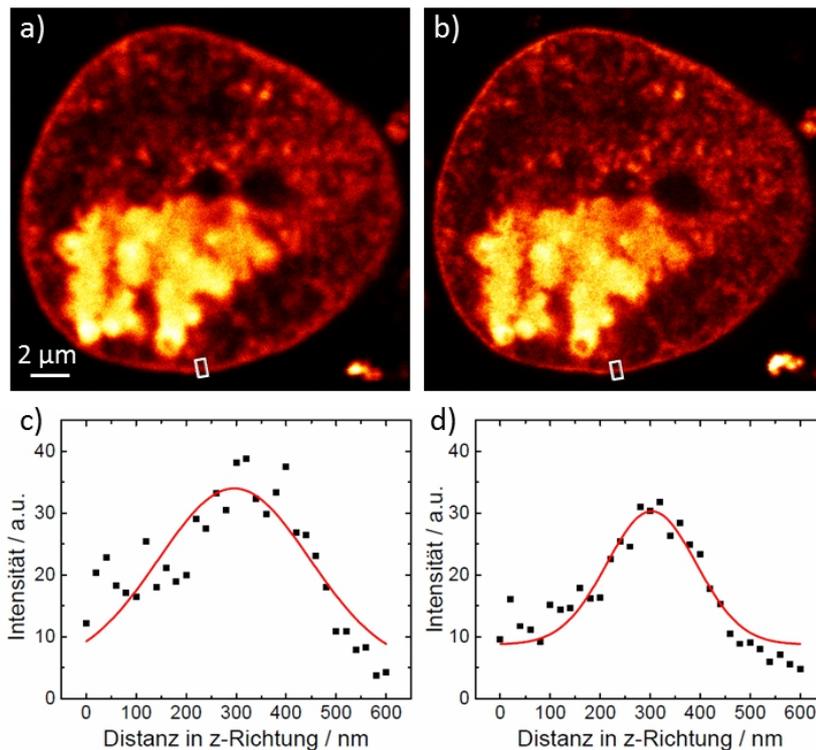


Abbildung 5.12: Fluoreszenzbilder eines mit Histon-2B-mGarnet markierten Zellkerns. a) Konfokal- und b) STED-Bild einer lebenden COS-7 Zelle. c) und d) Intensitätsprofile entlang der langen Seite der weißen Kästen in a) und b) gemittelt über die kurze Seite. Für das Konfokalbild beträgt die aus der Gaußanpassung ermittelte Halbwertsbreite 356 ± 21 nm, für das STED-Bild ist diese nur 211 ± 20 nm.

den Halbwertsbreiten zwischen Konfokal- und STED-Bild ist somit sehr gering, rührt aber von der Ausdehnung der Mitochondrien, die im Vergleich zu Mikrotubulin- oder Aktinfilamenten sehr viel größer ist.

Neben den Aufnahmen verschieden markierter Zellstrukturen wurde mGarnet auch als Marker in einer Langzeitmessung getestet. Dazu wurden nacheinander 200 Bilder desselben Ausschnitts einer mit mGarnet-RITA markierten COS7-Zelle im Konfokal- bzw. STED-Modus aufgenommen. Die Größe des Bildausschnittes betrug dabei 512×512 Pixel (Pixelgröße 40 nm, Pixelverweilzeit 40 µs). Angeregt wurde mit 640 nm (Laserleistung 6,3 µW) und abgeregt mit 780 nm (Laserleistung 46 mW). Anschließend wurde die integrierte Intensität der Emission jedes Bildes bestimmt und gegen die Bilderanzahl aufgetragen (Abbildung 5.14 e). Im Konfokalmodus, d.h. nur mit Anregung bei 640 nm, fiel die Intensität auch nach 200 Bildern auf nur 50% der Ausgangsintensität ab. Zwischen dem ersten und dem vierzigsten Bild (Abbildung 5.14 a und b) ist kaum ein Unterschied in der Intensität zu erkennen. Durch zusätzliches Einschalten des STED-

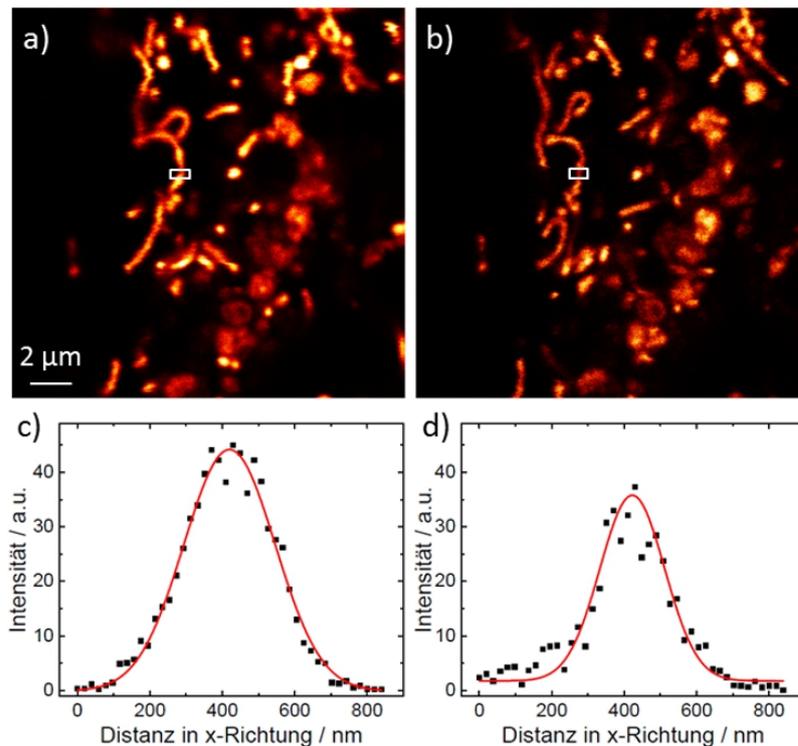


Abbildung 5.13: Fluoreszenzbilder von Mitochondrien markiert mit mito-mGarnet in lebenden COS-7 Zellen. a) Konfokal- und b) STED-Bild. c) und d) Die Intensitätsprofile entlang der langen Seite der weißen Kästen in a) und b) gemittelt über die kurze Seite und die daran angepasste Gaußfunktion ergeben Halbwertsbreiten von 297 ± 8 nm für das Konfokalbild und 210 ± 11 nm für das STED-Bild.

Lasers wurde der Intensitätsabfall wesentlich beschleunigt, sodass schon nach 40 Bildern die Intensität um die Hälfte verringert wurde. Nach 200 gemessenen Bildern im STED-Modus betrug die Intensität so nur noch ~25% der Ausgangsintensität. Beim Vergleich des ersten und des vierzigsten Bildes im STED-Modus (Abbildung 5.14 c und d) ist der Intensitätsunterschied deutlich zu erkennen, jedoch reicht die Intensität auch nach 40 Bildern noch aus, um Auflösungen von 70 – 90 nm zu erreichen (vgl. Abbildung 5.9).

5.3 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit, eine fern-rote Variante des monomeren FPs mRuby für die Anwendung in der hochauflösende STED-Mikroskopie an lebenden Zellen zu entwickeln, konnte erfolgreich durch allein vier Mutationen erreicht werden. Um aus mRuby die rotverschobene Variante mGarnet zu erhalten, waren die vier Punktmutationen R67K,

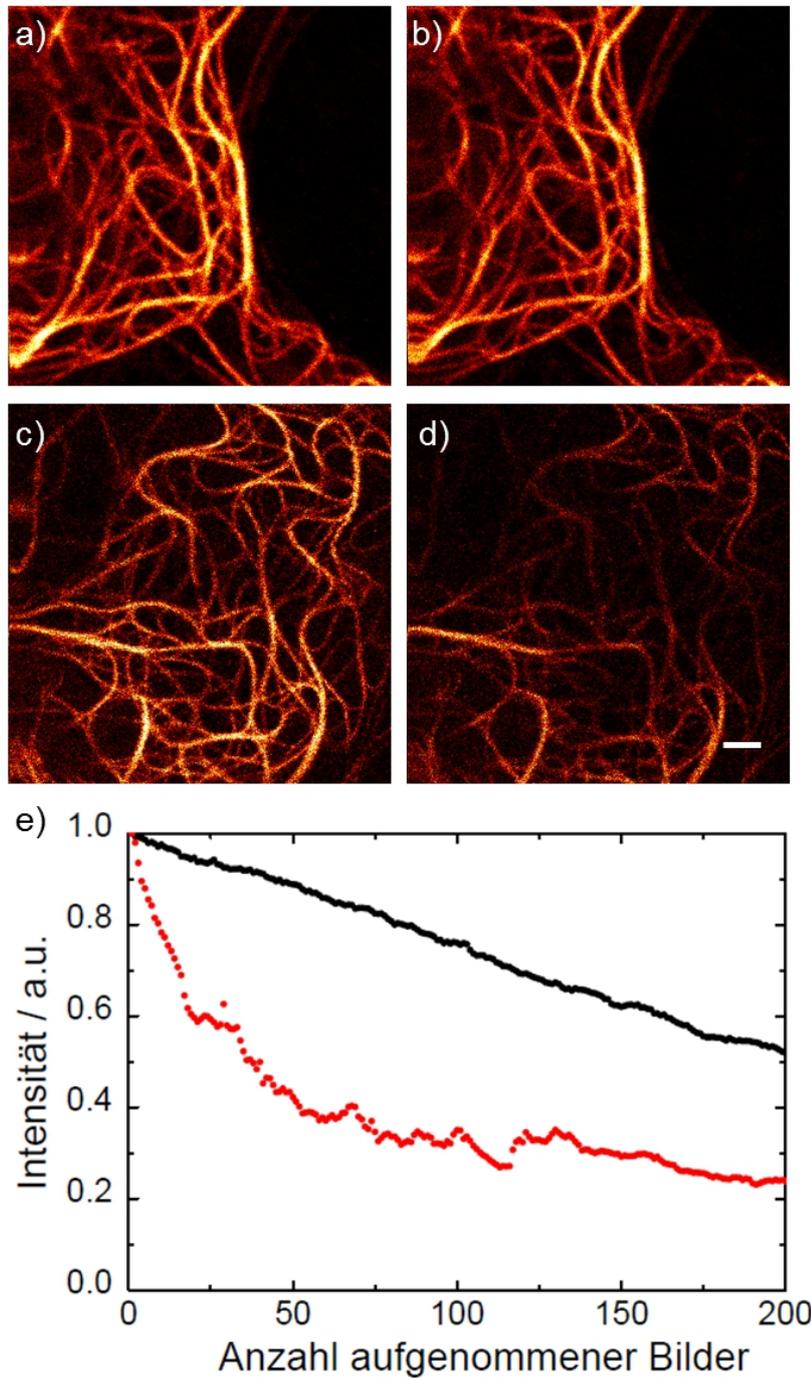


Abbildung 5.14: Wiederholte konfokale und STED-Messungen an COS7-Zellen, markiert mit mGarnet-RITA. Es wurden nacheinander 200 Bilder aufgenommen. Bei der Konfokalmessung ist kaum ein Unterschied in der Intensität zwischen a) Bild Nummer 1 und b) Bild Nummer 40 zu erkennen. Bei der STED-Messung nimmt die Intensität zwischen c) Bild Nummer 1 und d) Bild Nummer 40 um 50% ab. e) Die integrierte Intensität der Emission aufgetragen gegen die Bildanzahl zeigt, dass die Intensität nach 200 Bildern auf 50% bei der Konfokalmessung und 25% bei der STED-Messung sinkt, Maßstab: 2 μm .

T158N, F174L und H197R nötig. Im Vergleich dazu unterscheiden sich mKate und das daraus abgeleitet TagRFP657 in neun Aminosäuren, wobei hier die Rotverschiebung der Emission mit 23 nm wesentlich geringer ausfällt.^[128] Aus den mehr als 10^{295} Möglichkeiten an Aminosäurekombinationen in mRuby konnte mit Hilfe des rationalen Proteindesigns eine erfolgreiche Kombination gefunden werden. Absorptions- und Emissionsmaximum von mGarnet sind im Vergleich zum Ausgangsprotein 40 nm und 65 nm rotverschoben. Mit 670 nm besitzt es das langwelligste Emissionsmaximum aller bisher entwickelten monomeren FPs. Lediglich TagRFP675^[193] ist weiter rotverschoben, wobei bei diesem FP nicht geklärt ist, ob es sich um ein Monomer handelt. Dass die vier Mutationen in mGarnet keinen Effekt auf dessen Oligomerisierungszustand haben, konnte anhand einer nativen Gelelektrophorese (Abbildung 3.3) gezeigt werden. Mit seiner ungewöhnlich großen Stokes-Verschiebung von 72 nm eignet sich mGarnet ideal für die Anwendung in der STED-Mikroskopie mit Anregung bei 640 nm und Abregung bei 780 nm. Obwohl an der langwelligsten Flanke des Spektrums angeregt wird, wird aufgrund der großen Stokes-Verschiebung ein Großteil der emittierten Photonen detektiert (Abbildung 5.15). Außerdem ist durch den hohen Extinktionskoeffizienten von $95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und das breite Absorptionsspektrum auch die Anregung rund 40 nm vom Maximum entfernt noch sehr effektiv. Der hohe Extinktionskoeffizient sorgt auch dafür, dass trotz einer Quantenausbeute von nur 9,1% die relative molekulare Helligkeit noch 22% von der Helligkeit von mRuby beträgt. Damit ist mGarnet heller als andere RFPs mit Emissionsmaxima über 650 nm wie z.B. TagRFP657^[128] (9%) oder eqFP670^[127] (11%). Die niedrige Quantenausbeute ist typisch für fern-rote FPs mit Emission über 640 nm.^[136] Das erweiterte π -Elektronensystem ist nicht so fest im Proteingerüst verankert wie in GFPs oder YFPs, wodurch eine größere Dynamik im System entsteht. Der Chromophor kann sich aus der planaren Ebene herausdrehen, was die Quantenausbeute verringert.^[25] Außerdem werden nicht-radiative Abregungsprozesse begünstigt, was sich dann gleichzeitig auch in der geringen Fluoreszenzlebensdauer von nur 0,82 ns widerspiegelt.

Unmurierte und rote protonierte Chromophorzustände, die in der Absorption zu sehen sind, sind nicht fluoreszent und stören daher nicht in Fluoreszenzmikroskopieexperimenten. So wären z.B. auch Mehrfarbenexperimente mit mGarnet als Markerprotein möglich. Der pK_s von mGarnet liegt mit einem Wert von 7,4 höher als der der meisten anderen FPs. Dies bedeutet, dass bei einem pH-Wert von 7,4 nur die Hälfte der Chromophore in deprotonierter Form vorliegen. Die Emissionsspektren bei verschiedenen pH-Werten zeigen, dass bei einem pH von 6,8 die halbmaximale und bei pH 8,0 die maximale Fluoreszenzintensität erreicht ist. Der Grund für die Abweichung im pH-abhängigen Verhalten von Absorption und Emission liegt an der pH-Abhängigkeit der Quantenausbeute. Der pH-Wert des Cytosols liegt je nach Zelltyp zwischen 6,8 und

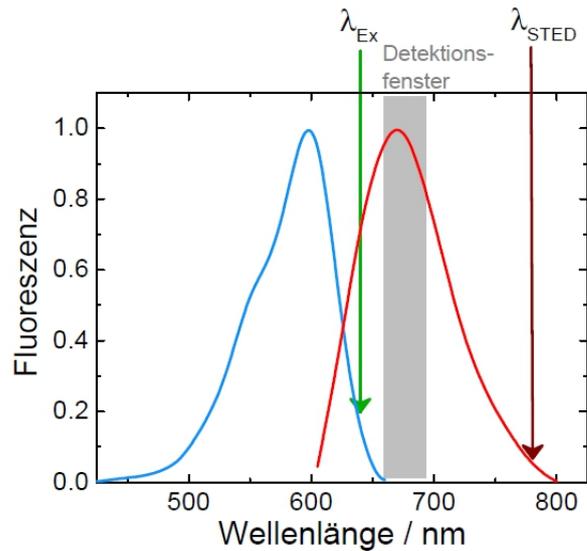


Abbildung 5.15: Spektroskopische Eigenschaften von mGarnet mit Anregungs-, Abregungs- und Detektionswellenlängen bei der STED-Messung. Der Anregungslaser (grün) regt mit 640 nm an der langwelligen Flanke des Anregungsspektrums (blau) an. Der Abregungslaser (dunkelrot) regt mit 780 nm zur stimulierten Emission an und liegt am langwelligen Rand des Emissionsspektrums (rot). Durch die große Stokes-Verschiebung liegt das Detektionsfenster (grau) genau im Bereich des Emissionsmaximums.

7,3.^[215] Obwohl sich in diesem Bereich weniger als die Hälfte der Chromophore im deprotonierten Zustand befinden, beweisen die Mikroskopiebilder, dass dies kein Problem für die Anwendung in lebenden Zellen darstellt. Die Messung in fixierten Zellen sollte durch die hohe pH-Sensitivität von mGarnet ebenfalls nicht beeinträchtigt werden, da es hierbei problemlos möglich ist, den pH auf einen Wert von 8,0 zu erhöhen.

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommenen konfokalen und hochauflösenden Fluoreszenzbilder wurden in lebenden Zellen gemessen. Für die Anwendung in lebenden Zellen ist mGarnet ein idealer Marker, da durch die Anregung und Emission im fern-roten Spektralbereich die Probe weniger Photoschaden nimmt als z.B. bei der Verwendung von GFP im höher energetischen, grünen Wellenlängenbereich. Die Messung von lebenden Zellen war zum einen von Vorteil in Bezug auf das Photobleichen; die Markerproteine binden nur transient an die jeweilige Struktur, sodass gebleichte Moleküle wegdiffundieren und durch neue ersetzt werden. Zum anderen war es für den Vergleich zwischen Konfokalbild und STED-Bild eine Herausforderung; die Bilder mussten auf einer Zeitskala aufgenommen werden, auf der die Zellen sich möglichst wenig bewegen. Gerade bei den Aktinfilamenten in den Filopodien, die zur Fortbewegung der Zelle dienen und ständig in Bewegung sind,^[216] erwies sich dies als schwierig.

Alle FP Moleküle werden durch Bestrahlung mit Licht früher oder später irreversibel gebleicht. Die Anzahl Photonen, die ein Molekül aussendet, bevor das Photobleichen eintritt, ist ein Maß für die Photostabilität des Proteins. In mGarnet ist die Photostabilität im Vergleich zu mRuby um mehr als ein Drittel niedriger. Die Gründe hierfür sind offensichtlich die durch die Mutationen ausgelösten Umstrukturierungen um den Chromophor. In TagRFP657 konnte die Photostabilität nur durch die Mutation S158T um das Neunfache gesteigert werden.^[135] Dies zeigt die Bedeutung der Aminosäure nahe der Hydroxyphenylgruppe des Chromophors. In mGarnet wurde das Threonin an dieser Position durch Asparagin ersetzt. Möglicherweise hat dies den umgekehrten Effekt wie in TagRFP657. Ein weiterer Faktor, der die Photostabilität beeinflusst ist die Konzentration an molekularem Sauerstoff.^[34,135] Die Rotverschiebung und die geringe Quantenausbeute sind Hinweise darauf, dass in mGarnet die Chromophorumgebung weniger starr ist als in mRuby. Durch die flexiblere Struktur wird dem Sauerstoff möglicherweise der Zugang zum Chromophor erleichtert und das Photobleichen gefördert. Im Vergleich zum ebenfalls in der STED-Mikroskopie verwendete fern-rote FP TagRFP657 sendet mGarnet jedoch 20% mehr Photonen aus, bevor es bleicht. Dadurch eignet es sich besser als Fluoreszenzmarker in der hochauflösenden Mikroskopie. Obwohl mit einer Pixelgröße von 15 – 20 nm eine Überabtastung der Probe vorgenommen wird, d.h., die FP-Moleküle werden einer übermäßig hohen Anzahl an Anregungs-Abregungs-Zyklen ausgesetzt, sind sie trotzdem so photostabil, dass ein helles Fluoreszenzbild aufgenommen werden kann. Verifiziert wurde dies durch die Langzeitmessung im Konfokal- und STED-Modus, bei der gezeigt werden konnte, dass auch nach 40 aufgenommenen STED-Bildern an derselben Stelle innerhalb einer Zelle immer noch genug FP-Moleküle fluoreszent sind, um die gefärbte Struktur abzubilden. Bei der Konfokalmessung, d.h., ohne Verwendung des Abregungslasers, war nach 40 Bildern kaum eine Abnahme der Intensität zu beobachten. Erst nach Einschalten des Abregungslasers beschleunigte sich die Intensitätsabnahme, d.h., die Photobleichrate wird durch den STED-Laser erhöht. Der Grund für das Photobleichen durch STED liegt nicht eindeutig auf der Hand. Allgemein bedeutet Photobleichen, dass ein Fluorophor in einen transienten Dunkelzustand überführt oder irreversibel, z.B. durch einen Bindungsbruch, zerstört wird. Bei den hohen Laserintensitäten des STED-Lasers kann es zur Absorption des ersten angeregten Zustands S_1 und damit zum Übergang in höhere angeregte Zustände S_n ($n > 1$) kommen^[217] oder der Übergang in einen Tripletzustand T_n induziert werden.^[218,219] Die Absorption des angeregten Zustands wird durch langsames Abtasten der Probe begünstigt.^[220–222] Durch die hohen Laserintensitäten des Abregungslasers im nahen Infrarot-Bereich von mehreren GW/cm^2 sind Zwei-Photonen-Prozesse im konfokalen Volumen ebenfalls nicht mehr auszuschließen.^[223–225] Dadurch können photochemische Prozesse induziert werden, die

zu einem irreversiblen Photobleichen des Fluorophors führen. Besonders bei Pulslängen des STED-Lasers von < 150 ps werden Zwei-Photonen-Prozesse wahrscheinlich.^[217] Aus diesem Grund ist STED besonders effektiv bei Pulslängen zwischen 150 ps und etwa der halben Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors. Trotz der hohen Laserintensitäten des Abregungslasers sind die Strukturen auch nach 40 aufgenommenen Bildern noch gut zu erkennen. Grund hierfür ist die Tatsache, dass in lebenden Zellen ein dynamisches Gleichgewicht zwischen an Tubulin gebundenen und in der Zelle frei diffundierenden mGarnet-RITA-Molekülen besteht. Dies bedeutet, dass FP-Moleküle, die schon gebleicht wurden, durch neue Moleküle aus der Zelle ersetzt werden. Unter den hier verwendeten Bedingungen eignet sich mGarnet als Marker für Langzeitmessungen wie z.B. die Verfolgung von Bewegungen in lebenden Zellen.

Es konnte gezeigt werden, dass mGarnet gegenüber anderen fern-roten FPs signifikante Vorteile in Bezug auf Wellenlänge oder Photostabilität aufweist und sich ideal als Fusionsmarker in der Konfokal- bzw. STED-Mikroskopie mit fern-roter Anregung und Detektion eignet.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit mGarnet ein FP mit fern-roter Absorption und Emission entwickelt werden. Als Schlüsselpositionen erwiesen sich dabei die Aminosäuren 67, 158, 174 und 197. Es wurden allerdings nur einige Kombinationen von Aminosäuren an diesen vier Positionen getestet. Da es sich insgesamt um mehr als 130000 Möglichkeiten handelt, besteht gerade in diesem Bereich noch Potential. So könnten z.B. Kombinationen mit Alanin oder Asparagin an Position 197 ausprobiert werden. Dabei sollte der Fokus weniger auf eine weitere Rotverschiebung gelegt werden, sondern vielmehr auf die Senkung der pH-Sensitivität oder Steigerung der Quantenausbeute abzielen. Da mGarnet zum jetzigen Zeitpunkt das monomere FP mit dem zweitrötesten Emissionsmaximum darstellt, wobei TagRFP675 nur 5 nm weiter rotverschoben ist, scheint es, als ob in diesem Bereich die obere Grenze der Emission für die FPs der GFP-Familie erreicht ist. Die geringe Quantenausbeute ist zwar typisch für RFPs mit Emissionsmaximum über 650 nm, im Falle von mNeptune^[194] liegt sie jedoch doppelt so hoch wie die von mGarnet, sodass hier durchaus Verbesserungspotential besteht. Das größte Potential besteht jedoch in der Absenkung der pH-Sensitivität, die in mGarnet außergewöhnlich hoch ist im Vergleich zu anderen RFPs, insbesondere zum Ausgangsprotein mRuby. Andererseits konnte in den Zellexperimenten gezeigt werden, dass der hohe pK_s des Chromophors in mGarnet kein Problem für fluoreszenzmikroskopische Untersuchung darstellt. Die hohe pH-Sensitivität könnte sogar ausgenutzt werden, um mGarnet als intrazellulären pH-Indikator zu verwenden. Dies funktioniert dann, wenn der pH-Wert der Umgebung in der Nähe des pK_s des Proteins liegt.^[226] Außerdem könnte die Bewegung eines Fusionspartners zwischen Kompartimenten mit unterschiedlichem pH-Wert innerhalb einer Zelle verfolgt werden.

Da mGarnet schon als fluoreszenter Marker in Zellexperimenten etabliert werden konnte, sollte neben der Verbesserung der Eigenschaften der Fokus vor allem auf der Anwendung als Fusionsmarker liegen. Es konnte in Photobleichexperimenten gezeigt werden, dass sich mGarnet für Langzeitmessungen eignet. So könnte es z.B. als Marker in *tracking*-Experimenten in lebenden Zellen verwendet werden. Außerdem ist es so möglich, mGarnet nicht nur als Marker in 2D-STED-Experimenten zu verwenden, sondern

auch 3D-STED-Bilder von Strukturen aufzunehmen, die mit mGarnet markiert wurden. Hierfür ist es notwendig, dass das FP-Molekül photostabil genug ist, um eine Vielzahl von Anregungs- und Abregungszyklen durchlaufen zu können. Aufgrund der großen Rotverschiebung in den fern-roten Bereich kann mGarnet in Mehrfarbenexperimenten in Kombination mit z.B. GFPs, YFPs und orangeFPs eingesetzt werden. Ebenso eröffnet mGarnet neue Möglichkeiten als FRET-Partner, neben den standardmäßig verwendeten CFP/YFP-FRET-Paaren.^[55,227] mGarnet kann als Akzeptor mit z.B. mOrange^[82] oder dtTomato^[73] als Donor kombiniert werden.

Insgesamt betrachtet überzeugt mGarnet als fern-rot fluoreszenter Marker in der hochauflösenden Mikroskopie. Es konnte ein Kompromiss zwischen Rotverschiebung, Quantenausbeute, Photostabilität und pH-Sensitivität gefunden werden, der eine Vielzahl neuer Anwendungsmöglichkeiten eröffnet. Besonders interessant ist mGarnet für die Verwendung in Experimenten an lebenden Zellen.

7 Zusammenfassung

Fluoreszierende Proteine werden als Fusionspartner für die Markierung von zellulären Strukturen eingesetzt, um diese unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Dabei eignen sich vor allem fern-rote FPs für Experimente in lebenden Zellen, da das rote Anregungslicht weniger phototoxisch für die Zellen ist. Außerdem ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis besser als mit z.B. GFPs, da das rote Emissionslicht weniger vom Gewebe absorbiert und gestreut wird und sich gut von der grünen Autofluoreszenz der Zellen unterscheidet.^[123] Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer, verbesserter fern-roter FPs ein wichtiges Gebiet der Forschung. Fern-rote FPs können aus bereits bekannten roten FPs durch verschiedene Strategien entwickelt werden. Eine Strategie ist die zufallsgerichtete Mutagenese mit anschließender Selektion mittels Durchflusszytometrie.^[73,228] Beim rationalen Proteindesign hingegen werden zielgerichtet einzelne Aminosäuren durch Punktmutation ausgetauscht.^[229]

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des rationalen Proteindesigns aus dem rot fluoreszierenden Protein mRuby die fern-rote Variante mGarnet mit Absorptions- und Emissionsmaxima bei 598 nm und 670 nm entwickelt. mGarnet enthält die vier Punktmutationen R67K, T158N, F174L und H197R. Durch die Mutation T158N wurde der Chromophor aus der *trans*-Konformation in die *cis*-Konformation gebracht, was eine Rotverschiebung von Absorption und Emission um ~20 nm bewirkte. Die zusätzlichen Mutationen R67K und H197R führten zu einer weiteren Rotverschiebung von ~20 nm in der Absorption und ~40 nm in der Emission. Damit weist mGarnet eine sehr große Stokes-Verschiebung von 72 nm auf. Durch die Mutation F174L konnte sowohl die Chromophormaturierung verbessert als auch der pK_s gesenkt werden. mGarnet ist wie mRuby ein Monomer. Der Chromophor besitzt eine Maturierungshalbwertszeit von 112 min bei 37°C und einen pK_s von 7,4. Mit einer Quantenausbeute von 9% und einem Extinktionskoeffizienten von $95000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ hat mGarnet eine relative Helligkeit von 22% im Vergleich zu mRuby. Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt 0,82 ns. Im Einzelmolekülbleichexperiment emittierte mGarnet 20% mehr Photonen als das zum Vergleich gemessene TagRFP657. COS-7-Zellen wurden mit fünf verschiedenen mGarnet-Fusionskonstrukten (mGarnet-RITA, LifeAct-mGarnet, α -actinin-mGarnet, mito-mGarnet und Histon-2B-mGarnet)

transfiziert. Es wurden Bilder der markierten Strukturen in lebenden Zellen im Konfokalmodus und unter STED-Bedingungen aufgenommen. In allen Fällen zeigten die STED-Bilder eine Auflösungsverbesserung im Vergleich zum jeweiligen Konfokalbild. Im Falle der mit mGarnet-RITA markierten Mikrotubuli konnten Auflösungen von 71 nm im STED-Bild und 330 nm im Konfokalbild erreicht werden, was einer etwa sechsfachen Auflösungsverbesserung entspricht. Des Weiteren wurden nacheinander 200 Bilder jeweils im Konfokal- und im STED-Modus an einer Stelle in mit mGarnet-RITA exprimierenden COS-7-Zellen aufgenommen. Während im Konfokalmodus die Intensität erst nach 200 Bildern auf 50% abfiel, war dies im STED-Modus schon nach 40 Bildern der Fall. Trotzdem waren auch nach 40 aufgenommenen STED-Bildern die Mikrotubulinfilamente klar erkennbar und es konnten weiterhin Auflösungen von 70 – 90 nm erreicht werden. All diese Experimente zeigen, dass sich mGarnet als fern-rot fluoreszenter Marker für die Messung an lebenden Zellen insbesondere mit der hochauflösenden STED-Mikroskopie eignet.

Abkürzungsverzeichnis

APD	Avalanche-Photodiode
BFP	blau fluoreszierendes Protein
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DYT	<i>double yeast tryptone</i>
ESPT	<i>excited state proton transfer</i>
FP	fluoreszierendes Protein
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
LSS	<i>large Stokes-Shift</i>
NA	numerische Apertur
NirFP	nah-infrarotes fluoreszierendes Protein
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PSF	Punktspreizfunktion
RITA	<i>RBP-J interacting and tubulin associated</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
SLM	<i>spatial light modulator</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow</i> fluoreszierendes Protein

Literaturverzeichnis

- [1] X. S. Xie, P. J. Choi, G.-W. Li, N. K. Lee und G. Lia, Single-Molecule Approach to Molecular Biology in Living Bacterial Cells, *Annu. Rev. Biophys.* **37** (2008), 417–444.
- [2] R. Hoffman, In vivo imaging revolution made by fluorescent proteins, in *Series in Cellular and Clinical Imaging*, CRC Press (2014), 309–323.
- [3] S. Gayda, P. Hedde, K. Nienhaus und G. Nienhaus, Probes for Nanoscopy: Fluorescent Proteins, in P. Tinnefeld, C. Eggeling und S. W. Hell, (Hrsg.), *Springer Series on Fluorescence*, Springer Berlin Heidelberg (2015), 111–158.
- [4] T. Müller, C. Schumann und A. Kraegeloh, STED Microscopy and its Applications: New Insights into Cellular Processes on the Nanoscale, *Chem. Phys. Chem.* **13** (2012), 1986–2000.
- [5] K. Nienhaus und G. Ulrich Nienhaus, Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution, *Chem. Soc. Rev.* **43** (2014), 1088–1106.
- [6] J. Wiedenmann und G. Nienhaus, Red fluorescent proteins, in *Series in Cellular and Clinical Imaging*, CRC Press (2014), 97–122.
- [7] J. Chu, Y. Xing und M. Lin, Far-red and near-infrared fluorescent proteins, in *Series in Cellular and Clinical Imaging*, CRC Press (2014), 157–175.
- [8] S. Kredel, F. Oswald, K. Nienhaus, K. Deuschle, C. Röcker, M. Wolff, R. Heilker, G. U. Nienhaus und J. Wiedenmann, mRuby, a Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Labeling of Subcellular Structures, *PLoS ONE* **4** (2009), e4391.
- [9] O. Shimomura, F. Johnson und Y. Saiga, Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from Luminous Hydromedusan, Aequorea, *J. Cell. Comp. Physiol.* **59** (1962), 223–239.
- [10] O. Shimomura, Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein, *FEBS Lett.* **104** (1979), 220–222.

- [11] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast und M. J. Cormier, Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene* **111** (1992), 229–233.
- [12] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward und D. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* **263** (1994), 802–805.
- [13] R. Heim, A. B. Cubitt und R. Y. Tsien, Improved green fluorescence, *Nature* **373** (1995), 663–664.
- [14] A. Cubitt, R. Heim, S. Adams, A. Boyd, L. Gross und R. Tsien, Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins, *Trends Biochem. Sci.* **20** (1995), 448–455.
- [15] R. Heim und R. Y. Tsien, Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Biol.* **6** (1996), 178–182.
- [16] G. Zhang, V. Gurtu und S. R. Kain, An Enhanced Green Fluorescent Protein Allows Sensitive Detection of Gene Transfer in Mammalian Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227** (1996), 707–711.
- [17] R. Tsien, The green fluorescent protein, *Annu. Rev. Biochem.* **67** (1998), 509–544.
- [18] A. Cramer, E. A. Whitehorn, E. Tate und W. P. Stemmer, Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling, *Nat. Biotech.* **14** (1996), 315–319.
- [19] R. Y. Tsien, Constructing and Exploiting the Fluorescent Protein Paintbox (Nobel Lecture), *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (2009), 5612–5626.
- [20] G. U. Nienhaus, The Green Fluorescent Protein: A Key Tool to Study Chemical Processes in Living Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008), 8992–8994.
- [21] S. H. Bokman und W. W. Ward, Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101** (1981), 1372–1380.
- [22] N. C. Shaner, G. H. Patterson und M. W. Davidson, Advances in fluorescent protein technology, *J. Cell Sci.* **120** (2007), 4247–4260.
- [23] D. M. Chudakov, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, *Trends Biotechnol.* **23** (2005), 605–613.
- [24] N. C. Shaner, P. A. Steinbach und R. Y. Tsien, A guide to choosing fluorescent proteins, *Nat. Meth.* **2** (2005), 905–909.

- [25] V. V. Verkhusha und K. A. Lukyanov, The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins, *Nat. Biotech.* **22** (2004), 289–296.
- [26] X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach und R. Y. Tsien, Mammalian Expression of Infrared Fluorescent Proteins Engineered from a Bacterial Phytochrome, *Science* **324** (2009), 804–807.
- [27] G. S. Filonov, K. D. Piatkevich, L.-M. Ting, J. Zhang, K. Kim und V. V. Verkhusha, Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging, *Nat. Biotech.* **29** (2011), 757–761.
- [28] D. M. Chudakov, M. V. Matz, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues, *Physiol. Rev.* **90** (2010), 1103–1163.
- [29] D. A. Shagin, E. V. Barsova, Y. G. Yanushevich, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, Y. A. Labas, T. N. Semenova, J. A. Ugalde, A. Meyers, J. M. Nunez, E. A. Widder, S. A. Lukyanov und M. V. Matz, GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity, *Mol. Biol. Evol.* **21** (2004), 841–850.
- [30] D. D. Deheyn, K. Kubokawa, J. K. McCarthy, A. Murakami, M. Porrachia, G. W. Rouse und N. D. Holland, Endogenous Green Fluorescent Protein (GFP) in Amphioxus, *Biol. Bull.* **213** (2007), 95–100.
- [31] D. Schlichter, H. Fricke und W. Weber, Light harvesting by wavelength transformation in a symbiotic coral of the Red Sea twilight zone, *Mar. Biol.* **91** (1986), 403–407.
- [32] A. Salih, A. Larkum, G. Cox, M. Kuhl und O. Hoegh-Guldberg, Fluorescent pigments in corals are photoprotective, *Nature* **408** (2000), 850–853.
- [33] N. Agmon, Proton Pathways in Green Fluorescence Protein, *Biophys. J.* **88** (2005), 2452–2461.
- [34] A. M. Bogdanov, A. S. Mishin, I. V. Yampolsky, V. V. Belousov, D. M. Chudakov, F. V. Subach, V. V. Verkhusha, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, Green fluorescent proteins are light-induced electron donors, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009), 459–461.
- [35] C. V. Palmer, C. K. Modi und L. D. Mydlarz, Coral Fluorescent Proteins as Antioxidants, *PLoS ONE* **4** (2009), e7298.

- [36] F. Bou-Abdallah, N. D. Chasteen und M. P. Lesser, Quenching of superoxide radicals by green fluorescent protein, *Biochim. Biophys. Acta* **1760** (2006), 1690–1695.
- [37] M. Zimmer, Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior, *Chem. Rev.* **102** (2002), 759–782.
- [38] K. D. Piatkevich, E. N. Efremenko, V. V. Verkhusha und S. D. Varfolomeev, Red fluorescent proteins and their properties, *Russ. Chem. Rev.* **79** (2010), 243–258.
- [39] M. Wall, M. Socolich und R. Ranganathan, The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed, *Nat. Struct. Biol.* **7** (2000), 1133–1138.
- [40] D. Yarbrough, R. Wachter, K. Kallio, M. Matz und S. Remington, Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-angstrom resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2001), 462–467.
- [41] R. Campbell, O. Tour, A. Palmer, P. Steinbach, G. Baird, D. Zacharias und R. Tsien, A monomeric red fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002), 7877–7882.
- [42] S. Habuchi, H. Tsutsui, A. B. Kochaniak, A. Miyawaki und A. M. van Oijen, mKik-GR, a Monomeric Photoswitchable Fluorescent Protein, *PLoS ONE* **3** (2008), e3944.
- [43] J. Wiedenmann, A. Schenk, C. Röcker, A. Girod, K.-D. Spindler und G. U. Nienhaus, A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (2002), 11646–11651.
- [44] S. Kredel, K. Nienhaus, F. Oswald, M. Wolff, S. Ivanchenko, F. Cymer, A. Jeromin, F. J. Michel, K.-D. Spindler, R. Heilker, G. U. Nienhaus und J. Wiedenmann, Optimized and Far-Red-Emitting Variants of Fluorescent Protein eqFP611, *Chem. Biol.* **15** (2008), 224–233.
- [45] J. Fuchs, S. Böhme, F. Oswald, P. N. Hedde, M. Krause, J. Wiedenmann und G. U. Nienhaus, A photoactivatable marker protein for pulse-chase imaging with superresolution, *Nat. Meth.* **8** (2010), 627–630.
- [46] A. Miyawaki, T. Nagai und H. Mizuno, Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7** (2003), 557–562.

- [47] O. V. Stepanenko, V. V. Verkhusha, M. M. Shavlovsky, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky und K. K. Turoverov, Understanding the role of Arg96 in structure and stability of green fluorescent protein, *Proteins* **73** (2008), 539–551.
- [48] N. P. Lemay, A. L. Morgan, E. J. Archer, L. A. Dickson, C. M. Megley und M. Zimmer, The role of the tight-turn, broken hydrogen bonding, Glu222 and Arg96 in the post-translational green fluorescent protein chromophore formation, *Chem. Phys.* **348** (2008), 152–160.
- [49] T. I. Wood, D. P. Barondeau, C. Hitomi, C. J. Kassmann, J. A. Tainer und E. D. Getzoff, Defining the Role of Arginine 96 in Green Fluorescent Protein Fluorophore Biosynthesis, *Biochemistry* **44** (2005), 16211–16220.
- [50] J. A. Sniegowski, J. W. Lappe, H. N. Patel, H. A. Huffman und R. M. Wachter, Base Catalysis of Chromophore Formation in Arg96 and Glu222 Variants of Green Fluorescent Protein, *J. Biol. Chem.* **280** (2005), 26248–26255.
- [51] R. M. Wachter, Chromogenic Cross-Link Formation in Green Fluorescent Protein, *Acc. Chem. Res.* **40** (2007), 120–127.
- [52] D. P. Barondeau, C. D. Putnam, C. J. Kassmann, J. A. Tainer und E. D. Getzoff, Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate structures, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (2003), 12111–12116.
- [53] N. G. Gurskaya, A. F. Fradkov, N. I. Pounkova, D. B. Staroverov, M. E. Bulina, Y. G. Yanushevich, Y. A. Labas, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants., *Biochem. J.* **373** (2003), 403–408.
- [54] R. M. Wachter, B. A. King, R. Heim, K. Kallio, R. Y. Tsien, S. G. Boxer und S. J. Remington, Crystal Structure and Photodynamic Behavior of the Blue Emission Variant Y66H/Y145F of Green Fluorescent Protein, *Biochemistry* **36** (1997), 9759–9765.
- [55] A. W. Nguyen und P. S. Daugherty, Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET, *Nat. Biotech.* **23** (2005), 355–360.
- [56] M. A. Rizzo, G. H. Springer, B. Granada und D. W. Piston, An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET, *Nat. Biotech.* **22** (2004), 445–449.

- [57] R. Heim, D. Prasher und R. Tsien, Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (1994), 12501–12504.
- [58] M. A. Mena, T. P. Treynor, S. L. Mayo und P. S. Daugherty, Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library, *Nat. Biotech.* **24** (2006), 1569–1571.
- [59] G. Patterson, S. Knobel, W. Sharif, S. Kain und D. Piston, Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy, *Biophys. J.* **73** (1997), 2782–2790.
- [60] R. M. Wachter, M.-A. Elsliger, K. Kallio, G. T. Hanson und S. J. Remington, Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein, *Structure* **6** (1998), 1267–1277.
- [61] M. Ormo, A. Cubitt, K. Kallio, L. Gross, R. Tsien und S. Remington, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science* **273** (1996), 1392–1395.
- [62] G. Patterson, R. N. Day und D. Piston, Fluorescent protein spectra, *J. Cell Sci.* **114** (2001), 837–838.
- [63] A. S. Mishin, F. V. Subach, I. V. Yampolsky, W. King, K. A. Lukyanov und V. V. Verkhusha, The First Mutant of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein That Forms a Red Chromophore, *Biochemistry* **47** (2008), 4666–4673.
- [64] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov und S. A. Lukyanov, Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species, *Nat. Biotech.* **17** (1999), 969–973.
- [65] G. S. Baird, D. A. Zacharias und R. Y. Tsien, Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (2000), 11984–11989.
- [66] P. V. Vrzheschch, N. A. Akovbian, S. D. Varfolomeyev und V. V. Verkhusha, Denaturation and partial renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions, *FEBS Lett.* **487** (2000), 203–208.
- [67] J. Wiedenmann, B. Vallone, F. Renzi, K. Nienhaus, S. Ivanchenko, C. Röcker und G. U. Nienhaus, Red fluorescent protein eqFP611 and its genetically engineered dimeric variants, *J. Biomed. Opt.* **10** (2005), 014003–0140037.

- [68] Y. G. Yanushevich, D. B. Staroverov, A. P. Savitsky, A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. E. Bulina, K. A. Lukyanov und S. A. Lukyanov, A strategy for the generation of non-aggregating mutants of Anthozoa fluorescent proteins, *FEBS Lett.* **511** (2002), 11–14.
- [69] M. W. Davidson und R. E. Campbell, Engineered fluorescent proteins: innovations and applications, *Nat. Meth.* **6** (2009), 713–717.
- [70] A. F. Fradkov, V. V. Verkhusha, D. B. Staroverov, M. E. Bulina, Y. G. Yanushevich, V. I. Martynov, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, Far-red fluorescent tag for protein labelling., *Biochem. J.* **368** (2002), 17–21.
- [71] T. Kogure, H. Kawano, Y. Abe und A. Miyawaki, Fluorescence imaging using a fluorescent protein with a large Stokes shift, *Methods* **45** (2008), 223–226.
- [72] D. Shcherbo, C. S. Murphy, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, T. V. Chepurnykh, A. S. Shcheglov, V. V. Verkhusha, V. Z. Pletnev, K. L. Hazelwood, P. M. Roche, S. Lukyanov, A. G. Zaraisky, M. W. Davidson und D. M. Chudakov, Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues, *Biochem. J.* **418** (2009), 567–574.
- [73] N. Shaner, R. Campbell, P. Steinbach, B. Giepmans, A. Palmer und R. Tsien, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein, *Nat. Biotech.* **22** (2004), 1567–1572.
- [74] J. Wiedenmann, Anwendung eines orange-fluoreszierenden Proteins und weiterer farbiger Proteine und der zugehörigen Gene aus der Artengruppe *Anemonia* sp. (*sulcata*) Pennant, (Cnidaria, Anthozoa, Actinaria) in Gentechnologie und Molekularbiologie (1999), dE Patent App. DE1,997,118,640.
- [75] H. Mizuno, T. K. Mal, K. I. Tong, R. Ando, T. Furuta, M. Ikura und A. Miyawaki, Photo-Induced Peptide Cleavage in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein, *Mol. Cell* **12** (2003), 1051–1058.
- [76] L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige und R. Y. Tsien, The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (2000), 11990–11995.
- [77] K. A. Lukyanov, A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M. L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan und S. A. Lukyanov, Natural Animal Coloration Can Be Determined by a Nonfluorescent Green Fluorescent Protein Homolog, *J. Biol. Chem.* **275** (2000), 25879–25882.

- [78] M. L. Quillin, D. M. Anstrom, X. Shu, S. O'Leary, K. Kallio, D. M. Chudakov und S. J. Remington, Kindling Fluorescent Protein from *Anemonia sulcata*: Dark-State Structure at 1.38 Å Resolution, *Biochemistry* **44** (2005), 5774–5787.
- [79] I. V. Yampolsky, S. J. Remington, V. I. Martynov, V. K. Potapov, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, Synthesis and Properties of the Chromophore of the asFP595 Chromoprotein from *Anemonia sulcata*, *Biochemistry* **44** (2005), 5788–5793.
- [80] S. J. Remington, R. M. Wachter, D. K. Yarbrough, B. Branchaud, D. C. Anderson, K. Kallio und K. A. Lukyanov, zFP538, a Yellow-Fluorescent Protein from *Zoanthus*, Contains a Novel Three-Ring Chromophore, *Biochemistry* **44** (2004), 202–212.
- [81] X. Shu, N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien und S. J. Remington, Novel Chromophores and Buried Charges Control Color in mFruits, *Biochemistry* **45** (2006), 9639–9647.
- [82] S. Karasawa, T. Araki, T. Nagai, H. Mizuno und A. Miyawaki, Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer, *Biochem. J.* **381** (2004), 307–312.
- [83] A. Kikuchi, E. Fukumura, S. Karasawa, H. Mizuno, A. Miyawaki und Y. Shiro, Structural Characterization of a Thiazoline-Containing Chromophore in an Orange Fluorescent Protein, Monomeric Kusabira Orange, *Biochemistry* **47** (2008), 11573–11580.
- [84] M. C. Y. Chan, S. Karasawa, H. Mizuno, I. Bosanac, D. Ho, G. G. Prive, A. Miyawaki und M. Ikura, Structural Characterization of a Blue Chromoprotein and Its Yellow Mutant from the Sea Anemone *Cnidopus Japonicus*, *J. Biol. Chem.* **281** (2006), 37813–37819.
- [85] V. I. Martynov, B. I. Maksimov, N. Y. Martynova, A. A. Pakhomov, N. G. Gurskaya und S. A. Lukyanov, A Purple-blue Chromoprotein from *Goniopora tenuidens* Belongs to the DsRed Subfamily of GFP-like Proteins, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), 46288–46292.
- [86] M. Prescott, M. Ling, T. Beddoe, A. J. Oakley, S. Dove, O. Hoegh-Guldberg, R. J. Devenish und J. Rossjohn, The 2.2 Å Crystal Structure of a Pocilloporin Pigment Reveals a Nonplanar Chromophore Conformation, *Structure* **11** (2003), 275–284.

- [87] A. A. Pakhomov und V. I. Martynov, Chromophore Aspartate Oxidation-Decarboxylation in the Green-to-Red Conversion of a Fluorescent Protein from *Zoanthus* sp. 2, *Biochemistry* **46** (2007), 11528–11535.
- [88] A. Miyawaki, D. M. Shcherbakova und V. V. Verkhusha, Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22** (2012), 679–688.
- [89] X. He, A. F. Bell und P. J. Tonge, Synthesis and Spectroscopic Studies of Model Red Fluorescent Protein Chromophores, *Org. Lett.* **4** (2002), 1523–1526.
- [90] E. M. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo, M. E. Bulina, A. S. Shcheglov, A. F. Fradkov, A. Gaintzeva, K. A. Lukyanov, S. Lukyanov, T. W. J. Gadella und D. M. Chudakov, Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime, *Nat. Meth.* **4** (2007), 555–557.
- [91] R. M. Wachter, J. L. Watkins und H. Kim, Mechanistic Diversity of Red Fluorescence Acquisition by GFP-like Proteins, *Biochemistry* **49** (2010), 7417–7427.
- [92] V. V. Verkhusha, D. M. Chudakov, N. G. Gurskaya, S. Lukyanov und K. A. Lukyanov, Common Pathway for the Red Chromophore Formation in Fluorescent Proteins and Chromoproteins, *Chem. Biol.* **11** (2004), 845–854.
- [93] F. V. Subach und V. V. Verkhusha, Chromophore Transformations in Red Fluorescent Proteins, *Chem. Rev.* **112** (2012), 4308–4327.
- [94] R. L. Strack, D. E. Strongin, L. Mets, B. S. Glick und R. J. Keenan, Chromophore Formation in DsRed Occurs by a Branched Pathway, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010), 8496–8505.
- [95] S. Pletnev, F. V. Subach, Z. Dauter, A. Wlodawer und V. V. Verkhusha, Understanding Blue-to-Red Conversion in Monomeric Fluorescent Timers and Hydrolytic Degradation of Their Chromophores, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010), 2243–2253.
- [96] S. J. Remington, Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16** (2006), 714–721.
- [97] M. Cotlet, J. Hofkens, S. Habuchi, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Michiels, J. Vanderleyden und F. C. De Schryver, Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98** (2001), 14398–14403.

- [98] F. V. Subach, O. M. Subach, I. S. Gundorov, K. S. Morozova, K. D. Piatkevich, A. M. Cuervo und V. V. Verkhusha, Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking, *Nat. Chem. Biol.* **5** (2009), 118–126.
- [99] O. M. Subach, V. N. Malashkevich, W. D. Zencheck, K. S. Morozova, K. D. Piatkevich, S. C. Almo und V. V. Verkhusha, Structural Characterization of Acylimine-Containing Blue and Red Chromophores in mTagBFP and TagRFP Fluorescent Proteins, *Chem. Biol.* **17** (2010), 333–341.
- [100] N. Pletneva, V. Pletnev, T. Tikhonova, A. A. Pakhomov, V. Popov, V. I. Martynov, A. Wlodawer, Z. Dauter und S. Pletnev, Refined crystal structures of red and green fluorescent proteins from the button polyp *Zoanthus*, *Acta Cryst. D* **63** (2007), 1082–1093.
- [101] J. Petersen, P. Wilmann, T. Beddoe, A. Oakley, R. Devenish, M. Prescott und J. Rossjohn, The 2.0-angstrom crystal structure of eqFP611, a far red fluorescent protein from the sea anemone *Entacmaea quadricolor*, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), 44626–44631.
- [102] K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov und V. V. Verkhusha, Photoactivatable fluorescent proteins, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6** (2005), 885–890.
- [103] J. N. Henderson, H.-w. Ai, R. E. Campbell und S. J. Remington, Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007), 6672–6677.
- [104] A. Schenk, S. Ivanchenko, C. Röcker, J. Wiedenmann und G. U. Nienhaus, Photo-dynamics of Red Fluorescent Proteins Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biophys. J.* **86** (2004), 384–394.
- [105] K. Nienhaus, B. Vallone, F. Renzi, J. Wiedenmann und G. Nienhaus, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the red fluorescent protein eqFP611, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **59** (2003), 1253–1255.
- [106] K. Nienhaus, H. Nar, R. Heilker, J. Wiedenmann und G. U. Nienhaus, Trans-Cis Isomerization is Responsible for the Red-Shifted Fluorescence in Variants of the Red Fluorescent Protein eqFP611, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008), 12578–12579.
- [107] D. C. Loos, S. Habuchi, C. Flors, J.-I. Hotta, J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus und J. Hofkens, Photoconversion in the Red Fluorescent Protein from the Sea

- Anemone Entacmaea quadricolor: Is Cis-Trans Isomerization Involved?, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006), 6270–6271.
- [108] T. Kogure, S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo und A. Miyawaki, A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Nat. Biotech.* **24** (2006), 577–581.
- [109] J. N. Henderson, R. Gepshtein, J. R. Heenan, K. Kallio, D. Huppert und S. J. Remington, Structure and Mechanism of the Photoactivatable Green Fluorescent Protein, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009), 4176–4177.
- [110] K. D. Piatkevich, V. N. Malashkevich, S. C. Almo und V. V. Verkhusha, Engineering ESPT Pathways Based on Structural Analysis of LSSmKate Red Fluorescent Proteins with Large Stokes Shift, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010), 10762–10770.
- [111] K. D. Piatkevich, J. Hult, O. M. Subach, B. Wu, A. Abdulla, J. E. Segall und V. V. Verkhusha, Monomeric red fluorescent proteins with a large Stokes shift, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010), 5369–5374.
- [112] M. Chatteraj, B. A. King, G. U. Bublitz und S. G. Boxer, Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996), 8362–8367.
- [113] H. Ai, N. C. Shaner, Z. Cheng, R. Y. Tsien und R. E. Campbell, Exploration of New Chromophore Structures Leads to the Identification of Improved Blue Fluorescent Proteins, *Biochemistry* **46** (2007), 5904–5910.
- [114] K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö und S. J. Remington, Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** (1997), 2306–2311.
- [115] G. J. Palm, A. Zdanov, G. A. Gaitanaris, R. Stauber, G. N. Pavlakis und A. Wlodawer, The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **4** (1997), 361–365.
- [116] X. Shu, P. Leiderman, R. Gepshtein, N. R. Smith, K. Kallio, D. Huppert und S. J. Remington, An alternative excited-state proton transfer pathway in green fluorescent protein variant S205V, *Protein Sci.* **16** (2007), 2703–2710.

- [117] S. Violot, P. Carpentier, L. Blanchoin und D. Bourgeois, Reverse pH-Dependence of Chromophore Protonation Explains the Large Stokes Shift of the Red Fluorescent Protein mKeima, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009), 10356–10357.
- [118] X. Shi, P. Abbyad, X. Shu, K. Kallio, P. Kanchanawong, W. Childs, S. J. Remington und S. G. Boxer, Ultrafast Excited-State Dynamics in the Green Fluorescent Protein Variant S65T/H148D. 2. Unusual Photophysical Properties, *Biochemistry* **46** (2007), 12014–12025.
- [119] X. Shu, K. Kallio, X. Shi, P. Abbyad, P. Kanchanawong, W. Childs, S. G. Boxer und S. J. Remington, Ultrafast Excited-State Dynamics in the Green Fluorescent Protein Variant S65T/H148D. 1. Mutagenesis and Structural Studies, *Biochemistry* **46** (2007), 12005–12013.
- [120] D. Stoner-Ma, A. A. Jaye, K. L. Ronayne, J. Nappa, S. R. Meech und P. J. Tonge, An Alternate Proton Acceptor for Excited-State Proton Transfer in Green Fluorescent Protein: Rewiring GFP, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008), 1227–1235.
- [121] K.-Y. Chen, Y.-M. Cheng, C.-H. Lai, C.-C. Hsu, M.-L. Ho, G.-H. Lee und P.-T. Chou, Ortho Green Fluorescence Protein Synthetic Chromophore; Excited-State Intramolecular Proton Transfer via a Seven-Membered-Ring Hydrogen-Bonding System, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007), 4534–4535.
- [122] K. Nienhaus, F. Renzi, B. Vallone, J. Wiedenmann und G. U. Nienhaus, Chromophore-Protein Interactions in the Anthozoan Green Fluorescent Protein asFP499, *Biophys. J.* **91** (2006), 4210–4220.
- [123] G. U. Nienhaus und J. Wiedenmann, Structure, Dynamics and Optical Properties of Fluorescent Proteins: Perspectives for Marker Development, *Chem. Phys. Chem.* **10** (2009), 1369–1379.
- [124] D. M. Shcherbakova, O. M. Subach und V. V. Verkhusha, Red Fluorescent Proteins: Advanced Imaging Applications and Future Design, *Angew. Chem. Int. Ed.* **51** (2012), 10724–10738.
- [125] A. M. Smith, M. C. Mancini und S. Nie, Bioimaging: Second window for in vivo imaging, *Nat. Nano.* **4** (2009), 710–711.
- [126] N. C. Deliolanis, R. Kasmieh, T. Wurdinger, B. A. Tannous, K. Shah und V. Ntziachristos, Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications, *J. Biomed. Opt.* **13** (2008), 044008–044008–9.

- [127] D. Shcherbo, I. I. Shemiakina, A. V. Ryabova, K. E. Luker, B. T. Schmidt, E. A. Souslova, T. V. Gorodnicheva, L. Strukova, K. M. Shidlovskiy, O. V. Britanova, A. G. Zaraisky, K. A. Lukyanov, V. B. Loschenov, G. D. Luker und D. M. Chudakov, Near-infrared fluorescent proteins, *Nat. Meth.* **7** (2010), 827–829.
- [128] K. S. Morozova, K. D. Piatkevich, T. J. Gould, J. Zhang, J. Bewersdorf und V. Verkhusha, Far-Red Fluorescent Protein Excitable with Red Lasers for Flow Cytometry and Superresolution STED Nanoscopy, *Biophys. J.* **99** (2010), L13–L15.
- [129] S. Hell und J. Wichmann, Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated-Emission - Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy, *Opt. Lett.* **19** (1994), 780–782.
- [130] K. I. Willig, R. R. Kellner, R. Medda, B. Hein, S. Jakobs und S. W. Hell, Nanoscale resolution in GFP-based microscopy, *Nat. Meth.* **3** (2006), 721–723.
- [131] B. O. Leung und K. C. Chou, Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology, *Appl. Spectrosc.* **65** (2011), 967–980.
- [132] B. Hein, K. I. Willig und S. W. Hell, Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105** (2008), 14271–14276.
- [133] H. Tsutsui, S. Karasawa, Y. Okamura und A. Miyawaki, Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins, *Nat. Meth.* **5** (2008), 683–685.
- [134] Y. Sun, C. F. Booker, S. Kumari, R. N. Day, M. Davidson und A. Periasamy, Characterization of an orange acceptor fluorescent protein for sensitized spectral fluorescence resonance energy transfer microscopy using a white-light laser, *J. Biomed. Opt.* **14** (2009), 05400901–05400911.
- [135] N. C. Shaner, M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson und R. Y. Tsien, Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins, *Nat. Meth.* **5** (2008), 545–551.
- [136] P. Dedecker, F. C. De Schryver und J. Hofkens, Fluorescent Proteins: Shine on, You Crazy Diamond, *J. Am. Chem. Soc.* **135** (2013), 2387–2402.
- [137] R. L. Strack, B. Hein, D. Bhattacharyya, S. W. Hell, R. J. Keenan und B. S. Glick, A Rapidly Maturing Far-Red Derivative of DsRed-Express2 for Whole-Cell Labeling, *Biochemistry* **48** (2009), 8279–8281.

- [138] I. Johnson, *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition*, Life Technologies Corporation (2010).
- [139] K. Dean, J. Lubbeck, J. Binder, L. Schwall, R. Jimenez und A. Palmer, Analysis of Red-Fluorescent Proteins Provides Insight into Dark-State Conversion and Photodegradation, *Biophys. J.* **101** (2011), 961–969.
- [140] A. A. Pakhomov und V. I. Martynov, GFP Family: Structural Insights into Spectral Tuning, *Chem. Biol.* **15** (2008), 755–764.
- [141] C. M. Megley, L. A. Dickson, S. L. Maddalo, G. J. Chandler und M. Zimmer, Photophysics and Dihedral Freedom of the Chromophore in Yellow, Blue, and Green Fluorescent Protein, *J. Phys. Chem. B* **113** (2008), 302–308.
- [142] J. Dong, K. M. Solntsev, O. Poizat und L. M. Tolbert, The Meta-Green Fluorescent Protein Chromophore, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007), 10084–10085.
- [143] H. Niwa, S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi und F. I. Tsuji, Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996), 13617–13622.
- [144] T. Nagai, K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba und A. Miyawaki, A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications, *Nat. Biotech.* **20** (2002), 87–90.
- [145] A. G. Evdokimov, M. E. Pokross, N. S. Egorov, A. G. Zarausky, I. V. Yampolsky, E. M. Merzlyak, A. N. Shkoporov, I. Sander, K. A. Lukyanov und D. M. Chudakov, Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein, *EMBO Reports* **7** (2006), 1006–1012.
- [146] A. Terskikh, A. Fradkov, G. Ermakova, A. Zarausky, P. Tan, A. V. Kajava, X. Zhao, S. Lukyanov, M. Matz, S. Kim, I. Weissman und P. Siebert, "Fluorescent Timer": Protein That Changes Color with Time, *Science* **290** (2000), 1585–1588.
- [147] S. Bertera, X. Geng, Z. Tawadrous, R. Bottino, A. Balamurugan, W. A. Rudert, S. Drain, P. and Watkins und T. M, Body window-enabled in vivo multicolor imaging of transplanted mouse islets expressing an insulin-Timer fusion protein, *Biotechniques* **35** (2003), 718–722.
- [148] A. Jimenez-Banzo, X. Ragas, S. Abbruzzetti, C. Viappiani, B. Campanini, C. Flors und S. Nonell, Singlet oxygen photosensitisation by GFP mutants: oxygen accessibility to the chromophore, *Photochem. Photobiol. Sci.* **9** (2010), 1336–1341.

-
- [149] J. Wiedenmann, F. Oswald und G. U. Nienhaus, Fluorescent proteins for live cell imaging: Opportunities, limitations, and challenges, *IUBMB Life* **61** (2009), 1029–1042.
- [150] J. F. W. Herschel, On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless, *Philos. Trans. Roy. Soc. London* **135** (1845), 143–145.
- [151] G. G. Stokes, On the Change of Refrangibility of Light, *Philos. Trans. Roy. Soc. London* **142** (1852), 463–562.
- [152] W. Demtröder, *Experimentalphysik 3 - Atome, Moleküle und Festkörper*, Springer (2010).
- [153] A. Jablonski, Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren, *Zeitschrift für Physik* **94** (1935), 38–46.
- [154] M. Kasha, Characterization of electronic transitions in complex molecules, *Discuss. Faraday Soc.* **9** (1950), 14–19.
- [155] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer (2006).
- [156] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH (1987).
- [157] R. Winter und F. Noll, *Methoden der Biophysikalischen Chemie*, Teubner (1998).
- [158] A. T. R. Williams, S. A. Winfield und J. N. Miller, Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer, *Analyst* **108** (1983), 1067–1071.
- [159] J. T. Wessels, K. Yamauchi, R. M. Hoffman und F. S. Wouters, Advances in cellular, subcellular, and nanoscale imaging in vitro and in vivo, *Cytometry* **77A** (2010), 667–676.
- [160] B. R. Masters, *The Development of Fluorescence Microscopy*, John Wiley & Sons, Ltd (2001).
- [161] J. Pawley, *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*, Springer US (2006).
- [162] J. G. White, W. B. Amos und M. Fordham, An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy., *J. Cell Biol.* **105** (1987), 41–48.
- [163] T. Wilson, C. J. R. Sheppard und K. Laschke, Theory and practice of scanning optical microscopy., *Cryst. Res. Technol.* **20** (1985), 1608–1608.

- [164] E. Abbe, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung, *Arch. Mikroskop. Anat.* **9** (1873), 413–420.
- [165] Rayleigh, XV. On the theory of optical images, with special reference to the microscope, *Philosophical Magazine Series 5* **42** (1896), 167–195.
- [166] D. B. Murphy, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Wiley-Liss, Inc. (2001).
- [167] E. Hecht, *Optics (4th Edition)*, Addison Wesley (2001).
- [168] S. W. Hell, Microscopy and its focal switch, *Nat. Meth.* **6** (2009), 24–32.
- [169] Betzig, Eric and Patterson, George H. and Sougrat, Rachid and Lindwasser, O. Wolf and Olenych, Scott and Bonifacino, Juan S. and Davidson, Michael W. and Lippincott-Schwartz, Jennifer and Hess, Harald F., Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Science* **313** (2006), 1642–1645.
- [170] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schuttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld und M. Sauer, Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008), 6172–6176.
- [171] Rust, Michael J. and Bates, Mark and Zhuang, Xiaowei, Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM), *Nat. Meth.* **3** (2006), 793–795.
- [172] A. Egner, C. Geisler, C. von Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A. C. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schönle und S. W. Hell, Fluorescence Nanoscopy in Whole Cells by Asynchronous Localization of Photoswitching Emitters, *Biophys. J.* **93** (2007), 3285–3290.
- [173] J. Fölling, M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C. A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling und S. W. Hell, Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return, *Nat. Meth.* **5** (2008), 943–945.
- [174] R. Heintzmann, T. Jovin und C. Cremer, Saturated patterned excitation microscopy - a concept for optical resolution improvement, *J. Opt. Soc. Am. A* **19** (2002), 1599–1609.
- [175] M. Gustafsson, Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (2005), 13081–13086.

-
- [176] M. Bossi, V. Belov, S. Polyakova und S. W. Hell, Reversible Red Fluorescent Molecular Switches, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006), 7462–7465.
- [177] M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs und S. W. Hell, Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102** (2005), 17565–17569.
- [178] S. Hell, S. Jakobs und L. Kastrup, *Imaging and writing at the nanoscale with focused visible light through saturable optical transitions*, Band 77, Springer-Verlag (2003).
- [179] S. W. Hell, Strategy for far-field optical imaging and writing without diffraction limit, *Phys. Lett. A* **326** (2004), 140–145.
- [180] S. Hell und M. Kroug, *Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit*, Band 60, Springer-Verlag (1995).
- [181] S. Bretschneider, C. Eggeling und S. W. Hell, Breaking the Diffraction Barrier in Fluorescence Microscopy by Optical Shelving, *Phys. Rev. Lett.* **98** (2007), 218103.
- [182] S. W. Hell, Far-field optical nanoscopy, *Science* **316** (2007), 1153–1158.
- [183] V. Westphal und S. W. Hell, Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope, *Phys. Rev. Lett.* **94** (2005), 143903.
- [184] A. Mendez-Vilas und J. Diaz, *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Formatex (2010).
- [185] D. Wildanger, B. R. Patton, H. Schill, L. Marseglia, J. P. Hadden, S. Knauer, A. Schönle, J. G. Rarity, J. L. O’Brien, S. W. Hell und J. M. Smith, Solid Immersion Facilitates Fluorescence Microscopy with Nanometer Resolution and Sub-Angström Emitter Localization, *Adv. Mater.* **24** (2012), OP309–OP313.
- [186] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner und S. W. Hell, Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97** (2000), 8206–8210.
- [187] V. Westphal, S. O. Rizzoli, M. A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn und S. W. Hell, Video-Rate Far-Field Optical Nanoscopy Dissects Synaptic Vesicle Movement, *Science* **320** (2008), 246–249.
- [188] E. Rittweger, K. Y. Han, S. E. Irvine, C. Eggeling und S. W. Hell, STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution, *Nat. Photon* **3** (2009), 144–147.

- [189] P. N. Hedde, J. Fuchs, F. Oswald, J. Wiedenmann und G. U. Nienhaus, Online image analysis software for photoactivation localization microscopy, *Nat. Meth.* **6** (2009), 689–690.
- [190] Y. Li, Y. Ishitsuka, P. N. Hedde und G. U. Nienhaus, Fast and Efficient Molecule Detection in Localization-Based Super-Resolution Microscopy by Parallel Adaptive Histogram Equalization, *ACS Nano* **7** (2013), 5207–5214.
- [191] P. Abbyad, W. Childs, X. Shi und S. G. Boxer, Dynamic Stokes shift in green fluorescent protein variants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (2007), 20189–20194.
- [192] P. Konold, C. K. Regmi, P. P. Chapagain, B. S. Gerstman und R. Jimenez, Hydrogen Bond Flexibility Correlates with Stokes Shift in mPlum Variants, *J. Phys. Chem. B* **118** (2014), 2940–2948.
- [193] K. D. Piatkevich, V. N. Malashkevich, K. S. Morozova, N. A. Nemkovich, S. C. Almo und V. V. Verkhusha, Extended Stokes Shift in Fluorescent Proteins: Chromophore-Protein Interactions in a Near-Infrared TagRFP675 Variant, *Sci. Rep.* **3** (2013), 184701–184711.
- [194] M. Z. Lin, M. R. McKeown, H.-L. Ng, T. A. Aguilera, N. C. Shaner, R. E. Campbell, S. R. Adams, L. A. Gross, W. Ma, T. Alber und R. Y. Tsien, Autofluorescent Proteins with Excitation in the Optical Window for Intravital Imaging in Mammals, *Chem. Biol.* **16** (2009), 1169–1179.
- [195] R. A. Chica, M. M. Moore, B. D. Allen und S. L. Mayo, Generation of longer emission wavelength red fluorescent proteins using computationally designed libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** (2010), 20257–20262.
- [196] N. V. Pletneva, V. Z. Pletnev, I. I. Shemiakina, D. M. Chudakov, I. Artemyev, A. Wlodawer, Z. Dauter und S. Pletnev, Crystallographic study of red fluorescent protein eqFP578 and its far-red variant Katushka reveals opposite pH-induced isomerization of chromophore, *Protein Sci.* **20** (2011), 1265–1274.
- [197] F. V. Subach, K. D. Piatkevich und V. V. Verkhusha, Directed molecular evolution to design advanced red fluorescent proteins, *Nat. Meth.* **8** (2011), 1019–1026.
- [198] A. Hense, K. Nienhaus und G. U. Nienhaus, Exploring color tuning strategies in red fluorescent proteins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** (2015), 200–212.

- [199] N. Marroquin, *Molekulargenetische Untersuchung des FGF8-Gens bei Patienten mit Erkrankungen aus dem Formenkreis der kongenitalen kranialen Dysinnervationsstörungen (CCDDs)*, GRIN Verlag (2011).
- [200] L. Wang, W. C. Jackson, P. A. Steinbach und R. Y. Tsien, Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101** (2004), 16745–16749.
- [201] J. Akerboom, N. Carreras Calderon, L. Tian, S. Wabnig, M. Prigge, J. Tolö, A. Gordus, M. B. Orger, K. E. Severi, J. J. Macklin, R. Patel, S. R. Pulver, T. J. Wardill, E. Fischer, C. Schüer, T.-W. Chen, K. S. Sarkisyan, J. S. Marvin, C. I. Bargmann, D. S. Kim, S. Kügler, L. Lagnado, P. Hegemann, A. Gottschalk, E. R. Schreiter und L. L. Looger, Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics, *Front. Mol. Neurosci.* **6** (2013), 1–29.
- [202] J. Chu, R. D. Haynes, S. Y. Corbel, P. Li, E. Gonzalez-Gonzalez, J. S. Burg, N. J. Ataie, A. J. Lam, P. J. Cranfill, M. A. Baird, M. W. Davidson, H.-L. Ng, K. C. Garcia, C. H. Contag, K. Shen, H. M. Blau und M. Z. Lin, Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitabile fluorescent protein, *Nat. Meth.* **11** (2014), 572–578.
- [203] D. Shcherbo, E. M. Merzlyak, T. V. Chepurnykh, A. F. Fradkov, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, K. A. Lukyanov, E. A. Bogdanova, A. G. Zaraisky, S. Lukyanov und D. M. Chudakov, Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging, *Nat. Meth.* **4** (2007), 741–746.
- [204] W. W. Ward und S. H. Bokman, Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein, *Biochemistry* **21** (1982), 4535–4540.
- [205] O. Griesbeck, G. S. Baird, R. E. Campbell, D. A. Zacharias und R. Y. Tsien, Reducing the Environmental Sensitivity of Yellow Fluorescent Protein: Mechanism and Applications, *J. Biol. Chem.* **276** (2001), 29188–29194.
- [206] J. Riedl, A. H. Crevenna, K. Kessenbrock, J. H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T. A. Holak, Z. Werb, M. Sixt und R. Wedlich-Soldner, Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin, *Nat. Meth.* **5** (2008), 605–607.
- [207] S. Wacker, C. Alvarado, G. von Wichert, U. Knippschild, J. Wiedenmann, K. Clauß, G. Nienhaus, H. Hameister, B. Baumann, T. Borggreffe, W. Knöchel

- und F. Oswald, RITA, a novel modulator of Notch signalling, acts via nuclear export of RBP-J, *EMBO J.* **30** (2011), 43–56.
- [208] G. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, Sunderland (MA): Sinauer Associates (2000).
- [209] H. Li, D. J. DeRosier, W. V. Nicholson, E. Nogales und K. H. Downing, Microtubule Structure at 8 Å Resolution, *Structure* **10** (2002), 1317–1328.
- [210] J. Hanson und J. Lowy, The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle, *J. Mol. Biol.* **6** (1963), 46–IN5.
- [211] N. A. Campbell und J. B. Reece, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag (2003).
- [212] R. A. Capaldi, Structure and Function of Cytochrome c Oxidase, *Annu. Rev. Biochem.* **59** (1990), 569–596.
- [213] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore und J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company (2000).
- [214] T. J. Collins, M. J. Berridge, P. Lipp und M. D. Bootman, Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells, *EMBO J.* **21** (2002), 1616–1627.
- [215] M. Chesler und K. Kaila, Modulation of pH by neuronal activity, *Trends Neurosci.* **15** (1992), 396–402.
- [216] P. K. Mattila und P. Lappalainen, Filopodia: molecular architecture and cellular functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** (2008), 446–454.
- [217] M. Dyba und S. W. Hell, Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission, *Appl. Opt.* **42** (2003), 5123–5129.
- [218] G. Donnert, C. Eggeling und S. W. Hell, Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation, *Nat. Meth.* **4** (2007), 81–86.
- [219] R. Kasper, B. Harke, C. Forthmann, P. Tinnefeld, S. W. Hell und M. Sauer, Single-Molecule STED Microscopy with Photostable Organic Fluorophores, *Small* **6** (2010), 1379–1384.
- [220] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler und C. A. M. Seidel, Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis, *Anal. Chem.* **70** (1998), 2651–2659.

- [221] C. Ringemann, A. Schönle, A. Giske, C. von Middendorff, S. W. Hell und C. Egge-ling, Enhancing Fluorescence Brightness: Effect of Reverse Intersystem Crossing Studied by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy, *Chem. Phys. Chem* **9** (2008), 612–624.
- [222] J.-I. Hotta, E. Fron, P. Dedecker, K. P. F. Janssen, C. Li, K. Müllen, B. Har-ke, J. Bückers, S. W. Hell und J. Hofkens, Spectroscopic Rationale for Efficient Stimulated-Emission Depletion Microscopy Fluorophores, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (2010), 5021–5023.
- [223] C. Xu und W. W. Webb, Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm, *J. Opt. Soc. Am. B* **13** (1996), 481–491.
- [224] D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup und S. Hell, A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution, *J. Microsc.* **236** (2009), 35–43.
- [225] G. Moneron und S. W. Hell, Two-photon excitation STED microscopy, *Opt. Ex-press* **17** (2009), 14567–14573.
- [226] R. Bizzarri, M. Serresi, S. Luin und F. Beltram, Green fluorescent protein based pH indicators for in vivo use: a review, *Anal. Bioanal. Chem.* **393** (2009), 1107–1122.
- [227] S. Shimozono und A. Miyawaki, Engineering FRET Constructs Using CFP and YFP, in K. F. Sullivan, (Hrsg.), *Fluorescent Proteins*, Band Volume 85, Academic Press (2008), 381–393.
- [228] B. P. Cormack, R. H. Valdivia und S. Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene* **173** (1996), 33–38.
- [229] H. W. Hellinga, Rational protein design: Combining theory and experiment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** (1997), 10015–10017.

Liste der Publikationen

A. Hense, E. Herman, S. Oldemeyer und T. Kottke, Proton Transfer to Flavin Stabilizes the Signaling State of the Blue Light Receptor Plant Cryptochrome, *J. Biol. Chem.* **290**, (2015) 1743–1751.

A. Hense, K. Nienhaus und G.U. Nienhaus, Exploring color tuning strategies in red fluorescent proteins, *Photochem. Photobiol. Sci.* **14** (2015), 200–212.

A. Hense, B. Prunsche, P. Gao, Y. Ishitsuka, K. Nienhaus und G.U. Nienhaus, Monomeric Garnet, a far-red fluorescent protein for live-cell STED imaging, *submitted*.