
Bioorthogonale Tetrazin-Farbstoffe
für die Lebendzell-Markierung und
hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN
DOKTORGRADES DER JULIUS-MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT WÜRZBURG

vorgelegt von

Gerti Beliu

geboren in Tirana (Albanien)

Würzburg, 2019



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ich glaube, es ist alles viel einfacher, als ich dachte.

Andreas Kurz

Zusammenfassung

Der genetische Code beschreibt die Ver- und Entschlüsselung der Erbinformation für das universelle Prinzip der Proteinbiosynthese aus einzelnen Aminosäuren. Durch Erweiterung des genetischen Codes lassen sich unnatürliche Aminosäuren (uAA) mit einzigartigen biophysikalischen Eigenschaften ortsspezifisch in Proteine einführen und ermöglichen die spezifische Manipulation von Proteinen.

Die Click-Reaktion zwischen der unnatürlichen Aminosäure TCO*-Lysin und Tetrazin besitzt eine außergewöhnliche Reaktionskinetik ($\geq 800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) und ermöglicht eine spezifische und bioorthogonale Markierung von Biomolekülen unter physiologischen Bedingungen.

Im Fokus dieser Arbeit stand zunächst die Markierung von Membranrezeptoren durch Click-Chemie in lebenden Zellen sowie die Untersuchung der Wechselwirkung 22 bekannter und neuartiger Tetrazin-Farbstoff-Konjugate. Darüber hinaus wurde die Anwendbarkeit von bioorthogonalen Click-Reaktionen für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Durch Erweiterung des genetischen Codes in Proteine aus der Klasse der ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR), TNF-Rezeptoren oder Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) wurde ortsspezifisch die unnatürliche Aminosäure TCO*-Lysin eingeführt und dadurch die Fluoreszenzmarkierung durch Tetrazin-Farbstoffe ermöglicht. Die direkte chemische Kopplung von TCO an Liganden wie Phalloidin und Docetaxel, welche spezifisch das Aktin-Zytoskelett bzw. Mikrotubuli-Filamente binden können, ermöglichte zudem die Click-Färbungen von fixierten und lebenden Zellen ohne genetische Veränderungen der Zielproteine.

Des Weiteren wurden die spektroskopischen Eigenschaften von 22 Tetrazin-Farbstoffen, verteilt über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich,

untersucht. Ein charakteristisches Kennzeichen der Click-Reaktion mit Tetrazin-Farbstoffen ist dabei ihre Fluorogenität. Das Tetrazin fungiert nicht nur als reaktive Gruppe während der Click-Reaktion mit Alkenen, sondern führt in vielen Tetrazin-Farbstoff-Konjugaten zur Fluoreszenzlöschung. Während bei grün-absorbierenden Farbstoffe vor allem FRET-basierte Lösprozesse dominieren, konnte photoinduzierter Elektronentransfer (PET) vom angeregten Farbstoff zum Tetrazin als Hauptlöschmechanismus bei rot-absorbierenden Oxazin- und Rhodamin-Derivaten identifiziert werden.

Die effiziente und spezifische Markierung aller untersuchten Tetrazin-Farbstoffe ermöglichte die Visualisierung von Aktin-Filamenten, Mikrotubuli und Membranrezeptoren sowohl durch konventionelle Fluoreszenzmikroskopie als auch durch hochauflösende Verfahren, wie z.B. *d*STORM, auf Einzelmolekülebene. Die unterschiedliche Zellpermeabilität von Tetrazin-Farbstoffen kann dabei vorteilhaft für die spezifische intra- und extrazelluläre Markierung von Proteinen in fixierten und lebenden Zellen genutzt werden.

Summary

The genetic code describes the encoding and decoding of genetic information for the universal principle of protein biosynthesis from individual amino acids. By expanding the genetic code, unnatural amino acids (uAA) with unique biophysical properties can be introduced site-specifically into proteins and enable the selective manipulation of proteins.

The click reaction of the unnatural amino acid TCO*-lysine and tetrazine has an extraordinary reaction kinetic ($\geq 800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) enabling the specific and bioorthogonal labeling of biomolecules under physiological conditions.

The main focus of this work was the labeling of membrane receptors by click chemistry in living cells and the investigation of the interaction of 22 known and novel tetrazine dye conjugates. In addition, the applicability of bioorthogonal click reactions for high-resolution fluorescence microscopy was investigated.

For this purpose, the unnatural amino acid TCO*-lysine was introduced site-specifically via genetic code expansion into proteins from the class of ionotropic glutamate receptors (iGluR), TNF receptors or microtubule-associated proteins (MAP), thereby enabling fluorescence labeling with tetrazine dyes. The direct chemical coupling of TCO to ligands such as phalloidin and docetaxel, which can specifically bind the actin cytoskeleton or microtubule filaments, allowed click staining of fixed and living cells without genetic modifications of the target proteins.

Furthermore, the spectroscopic properties of 22 tetrazine dyes spanning the entire visible wavelength range were investigated. A hallmark of the click reaction using tetrazine dyes is their fluorogenicity. Thus, the tetrazine not only functions as a reactive group during the click reaction with alkenes, but also leads to fluorescence quenching in many tetrazine-dye conjugates. While FRET-based quenching processes dominate in green-absorbing dyes, photoinduced electron transfer (PET) from excited dye to tetrazine has been

identified as the main quenching mechanism in red-absorbing oxazine and rhodamine derivatives.

The efficient and specific labeling of all investigated tetrazine dyes facilitates the visualization of actin filaments, microtubules and membrane receptors by conventional fluorescence microscopy as well as by super-resolution microscopy techniques, e.g. *α*STORM, also at single molecule level. The different cell permeability of tetrazine dyes can be used advantageously for the specific intra- and extracellular labeling of proteins in fixed and living cells.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VII
1 Einleitung	1
1.1 Proteinbiosynthese und der genetische Code	1
1.2 Die Erweiterung des genetischen Codes mithilfe von unnatürlichen Aminosäuren	2
1.3 Fluoreszenzmarkierung	4
1.4 Fluoreszenzmikroskopie	6
2 Theorie	10
2.1 Grundlagen der Fluoreszenz	10
2.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe	10
2.1.2 Absorption und Emission	11
2.1.3 Quantenausbeute & Fluoreszenzlebensdauer	13
2.1.4 Fluoreszenzlöschung	15
2.1.5 Energie- und Elektronentransfer	18
2.2 Erkennung und Markierung von Proteinen	20
2.2.1 Immunofluoreszenzmarkierung	20
2.2.2 Fluoreszenzproteine	22
2.2.3 Bioorthogonale Click-Reaktion	23
2.3 Zielproteine	26
2.3.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren	26
2.3.2 Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor 1 (TNFR1)	29
2.3.3 Zytoskelett	31
3 Material und Methoden	36
3.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Puffer	36
3.2 Fluoreszenzfarbstoffe	39
3.3 Zellkultur und Zelllinien	46

3.4	DNA-Proben.....	47
3.5	Standardgeräte	47
3.6	Antikörper und Enzyme	48
3.7	Verwendete Software	49
3.8	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....	49
3.9	Spektroskopische Methoden.....	52
3.10	Methoden zur Fluoreszenzmarkierung	54
3.11	Verwendete Mikroskope.....	56
3.12	Chemische Synthese der TCO- und Tetrazin-Derivate.....	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Spektroskopische Charakteristika von Tetrazin- Farbstoffen.....	59
4.1.1	Absorption und Emission	60
4.1.2	Fluoreszenzlebensdauern von Tet-Farbstoffen.....	70
4.1.3	Fluoreszenzlöschung und Fluoreszenzzunahme	72
4.1.4	Stern-Volmer Analyse	75
4.1.5	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	78
4.2	Visualisierung von Membranrezeptoren	81
4.2.1	Auswahl geeigneter Proteine sowie Click-Stellen.....	81
4.2.2	Click-Mutanten in verschiedenen Systeme	82
4.2.3	Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie	85
4.2.4	Einzelmolekül-Lokalisations-Mikroskopie	91
4.3	Aktin-Färbungen mit phalloidin-TCO	94
4.3.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM)	94
4.3.2	Hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie RCM & SIM...101	
4.3.3	Lokalisationsmikroskopie (δ STORM/PALM).....	104
4.4	Visualisierung von Tubulin-Filamenten	106
4.4.1	Click-Färbung von klickbaren Enscosin (EMTB).....	107
4.4.2	Klickbares Docetaxel (cLSM, RCM, SIM)	110

5	Diskussion und Ausblick.....	112
5.1	Fluoreszenzlöschung von oxazinen und rhodaminen Tetrazin- Farbstoffen	112
5.2	Visualisierung von Membranrezeptoren mit Tetrazin- Farbstoffen	114
5.3	Bioorthogonale Markierung von lebenden Zellen	118
5.4	Anwendbarkeit von Tetrazin-Farbstoffen in der Fluoreszenzmikroskopie	121
5.5	Fazit & Ausblick	122
5.5.1	Fazit.....	122
5.5.2	Ausblick	124
6	Literaturverzeichnis.....	130
7	Abkürzungsverzeichnis	138
	Anhang.....	XII
	Publikationsliste	XIX
	Danksagung	XX
	Eidesstattliche Erklärung.....	XXIII
	Lebenslauf	XXIV

1 Einleitung

1.1 Proteinbiosynthese und der genetische Code

Die genetische Information aller Lebewesen wird durch Nukleinsäuren (meist Desoxyribonukleinsäuren, DNS bzw. DNA) gespeichert und weitergegeben. Ein Abschnitt der DNA, welcher für ein Polypeptid kodiert, wird als Gen bezeichnet (Crick et al., 1961). Soll ein Gen nun übersetzt und zur Synthese einer Aminosäurekette bzw. eines Proteins führen, sind zwei Prozesse maßgeblich von Bedeutung: die Transkription und Translation. Bei der Transkription wird die im Zellkern gespeicherte DNA zunächst in eine Boten-RNA (engl. messenger RNA, mRNA) umgesetzt bzw. transkribiert. Die mRNA stellt eine Art bewegliche Kopie eines Gens dar, welche im Prozess der Translation in eine Aminosäurekette übersetzt werden kann. Der genetische Code beinhaltet die Erkennung und Umsetzung eines Triplets von Nukleotiden (Codon). Insgesamt gibt es vier natürliche Nukleotide, welche zur Speicherung von genetischer Information von Zellen genutzt werden: Adenin, Thymin, Cytosin und Guanin, wobei Erstere zwei und Letztere drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Das Nukleotid Thymin wird auf der mRNA zu Uracil übersetzt. Aus diesen Grundbausteinen ergeben sich somit $4^3 = 64$ mögliche Codon-Kombinationen für den genetischen Code. Jedoch kodiert nicht jedes Codon für eine andere Aminosäure, da die meisten Lebewesen nur 20 Aminosäuren verwenden. Jede Aminosäure (mit Ausnahme von Methionin und Tryptophan) wird von mehr als einem Codon kodiert: man spricht dadurch auch vom redundanten bzw. degenerierten genetischen Code (Berg et al., 2013).

Der Aufbau der Aminosäurekette beinhaltet Wechselwirkungen zwischen mRNA, Ribosomen und mehr als 100 weiteren Molekülen. Die Translation findet dabei nicht im, sondern außerhalb des Zellkerns statt. Zu den grundlegenden Prozessen hierbei zählt der Transport der mRNA aus dem Zellkern hin zu den, im Zytoplasma lokalisierten, Ribosomen. Sobald die mRNA und ein Ribosom einen Komplex gebildet haben, beginnt die eigentliche Translation. Um nun eine Aminosäurekette nach dem "Vorbild" der mRNA zu synthetisieren, wird jedes Codon von einer spezifischen Transfer-RNA (tRNA) erkannt. Die tRNAs werden über bestimmte Enzyme, sogenannte Aminoacyl-tRNA-Synthasen, mit der für eine tRNA spezifische Aminosäure beladen.

Als Startpunkt jeder Aminosäurekette dient dabei die Aminosäure Methionin, deren Codon in diesem Fall auch als Start-Codon bezeichnet wird. Die Beendigung der Translation (Termination) wird von einem der drei Stop-Codons auf der mRNA eingeleitet, welchen aus historischen Gründen sowie zur Unterscheidbarkeit eine Farbe zugewiesen wurde: UAG (bernsteinfarben, *amber*), UAA (ockerfarben, *ochre*) und UGA (opalfarben, *opal*). Nach der Termination der Translation werden häufig noch Modifikationen an einzelnen Aminosäuren durchgeführt. Sie beinhalten beispielsweise Phosphorylierung oder Glykosylierung von Serin-Seitenketten, Acetylierung oder Alkylierung von Lysin-Seitenketten oder Oxidation von Prolin-Seitenketten (Walsh, 2006.).

1.2 Die Erweiterung des genetischen Codes mithilfe von unnatürlichen Aminosäuren

Der universelle genetische Code zeigt jedoch selbst in der Natur vorkommende Ausnahmen. So existieren, zusätzlich zu den 20 konventionellen Aminosäuren, zwei weitere: Selenocystein und Pyrrolysin, welche deshalb auch als 21. und 22. Aminosäure bezeichnet werden. Diese beiden Erweiterungen verdeutlichen, dass der universelle genetische Code durchaus Raum für Modifikationen bzw. Manipulationen zulässt.

Das Forschungsgebiet der Manipulation und der Erweiterung des genetischen Codes (engl. genetic code expansion, GCE) beschäftigt sich mit der Frage, wie man gezielt einzelne Komponenten während der Transkription oder Translation austauschen bzw. einführen kann, um dadurch spezifische Effekte hervorzurufen (Chin et al., 2003; Xie und Schultz, 2005). Besondere Bedeutung kommt dabei dem Einbau sogenannter unnatürlicher Aminosäuren zu: Derartige Techniken ermöglichen den Einbau von „maßgeschneiderten“ Aminosäuren, welche auf die Bedürfnisse des Experimentators angepasst sind und einzigartige chemische Reaktionen ermöglichen (Chin, 2014; Lemke, 2014a; Liu und Schultz, 2010).

Eine elegante Methode stellt die Amber-Codon-Unterdrückungsmethode (engl. amber suppression) dar. Hierbei wird ein, in den meisten Lebewesen nicht vorkommendes, tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase (tRNA/RS) Paar verwendet, welches in einem Zielorganismus exprimiert und den Einbau einer, der Zelle bzw. dem Organismus vorher unbekannt, Aminosäure ermöglicht. Durch gezielte Modifikation der Aminosäurebindetasche der tRNA-Synthetase ist es möglich eine Fülle von synthetischen, in der Natur nicht vorkommenden, Aminosäuren (engl. unnatural amino acid, uAA) in

Zellen einzuschleusen und in Polypeptidketten einzubauen. Da, wie in Abschnitt 1.1 bereits beschrieben, jedes Codon von einem tRNA/tRNA-Synthetase Paar erkannt und übersetzt wird, nutzt die Amber-Suppressionsmethode das Stop-Codon TAG bzw. UAG (auch als Amber-Codon bezeichnet) als Erkennungsstelle. Hierbei wird nun das normalerweise als Terminationssignal genutzte Amber-Stop-Codon mittels des unnatürlichen tRNA-tRNA-Synthetase Paares während der Translation in eine unnatürliche Aminosäure übersetzt. Das tRNA/RS Paar konkurriert jedoch mit dem translationalen Terminationsprotein RF1 (release factor 1), welches am Amber-Codon die Translation terminiert. Um einen effizienten Einbau der uAA in ein Protein zu gewährleisten, ist es daher wichtig, dass den Zellen eine hohe Konzentration an tRNA/RS sowie uAA zur Verfügung gestellt wird. Andernfalls kann die Amber-Suppression nicht effizient durchgeführt werden (Mukai et al., 2017). Die in Rahmen dieser Arbeit verwendete Amber-Suppressionstechnologie stammt ursprünglich aus der Gruppe von Peter G. Schultz, welche es durch eine Reihe von Optimierungen ermöglichte unnatürliche, aromatische Aminosäuren spezifisch in Proteine einzuführen (Chen et al., 2009; Liu and Schultz, 2010; Nikic et al., 2015; Xie und Schultz, 2005). Weitere Pionierarbeiten aus der Gruppe von Jason W. Chin, Edward Lemke und Shigeyuki Yokoyama identifizierten das tRNA/RS-Paar Pyl-tRNA_{CUA}/Pyrrolysyl(Pyl)-tRNA aus *Methanosarcina mazei* (aus der Domäne der Archaea) als optimalen Kandidaten für die genetische Erweiterung von bakteriellen und eukaryotischen Zellkulturen (Chin et al., 2003; Lemke, 2014; Sakamoto et al., 2002). Dieses Paar ist vor allem wegen seiner hohen Spezifität sowie aufgeklärten Kristallstruktur in den Fokus gerückt, da es keine endogenen Aminosäuren erkennt (somit orthogonal zur vorherrschenden Translationsmaschinerie in der Zielzelle ist) und durch gezielte Modifikationen des aktiven Zentrums der tRNA-Synthetase flexibel für verschiedenen unnatürliche Aminosäuren optimiert werden kann. Vor allem in Kombination mit spezifischer und schneller Click-Chemie entwickelte sich die Amber-Suppressionsmethode zu einem wertvollen genetischen Werkzeug bei der Modifikation von Proteinen und ortsspezifischen Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Kozma et al., 2017; Prescher und Bertozzi, 2005).

1.3 Fluoreszenzmarkierung

Durch die Entdeckung der Fluoreszenz im 19. Jahrhundert sowie technische Fortschritte im Bereich der Mikroskopie eröffneten sich neue Möglichkeiten für die Visualisierung von Biomolekülen in lebenden oder zuvor fixierten Zellen (Stokes, 1852). Die Markierung von Biomolekülen mit Fluoreszenzfarbstoffen ist hierbei Grundvoraussetzung für die Fluoreszenzmikroskopie. Stetig werden neue Fluoreszenzreagenzien zur Markierung von Proteinen, Nukleinsäuren oder anderen Biomolekülen entwickelt und optimiert (Combs, 2010; Lichtman und Conchello, 2005). Heutzutage gibt es eine Fülle an Möglichkeiten ein Molekül spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln, wie bspw. die Immunomarkierung, die genetische Expression fluoreszierender Proteine sowie die direkte chemische Kopplung von Farbstoffen an funktionalisierte Biomoleküle (Sauer et al., 2011; Toseland, 2013). Die erste dokumentierte Immunofluoreszenzmarkierung mit primären Antikörpern gelang Albert Coons im Jahre 1941 zur Visualisierung des Erregers *Streptococcus pneumoniae* in Lungengewebeschnitten von infizierten Patienten. Der primäre Antikörper stammte aus einem immunisierten Kaninchen und wurde mit dem damals bekannten Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein gekoppelt (Coons et al., 1941). Bis zur heutigen Zeit sind Immunomarkierungen eine gängige Labormethode, die in vielen Bereichen der Biomedizin und Mikroskopie eingesetzt wird. Die Probenvorbereitung sowie die Prozedur hat sich dabei kaum verändert: Ein Antigen (ein Biomolekül bzw. ein Peptidmotiv) wird von einem Antikörper (Immunglobulin) erkannt und von diesem spezifisch gebunden. Bei der Immunofluoreszenzmarkierung wird der Antikörper zuvor chemisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, wodurch die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung eine spezifische Markierung von biologischen Strukturen ermöglicht (Griffiths und Lucocq, 2014). Im Immunsystem eines Organismus spielt diese Erkennung und Markierung des Antigens eine wichtige Rolle, da es Krankheitserreger kennzeichnen oder infizierte Zellen identifizieren kann und daraufhin eine Immunreaktion ausgelöst wird. Der Antikörper Immunglobulin G (IgG) gehört zur Antikörperklasse G, welche v.a. gegen Bakterien gerichtet ist, und ist im Durchmesser zwischen 10-15 nm groß (Abbildung 1).

Eine weitere Möglichkeit der Markierung stellen dabei sogenannte fluoreszierende Proteine (FP) dar. Das erste genetisch-kodierte fluoreszierende Protein wurde im Jahre 1962 isoliert und identifiziert (Shimomura, 1962).

1 Einleitung

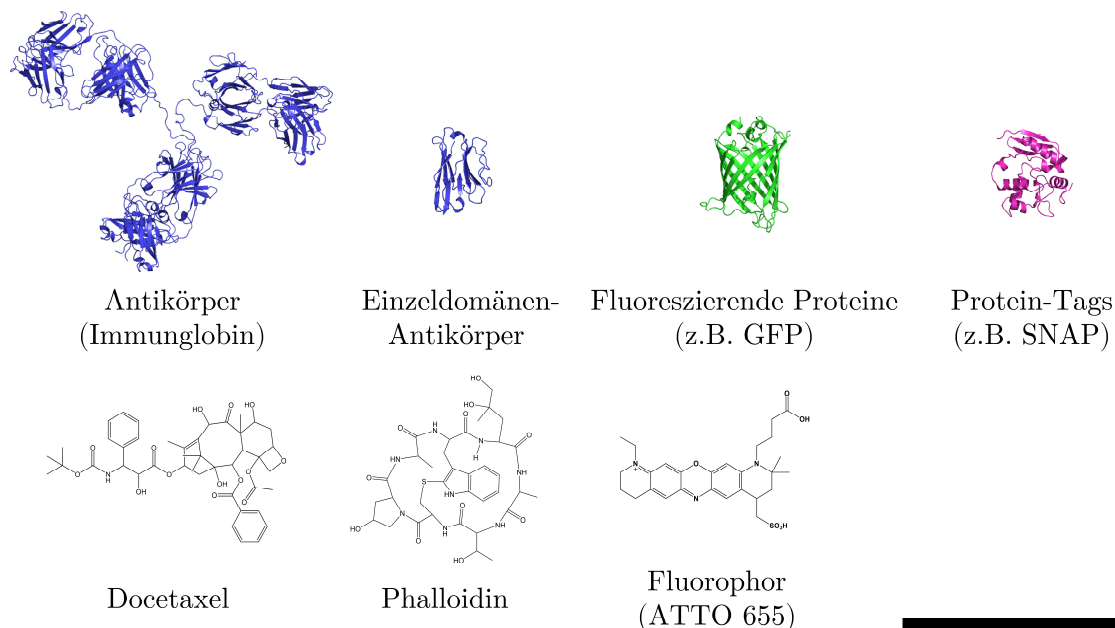


Abbildung 1 - Größenvergleich der verschiedenen Fluoreszenzmarker. Volllängen- (IgG) sowie ein Einzeldomänen-Antikörper in blau, ein fluoreszierendes Protein (GFP) in grün sowie ein Enzym-Tag (SNAP-Tag) in magenta, unter Berücksichtigung der relativen Größe zueinander, dargestellt. Die Strukturformeln von Docetaxel (Tubulin-bindendes Molekül), Phalloidin (Aktin-bindendes Molekül) sowie ein organisches Fluorophor (z.B. ATTO655) sind um ein zehnfaches vergrößert dargestellt. Längenskala, 10 nm.

Durch Entschlüsselung der Kristallstruktur sowie der stetigen Optimierung und Modifizierung der für die Fluoreszenz relevanten Aminosäuren erwiesen sich fluoreszierende Proteine als ein außerordentlich leistungsfähiges Werkzeug zur Markierung von Biomolekülen in lebenden Zellen sowie Organismen. Eines der gängigsten FP ist das grün-fluoreszierende Protein (GFP). Es besteht aus 238 Aminosäuren, welche eine 11-strängige β -Fasstruktur mit einer durchspannenden α -Helix bilden. Das Chromophor bildet sich durch autokatalytische Prozesse durch drei Aminosäuren im inneren der Fasstruktur und besitzt zwei lokale Absorptionsmaxima sowie ein Emissionsmaximum. Fluoreszierende Proteine zeichnen sich durch eine hohe Stabilität bezüglich Schwankungen des pH- oder Temperatur-Bereichs aus und sind kompatibel mit einer Vielzahl an damit koppelbaren Proteinen. Durch ihre geringe Toxizität sowie ihre Fülle an Varianten mit unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften finden sie breite Anwendung in der biologischen und biomedizinischen Erforschung von einzelnen Proteinen, Zellen oder Organismen und zählen zum molekularbiologischen Standardrepertoire zur Markierung von überexprimierten Protein.

Trotz vieler Vorteile bergen FP auch Nachteile: so neigen sie beispielweise zu Aggregation mit anderen Proteinen oder stören durch ihre Größe (~ 5 nm) die Interaktion von gekoppelten Proteinen (Chudakov et al., 2010; Kremers et al., 2011). Es lassen sich jedoch auch organische Fluorophore an Protein-Tags koppeln: Analog zu fluoreszierenden Proteinen wird eine Polypeptidsequenz (selbst-koppelndes Enzym, z.B. SNAP-Tag) mit bzw. an einem Zielprotein koexprimiert (Gautier et al., 2008; Thorn, 2017). Das Enzym (Tag) erkennt einen, zuvor mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten, Liganden und bindet diesen kovalent. Diese Markierungsmethode kombiniert die einfache Handhabung fluoreszierender Proteine mit den außerordentlichen photophysikalischen Eigenschaften von organischen Fluorophoren, wobei die nachteilige Größe von ~ 4 - 5 nm sowie etwaige Funktionalitätsstörungen erhalten bleiben. Alternativ lassen sich synthetische Fluorophore auch direkt an kleine Peptide oder Biomoleküle koppeln wie z.B. an das Aktin-bindende Molekül Phalloidin oder das Tubulin-bindende Molekül Docetaxel, welche selbst zelluläre Strukturen spezifisch markieren können. Derartige Markierungsmethoden sind oftmals um ein Vielfaches kleiner (1 - 3 nm), besitzen häufig jedoch eine Beeinträchtigung der Funktionalität. Sie stammen häufig von Toxinen oder Zytoskelett-Interaktionspartnern und sind meist als Schutzmoleküle in der Natur evolviert, da sie oftmals Störungen des Gleichgewichts von Auf- und Abbau von Zytoskelettbestandteilen herbeiführen.

1.4 Fluoreszenzmikroskopie

In modernen biologischen Fragestellungen spielen mikroskopische Bildgebungsverfahren eine wichtige Rolle und zählen zu den am weitesten verbreiteten Werkzeugen zur Visualisierung von zellulären Strukturen. Vor allem fluoreszenzbasierte Mikroskopieverfahren finden seit mehreren Jahrzehnten immer häufiger Anwendung in der Biotechnologie, medizinischen Diagnostik und Erbgutforschung. Die Detektion von Fluoreszenzsignalen kann hochempfindlich und spezifisch erfolgen und Fluoreszenzfarbstoffe eignen sich aufgrund ihres hohen Kontrasts zwischen Signal und Hintergrund hervorragend für die molekulare und zelluläre Bildgebung (Lichtman und Conchello, 2005; Sauer et al., 2011). Charakteristisch für die Fluoreszenzmikroskopie ist hierbei die Rotverschiebung des Anregungslichts und Emissionslichts. Das Licht einer höheren Energie (kürzere Wellenlänge) wird von einem fluoreszierenden Molekül aufgenommen und gibt daraufhin ein Fluoreszenzphoton mit einer niedrigeren Energie (längere

Wellenlänge) ab (Stokes, 1852). Im sichtbaren Lichtspektrum spricht man daher von einer Rotverschiebung bzw. dem sogenannten Stokes-Verschiebung (engl. stokes shift). Im Vergleich zur konventionellen Durchlichtmikroskopie führt der verbesserte Kontrast sowie die Möglichkeit der hochempfindlichen Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen zur besseren Bildgebung und ermöglicht die Beobachtung von dynamischen biologischen Prozessen. Durch die Vielzahl an verschiedensten fluoreszierenden Molekülen, von fluoreszierenden Proteinen bis hin zu organischen Fluoreszenzfarbstoffen kann der Anwender nun entscheiden, welche Wellenlängen des Lichts, Fluoreszenzlebensdauern oder weitere photophysikalische Eigenschaften in einem Experiment vorherrschen und zur Bildgebung genutzt werden sollen.

Neben den zahlreichen Vorteilen der fluoreszenzbasierten Mikroskopie ergeben sich ebenfalls Nachteile, die berücksichtigt werden müssen. Der wohl Wichtigste ist wahrscheinlich die Lichtbeugungsgrenze. Ernst Abbe formulierte erstmals 1873 eine physikalische Grenze von optischen Systemen, welche den minimalen Abstand beschreibt, bei dem man zwei Objekte noch getrennt voneinander detektieren bzw. identifizieren kann. Dieser Abstand wird durch die Wellennatur des Lichts verursacht und entspricht somit der Auflösungsgrenze eines Mikroskops. Die von Abbe beschriebene Auflösungsgrenze wird durch die Emissionswellenlänge, den Brechungsindex des Mediums zwischen dem Gegenstand und dem Objektiv sowie dem Öffnungswinkel des Objektivs bestimmt. Jedoch lässt sich die Auflösung in klassischen Fluoreszenzmikroskopen nicht beliebig verbessern. Die Erweiterung des Objektivöffnungswinkels ist durch technische Einschränkungen beschränkt und die Verringerung der Anregungswellenlänge ist begrenzt durch das Lichtspektrum. Zusätzlich führt kurzwelliges, hochenergetisches Licht zu Schäden an biologischen Proben wie z.B. Erbgutschäden oder Zelltod. Die Auflösungsgrenze liegt bei konventionellen Fluoreszenzmikroskopen daher im Bereich von 200-250 nm (Abbe, 1873). Durch die Entwicklung neuer mikroskopischer Methoden war es dennoch möglich, die Moleküle unterhalb der Auflösungsgrenze zu detektieren. Diese Methoden beruhen entweder auf deterministische Vorgehensweisen, wie bspw. der Verwendung verschiedener Beleuchtungsmuster oder aber stochastischen Prozessen, wie der zeitlichen Trennung individueller Fluoreszenzsignale (Schermelleh et al., 2019). Bei deterministischen Hochauflösungsmikroskopiemethoden beruht die Auflösungsverbesserung auf der Veränderung des Anregungslichts. Bei der strukturierten-Beleuchtungsmikroskopie (engl. structured illumination microscopy, SIM) wird das Anregungslicht gitterförmig strukturiert und führt zu Interferenzstreifen (Moire-

Muster) im aufgenommenen Fluoreszenzbild. Durch mehrmaliges strukturiertes Beleuchten der Probe in unterschiedlichen Orientierungen ergeben sich dadurch Strukturinformationen, die mathematisch extrahiert werden können und eine Rekonstruktion des Bildes mit einer bis zu zweifach verbesserten räumlichen Auflösung (~ 100 nm) ermöglichen (Gustafsson, 2000).

Ein weiteres Beispiel für deterministische Hochauflösungsmikroskopiemethoden ist die sogenannte STED-Mikroskopie (engl. Stimulated Emission Depletion Microscopy). Die Auflösungsverbesserung basiert auf dem Ausschalten der Fluoreszenz durch stimulierte Emission mit starkem Laserlicht in den äußeren Bereichen des Anregungsfokus.

Das donutförmige Anregungslicht (Depletion-Laser) bewirkt, dass fast alle angeregten Fluoreszenzmoleküle in den Grundzustand zurückkehren, wohingegen die Fluoreszenz der verbleibenden angeregten Farbstoffmoleküle in der Mitte des Anregungslasers erfasst werden. Die daraus resultierenden hochaufgelösten Bilder zeigen eine bis zu vierfach verbesserte räumliche Auflösung (~ 50 nm) (Hell und Wichmann, 1994; Okhonin, 1986). Eine weitere Herangehensweise zur Überwindung der Auflösungsgrenze sind sogenannte stochastische Einzelmolekül-basierte Mikroskopieverfahren (engl. single molecule localization microscopy, SMLM) (Sauer und Heilemann, 2017; Toomre und Bewersdorf, 2010). Hierbei nutzt man die zufällige zeitliche Trennung der Fluoreszenzsignale von einzelnen Fluorophoren, um die genaue Position des Fluorophors zu ermitteln. Die zeitliche Trennung der Fluoreszenzsignale wird durch photoschaltbare Fluorophore erreicht, welche bspw. zwischen einem fluoreszierenden An-Zustand und einem nicht-fluoreszierenden Aus-Zustand wechseln können. Durch Verschiebung dieses Gleichgewichts hin zum mehrheitlichem Aus-Zustand der meisten Fluorophore wird es dadurch möglich, vereinzelte Fluorophore detektieren bzw. lokalisieren zu können. Bei der photoaktivierten Lokalisationsmikroskopie (PALM) nutzt man z.B. fluoreszierende Proteine, welche mit ultravioletten Licht von einem nicht- bzw. grün-fluoreszierendem Zustand in einem fluoreszierenden bzw. rot-fluoreszierenden Zustand überführt werden können. Diese „eingeschalteten“ Fluoreszenzmoleküle können detektiert und lokalisiert werden, bis sie schließlich irreversibel photozerstört (engl. photobleaching) werden. Ein weiteres Beispiel für stochastische Hochauflösungsmikroskopie ist bspw. die direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (*d*STORM), welche ebenfalls auf der zeitlichen Trennung individueller Fluoreszenzsignale beruht (Heilemann et al., 2009; van de Linde et al., 2008). Hauptunterschied zu PALM-Techniken ist hierbei die Verwendung von organischen Fluoreszenzfarbstoffen sowie die Modulierung der Photoschaltraten durch bspw. Pufferbedingungen oder dem Entzug von Sauerstoff.

Dadurch kann die Mehrheit an Fluoreszenzfarbstoffen in einen stabilen Aus-Zustand überführt werden, sodass die Detektion einzelner Fluorophore im Ein-Zustand ermöglicht wird. Dieser zufällige Prozess gewährleistet, dass bei optimierten Messbedingungen innerhalb kurzer Zeitintervalle unterschiedliche, räumlich getrennte Fluorophore für kurze Zeit in den fluoreszierenden Zustand überführt und detektiert werden können, wobei die Mehrheit der übrigen Fluorophore keine Fluoreszenzemission zeigt. Durch Aufnahme mehrerer kurzer Fluoreszenzbilder (typischerweise 10.000 – 100.000 Bilder mit 10-30 msec Belichtungszeit) lassen sich einzelne Fluoreszenzsignale aufnehmen und die Position jedes Fluorophors durch Anpassung einer zweidimensionalen Gauß-Funktion ermitteln. Die Lokalisationsgenauigkeit ist dabei abhängig von der Anzahl der gesammelten Fluoreszenzphotonen, der Standardabweichung der Anpassung sowie dem Hintergrundrauschen. Das rekonstruierte, hochaufgelöste Bild besitzt dabei eine räumliche Auflösung von ~ 20 nm (Holden und Sage, 2016; Wolter, 2012).

Abschließend ist festzuhalten, dass alle Mikroskopietechniken unterschiedliche Stärken und Schwächen besitzen. Daher müssen immer die jeweiligen experimentellen Bedingungen und Fragestellungen berücksichtigt und oftmals eine Kombination an Techniken durchgeführt werden, um eine optimale Fluoreszenzbildgebung zu ermöglichen.

2 Theorie

Das nachfolgende Kapitel beschäftigt sich mit den theoretischen Grundlagen dieser Arbeit. Neben den allgemeinen Definitionen von Fluoreszenz und Fluoreszenz-basierten spektroskopischen Methoden, wird ebenfalls auf die Grundlagen der Proteinbiosynthese und deren Modifikation eingegangen. Zudem wird besonderer Wert auf die Erläuterung von Farbstoffwechselwirkungen hinsichtlich ihrer Anwendung in Bildgebungsverfahren gelegt.

2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

2.1.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe sind chemische Verbindungen, welche nach Anregung Fluoreszenzlicht emittieren können. Sie enthalten typischerweise planare, zyklische oder aromatische Verbindungen und bilden mehrere π -Bindungen aus. Generell lassen sich Fluorophore in zwei Klassen einteilen: intrinsische Fluorophore, welche in der Natur auftreten (wie bspw. die Indol-Gruppe der natürlichen Aminosäure Tryptophan) und extrinsische Fluorophore, also synthetische chemische Verbindungen, welche einem Biomolekül nachträglich zugegeben werden können (Lakowicz, 2006; Teale und Weber, 1957).

Extrinsische Fluoreszenzsonden zeigen hierbei oftmals verbesserte photophysikalische Eigenschaften, wie bspw. eine hohe Fluoreszenzintensität oder Photostabilität im Vergleich zu intrinsisch fluoreszierenden Molekülen (Fernández-Suárez und Ting, 2008). Aus diesem Grund zählen organische Fluorophore zum Standardrepertoire bei der Untersuchung dynamischer Prozesse in biologischen Fragestellung und sind essentiell für die moderne Fluoreszenzmikroskopie mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Die Molekularstruktur von organischen Fluoreszenzfarbstoffen kann in unterschiedliche chemische Klassen unterteilt werden. Zu den gängigsten Farbstoffklassen in der Fluoreszenzmikroskopie zählen die Coumarine, Acridine, Rhodamine, Carbopyronine, Oxazine sowie Cyanine (Abbildung 2).

Diese unterscheiden sich vor allem in der Anzahl und Kombination der chemischen Verbindungen, welche das Chromophor, also denjenigen Teil des Moleküls, der für die Farbgebung verantwortlich ist, aufbauen.

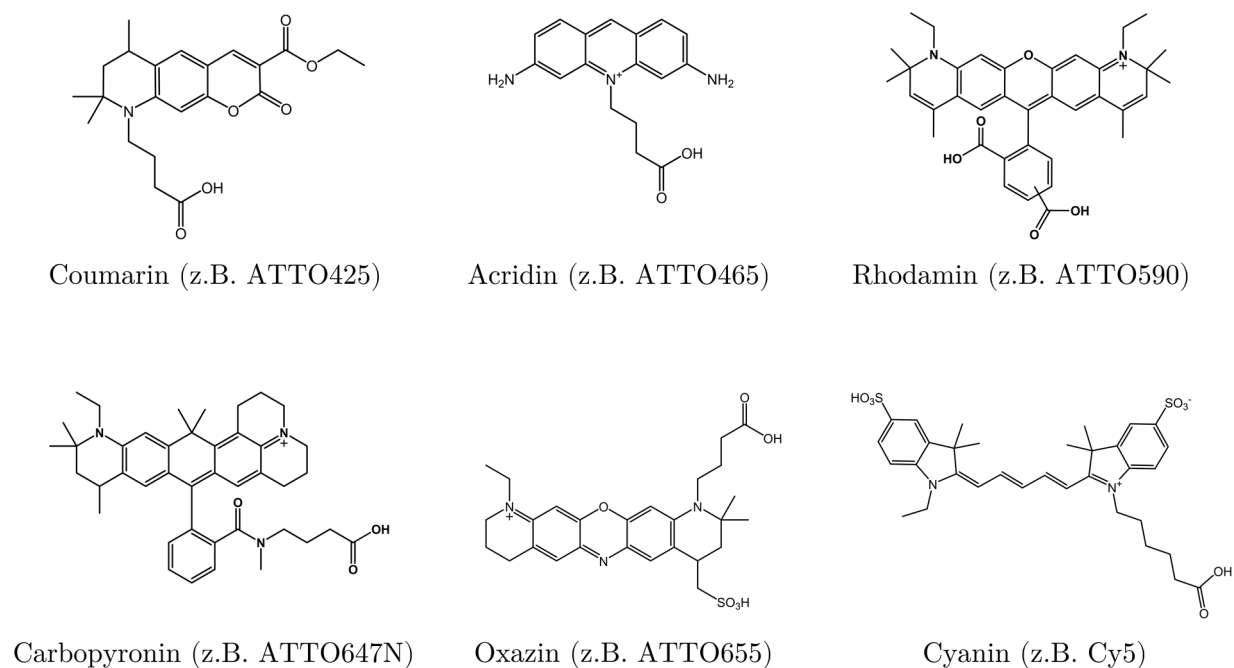


Abbildung 2 - Fluoreszenzfarbstoffe aus unterschiedlichen Farbstoffklassen

Die Farbstoffe jeder Klasse unterscheiden sich dabei bezüglich ihrer Eigenschaften. So sind bspw. rhodamine Farbstoffe häufig membrandurchgängig, cyanine Farbstoffe strukturell flexibel (Isomerisierung) oder oxazine Fluoreszenzfarbstoffe oftmals sehr photostabil.

2.1.2 Absorption und Emission

Die Photonen-Aufnahme (Absorption) von Molekülen und die darauffolgende Abgabe eines niederenergetischen, langwelligeren Photons (Emission) stellt die Grundlage der Fluoreszenz dar. Bevor es jedoch zur Fluoreszenzemission kommt, muss einem fluoreszierendes Molekül Energie (Anregungslicht mit geringer Wellenlänge und hoher Energie) zugeführt werden. Das Jablonski-Diagramm (Abbildung 3) veranschaulicht die Übergänge der Elektronen zwischen den möglichen Energieniveaus (Jabłoński, 1935).

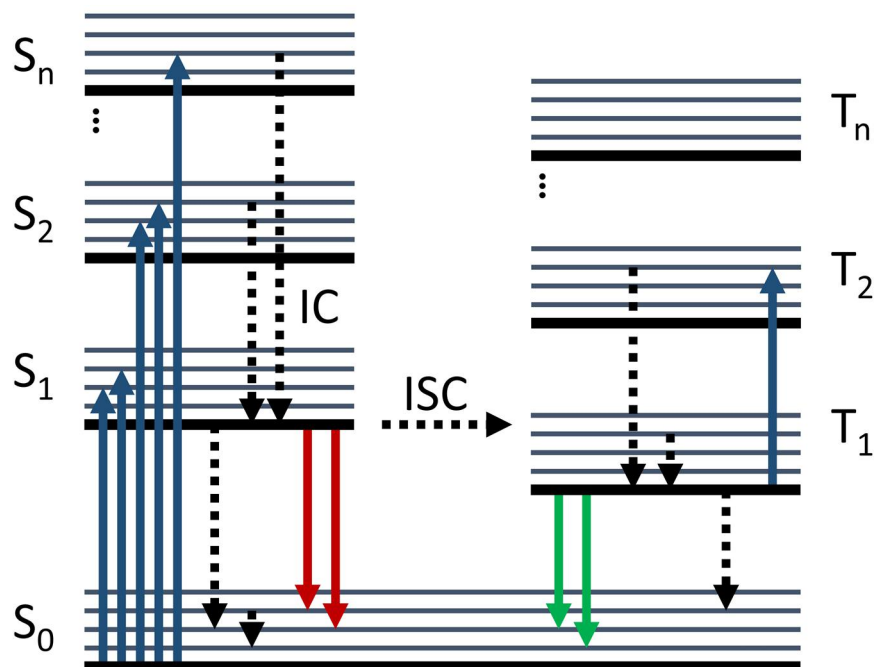


Abbildung 3 - Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung der Energieniveaus sowie der möglichen Übergänge innerhalb eines Fluoreszenzmoleküls: Der Grundzustand (S_0), die angeregten Singulettzustände (S_1, S_2, \dots, S_n), die Triplettzustände (T_1, T_2, \dots, T_n) sowie Anregung (blaue Pfeile), Interne Umwandlung (engl. Internal conversion, IC), Phosphoreszenz (grüne Pfeile), strahlungsfreie Übergänge (gepunktete Pfeile) sowie Interkombination (engl. Intersystem crossing, ISC).

Wird einem fluoreszierenden Molekül Energie zugeführt, bewirkt dies das “Anheben“ eines Elektrons vom Grundniveau (S_0) auf ein höheres Energieniveau ($S_{1,2,\dots,n}$). Da der angeregte Zustand nicht langlebig ist, kommt es zum “Herabfallen“ des Elektrons von seinem angeregten, höheren Energiezustand zurück in den Grundzustand, was entweder über strahlungsfreie Übergänge oder durch Abgabe eines Fluoreszenzphotons bewirkt werden kann (Stokes, 1852). Die Differenz der Wellenlängen von absorbierten und emittierten Licht wird als Stokes-Verschiebung (engl. stokes shift) bezeichnet (Abbildung 4).

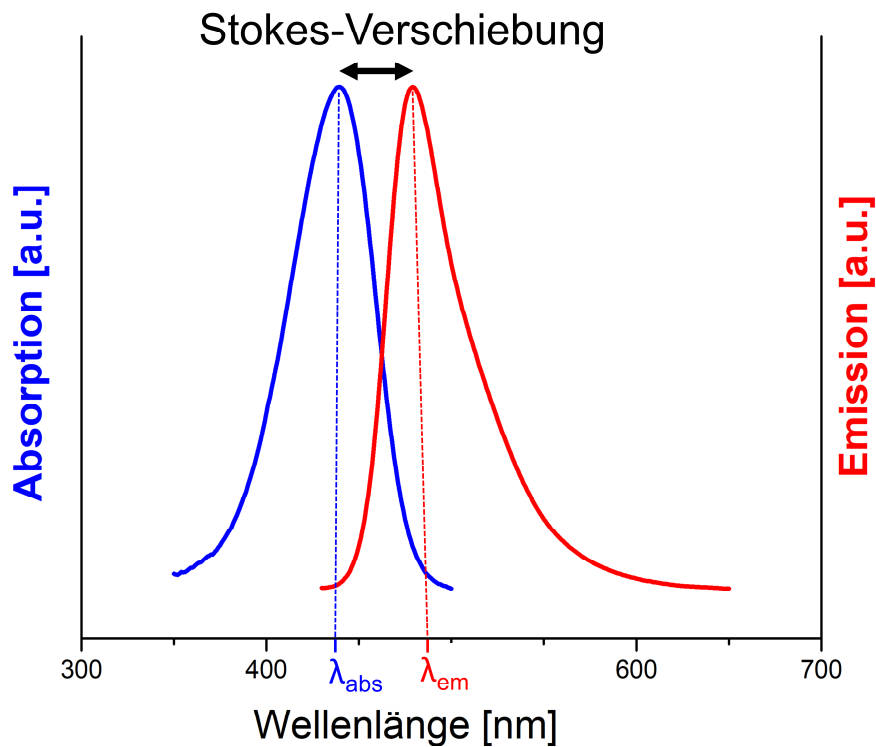


Abbildung 4 - Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (rot) von ATTO425. Das Absorptionsmaximum (λ_{abs}) und das Emissionsmaximum (λ_{em}) sind um die sogenannte Stokes-Verschiebung gegeneinander verschoben.

2.1.3 Quantenausbeute & Fluoreszenzlebensdauer

Zusätzlich zum Absorptions- und Emissionsmaximum gibt es noch weitere charakteristische Eigenschaften von Farbstoffen. Hierzu zählen beispielsweise die Quantenausbeute (Q bzw. Φ) sowie die Fluoreszenzlebensdauer (τ) (Birks, 1973; Strickler und Berg, 1962).

Die Quantenausbeute ist definiert als das Verhältnis zwischen der Anzahl an emittierten Photonen zu der Gesamtanzahl an absorbierten Photonen:

$$\Phi_f = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (1)$$

wobei

Φ_f die Fluoreszenzquantenausbeute, N_{em} die Anzahl an emittierten Photonen und N_{abs} die Anzahl an absorbierten Photonen darstellt.

Die Quantenausbeute ist dabei ≤ 1 und wird durch Umgebungsbedingungen wie pH, Temperatur sowie Lösungsmittelpolarität beeinflusst. Zudem können umliegenden Moleküle die Quantenausbeute reduzieren (siehe Kapitel 2.1.4).

Die charakteristische Abklingzeit bzw. Fluoreszenzlebensdauer τ kann über die Abnahme der Anzahl angeregter Fluorophore nach unmittelbar aufeinanderfolgenden Anregungspulsen in Abhängigkeit mit der Zeit beschrieben werden.

Es gilt:

$$\frac{\Delta[F(t)^*]}{\Delta t} = -(k) [F(t)^*] \quad (2)$$

und

$$\frac{\Delta[F(t)^*]}{\Delta t} = -(k_f + k_{IC} + k_{ISC})[F(t)^*] \quad (3)$$

wobei

$F(t)^*$ die Anzahl angeregter Farbstoffmoleküle zum Zeitpunkt t und k die Summe aller Geschwindigkeitskonstanten (zusammengesetzt aus der Gleichgewichtskonstanten der Fluoreszenz (k_f), der internen Umwandlung (k_{IC}) sowie der Interkombination (k_{ISC})) ist.

Für die Fluoreszenzlebensdauer τ gilt:

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (4)$$

Die experimentelle Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer τ entspricht der Abklingzeit bis zum Abfall der Fluoreszenzintensität auf $1/e$ der Anfangsintensität von angeregten Fluorophoren (F^*) nach zu voriger Anregung und kann durch zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (engl. time-correlated single photon counting, TCSPC) bestimmt werden. Die mittlere Lebensdauer von Fluoreszenzfarbstoffen tritt häufig im Zeitbereich von mehreren Nanosekunden (10^{-9} s) auf. Die exponentielle Abfallkinetik kann durch den folgenden Term beschrieben werden:

$$I(t) = I_0 * \sum^n A_n e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (5)$$

wobei

$I(t)$ die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t , A_n die relative Amplitude jeder Komponente n , I_0 die Anfangsintensität zum Zeitpunkt t_0 und τ_n die Fluoreszenzlebensdauer der jeweiligen Komponente n darstellt.

2.1.4 Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzlöschung beschreibt die Gesamtheit aller Wechselwirkungen von angeregten Fluorophoren und umliegenden Molekülen, die eine Reduzierung der Quantenausbeute des Fluorophors zur Folge haben, ohne jedoch das Fluorophor zu zerstören (Lakowicz, 2006). Unter der Voraussetzung von konstanter Konzentration des Löschmoleküls ($[Q] \gg [F]$) gilt für die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit eines Quenchers Q bei intermolekularen Löschreaktionen:

$$I(t) = I_0 * e^{-(k+k_q[Q])*t} \quad (6)$$

wobei

$I(t)$ die zeitabhängige Fluoreszenzintensitätsabnahme, k die Summe der Gleichgewichtskonstanten (k_f , k_{IC} und k_{ISC}), k_q die Ratenkonstante der bimolekularen Löschung und I_0 die Anfangsintensität ohne Löschmolekül darstellt.

Für die Fluoreszenzlebenszeit ergibt sich:

$$\tau = \frac{1}{k + k_q[Q]} \quad (7)$$

wobei

τ die Fluoreszenzlebenszeit, k die Summe der Gleichgewichtskonstanten (k_f , k_{IC} und k_{ISC}), k_q die Ratenkonstante der bimolekularen Löschung und $[Q]$ die Konzentration des Löschmoleküls darstellt.

Generell lassen sich Löschprozesse in zwei Kategorien einteilen: statische und dynamische Löschung. Bei der dynamischen Löschung (Stoßlöschung) kommt es zur diffusionslimitierten Kollision eines angeregten Fluorophors mit einem Löschmolekül (engl. Quencher, Q) innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit. Durch den intermolekularen Stoß beider Moleküle kommt es zum strahlungsfreien Übergang in den elektronischen Grundzustand S_0 und damit zu keinem Ausstoß eines Fluoreszenzphotons. Die dynamische Löschung verringert hierbei sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Fluoreszenzlebensdauer (Doose et al., 2005). Die rein dynamische Löschung lässt sich durch die Stern-Volmer Gleichung beschreiben:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q * \tau_0 * [Q] = 1 + K_D * [Q] \quad (8)$$

wobei

$[Q]$ die Konzentration des Löschmoleküls, I die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von $[Q]$, I_0 die Fluoreszenzintensität ohne Löschmolekül, τ die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von $[Q]$, τ_0 die Fluoreszenzlebensdauer ohne Löschmolekül, k_q die bimolekulare dynamische Löschkonstante sowie K_D die dynamische Stern-Volmer-Konstante darstellt.

Die Stern-Volmer-Konstante für dynamische Löschung kann nach Gleichung 8 anhand der Steigung der Geraden von I_0/I bzw. τ_0/τ gegen $[Q]$ bestimmt werden. Die statische Löschung hingegen beruht auf der Bildung eines nicht bzw. kaum fluoreszierenden Grundzustand-Komplexes zwischen Fluorophor und Löschmolekül. Dadurch verringert sich die Quantenausbeute bzw. die Intensität des Fluorophors, wohingegen die Fluoreszenzlebenszeit weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Für rein statische Löschprozesse

entspricht die statische Stern-Volmer-Konstante der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante für die Bildung des Komplexes. Es gilt:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S * [Q] \quad (9)$$

sowie

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (10)$$

wobei

I die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von [Q], I₀ die Fluoreszenzintensität ohne Löschmolekül, [Q] die Löschmolekülkonzentration, [F] die Fluorophor-konzentration, [FQ] die Komplexkonzentration sowie K_S die statische Stern-Volmer-Konstante darstellt.

Häufig lässt sich eine Fluoreszenzlöschung jedoch nicht eindeutig durch rein-statische oder rein-dynamische Löschung beschreiben und beruht auf einer Kombination beider Löschprozesse. Es gilt:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_S * [Q]) * (1 + K_D * [Q]) \quad (11)$$

Diese modifizierte Stern-Volmer-Gleichung bedingt eine konkave Abweichung der linearen Abhängigkeit des stationären Stern-Volmer-Plots. Die Bestimmung der Anteile von statischer und dynamischer Löschung wird mittels stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

2.1.5 Energie- und Elektronentransfer

Bimolekulare Lösprozesse können auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Die zwei wichtigsten Mechanismen sind zum einen der Energie- sowie zum anderen der Elektronen-Transfer (Sauer et al., 2011). Das Prinzip des Energie-Transfers beruht dabei auf der Übertragung von Energie von einem Molekül auf ein anderes (z.B. Fluoreszenz-Resonanz Energie-Transfer, FRET). Hierbei wird zwischen einem Energie-spendenden Molekül (Donor) und einem Energie-aufnehmendem Molekül (Akzeptor) bei geringem Abstand (1-10nm) durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen übertragen. Es kommt zum strahlungsfreiem Energie-Transfer des Donor-Moleküls auf ein Akzeptor-Molekül. Dieser Prozess wird maßgeblich durch die räumliche Nähe beider Moleküle sowie dem spektralen Überlapp beeinflusst, da Absorptions- und Emissionsdipol vom Akzeptor- und Donor-Molekül in Wechselwirkung (Resonanz) miteinander treten. Die Energieaustauschrate des Fluoreszenz- bzw. Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) lässt sich wie folgt beschreiben:

$$k_{\text{FRET}}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (12)$$

wobei

k die Transferrate, r den Abstand beider Moleküle, τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donors und R_0 den Förster-Radius, also denjenigen Abstand, bei dem die FRET-Effizienz zwischen Donor und Akzeptor 50% beträgt, beschreibt.

Typischerweise liegt der Abstand R_0 im Bereich zwischen 5 – 10 nm, sodass sich FRET als Methode zur Bestimmung von Abständen auf molekularer Ebene nutzen lässt. Eine weitere Art der Wechselwirkung stellt der sogenannte Dexter-Energie-Transfer (auch Dexter-Elektronen-Transfer) dar. Er beruht auf einer Übertragung eines Elektrons von einem angeregten Donor-Molekül auf ein Akzeptormolekül, wobei ein Elektron vom Akzeptor wieder zurück zum Donor-Molekül übertragen wird. Diese Übertragung erfordert eine Wellenfunktionsüberlagerung zwischen Donor- und Akzeptor-Molekül, sodass es nur bei kurzen Abständen (< 1 nm) auftreten kann. Der Ladungsaustausch kann in einem oder zwei separaten Schritten erfolgen.

Im Gegensatz zu FRET stellt Dexter einen quantenmechanischen Effekt dar, welcher in der klassischen Elektrodynamik keine Entsprechung hat (Inokuti und Hirayama, 1965).

Charakteristisch für FRET-basierte Wechselwirkungen ist ein angeregtes Akzeptor-Molekül, wohingegen Dexter-basierte Wechselwirkungen zu einer Fluoreszenzlöschung führen. Der photoinduzierte Elektronen-Transfer (PET) beruht hingegen auf der Übertragung eines Elektrons von einem Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül durch Bildung eines Komplexes, welcher strahlungsfrei in den Grundzustand zurückkehren kann (Abbildung 5). Der angeregte Fluorophor kann dabei, abhängig von den Redox-Potenzialen von Farbstoff und Löschmolekül, entweder Elektronendonator oder Elektronenakzeptor sein. Der Begriffe Donor bzw. Akzeptor bezeichnet bei PET das Molekül, welches ein Elektron abgibt bzw. aufnimmt und welche gemeinsam zur Bildung des nicht-fluoreszierenden Komplexes (excited state complex, exciplex) führen (Kavarnos, 1990). Ob sich das Donor- als auch Akzeptormolekül zuvor im angeregten Zustand befand, spielt für die Komplexbildung dabei keine Rolle.

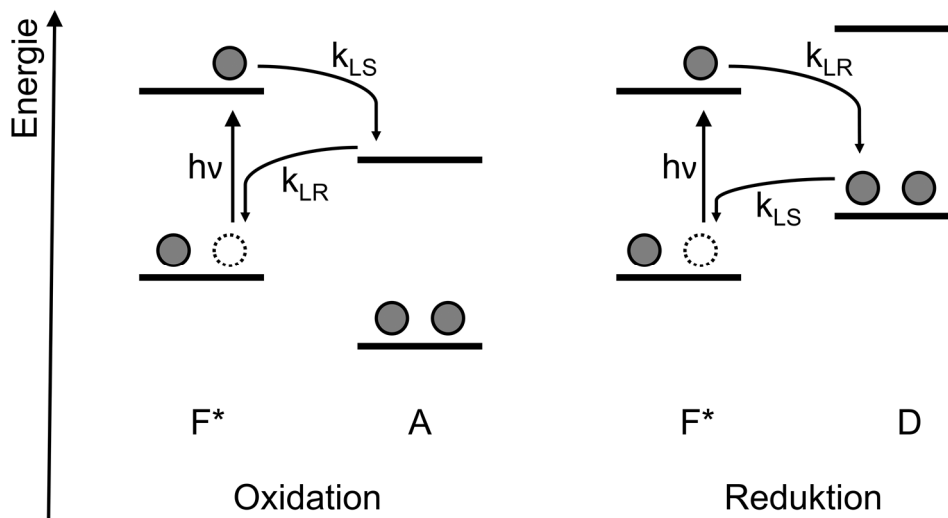


Abbildung 5 - Vereinfachtes Energiebilanz-Schema für den photoinduzierten Elektronen-Transfer zwischen einem (durch Licht, $h\nu$) angeregten Fluoreszenz-Farbstoff (F^*) und einem Akzeptor-Molekül (A) bzw. einem Donor-Molekül (D) sowie die dazugehörigen Raten der Ladungsseparierung (k_{LS}) und Ladungsrekombination (k_{LR}). Links: Ein Elektron wird von einem höheren Energieniveau des angeregten Zustands (F^*) auf ein Akzeptormolekül übertragen (Oxidation). Rechts: Ein Elektron eines wird durch Lichtanregung in ein höheres Energieniveau gehoben.

2.2 Erkennung und Markierung von Proteinen

2.2.1 Immunfluoreszenzmarkierung

Immunglobuline (auch Antikörper) sind Glykoproteine, welche von weißen Blutkörperchen produziert werden und spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort bei Kontakt mit Krankheitserregern wie bspw. Bakterien oder Viren spielen. Es werden je nach biologischer Funktion, Spezifität und Vorkommen verschiedene Antikörperklassen (Isotypen) unterschieden. Zusätzlich wird eine grundsätzliche Unterscheidung zwischen löslichen Antikörpern, welche in wässriger Lösung vorkommen können, sowie membran gebundenen Antikörpern, welche über hydrophobe membranständige Regionen auf der Oberfläche von Zellen exponiert werden, vorgenommen (Harlow und Lane, 1999). Ein monomeres Antikörper besteht aus vier Grundelementen (Abbildung 6): zwei identische schwere Ketten (engl. heavy chain, H) und zwei identische leichte Ketten (engl. light chain, L).

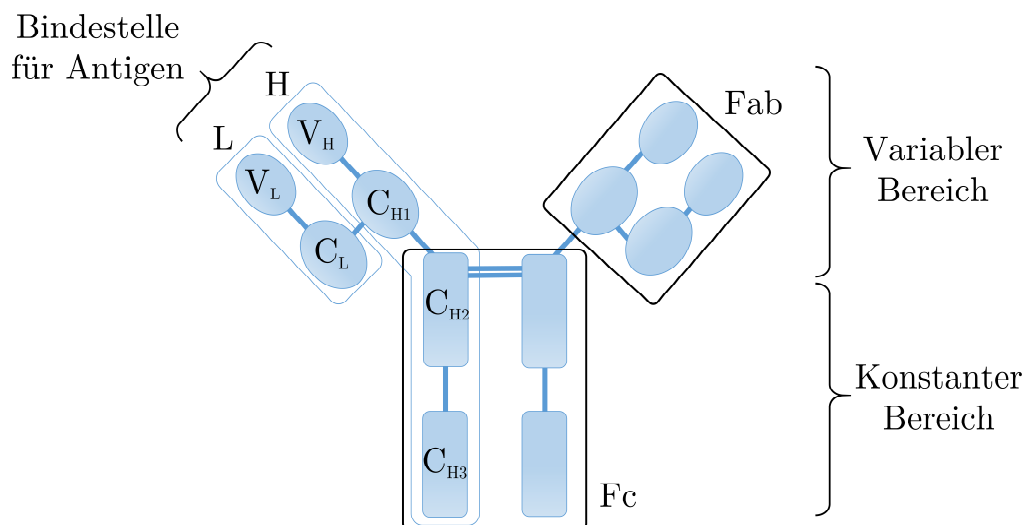


Abbildung 6 - Schematischer Aufbau eines monomeren Antikörpers (z.B. IgG). Dieser besteht aus mehreren Subdomänen und kann in einen variablen und konstanten Bereich unterteilt werden.

Die N-terminalen Enden der Polypeptidketten können in ihrer Sequenz sehr unterschiedlich sein und werden daher als variable Bereiche (engl. variable, V) bezeichnet, um sie von den relativ konstanten Bereichen (engl. constant, C) zu unterscheiden. Jede leichte Kette besteht aus einer variablen Domäne (V_L), und einer konstanten Domäne

(C_L). Die schweren Ketten bestehen aus einer variablen Domäne (V_H), und den drei konstanten Domänen C_{H1}, C_{H2} und C_{H3}. Die zwei schweren Ketten (jeweils ~50 kDa) und zwei leichten Ketten (jeweils ~25 kDa) führen zu einem Gesamtmolekulargewicht des Antikörpers von ~150 kDa (Sauer und Heilemann, 2017). Der Bereich des Antikörpers, der für die Antigen-Bindung zuständig ist wird als F_{ab}-Fragment bezeichnet. Es besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne aus jeweils einer schweren und einer leichten Kette des Antikörpers. Der restliche Teil des Antikörpers wird auch Fc-Fragment bezeichnet und besteht aus zwei schweren Ketten, die je nach Klasse des Antikörpers zwei oder drei konstante Domänen aufweisen. Diese Region spielt vor allem bei der Immunantwort eine wichtige Rolle, da mit Fc-Rezeptoren interagiert und eine Immunreaktion auslösen kann. Dieser Prozess ist jedoch bei der Immunfärbung nicht relevant, sodass die Größe des Antikörpers durch Zugabe des Enzyms Papain, welches das gesamte Fc-Fragment abspaltet, auf die Größe der Fab-Fragmente (~ 50kDa) reduziert werden kann.

Die Herstellung von Antikörpern hat sich in den letzten Jahrzehnten weitestgehend nicht verändert: Einem Säugetier, wie z.B. Maus, Ratte, Ziege, Kaninchen oder Schaf, wird ein Antigen injiziert, sodass sie eine Immunreaktion gegen das Antigen zeigen und über ihr eigenes Immunsystem Antikörper produzieren. Diese Antikörper sind polyklonal, d.h. sie sind gegen mehrere Regionen des Antigens gerichtet. Durch Entnahme von Blut und der Aufreinigung des Blutserums (Antiserum) können die polyklonalen Antikörper gewonnen und für die weitere Verwendung gelagert werden. Um spezifische Antikörper zu gewinnen, welche gegen ein spezifisches Epitop des Antigens gerichtet sind, werden Lymphozyten (welche die Antikörper sekretieren) aus einem zuvor immunisierten Säugetier isoliert und über Standard-Krebszellkulturen immortalisiert. Die daraus resultierenden Zellen zeichnen sich durch kontinuierliche Zellproliferation und Sekretion von Antikörpern aus und werden als Hybridoma-Zellen bezeichnet. Durch Vereinzelung und Isolierung von Hybridoma-Zellkulturen ist es so möglich, Zellklone, welche identische Antikörper gerichtet gegen ein spezifisches Epitop (monoklonale Antikörper) synthetisieren, zu erzeugen. In der heutigen Forschung finden Antikörper noch immer breite Anwendung, bspw. der Durchflusszytometrie, Immunpräzipitation oder Western-Blot-Analyse von Proteinen.

Die Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern kann dabei über mehrere chemische Gruppen erfolgen. Die meisten Markierungsstrategien beruhen auf der chemischen Kopplung an primäre Amine (-NH₂), Sulfhydrylgruppen (-SH) oder Kohlenhydrate (Zucker). Die Modifikation von Kohlenhydraten hat neben ihren Vorteilen (z.B. Vorkommen am Fc-Fragment und daher wenig Störung an den variablen, Antigen-bindenden Bereichen des Antikörpers) auch Nachteile. So müssen Kohlenhydrate zunächst chemisch aktiviert werden, da nur die Aldehyd-Gruppen effizient mit primären Aminen oder anderen Reagenzien umgesetzt werden können. Die Markierung über Sulfhydrylgruppen geschieht über native Cysteine, welche im intakten Antikörper die einzelnen Fragmente über Disulfidbrücken stabilisieren. Diese Markierungsart erfordert zwar eine Reduktion der Thiole zu freien Sulfhydryl-Gruppen, führt jedoch zu keiner Modifikation der variablen Regionen.

Eine dritte Möglichkeit der Markierung von Antikörpern liegt in der Reaktion zwischen primären Aminen und N-Hydroxysuccinimidylestern (NHS-Ester). Die Methode wird häufig verwendet, da die natürliche Aminosäure Lysin ein primäres Amin enthält und Oberflächen-exponiert in Antikörpern vorkommt. Ein Vorteil dieser Methode ist die breite Palette an kommerziell erhältlichen Enzymen und Fluoreszenzfarbstoffen, welche eine voraktivierte NHS-Gruppe besitzen. Ein Nachteil dieser Markierungsstrategie ist jedoch, das Vorkommen intrinsischer Lysine auch in der Antigen-bindenden variablen Region. Die Modifizierung dieser Lysine über NHS-Ester kann zu einer Abnahme der Antigen-Bindung und somit zu Unspezifität führen.

2.2.2 Fluoreszenzproteine

Mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde die Klasse der fluoreszierenden Proteine (FP) begründet. Diese Klasse zeichnet sich durch homologe Proteinstrukturen sowie der spontanen Ausbildung eines Chromophors über Aminosäure-Wechselwirkungen aus. Das GFP ist ein ~27 kDa großes Protein, bestehend aus 238 Aminosäuren. Es bildet über eine Reihe von posttranslationalen Modifikationen der drei Aminosäuren Serin (S65), Tyrosin (Y66) sowie Glycin (G67) ein chromophores System mit einem Absorptionsmaximum bei ~400 nm aus. Die Relevanz der genetisch-kodierbaren FPs wurden jedoch schnell erkannt und ihre photophysikalischen und biochemischen Eigenschaften stetig verbessert (Ries et al., 2012). So gelang es bspw. über eine Punktmutation S65T (Serin zu Threonin an der Aminosäure 65) das Absorptionsmaximum auf 488 nm zu verschieben (Heim et al., 1995).

Weitere Modifikationen und Variationen der Proteinstruktur sowie der Aminosäure-Reihenfolge folgten, sodass man heute zwischen dutzenden verschiedenen Fluoreszenzproteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften unterscheidet. Aufgrund seiner Größe sowie einfachen Implementierbarkeit sind fluoreszierende Proteine ein wichtiges Werkzeug in molekularbiologischen Fragestellungen geworden und finden breite Anwendung in biologischen Bildgebung und Proteinanalyse (Chudakov et al., 2010; Rodriguez et al., 2017).

Heute existieren eine Reihe von photoaktivierbaren bzw. photokonvertierbaren FP, die durch Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge entweder von einem nicht-fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand überführt oder das Absorptionsmaximum ihrer Emissionswellenlänge verschieben können. Auch zeigen FP unterschiedliche Fluoreszenzlebenszeiten oder lassen sich als Biosensoren, welche bei Umgebungsänderungen (z.B. pH-Wert Änderungen oder Kalziumkonzentration) ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern, verwenden.

2.2.3 Bioorthogonale Click-Reaktionen

Im folgenden Kapitel werden eine Reihe von chemischen Reaktionen, welche bei allen Fluoreszenzmarkierungen eine grundlegende Rolle spielen, erläutert (Abbildung 7). Vor allem bei der Modifikation und Markierung von Biomolekülen sind Spezifität und Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Komponenten ebenso wichtig wie Kompatibilität mit den jeweiligen biologischen Systemen. Der Begriff der Bioorthogonalität wurde in diesem Zusammenhang erst im Jahre 2003 verwendet (Hang et al., 2003) und beschreibt die Verwendung von Reaktionspartnern welche nicht natürlich in biologischen Systemen vorkommen, keine Kreuzreaktivität zu bestehenden, in den Zellen vorkommenden, Molekülen zeigen sowie keine zytotoxischen Nebenprodukte produzieren oder benötigen (Devaraj, 2018; Sletten und Bertozzi, 2009).

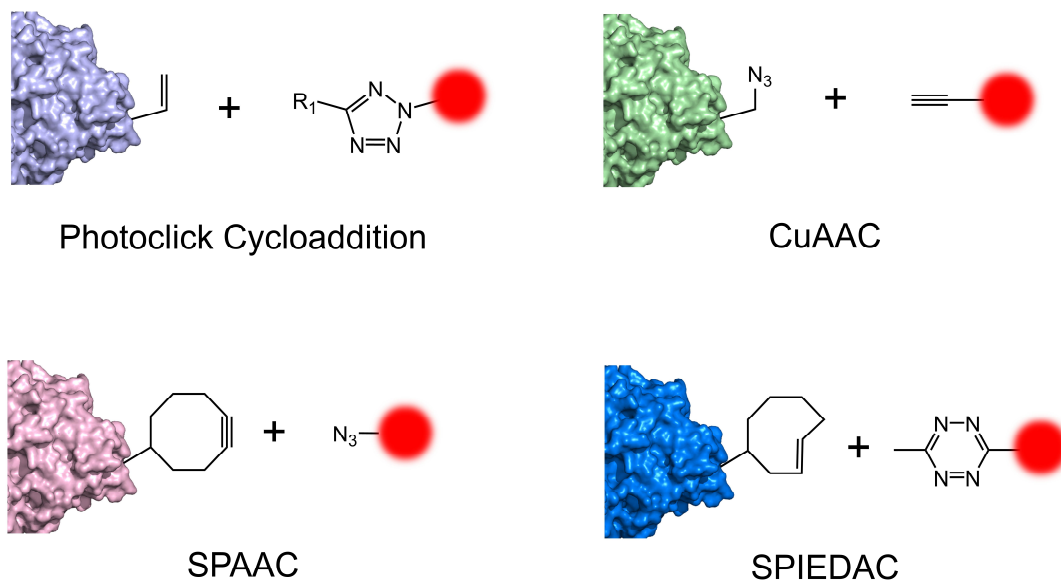


Abbildung 7 - Überblick über die häufigsten bioorthogonale Markierungsmethoden. Photoinduzierte Cycloaddition (Photoclick Cycloaddition). Kupfer-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC). Kupferfreie Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC). Kupferfreie Alken-Tetrazin Cycloaddition (SPIEDAC).

Bei den damals verwendeten Reaktionspartnern handelte es sich um eine Azid-funktionalisierte Zelloberfläche und einem Phosphin-modifizierten Biotin, welche über eine Staudinger-Ligation eine kovalente Markierung der Zellmembranen mit Biotin ermöglichten. Aufgrund der relativ kleinen Größe sowie geringer Kreuzreaktivität von Azid-funktionalisierten Molekülen, finden Staudinger-Ligationen breite Anwendung in der Modifizierung von Oberflächen und Zellmembranen.

Eine weitere Möglichkeit zur chemischen Kopplung an Azid-modifizierten Molekülen ist ihre Reaktion mit Alkinen (1,3-dipolare Cycloaddition). Durch Zugabe von geringen, katalytischen Mengen Kupfer(I) ist es möglich, diese Click-Reaktion im wässrigen Medium zur kovalenten Kopplung von Biomolekülen in fixierten und Lebendzell-Bedingungen zu verwenden. Nichtsdestotrotz kann die Verwendung von Kupfer(I) negativen Einfluss auf die Zellviabilität sowie metabolischen Prozesse von Zellen haben und Zelltoxizität zeigen. Eine Weiterentwicklung der kupfer-katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) stellt die Verwendung von gespannten Cyclooctin-Rings in

Kombination mit Azid-modifizierten Molekülen dar (engl., strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC). Die Ringspannung des Alkins ist hierbei ausreichend, um eine schnelle Reaktion ohne Zugabe toxischer Katalysatoren zu gewährleisten. Derartige Reaktionen werden daher häufig in Lebzellen-Experimenten verwendet. Eine weitere Variation ist die sogenannte photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition. Sie basiert auf einer Licht-induzierten Abspaltung molekularen Stickstoffs aus einer Tetrazol-Verbindung, welche zur Bildung eines 1,3-Nitrilimins führt und anschließend spontan mit einem Alkene zyklisiert. Eine weitere Möglichkeit der bioorthogonalen Click-Reaktion stellt die Kombination von Tetrazinen mit gespannten Alkenen dar. Derartige Reaktionen zeigen Reaktionsraten, welche drei Größenordnungen größer sind als zuvor optimierte SPAAC-Reaktionen und eignen sich daher hervorragend für die schnelle Markierung von Biomolekülen. Die Reaktion zwischen einem Dien (z.B. 1,2,4,5-Tetrazinen) und verschiedenen Dienophilen (wie z.B. trans-Cycloocten, TCO) erfüllt hierbei alle Kriterien für bioorthogonale Reaktionen, da sie schnell, chemoselektiv und ohne Zugabe von Katalysatoren ablaufen und nicht mit zelleigenen Molekülen kreuzreagieren. Eine Diels-Alder [4+2]-Cycloaddition führt zur Bildung eines sechsgliedrigen Rings (Pyridazin) (Abbildung 8).

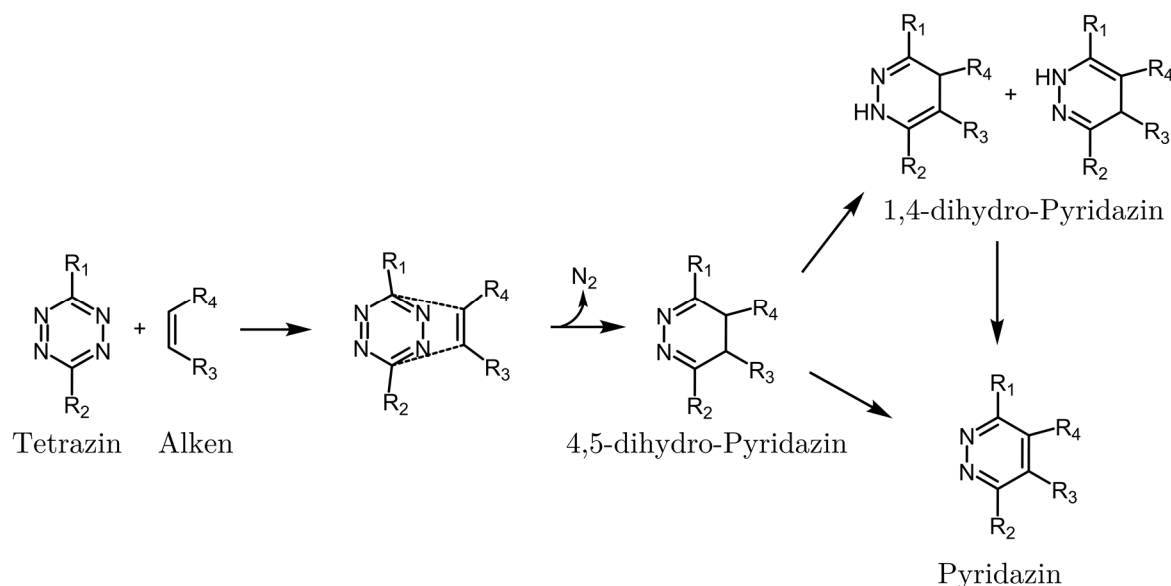


Abbildung 8 - Reaktionsschema der Diels-Alder [4+2]-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf zwischen einem 1,2,4,5-Tetrazin und einem Alken. Als Endprodukt dieser Reaktion steht ein Pyridazin-Derivat.

Im Gegensatz zu einer klassischen Diels-Alder Reaktion, bei der ein elektronenreiches Dien mit einem elektronenarmen Dienophilen reagiert, handelt es sich bei der Diels-Alder Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf um ein elektronenreiches Dienophil (z.B. TCO) und einem elektronenarmen Dien (Tetrazin). Über eine 1,4-Addition des (-C=N-N=C-) Diensystems eines Tetrazins mit einem geeigneten Alken kommt es unter Abgabe von Stickstoff (N₂) zur Bildung des Zwischenprodukt 4,5-dihydro-Pyridazin. Dies isomerisiert daraufhin zu 1,4-dihydro-Pyridazin, welches zu Pyridazin oxidiert werden kann. Die Reaktion von Tetrazin mit Alkinen ist ebenfalls möglich, führt jedoch direkt zur Bildung des Pyridazin.

Bei gespannten Dienophilen wie bspw. trans-Cycloocten (TCO) oder bi-Cyclononin (BCN) spricht man dann von einer Ringspannungs-unterstützten Diels-Alder Cycloaddition mit umgekehrten Elektronenbedarf (engl. strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition, SPIEDAC).

2.3 Zielproteine

2.3.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren

Glutamatrezeptoren spielen eine grundlegende Rolle bei der neuronalen Transmission im Gehirn und lassen sich grundsätzlich in zwei Gruppen einteilen: die ionotropen und die metabotropen Glutamatrezeptoren (Dingledine et al., 1999). Bei den metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) unterscheidet man drei Klassen (Klasse I-III), welche vor allem second-messenger-Systeme, wie z.B. cAMP oder Ca²⁺, nutzen und eine wichtige Rolle im Lernprozess oder Gedächtnis spielen. Bei den ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR) unterscheidet man zwischen NMDA-, AMPA und Kainat-Rezeptoren, welche als Liganden-gesteuerte Ionenkanäle eine wichtige Rolle in der exzitatorischen Nervweiterleitung spielen und fundamental für die Funktionen des zentralen Nervensystems sind. Die Namensgebung beruht auf der Bindung spezifischer Agonisten (Watkins und Jane, 2006). So bindet bspw. der AMPA-Rezeptor α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure (AMPA), der NMDA-Rezeptor N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und der Kainat-Rezeptor das namensgebende Kainat. Rezeptoren aus der Klasse der iGluR finden sich sowohl in der Prä- als auch Postsynapse von Nervenzellen. Sie bestehen aus vier Domänen: der extrazellulären aminoterminalen Domäne (ATD), der extrazellulären Liganden-bindenden Domäne (LBD), vier Transmembrandomänen (TMD) und einer intrazellulären Carboxylterminaldomäne (CTD) (Abbildung 9).

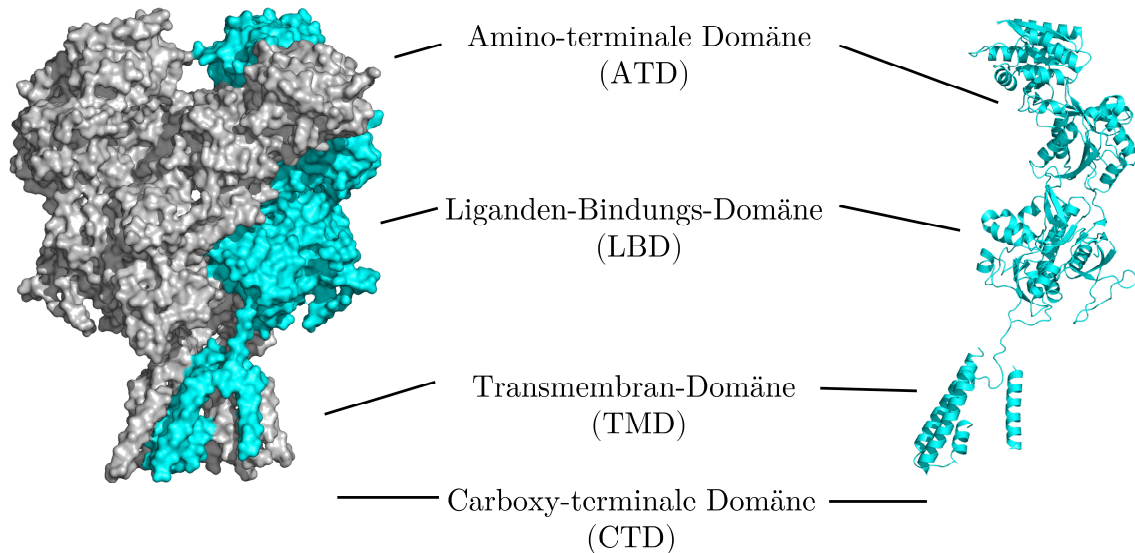


Abbildung 9 - Schematischer Aufbau der ionotropen Glutamaterezeptoren (NMDA-Rezeptor, PDB: 4PE5).

Als Kationenkanäle (Na^+ , K^+ oder Ca^{2+}) führt die Aktivierung der iGluR zur Generierung eines Aktionspotenzials und trägt maßgeblich zu Lernprozessen und zur synaptischen Plastizität bei. Eine übermäßige Stimulation der iGluR kann jedoch zu Störungen der Erregbarkeit und zur Überreizung führen, sodass die Aufnahme von Glutamat und die Funktion der Nervenzellen gestört werden kann. Derartige neurodegenerative Erkrankungen machen iGluR zu einem interessanten Ziel für therapeutische Behandlungen.

Die AMPA-Rezeptoren (GluA) zählen gemeinsam mit den NMDA-Rezeptoren zu den am häufigsten in Neuronen und Gliazellen auftretenden iGluR und sind eine der wichtigsten Modulatoren synaptischer Plastizität, da bspw. die Rezeptordichte auf postsynaptischer Seite maßgeblich die Geschwindigkeit der exzitatorischen neuronalen Transmission beeinflusst und dadurch schneller auf ankommende Aktionspotenziale reagiert werden kann. Die Durchlässigkeit für Ca^{2+} -Ionen wird durch die GluA2-Untereinheit vermittelt. Die posttranskriptionale Modifikation einer Aminosäure in der Transmembrandomäne (Q>R), ermöglicht so die Ionendurchlässigkeit. Das Verhältnis

zwischen Ionen-durchlässigen zu –undurchlässigen Rezeptoren spielt bei vielen Krankheiten eine wesentliche Rolle, da ein übermäßiger bzw. unkontrollierter Ca^{2+} -Einstrom das Membranpotenzial der Neuronen empfindlich stören und sogar zum kontrollierten Zelltod (Apoptose) führen kann.

Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren (GluN) benötigt neben Glutamat zusätzlich die Bindung von Glycin, welche an der Glycin-Bindestelle in den Untereinheiten GluN1 und GluN3 binden. Prinzipiell sind NMDA-Rezeptoren nicht Kationen-spezifisch und ermöglichen den Einstrom von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} . Die Bindung von Magnesium (Mg^{2+}) führt dabei zur Inhibierung der GluN, sodass selbst bei Glutamat-Bindung keine effiziente Rezeptoraktivierung stattfindet. Das postsynaptische Potenzial muss zuvor über AMPA-Rezeptoren durch Einstrom von Na^+ und K^+ vermittelt werden, sodass es zu einer starken Depolarisation der Membran kommt und Magnesium-Ionen die GluN nicht mehr blockieren können. Die Aktivierung der GluN ist also sowohl Liganden-gesteuert als auch spannungsabhängig, da sie sowohl Glutamatbindung als auch einen starken depolarisierenden Stimulus erfordert. Die GluN-vermittelte Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung kann als sekundärer Botenstoff (engl. second messenger) wiederum eine Hochregulierung von AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran verursachen, und so zu einer Verstärkung der synaptischen Aktivität und Langzeitpotenzieren (engl. long-time potentiation, LTP) führen. Störungen der GluN-Funktionalität sind oftmals mit schweren neurodegenerativen Krankheiten assoziiert. Eine der schwerwiegendsten Erkrankungen stellt dabei die Anti-NMDA-Enzephalitis dar. Hierbei produzieren Betroffene sog. Autoimmun-Antikörper, welche eine Internalisierung der GluN und damit einhergehend eine Erniedrigung der GluN-Dichte auslösen. Diese Störung des GluR-Gleichgewichts führt vor allem im Hippocampus, einem Gehirnareal mit hoher GluR-Dichte, zu massiven Beeinträchtigungen bei der Reizweiterleitung und verursachen bei Betroffenen diverse Schizophrenie-ähnliche Krankheitssymptome wie Gedächtnisverlust und Psychosen. Krankheitsbilder wie diese machen die GluN-Rezeptorklasse zu einem hochinteressanten Zielprotein für therapeutischen Wirkstoffe und stehen deshalb verstärkt im Fokus der medizinischen Glutamatforschung (Dong et al., 2009).

Die Klasse der Kainat-Rezeptoren (GluK) stellt die dritte Unterklasse der iGluR dar. GluK benötigen zur Aktivierung Na^+ - und Cl^- -Ionen auf extrazellulärer Seite und sind zusammen mit den GluA und GluN in (beinahe) allen Bereichen des zentralen Nervensystems zu finden. Im Gegensatz zu den anderen GluR können Kainat-Rezeptoren jedoch auch über G-Protein gekoppelte Signalwege die Erregbarkeit der postsynaptischen Membran beeinflussen und (ähnlich zu den mGluR) Ionen-unabhängig die Freisetzung von Neurotransmittern modulieren. Die GluK finden sich sowohl auf postsynaptischer Seite, wo sie ähnlich zu den anderen GluR den postsynaptischen Strom weiterleiten, als auch an präsynaptischer Seite, wo sie die Neurotransmitter-Freisetzung in inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen steuern. Ihre Rolle in diversen neurodegenerativen Krankheiten wie Autismus, Epilepsie und Schizophrenie verdeutlicht zwar ihre Relevanz in der Krankheitsentstehung von Hirnerkrankungen, jedoch ist diese Rezeptorklasse im Vergleich zu den GluA und GluN weitestgehend unerforscht (Lerma, 2003).

2.3.2 Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR1)

Die Tumor-Nekrose-Faktor(TNF)-Superfamilie umfasst 19 Liganden und 29 Rezeptoren im Menschen und spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstums- und Entzündungsprozessen. Häufig besitzen TNF-Rezeptoren (TNFR) eine hochkonservierte, Cystein-reiche extrazelluläre Proteindomäne, welche verschiedene Liganden binden kann (Abbildung 10). Zu den ersten entdeckten Liganden dieser Rezeptorklasse zählen TNF- α und Lymphotoxin- α (früher als TNF- β bezeichnet), welche am ersten identifizierten TNF-Rezeptor TNFR1 binden (Aggarwal et al., 1987; Wajant et al., 2003). Diese sind meist zwischen 5-20kDa groß und sind wichtig bei verschiedenen Prozessen der Zellteilung, -vermehrung und -regulation. Die Namensgebung lässt sich auf medizinische Studien im späten 19. Jahrhundert zurückführen, bei denen beobachtet werden konnte, dass es bei einigen Krebspatienten, die zusätzlich mit einem infektiösen Krankheitserreger der Gattung Streptokokken befallen waren, zu einer verstärkten Immunantwort und Zurückbildung der Tumore kommen konnte. Das später identifizierte Protein, welches zu diesem Effekt führte, wurde deshalb als Tumor-Nekrose-Faktor (nekrosis, griechisch für Töten oder Absterben) bezeichnet.

Der Ligand TNF- α kann dabei entweder als membranständiges Protein mit einer Transmembrandomäne oder als lösliche TNF-Homologiedomäne (sTNF) vorliegen.

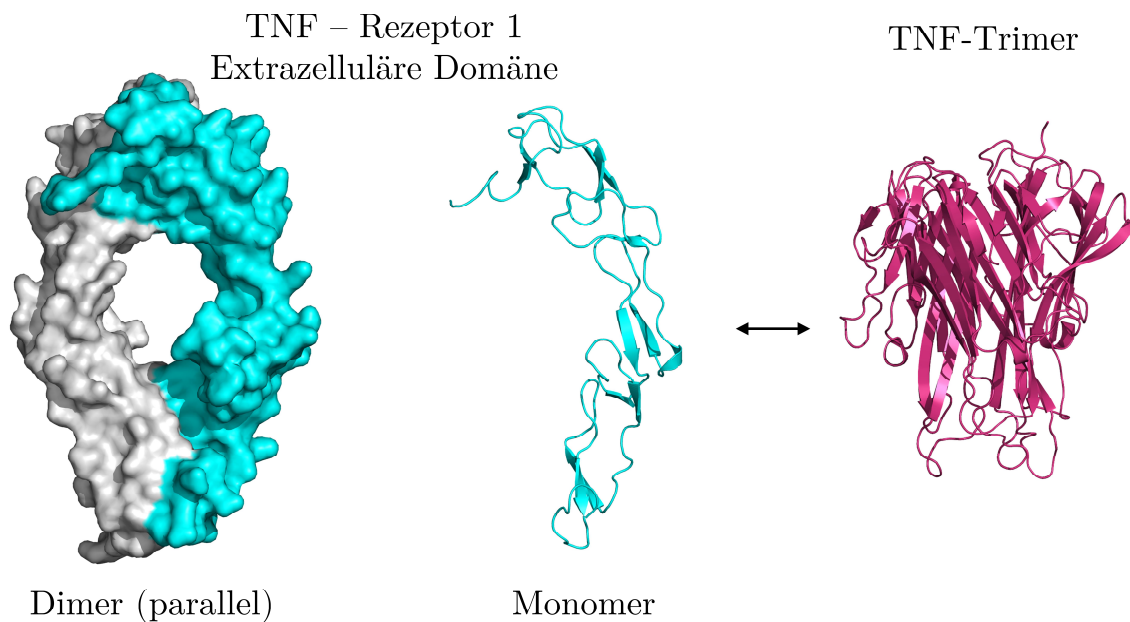


Abbildung 10 - Kristallstruktur des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1, PBD: 1NCF) und des löslichen trimerisierten TNFR-Liganden (PBD: 1TNF).

Das sTNF (~17kDa) entspricht dem aminoterminalen Bereich, welcher proteolytisch von der Transmembrandomäne und intrazellulären Domäne getrennt wurde. Diese löslichen TNF-Domänen bestehen aus zwei dicht-gepackten anti-parallel angeordneten β -Faltblättern, welche selbstständig funktionale Trimere formen. Die Aktivierung durch TNF- α führt zur Trimerisierung des TNFR1-Rezeptors und zur Assoziation der sogenannten Todesdomänen (engl. death domains, DD), welche auf intrazellulärer Seite lokalisiert sind. Dies führt zur Rekrutierung verschiedener Adapterproteine wie bspw. dem TNFR-assoziierten Todesdomänen Protein (TRADD) oder dem Fas-assoziierten Todesdomänen Protein (FADD). Über Pro-Caspase 8 kommt es dadurch zu einer Aktivierung der Caspase-8, welche als Protease zu einer Reihe von kontrollierten Proteinspaltungen und letztlich zum kontrollierten Zelltod führt (Li et al., 2013).

Zur Visualisierung von TNFR1 gibt es verschiedene Markierungsstrategien: Kommerziell erhältliche Antikörper, welche gegen den extrazellulären Bereich gerichtet sind und diesen spezifisch binden. Jedoch führt diese Art der Immunofärbung aufgrund der relativ großen Antikörper zu negativen sterischen Effekten, sodass Antikörper-gebundene TNFR1 verminderte Rezeptorinteraktionen eingehen können und vor allem Lebendzell-Beobachtungen erschwert werden. Alternativ ist es möglich, den Liganden TNF- α direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln.

Diese Vorgehensweise zeichnet sich zwar durch kleine Markierungsgröße und dadurch verminderte Störung der Rezeptorfunktionalität aus, führt jedoch zur gleichzeitigen Aktivierung der Rezeptoren.

2.3.3 Zytoskelett

Das Zellinnere einer eukaryotischen Zelle enthält ein dynamisches und filamentöses Netzwerk, das sogenannte Zytoskelett. Das Zytoskelett hat mehrere Funktionen innerhalb der Zelle: es bestimmt die Zellform, ist entscheidend an der Zellbewegung und Zellteilung beteiligt und dient als Transportnetzwerk von Biomolekülen. Generell wird zwischen Mikrotubuli, Aktin-, und Intermediärfilamenten unterschieden. Keines dieser Filamente ist starr, vielmehr bauen sie sich stetig auf (Polymerisation) und ab (Depolymerisation) und können so flexibel auf verschiedenste Anforderungen der Zelle reagieren.

Das Aktin-Filament (auch als filamentöses Aktin oder F-Aktin bezeichnet) besteht aus einer Aneinanderreihung einzelner Aktin-Proteine (globuläres Aktin, G-Aktin). Es wird zusätzlich zwischen α -Aktin, welches vor allem im Skelett-, Herz- und glatten Muskelbereich exprimiert wird, sowie β - und γ -Aktin, welches auch außerhalb des Muskelgewebes vorkommt, unterschieden. Die Funktionen von Aktin-Filamenten reichen von strukturgebenden Aufgaben, wie der Erhaltung der Zellform und Bewegung der Zelle, bis hin zu intrazellulären Prozessen, wie Transport von intrazellulären Organellen und anderen Biomolekülen. Die Polymerisation von F-Aktin benötigt Energie in Form von ATP. In einem eher langsamen Prozess finden sich einzelne Aktin-ATP-Komplexe zu kurzkettigen Oligomeren zusammen, ehe es zum Wachstum zum langen Filament kommt, wobei zwei Protofilamente zur Erhöhung der Stabilität eine intrinsische Drehung (rechtsgewundene Helix) formen (Abbildung 11). Insbesondere bei Transportprozessen sind Aktin-Filamente in zahlreiche Protein-Interaktionen verwickelt. Neben zahlreichen Aktin-bindenden Proteinen, welche die Bildung und Funktionalität von Aktinfilamenten beeinflussen, gibt es einige Biomoleküle, die vor allem als Gifte (Toxine) die Funktion und Ausbildung von Aktinfilamenten inhibieren. Diese Toxine können die Aktin-Dynamik durch Störung der Polymerisation entweder inhibieren (wie bspw. Latrunculin oder Cytochalasin D) oder F-Aktin stabilisieren (wie bspw. Phalloidin aus dem grünen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*) und dessen Depolymerisation verhindern.

Beide Arten der biochemischen Inhibierung werden auch in der mikroskopischen Bildgebung verwendet, da diese Toxine verhältnismäßig einfach modifiziert und zur spezifischen Färbung von Aktin-Filamenten genutzt werden können.

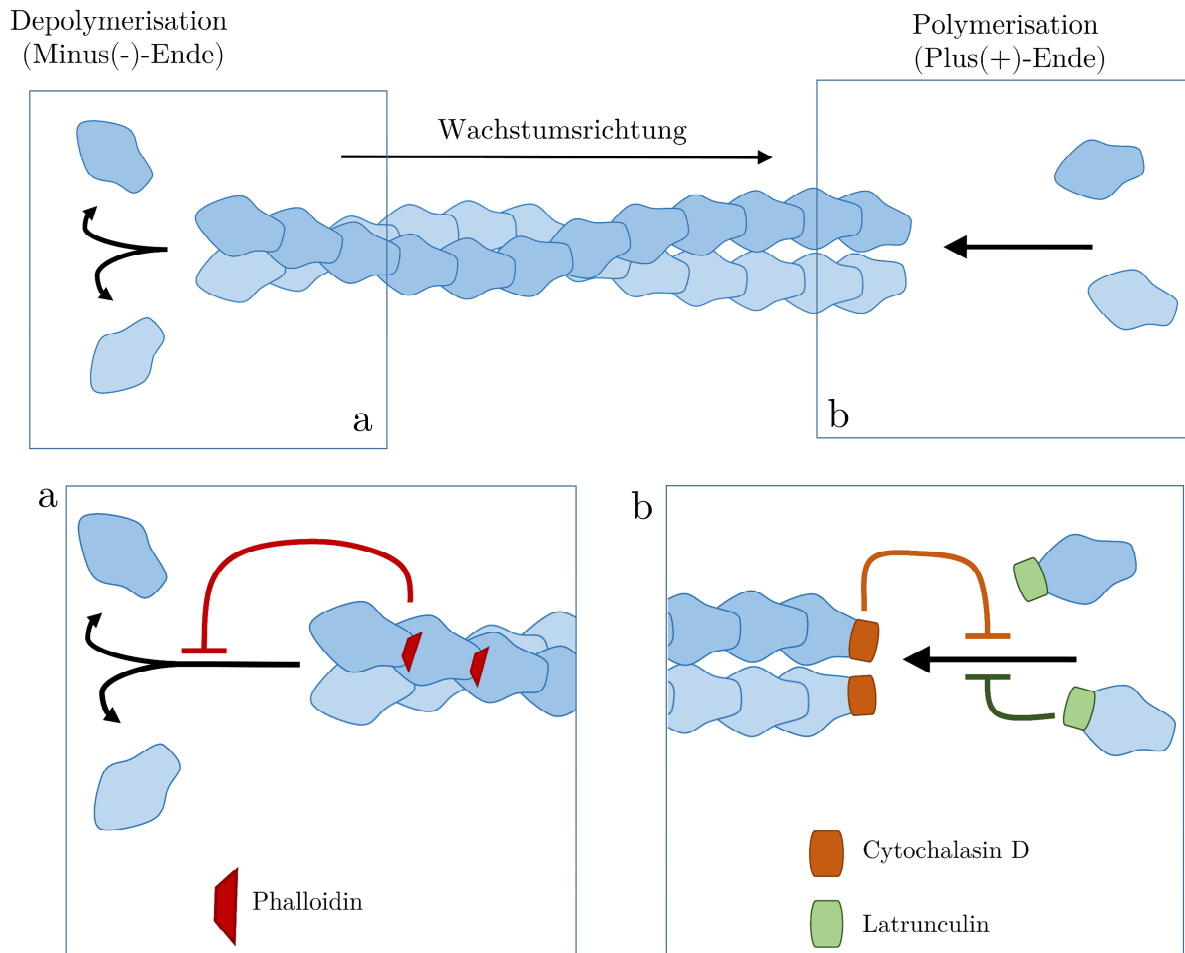


Abbildung 11 – Struktur und Aufbau eines Aktin-Filaments sowie die Effektormoleküle Phalloidin, Cytochalasin D und Latrunculin, welche den Abbau bzw. das Wachstum verhindern.

Ein weiterer Bestandteil des Zytoskeletts stellen die Mikrotubuli dar. Mikrotubuli sind röhrenförmige Filamente, bestehend aus einzelnen Proteinuntereinheiten (Tubulin), welche aus einem Dimer aus α - und β -Tubulin aufgebaut sind (Abbildung 12). Die Strukturen der α - und β -Tubulin Untereinheiten sind ähnlich. Sie zeigen beide eine globuläre Form und die Fähigkeit GTP zu binden, wohingegen nur β -Tubulin eine

GTPase-Aktivität zeigt und GTP zu GDP hydrolysieren kann. Mikrotubuli sind hochdynamisch: sie wachsen und schrumpfen häufig mit einer schnellen, aber konstanten Geschwindigkeit (dynamische Instabilität). Es kann hierbei sowohl zur Polymerisation als auch zur Depolymerisation des Tubulinstrangs in Wachstumsrichtung (Plus-Ende) kommen. Aufgrund der erhöhten Stabilität von GTP-gebundenen β -Tubulin kommt es an den Plus (+)-Enden zu vermehrt zur Polymerisation, während die Hydrolyse von GTP zu GDP eine Depolymerisation am Minus(-)-Ende hervorruft (Mitchison und Kirschner, 1984). Die depolymerisierten Tubulindimere werden durch den Austausch des GDP mit GTP wiederverwertet (Abbildung 12).

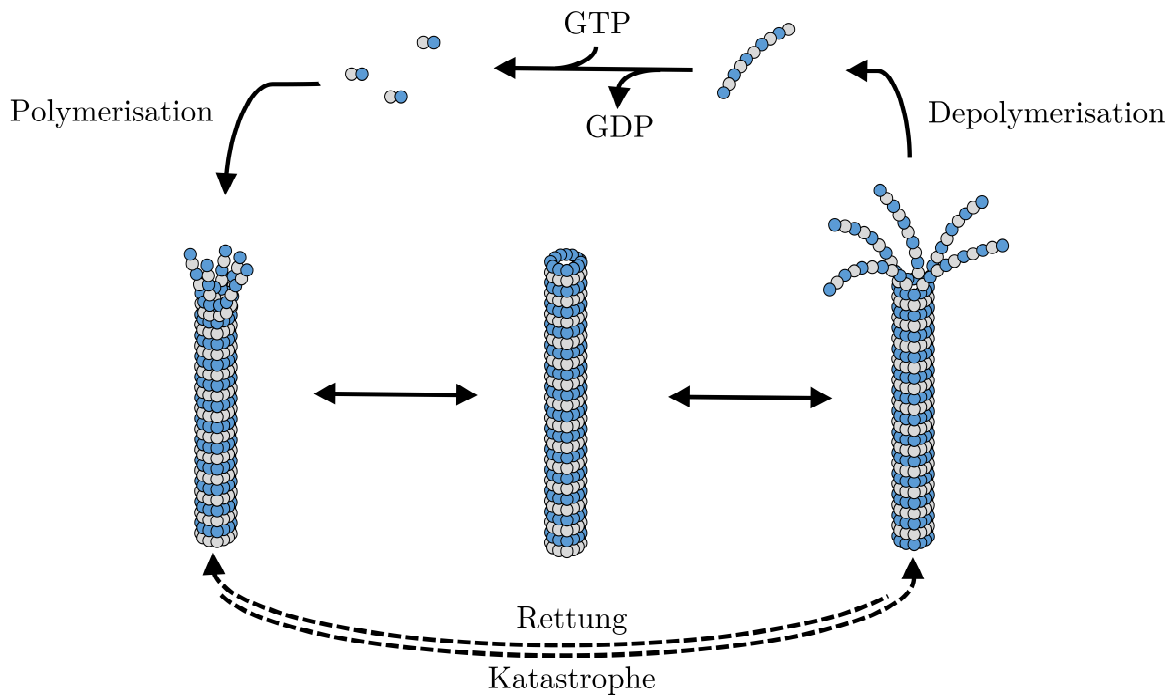


Abbildung 12 – Struktur, Aufbau (Polymerisation) und Abbau (Depolymerisation) von Mikrotubuli. Der dynamische Auf- und Abbau eines Mikrotubuli-Strangs (dynamische Instabilität) ist hierbei reversibel und bidirektional (Rettung bzw. Katastrophe).

Das Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) steuert die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli, wodurch der geordnete Aufbau ermöglicht wird. Es spielt daher eine wesentliche Rolle bei der Zellpolarität- und Motilität. In eukaryotischen Zellen unterscheidet man zusätzlich in Zentrosom, Basalkörper und Spindel-Pol-Körper, welche verschiedene Formen des MTOC darstellen.

Mikrotubuli besitzen jedoch ebenfalls eine Fülle an Interaktionspartnern, sogenannte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP), welche ihre Stabilität und Funktionalität beeinflussen können. Sie lassen sich in Typ-I und Typ-II MAP unterscheiden. Die Typ-I MAP dienen der Positionierung und Verankerung der Mikrotubuli innerhalb der Zelle und verbinden MT mit anderen Zytoskelett-Bestandteilen oder membranständigen Proteinen. Die Typ-II MAP hingegen modulieren die Mikrotubuli-Dynamik und besitzen regulatorische Funktionen. MAP-2 oder τ -Proteine stabilisieren bspw. die MT-Filamente und verschieben das Gleichgewicht zugunsten der Polymerisation neuer Stränge durch Wechselwirkungen an der Außenseite der MT-Protofilamente.

Eine Reihe weiterer Proteine aus der Klasse der Mikrotubuli-assoziierten regulatorischen Proteine (MAPRE) wie z.B. EB1 und EB3 binden hauptsächlich an den Plus (+)-Enden der MT und zeigen dynamisch die Wachstumsrichtung von neu-polymerisierenden MT an. Andere MAP-Proteine wie z.B. MAP-7 (Enscosin) binden entlang eines gesamten MT-Filaments und lassen sich in Zellkulturlinien überexprimieren, ohne die Mikrotubuli-Dynamik signifikant zu beeinträchtigen (Abbildung 13). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die MT-Dynamik von Zellen, welche Enscosin-MAP-115 (EMTB) überexprimierten, nicht von der MT-Dynamik untransfizierter Zellen unterscheidbar war (Faire, 1999).

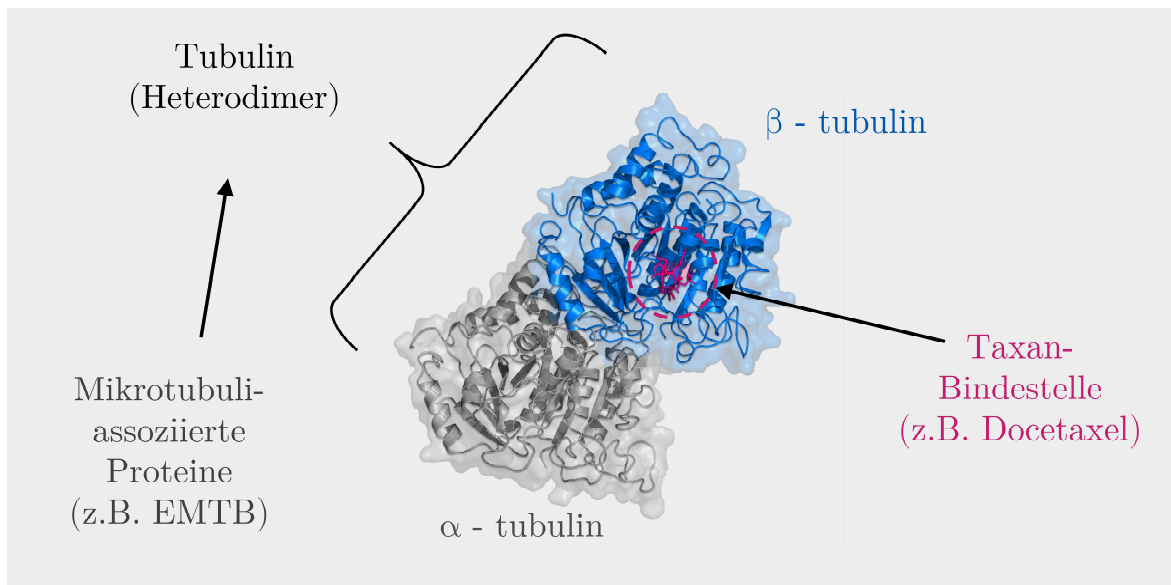


Abbildung 13 – Darstellung des α/β -Tubulin Heterodimers (Tubulin) sowie mögliche Interaktionsflächen mit assoziierten Proteinen (z.B. EMTB) oder Taxan-Verbindungen (z.B. Docetaxel).

Zusätzlich zu den MAP gibt es noch eine Reihe von chemischen Substanzen, welche Tubulin binden und so die MT-Dynamik beeinflussen können. Die meisten dieser Substanzen stammen aus der Klasse der Taxane (benannt nach der Pflanzengattung der Eibengewächse, lat. *Taxus*). Diese Moleküle binden und stabilisieren das GDP-gebundene β -Tubulin irreversibel und Inhibieren so die Depolymerisation der Mikrotubuli-Filamente. Durch diese anti-mitotischen Eigenschaften stellen Taxane eine beliebte Wirkstoffklasse in der Krebstherapie dar. Einige Vertreter dieser Klasse, wie bspw. Paclitaxel oder Docetaxel, werden bereits zur Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt.

Den dritten filamentösen Zytoskelettbestandteil stellen die Intermediärfilamente dar. Sie liegen mit ~ 10 nm Durchmesser zwischen den Aktin-Filamenten (~ 7 nm) und Mikrotubuli (~ 25 nm) und werden deshalb als Zwischenfilament (lat. *Intermedus*, der Dazwischenliegende) bezeichnet. Sie sind vor allem an Prozessen beteiligt, welche keine hohe Dynamik zeigen, wie z.B. Zelladhäsion und Zellstrukturerhaltung, sodass sie im Vergleich zu Aktin und Mikrotubuli als vergleichsweise stabil in den Zellen vorkommen und nicht stetig polymerisiert sowie depolymerisiert werden. Zudem unterscheidet sich der Polymerisations-mechanismus von dem der Aktin-Filamente und Mikrotubuli: es werden keine Nukleotide (wie z.B. ATP oder GTP) während der Polymerisation benötigt. Typischer Vertreter aus der Klasse der Intermediärfilamente sind Keratin (v.a. in Epithelzellen exprimiert), Vimentin (v.a. bei der Verankerung von Organellen beteiligt), Neurofilamente (ausschließlich in Neuronen exprimiert) und Lamin (Formerhaltung des Zellkerns).

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien sowie die dazugehörigen Methoden aufgelistet bzw. spezifiziert. Für alle selbst-hergestellten Lösungen wurde Reinstwasser (aufgereinigt durch Barnstead™ GenPure™ Pro Water Purification System mit >18 MOhm) verwendet.

3.1 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Puffer

Tabelle 1 - Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller (Bestellnummer)
Trypton	Melford Biolaboratories Ltd. (T60065)
Hefeextrakt	Melford Biolaboratories Ltd. (Y20025)
Salz (NaCl)	Sigma-Aldrich (S9888)
Bakteriologischer Agar	Sigma Aldrich (A5306)
Agarose	Sigma Aldrich (A9539)
5x Q5 Puffer	New England Biolabs (M0491S)
dNTPs	Sigma Aldrich (DNTP100-1KT)
Q5 DNA Polymerase	New England Biolabs (M0491S)
6x Gel Loading Dye	New England Biolabs(B7025S)
Quick-Load 2-log DNA Ladder	New England Biolabs (N0468S)
Ampicillin	Melford Biolaboratories Ltd. (A40040)
Kanamycin	Melford Biolaboratories Ltd. (K22000)
PBS	Sigma Aldrich (P549)
HBSS	Sigma Aldrich (55037C)
DMEM	Sigma Aldrich (D5796 und D8062)
TRIS	Sigma-Aldrich (T1503)
Borsäure	Merck (10043-35-3)
EDTA	Sigma-Aldrich (60-00-4)
FCS	Sigma-Aldrich (F7524)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (P4333)

3 Material und Methoden

Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich (#P6407)
MEA	Sigma-Aldrich (M6250)
Glukose	Sigma-Aldrich (49163)
Glukose-Oxidase	Sigma-Aldrich (G7141)
Katalase	Roche Applied Science
Tween-20	Sigma-Aldrich (P1379)
Safeview	Applied Biological Materials (Canada)
Triton-X	Sigma-Aldrich (T0307)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich (50-00-0)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (354400)

Tabelle 2 - Liste der verwendeten Gefäße

Probengefäß	Hersteller (Bestellnummer)
15ml Greiner	Merck
50ml Greiner	Merck
Erlenmeyerkolben	VWR
Bechergläser	VWR
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf
T25-Kulturflaschen	Thermo Fisher (156340)
LabTeks	Thermo Fisher (Nunc,155409)

Sonstige Puffer und Lösungen

Transformations-Puffer

- 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 7.5 % Glucose (pH 6,7)

Zytoskelett (engl. Cytoskeleton, CB) -Puffer

- 10 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM Glukose, 5 mM MgCl₂ (pH 6,1)

Schaltpuffer

Die dSTORM-Experimente mit Cy5 wurden in einem PBS-basierten Schaltpuffer (Photoswitching-Buffer) mit 100 mM β -Mercaptoethylamin (MEA, Sigma-Aldrich) und einem Sauerabfang-System (engl. oxygen scavenger system) (2 % (w/v) Glukose, 4 U/ml Glukose-Oxidase und 80 U/ml Katalase) durchgeführt. Für Cy5B und HMSiR wurde PBS (pH 7.4) ohne weitere Zusätze verwendet. Die Cy5B-Proben wurden zuvor mit 0,1% NaBH₄ (für 10min) behandelt.

Gelelektrophorese-Puffer (stock: 5x TBE 0,5l)

- 27g TRIS
- 13,8g Borsäure
- 10ml EDTA (0,5M, pH 8.0)

Bakterien-Flüssigkulturen (stock: 10x TY Medium 1l (pH 7.4))

- 80g Trypton
- 50g Hefeextrakt
- 25g NaCl

Autoklaviert (121°C, 15min)

Agar-Platten zur Selektion von Bakterienkolonien (2x TY-Platten 1l)

- 5g Trypton
- 2,5g Hefeextrakt
- 4g NaCl
- 7,5g Agar

Autoklaviert (121°C, 15min)

Fixier-Puffer

- Membranproteine: 4% Formaldehyd (+ 0,25% Glutaraldehyd) in HBSS bzw. PBS
- Intrazelluläre Zielproteine: 4% Formaldehyd + 0,1% Triton-X in CB-Puffer

Zur Präparation und Isolation von DNA wurden folgende kommerzielle Kits verwendet:

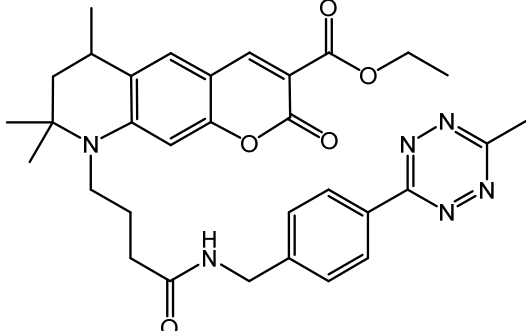
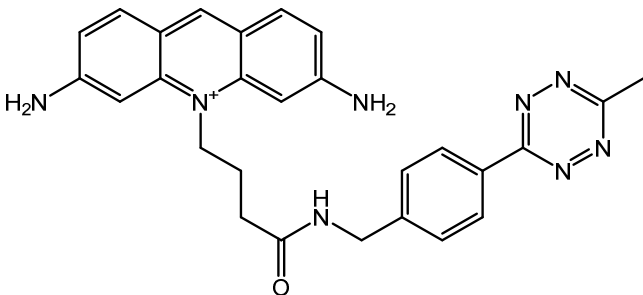
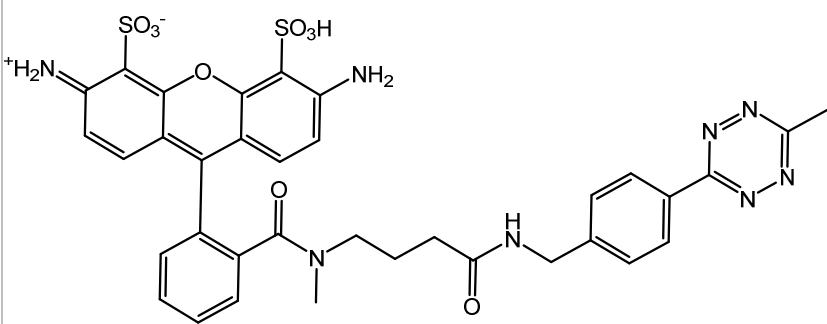
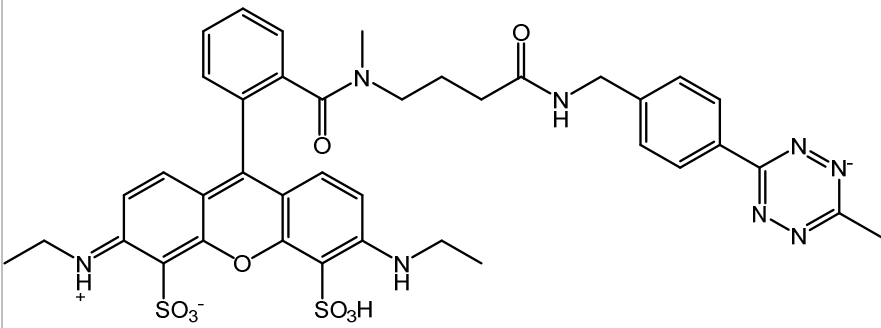
- High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, #11754777001)
- NucleoBond Xtra Midi EF Kit (Macherey-Nagel, #740420)

3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

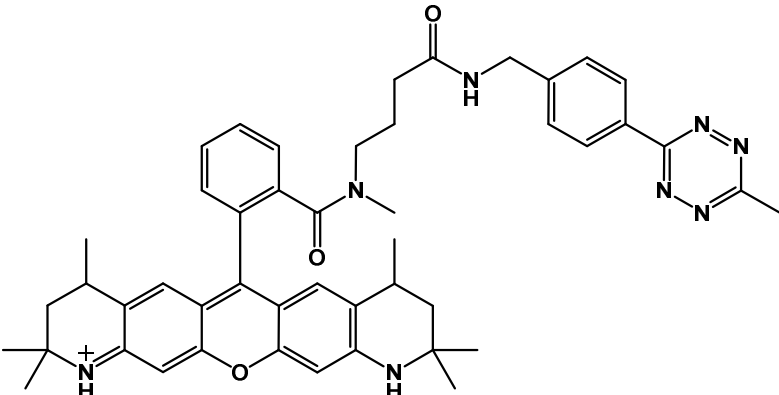
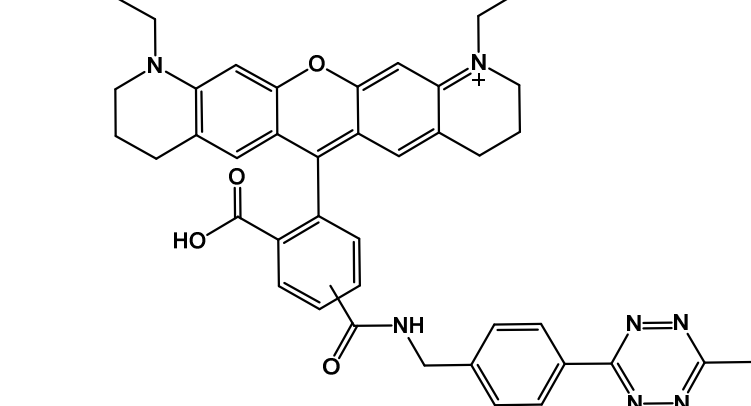
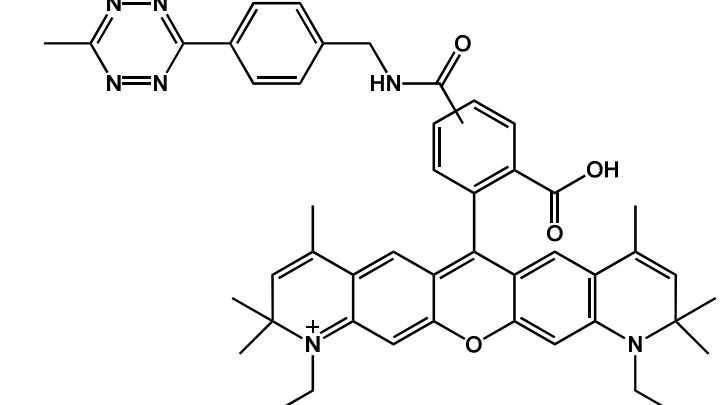
Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen, u.a. aus der Klasse der Oxazine, Rhodamine sowie Cyaninen, verwendet. Bei den Tetrazin-Derivaten wird unterschieden zwischen 3-phenyl-1,2,4,5-Tetrazinen (H-Tet) und 3-methyl-6-phenyl-1,2,4,5-Tetrazinen (Me-Tet).

Me-Tet-Derivate von ATTO425, ATTO465, ATTO488, ATTO550, ATTO565, ATTO590, ATTO594, ATTO620, ATTO655, ATTO680, ATTO700, AZ503, AZ519 und ATTO647N wurden von ATTO-TEC (Siegen, Germany) zur Verfügung gestellt. Me-Tet-ATTO532, H-Tet-Cy3, Me-Tet-5-TAMRA, H-Tet-Cy5 wurden bei Jena Bioscience (Jena, Germany) erworben. HMSiR-NHS wurde von MoBiTec (Göttingen, Germany) gekauft und Cy5B-NHS wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Martin Schnermann (NIH, Maryland) zur Verfügung gestellt. Beide NHS-Derivate wurden selbst an H-Tet gekoppelt und aufgereinigt. Me-Tet-JF₆₄₆ wurde von Dr. Luke Lavis (Janelia, HHMI, Virginia) bereitgestellt. H-Tet-SiR stammt von Spirochrome (Stein am Rhein, Schweiz). Alle bekannten Strukturformeln der, in dieser Arbeit verwendeten, Tetrazin-Farbstoffe stammen vom jeweiligen Hersteller.

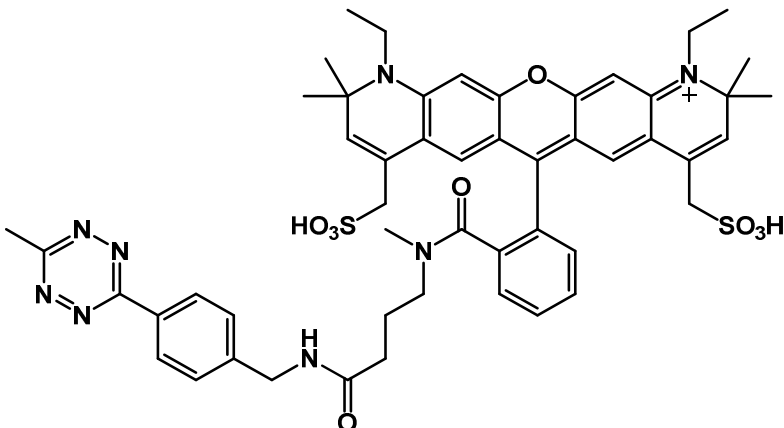
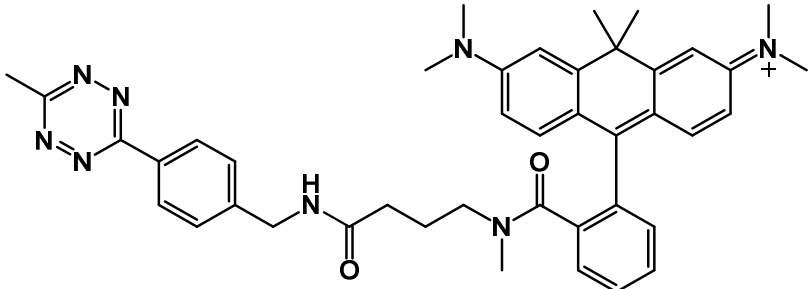
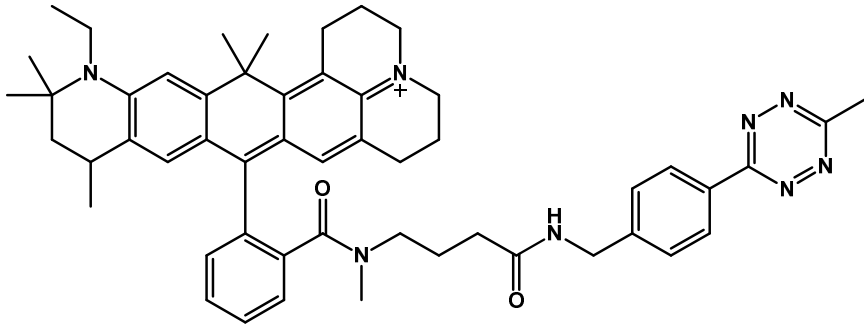
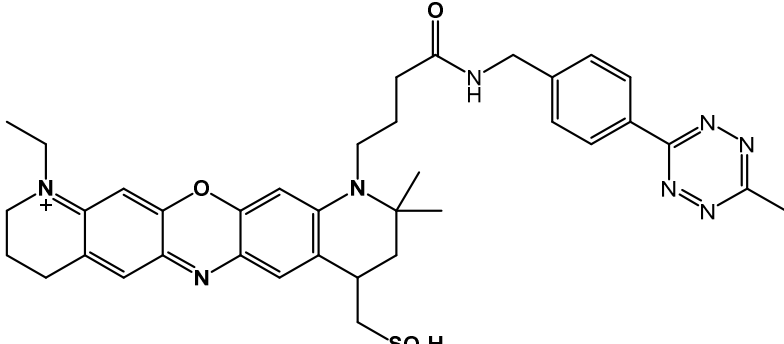
Tabelle 3 - Liste der verwendeten Tetrazin-Farbstoffe und Strukturformeln

Farbstoff	Strukturformel
Me-Tet-ATTO425	
Me-Tet-ATTO465	
Me-Tet-ATTO488	
Me-Tet-ATTO532	

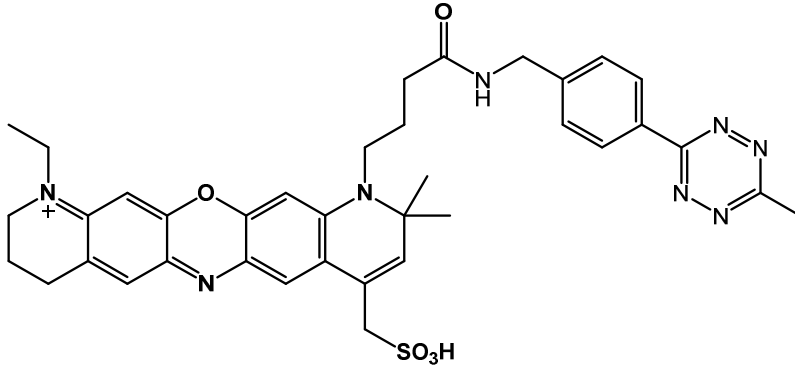
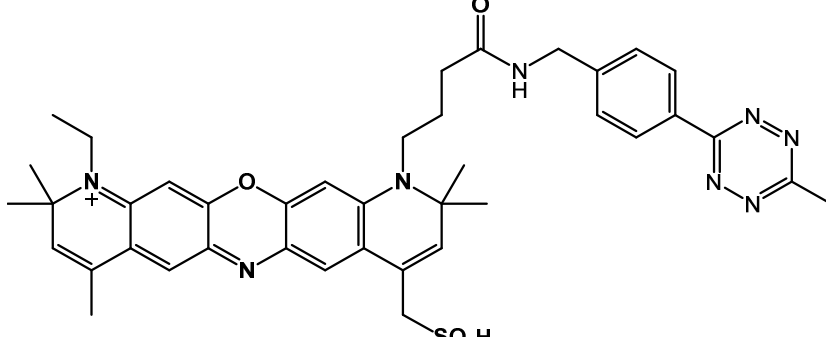
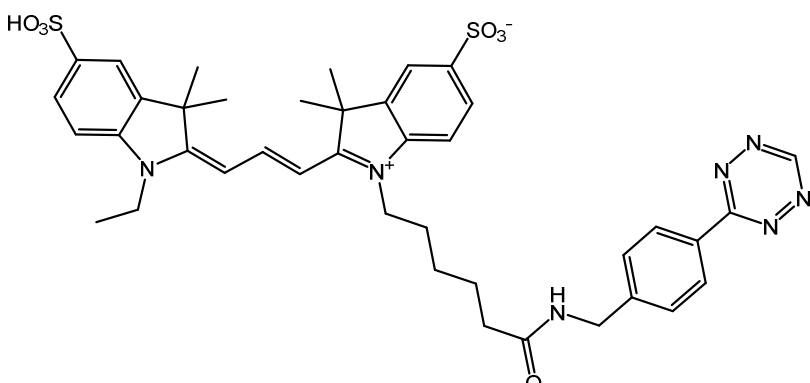
3 Material und Methoden

Me-Tet- ATTO550	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO550 features a central tetracycline core. It is substituted with a methylphenylacetamide group at the 7-position, a benzoyl group at the 8-position, and a 4-(4-methyl-1,2,4,5-tetrazol-2-yl)benzylamide group at the 12-position.</p>
Me-Tet- ATTO565	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO565 features a central tetracycline core. It is substituted with two ethyl groups on the nitrogen atoms at the 4 and 11 positions. At the 8-position, there is a 4-(4-methyl-1,2,4,5-tetrazol-2-yl)benzylamide group and a 4-carboxyphenyl group.</p>
Me-Tet- ATTO590	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO590 features a central tetracycline core. It is substituted with two ethyl groups on the nitrogen atoms at the 4 and 11 positions. At the 8-position, there is a 4-(4-methyl-1,2,4,5-tetrazol-2-yl)benzylamide group and a 4-carboxyphenyl group.</p>

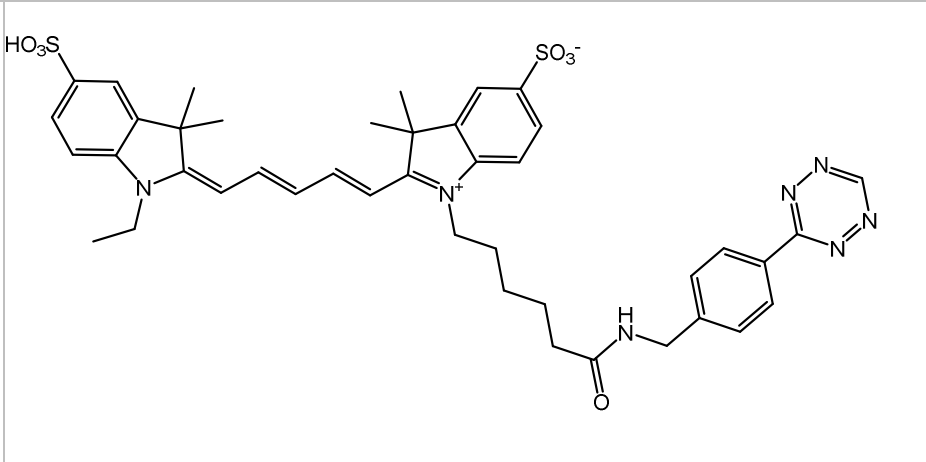
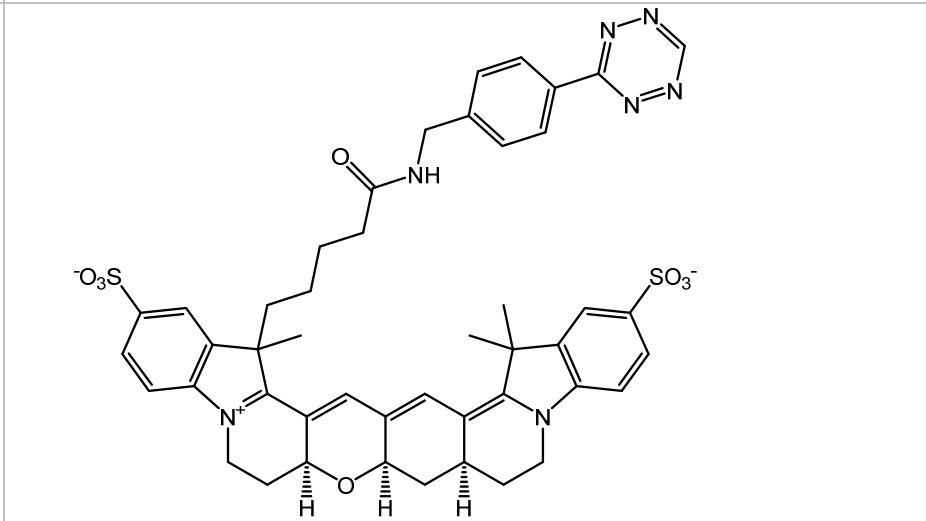
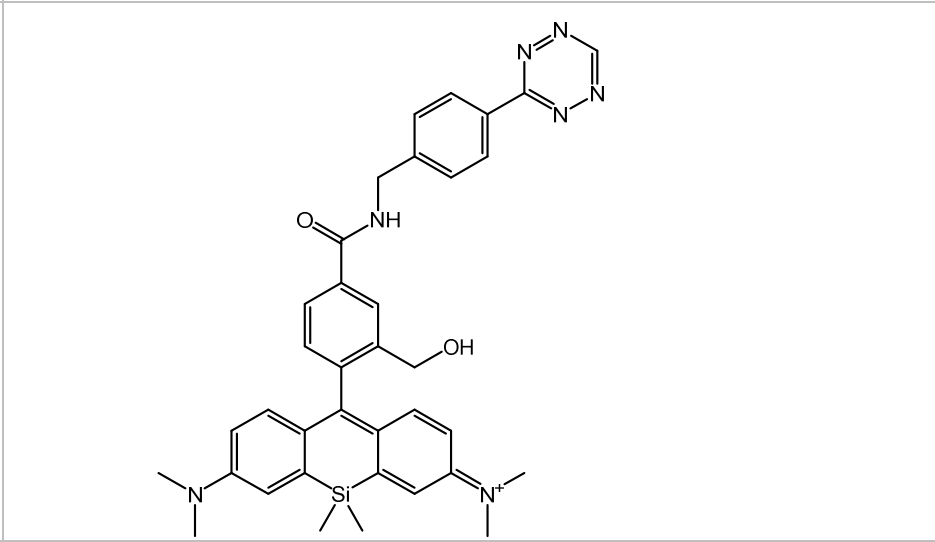
3 Material und Methoden

<p>Me-Tet- ATTO594</p>	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO594 features a central xanthene core. It is substituted with two diethylammonium groups (N⁺), each bearing two methyl groups. A hydroxymethyl group (-CH₂OH) is attached to the left ring, and a sulfonate group (-SO₃H) is attached to the right ring. A side chain is connected to the left ring via a carbonyl group (-C(=O)-), which is further linked to a benzene ring. This benzene ring is connected to a propyl chain, which is then linked to an amide group (-NH-). The amide nitrogen is attached to a para-substituted benzene ring, which is in turn connected to a 1,2,4,5-tetrazole ring.</p>
<p>Me-Tet- ATTO620</p>	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO620 consists of a central xanthene core substituted with two dimethylammonium groups (N⁺). A side chain is attached to the left ring via a carbonyl group (-C(=O)-), which is linked to a propyl chain, then an amide group (-NH-), and finally a para-substituted benzene ring connected to a 1,2,4,5-tetrazole ring.</p>
<p>Me-Tet- ATTO647N</p>	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO647N features a central xanthene core substituted with two diethylammonium groups (N⁺). A side chain is attached to the left ring via a carbonyl group (-C(=O)-), which is linked to a propyl chain, then an amide group (-NH-), and finally a para-substituted benzene ring connected to a 1,2,4,5-tetrazole ring.</p>
<p>Me-Tet- ATTO655</p>	 <p>The structure of Me-Tet-ATTO655 features a central xanthene core substituted with two diethylammonium groups (N⁺). A hydroxymethyl group (-CH₂OH) is attached to the right ring. A side chain is attached to the left ring via a carbonyl group (-C(=O)-), which is linked to a propyl chain, then an amide group (-NH-), and finally a para-substituted benzene ring connected to a 1,2,4,5-tetrazole ring.</p>

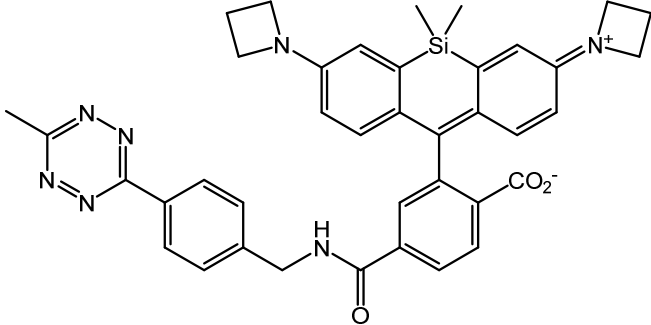
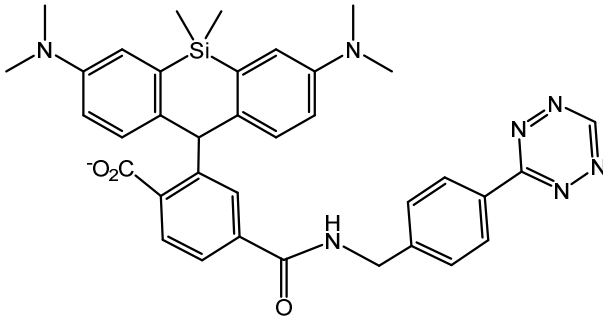
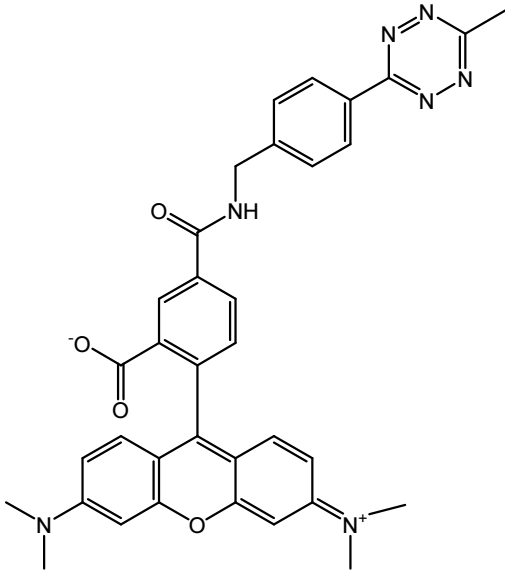
3 Material und Methoden

<p>Me-Tet- ATTO680</p>	 <p>The structure shows a phthalocyanine core with a methyl group on the nitrogen, a propionic acid side chain, and a 4-(4-methyl-1H-tetrazol-1-yl)phenylamino side chain.</p>
<p>Me-Tet- ATTO700</p>	 <p>The structure shows a phthalocyanine core with methyl groups on the nitrogens, a propionic acid side chain, and a 4-(4-methyl-1H-tetrazol-1-yl)phenylamino side chain.</p>
<p>Me-Tet- AZ503</p>	<p>Keine Strukturformel verfügbar</p>
<p>Me-Tet- AZ519</p>	<p>Keine Strukturformel verfügbar</p>
<p>H-Tet- Cy3</p>	 <p>The structure shows a cyanine dye core with two indole rings connected by a trimethine chain. One indole ring has a methyl group and a propionic acid side chain. The other indole ring has a methyl group and a 4-(4-methyl-1H-tetrazol-1-yl)phenylamino side chain. Sulfonate groups (SO₃⁻) are attached to the benzene rings of the indole units.</p>

3 Material und Methoden

H-Tet-Cy5	 <p>The structure of H-Tet-Cy5 consists of a central tetrapyrrole ring system. The left pyrrole ring is substituted with a methyl group and a propyl group, and has a sulfonate group (HO₃S) at the 5-position. The right pyrrole ring is substituted with a methyl group and a propyl group, and has a sulfonate group (SO₃⁻) at the 5-position. A long polyene chain connects the two pyrrole rings. The right-hand end of the polyene chain is attached to a propyl chain, which is further connected to a carbonyl group. This carbonyl group is linked to a methylene group, which is in turn connected to a para-substituted benzene ring. The benzene ring is attached to a 1,2,4,5-tetrazine ring.</p>
H-Tet-Cy5B	 <p>The structure of H-Tet-Cy5B features a central tetrapyrrole ring system. The left pyrrole ring has a sulfonate group (O₃S⁻) at the 5-position. The right pyrrole ring has a sulfonate group (SO₃⁻) at the 5-position. A long polyene chain connects the two pyrrole rings. The right-hand end of the polyene chain is attached to a propyl chain, which is further connected to a carbonyl group. This carbonyl group is linked to a methylene group, which is in turn connected to a para-substituted benzene ring. The benzene ring is attached to a 1,2,4,5-tetrazine ring.</p>
H-Tet-HMSiR	 <p>The structure of H-Tet-HMSiR consists of a central tetrapyrrole ring system. The left pyrrole ring is substituted with a methyl group and a propyl group, and has a sulfonate group (SO₃⁻) at the 5-position. The right pyrrole ring is substituted with a methyl group and a propyl group, and has a sulfonate group (SO₃⁻) at the 5-position. A long polyene chain connects the two pyrrole rings. The right-hand end of the polyene chain is attached to a propyl chain, which is further connected to a carbonyl group. This carbonyl group is linked to a methylene group, which is in turn connected to a para-substituted benzene ring. The benzene ring is attached to a 1,2,4,5-tetrazine ring.</p>

3 Material und Methoden

<p>Me-Tet- JF₆₄₆</p>	 <p>The structure of Me-Tet-JF₆₄₆ features a central silicon atom bonded to two methyl groups and two phenyl rings. One phenyl ring is substituted with a carbocyclic iminium group (a four-membered ring with a positive charge on nitrogen). The other phenyl ring is substituted with a carbocyclic secondary amine group (a four-membered ring with a neutral nitrogen). A third phenyl ring is attached to the silicon atom and is substituted with a carboxylate group (CO₂⁻) and a methylene chain (-CH₂-) that is further substituted with a methylene group (-CH₂-) and a 1,2,4,5-tetrazole ring.</p>
<p>H-Tet- SiR</p>	 <p>The structure of H-Tet-SiR features a central silicon atom bonded to two methyl groups and two phenyl rings. One phenyl ring is substituted with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂). The other phenyl ring is substituted with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) and a carboxylate group (-CO₂⁻). A third phenyl ring is attached to the silicon atom and is substituted with a methylene chain (-CH₂-) that is further substituted with a methylene group (-CH₂-) and a 1,2,4,5-tetrazole ring.</p>
<p>Me-Tet- 5-TAMRA</p>	 <p>The structure of Me-Tet-5-TAMRA features a central silicon atom bonded to two methyl groups and two phenyl rings. One phenyl ring is substituted with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂). The other phenyl ring is substituted with a dimethyliminium group (=N⁺(CH₃)₂). A third phenyl ring is attached to the silicon atom and is substituted with a methylene chain (-CH₂-) that is further substituted with a methylene group (-CH₂-) and a 1,2,4,5-tetrazole ring. The structure also includes a TAMRA moiety (6-((dimethylamino)ethyl)-2,2,6,6-tetramethyl-3,5-dihydro-1,4-benzoxazine) attached to the methylene chain.</p>

3.3 Zellkultur und Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- HEK293T (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; #ACC635)

Kultiviert in: T25-Kulturflaschen in Zellkulturmedium (DMEM, #D5796) mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C.

- COS-7 (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany #605470)
- NIH-3T3 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; #ACC59)
- U2-OS (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany # 300364)

Kultiviert in: T25-Kulturflaschen in Zellkulturmedium (DMEM, #D8062) mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin und 100 U/ml Penicillin + 0,1mg/ml Streptomycin im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C.

Zellpassage erfolgte dreimal wöchentlich und wurden auf Mycoplasmenbefall getestet (GreinerBio-One).

3.4 DNA-Proben

Tabelle 4 - Liste der verwendeten Plasmide

Protein	Konstrukt	Quelle bzw. Referenz
TNF - Rezeptor	pTNFR1-tdEOS	Mike Heilemann (Addgene #98273)
tRNA & tRNA-Synthetase	pCMV tRNA-Pyl/NESPyIRSAF	Edward Lemke (EMBL, Heidelberg) (Nikić et al., 2016)
Kainat – Rezeptor	pcDNA3-GluK2	Peter Seeburg (MPI, Heidelberg) (Herb et al., 1992)
GFP-Fusionsprotein	pEGFP-N1	Clontech #U55762
Ensconsin als Fusionsprotein mit 3xGFP	EMTB-3XGFP	William Bement (Addgene #26741)
NMDA – Rezeptor (Untereinheit 2B)	NR2B	Georg Köhr (Uni. Heidelberg)
NMDA – Rezeptor (Untereinheit 1) als Fusionsprotein mit eGFP	NR1-eGFP	Noam Ziv (Uni. Haifa, Israel)

3.5 Standardgeräte

Tabelle 5 – Liste der verwendeten Geräte

Autoklav	Hersteller
Fluoreszenzspektrometer	Jasco FP-6500 Spectrofluorometer
Minivolumina-Schüttler	IKa® KS 4000i control
PCR-Cycler	C1000™ Thermal Cycler
pH-Meter	Mettler® TOLEDO
Photometer	IMPLEN Pearl Nanophotometer®
Spritzen (5,10,20ml)	Braun®
Sterilfilter 0,2 µm	Sartorius®
Waage	Sartorius® TE412

3.6 Antikörper und Enzyme

Tabelle 6 – Liste der verwendeten Antikörper

Typ (Klonalität)	Wirt	Spezifi- tät	Konjugat	Arbeitskon- zentration	Hersteller
Primär (mono- klonal)	Kaninchen	anti- GluK2		2-10 µg/ml	Merck-Millipore, #04-921
Primär (polyklonal)	Kaninchen	anti- GluK2		2-10 µg/ml	Thermo Fisher #PA5-32427
Primär (monoklonal)	Maus	anti- TNFR1		2-10 µg/ml	Abcam, #ab194814
Primär (polyklonal)	Kaninchen	anti- TNFR1		2-10 µg/ml	Abcam, #ab19139
Sekundär (polyklonal)	Ziege (anti-Maus)	anti- IgG	Alexa647	10 µg/ml	Thermo Fisher, #A-21235
Sekundär (polyklonal)	Ziege (anti-Kan.)	anti- IgG	Alexa647	10 µg/ml	Thermo Fisher, #A-21245
Sekundär (polyklonal)	Ziege (anti-Kan.)	anti- IgG	Alexa488	10 µg/ml	Thermo Fisher, #A-11034
Primär (polyklonal)	Kaninchen	anti- NMDA		2,6 µg/ml	Alomone #AGC-001

Tabelle 7 – Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
EcoRI-HF	New England Biolabs (R3101S)
AgeI-HF	New England Biolabs (R3552S)
DpnI	New England Biolabs (R0176S)
BamHI	New England Biolabs (R3136S)
EcoRV-HF	New England Biolabs (R3195S)
HindIII-HF	New England Biolabs (R0401S)
KpnI-HF	New England Biolabs (R3142S)
NotI-HF	New England Biolabs (R3189S)

NheI-HF	New England Biolabs (R3131S)
Q5-DNA Polymerase	New England Biolabs (M0491S)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (M0202S)
XhoI	New England Biolabs (R0146S)

3.7 Verwendete Software

- OriginPro 2016G (OriginLab, USA)
- FluoFit 4.4. (Picoquant, Deutschland)
- ZENblack 2.3 (Zeiss, Deutschland)
- NIS Elements 5.1 (Nikon, Deutschland)
- Fiji (Schindelin et al., 2012)

3.8 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

PCR und Mutagenese

Die PCR wurde genutzt um plasmidische DNA zu vervielfältigen oder zu modifizieren. Hierbei wurde folgende Reaktionsmischung verwendet

- 5x Q5 Reaktionspuffer 10 µl
- 25mM dNTPs 1 µl
- Vorwärts Primer (125ng/µl) 1 µl
- Rückwärts Primer (125ng/µl) 1 µl
- Plasmidische DNA 75 ng
- Q5 HF-Polymerase 1 µl
- ddH₂O auf Gesamtvolumen (50 µl)

Das folgende Programm des PCR-Thermocyclers wurde verwendet:

- 1) Inkubieren 98°C 30 sec
- 2) Denaturieren 98°C 30 sec
- 3) Annealing-Temperatur 55-60°C 30 sec
- 4) Elongations-Temperatur 72°C 3 min
- Wiederholen der Schritte 2 bis 4 (20x)
- 5) Kühle Lagerung 4°C ∞

Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente dazu, DNA-Fragmente oder –Plasmide zu identifizieren oder zu isolieren. Hierbei wurde zunächst eine 1%-Agarose-Lösung in 0.5x TBE-Puffer angesetzt, homogen erhitzt, mit SafeView (zur Färbung der DNA) versetzt und zum Erkalten in einen Gelelektrophorese-Schlitten mit Probenbeladungskamm überführt. Jede DNA-Probe wurde vor Überführung in die Probenbeladungstasche mit DNA-Gelbeladungspuffer (engl. DNA gel loading dye) versetzt. Als Referenz wurde eine DNA-Leiter mit DNA-Fragmenten definierter Länge in eine separate Proben tasche hinzugefügt. Als Laufpuffer wurde 0.5x TBE verwendet und ein elektrisches Feld der Stärke ~ 15 V/cm angelegt. Die Auswertung erfolgte optisch über einen UV-Illuminator.

Molekulare Klonierung

Bei der molekularen Klonierung wurde mittels Restriktionsenzymen (sog. Endonukleasen) ein spezifisches Motiv des DNA-Doppelstrangs geschnitten. Hierzu verwendete man, je nach verwendetem Restriktionsenzym, das vom Hersteller empfohlene Protokoll und Puffergemisch. Bei der DNA-Ligation wurde die T4 DNA Ligase (Thermo Fisher), gemäß Herstellerangabe, verwendet. Daraufhin erfolgte zur Vervielfältigung der DNA eine Transformation in XL1-Blau *E.coli* Zellen sowie weitere Schritte der DNA-Isolation.

DNA-Isolation

Die Isolation von plasmidischer DNA wurde ich zwei Maßstäben durchgeführt (5ml oder 100ml Bakterienkultur). Für die sogenannte Minipräparation von geringen DNA-Mengen wurde das Protokoll des High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) mit einem Elutionsvolumen von 50 μ l verwendet. Für die Midipräparation wurde das Protokoll des NucleoBond Xtra Midi EF Kit (Macherey-Nagel) mit einem Elutionsvolumen von 1ml verwendet. Jede isolierte und aufgereinigte DNA-Probe wurde mittels Sequenzierung (Eurofins Genomics) verifiziert.

Transformation und Kultivierung von kompetenten Bakterien

Die Transformation von Zellen beschreibt den Prozess der Einschleusung von Fremd-DNA in eine Bakterienzelle. Um eine effiziente Replikation der DNA gewährleisten zu können, tragen die meisten Plasmide sowohl einen bakteriellen Replikationsursprung als auch ein Antibiotika-Resistenzgen (selektierbarer Marker) in ihrer Sequenz.

Für die bakterielle Transformation wurden chemisch-kompetente XL1-Blau *E.coli* verwendet (gelagert bei -80°C).

Präparation der chemisch kompetenten Zellen

Die Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen mit sehr hoher Transformationseffizienz wurde in Zusammenarbeit mit der Dr. Hannes Neuweiler (Biotechnologie und Biophysik, Uni Würzburg) durchgeführt. Chemisch kompetente XL1-Blau *E.coli*-Stämme wurden nach Standardprotokoll hergestellt (Inoue et al., 1990). Eine 8ml Bakterienstartkultur wurde in antibiotikafreiem TY-Medium kultiviert, daraufhin in 800 ml TY-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei einer optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) von 0.6 wurde zu Bakterienlösung gekühlt (4°C für 30 min) und pelletiert. Das Pellet wurde mit TB-Puffer gewaschen. Zuletzt wurde das Bakterienpellet in 25 ml TB-Puffer resuspendiert und die Suspension auf 25 ml TB-Puffer (+ 14 % DMSO) überführt. Die Suspension wurde in 250 μl Aliquots in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgeteilt, in einem Ethanol-Trockeneisbad gefroren und bei -80°C gelagert.

Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für die Transfektion der kultivierten Zellen (HEK293T, Cos-7, U2-OS sowie NIH-3T3) wurde JetPrime Transfection Reagent (Polypus, #114-01) verwendet. Hierbei wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Protokoll verwendet. Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf (ggf. mit Poly-D-Lysin vorbehandelte) 4-Kammer Probenobjektträgern ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Zellzahl wurde so gewählt, dass zum Zeitpunkt der Transfektion die Zellkonfluenz zwischen 60-85% lag.

Der Transfektionsansatz für eine Kammer:

- 500 ng plasmidische DNA vom Zielkonstrukt
- 500 ng plasmidische DNA (kodierend für tRNA/tRNA-Synthetase)
- 2 μ l JetPrime Transfektionsagens in 50 μ l JP-Reaktionspuffer

Zusätzlich wird den Zellen eine unnatürliche Aminosäure (uAA) direkt in das Zellkulturmedium hinzugefügt. Hierbei wird die uAA frisch mit 1M HEPES (pH 8.0) im Verhältnis 1:4 vorverdünnt (Endkonzentration 250 μ M) und den Zellen zugegeben.

3.9 Spektroskopische Methoden

Für die Untersuchung der spektroskopischen Charakteristika der Tetrazin-Farbstoffe wurden eine Reihe verschiedener Methoden und Experimente durchgeführt.

Ensemble-Messungen

Die Küvetten-Messungen der Absorptionsspektren wurden an einem Jasco V-650 Spectrophotometer durchgeführt. Die Küvetten-Messungen der Emissionsspektren sowie der Zeitverlaufsmessung der Fluoreszenzintensität der Tetrazin-Farbstoffe vor und nach Zugabe von TCO*-Lysin wurden an einem Jasco FP-6500 Spectrofluorometer, ausgestattet mit einer 150W Xenon-Lampe (220-750 nm), durchgeführt. Durch einen zwischengeschalteten Monochromator konnte das Anregungslicht auf die Probe geführt und orthogonal dazu ausgelesen werden. Die Temperatur der Proben wurde über ein Peltier Thermoelement konstant auf 25°C gehalten. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte im Wellenlängenbereich des Absorptionsmaximums.

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

FCS-Messungen wurde mit einem speziell angefertigten konfokalen Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einem 640 nm Diodenlaser (Coherent) durchgeführt. Die Proben wurden in PBS (pH 7,4) verdünnt und durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,25 μ m) gefiltert, auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Die Proben mit Konzentrationen von 1 nM ergaben im Durchschnitt ~ 20 Moleküle im Detektionsfokus. Die Probentemperatur wurde mit einer speziell angefertigten Objektivheizung auf 25°C eingestellt. Für jede Probe wurden mindestens drei individuelle Autokorrelationsfunktionen mit jeweils mindestens 5 Minuten Messzeit aufgezeichnet. PET-FCS-Daten wurden an ein analytisches Modell für die Diffusion und ein Zwei-Zustands-Gleichgewicht mit den Aus- und An-Ratenkonstanten k_{closing} und k_{opening} angepasst:

$$G_D(\tau) = N^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \quad (13)$$

sowie

$$G(\tau) = G_D(\tau) (1 + A e^{-\tau/\tau_{rel}}) \quad (14)$$

wobei N die Anzahl der erfassten Moleküle und D die Diffusionszeit darstellt. $A = k_{\text{closing}} / k_{\text{opening}}$ ist die Gleichgewichtskonstante und $\tau_{rel} = (k_{\text{closing}} + k_{\text{opening}})^{-1}$ ist die Exponentialzeitkonstante.

Intermolekulare Fluoreszenz-Löschversuche

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Löscheffizienz von Tetrazinen und Fluorophoren wurden bimolekulare Löschversuche mit mit ATTO655, ATTO700, JF₆₄₆ und Cy5 sowie Me-Tet-Amin in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) bei pH 7.4 durchgeführt. Bimolekulare statische und dynamische Löschkonstanten, K_{stat} und K_{dyn} , wurden aus zeitaufgelösten und stationären Fluoreszenz-Löschversuchen mittels Stern-Volmer-Analyse bestimmt:

$$\tau_0/\tau = 1 + K_{dyn} [Q] = 1 + k_{dyn} \tau_0 [Q] \quad (15)$$

$$F_0/F = (1 + K_{\text{stat}} [Q]) (1 + K_{\text{dyn}} [Q]) \quad (16)$$

wobei

τ_0 und F_0 die Fluoreszenzlebensdauer und -intensität in Abwesenheit eines Quenchers sind, τ und F die Fluoreszenzlebensdauer und -intensität in Anwesenheit des Quenchers Q mit der Konzentration $[Q]$ ist. K_{stat} und K_{dyn} bezeichnen dabei die statische bzw. dynamische Stern-Volmer-Konstanten. Die dynamische Löschung beruht auf den Kollisionswechselwirkungen mit einer dynamischen Löschratenkonstante k_{dyn} . Die statische Löschung stammt aus bimolekularen Komplexen, die sehr effizient gelöscht werden und K_{stat} kann somit als Assoziationskonstante K_a interpretiert werden. Bei den angegebenen Schätzwerten handelt es sich um die Ergebnisse der linearen Regression (mit Standardfehler) aus dem Anpassungsverfahren (OriginPro).

Zeitkorrelierte Einzelphotonen-Zählung (TCSPC)

Die Messungen zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern wurden über zeitkorrelierte Einzelphoton-Zählungen (TCSPC: Time-Correlated Single-Photon-Counting) durchgeführt. Für Farbstoffe, die mit einem 640 nm Laser angeregt werden konnten, wurde ein Fluotime200 (Picoquant) zeitaufgelöstes Spektrometer verwendet. Für die Farbstoffe mit der Anregung zwischen 400 – 560 nm wurde ein MicroTime200 (Picoquant), ausgestattet mit einem Superkontinuum-Laser SuperK Extreme EXW12 (NKT Photonics), verwendet. Das Modul ist an ein IX83 Mikroskopstativ (Olympus), ausgestattet mit einem 60x/1.2 ultra-plan apochromat Wasserimmersions-Objektiv, gekoppelt. Die Auswertung erfolgte über die Software FluoFit 4.4.0.1.

3.10 Methoden zur Fluoreszenzmarkierung

Immunofärbung mit Antikörpern

Bei der klassischen Immunofärbung verwendet man Antikörper, welche eine bestimmte Region (Antigen) eines Proteins oder Peptids spezifisch erkennen und binden.

Die verwendeten Antikörper-Färbeprotokolle A und B sind:

Immunolabeling A Lebendzell-Markierung	Immunolabeling B Markierung fixierter Zellen
<ul style="list-style-type: none"> • Zellinkubation – 5 min auf RT • Zellinkubation – 10 min auf 4°C • Waschen mit Zellmedium (3x) • 1-10 ug/ml primärer Antikörper in Zellkulturmedium – 30 min bei 4°C • Waschen mit Zellmedium (3x) • Messung (opt. Fixierung mit 4% Formaldehyd in PBS – 15 min bei RT) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zellinkubation – 5 min auf bei 37 °C • Waschen mit vorgewärmten PBS (1x) • Vorfixierung mit 4% FA mit 0,25% Triton-X in PBS • Fixierung mit 4% Formaldehyd in PBS – 15 min bei 37°C • Waschen mit PBS bei RT (3x) • 1-10 ug/ml primärer Antikörper in PBS – 30 min bei RT • Waschen mit PBS (3x) • (optional: Sekundärfärbung mit 1-10 µg/ml sekundärem Antikörper in PBS – 30 min bei RT) • Messung

Bioorthogonale Click-Färbung

Für die bioorthogonale Click-Färbung von membranständigen Rezeptoren wurden die transfizierten Zellen mit 1,5 µM Tetrazin-Farbstoff im Zellkulturmedium für 10 min auf Raumtemperatur oder auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit frischem Zellkulturmedium gewaschen und mit 4% Formaldehyd (+0,25% Glutaraldehyd) für 10 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut dreimal mit HBSS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Alternativ wurden die Zellen nach der Färbung direkt mit HBSS gewaschen und mikroskopiert. Für die Färbung des Aktin-Skeletts durch phalloidin-TCO wurden die Zellen zunächst mit 4% Formaldehyd in CB-Puffer für 10 min vorfixiert. Dann wurden die Zellen mit HBSS (+0,1% Tween-20) gewaschen und zeitgleich permeabilisiert. Daraufhin wurden die Zellen für 1h mit phalloidin-TCO (0,5 µM) bei Raumtemperatur vorinkubiert.

Für die Click-Färbung der Aktinfilamente wurden die Zellen zunächst dreimal mit frischem HBSS gewaschen und mit 1-3 μM des jeweiligen Tetrazin-Farbstoffs für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin erneut dreimal mit HBSS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Bei waschfreien Experimenten wurden die Zellen alternativ auch ohne Waschschritte direkt mikroskopiert.

3.11 Verwendete Mikroskope

Konfokale Laser-Scanner-Mikroskopie (cLSM)

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem kommerziellen Mikroskop LSM700 (Zeiss) aufgenommen. Hierzu wurde ein 63x Immersionsöl-Objektiv (1,4 NA) und eine Pixelgröße von 90 nm verwendet. Die verwendeten Anregungslaser wurden für jeden Farbstoff individuell angepasst bzw. ausgewählt. Der Anregungslaser 488 nm wurde für folgende Fluoreszenzproteine bzw. Farbstoffe verwendet: (e)GFP, tdEOS (grün), Me-Tet-ATTO488, Me-Tet-AZ503, Me-Tet-AZ519 und Me-Tet-ATTO532. Der Anregungslaser 555 nm wurde für folgende Farbstoffe verwendet: Me-Tet-ATTO550, Me-Tet-ATTO565, Me-Tet-ATTO590, Me-Tet-ATTO594, Me-Tet-TAMRA und H-Tet-Cy3. Der Anregungslaser 640 nm wurde für folgende Farbstoffe verwendet: Me-Tet-ATTO620, Me-Tet-JF₆₄₆, H-Tet-SiR, H-Tet-HMSiR, Me-Tet-ATTO647N, Me-Tet-ATTO655, Me-Tet-ATTO680, Me-Tet-ATTO700, H-Tet-Cy5 und H-Tet-Cy5B.

Konfokale Re-Scan-Mikroskopie (RCM)

Konfokale Rescan-Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem kommerziellen RCM-Modul (confocal.nl) angehängt an ein inverses Nikon TiE Mikroskopstativ aufgenommen. Das Mikroskop ist durch ein Multi-Laserlinien-Modul Skyra (Cobolt) mit folgenden Anregungslasern ausgestattet: 405 nm, 488 nm, 561 nm und 640 nm. Aufgenommen wird auf einer sCMOS Kamera Zyla4.2P (Andor) unter Verwendung eines 100x/1.49 Öl-Objektiv und einer resultierenden Pixelgröße von 42 nm. Der Anregungslaser 488 nm wurde für folgende Fluoreszenzproteine bzw. Farbstoffe verwendet: (e)GFP, Me-Tet-ATTO488, Me-Tet-AZ503. Der Anregungslaser 640 nm wurde für folgende Farbstoffe verwendet: H-Tet-SiR, Me-Tet-ATTO655 und H-Tet-Cy5.

Strukturierte Illuminierungs-Mikroskopie (SIM)

Hochaufgelöste Fluoreszenzaufnahmen mittels strukturierter Beleuchtung (SIM) wurden mit einem kommerziellen ELYRA S.1 Mikroskop (Zeiss) aufgenommen und prozessiert. Das Mikroskop ist mit einem 63x/1.4 Öl-Objektiv und vier Anregungslasern ausgestattet: 405 nm, 488 nm, 561 nm und 641 nm.

Der Anregungslaser 405 nm wurde für folgende Farbstoffe verwendet: Me-Tet-ATTO425 und Me-Tet-ATTP465. Der Anregungslaser 561nm wurde für folgende Fluoreszenzproteine bzw. Farbstoffe verwendet: H-Tet-Cy3, Me-Tet-ATTO565 und Me-Tet-ATTO594. Der Anregungslaser 642 nm wurde für folgende Fluoreszenzproteine bzw. Farbstoffe verwendet: Me-Tet-ATTO620, Me-Tet-JF₆₄₆, H-Tet-Cy5 und H-Tet-Cy5B.

Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (dSTORM)

Hochaufgelöste Fluoreszenzaufnahmen mittels dSTORM wurden mit einem inversen Weitfeld-Mikroskopstativ (IX-70, Olympus) aufgenommen. Für die Anregung wurde ein 641 nm Laser (Cube 640-100C, Coherent) verwendet, welcher auf die hintere Fokalebene eines 60x/1.45 Immersionsöl-Objektivs (Olympus) fokussiert wurde. Das Objektiv kann über einen Objektivrevolver (Nosepiece Stage IX2-NPS, Olympus) vom Probenstisch des Mikroskops entkoppelt werden. Das Emissionslicht wurde über einen dichroischen Spiegel (6325rpc, Chroma) vom Anregungslicht getrennt und spektral durch einen Bandpass-Filter (Em01-R442/514/647-25, Semrock) gefiltert. Aufgenommen wird auf einer EMCCD Kamera (IXON DU897, Andor) mit einer resultierenden Pixelgröße von 128 nm. Für alle dSTORM-Aufnahmen wurden mindestens 15.000 Einzelaufnahmen mit einer Belichtungszeit von jeweils 20ms und einer Anregungsintensität von $\sim 2-10 \text{ kW/cm}^2$ aufgenommen. Die Rekonstruktion der dSTORM-Aufnahmen erfolgte über die Software rapidSTORM (Wolter, 2012).

3.12 Chemische Synthese der TCO- und Tetrazin-Derivate

Folgende Tetrazin-Derivate sowie TCO-modifiziertes Phalloidin wurden gekoppelt und aufgereinigt:

H-Tet-HMSiR: 0,034 μmol HMSiR-NHS (MoBiTec, Göttingen, Germany, #A208-01) wurden zu 0,68 μmol H-Tet-amine (Jena Bioscience, Jena, Germany, #CLK001-5) in wasserfreiem DMSO (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen Cat. Nr. D12345) mit diisopropylethylamine (Sigma-Aldrich, #D125806, DIPEA, 1,1 μmol) hinzugefügt und 4h bei Raumtemperatur inkubiert.

H-Tet-Cy5B: 0,355 μmol Cy5B-NHS wurde zu 3,5 μmol H-Tet-amine (Jena Bioscience, Jena, Germany, # CLK-001-5) in wasserfreiem DMSO (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen Cat. Nr. D12345) mit Diisopropylethylamine (Sigma-Aldrich, #D125806, DIPEA, 1,1 μmol) hinzugefügt und 4h bei Raumtemperatur inkubiert.

Phalloidin-TCO: 0.07 μmol Amino-phalloidin (Biomol, Hamburg, Germany, #ABD-5302) wurde zu 0.7 μmol TCO-PEG4-NHS (Jena Bioscience, Jena, Germany, #CLK-A137-10) in wasserfreiem DMSO (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen Cat. Nr. D12345) mit diisopropylethylamine (DIPEA, 1,1 μmol) hinzugefügt und 4h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Aufreinigung erfolgte über eine Umkehrphasenchromatographie an einer Phenomenex Kinetex Biphenyl-Kern-Schalen-LC-Säule (2,6 μm , 150 x 4,6 mm; Wasser:Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure und einem Elutionsgradienten von 0-95% in 45 min).

4 Ergebnisse

4.1 Spektroskopische Charakteristika von Tetrazin-Farbstoffen

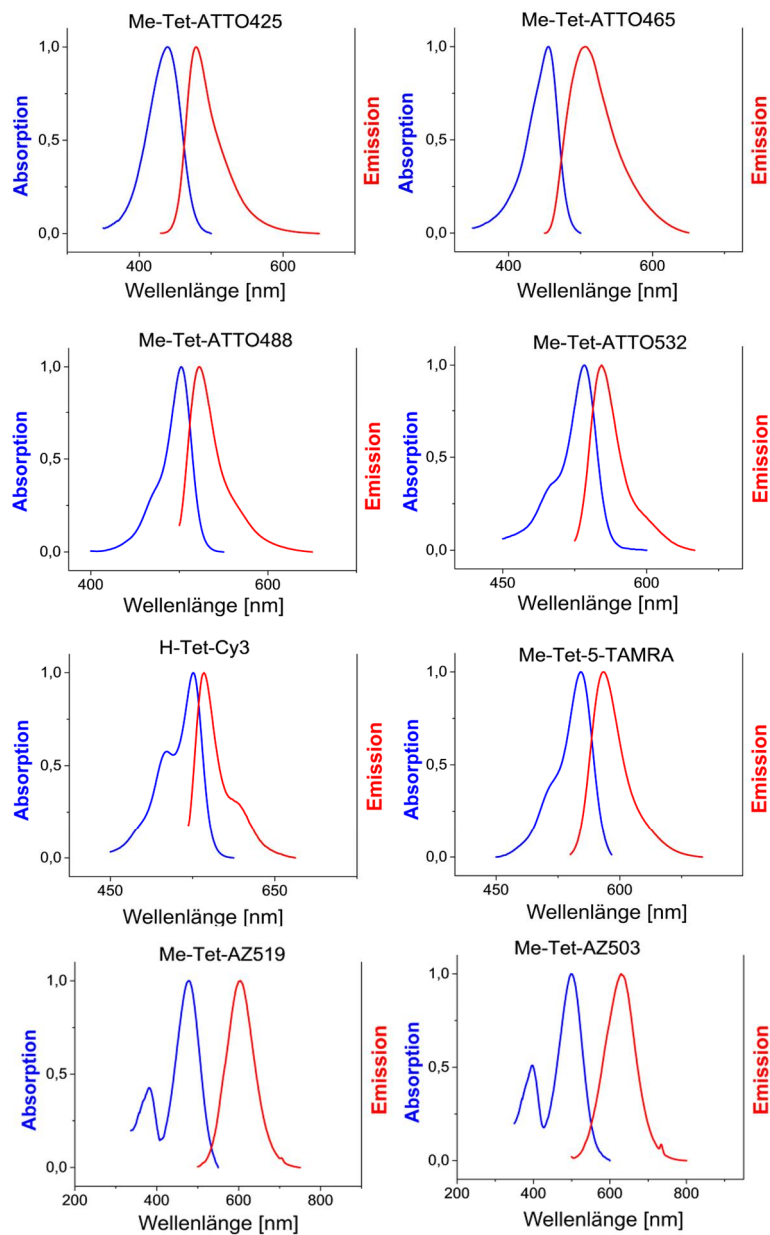
Im folgenden Teilkapitel werden die spektroskopischen Eigenschaften von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen als Tetrazin-Derivate (Tet-Farbstoffe) bestimmt. Die meisten der Tet-Farbstoffe sind als 3-Methyl-6-phenyl-1,2,4,5-tetrazin-(Me-Tet)-Derivate und nur einige als 3-Phenyl-1,2,4,5-tetrazin-(H-Tet)-Derivate erhältlich. Die Farbstoff-Derivate von Cy5B und HMSiR sind nicht kommerziell erhältlich und wurden selbst an H-Tet gekoppelt (siehe Material und Methoden 3.2).

Die Absorptions- und Emissionsspektren sowie die Fluoreszenzlebensdauern vor und nach der Click-Reaktion mit dem Reaktionspartner TCO*-Lysin von 22 Tetrazin-Farbstoffen wurden in wässrigen Medium (PBS, pH 7.4) in Küvettenexperimenten gemessen (Abschnitt 4.1.1). Des Weiteren wurde das Absorptions- und Emissionsverhalten von H-Tet und Me-Tet untersucht. Zusätzlich wurden die Fluoreszenzintensitätsanstiege (engl. Turn-On ratios) in Ensemble-Küvettenmessungen nach Zugabe des Click-Reaktionspartner TCO*-Lysin bestimmt (Tabelle 8). Sie sind für jeden Tet-Farbstoff charakteristisch und unterscheiden sich bei den, in der vorliegenden Studie verwendeten, Tet-Farbstoffen von keinem Turn-On bis hin zu fast 40fachen Intensitätsanstieg.

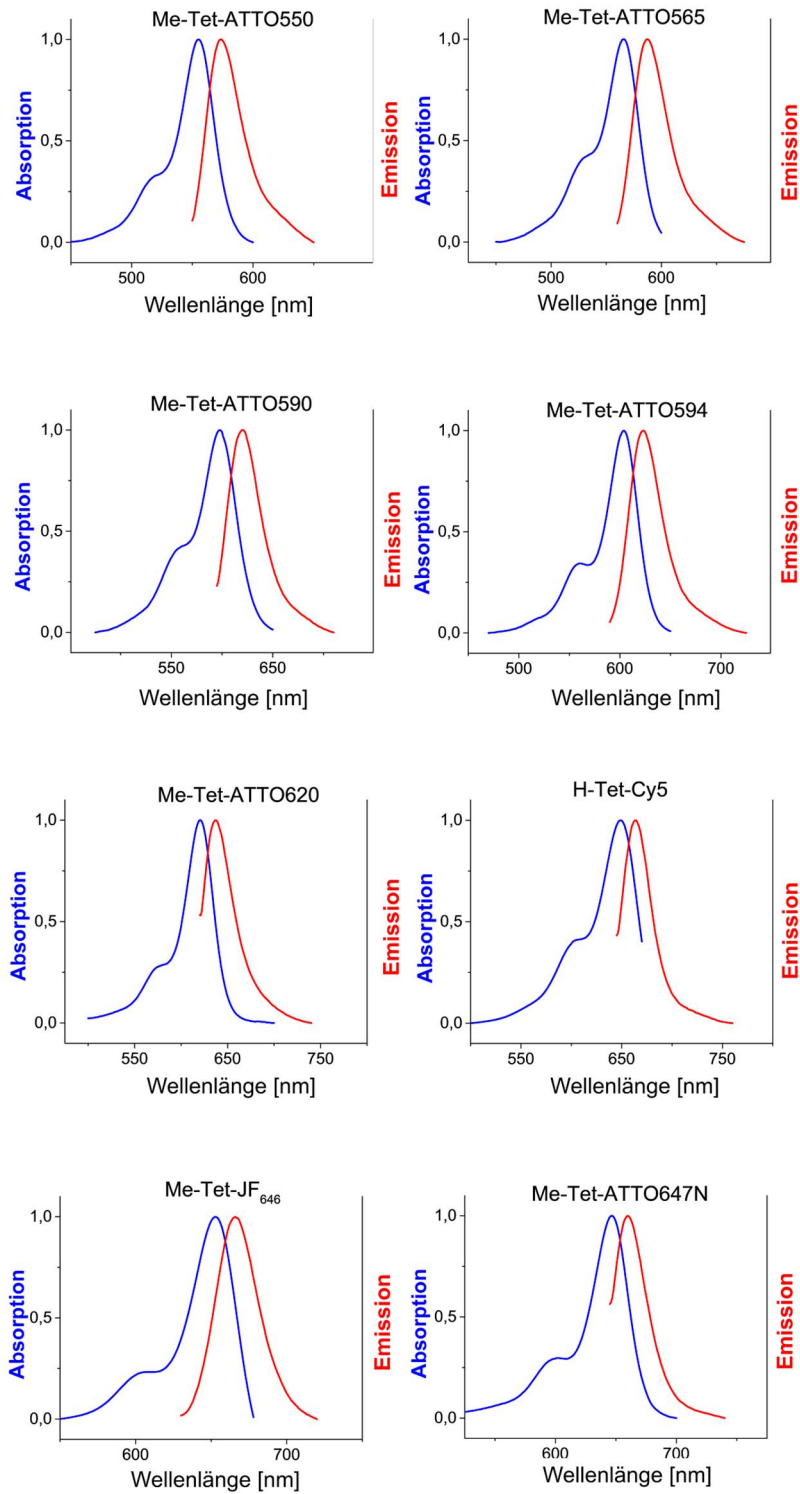
Außerdem wurde die Fluoreszenzintensitätsänderung je nach Polarität des Lösemittels bzw. nach Zugabe von hohen Konzentrationen von denaturierenden Agenzien wie z.B. Guanidiniumchlorid (GCl) bestimmt (Abschnitt 4.1.3). Die Experimente zur Untersuchung der Mechanismen der Fluoreszenzlöschung wurden mithilfe der Analyse von Stern-Volmer-Plots durchgeführt (Abschnitt 4.1.4). Zudem wurde inter- und intramolekulare Wechselwirkungen von einigen rot-absorbierenden Tet-Farbstoffen über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie untersucht (Abschnitt 4.1.5).

4.1.1 Absorption und Emission

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tet-Farbstoffe sollten alle für die Mikroskopie genutzt werden, sodass zu Beginn Absorptions- und Emissionsmessungen der Tetrazin-Farbstoffe durchgeführt wurden, um optimale Anregungs- und Detektionsparameter festlegen zu können.



4 Ergebnisse



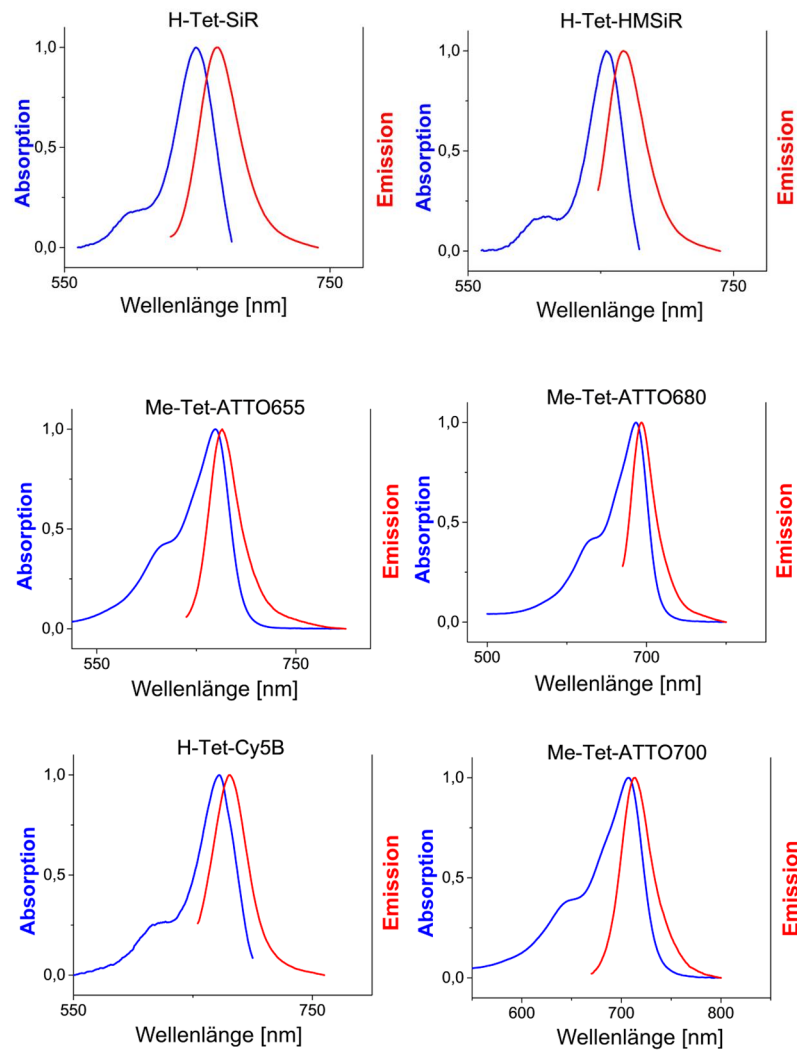


Abbildung 14 - Normierte Absorptions- (blau) und Emissionsspektren (rot) aller 22, in dieser Studie untersuchten, Tetrazin-Farbstoffe in PBS (pH 7.4, 25°C). Mit Erlaubnis entnommen aus (Belu et al., 2019).

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zeigen unterschiedliche Absorptions- und Emissionsmaxima. Die Spektren zeigen zwar bei allen Farbstoffen einen Überlapp, jedoch sind die Maxima bei allen getesteten Farbstoffen klar voneinander getrennt, sodass bei der Wahl geeigneter Filter und Anregungslaser eine Trennung von Anregungslicht und detektierbarem Emissionslicht möglich ist. Eine tabellarische Zusammenfassung findet sich in Tabelle 8.

4 Ergebnisse

Tabelle 8 - Charakteristische Absorptions- (λ_{abs}) und Emissionsmaxima (λ_{em}) sowie der Anstieg der Fluoreszenzintensitäten von Tetrazin-Farbstoffen nach Zugabe von TCO*-Lysin (gemessen bei 25°C in PBS). Konzentrationen: 1 μM Tetrazin-Farbstoff und 25 μM TCO*-Lysin. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität (Turn-On ratio) ergibt sich aus dem Verhältnis der minimalen (ohne TCO*-Lysin) und maximalen (nach Zugabe von TCO*-Lysin) Fluoreszenzintensitäten. Die Referenzwerte zeigen die Herstellerangabe der jeweiligen freien Farbstoffe.

Tetrazine-Farbstoff	λ_{abs} [nm] (Referenzwert)	λ_{em} [nm] (Referenzwert)	Intensitäts- zunahme nach Zugabe von TCO*-Lysin
Me-Tet-ATTO425	441 (436)	478 (484)	15
Me-Tet-ATTO465	455 (453)	505 (508)	39
Me-Tet-ATTO488	502 (501)	522 (523)	25
Me-Tet-ATTO532	535 (532)	553 (553)	7
H-Tet-Cy3	551 (550)	564 (570)	2
Me-Tet-5-TAMRA	553 (545)	580 (575)	1
Me-Tet-AZ519	478 (470)	602 (615)	8
Me-Tet-AZ503	498 (490)	629 (655)	8
Me-Tet-ATTO550	555 (554)	573 (576)	4
Me-Tet-ATTO565	566 (563)	587 (592)	2
Me-Tet-ATTO590	598 (594)	621 (624)	3
Me-Tet-ATTO594	604 (601)	624 (627)	4
Me-Tet-ATTO620	620 (619)	637 (643)	3
Me-Tet-JF ₆₄₆	646 (646)	667 (664)	10
Me-Tet-ATTO647N	647 (644)	660 (669)	2
H-Tet-Cy5	649 (649)	664 (670)	3
H-Tet-SiR	649 (652)	669 (674)	4
H-Tet-HMSiR	654 (656)	667 (669)	1
Me-Tet-ATTO655	668 (663)	676 (684)	13
H-Tet-Cy5B	670 (670)	683 (683)	3
Me-Tet-ATTO680	686 (680)	694 (700)	6
Me-Tet-ATTO700	707 (700)	712 (719)	8

Die Maxima der Anregungs- und Emissionsspektren aller 22 Tet-Farbstoffe wurden mit den Literaturwerten der jeweiligen Farbstoffe als freie Säuren (-Carboxy, -COOH) in Tabelle 8 gegenübergestellt (Literaturwerte in runden Klammern).

Die meisten Tetrazin (Tet)- Farbstoffe wurden als 3-Methyl-6-phenyl-1,2,4,5-tetrazin-(Me-Tet)-Derivate, und nur einige als 3-Phenyl-1,2,4,5-tetrazin-(H-Tet)-Derivate gemessen. Die selbst-konjugierten Tet-Derivate von HMSiR und Cy5B wurden als H-Tet synthetisiert, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den verwandten Farbstoffen SiR und Cy5 zu gewährleisten, da diese nur als H-Tet kommerziell verfügbar sind.

Die Wahl eines bestimmten Fluorophors in einem experimentellen Versuchsaufbau wird maßgeblich durch seine spektralen Eigenschaften bestimmt. Der Einfluss einer funktionellen Gruppe an ein chromophores System kann diese Eigenschaften jedoch beeinflussen. Die Messung der Fluoreszenzabsorption und -Emission eines Farbstoff-Derivats sollte vor Verwendung daher noch einmal gemessen und mit dem Referenzwert des Farbstoffs abgeglichen werden.

Der Vergleich zeigt, dass die experimentell bestimmten Maxima aller getesteten Tet-Farbstoffe nicht bzw. nur kaum vom Referenzwert (freie Farbstoffe, vorliegend als freie Säure -COOH, ohne Tetrazin) abweichen. Die, für jeden Farbstoff charakteristischen, spektralen Wellenlängen-Bereiche der jeweiligen Fluorophore gelten somit auch für die Tetrazin-Derivate, sodass keine Anpassung der Anregungslichtquelle oder der Detektionsfilter im Vergleich zu den jeweiligen freien Farbstoffen durchgeführt werden muss. Der Großteil der Tet-Farbstoffe zeigt ein Absorptions- und ein Emissionsmaximum. Jedoch zeigen einige Farbstoffe (wie z.B. AZ503, AZ519 oder Cy3) ein zweites, kürzerwelliges Nebenmaximum, sodass diese Farbstoffe auch mit Anregungslicht kürzerer Wellenlänge effizient angeregt werden können. Die beiden Farbstoffe AZ503 und AZ519 zeigen zudem eine sehr starke Rotverschiebung (engl. large stokes shift, LS) des Emissionslichts (~ 130 nm). Derartige LS-Farbstoffe eignen sich vor allem für mikroskopische Messungen in Zell- oder Gewebekulturen mit hoher Autofluoreszenz unter Wahrung der vorteilhaften Signal-zu-Rausch Verhältnisse. Zusätzlich wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität (Turn-On ratio) jedes Tet-Farbstoffs vor und nach Zugabe des Click-Reaktionspartners TCO*-Lysin bestimmt. Funktionelle Gruppen, welche an ein chromophores System konjugiert wurden, können die Fluoreszenzintensität sowie -lebenszeit maßgeblich beeinflussen. Fast alle untersuchten Tetrazin-Farbstoffe zeigten bei Reaktion mit TCO*-Lysin einen starken Fluoreszenzanstieg (engl. Turn-On) (Tabelle 8).

4 Ergebnisse

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität ist bei den kurzwelligen Absorptionsfarbstoffen Me-Tet-ATTO425, Me-Tet-ATTO465 und Me-Tet-ATTO488 mit Einschaltverhältnissen von 15-40 am stärksten. Die Farbstoffe aus der Klasse der Cyanine H-Tet-Cy3, H-Tet-Cy5 und H-Tet-Cy5B zeigten geringe Turn-Ons zwischen 2-3fach auf. Die Farbstoffe im gelb-orangen Absorptionsbereich (550-620 nm) Me-Tet-5-TAMRA, Me-Tet-ATTO550, Me-Tet-ATTO565, Me-Tet-ATTO590, Me-Tet-ATTO594 und Me-Tet-ATTO620 zeigten ebenfalls geringe bis keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität auf (Turn-On zwischen 1-4fach). Die längerwellig-absorbierenden Oxazin-Farbstoffe Me-Tet-ATTO655, Me-Tet-ATTO680 und Me-Tet-ATTO700 sowie die LS-Farbstoffe Me-Tet-AZ503 und Me-Tet-AZ519 weisen hingegen Turn-Ons zwischen 6-13fach auf. Der photostabile Me-Tet-ATTO647N zeigte eine sehr geringe Intensitätsänderung (Turn-On \sim 2fach) auf, wohingegen das Silizium-Rhodamin Me-Tet-JF₆₄₆ eine hohe Turn-On von \sim 10fach zeigte. Somit kann das gekoppelte Tetrazin sowohl als Löschmolekül als auch als bioorthogonale Click-Reaktionsgruppe fungieren und bewirkt für die meisten Tet-Farbstoffe eine messbare Fluorogenität (Abbildung 15).

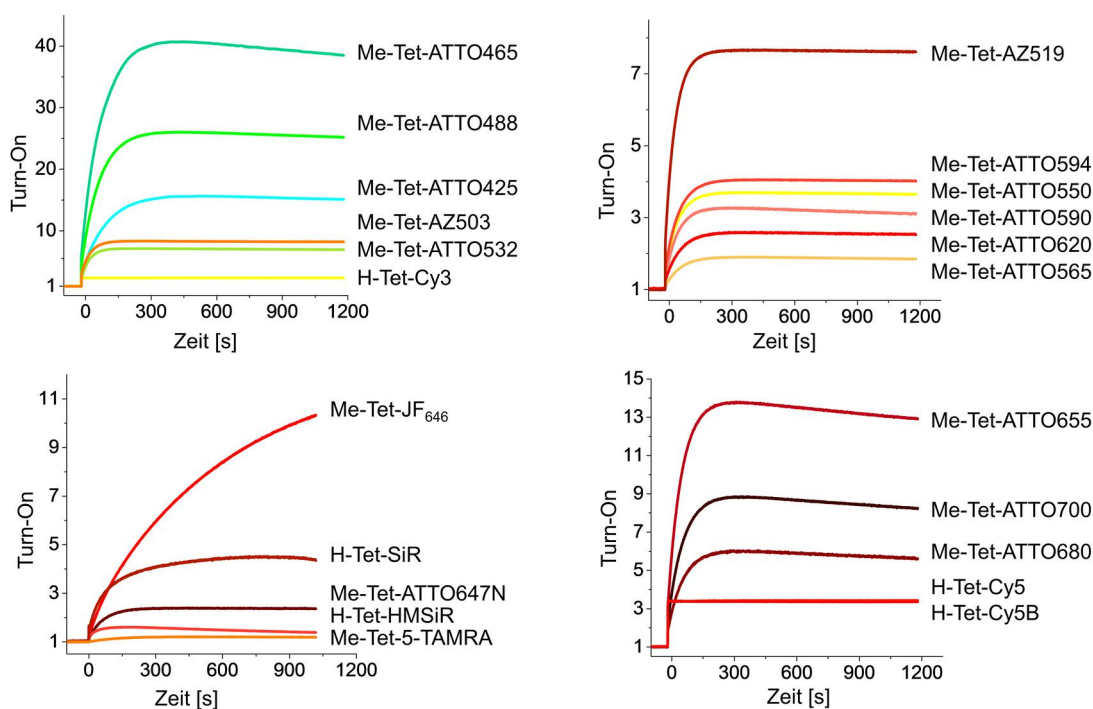


Abbildung 15 - Fluoreszenzintensitätserhöhung von 1 µm Lösungen verschiedener Tetrazin-Farbstoffe nach Zugabe von 25 µM TCO*-Lysin. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Die Mehrheit aller untersuchten Tetrazin-Farbstoffe zeigte bei Reaktion mit TCO*-Lysin einen starken Turn-On (Tabelle 8, Abbildung 15). Die Zunahme der Fluoreszenzintensität ist am stärksten bei den kurzwelligen Absorptionsfarbstoffen ATTO425, ATTO465 und ATTO488 mit Einschaltverhältnissen von 15-40. Aufgrund des breiten Absorptionsspektrums von Tetrazin, das bei ~ 515 nm ein Maximum aufweist, kann es die Fluoreszenz von Farbstoffen, die bei Wellenlängen ≤ 550 nm emittieren, durch Fluoreszenzresonanz-Energieübertragung (FRET) effizient löschen. Somit kann das Tetrazin sowohl als Löschmolekül als auch als bioorthogonale Klickreaktionsgruppe fungieren. Tatsächlich korrelieren die Einschaltverhältnisse der Tetrazin-Farbstoffe ATTO425, ATTO465, ATTO488 und ATTO532 nach der Kopplung an die TCO*-Lysin gemäß den Emissionsmaxima der Farbstoffe und ihrer Überlappung mit dem Absorptionsspektrum von Tetrazin (Abbildung 17). Die längerwelligen, absorbierenden Oxazin-Farbstoffe ATTO655, ATTO680 und ATTO700 sowie die großen Stoke-Shift-Farbstoffe AZ503 und AZ519 weisen Einschaltverhältnisse von 6-13fach auf (Tabelle 8). Diese hohen Einschaltverhältnisse spiegeln sich nicht vollständig in der Erhöhung der Fluoreszenzlebensdauer wieder, was darauf hindeutet, dass kurze Fluoreszenzlebensdauerkomponenten in unseren zeitkorrelierten Single-Photon-Counting (TCSPC)-Experimenten mit einer Zeitauflösung von ca. 40 ps nicht detektiert werden kann.

Langzeit-Spektroskopiestudien zeigten, dass einige Farbstoffe wie ATTO465, ATTO488 und ATTO655 nach dem anfänglichen starken Anstieg bei Zugabe von TCO*-Lys eine leichte, aber reproduzierbare Abnahme der Fluoreszenzintensität aufweisen (Abbildung 16 - rechts), die am ehesten auf die Tautomerisierung des TCO*-Tetrazin-Konjugats zurückzuführen ist, was zur Freisetzung von Lysin durch decarboxylative Eliminierung führt (Abbildung 16 - links). Diese Eliminierung führt zur Bildung einer neuen heterocyclischen Verbindung (Pyridazin), die die Fluoreszenz einiger Farbstoffe in Abhängigkeit von ihren elektronischen Eigenschaften potenziell löschen kann (Carlson et al., 2018). Zusätzlich ist bekannt, dass Acridin- und Oxazin-Farbstoffe dazu neigen, mit Aminosäuren in wässrigen Lösungsmitteln zu interagieren, wobei sich die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche verringert und es zu einer leichten Erhöhung der Quantenausbeute kommt (Doose et al., 2005; Vaiana et al., 2003). Die Eliminierung des Lysins reduziert diese Wechselwirkungen, sodass die Quantenausbeute wiederum abnehmen kann.

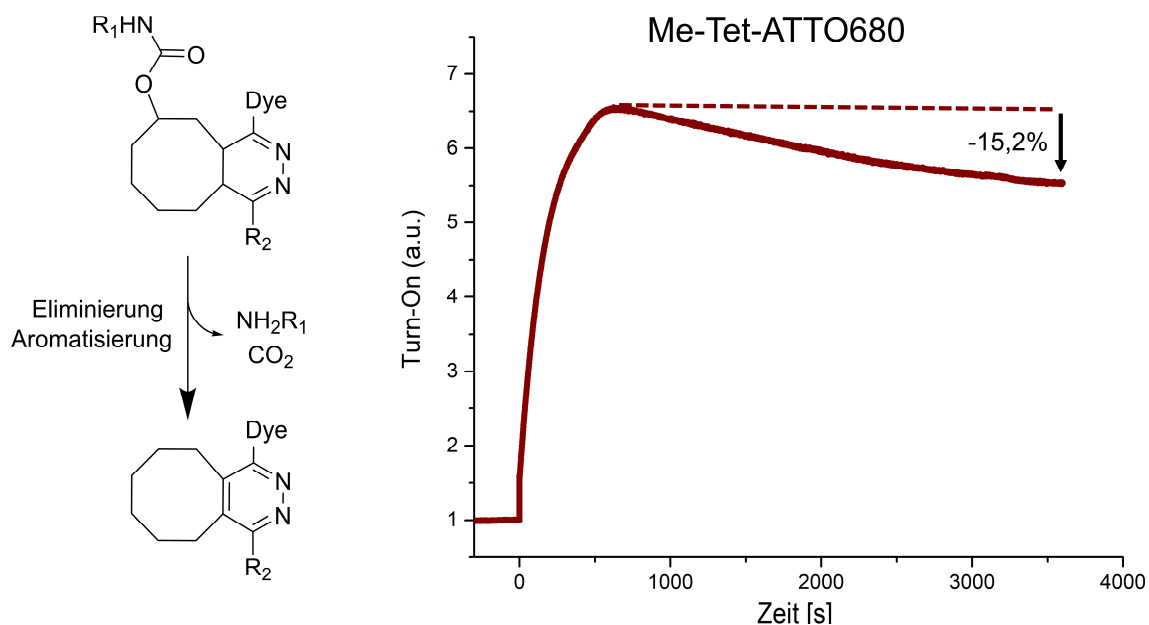


Abbildung 16 – Bioorthogonale 1,4-Eliminierung nach der Click-Reaktion von TCO-Lysin und Tetrazin. Durch Eliminierung und darauffolgender Aromatisierung kann es zur Freisetzung der TCO-Seitenkette NH₂R₁ (z.B. Lysin) und Bildung von Pyridazin kommen (links). Abnahme der Fluoreszenzintensität nach zuvorigem Turn-On vom Tetrazin-Farbstoff Me-Tet-ATTO680 (rechts).

Um die Art der Wechselwirkung zwischen den Farbstoffen und der Tetrazin-Gruppe näher zu beleuchten, wurde die Absorption und Emission von ungekoppelten Tetrazin-Amin (H-Tet und Me-Tet) gemessen (Abbildung 17). Es zeigt sich ein Anregungsmaximum bei ~515 nm sowie ein Emissionsmaximum ~560 nm, wobei die Maxima von Me-Tet um wenige Nanometer rotverschoben sind.

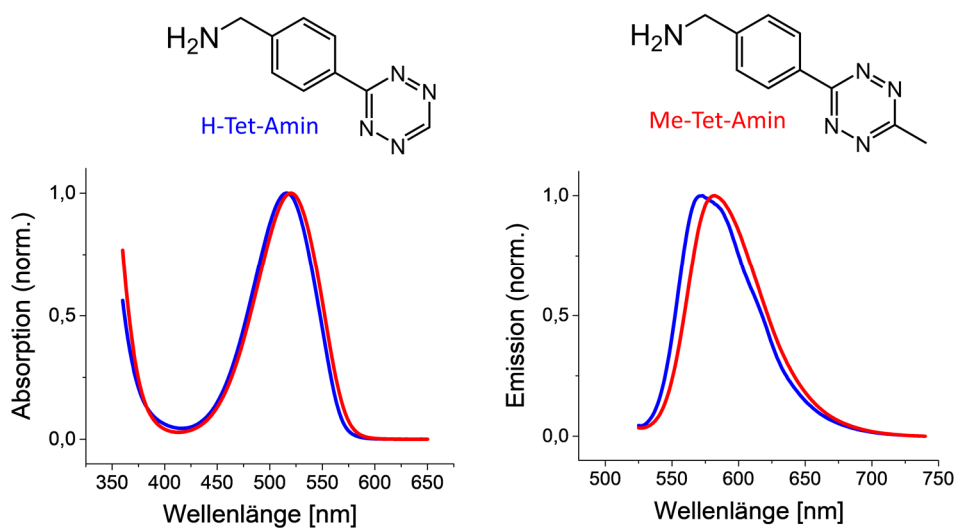


Abbildung 17 - Molekularstruktur, sowie normierte Absorptions- und Emissionsspektren von H-Tet-Amin (blau) und Me-Tet-Amin (rot). Mit Erlaubnis modifiziert nach (Beliu et al., 2019).

Zur näheren Untersuchung der Tetrazin-Farbstoff Löslichkeit wurden die Absorptions- und Emissionsspektren von Me-Tet-ATTO655 in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Ethanol, Methanol und Wasser) gemessen (Abbildung 18).

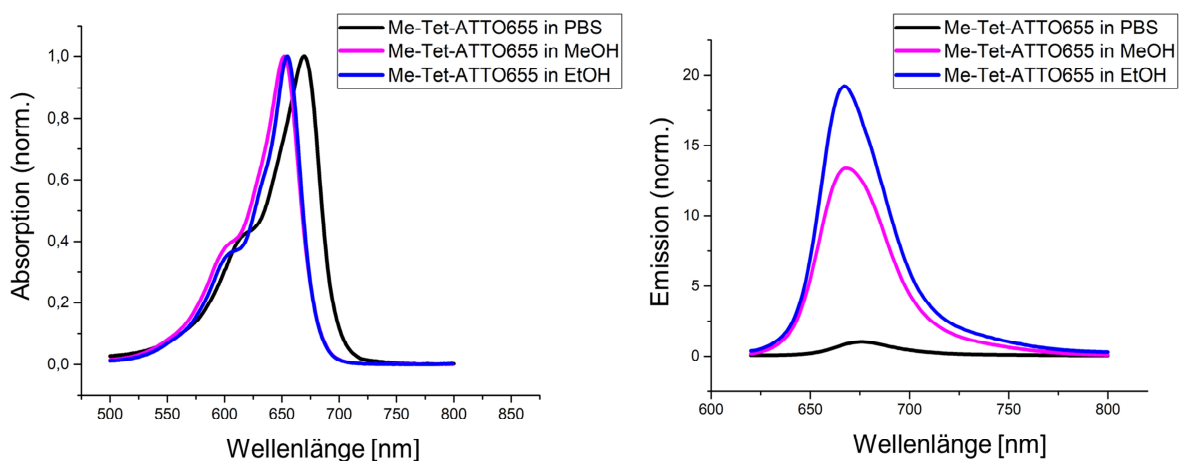


Abbildung 18 - Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) von Me-Tet-ATTO655 in PBS (schwarz), reinem Methanol (magenta) und reinem Ethanol (blau) normiert auf die Intensität gemessen in PBS.

Die gemessenen Absorptionsspektren sind in Lösemitteln geringerer Polarität Methanol (MeOH) oder Ethanol (EtOH) leicht blauverschoben. Die relativen Emissionsspektren sind ebenfalls leicht blauverschoben und zeigen zudem einen deutlichen Fluoreszenzanstieg in MeOH (~ 14 fach) und EtOH (~ 19 fach) im Verhältnis zur Intensität in Wasser. Zur Untersuchung der Unterschiede zwischen H-Tet- und Me-Tet-Farbstoffen wurden zudem noch vergleichende Fluoreszenzintensitätsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden exemplarisch die Emissionsspektren von freiem ATTO488, H-Tet-ATTO488 und Me-Tet-ATTO488 gemessen und auf die Intensität von freiem ATTO488 normiert (Abbildung 19). Die Fluoreszenzlöschung ist aus den Spektren erkennbar und die Unterschiede in der Höhe der Amplituden der Tet-Farbstoffe spiegeln in etwa den Lösquotienten bzw. die Turn-On Verhältnisse wieder. Die Intensität des H-Tet-ATTO488 ist jedoch höher als die des Me-Tet-ATTO488 (Abbildung 19, magenta und hellblau). Zeitaufgelöste Fluoreszenzintensitätsmessungen nach Zugabe von TCO*-Lysin zeigen eine ~ 30 fach schnellere Click-Reaktionskinetik von H-Tet-ATTO488 im Vergleich zu Me-Tet-ATTO488 (Abbildung 20– links) (Karver et al., 2011). Betrachtet man jedoch den Intensitätsanstieg von H-Tet-ATTO488 und Me-Tet-ATTO488 nach Zugabe von TCO*-Lysin ergibt sich für das H-Tet-Derivat ein Turn-On von ~ 5 fach, für das Me-Tet-Derivat ein Turn-On von ~ 20 (Abbildung 20– rechts). Unter Annahme identischer Lösmechanismen, lassen sich diese Unterschiede nur auf Veränderungen des Löschemoleküls zurückzuführen und deuten auf eine geringere Stabilität von H-Tet in wässrigen Medium hin (Karver et al., 2011).

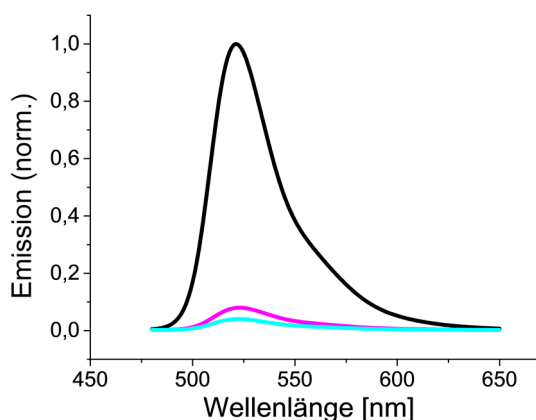


Abbildung 19 - Relative Fluoreszenzemissionsspektren von ATTO488 (schwarz), H-Tet-ATTO488 (magenta) und Me-Tet-ATTO488 (hellblau). Die Emissionsspektren werden zur gleichen Extinktion bei der Anregungswellenlänge normiert.

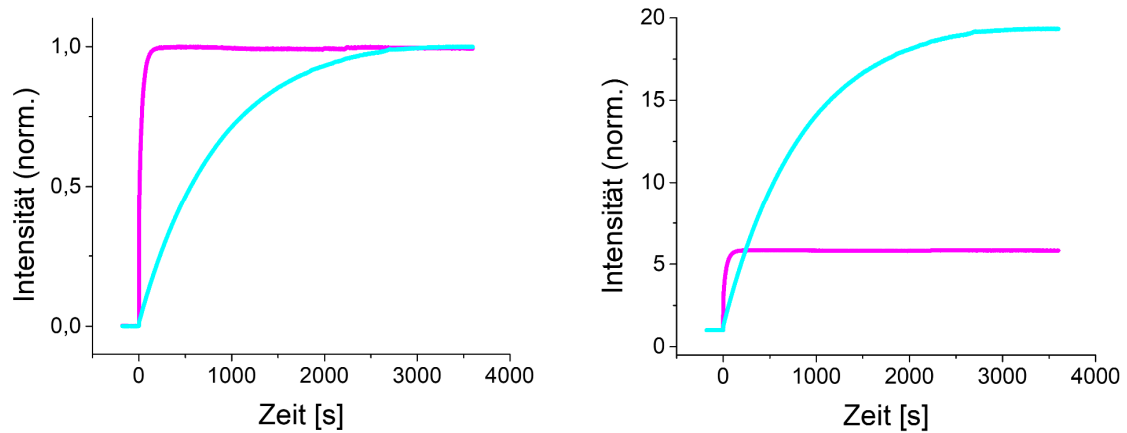


Abbildung 20 - Relative Fluoreszenzintensitätserhöhung von H-Tet-ATTO488 (magenta) und Me-Tet-ATTO488 (hellblau) unter Zugabe eines 25-fachen Überschusses an TCO*-Lysin, normiert auf die, nach Reaktion mit TCO*-Lysin aufgezeichnete, Fluoreszenzintensität (links). Relative Fluoreszenzintensitätserhöhung von H-Tet-ATTO488 (magenta) und Me-Tet-ATTO488 (cyan) unter Zugabe eines 25-fachen Überschusses an TCO*-Lysin, gemessen bei 522 nm und normiert auf die vor der Zugabe von TCO*-Lysin aufgezeichnete Fluoreszenzintensität. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

4.1.2 Fluoreszenzlebensdauern von Tet-Farbstoffen

Die Fluoreszenzlebensdauer ist für jeden Fluoreszenzfarbstoff charakteristisch und lässt sich durch zeitkorrelierte Einzelphotonen-Zählung (TCSPC) experimentell bestimmen. Die Lebensdauern eines Farbstoffes können sich jedoch je nach Umgebung oder Koppelung an Biomoleküle verändern.

4 Ergebnisse

Tabelle 9 - Fluoreszenzlebensdauern von Tetrazin-Farbstoffen vor und nach (+TCO) Click-Reaktion mit TCO*-Lysin (gemessen bei 25°C in PBS). Konzentrationen: 1 μ M Tetrazin-Farbstoff. 25 μ M TCO*-Lysin. Einige Literaturwerte sind nicht verfügbar (n.v.).

Tetrazine-Farbstoff	τ_{av} [ns]+TCO (Ref.)	τ_{av} [ns]
Me-Tet-ATTO425	3.93 (3.5)	1.28
Me-Tet-ATTO465	2.82 (2.2)	0.21
Me-Tet-ATTO488	3.60 (3.2)	1.39
Me-Tet-ATTO532	3.00 (3.8)	3.13
H-Tet-Cy3	0.44 (0.3)	0.37
Me-Tet-5-TAMRA	2.38 (2.3)	1.96
Me-Tet-AZ519	4.08 (n.v)	3.29
Me-Tet-AZ503	2.79 (n.v.)	2.38
Me-Tet-ATTO550	3.40 (3.2)	1.95
Me-Tet-ATTO565	3.80 (3.4)	2.24
Me-Tet-ATTO590	3.70 (3.7)	1.99
Me-Tet-ATTO594	3.74 (3.5)	1.85
Me-Tet-ATTO620	2.86 (2.9)	1.47
Me-Tet-JF ₆₄₆	3.01 (3.8)	2.45
Me-Tet-ATTO647N	3.58 (3.4)	3.01
H-Tet-Cy5	1.21 (1.0)	0.76
H-Tet-SiR	2.71 (2.6)	2.40
H-Tet-HMSiR	2.49 (2.5)	2.56
Me-Tet-ATTO655	2.12 (3.6)	1.50
H-Tet-Cy5B	1.91 (1.7)	1.08
Me-Tet-ATTO680	1.91 (1.8)	1.38
Me-Tet-ATTO700	1.81 (1.5)	1.28

Hierzu wurden von allen 22 Tet-Farbstoffen die Fluoreszenzlebensdauern vor und nach Zugabe von TCO*-Lysin experimentell bestimmt und mit dem Literaturwert des jeweiligen Farbstoffs (als freie Säure –COOH) vergleichend dargestellt (Tabelle 9). Die experimentell gemessenen Lebensdauern wurden durch mathematische Anpassung (Fit) bestimmt (siehe Kapitel 3.9). Die Qualität der Fits wurde anhand der reduzierten χ^2 -Werte und der Zufälligkeit der gewichteten Residuen beurteilt.

Für alle Fits wurden χ^2 -Werte zwischen 0.9 und 1.2 eingehalten. Die meisten Fluoreszenzfarbstoffe zeigten eine Fluoreszenzkinetik, welche mit einem biexponentiellen Modell beschrieben werden konnte. Die durchschnittlichen Fluoreszenzlebensdauern τ_{av} ergeben sich aus den amplitudengewichteten Fluoreszenzabklingdauern ($\tau_{av} = a_1\tau_1 + a_2\tau_2$) (Tabelle 9). Betrachtet man vergleichend die experimentell bestimmten Fluoreszenzlebensdauern vor und nach der Click-Reaktion, lässt sich bei (fast) allen verwendeten Farbstoffen eine Erhöhung der Lebensdauer nach der Zugabe von TCO*-Lysin feststellen.

Die Tetrazin-Farbstoffe Me-Tet-ATTO425, Me-Tet-ATTO465 und Me-Tet-ATTO488 zeigen ein deutlich verringerte Lebensdauern vor Zugabe des Click-Reaktionspartners. Diese erhöht sich nach Zugabe von TCO*-Lysin und stimmt weitestgehend mit der Referenzlebensdauer der freien Farbstoffe überein. Unter Berücksichtigung des Absorptionsspektrums von Tetrazin-Amin (Abbildung 17) mit einem Absorptionsmaximum bei ~ 515 nm und der hohen Turn-On Werte dieser Farbstoffe nach Click-Reaktion, kann davon ausgegangen werden, dass es zur Energieübertragung (FRET) zwischen Farbstoff und Tetrazin kommt. Das angeregte Fluorophore überträgt somit seine Energie auf das nicht- bzw. kaum-fluoreszierende Tetrazin, was zu einer verringerten Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors führt. Bei der Click-Reaktion geht das hierbei beteiligte Löschmolekül Tetrazin eine kovalente Bindung mit dem trans-Cycloocten ein. Außerdem kann kein effizienter FRET auftreten, sodass die Fluoreszenz des Farbstoffs sowie die charakteristische Fluoreszenzlebensdauer wiederhergestellt sind.

4.1.3 Fluoreszenzlöschung und Fluoreszenzzunahme

Bei der Bildung von Farbstoff-Löschmolekül-Komplexen, wie sie bspw. bei Oxazinen und Tryptophan bzw. Tetrazin auftreten, handelt es sich um eine statische Löschung, wobei die Fluoreszenzintensität die Fluoreszenzlebensdauer jedoch nicht verringert bzw. kaum verkürzt (Abschnitt 4.1.2) (Doose et al., 2005, 2009). Chaotrope Substanzen wie bspw. Guanidiniumchlorid (GCl) können in hoher Konzentration die Bildung solcher Komplexe verhindern. Die Zugabe hoher Konzentration (6 Molar (M)) GCl führt bei oxazinen Tet-Farbstoffen zu einer deutlichen Erhöhung (5-8fach) der Fluoreszenzintensität (Abbildung 21). Bei rhodaminen oder cyaninen Tet-Farbstoffen, bspw. Me-Tet-ATTO488 oder H-Tet-Cy5, führt die Zugabe von GCl zu keiner bzw. nur sehr geringen Erhöhung der Intensität (Abbildung 21).

Dies lässt sich durch die unterschiedlichen Mechanismen der Löschung mittels Tetrazin erklären: Während Oxazine (hauptsächlich) über Bildung von Grundzustandskomplexe statisch gelöscht werden, werden Rhodaminen bzw. Cyaninen durch andere Wechselwirkungen bzw. Mechanismen gelöscht (wie z.B. Stoßlöschung, FRET, etc.). Die Zugabe von GCl, welche die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Tetrazin aufheben kann, verursacht somit nur bei statisch-gelöschten Tet-Farbstoffen eine Intensitätszunahme (Me-Tet-ATTO655, Me-Tet-ATTO680 und Me-Tet-ATTO700), wohingegen sich die Intensität von Me-Tet-ATTO488 oder H-Tet-Cy5 nicht verändert.

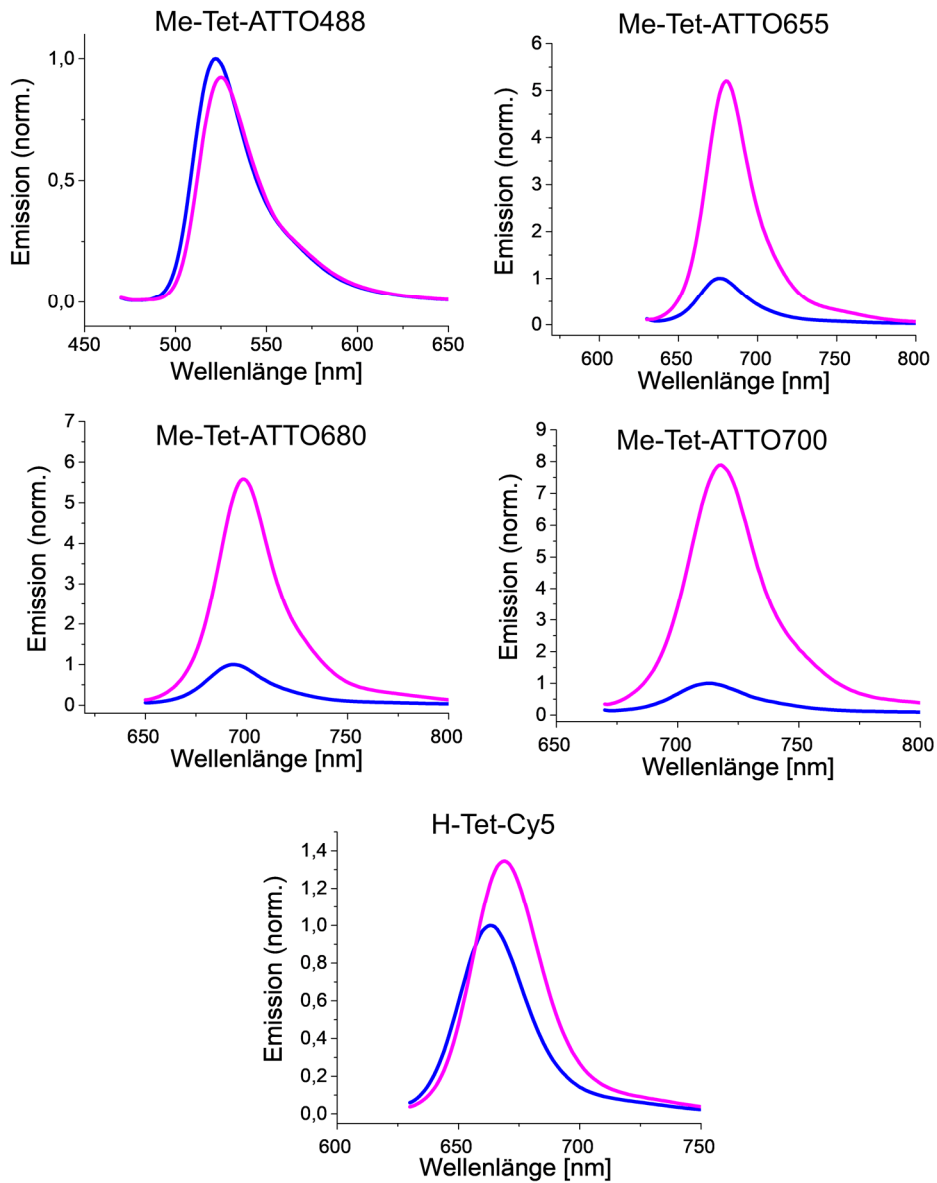


Abbildung 21 - Relative Fluoreszenzemissionsspektren von fünf verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen (Met-Tet-ATTO488, Met-Tet-ATTO655, Met-Tet-ATTO680, Met-Tet-ATTO700 und H-Tet-Cy5 in PBS (pH 7.4) ohne (blau) und mit 6M Guanidiniumchlorid (magenta) normiert auf die Fluoreszenzintensität ohne Guanidiniumchlorid. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

4.1.4 Stern-Volmer Analyse

Zur Untersuchung des zugrundeliegenden Löschmechanismus der längerwelligen, Tetrazin-Farbstoffe, wurden intermolekulare stationäre und zeitaufgelöste Löschversuche mit freien Farbstoffen und Me-Tet-Amin unter physiologischen Bedingungen (PBS, pH 7,4) durchgeführt (Abbildung 22). Zur Untersuchung des Löschmechanismus wird die Fluoreszenzintensitäts- sowie Lebenszeitveränderung in Abhängigkeit der Löschmolekülkonzentration bestimmt und aufgetragen (Stern-Volmer Plot).

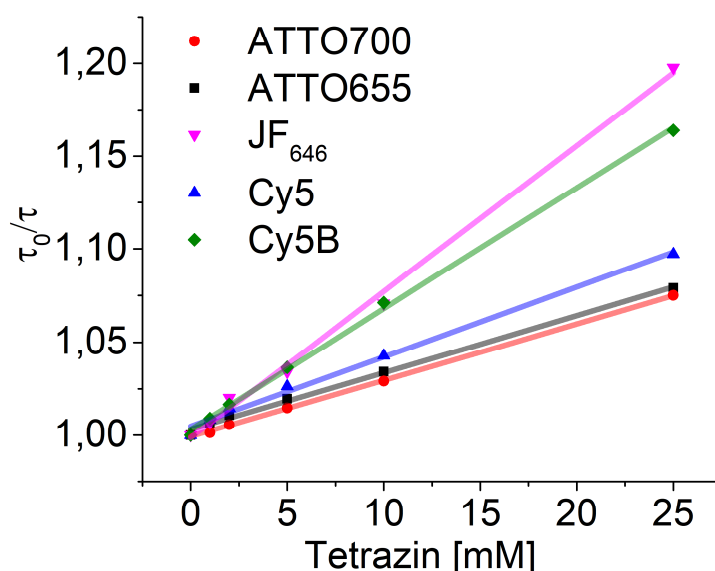


Abbildung 22 - Diagramm der Fluoreszenzlebensdauern von ATTO655, ATTO700, Cy5, Cy5B und JF₆₄₆, aufgenommen mit verschiedenen Konzentrationen von Tetrazin (Me-Tet-Amin) (0-25 mM) in PBS (pH 7.4). Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Die Bildung von nicht-fluoreszierenden Grundzustandskomplexen (statische Löschung) zeichnet sich durch unveränderte Fluoreszenzlebensdauern ($\tau_0/\tau = 1$) aus, wohingegen dynamische Löschprozesse (Stoßlöschung) sich durch verkürzte Lebensdauern in Abhängigkeit der Löschmolekülkonzentration ($F_0/F = \tau_0/\tau > 1$) auszeichnen.

Die Kombination beider Löschmechanismen führt zur konkaven Abweichung des linearen Verlaufs des Stern-Volmer Plots (siehe Abschnitt 3.9).

4 Ergebnisse

Im Stern-Volmer Plot lässt die Steigung aus dem Verhältnis von $(F_0/F)/(\tau_0/\tau)$ gegen die Löschmolekülkonzentration Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Löschmechanismen zu (Abbildung 23).

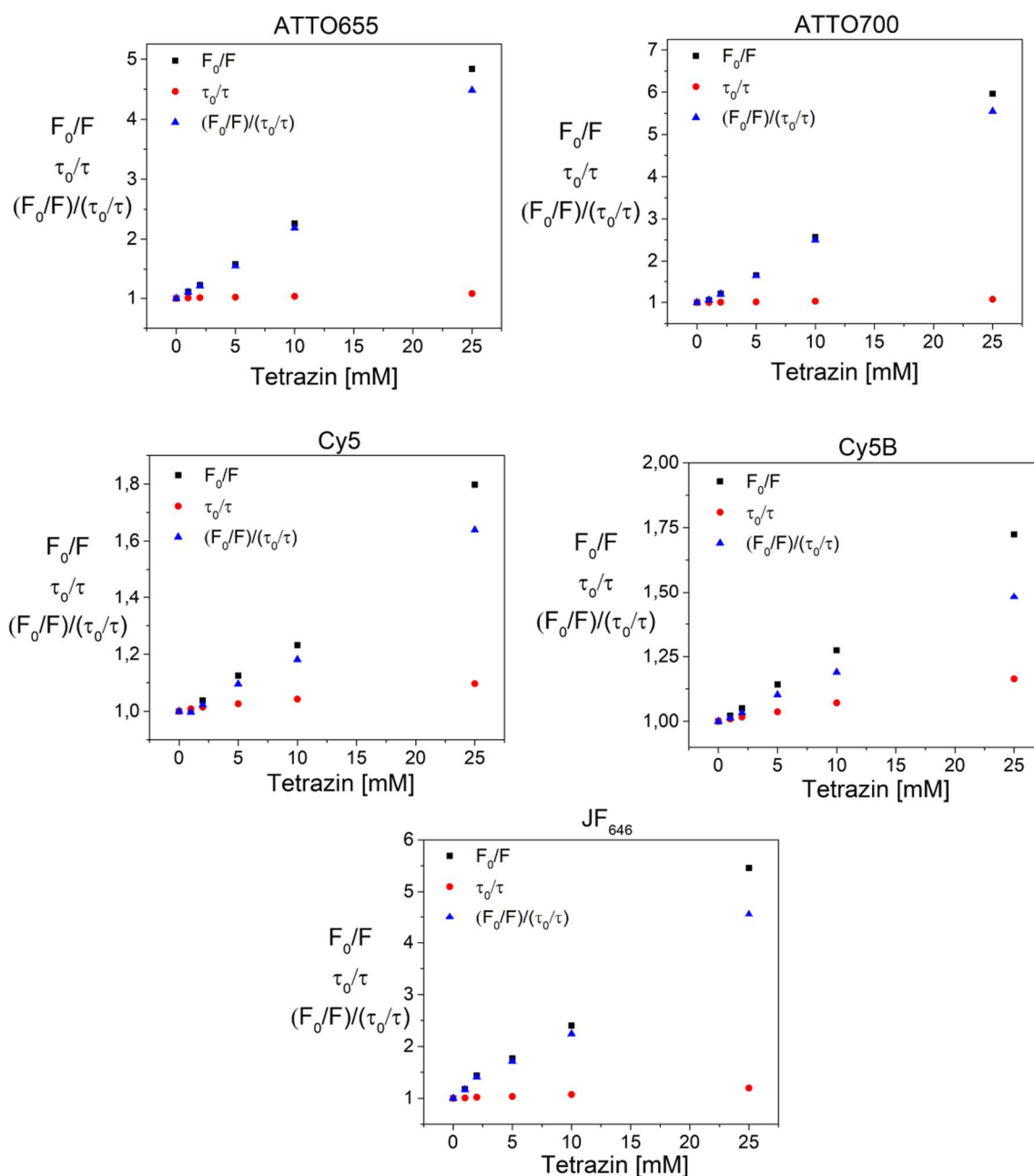


Abbildung 23 - Stationäre und zeitaufgelöste Stern-Volmer-Diagramme von ATTO655, ATTO700, Cy5, Cy5, Cy5B und JF₆₄₆, aufgenommen mit verschiedenen Konzentrationen von Me-Tet-Amin (0 - 25 mM) in PBS (pH 7.4). Mit Erlaubnis entnommen aus (Belieu et al., 2019).

Die relativen Fluoreszenzintensitäten zeigen, dass Tetrazin als effizientes Fluoreszenzlöschmolekül für die hier getesteten Farbstoffe dient. Um den Löschmechanismus von Tetrazin zu verdeutlichen, wurden die stationäre Fluoreszenzintensität sowie die Fluoreszenzlebensdauer der freien Farbstoffe in Abhängigkeit von der Tetrazin-Konzentration gemessen (Abbildung 23). Die Fluoreszenzintensität der oxazinen Farbstoffe ATTO655, ATTO700 und des Silizium-Rhodamin JF₆₄₆ werden bei Zugabe vom 25mM Tetrazin um ~ 80-85% reduziert, wohingegen sich die Intensitäten von Cy5 und Cy5B um ~ 40-45% reduzieren. Die relativen Lebensdauern verändern sich bei Überschuss an Tetrazin zwischen 7–20 % (Abbildung 22). Die lineare Anpassung der normierten Fluoreszenzlebensdauerdaten in Abhängigkeit von der Tetrazin-Konzentration ergibt eine dynamische Stern-Volmer-Konstante, K_D [M^{-1}]. Mit der Fluoreszenzlebensdauern τ_0 der reinen Farbstoffe kann die bimolekulare dynamische Löschratenkonstante k_{dyn} [$M^{-1}s^{-1}$] berechnet werden. Die erhaltenen Werte (Tabelle 10) zeigen dynamische Löschung Zusätzlich lässt sich durch lineare Anpassung der Löschmolekül-abhängigen Intensitätswerte die statische Stern-Volmer Konstante K_S abschätzen. Diese entspricht der Assoziationskonstante für die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Tetrazin K_A . Die Assoziationskonstante K_A kann somit durch Auftragen von $(F_0/F)/(\tau_0/\tau)$ gegenüber der Konzentration des Löschmoleküls Tetrazin berechnet werden.

Tabelle 10 - Statische und dynamische bimolekulare Löschkonstanten aus intermolekularen Löschexperimenten verschiedener Farbstoffe mit Tetrazin in PBS (pH 7.4, 25°C).

Farbstoffe	K_D [M^{-1}]	k_{dyn} [$\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$]	K_A [M^{-1}]	k_{stat} [$\times 10^9 M^{-1}s^{-1}$]
ATTO655	3.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	135 ± 4	73 ± 2
ATTO700	3.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	175 ± 7	110 ± 5
JF ₆₄₆	7.9 ± 0.3	2.6 ± 0.1	140 ± 3	46 ± 1
Cy5	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2	24 ± 1	24 ± 1
Cy5B	6.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	19 ± 1	10 ± 1

Die auf diese Weise erhaltenen Werte von k_{dyn} stellen eine dynamische Löschung nahe der Diffusionsgrenze ($\sim 6,5 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$) dar, was darauf hindeutet, dass die meisten Kollisionen zu einer Fluoreszenzlöschung führen. Darüber hinaus kann man eine starke statische Löschung für die beiden Oxazinfarbstoffe ATTO655 und ATTO700 sowie für den Si-Rhodaminfarbstoff JF₆₄₆ (Abbildung 23, Tabelle 10) beobachten, welche durch

nicht oder nur schwach fluoreszierende Grundzustandskomplexe zwischen den längerwelligen, absorbierenden Oxazin- und Si-Rhodaminfarbstoffen und Tetrazin in wässrigen Lösungen erklärbar sind, deren Lebensdauer unter der Zeitauflösung des TCSPC-Aufbaus (~ 50 ps) liegt.

4.1.5 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

Oxazine Farbstoffe wie bspw. ATTO655 können mit Tetrazinen, durch hydrophobe Wechselwirkung getriebene, nicht-fluoreszierende Grundzustandskomplexe ausbilden. Für Tetrazin-Farbstoffe, gekoppelt über einen flexiblen Linker, kann somit ein Gleichgewicht zwischen einer offenen (fluoreszierenden, A_{offen}) und einer geschlossenen (komplexierten und nicht-fluoreszierenden, $B_{\text{geschlossen}}$) Konformation angenommen werden. Um dieses Gleichgewicht genauer zu untersuchen, wurden mit Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)-Messungen durchgeführt. Durch FCS werden zeitliche Fluoreszenzschwankungen von stark verdünnten Proben (Konzentration zwischen pM-nM) analysiert. Das Signal ist Einzelmolekül-empfindlich und untersucht ~ 1 - 20 Moleküle, die durch ein begrenztes Detektionsvolumen ($\sim 1 \times 10^{-15}$ l) diffundieren. Charakteristische Zeitskalen von molekularen Prozessen, die zu schwankender Fluoreszenz-emission führen, können dadurch unter thermodynamischen Gleichgewichtsbedingungen mit einer Zeitauflösung im Bereich von Nanosekunden gemessen werden (Chattopadhyay et al., 2002; Doose et al., 2007; Neuweiler et al., 2005).

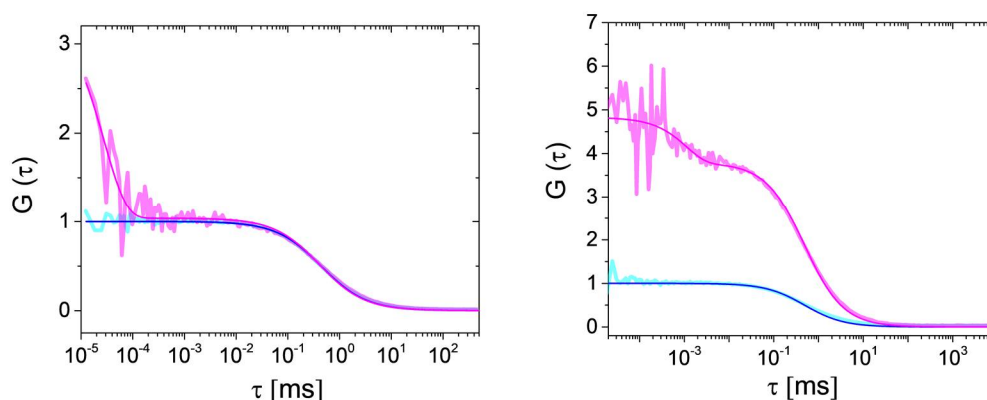


Abbildung 24 - FCS-Kurven des freien ATTO655 (cyan) und in Gegenwart von 25 mM Me-Tet-Amin (magenta, links). FCS-Kurven des Me-Tet-ATTO655 (magenta) und des freien ATTO655 (cyan, rechts) (Konzentration 1 nM). Amplitude unterschiede spiegeln die Existenz von gelöschten Komplexen wieder, die auf Zeitskalen stabil sind, die länger als die Diffusionszeitskala sind. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Unter moderaten Anregungsbedingungen ist im Submillisekunden-Zeitbereich von FCS-Kurven, die von Me-Tet-ATTO655 nach Reaktion mit TCO*-Lys aufgenommen wurden, kein photophysikalischer Prozess, wie z.B. die Kreuzung zwischen Systemen, erkennbar. Die FCS-Kurve zeigt einen Millisekunden-Zerfall, der der Diffusion der Moleküle durch das konfokale Anregungs-/Detektionsvolumen entspricht (Abbildung 24). Die, von Me-Tet-ATTO655 vor der Zugabe von TCO*-Lys, aufgezeichnete FCS-Kurve zeigt jedoch einen zusätzlichen schnellen Abfall auf der Nano- bis Mikrosekundenzeitskala zusammen mit einer Änderung der Amplitude (Abbildung 23). Bimolekulare Experimente mit ATTO655 und 25 mM Tetrazin zeigen einen ähnlichen FCS-Zerfall (Abbildung 23- links), der die Annahme einer diffusionsgetriebenen Bildung von nicht-fluoreszierenden Grundzustandskomplexen bestätigt. Die FCS-Autokorrelationskurven wurden an ein analytisches Modell für die Diffusion und ein Zwei-Zustands-Gleichgewicht mit Off- und On-Ratenkonstanten k_{closing} und k_{opening} angepasst. Durch Anpassen der FCS-Kurve, ergibt sich die Off-Ratenkonstante $k_{\text{closing}} = (0,04 \pm 0,01) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ und die On-Ratenkonstante $k_{\text{opening}} = (0,015 \pm 0,002) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. Die daraus ermittelten Werte für die Assoziationsratenkonstante mit $(1,5 \pm 0,5) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und Assoziationskonstante mit $(100 \pm 23) \text{ M}^{-1}$ liegen im Bereich der Werte aus der Stern-Volmer-Analyse. Konzentrationsschätzungen aus der Amplitude von FCS-Kurven bestätigen, dass alle Fluorophore zu den beobachteten bimolekularen FCS-Zerfällen beitragen und es keine Population von Fluorophoren gibt, die über Zeiträume von mehr als $\sim 1 \text{ ms}$ (die diffusionsbegrenzte Beobachtungszeit) gelöscht werden (Abbildung 24- rechts). Die für Me-Tet-ATTO655 aufgezeichneten Fluoreszenzschwankungen (im Bereich von ns- μs) spiegeln somit die Kontakt-induzierte intramolekulare Löschung von ATTO655 durch Tetrazin wieder (Dose et al., 2005). Die Zeitskala der schnellen Löschfluktuation ist deutlich von Diffusionsbewegung getrennt. Die berechneten Geschwindigkeitskonstanten für k_{opening} mit $\sim 9,0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ und k_{closing} mit $\sim 3,3 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ zeigen, dass ATTO655 durchschnittlich 27% der Zeit in seiner gelöschten, komplexierten Konformation verweilt. Der schnelle Zerfall macht damit etwa ein Viertel des beobachteten Turn-On (von ~ 13) aus. Der verbleibende Anteil des Turn-On spiegelt sich in einer Konzentrationsdifferenz von ~ 4 , der aus der Amplitude der FCS-Kurven beobachtet wird (Abbildung 24- rechts). Die Beobachtung derartiger Zerfallskomponenten auf Zeitskalen oberhalb und unterhalb der FCS-Diffusionszeit von $\sim 1 \text{ ms}$, die in intermolekularen Löschexperimenten nicht nachgewiesen werden können

(Abbildung 24), zeigt, dass der intramolekulare Linker zusätzliche konformationsbedingte Beschränkungen für den Prozess der Komplexbildung mitbringt.

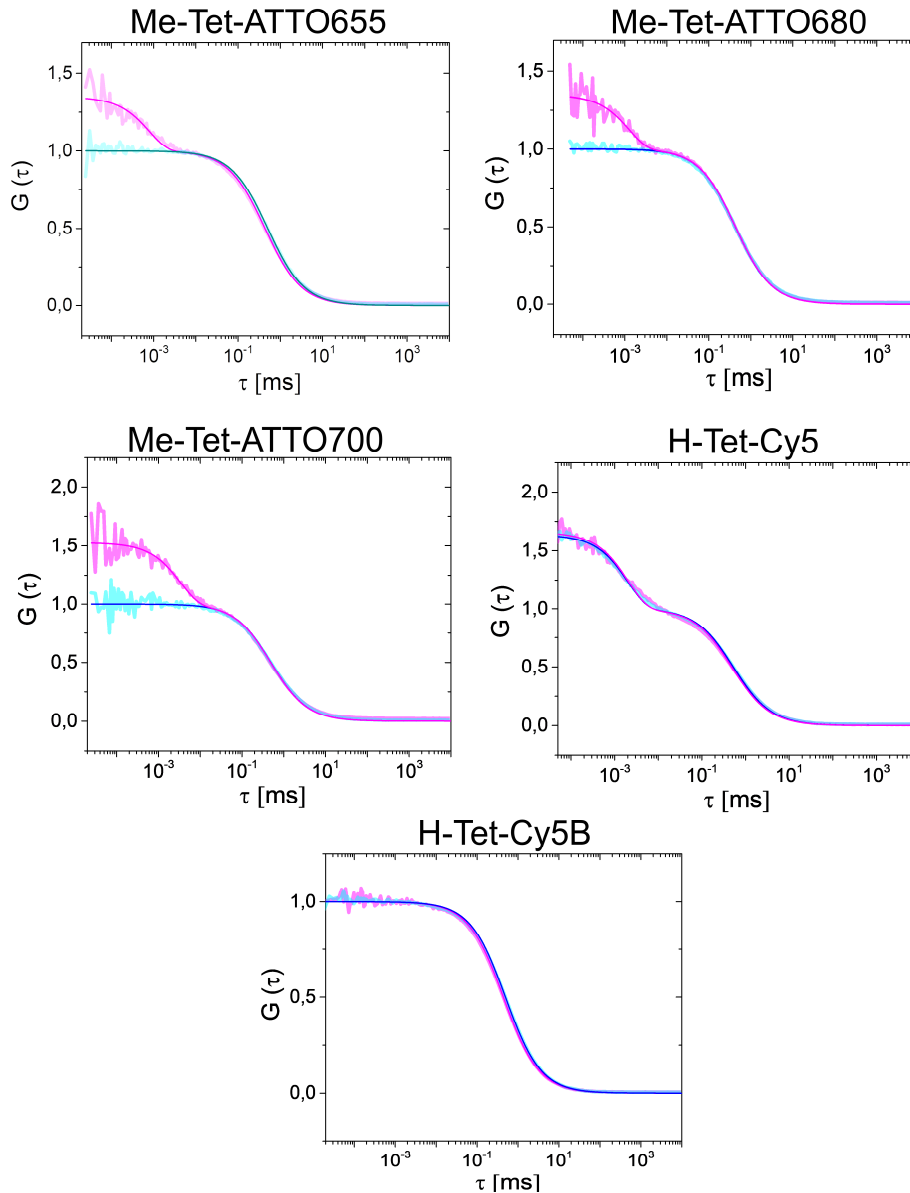


Abbildung 25 - FCS-Autokorrelations-Kurven verschiedener Tetrazin-Farbstoffe vor (magenta) und nach (cyan) der Click-Reaktion mit TCO*-Lysin. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Während die FCS-Autokorrelationsfunktionen von Me-Tet-ATTO680 und Me-Tet-ATTO700 sich ähnlich zu Me-Tet-ATTO655 verhalten, zeigen die FCS-Kurven von Me-Tet-Cy5 und Me-Tet Cy5B keine Veränderung der Amplituden bzw., Kinetiken

vor und nach Zugabe vom Click-Reaktionspartner TCO*-Lysin. Das deutet darauf hin, dass diese Farbstoffe keine gelöschten Grundzustandskomplexe mit Tetrazin ausbilden. Die beobachtete schnelle Kinetik von Cy5 ist auf eine gut charakterisierte cis/trans-Isomerisierung zurückzuführen (Widengren und Schwille, 2000). Diesbezüglich kann festgehalten werden, dass der Farbstoff Cy5B, welcher aufgrund der eingeschränkten konjugierten Bindungsstruktur nicht isomerisierbar ist, keine solche schnelle Kinetik zeigt.

4.2 Visualisierung von Membranrezeptoren

4.2.1 Auswahl geeigneter Proteine sowie Click-Stellen

Für die Auswahl derjenigen Positionen in der Aminosäurekette, welche gegen eine un-natürliche Aminosäure ausgetauscht werden sollen, werden eine Reihe von Kriterien formuliert. Prinzipiell kann jedes Codon eines Plasmids in ein Amber-Stop-Codon mutiert werden. Zudem gibt es die Möglichkeit das Amber-Codon zusätzlich in eine cDNA einzufügen, ohne eine bestehende Aminosäure der Polypeptidsequenz zu ersetzen. Für die Identifizierung geeigneter Amber-Mutanten sind jegliche Strukturinformationen vorteilhaft, da viele Aminosäuren essentiell für die Faltung, Stabilität oder Funktion eines Proteins sein können und der Einbau der uAA in diese Bereiche eine Beeinträchtigung des Proteins verursachen könnte. Zudem sollten Positionen ausgewählt werden, die auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind, da diese bei der darauffolgenden Click-Färbung besser zugänglich sind als verborgene Aminosäuren. Zudem sollte das Expressionssystem nach Möglichkeit C-terminal vom Zielprotein für ein Fluoreszenzprotein (z.B. GFP) kodieren. Das Fluoreszenzprotein wird nur dann exprimiert, falls die amber-Suppression stattgefunden hat und die uAA erfolgreich eingebaut wurde. Die Detektion des FP zeigt somit die Effizienz der Inkorporation der uAA an und sollte bei Zellen ohne zugegebene uAA nicht sichtbar sein. Ist ein geeignetes Expressionssystem gefunden, werden die Click-Positionen optimiert: Hierzu empfiehlt es sich eine Reihe von Positionen der Aminosäurekette auszuprobieren. Die Signalstärke des C-terminal angehängten FP sowie die Lokalisation des Zielproteins im jeweiligen Zellkompartiment (z.B. Membranrezeptoren sollten größtenteils in der Zellmembran detektiert werden können) ermöglichen den Vergleich der Click-Mutanten und die Identifizierung der optimalen Click-Position. Die erhaltenen Click-Mutanten werden daraufhin alle unter ansonsten identischen Bedingungen in HEK293T-Zellen exprimiert

und ihre Expression, Lokalisation und Click-Effizienz getestet (Abbildung 27). Auf diese Weise kann eine optimale Mutante identifiziert werden.

4.2.2 Click-Mutanten in verschiedenen Systeme

NMDA-Rezeptor (NR1)

Die Identifizierung geeigneter Click-Positionen beim NMDA-Rezeptor erfolgte über die Modifizierung und Mutagenese der NR1-Untereinheit. Die Kristallstrukturen ermöglichen die Auswahl von sieben Positionen an der Oberfläche des Rezeptors auf der extrazellulären Seite (Abbildung 26): K275TAG, K298TAG, K378TAG, K388TAG, Y392TAG, S395TAG und K421TAG. Die ausgewählten Positionen befinden sich in weitestgehend unstrukturierten Bereichen des Rezeptors und weisen in der Kristallstruktur keine sterischen Hinderungen für die spätere Färbung mit einem Tetrazin-Farbstoff auf.

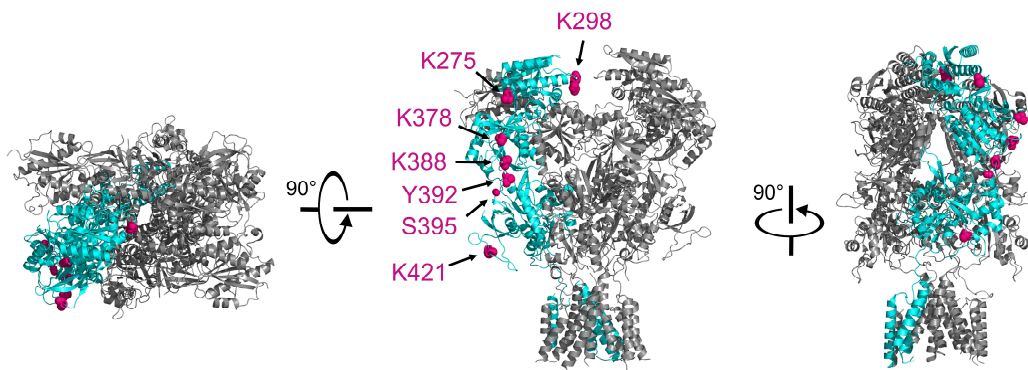


Abbildung 26 - Kristallstruktur des NMDA-Rezeptors mit annotierten Click-Mutanten in verschiedenen Orientierungen (PDB 4PE5). Der Volllängen-Rezeptor (grau) besteht aus vier Untereinheiten, wobei die NR1-Untereinheit (cyan) an verschiedenen Positionen mit einem amber-Codon modifiziert wurde (pink).

Die erhaltenen Click-Mutanten werden daraufhin alle unter ansonsten identischen Bedingungen in HEK293T-Zellen exprimiert und ihre Expression, Lokalisation und Click-Effizienz getestet (Abbildung 27).

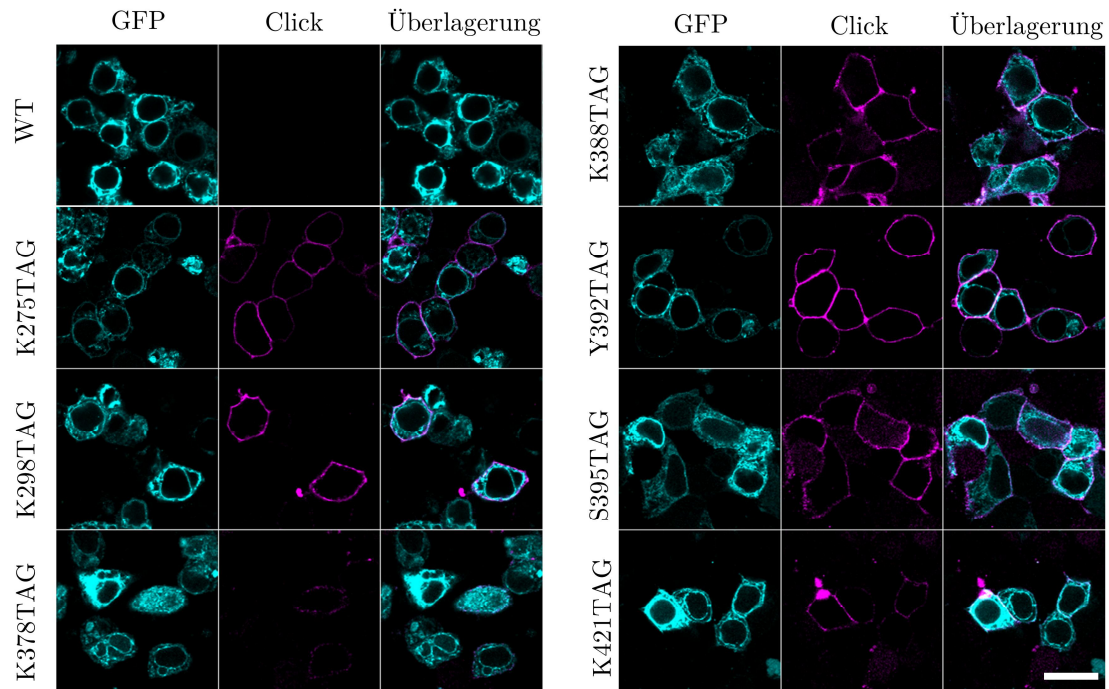


Abbildung 27 - Exemplarischer Überblick der Expression verschiedener Click-Mutanten in der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und Click-Färbung (cLSM). Der Wildtyp(WT)-Rezeptor ohne amber-Codon zeigt hierbei, trotz Zugabe von TCO*-Lysin, keine Click-Färbung, wohingegen alle weiteren Konstrukte bei Zugabe des Membran-impermeablen Click-Farbstoffs H-Tet-Cy5 eine Membranfärbung aufweisen. Die Längenskala entspricht 20 μm . Helligkeits- und Kontrasteinstellungen sind für alle Mutanten identisch. Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Neubert et al., 2018).

Kainat-Rezeptor (GluK2)

Die Identifizierung geeigneter Click-Positionen beim Kainat-Rezeptor erfolgte über die Modifizierung und Mutagenese der GluK2-Untereinheit. Die Kristallstruktur ermöglichte die Auswahl von fünf Positionen an der Oberfläche des Rezeptors auf der extrazellulären Seite (Abbildung 28): S47TAG, S272TAG, K306TAG, S309TAG und S343TAG. Die ausgewählten Positionen befinden sich in weitestgehend unstrukturierteren Bereichen der Amino-terminalen Domäne (ATD) des Rezeptors und weisen in der Kristallstruktur keine sterischen Hinderungen für die darauffolgende Färbung mit einem Tetrazin-Farbstoff auf.

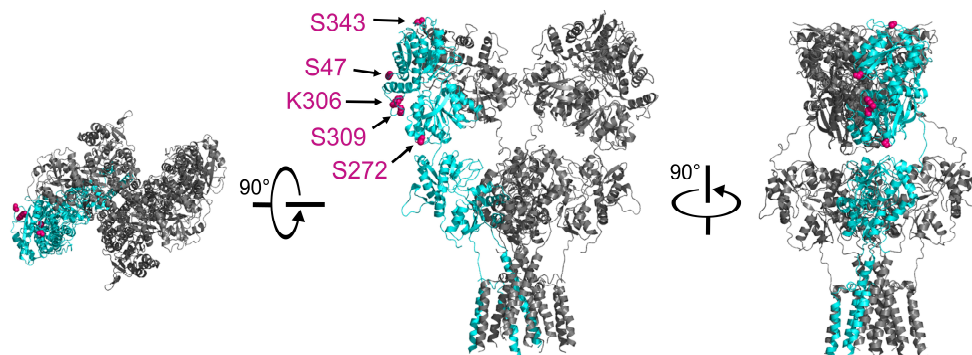


Abbildung 28 - Kristallstruktur des Kainat-Rezeptors mit annotierten Click-Mutanten in verschiedenen Orientierungen (PDB 5KUF). Der Volllängen-Rezeptor (grau) besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei eine GluK2-Untereinheit (cyan) an verschiedenen Positionen mit einem Amber-Codon modifiziert wurde (pink).

TNF-Rezeptor (TNFR1)

Die Identifizierung geeigneter Click-Positionen beim TNF-Rezeptors erfolgte über die Modifizierung und Mutagenese der TNFR1-Untereinheit. Die Kristallstruktur ermöglichten die Auswahl von fünf Positionen an der Oberfläche des Rezeptors auf der extrazellulären Seite (Abbildung 29): S42TAG, Q77TAG, R121TAG, S137TAG und K161TAG. Die ausgewählten Positionen befinden sich in weitestgehend unstrukturierteren Bereichen der extrazellulären Domäne des Rezeptors und weisen in der Kristallstruktur keine sterischen Hinderungen für die nachfolgende Färbung mit einem Tetrazin-Farbstoff auf.

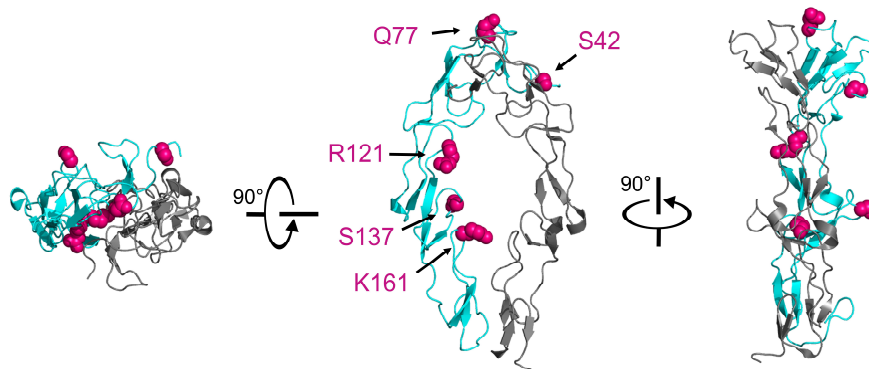


Abbildung 29 - TNFR1-Dimer (Modell) basierend auf der Struktur des löslichen TNFR1 (PDB 1NCF) mit annotierten Click-Mutanten in verschiedenen Orientierungen. Das Dimer besteht aus zwei Untereinheiten, wobei eine Untereinheit (cyan) an verschiedenen Positionen mit einem Amber-Codon modifiziert wurde (pink).

4.2.3 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie

Im folgenden Unterkapitel finden sich exemplarische konfokale Fluoreszenzaufnahmen aller Rezeptoren, die im Rahmen dieser Arbeit mithilfe des Einbaus unnatürlicher Aminosäuren und der click-chemischen Kopplung markiert wurden. Die Expressionssysteme beinhalteten stets das Zielgen sowie ein C-terminal angehängtes Fluoreszenzprotein (z.B. eGFP oder tdEOS). Eine detaillierte Erklärung über die verwendeten Plasmide bzw. Konstrukte findet sich in Abschnitt Material und Methoden 3.4.

Für die bioorthogonalen Click-Färbungen wurde mithilfe der Amber-Suppressionsmethode der genetische Code der Zellen erweitert und die unnatürliche Aminosäure TCO*-Lysin ortspezifisch eingebaut (siehe Theorie 1.2). Die darauffolgende Click-Färbung erfolgte in allen Rezeptor-Fluoreszenzaufnahmen mit dem Farbstoff H-Tet-Cy5, da diese von den meist grün-fluoreszierenden Fluoreszenzproteinen gut spektral unterscheidbar ist und die Zellmembran nicht durchdringen kann. Zudem zeichnet sich der Farbstoff mit seinen photophysikalischen Eigenschaften durch die Nutzbarkeit in hochauflösenden Lokalisationsmikroskopieverfahren, wie z.B. α STORM, aus.

Ionotrope Glutamaterezeptoren

Die Click-Färbung des NMDA- und Kainatrezeptors erfolgte nach Standardprotokoll (siehe Material und Methoden 3.10) und diente der Untersuchung der Click-Effizienz bzw. -Spezifität der Markierungsmethode.

Die Expression des NMDA-Rezeptors erforderte zudem die Co-Expression der NR2B-Untereinheit, da es sonst nicht zur Ausbildung funktionaler Rezeptoren auf der Zellmembran und zu einer Akkumulation von NR1-Untereinheiten in der Zelle kommen kann. Der Kainat-Rezeptor kann auch als Homotetramer in der Zellmembran assemblieren, sodass keine Co-Transfektion anderer Untereinheiten notwendig ist (Lerma, 2003). Die Überexpression der funktionalen NMDA-Rezeptoren zeigt, dass die Rezeptoren sowohl intrazellulär als auch membranständig lokalisiert sind (Abbildung 30). Der intrazelluläre Anteil deutet auf Mislokalisierung des eigentlich membranständigen Rezeptors hin. Dieser Effekt wird oftmals in Überexpressionssystemen beobachtet, da der Transfer zur Zellmembran durch die starke Überexpression beeinflusst wird und Zielproteine daraufhin an Zellkompartimenten (wie bspw. dem endoplasmatischen Reticulum, ER) akkumulieren. Die Click-Färbung mit H-Tet-Cy5 hingegen zeigt eine selektive und spezifische Markierung der extrazellulären bzw. membranständigen Population an NMDA-Rezeptoren.

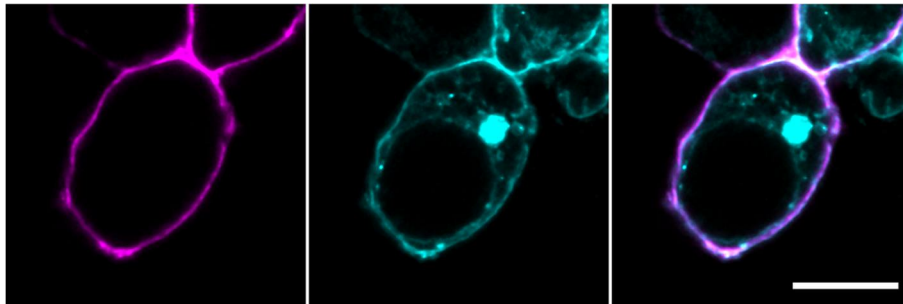


Abbildung 30 - Konfokales Fluoreszenzbild des klickbaren NMDA-Rezeptors 1 (NR1^{Y392TAG}-GFP). Die ortsspezifische extrazelluläre Click-Färbung erfolgte mit dem Membrane-undurchlässigen Farbstoff H-Tet-Cy5 (1,5 μ M) (magenta). Der GFP-Kanal (cyan) und das Überlagerungsbild sind ebenfalls dargestellt. Skala, 10 μ m.

Zur Untersuchung der Markierungseffizienz und Spezifität wurden Vergleichsfärbungen zwischen Click-Färbung und klassischen Antikörperfärbung durchgeführt (Abbildung 31). Der verwendete Antikörper erkennt hierbei ein identifiziertes Epitop in der ATD der NR1-Untereinheit und ermöglichte so die extrazelluläre Markierung des NMDA-Rezeptors. Der Vergleich beider Markierungsmethoden zweier ansonsten identischer Transfektions- bzw. Probenansätze zeigte dabei deutliche Unterschiede bezüglich der Markierungseffizienz:

Während die Antikörper-Färbung ein spezifisches, aber unregelmäßiges Fluoreszenzsignal in der Zellmembran zeigte, deutete die Click-Färbung auf eine homogene Gleichverteilung auf der Zellmembran hin. Zudem sind die Intensitäten der Click-Färbung deutlich höher (Neubert et al., 2018). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die NR1-Markierungsstelle für die kleinen Tet-Farbstoffe (1-2 nm) besser zugänglich ist als für die größeren Antikörper (10-15 nm). Eine mögliche Erklärung ist, dass das Epitop des Antikörpers sterisch durch andere Membrankomponenten abgeschirmt und so die Antigen-Antikörper-Erkennung des IgG-Antikörpers wesentlich beeinflusst sein könnte. Darüber hinaus zeigen Antikörper-Färbungen während der Fixierung mit Aldehyden (z.B. Formaldehyd) häufig induzierte Farbstoff- bzw. Rezeptoraggregationen (engl. cluster) und führen so zu Artefakten in der Charakterisierung von Membranrezeptoren. Im Gegensatz hierzu scheint die Click-Färbungen keinen solchen Effekt zu zeigen und eine Visualisierung der homogen-verteilten NMDA-Rezeptoren zu ermöglichen.

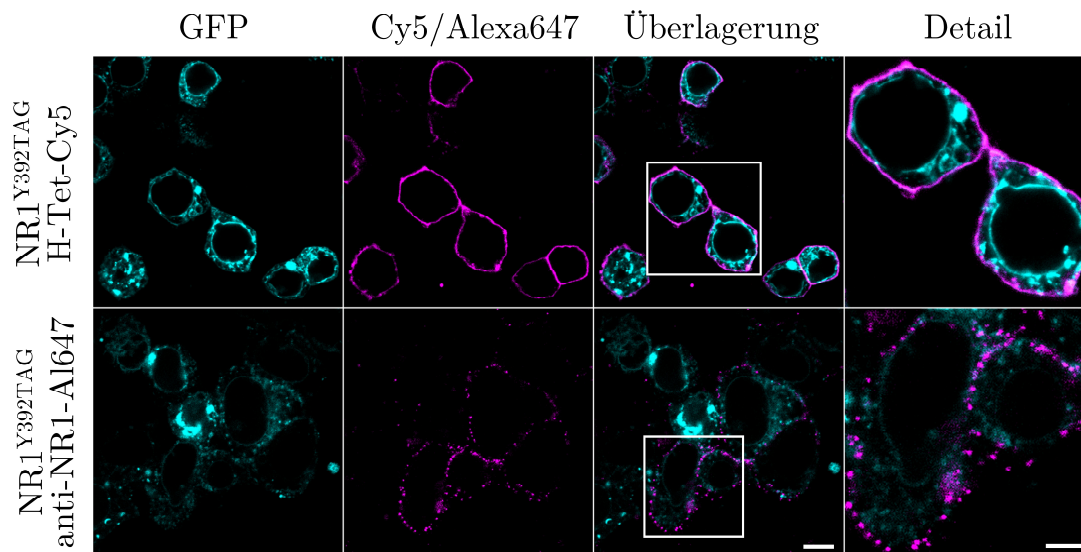


Abbildung 31 - Vergleich der Antikörperfärbung und Click-Färbung. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen des Konstrukts NR1^{Y392TAG}-eGFP in HEK293T-Zellen überexprimiert. GFP-Signal (cyan), H-Tet-Cy5 und Antikörper-Alexa647 (magenta). Die Längenskala ist 10 μm (Überlagerung) bzw. 5 μm (Detail). Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Neubert et al. 2018).

Die Überexpression der Kainat-Rezeptoren zeigt analog zu den zuvor beschriebenen NMDA-Experimenten, dass die Rezeptoren sowohl intrazellulär als auch membranständig lokalisiert sind (Abbildung 32).

Der intrazelluläre Anteil deutet hier ebenfalls auf Mislokalisationen, verursacht durch das Überexpressionssystem, des eigentlich membranständigen Rezeptors hin. Die Click-Färbung mit H-Tet-Cy5 hingegen zeigt wiederum eine selektive und spezifische Markierung der extrazellulären bzw. membranständigen Population an Kainat-Rezeptoren.

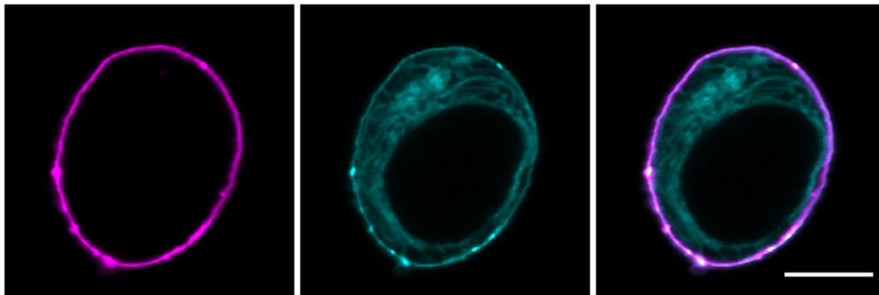


Abbildung 32 - Konfokales Fluoreszenzbild des anklickbaren Kainat-Rezeptors (GluK2^{S343TAG}-eGFP). Die ortsspezifische extrazelluläre Click-Färbung erfolgte mit dem Membran-undurchlässigen Farbstoff H-Tet-Cy5 (1,5 μ M) (magenta). Der eGFP-Kanal (cyan) und das Überlagerungsbild sind ebenfalls dargestellt. Skala 10 μ m. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Die Markierungseffizienz und Spezifität wurde ebenfalls über Vergleichsfärbungen zwischen Click-Färbung und klassischen Antikörperfärbung durchgeführt (Abbildung 33). Alle kommerziell erhältlichen Antikörper erkennen jedoch kein extrazelluläres Epitop, sondern den intrazellulären Bereich der Transmembrandomäne des Kainat-Rezeptors. Der Vergleich beider Markierungsmethoden ist daher beeinträchtigt, da die Click-Färbung eine Lebendzellfärbung der Rezeptoren ermöglicht. Die Antikörperfärbung bedarf jedoch einer Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran bedarf, da der anti-GluK2-Antikörper nicht selbstständig die Zellmembran durchdringen kann (Abbildung 33). Die Visualisierung der homogen-verteilter Kainat-Rezeptoren ist in Lebendzellexperimenten daher zwar mit Click-Färbungen, jedoch nicht mit klassischen Antikörperfärbung möglich.

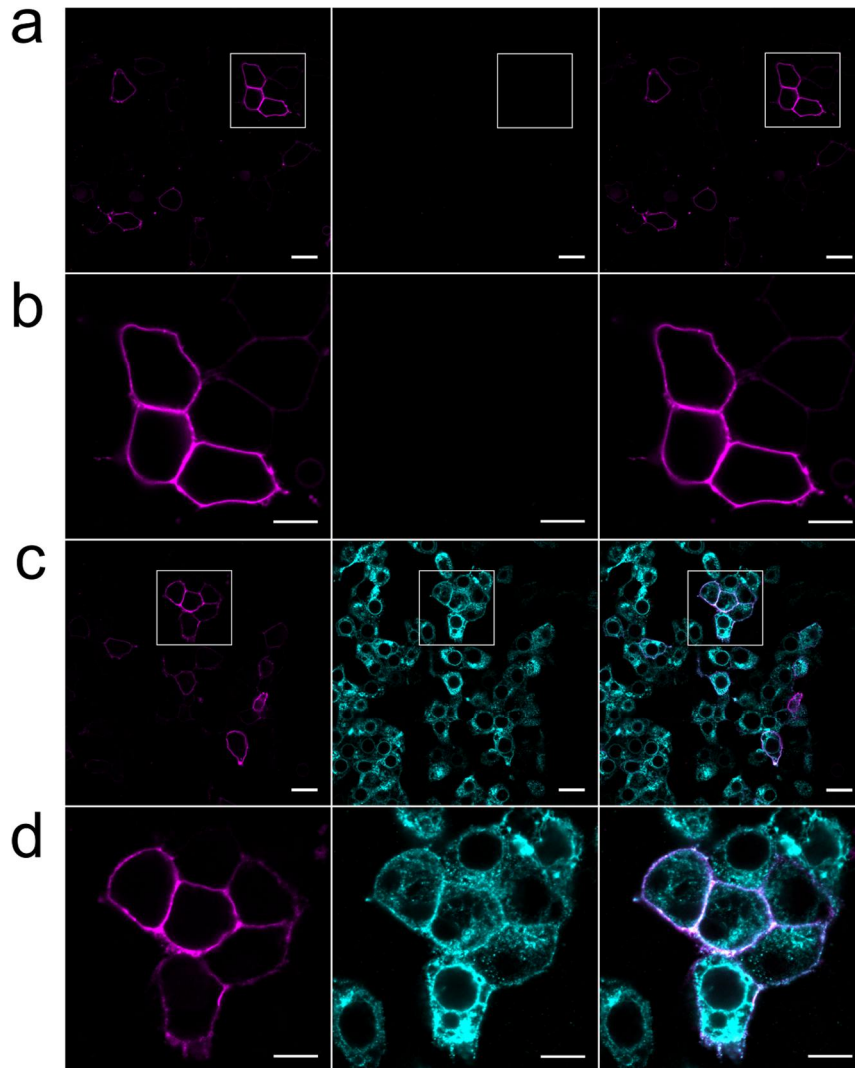


Abbildung 33 - Click-Färbung des Kainat-Rezeptors exprimiert in HEK293T-Zellen, markiert mit H-Tet-Cy5 und Anti-GluK2-Antikörper. (a) Konfokale Fluoreszenzaufnahme der Lebendzellmarkierung von HEK293T-Zellen, transfiziert mit dem Membranrezeptor-Konstrukt $\text{GluK2}^{\text{S272TAG}}$ und markiert mit dem membranundurchlässigen H-Tet-Cy5 (magenta). Zeitgleich erfolgte Antikörperfärbung mit dem primären Antikörper Kaninchen-anti-GluK2 und sekundären Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-Alexa488 gefärbt wurde (cyan) sowie das überlagerte Bild (rechts). (b) Vergrößerte Ansicht von a. (c) Konfokale Fluoreszenzaufnahme der Lebendzellmarkierung von HEK293T-Zellen, transfiziert mit $\text{GluK2}^{\text{S272TAG}}$ und markiert mit H-Tet-Cy5 (magenta). Im Anschluss erfolgte eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen (4%FA und 0,25% Triton X-100). Daraufhin wurden die Zellen mit dem primären Antikörper Kaninchen-anti-GluK2 markiert und mit dem sekundären Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen-Alexa488 (cyan) gefärbt. d. Erweiterte Ansicht von c. Scala, 20 μm (a) und (c), 10 μm (b) und (d). Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR1)

Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der bei den ionotropen Glutamaterezeptoren erworbenen Erkenntnisse, folgte die Click-Färbung des TNF-Rezeptors TNFR1. Sie diente der Untersuchung der Click-Effizienz bzw. -Spezifität der Click-Markierungsmethode im Vergleich zur klassischen Antikörperfärbung. Der TNF-Rezeptor TNFR1 bildet ein Homodimer in der Zellmembran, sodass keine Co-Transfektion anderer Untereinheiten notwendig ist. Die Überexpression der klickbaren TNFR1 zeigte, dass die Rezeptoren sowohl intrazellulär als auch membranständig lokalisiert sind (Abbildung 34). Der intrazelluläre Anteil deutet auf deutliche Mislokalisierung des eigentlich membranständigen Rezeptors hin. Die Click-Färbung mit H-Tet-Cy5 hingegen zeigt eine selektive und spezifische Markierung der extrazellulären bzw. membranständigen Population an TNF-Rezeptoren.

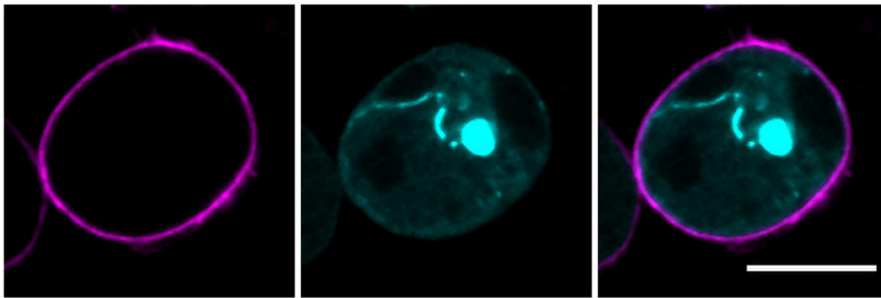


Abbildung 34 - Konfokales Fluoreszenzbild des anklickbaren TNF-Rezeptors TNFR1 (TNFR1^{S42TAG}-tdEOS). Die ortsspezifische extrazelluläre Click-Färbung erfolgte mit dem Membran-undurchlässigen Farbstoff H-Tet-Cy5 (1,5 μ M)(magenta). Der tdEOS-Kanal (cyan) und das Überlagerungsbild sind ebenfalls dargestellt. Längenskala, 10 μ m. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Zur Untersuchung der Markierungseffizienz und Spezifität wurden Vergleichsfärbungen zwischen Click-Färbung und klassischen Antikörperfärbung durchgeführt (Abbildung 35). Der verwendete Antikörper erkennt hierbei ein bekanntes, extrazelluläres Epitop und ermöglicht so die extrazelluläre Markierung des TNF-Rezeptors. Der Vergleich beider Markierungsmethoden zweier ansonsten identischer Transfektions- bzw. Probenansätze zeigt dabei deutliche Unterschiede bezüglich der Markierungseffizienz:

Während die Antikörper-Färbung ein spezifisches aber unregelmäßiges Fluoreszenzsignal in der Zellmembran zeigte, deutete Click-Färbung auf eine homogene Gleichverteilung auf der Zellmembran hin. Zudem sind die Intensitäten der Click-Färbung deutlich höher (\sim 10fach).

Ähnlich zu den zuvor vorgestellten Membranrezeptoren deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die TNFR1-Markierungsstelle für die kleinen Tet-Farbstoffe besser zugänglich ist als für die größeren Antikörper. Die Visualisierung der TNF-Rezeptoren ist in Lebzelllexperimenten daher zwar über Antikörper-Färbung möglich, jedoch zeigt die Click-Färbung ein homogenes und um ein Vielfaches stärkeres Fluoreszenzsignal.

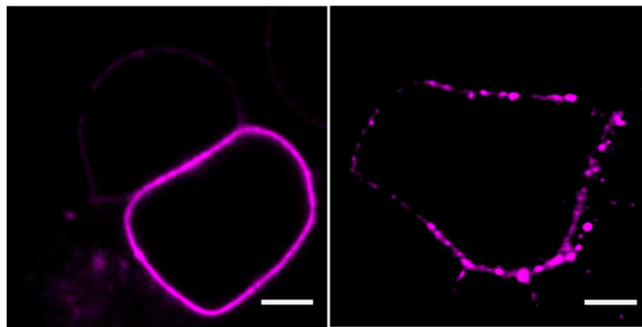


Abbildung 35 - Konfokales Fluoreszenzbild des anklickbaren TNF-Rezeptors 1 ($\text{TNFR1}^{\text{S42TAG}}$ -tdEOS), der mit H-Tet-Cy5 ($1,5 \mu\text{M}$) markiert ist (links). Konfokales Fluoreszenzbild des TNF-Rezeptors (TNFR1 -tdEOS), der mit einem polyklonalen primären Antikörper (Abcam, #ab19139) mit dem Fluoreszenz-farbstoff Alexa 647 (DOL ~ 1.0) markiert ist (rechts). Helligkeit und Kontrast wurden bei der Antikörperfärbung 10x verstärkt. Skala, $5 \mu\text{m}$. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

4.2.4 Einzelmolekül-Lokalisations-Mikroskopie

Im folgenden Teilkapitel wurde die Membranverteilung beider Glutamaterezeptoren über die hochauflösende Mikroskopietechnik δSTORM untersucht. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen bestätigten die effiziente und spezifische Färbung der membranständigen Rezeptoren mit dem Tetrazin-Farbstoff H-Tet-Cy5. Er zählt zu den gängigsten Farbstoffen in δSTORM -Experimenten und ermöglicht so die Visualisierung der seitenspezifisch und stöchiometrisch markierten Rezeptoren (Heilemann, 2008; van de Linde et al., 2011). Um optimales Photoschalten von Cy5 zu gewährleisten, wurden die Zellen nach Fixierung mit Photoschalt-puffer versetzt und unter klassischen δSTORM -Bedingungen gemessen (siehe Material und Methoden 3.1). Ziel dieser Messungen war es, die Dichte der geklickten NMDA- und Kainat-Rezeptoren auf der basalen Membran zu untersuchen (Abbildung 36 und Abbildung 37).

NMDA-Rezeptor

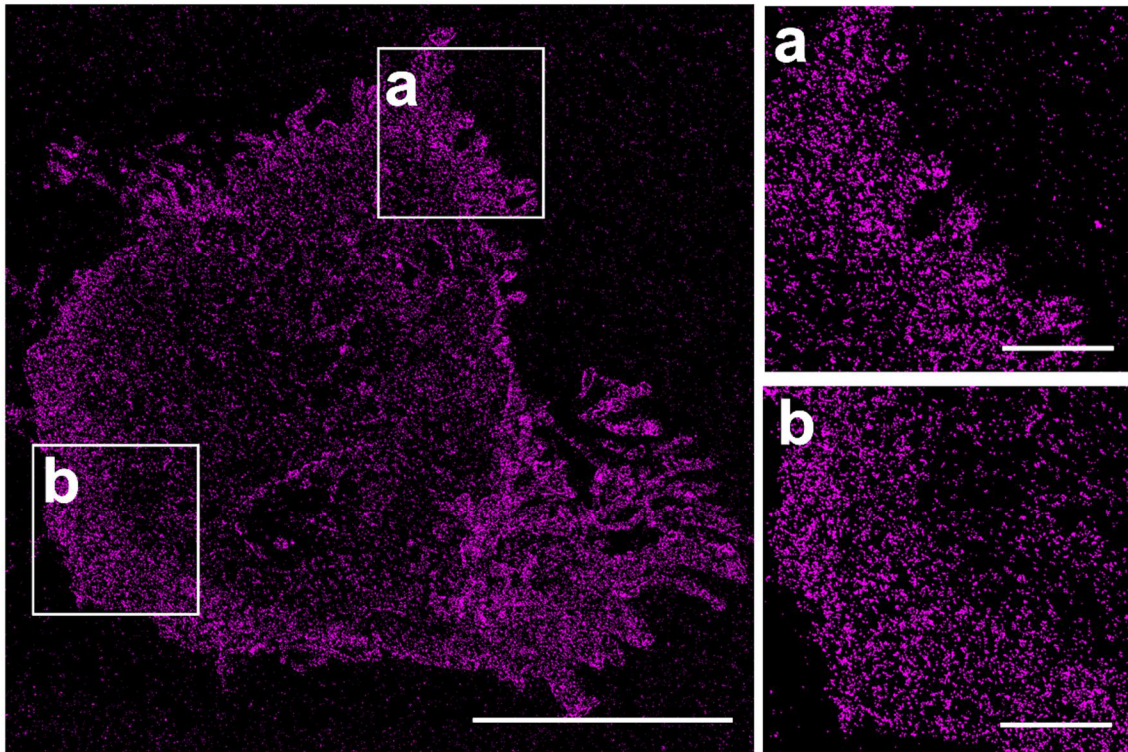


Abbildung 36 - Hochaufgelöste bzw. Rekonstruierte *d*STORM-Aufnahme einer HEK293T-Zelle, transfiziert mit dem Membranrezeptoren-Konstrukt NR1^{Y392TAG}-GFP und angeklickt mit H-Tet-Cy5 zeigt eine homogene Verteilung der Rezeptoren auf der Plasmamembran. Skala, 5 µm (Übersicht), 2 µm (für die vergrößerte Ansicht von a und b)

Kainat-Rezeptor

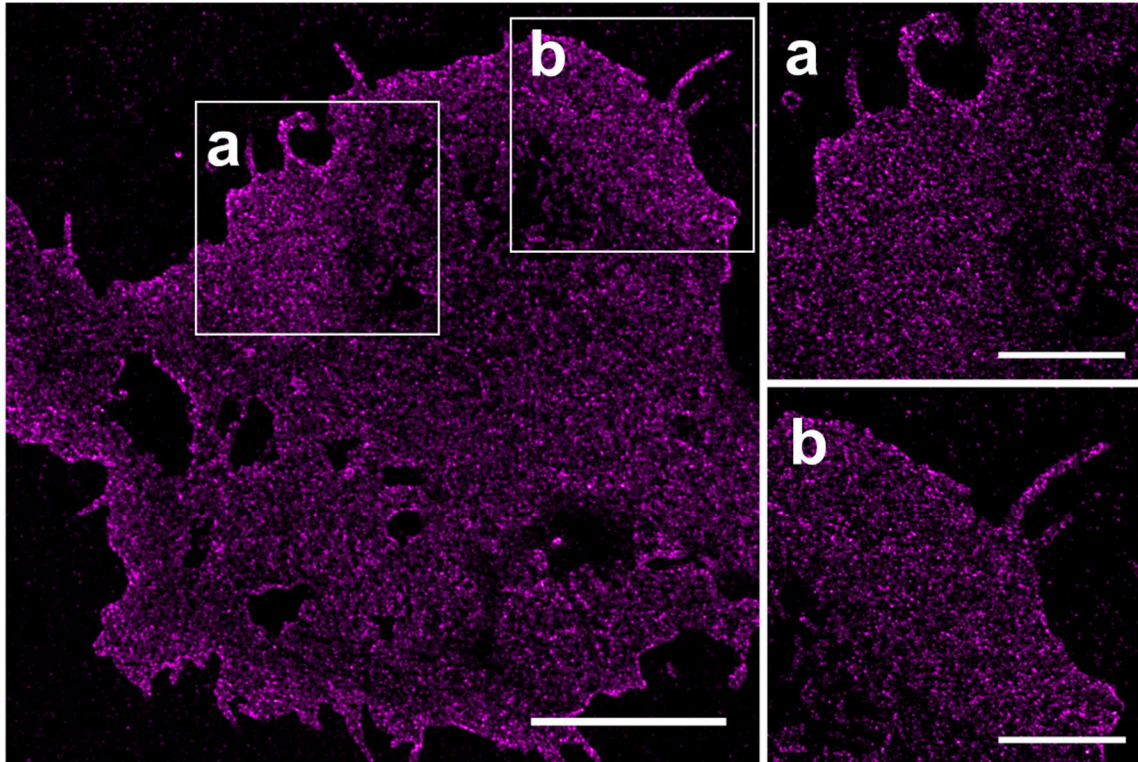


Abbildung 37 - Hochoaufgelöste bzw. Rekonstruierte d STORM-Aufnahme einer HEK293T-Zelle, transfiziert mit dem Membranrezeptoren-Konstrukt $\text{GluK2}^{\text{S343TAG}}$ -eGFP und angeklickt mit H-Tet-Cy5 zeigt eine homogene Verteilung der Rezeptoren auf der Plasmamembran. Skala, 5 μm (Übersicht), 2 μm (für die vergrößerte Ansicht von a und b). Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Beliu et al., 2019).

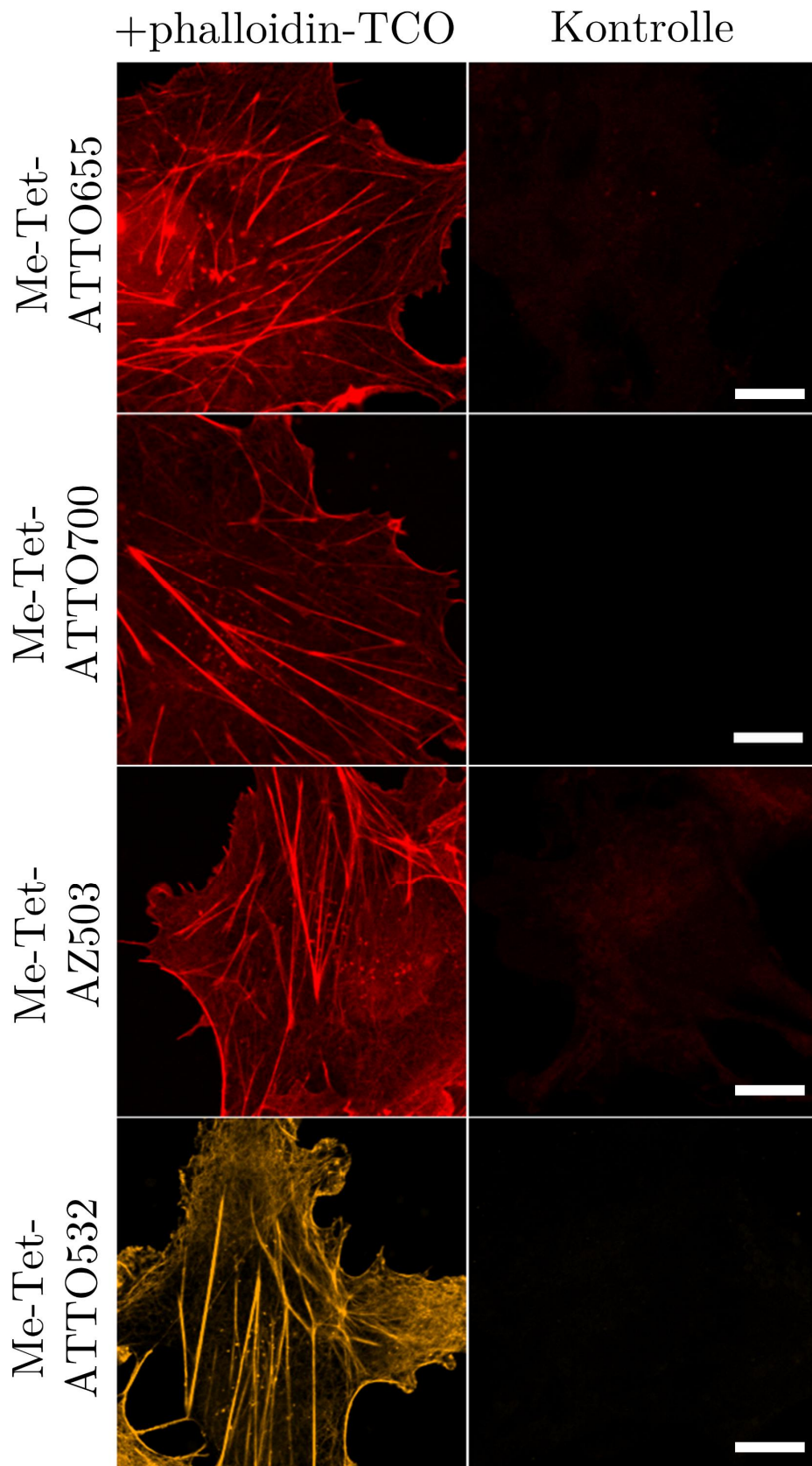
Die rekonstruierten d STORM-Bilder zeigen, dass sowohl der NMDA- als auch der Kainat-Rezeptor mit hohen Expressionsraten exprimiert werden und homogen in der Plasmamembran von fixierten HEK293T-Zellen verteilt sind (Abbildung 36 und Abbildung 37). Diese Ergebnisse zeigten, dass die bioorthogonalen Click-Färbungen mit Tetrazin-Farbstoffen für die Markierung von Membranrezeptoren eingesetzt werden können und so die Färbung extrazellulärer Bereiche von Membranrezeptoren ermöglichen. Darüber hinaus ermöglichte diese Technik die ortsspezifische und stöchiometrische Lebendzellfärbungen von Rezeptoren, gegen die keine oder nur Domänen-spezifische Antikörper verfügbar sind.

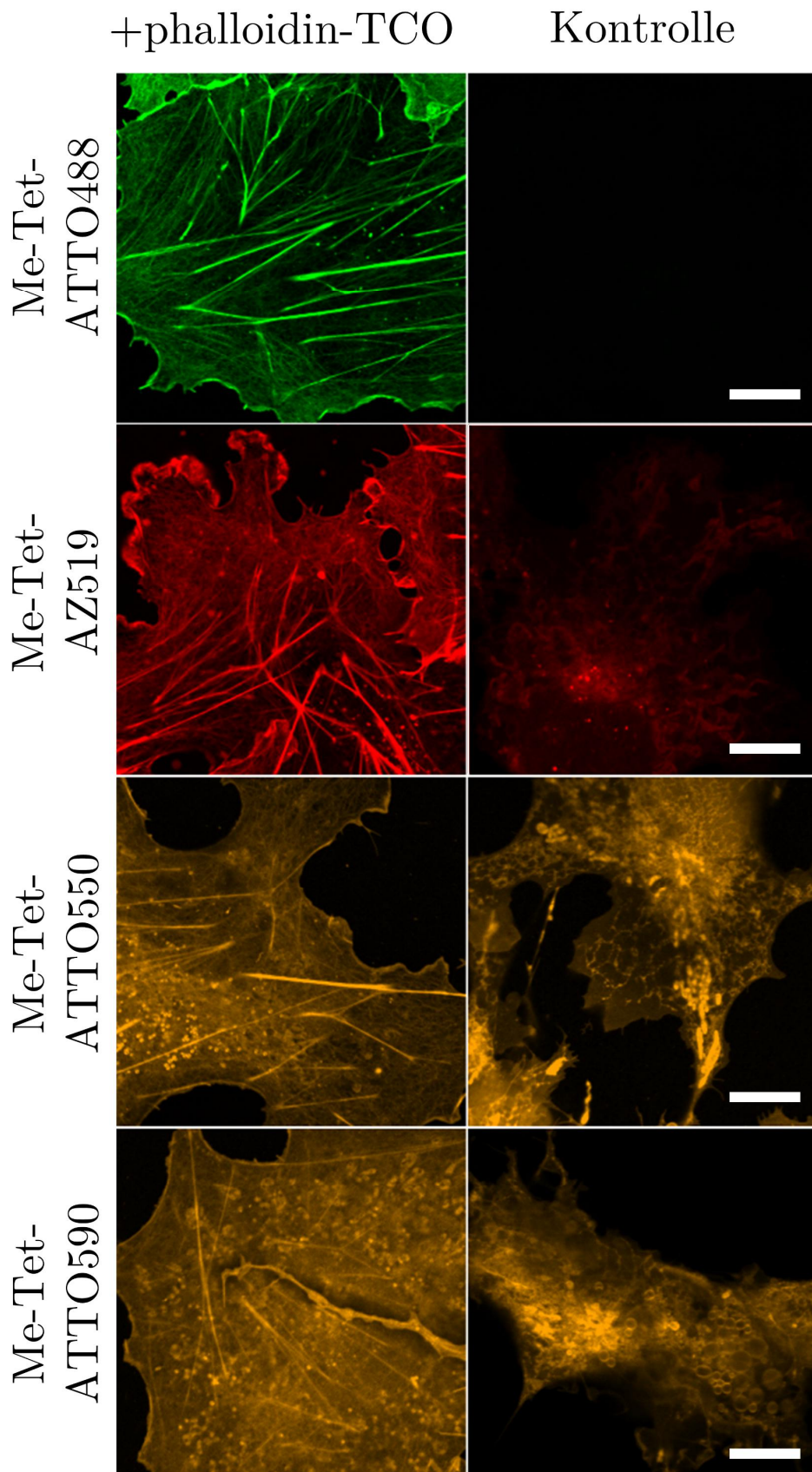
4.3 Aktin-Färbungen mit phalloidin-TCO

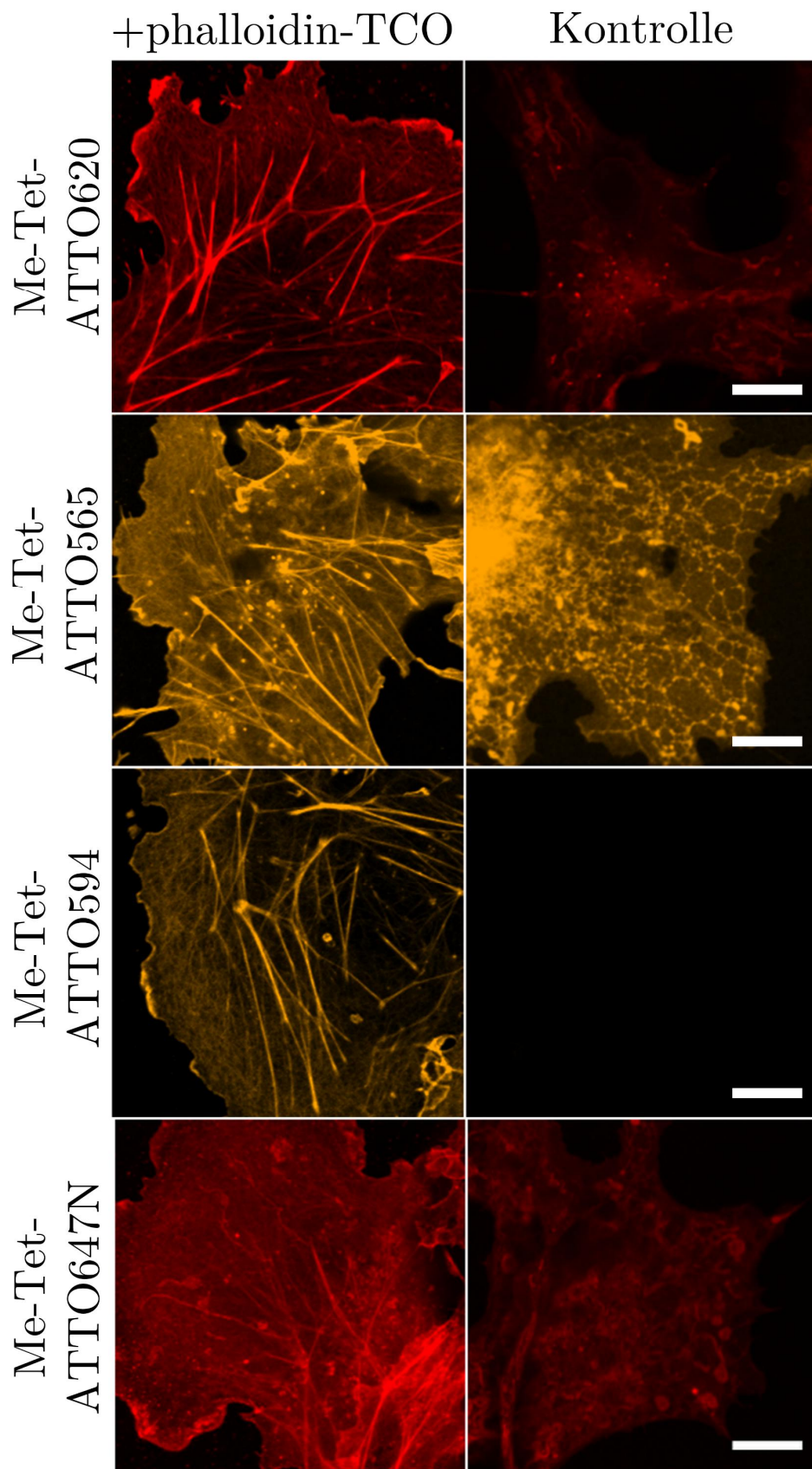
Um die Verwendbarkeit aller Tet-Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen, wurde als Modellstruktur Aktin gewählt. Aktinfilamente sind Teil des Zytoskeletts und spielen eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen wie Formhaltung, Motilität und Transport von Biomolekülen. Chemische Moleküle wie Phalloidin können an Aktinfilamente binden und deshalb durch Modifikation von Phalloidin zur Visualisierung von Aktin genutzt werden. Um die Spezifität und Effizienz von Tet-Farbstoffen in zuvor fixierten Zellen untersuchen zu können, wurde Phalloidin mit der Click-Gruppe TCO funktionalisiert und die Zellen vor der eigentlichen Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff mit Phalloidin-TCO vormarkiert (Meimetis et al., 2014). Der Grad an Unspezifität bzw. Hintergrundfärbung jedes Tet-Farbstoffs konnte durch Vormarkierung mit unmodifizierten, nicht klickbarem Phalloidin und der darauffolgenden Zugabe des Tet-Farbstoffs getestet werden.

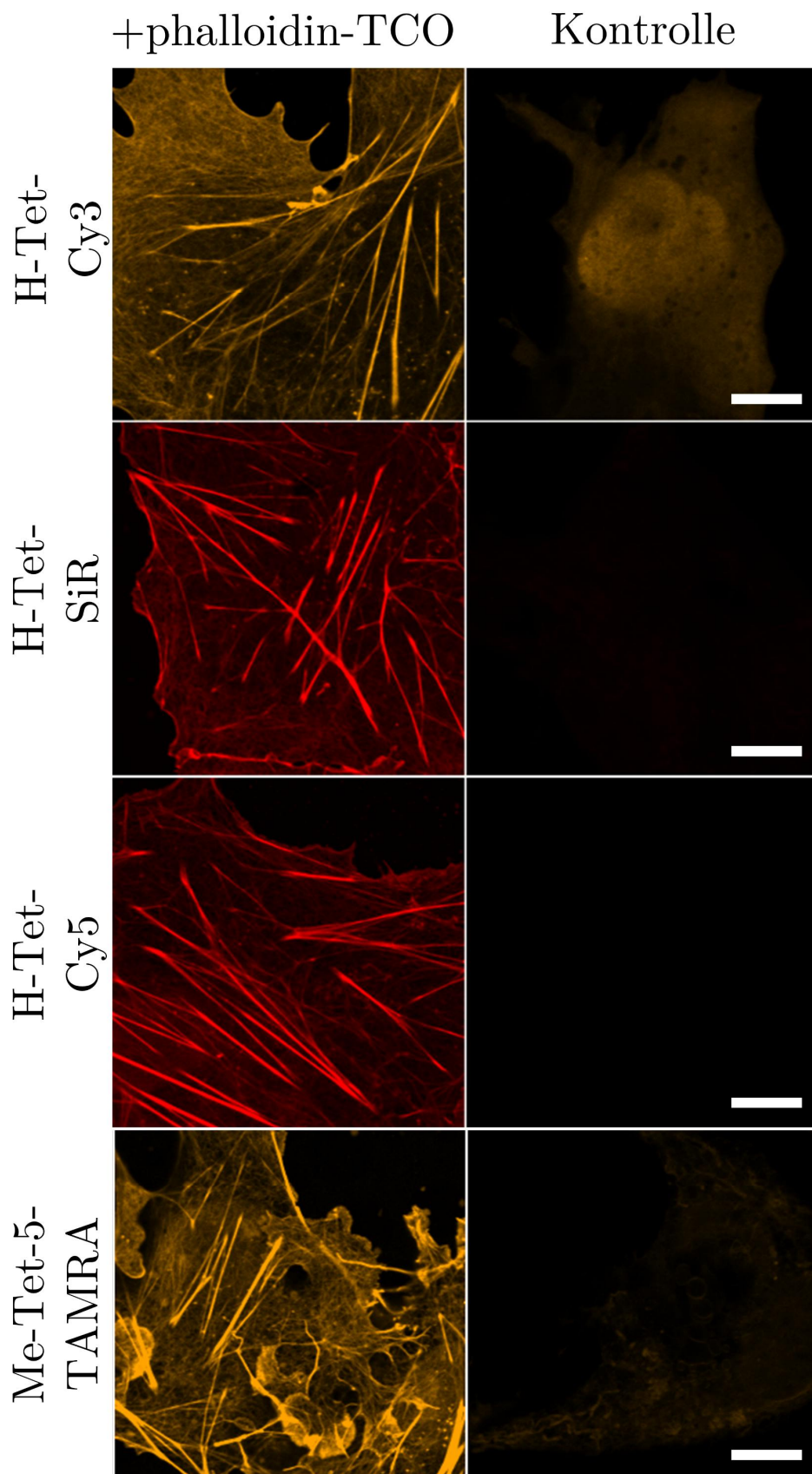
4.3.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM)

Konfokale Fluoreszenzbilder zeigten, dass alle Tetrazin-Farbstoffe gut für die High-End-Mikroskopie geeignet sind. Vergleichende Fluoreszenzmarkierungsexperimente mit unmodifiziertem Phalloidin zeigten jedoch, dass einige Tetrazin-Farbstoffe die Tendenz haben, unspezifisch an intrazelluläre Strukturen zu binden. Insbesondere einige der gelb- bis rotabsorbierenden ATTO-Farbstoffe (z.B. Me-Tet-ATTO555, Me-Tet-ATTO565 und Me-Tet-ATTO590) zeigten ein erhebliches unspezifisches Hintergrundsignal (Abbildung 38).









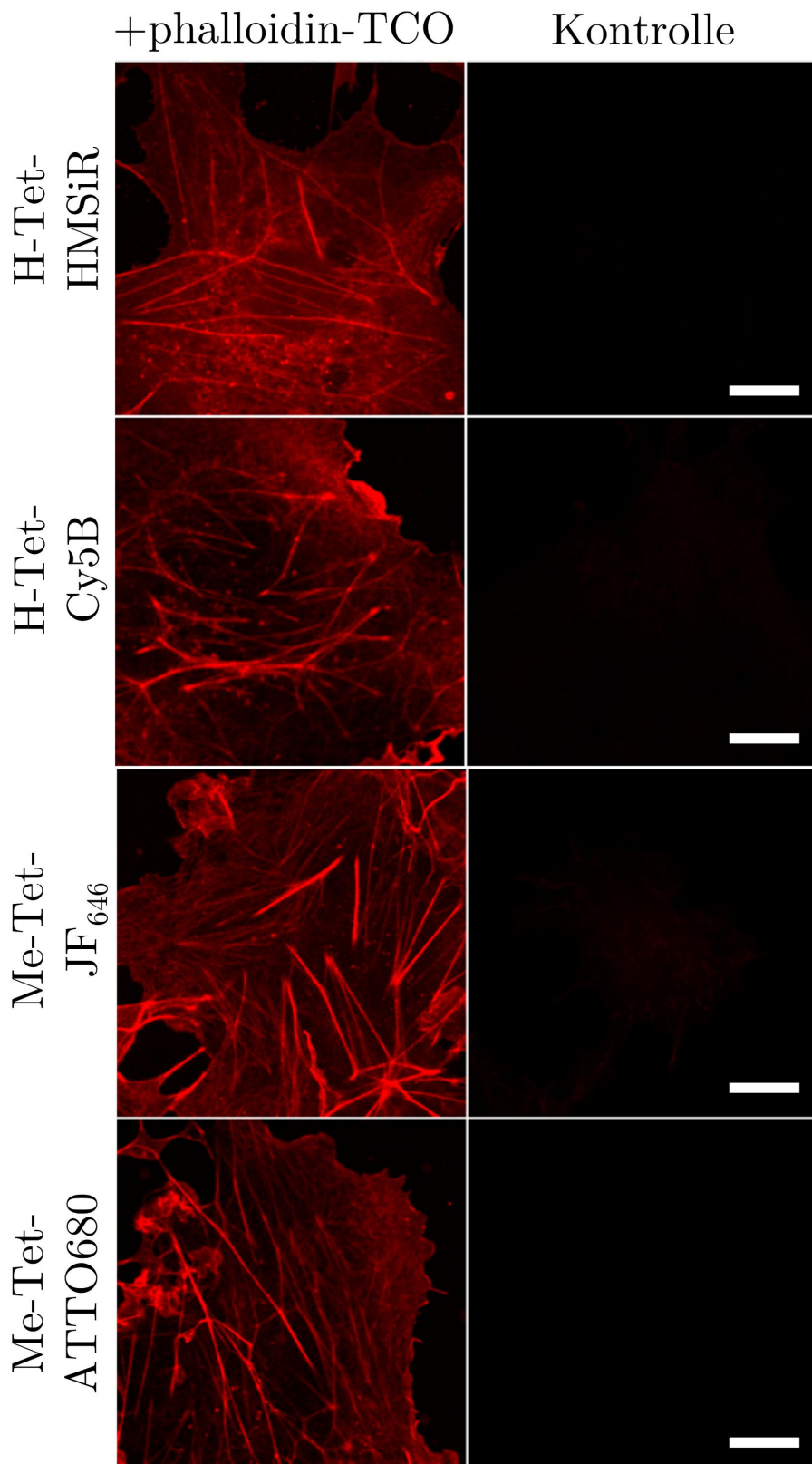


Abbildung 38 – Fluoreszenzbilder von fixierten Cos7-Zellen, die mit Phalloidin-TCO und unmodifizierten (nicht klickbarem) Phalloidin-Amin (Kontrolle) und

verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen markiert wurden. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Überschuss an Phalloidin-TCO vormarkiert. Die Click-Färbung erfolgte nach dem Waschen mit 1-3 μM Tetrazin-Farbstoffen für zehn Minuten. Vor der Aufnahme wurde der Überschuss an Tetrazin-Farbstoffen durch Waschen mit PBS (pH 7.4) entfernt. Skala, 10 μm . Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Beliu et al., 2019).

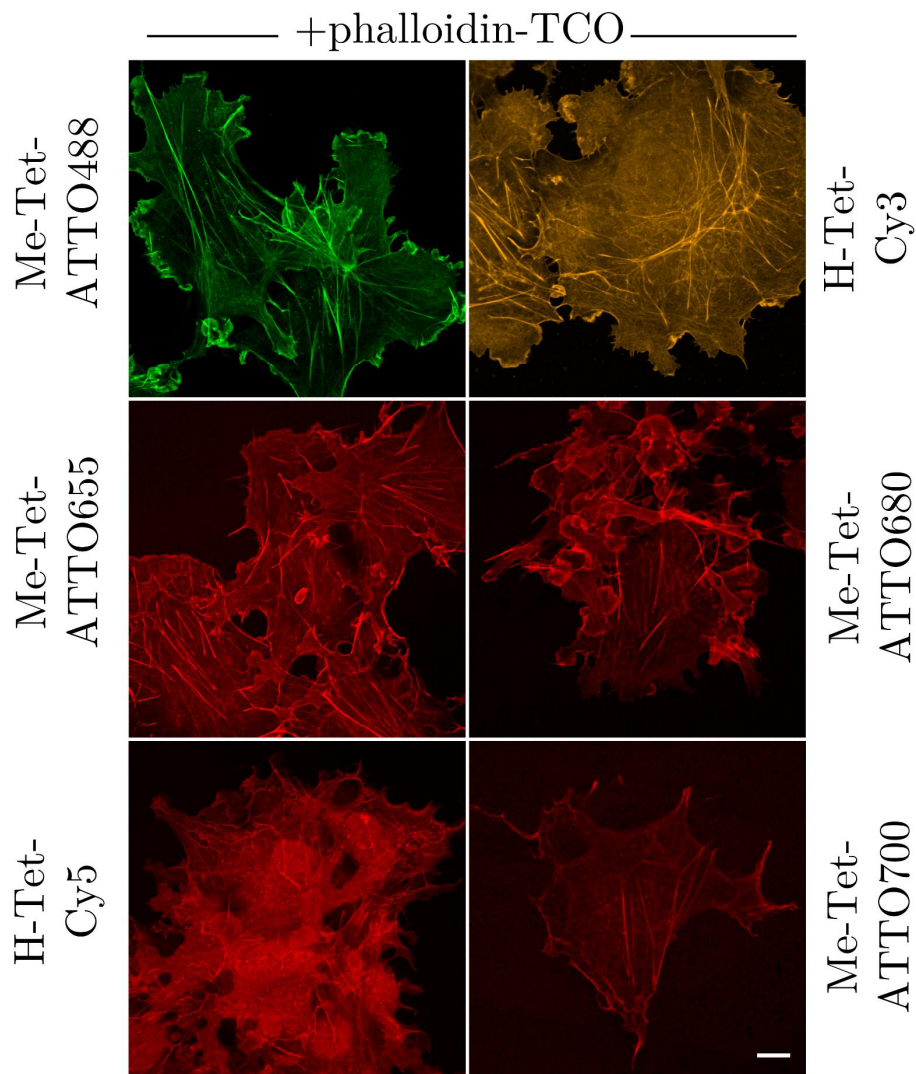


Abbildung 39 - Waschfreie konfokale Fluoreszenzbilder von COS7-Zellen, die mit Phalloidin-TCO und verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen markiert sind. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Überschuss an Phalloidin-TCO vormarkiert. Die Click-Färbung erfolgte nach dem Waschen mit 1-3 μM Tetrazin-Farbstoffen für 10 min in PBS (pH 7.4) ohne zusätzlichen Waschschrift. Skala, 10 μm . Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Beliu et al., 2019).

4.3.2 Hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie RCM & SIM

Als nächstes wurde die Leistung der Tet-Farbstoffe in der hochauflösenden Mikroskopie durch Re-Scan-Konfokalmikroskopie (RCM) und strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM) mit einem theoretischen Auflösungsverbesserungsfaktor von 1,4 bzw. 2,0 getestet (Abbildung 40 und Abbildung 41) (Gustafsson, 2000; Luca, 2013; Müller und Enderlein, 2010). Die meisten untersuchten Tetrazin-Farbstoffe, darunter die neuen Farbstoffe JF₆₄₆ und Cy5B, zeigen eine geringe Tendenz zur unspezifischen Bindung an zelluläre Strukturen und liefern hochaufgelöste Aktinbilder mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis. Darüber hinaus ermöglichen fluorogene Tetrazin-Farbstoffe wie Me-Tet-ATTO488, Me-Tet-ATTO655 und Me-Tet-ATTO680 mit Turn-Ons ≥ 6 (Tabelle 8) eine waschfreie hochauflösende Fluoreszenzbildgebung (Abbildung 39). Zudem ermöglichen auch andere Tetrazin-Farbstoffe wie H-Tet-Cy3 und H-Tet-Cy5 mit geringerem Einschaltverhältnis eine waschfreie Fluoreszenzbildgebung (Abbildung 39). Das Ergebnis zeigt, dass nicht nur das Einschaltverhältnis, sondern auch eine hohe Wasserlöslichkeit und geringe Tendenz zur unspezifischen Bindung an zelluläre Komponenten in Kombination mit einer hohen Reaktivität die waschfreie Bildgebung intrazellulärer Strukturen ermöglichen kann (Knorr et al., 2018; Schwartz et al., 2017).

Konfokale Rescan-Mikroskopie (RCM)

Re-scan Konfokale Mikroskopie (RCM) ist eine hochauflösende Technik, die auf der Standardkonfokalen Mikroskopie basiert (Luca, 2013). Diese Mikroskopietechnik hat eine verbesserte laterale Auflösung (\sim um den Faktor $\sqrt{2}$), sowie eine verbesserte Empfindlichkeit und wurde von Andreas Kurz (AG Sauer, Universität Würzburg) im Lehrstuhl eingeführt und etabliert. RCM eignet sich vor allem für biologische Anwendungen, welche eine hohe Auflösung und Empfindlichkeit benötigen.

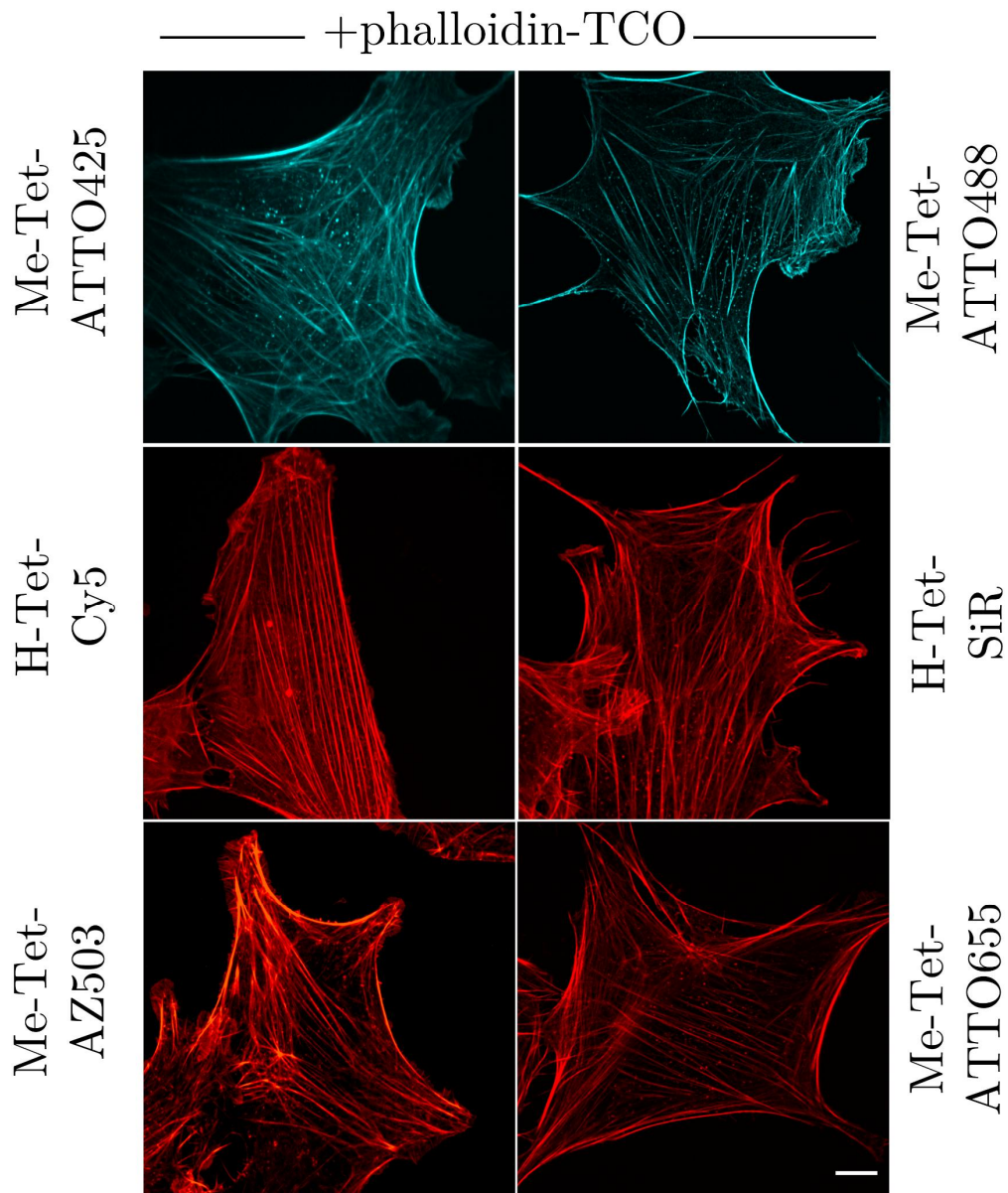
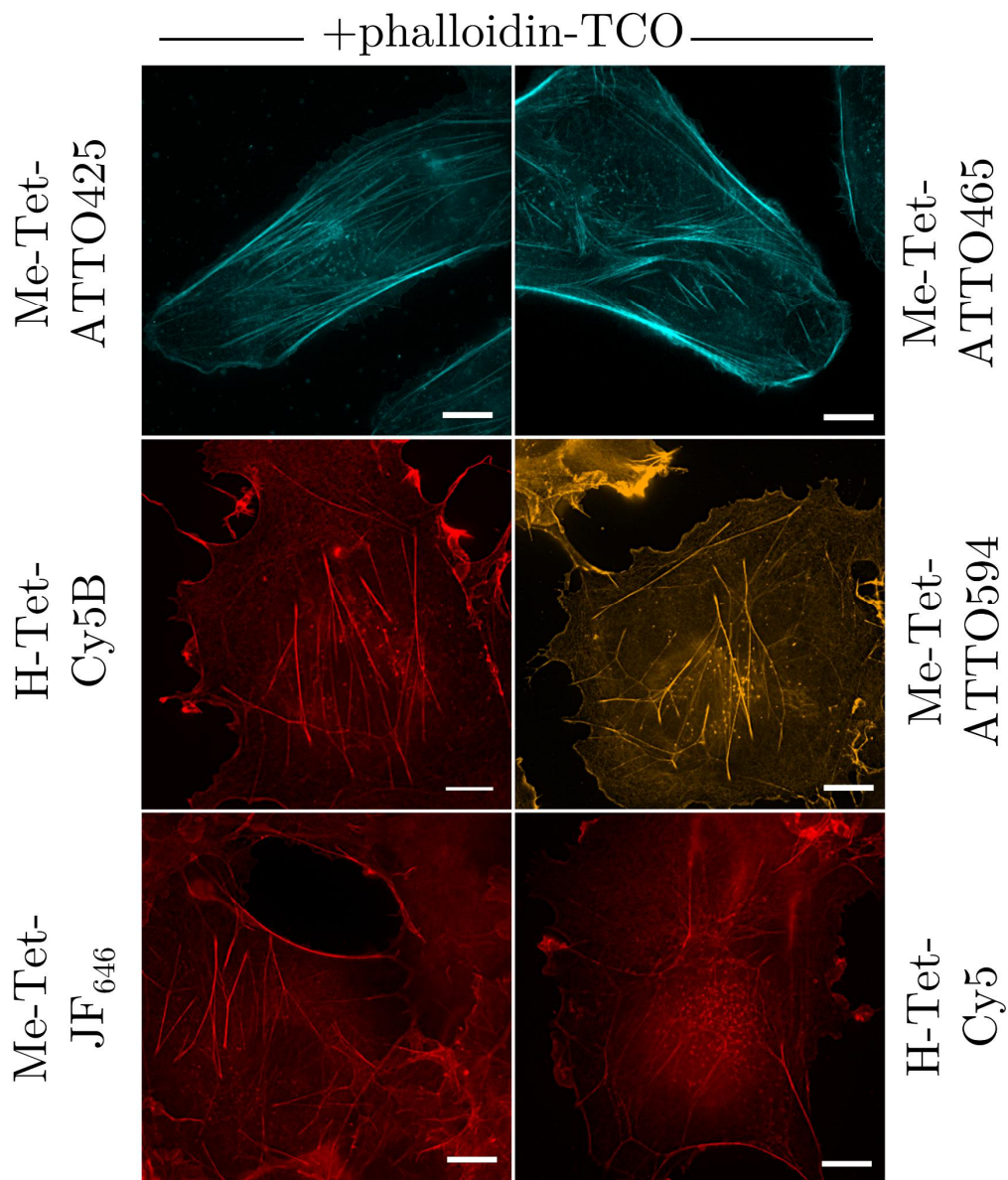


Abbildung 40 - Konfokale Rescan-Fluoreszenzbilder von NIH/3T3-Zellen, die mit Phalloidin-TCO und verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen markiert wurden. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Überschuss an Phalloidin-TCO vormarkiert. Die Markierung erfolgte nach dem Waschen mit 1-3 μM Tetrazin-Farbstoffen für 10 min. Vor der Aufnahme wurde der Überschuss an Tetrazin-Farbstoffen durch Waschen mit PBS (pH 7,4) entfernt. Skala, 10 μm . Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Beliu et al., 2019).

Strukturierte Beleuchtungs-Mikroskopie (SIM)

Die Strukturierte Beleuchtungs-Mikroskopie (SIM) basiert auf der Weitfeldmikroskopie, bei der ein bewegliches Beugungsgitter im Strahlengang des Anregungslasers platziert ist. Mehrere derart beleuchtete Fluoreszenzaufnahmen können dann rekonstruiert werden, um ein hochaufgelöstes Bild (Auflösungsverbesserungsfaktor ~ 2) zu erzeugen (Gustafsson, 2000).



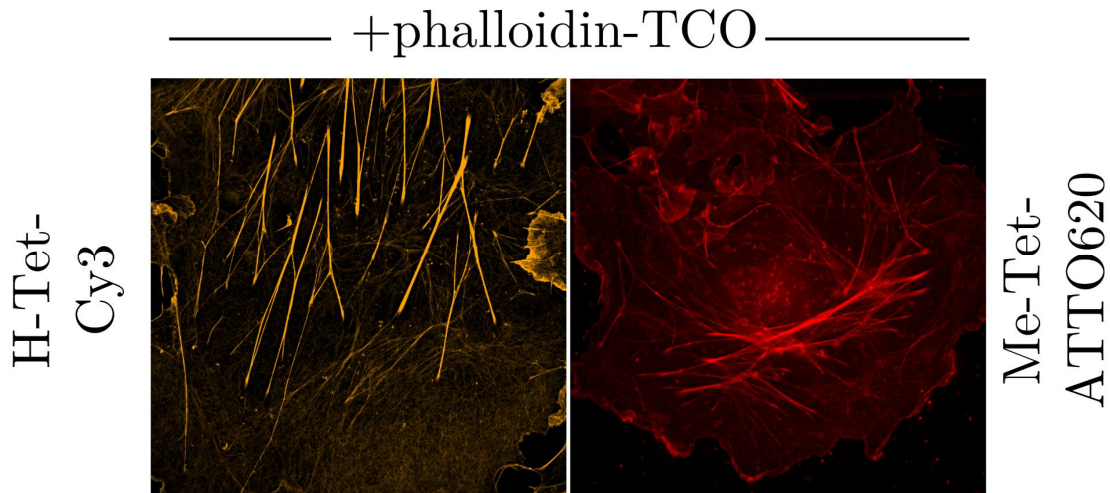


Abbildung 41 - SIM-Bilder von U2-OS-Zellen (obere Reihe) und COS7-Zellen, die mit Phalloidin-TCO und verschiedenen Tetrazin-Farbstoffen markiert wurden. Die Zellen wurden fixiert und mit einem Überschuss an Phalloidin-TCO vormarkiert. Die Markierung erfolgte nach dem Waschen mit 1-3 μM Tetrazin-Farbstoffen für zehn Minuten. Vor der Aufnahme wurde der Überschuss an Tetrazin-Farbstoffen durch Waschen mit PBS (pH 7.4) entfernt. Skala, 10 μm . Mit Erlaubnis bearbeitet nach (Beliu et al., 2019).

4.3.3 Lokalisationsmikroskopie (d STORM/PALM)

Als nächstes wurden Experimente zur Lokalisationsmikroskopie von Einzelmolekülen durchgeführt, um zu überprüfen, ob Tetrazin-Farbstoffe auch für einzelmolekulare sensitive Fluoreszenzbilder verwendet werden können. Die erhaltenen hochauflösenden Bilder zeigen, dass H-Tet-Cy5, das an Phalloidin-TCO gekoppelt ist, zuverlässig in Photoschalt-Puffer für d STORM genutzt werden kann, was die Hochauflösung des Aktinskeletts ermöglicht (Abbildung 42). Darüber hinaus wurden auch der überbrückten Carbocyanin-Farbstoff Cy5B für die PALM-ähnliche Bildgebung unter reduktiven Bildbedingungen (Abbildung 43) und der spontan-blinkende Farbstoff HMSiR in PBS (pH 7,4) ohne Zusatz von Photoschalt-Puffer getestet (Abbildung 44), womit ähnliche Bildqualitäten erreicht wurden.

Die Farbstoffe weisen aufgrund der unterschiedlichen Lokalisierungsintensitäten von 1 (Cy5) : 0,42 (HMSiR) : 1,8 (Cy5B), die unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen aufgenommen wurden, geringfügig unterschiedliche Lokalisierungsgenauigkeiten von ~ 12 nm (Cy5), ~ 13 nm (HMSiR) und ~ 11 nm (Cy5B) auf.

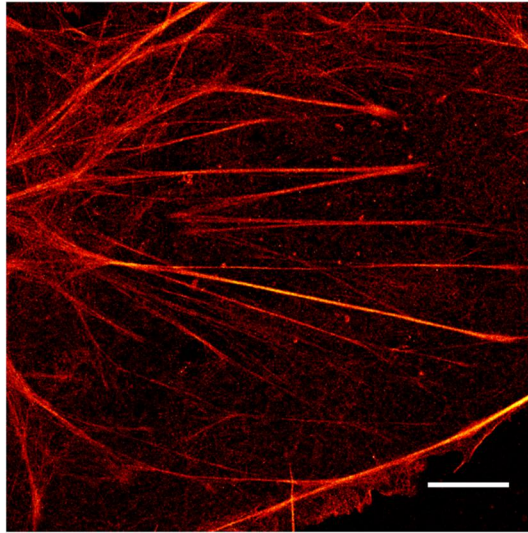


Abbildung 42 - Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (*d*STORM) mit H-Tet-Cy5. Cos-7-Zelle wurde zunächst fixiert, mit Phalloidin-TCO und mit H-Tet-Cy5 markiert und in Photoschaltpuffer mikroskopiert. Die Bestrahlung wurde ausschließlich mit 640 nm Laserlicht durchgeführt. Skala, 5 μ m. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

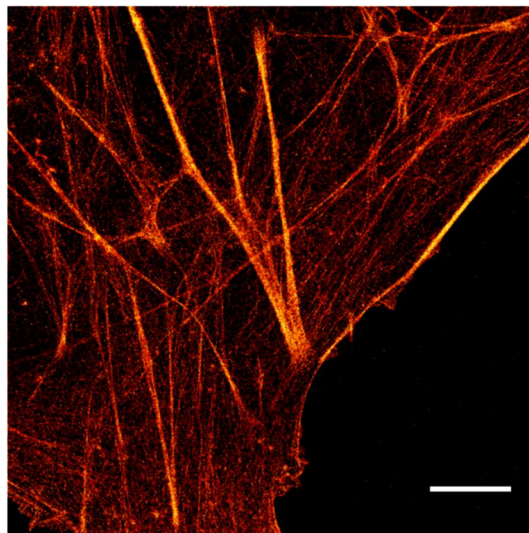


Abbildung 43 - Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (PALM-ähnlich) mit H-Tet-Cy5B. Cos-7-Zelle wurde zunächst fixiert, mit Phalloidin-TCO und mit H-Tet-Cy5B markiert und in PBS mikroskopiert. Cy5B wurde vor der Aufnahme mit 0,1% NaBH₄ (10min) reduziert. Die Bestrahlung wurde ausschließlich mit 640 nm Laserlicht durchgeführt. Skala, 5 μ m. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

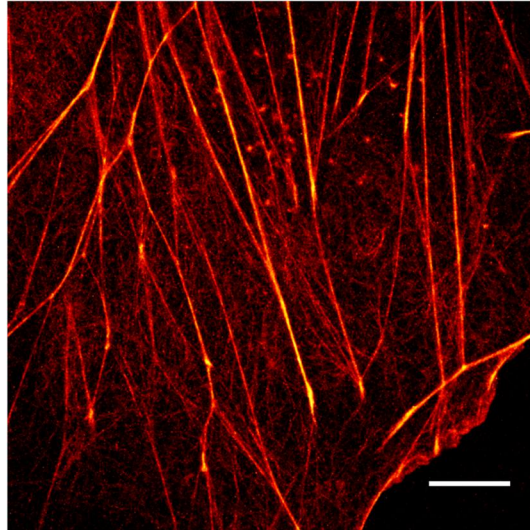


Abbildung 44 - Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (α STORM) mit dem spontan blinkendem Tetrazin-Farbstoff H-Tet-HMSiR. Cos-7-Zelle wurde zunächst fixiert, mit Phalloidin-TCO und mit H-Tet-HMSiR markiert und in PBS mikroskopiert. Die Bestrahlung wurde ausschließlich mit 640 nm Laserlicht durchgeführt. Skala, 5 μ m. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

4.4 Visualisierung von Tubulin-Filamenten

Zur Markierung der Mikrotubuli wurden zwei unabhängige System generiert: Zum einen wurde der genetische Code des Proteins EMTB erweitert, sodass über Einbau der unnatürlichen Aminosäure TCO*-Lysin eine Click-Reaktion ermöglicht wurde. Zum anderen wurde das Mikrotubuli-stabilisierende Wirkstoff Docetaxel chemisch direkt an TCO gekoppelt und ermöglicht so eine Transfektion-freie Möglichkeit der Markierung und Click-Färbung des Zytoskelett-Bestandteils.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein (MAP) Ensconsin (EMTB) wurde hierzu an verschiedenen Positionen modifiziert. Da bis dato keine Kristallstruktur oder andere strukturellen Informationen zu diesem Protein vorliegen, wurden neun verschiedene Positionen zufällig ausgewählt. Hierbei handelt es sich um die Mutanten A21TAG, S23TAG, K65TAG, K87TAG, K102TAG, K122TAG, K140TAG, S182TAG, und K259TAG. Bei der Generierung und späteren Expression stellte sich die Mutante EMTB^{K87TAG}-3xGFP mit hellstem Fluoreszenzsignal, geringer Hintergrundfärbung sowie geringer Zelltoxizität als beste Mutante heraus.

Tubulin-Docetaxel

Die chemische Kopplung von TCO an den anti-mitotischen Wirkstoff Docetaxel erfolgte im Labor von Prof. Jürgen Seibel (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) in Zusammenarbeit mit Natalia Wolf. Das Syntheseprotokoll findet sich in Anhang A. Das klickbare Endprodukt wurde aufgereinigt, in DMSO gelöst (stock: 1mM) und bei -20°C gelagert.

4.4.1 Click-Färbung von klickbaren Ensconsin (EMTB)

Zur Untersuchung der Möglichkeit der intrazellulären Click-Färbung eines, durch die amber-Suppressionsmethode, TCO-inkorporierten Proteins wurde das Mikrotubuli-bindende Protein Ensconsin (EMTB) gewählt. Durch ihre charakteristische Filamentstruktur sind Mikrotubuli leicht zu identifizieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass Zellen, die das Vier- bis Zehnfache des physiologischen Niveaus des endogenen MAP exprimieren, eine Mikrotubuli-Dynamik aufweisen, die sich nicht von denen nicht-transfizierter Zellen unterscheiden lässt. Wir haben TCO*-Lysin in die Mikrotubuli-Bindungsdomäne (EMTB) von E-MAP-115 eingefügt, die mit drei GFPs (EMTB^{K87TAG}-3xGFP) für die Fluoreszenzbildgebung von lebenden Zellen C-terminal markiert ist (Miller und Berment, 2009). Die Detektion des GFP-Signals machte es möglich, stark exprimierende Zellen auszuwählen und einen Tag vor der bioorthogonalen Markierung auf Medium ohne TCO*-Lysin zu wechseln, um das unspezifische Hintergrundsignal zu minimieren. Darüber hinaus wurde erneut das tRNA-Pyl/NESPyIRS^{AF}-Paar verwendet, um den nuklearen Export von tRNA-Synthetase zu verbessern (Nikic, 2016). Die hohe Toleranz der Zellen gegenüber der Überexpression des Konstrukts sowie das Wechseln auf ein frisches Medium, führte zu reduzierter Hintergrundfärbung und zur erkennbaren Click-Färbung der Mikrotubuli-assoziierten Proteine trotz freier intrazellulärer TCO*-Lysine mit dem membranpermeablen Farbstoff H-Tet-SiR (Abbildung 45). Die Zugabe des membran-impermeablen Farbstoffs H-Tet-Cy5 führte hingegen zu keiner Färbung (Abbildung 46).

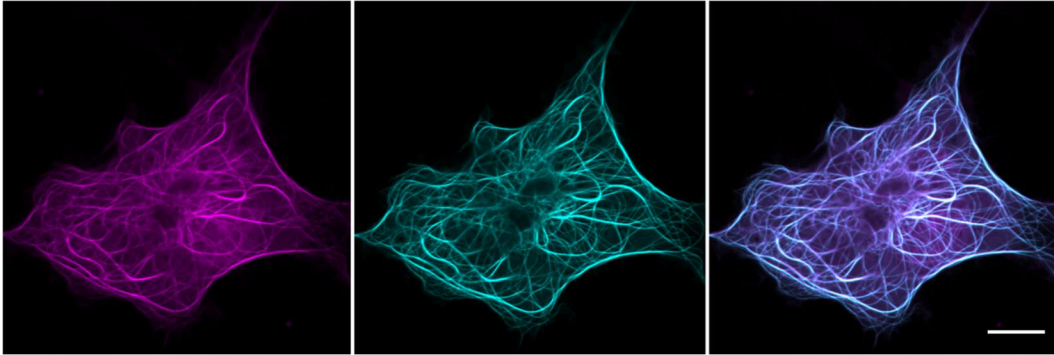


Abbildung 45 - Konfokale Lebendzell-Fluoreszenzaufnahme des Konstrukts $\text{EMTB}^{\text{K87TAG}}\text{-3xGFP}$, markiert mit $3 \mu\text{M}$ des membranpermeablen Tetrazin-Farbstoffs H-Tet-SiR für 10 min. Dargestellt sind der GFP-Kanal (cyan), der SiR-Kanal (magenta) sowie das Überlagerungsbild. Skala, $5 \mu\text{m}$. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

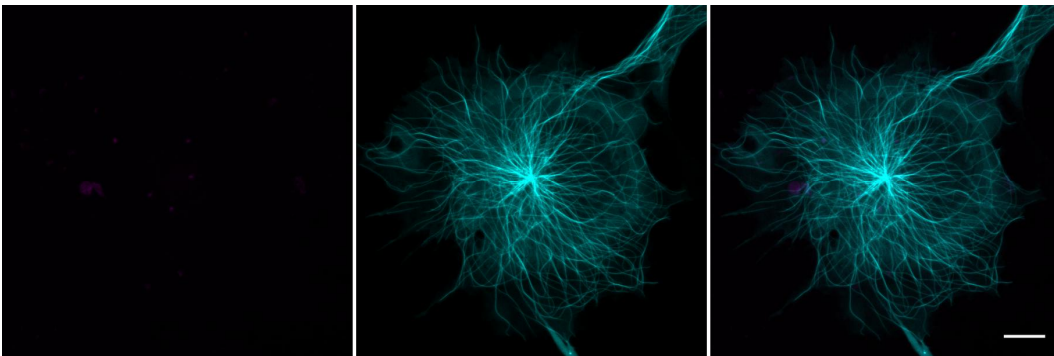


Abbildung 46 - Konfokale Lebendzell-Fluoreszenzaufnahme des Konstrukts $\text{EMTB}^{\text{K87TAG}}\text{-3xGFP}$, gefärbt mit $3 \mu\text{M}$ des membran-impermeablen Tetrazin-Farbstoffs H-Tet-Cy5 für 10 min. Dargestellt sind der GFP-Kanal (cyan), der Cy5-Kanal (magenta) sowie das Überlagerungsbild. Skala, $5 \mu\text{m}$.

Mit diesem optimierten Ansatz konnte die Mikrotubuli-Dynamik in lebenden Zellen mittels konfokaler Mikroskopie beobachtet werden (Abbildung 47). Um die Dynamik der Mikrotubuli zu untersuchen, wurde konfokale Zeitraffer-Mikroskopie mit Lebendzell-Rescan-Mikroskopie durchgeführt, die zeigt, dass die mit $\text{EMTB}^{\text{K87TAG}}\text{-3xGFP}$ markierten Mikrotubuli deutliche Polymerisations- und Degradationsereignisse aufweisen (Abbildung 47).

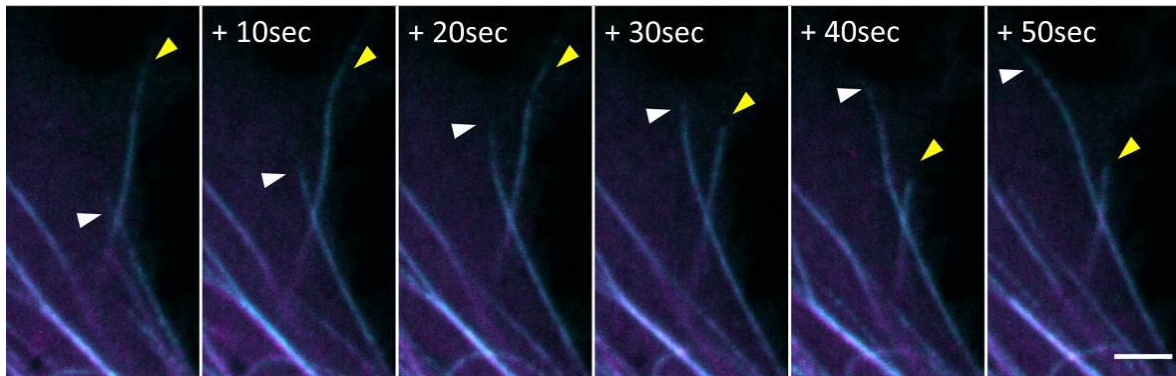


Abbildung 47 - Konfokale Rescan-Fluoreszenzaufnahmen einer Zeitreihe einer lebenden COS-7-Zelle, transfiziert mit dem Tubulin-assoziierten Ensconsin-Konstrukt EMTB^{K87TAG}-3xGFP und gefärbt mit 3 µM H-Tet-SiR für 10 min. Das dynamische Wachstum (weiße Pfeilspitzen) sowie die Schrumpfung (gelbe Pfeilspitzen) der Mikrotubuli-Filamente bleiben erhalten bzw. unverändert. Dargestellt ist das Überlagerungsbild des SiR- und GFP-Kanals. Skala, 2 µm. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Hochaufgelöste δ STORM-Aufnahmen

Zusätzliche Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie-Experimente mittels δ STORM an fixierten EMTB^{87TAG}-3xGFP Zellen mit H-Tet-HMSiR zeigten jedoch, dass der Fluoreszenz-hintergrund von ungebundenem EMTB die erreichbare Bildqualität immer noch begrenzt (Abbildung 48). Hintergrundfärbung auf der Zellmembran deutet darauf hin, dass ungebundene Proteine bzw. einzelne freie unnatürliche Aminosäuren mit dem Tetrazin-Farbstoff markiert und zu erhöhtem Hintersignal führen.

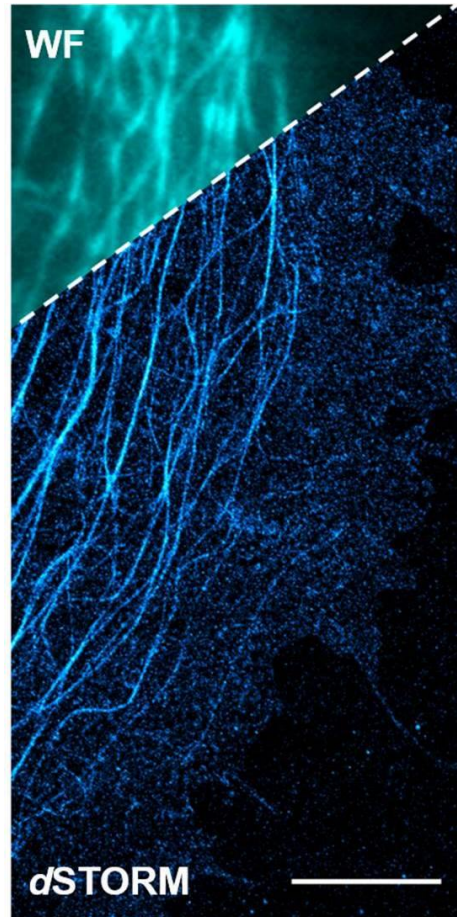


Abbildung 48 - Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (d STORM) einer COS-7-Zelle, transfiziert mit dem Tubulin-assoziierten Ensconsin-Konstrukt $EMTB^{K87TAG}$ -3xGFP, fixiert und permeabilisiert und gefärbt mit 3 μ M H-Tet-HMSiR (10 min). Anschließend wurde in PBS (pH 7.4) mikroskopiert. Die obere linke Ecke zeigt eine Überlagerung mit der entsprechenden Weitfeld-Aufnahme (WF). Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

4.4.2 Klickbares Docetaxel (cLSM, RCM, SIM)

Als nächstes wurde getestet, ob Mikrotubuli-stabilisierende Wirkstoff Docetaxel nach der TCO-Modifizierung spezifisch an Mikrotubuli bindet und transfektionsfrei die Lebendzellmarkierung und Click-Färbung des Zytoskelett-Bestandteils mit H-Tet-SiR ermöglicht. Konfokale und hochauflösende Mikroskopie-Bilder, die über RCM und SIM aufgenommen wurden, zeigen eine spezifische Lebendzell-Markierung des Zytoskeletts (Abbildung 49).

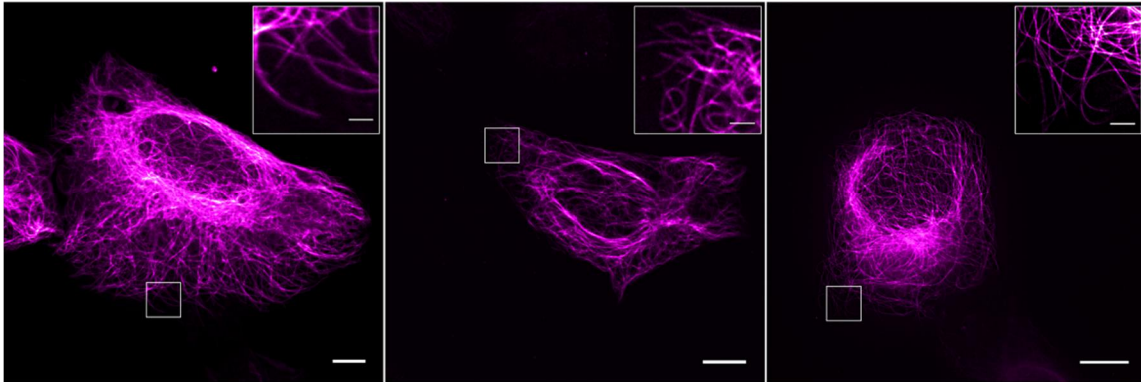


Abbildung 49 - Konfokale, Rescan- und SIM-Fluoreszenzbilder (von links nach rechts) von U2OS-Zellen, behandelt mit 10 μM Docetaxel-TCO (30 min) behandelt und mit 10 μM H-Tet SiR (10 min) gefärbt. Skala, 5 μm (Übersicht), 1 μm (vergrößerte Ansicht). Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

Die Dynamik der Mikrotubuli ist jedoch bei Zugabe von 10 μM Docetaxel-TCO gestört und zeigt keine Polymerisations- und Degradationsereignisse mehr (Abbildung 50). Das deutet darauf hin, dass der Mikrotubuli-stabilisierende Wirkstoff Docetaxel-TCO nicht geeignet ist, die Dynamik der Mikrotubuli in lebenden Zellen zu untersuchen, wenn es bei Konzentrationen > 100 nM eingesetzt wird (Lukinavičius et al., 2014).

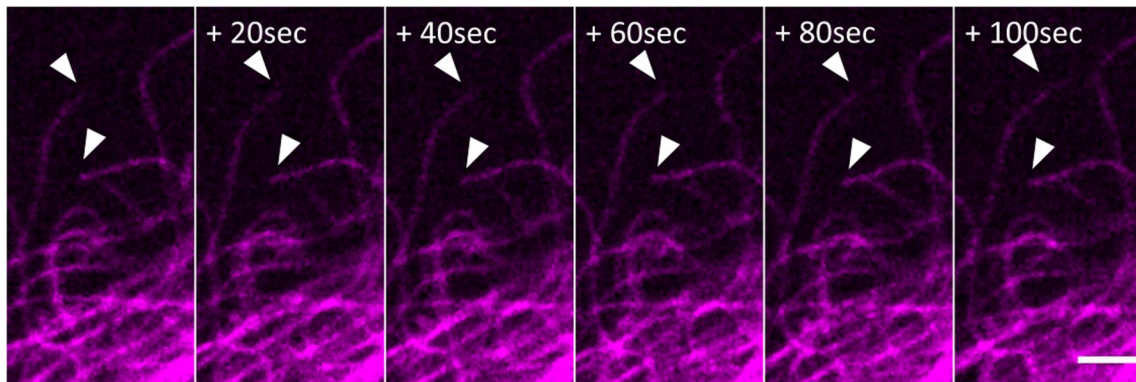


Abbildung 50 - Konfokale Rescan-Fluoreszenzaufnahmen einer Zeitreihe einer lebenden U2OS-Zelle, behandelt mit 10 μM Docetaxel-TCO (30min) und gefärbt mit 10 μM H-Tet-SiR (10min). Die weißen Pfeilspitzen zeigen eine gestörte Dynamik ohne Mikrotubuli-Polymerisation und Degradationsereignisse. Skala, 2 μm . Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

5 Diskussion und Ausblick

5.1 Fluoreszenzlöschung von oxazinen und rhodaminen Tetrazin-Farbstoffen

Zur Untersuchung des Fluoreszenz-Löschmechanismus der längerwelligen Tetrazin-Farbstoffe, wurden intermolekulare stationäre und zeitaufgelöste Fluoreszenz-Löschversuche mit freien Farbstoffen und freiem Tetrazin (Me-Tet-Amin) unter physiologischen Bedingungen (PBS, pH 7.4) durchgeführt.

Es ergeben sich für alle gemessenen Farbstoffe (ATTO655, ATTO700, JF₆₄₆, Cy5 und Cy5B) lineare Stern-Volmer-Plots (Abbildung 23) und bimolekulare dynamische Löschratenkonstanten k_{dyn} , die sich der Diffusionsgrenze nähern. Dies deutet darauf hin, dass die meisten Kollisionen zwischen Fluorophor und Tetrazin zu einer Fluoreszenzlöschung führen.

Darüber hinaus wurde eine starke statische Löschung für die beiden Oxazin-Farbstoffe ATTO655 und ATTO700 sowie für den Si-Rhodaminfarbstoff JF₆₄₆ (Abbildung 23) beobachtet, was zu der Annahme führt, dass nicht oder nur schwach fluoreszierende Grundzustandskomplexe zwischen den längerwelligen, absorbierenden Oxazin- und Si-Rhodaminfarbstoffen und Tetrazin in wässrigen Lösungen entstehen, deren Fluoreszenzlebensdauern nicht gemessen werden können, da sie unter der Zeitauflösung des TCSPC-Aufbaus liegen.

Die Assoziationskonstanten K_a , welche aus den statischen Löschkomponenten berechnet werden können, deuten dabei auf die Komplexbildung zwischen den Farbstoffen ATTO655, ATTO700, JF₆₄₆ und Tetrazin hin, wohingegen Cy5 und Cy5B nur eine schwache statische Löschung zeigen.

Me-Tet-ATTO655, Me-Tet-ATTO680, Me-Tet-ATTO700 und Me-Tet-JF₆₄₆ weisen zusätzlich einen hohen Turn-On auf (Tabelle 8) und werden daher auch in intramolekularen Löschversuchen effizient gelöscht (Abbildung 21). Dies deutet darauf hin, dass der jeweilige Farbstoff und das Tetrazin, wenn sie durch einen flexiblen Linker verbunden sind, eine nahezu koplanare Stapelform annehmen können, die für eine effiziente Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer erforderlich ist.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der zugrundeliegende Löschmechanismus in längerwelligen, Oxazin- und Si-Rhodamin-Farbstoffen nur bei kurzen Entfernungen, d.h. innerhalb von Komplexen, effizient ist. Die Beobachtung stützt die Annahme, dass die Fluoreszenzintensität der Tetrazin-Konjugate ATTO655, ATTO680 und ATTO700 unter Zusatz von Denaturierungsmitteln wie Guanidiniumchlorid (GCl) stark zunimmt, während ATTO488 und Cy5 nur geringen oder keinen Fluoreszenzanstieg zeigen (Abbildung 21). Daraus lässt sich schließen, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den längerwelligen, absorbierenden Oxazin- und Si-Rhodamin-Farbstoffen und Tetrazin mit einer koplanaren Anordnung der konjugierten Elektronensysteme eine wichtige Rolle bei der Bildung von Grundzustandskomplexen spielen. Da Tetrazin eine sehr hohe Elektronenaffinität aufweist, werden die angeregten längerwelligen Farbstoffe höchstwahrscheinlich effizient in ihrer gestapelten Konformation über den photoinduzierten Elektronentransfer (PET) gelöscht (Beliu et al., 2019; Gong, 2009; Troll, 1982). Die cyaninen Farbstoffe wie Cy5 weisen eine höhere Wasserlöslichkeit auf und sind daher weniger anfällig für die Bildung von Komplexen mit Tetrazin. Im Falle von Me-Tet-ATTO488 wird die Fluoreszenzlöschung von FRET dominiert, wobei die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Tetrazin keine dominante Rolle spielt. Zudem korrelieren die Turn-On Werte der Farbstoffe Me-Tet-ATTO425, Me-Tet-ATTO465, Me-Tet-ATTO488 und Me-Tet-ATTO532 nach Click-Reaktion mit TCO*-Lysin mit der Schnittmenge der Emissionsspektren im Verhältnis zum Absorptionsspektrum von Tetrazin, sodass bei diesen kurzwelligen Tetrazin-Farbstoffen ein FRET-basierter Löschmechanismus dominiert.

5.2 Visualisierung von Membranrezeptoren mit Tetrazin-Farbstoffen

Der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren durch Erweiterung des genetischen Codes in Kombination mit bioorthogonalen Click-Reaktionen sind eine effiziente Möglichkeit zur Markierung von Biomolekülen. Um die Nützlichkeit von Tetrazin-Farbstoffen zur Visualisierung von Membranrezeptoren zu demonstrieren, wurden die extrazellulären Domänen des NMDA-Rezeptors (NR1), Kainat-Rezeptors (GluK2) und Tumornekrosefaktor-Rezeptors (TNFR1) ortsspezifisch markiert. Sie wurden mithilfe der Amber-Suppressionsmethode durch genetische Expression in Säugetier-Zelllinien überexprimiert und mit dem membran-impermeablen Tetrazin-Farbstoff H-Tet-Cy5 markiert. Hierfür wurden von jedem Rezeptor eine Reihe von natürlichen Aminosäuren gegen die unnatürliche Aminosäure (uAA) TCO*-Lysin ausgetauscht, welche eine ortsspezifische Markierung der jeweiligen Position mit Tetrazin-Farbstoffen unter physiologischen Bedingungen und mit minimalem Linkerabstand ermöglicht.

Bei den ausgewählten Positionen des Einbaus der uAA in Membranrezeptoren handelte es sich stets um extrazelluläre Positionen, welche auf Grundlage der Kristallstrukturen ausgewählt wurden. Oftmals gibt es bei Rezeptoren essentielle Aminosäuren, welche im Idealfall nicht modifiziert werden sollten, um die Funktionsfähigkeit des Rezeptors nicht zu beeinflussen. Des Weiteren ermöglichen Strukturinformationen die Identifizierung von Oberflächen-exponierten Aminosäuren, welche für die folgende Markierung über eine Click-Reaktion mit einem Tet-Farbstoff vorteilhaft ist. Durch die Überexpression der genetischen Konstrukte ist es zudem vergleichsweise einfach, ein Fluoreszenzprotein C-terminal an einen Membranrezeptor zu fusionieren. Dies ermöglicht die Detektion von exprimierenden Zellen und lässt Rückschlüsse zum erfolgreichen Einbau der uAA sowie zur Lokalisation des Rezeptors innerhalb der Zelle zu.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten eine Reihe von Fragestellungen untersucht werden: So ist bspw. weitestgehend unklar, in welchem Maße der Einbau unnatürlicher Aminosäuren die Funktionalität von Rezeptoren beeinflusst. Der NMDA-Rezeptors wurde hierfür als Modell-System ausgewählt, da es sich um einen ionotropen Glutamat-rezeptor mit charakteristischen elektrophysiologischen Strömen handelt.

Durch vergleichende elektrophysiologische Patch-Clamp-Messungen zwischen unmodifiziertem Wildtyp-NMDA-Rezeptor und uAA-modifizierter Variante konnten so Rückschlüsse auf die Auswirkungen auf die Funktionalität nach uAA-Einbau untersucht werden (Neubert et al., 2018). In enger Zusammenarbeit mit Franziska Neubert,

Dr. Sören Doose und Dr. Ulrich Terpitz (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg) konnte ein Protokoll für die Überexpression von funktionalen NMDA-Rezeptoren in Säugetier-Zelllinien etabliert und durch elektrophysiologische Messungen analysiert werden. Die Etablierung der NMDA-Untersuchungen sowie deren quantitative Analyse wurden von Franziska Neubert in enger Zusammenarbeit mit Prof. Christian Geis (Universität Jena) in den Arbeitskreis eingeführt.

Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigen vergleichbare Ströme von Wildtyp-NMDA-Rezeptor und klickbaren Mutante NR1^{Y392TAG}-NMDA-Rezeptor unter allen getesteten Bedingungen. Die Ergebnisse deuten auf volle Funktionalität des Rezeptors auch nach Einbau der uAA hin. Zudem erlaubte die Click-Färbung der Rezeptoren weitergehende Messungen, wie z.B. die Untersuchung der lateralen Mobilität durch FRAP-Messungen sowie die Bestimmung der Rezeptordichten auf der basalen Membran von adhärenenten Zellen. Der Vergleich zur Immunofärbung über Antikörper zeigt, dass die Click-Färbung die Mobilität der Rezeptoren in der Zellmembran nicht beeinflusst und zusätzlich die Detektion homogenen-verteilter Rezeptoren auf der Membran über *d*STORM ermöglicht. Im Gegensatz dazu lässt die Antikörper-Markierung durch Aggregationen und geringe Markierungsgrade keine Mobilitätsmessungen über FRAP-Mikroskopie zu und zeigt auch in *d*STORM-Aufnahmen Aggregate (engl. cluster). Derartige Cluster sind häufig Artefakte bei der Antikörperfärbung, welche durch Mehrfachbindung beider Fab-Fragmente an mehr als einen Rezeptor bzw. durch Selbsterkennung andere Antikörper zustande kommen und so zu einer Ansammlung von Antikörpern führen können. Die Einzelkomponenten der Click-Färbung hingegen ermöglichen eine stöchiometrische Markierung jeder Rezeptoruntereinheit mit einem Tet-Farbstoff und sind durch ihre Bioorthogonalität und Spezifität weniger anfällig für derartige Artefakte.

Des Weiteren wurde die Anwendbarkeit der Amber-Suppressionsmethode in Kombination mit der Markierung durch Tet-Farbstoffen von Rezeptoren untersucht, gegen die keine kommerziellen Antikörper erhältlich sind. Die Immunofärbung mithilfe von modifizierten Antikörper zählt bis heute zum Standardrepertoire in der Fluoreszenzmikroskopie. Jedoch ist die Generierung solcher Antikörper kosten- und zeitintensiv, sodass es nicht gegen jedes Epitop bzw. Bereich eines Proteins einen passenden Antikörper geben kann. Ob und in welchem Maße die Click-Färbung für derartige Rezeptoren nützlich sein kann, war dabei unklar. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der Kainat-Rezeptor als Modell-System ausgewählt, da für diesen Rezeptor nur

intrazellulär-bindende Antikörper kommerziell erhältlich sind und deshalb eine Lebendzell-Markierung der extrazellulären Bereiche des Proteins mit organischen Farbstoffen nicht durchführbar war. Die GluK2-Untereinheit des Kainat-Rezeptors wurde durch den Einbau der unnatürlichen Aminosäure TCO*-Lysin in fünf verschiedene Positionen der amino-terminalen Domäne (ATD) modifiziert und über eine Click-Reaktion mit dem membranimpermeablen Farbstoff H-Tet-Cy5 markiert. Kainat-Rezeptoren zählen ebenfalls zu den ionotropen Glutamatrezeptoren, welche jedoch auch als Homo-Tetramere an der Zellmembran lokalisiert sein können (Lerma, 2003). In enger Zusammenarbeit mit Alexander Kuhleemann (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg) konnte ein Protokoll für die Überexpression von Kainat-Rezeptoren in Säugetier-Zelllinien etabliert werden. Die Etablierung der Kainat-Experimente sowie deren quantitative Analyse wurden zudem in Zusammenarbeit mit Prof. Anna-Leena Sirén (Universität Würzburg) in den Arbeitskreis eingeführt.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine Lebendzell-Markierung der GluK2-Untereinheit durch die Click-Färbung mit Tet-Farbstoffen. Das genetisch-kodierte Fusionsprotein GFP zeigt eine deutliche Expression des Rezeptors in den Zellen, wobei ein Großteil der exprimierten Proteine intrazellulär mislokalisiert und mit anderen zellulären Organellen wechselwirkt. Durch Verwendung des membran-impermeablen Tetrazin-Farbstoffs H-Tet-Cy5 ermöglicht die Click-Färbung eine selektive Färbung der oberflächen-exponierten Kainat-Rezeptoren. Vergleichende Aufnahmen von Click- und Antikörper-Färbung zeigen eine homogene Färbung der Zellmembran durch H-Tet-Cy5 und keine detektierbare Markierung durch die verwendeten Antikörper. Die Antikörper sind gegen intrazelluläre Epitope gerichtet und benötigen zuvor eine Fixierung sowie Permeabilisierung der Zellmembran. Die Immunofärbung erlaubt daher keine Markierung von Kainat-Rezeptoren in lebenden Zellen und färbt zudem auch mislokalisierte, intrazelluläre Rezeptoren, wobei die Click-Färbung spezifisch die extrazelluläre Rezeptorpopulation markiert und eine Lebendzellfärbung ermöglicht. Zuletzt wurde die Markierungseffizienz zwischen Click- und Antikörper-Färbung näher betrachtet. Der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) wurde dabei als Modell-System ausgewählt. TNFR1 bildet ein membranständiges Dimer und lässt sich in Säugetier-Zelllinien überexprimieren (Locksley et al., 2001). Zudem sind kommerzielle Antikörper gegen extrazelluläre Epitope erhältlich und Strukturinformationen aus Kristallisationsdaten verfügbar. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen eine erhöhte Markierungsdichte durch die Click-Färbung im Vergleich zur Antikörper-Färbung. Zudem zeigt die Antikörper-Färbung aggregierte Fluoreszenzsignale und deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten

(~10fach) im Vergleich zur Click-Färbung. Um vergleichbare Bedingungen für die Markierung zu erreichen, wurde der Markierungsgrad des Antikörpers (engl. degree of labeling, DOL) auf ~1 eingestellt, sodass beide Färbemethoden prinzipiell mit einem Fluoreszenzfarbstoff je TNFR1-Untereinheit markieren sollten. Die Ergebnisse verdeutlichen die hohe Markierungseffizienz der Click-Färbung, welche bspw. durch die bessere Zugänglichkeit der kleinen Tet-Farbstoffe oder gestörte Zugänglichkeit der Antikörper-Bindestelle erklärt werden können. Zudem stellt die Click-Färbung eine kovalente Bindung zwischen Rezeptor und dem Fluoreszenzfarbstoff dar, wohingegen gebundene Antikörper nicht kovalent gebunden und daher anfällig gegenüber Waschschritten sind und zu reduzierten Fluoreszenzsignalen führen können. Der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Membranrezeptoren und die bioorthogonale Click-Färbung ermöglicht eine minimal-invasive Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung von membranständigen Rezeptoren ohne messbaren Funktionsverlust. Zudem ermöglicht die Click-Färbung die extrazelluläre Lebendzell-Markierung von Rezeptoren, gegen die keine kommerziellen Antikörper verfügbar sind und deshalb oftmals nicht oder nur schlecht erforscht sind. Durch die Click-Färbung können derartige Rezeptoren stöchiometrisch und kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und die Mobilität, Verteilung oder Funktionalität untersucht werden. Durch kurze Inkubationszeiten und physiologischen Bedingung eignet sich die Click-Färbung generell für die Visualisierung von Membranrezeptoren. Nichtsdestotrotz greifen diese Experimente oftmals auf die Überexpression von Rezeptoren in immortalisierten Zelllinien zurück und ermöglichen deshalb keine Analyse von endogenen Rezeptordichten bzw. -komplexen. Klassische Antikörper-Färbungen ermöglichen die Markierung von endogenen Proteinen, zeigen jedoch oftmals eine geringe Spezifität oder hohe Kreuz- oder Eigenreaktivität. Dies führt zu einer Verringerung der Markierungsdichte oder zu Artefakten wie bspw. induzierte Rezeptorcluster durch Aggregation (Neubert et al., 2018). Die Click-Färbung zeichnet sich durch die geringe Größe der Einzelkomponenten aus, welche die Funktionalität nicht beeinträchtigen und eine minimal-invasive Möglichkeit der Färbung erlauben. Darüber hinaus ermöglicht die Click-Färbung eine stöchiometrische und ortsspezifische Markierung eines Proteins. Die Überexpression sowie die Zugabe der unnatürlichen Aminosäuren verhindern jedoch die Analyse von endogenen Rezeptoren in ihrem ursprünglichen Zellkontext wodurch geeignete Click-Positionen für jeden Rezeptor angepasst bzw. optimiert werden müssen. Daher ist die Auswahl einer geeigneten Markierungsstrategie stets vom Anwender bzw. der Fragestellung abhängig.

5.3 Bioorthogonale Markierung von lebenden Zellen

Bei lebenden Zellen unterscheidet man grundsätzlich zwischen der Markierung von intrazellulären und extrazellulären Zielproteinen. Die spezifische Markierung lässt sich durch verschiedene Markierungsstrategien ermöglichen. In konventionellen Methoden zeigen sich oftmals eine Reihe von Limitierungen. Die gängigsten Strategien hierbei sind die klassische Immunofärbung über Antikörper. Diese ermöglicht zwar die Markierung von endogenen Proteinen mit organischen Farbstoffen, jedoch sind die verwendeten Antikörper oftmals größer als die zu markierenden Proteine und können so deren Funktionen erheblich beeinträchtigen. Zudem zeigen Antikörper häufig niedrige Affinität zu ihren Epitopen, sodass eine hohe Konzentration und lange Inkubationszeiten benötigt werden, um eine effiziente Markierung zu gewährleisten. Die damit einhergehende zelluläre Antwort kann dabei von unspezifischer Internalisierung durch unspezifische endozytotische Vesikel bis hin zum Zelltod reichen. Zusätzlich lassen sich primäre Antikörper oftmals nicht effizient fluoreszenzmarkieren, sodass zur Erhöhung der Spezifität häufig eine Sekundärfärbung mit einem zweiten Antikörper, welchen den ersten bindet, nötig ist. Außerdem erfolgt die Fluoreszenz-Markierung meist über freie Carboxy-, Thiol- oder Amin-Gruppen, deren Anzahl und Zugänglichkeit bei jedem Antikörper unterschiedlich ist und dadurch zu unterschiedlichen Graden der Markierung (DOL) führt. Die damit einhergehenden Unsicherheiten bezüglich der Farbstoffanzahl pro gebundenem Zielprotein sowie die Variabilität der bindenden Antikörper erschwert eine quantitative Abschätzung enorm. Bei Verwendung von polyklonalen oder sekundären Antikörpern potenziert sich diese Unsicherheit, sodass quantitative Aussagen bei hoher Proteindichte nicht mehr möglich sind. Die Markierung durch Antikörper ist kosten- und zeitintensiv und erfordert bei neuen Proteinen bzw. Epitopen die Immunisierung anderer Organismen. Zudem ermöglicht die klassische Immunofärbung nur die Markierung extrazellulärer Zielproteine, da Antikörper in lebenden Zellen nicht die Zellmembran durchqueren können.

Die genetische Kodierung von Fluoreszenzproteinen oder selbst-koppelnden Enzymen ermöglicht sowohl die Markierung von extrazellulären als auch intrazellulären Proteinen und findet breite Anwendung in vielen Lebendzell-Experimenten auf zellulärer Ebene, in Gewebemodellen oder ganzen Organismen. Es gibt eine große Auswahl verschiedener Varianten mit unterschiedlichsten Absorptions- und Emissionsspektren oder photophysikalischen Eigenschaften, sodass je nach experimentellem Aufbau ein geeignetes Fluoreszenzprotein ausgewählt werden kann. Nichtsdestotrotz neigen

Fusionsproteine dazu mit anderen Proteinen zu interagieren oder mit weiteren Fusionsproteinen Oligomere auszubilden. Außerdem stört die Fusionierung oftmals die Funktionalität oder Dynamik des Zielproteins und ist häufig auf den N- oder C-terminalen Bereich eines gekoppelten Proteins beschränkt. Außerdem eignen sich die meisten Fusionsproteine nicht für extrazelluläre Expression, sodass eine selektive Markierung durch Fusionsproteine oftmals mit intrazellulärem Hintergrundsignal einhergeht.

Bei der bioorthogonalen Markierung von lebenden Zellen durch Click-Reaktion von TCO und Tetrazin unterscheidet man ebenfalls zwischen intrazellulären und extrazellulären Zielproteine. Extrazellulär-zugängliche Proteine wie z.B. Membranrezeptoren sind dabei prinzipiell am einfachsten zu markieren: Durch Einbau einer unnatürlichen Aminosäure in einen extrazellulären Bereich des Zielproteins ist es möglich ortsspezifisch und kovalent einen Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln. Durch Auswahl eines membranimpermeablen Fluoreszenzfarbstoffs wie bspw. H-Tet-Cy5 kann man nun spezifisch die extrazelluläre Population fluoreszenzmarkieren. Die kurzen Inkubationszeiten sowie geringen Farbstoffkonzentrationen ermöglichen die Etablierung von optimalen Markierungsprotokollen für die stöchiometrische, bioorthogonale und chemoselektive Färbung eines Membranproteins. Durch die kleine Größe der Click-Reaktionspartner interferiert diese Art der Markierung, bei optimaler Position der uAA nicht bzw. kaum mit der biologischen Funktion des Proteins und ermöglicht so eine minimal-invasive Färbung des Zielproteins in lebenden Zellen. Intrazelluläre Zielproteine hingegen bringen einige Herausforderungen mit sich: Durch Zugabe der uAA in das Wachstumsmedium der Zellen besitzen diese einen hohen Anteil an nicht-inkorporierten frei-diffundierenden uAA im Zytosol (Hoffmann, 2015). Der Einbau einer uAA in ein intrazelluläres Zielprotein unterscheidet sich methodisch prinzipiell zwar nicht vom Einbau in einen extrazellulären Membranrezeptor, jedoch konkurriert der ungebundene Anteil an freien uAA mit dem klickbaren intrazellulären Zielprotein um den Reaktionspartner Tetrazin. Bei Zugabe eines membran-permeablen Tet-Farbstoffs wie z.B. H-Tet-SiR wird daher sowohl das klickbare Zielprotein als auch der zytosolische Anteil an freien uAA markiert. Das damit einhergehende Hintergrundsignal ist dabei meist stärker als die gewünschte Färbung und verhindert so eine Visualisierung von intrazellulären Zielproteinen. Es gibt jedoch einige Möglichkeiten das Hintergrundsignal zu reduzieren. Zum einen kann die Inkubationszeit der Zellen mit der jeweiligen uAA reduziert werden. Dies führt zu einem reduzierten Vorkommen freier, nicht-eingebauter uAA in den Zellen. Ist die Expression des Zielproteins in den Zellen stark genug, kann ein

Großteil der zur Verfügung stehenden uAA in das Zielprotein eingebaut werden und so zu einer geringeren Hintergrundmarkierung führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde exemplarisch das Zielprotein EMTB ausgewählt. Es handelt sich hierbei um ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches sich stark in Zellen überexprimieren lässt ohne die Mikrotubuli-Dynamik zu beeinflussen. Zudem ermöglicht es durch seine strukturelle Anhäufung zwischen Hintergrundsignal von freien, zytosolischen uAA und der spezifischen Markierung der Mikrotubuli-Filamente des klickbaren EMTB zu unterscheiden. Das Expressionssystem kodierte zudem für drei aneinandergereihte GFP, welche die Identifizierung von Zellen mit hoher Expression ermöglichen. Mit diesem optimierten Versuchsansatz konnten die Mikrotubuli-Dynamik in lebenden Zellen mittels konfokaler RCM-Mikroskopie untersucht werden. Zusätzliche Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie-Experimente an fixierten Zellen, welche EMTB^{K87TAG}-3xGFP exprimierten, ermöglichten die Rekonstruktion von hochaufgelösten Fluoreszenzbildern, wobei das Hintergrundsignal von ungebundenem EMTB die Bildqualität erheblich begrenzt. Um diese Limitierung zu umgehen wurde ein zweiter Ansatz durchgeführt: Die Click-Gruppe TCO wurde direkt an das Mikrotubuli-stabilisierende Effektormolekül Docetaxel gekoppelt (Dumontet und Jordan, 2010; Lee et al., 2018; Lukinavičius et al., 2014). Dieser Versuchsansatz bedarf weder der transienten Transfektion der Zellen noch der Zugabe der freien uAA TCO*-Lysin. Es wurde getestet, ob Docetaxel-TCO spezifisch an Mikrotubuli bindet und eine lebende Zellmarkierung des Zytoskeletts mit H-Tet-SiR ermöglicht. Konfokale und hochauflösende Mikroskopie-Bilder (RCM und SIM) zeigen eine spezifische Markierung des Zytoskeletts durch Click-Chemie, wobei die dynamische Instabilität von Mikrotubuli, die mit 10 μ M Docetaxel-TCO markiert sind, gestört ist und keine Polymerisations- und Degradationsereignisse mehr sichtbar sind. Das Mikrotubuli-stabilisierende Effektormolekül Docetaxel-TCO kann somit zur Visualisierung von Mikrotubuli und Untersuchung der Permeabilität von Tetrazin-Farbstoffen genutzt werden. Bei Konzentrationen >100 nM ist es jedoch nicht geeignet die Dynamik der Mikrotubuli in lebenden Zellen zu untersuchen (Lukinavičius et al., 2014).

5.4 Anwendbarkeit von Tetrazin-Farbstoffen in der Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der charakteristischen Eigenschaften jedes Tetrazin-Farbstoffs wurden neben spektroskopischen Messungen auch vergleichende Experimente bezüglich der Markierungseffizienz, Hintergrundfärbung und Nutzbarkeit in hochauflösenden Mikroskopie-Techniken durchgeführt. Hierfür wurde als Modell-System Phalloidin-TCO ausgewählt. Phalloidin bindet filamentöses Aktin sehr effizient und ermöglicht die Visualisierung dieses Zellskelettbestandteils in fixierten Zellen. Es ermöglicht zudem die Click-Färbung mit unterschiedlichen Tet-Farbstoffen ohne genetische Modifikation der Zellen. Konfokale Fluoreszenzbilder zeigen, dass alle Tetrazin-Farbstoffe gut für die High-End-Mikroskopie geeignet sind. Vergleichende Fluoreszenzmarkierungs- und Bildgebungsexperimente mit unmodifiziertem Phalloidin zeigen jedoch, dass einige Tet-Farbstoffe die Tendenz zeigen, unspezifisch an intrazelluläre Strukturen zu binden. Insbesondere einige der gelb- bis rotabsorbierenden ATTO-Farbstoffe (z.B. Me-Tet-ATTO550, Me-Tet-ATTO565 und Me-Tet-ATTO590) zeigen ein starkes unspezifisches Hintergrundsignal. Dieser Effekt ließ sich ebenfalls bei den hochauflösenden Mikroskopie-Techniken durch Re-Scan-Konfokalmikroskopie (RCM) und strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM) beobachten. Die meisten untersuchten Tet-Farbstoffe, darunter die neuen Farbstoffe HMSiR, JF₆₄₆, und Cy5B, zeigen eine geringe Tendenz zur unspezifischen Bindung an zelluläre Strukturen und liefern hochaufgelöste Aktinbilder mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis. Darüber hinaus ermöglichen bspw. fluorige Tet-Farbstoffe wie z.B. Me-Tet-ATTO488, Me-Tet-ATTO655 mit Turn-Ons ≥ 6 sowie hydrophile Tet-Farbstoffe wie z.B. H-Tet-Cy3 und H-Tet-Cy5 eine waschfreie Fluoreszenzbildgebung. Darüber hinaus zeigte sich, dass einige Tet-Farbstoffe wie z.B. H-Tet-Cy5, H-Tet-Cy5B und H-Tet-HMSiR in Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie-Experimenten verwendet werden können, um hochauflösende Fluoreszenzbilder des Aktin-Skeletts zu rekonstruieren. Die Farbstoffe zeigten trotz der unterschiedlichen Lokalisierungsintensitäten und verschiedenen experimentellen Bedingungen vergleichbare Lokalisationsgenauigkeiten im Bereich von 11-13 nm (siehe 4.3.3).

5.5 Fazit & Ausblick

5.5.1 Fazit

Mit ständig zunehmender räumlicher und zeitlicher Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie wird die Entwicklung von effizienten Fluoreszenzsonden mit minimaler Größe besonders wichtig. Der ortsspezifische Einbau von unnatürlichen Aminosäuren (wie bspw. TCO*-Lysin) in die Aminosäurekette eines zu untersuchenden Proteins mit anschließender bioorthogonaler Kopplung durch Tetrazin-Farbstoffen stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, aktuelle Limitierungen anderer Färbemethoden zu überwinden und hochauflösende Fluoreszenzbilder mit organischen Farbstoffen zu ermöglichen (siehe 4.2). Die ständig wachsende Anzahl von kommerziell erhältlichen organischen Farbstoffen als Tetrazin-Derivate ermöglicht zudem eine breite Anwendbarkeit sowie große Anpassbarkeit dieser Markierungsstrategie. Einige Tetrazin-Farbstoffe neigen jedoch dazu, unspezifisch an intrazelluläre Kompartimente zu binden, sodass die Auswahl eines geeigneten Tetrazin-Farbstoffs eine spezifische Markierung wesentlich beeinflusst (siehe 4.3).

Die Fluoreszenzlöschung vieler Tetrazin-Farbstoffe vor der Click-Reaktion sowie die Erhöhung der Fluoreszenz nach der Click-Reaktion (Turn-On) ist ein Kennzeichen der Tetrazin-Farbstoff-Derivate und kann unterschiedliche Ursachen haben: Während Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) für die Fluoreszenzlöschung von blau- und grünabsorbierenden Farbstoffen verantwortlich ist (Devaraj et al., 2010), ist der photoulinduzierte Elektronentransfer (PET) vom angeregten Farbstoff auf das Tetrazin hauptsächlich für die Löschung in rot-absorbierenden Oxazin- und Si-Rhodamin-Derivaten verantwortlich (siehe 4.1). Hierbei ist die gestapelte Anordnung des konjugierten Elektronensystems von Farbstoff und Tetrazin erforderlich. Bei der Click-Reaktion mit Dienophilen werden diese Löschwechselwirkungen reduziert, was zu einer erheblichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt. Die daraus resultierende Fluoreszenzerhöhung kann vorteilhaft für waschfreie Fluoreszenzexperimente genutzt werden (siehe 4.3.1). Die Farbstoffe Me-Tet-AZ519 und Me-Tet-AZ503 sowie die rot-absorbierenden Farbstoffe H-Tet-Cy5, H-Tet-Cy5B und H-Tet-HMSiR sind zudem besonders interessant für die autofluoreszenzfreie, hochauflösende Fluoreszenzbildgebung mittels konfokaler Re-Scan-Mikroskopie (RCM), strukturierter Beleuchtungsmikroskopie (SIM) und Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie (engl. single-molecule localization

microscopy, SMLM), da diese eine große Stokes-Verschiebung zeigen oder photoschaltbar sind (siehe 4.3).

Der Einbau unnatürlicher Aminosäuren ermöglicht es auch, Domänen von Plasmamembranproteinen, welche über Antikörper nicht bzw. nur schlecht adressiert werden können, spezifisch und kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Jedoch kann jede Modifikation bzw. Markierungsmethode die Funktionalität des jeweiligen Zielproteins beeinflussen. Am Beispiel der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 wurde die Auswirkung des Einbaus der unnatürlichen Aminosäure TCO*-Lysin in Membranproteine untersucht. Hierfür wurde ein Protokoll zur ortsspezifischen Markierung der NR1-Untereinheit durch Erweiterung des genetischen Codes entwickelt (Neubert et al., 2018). Aus einer Reihe von Mutanten wurde diejenige identifiziert, die am effektivsten überexprimiert und markiert werden konnte. Die NR1^{Y392TAG}-Mutante konnte erfolgreich in hochauflösenden Mikroskopie-Experimenten eingesetzt und mit konventioneller immunzytochemischer Markierung mittels Antikörper verglichen werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Click-Färbung im Vergleich zur Immunofärbung eine höhere Markierungseffizienz besitzt und die Rekonstruktion der homogenen Verteilung der überexprimierten Rezeptoren in verschiedenen Zelllinien ermöglicht. Zudem konnte die Funktionalität der NMDA-Rezeptoren durch vergleichende Patch-Clamp-Messungen der Click-Mutante und des Wildtyp-Rezeptors gezeigt werden. In weiterführenden Untersuchungen wurde der Kainat-Rezeptor, ebenfalls aus der Klasse der ionotropen Glutamat-rezeptoren, ausgewählt, da es für diese Rezeptoren nur wenige kommerzielle Antikörper gibt. Sie binden zudem ausschließlich an intrazelluläre Epitope, sodass eine Lebendzell-Markierung der extrazellulären Domänen mittels Antikörper nicht möglich ist. Analog zu den Untersuchungen des NMDA-Rezeptors, konnten verschiedene Mutanten auf der extrazellulären Domäne des Kainat-Rezeptors etabliert und mittels hochauflösender Mikroskopie untersucht werden (Beliu et al., 2019). Die hierfür entwickelten Protokolle ermöglichten erstmals die Lebendzell-Mikroskopie der membranständigen, mit organischen Farbstoffen markierten, Kainat-Rezeptoren.

Zur weiteren Untersuchung der Markierungseffizienz wurde der TNF-Rezeptor herangezogen. Hierbei handelt es sich um ein membranständiges, dimerisches Protein, welches eine extrazelluläre Domäne besitzt. Vergleichende Fluoreszenzaufnahmen von click-markierten TNF-Mutanten und Antikörper-markierten TNF-Rezeptoren zeigten eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität und Markierungseffizienz der Click-Färbung (siehe 4.2.3).

Der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Membranproteine und die bioorthogonale Click-Färbung ermöglicht somit eine effiziente Fluoreszenzmarkierung von schwer zugänglichen Epitopen bzw. Proteindomänen ohne Einfluss auf deren Funktionalität. Die damit verbundene Überexpression der tRNA-/tRNA-Synthetase sowie der jeweiligen Zielproteine spiegelt jedoch nicht die endogenen Level der Proteinkonzentration innerhalb der Zellen wider. Es müssen Artefakte wie Aggregation bedingt durch starke Erhöhung der Rezeptordichte auf der Plasmamembran berücksichtigt werden. Die Rezeptordichten von click-markierten Rezeptoren, welche in Standard-Zellkulturlinien exprimiert werden, können zudem durch die meist transiente Transfektion stark variieren und entsprechen nicht der Verteilung des nativen Rezeptors. Klassische Immunofärbungen ermöglichen zwar die Markierung endogener Proteinlevel, können jedoch ebenfalls zu Artefakten, wie bspw. Aggregation durch Kreuzreaktivität oder Störung der Funktionalität, führen. Abschließend ist festzuhalten, dass die Markierungsstrategie immer auf die jeweiligen experimentellen Bedingungen und Fragestellungen angepasst werden muss.

5.5.2 Ausblick

Intrazelluläre Zielproteine. Die Markierung von extrazellulären Zielproteinen über Einbau einer klickbaren unnatürlichen Aminosäure (z.B. TCO*-Lysin) und einem Tetrazin-Farbstoff (z.B. H-Tet-Cy5) gehört inzwischen zu den gängigsten Anwendungen von kupferfreier Click-Chemie in der Visualisierung von Membranrezeptoren (Nikic et al., 2015; Plass et al., 2011). Vorteilhaft ist hier vor allem die Integrität der Zellmembran: Zum einen hält diese die frei im Zytosol diffundierenden und ungebundenen unnatürlichen Aminosäuren zurück, welche die Zellen aus dem Kulturmedium aufgenommen haben. Zum anderen stellt sie eine biochemische Schranke für extrazelluläre Moleküle dar, welche je nach Ladung und Polarität, in die Zelle vordringen können oder nicht. In Kombination mit einem impermeablen Tetrazin-Farbstoff lassen sich auf diese Weise modifizierte Membranrezeptoren extrazellulär spezifisch und effizient markieren, wobei die intrazelluläre Population an gebundenem und ungebundenem TCO*-Lysin nicht markiert wird.

Bei der Visualisierung intrazellulärer Proteine können vor allem unspezifisches Signal und Hintergrundfluoreszenz, die durch unzureichendes Waschen von nicht-eingebauten, frei im Zytosol diffundierenden und Farbstoff-gebundenen unnatürlichen Aminosäuren entsteht, problematisch sein (Kozma et al., 2016). Im Rahmen dieser Arbeit konnten

Protokolle etabliert werden, die eine intrazelluläre Click-Färbung ermöglichen. Am Beispiel des Mikrotubuli-bindenden Proteins (EMTB) und der Mikrotubuli-bindenden Verbindung Docetaxel konnte gezeigt werden, dass vor allem die lokale Konzentration von inkorporiertem sowie ungebundenem TCO-Derivaten die Markierungseffizienz und das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis beeinflusst (siehe 4.4). Die Färbung von Zellen, welche zuvor mit Docetaxel-TCO behandelt wurden, konnte erfolgreich mit dem Membran-permeablen Tetrazin-Farbstoff H-Tet-SiR durchgeführt werden, wobei die Hintergrundfärbung vernachlässigbar war (Abbildung 49). Bei der Click-Markierung von EMTB^{87TAG}-3xGFP mit H-Tet-SiR zeigte sich zwar eine erhöhte Hintergrundfärbung (Abbildung 45), jedoch ermöglicht die starke Überexpression des Konstrukts dennoch eine gute Click-Färbung.

Hydrophilere Varianten bestehender unnatürliche Aminosäuren könnten dazu beitragen, die Markierungseffizienz von zytosolischen Proteinen zu erhöhen, ohne jedoch die hervorragenden Click-Eigenschaften mit Tetrazin-Farbstoffen zu verringern. Erste Studien zeigen, dass sich hydrophilere unnatürliche Aminosäuren wie BCN-Lysin oder das TCO-Derivat Dioxo-TCO (DOTCO) besser aus dem Zytosol herauswaschen lassen und dazu beitragen können, unspezifische Hintergrundfärbung zu verringern (Kozma et al., 2016; Oliveira et al., 2017). In Kombination mit membranpermeablen Tetrazin-Farbstoffen mit hohem Turn-On könnten optimierte unnatürliche Aminosäuren eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, intrazelluläre Zielproteine effizienter markieren und untersuchen zu können.

Bezüglich der Wahl des Farbstoffs kann man festhalten, dass nicht alle (Tetrazin-) Farbstoffe zellpermeabel sind (Beliu et al., 2019; Specht et al., 2017; Uttamapinant et al., 2015). Viele der, im Feld der (hochauflösenden) Fluoreszenzmikroskopie, gängigen Fluorophore wie bspw. die Alexa-, ATTO-, oder Cy-Farbstoffe zeigen zwar hervorragende photophysikalische Eigenschaften bezüglich Stabilität und Quantenausbeute, sind jedoch nicht bzw. kaum zellpermeabel und eignen sich somit nur bedingt für intrazelluläre Lebendzellfärbungen (Grimm, 2015; Lukinavičius et al., 2014; Zhang et al., 2019). Eine mögliche Strategie zur Einschleusung von zellimpermeablen Farbstoffen in Zellen ist die Nutzung von zellpenetrierenden Peptiden (engl. cell-penetrating peptides, CPP). Mit ihrer relativ geringen Größe (typischerweise <50 Aminosäuren) können diese als Peptidvehikel (PV) fungieren und sind in der Lage, verschiedene Makromoleküle, wie DNA, Proteine oder Farbstoffe, in lebende Zellen zu transportieren (Zhang et al., 2019). In Kombination mit Click-Reagenzien könnte diese Strategien

zukünftig das Einbringen von normalerweise impermeablen Tetrazin-Verbindungen vermitteln und die Visualisierung intrazellulärer Strukturen mit freier Farbstoffwahl ermöglichen (Beliu und Sauer, 2019).

Click-Markierung von neuronalen Proteinen. Die Kultivierung und genetische Manipulation von neuronalen Zellen birgt diverse Schwierigkeiten im Vergleich zu Standard-Zellkulturlinien: So zeigen ausdifferenzierte Neurone keine Zellproliferation mehr, reagieren empfindlicher auf Umgebungsstörungen und lassen sich oftmals nur schwierig präparieren und kultivieren. Dennoch ist die Erforschung neuronaler Zielproteine für die Identifizierung und Charakterisierung von neuronalen Prozessen unverzichtbar, sodass neuronale Proteine, bei der Erforschung von Lernprozessen, Gedächtnisformierung und neurodegenerativen Krankheiten immer mehr in den Fokus der Fluoreszenzbildgebung rücken.

Neurone sind über Synapsen miteinander verbunden und können über die unidirektionale Freisetzung von Neurotransmitter von der prä- zur postsynaptischen Membran Signale weiterleiten und miteinander kommunizieren. Der synaptische Spalt ist ca. 20-40 nm breit und trennt die prä- und postsynaptische Membran. Die Fluoreszenzmarkierung von Zielproteinen innerhalb der Synapse stellt aufgrund der Markersgröße sowie potenzieller Wechselwirkungen mit der Proteinfunktion jedoch eine große Herausforderung dar. Hierbei könnte der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren und die Click-Färbung mit Tetrazin-Farbstoffen vorteilhaft für die spezifische Färbung und Detektion einzelner Proteine genutzt werden und neue Möglichkeiten der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie eröffnen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten Protokolle für die Expression von klickbaren, funktionalen NMDA-Rezeptoren in HEK293T-Zellen etabliert werden. Die Übertragung dieser Markierungsstrategie auf neuronale Zellen wird es ermöglichen, den Transport, die Internalisierung und den Abbau von Rezeptoren in neuronalen Zellen und Geweben zu verfolgen. Obwohl bisher auf die Überexpression beschränkt, könnte dieser Markierungsansatz in vielen Glutamaterezeptor-Studien Anwendung finden, bei denen die räumliche Auflösung oder die Färbungseffizienz durch die Größe konventioneller Marker beeinträchtigt wird. Zudem könnte die Untersuchung der Zusammensetzung der Protein-Untereinheiten durch den Einbau mehrerer unnatürlichen Aminosäuren ermöglicht werden.

Anwendbarkeit der Click-Färbung zur Untersuchung der Zugänglichkeit. Strukturelle Informationen sind sehr nützlich bei der Untersuchung von Funktionalität, Interaktionspartnern sowie Wirkmechanismen von Peptiden und Proteinen. Diverse Verfahren wie bspw. Kristallographie, NMR-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie ermöglichen es, die Struktur von Molekülen mit atomarer Auflösung zu bestimmen und ein Modell der zugrundeliegenden Struktur zu rekonstruieren, wobei jede Methode Vor- und Nachteile gegenüber der jeweils anderen besitzt (Billinge und Levin, 2007). In Protein-Datenbanken (PDB) finden sich zahlreiche Strukturinformationen, welche von kleinen Peptiden bis hin zu Multiproteinkomplexen reichen. Eine prinzipielle Gemeinsamkeit der erzeugten Daten ist hierbei die starre Natur der erzeugten Strukturen: Je nach Präparation und Aufreinigung der Proben werden die nativen Wechselwirkungen des Proteins eingeschränkt und die erhaltenen Strukturen stellen eine Art Schnappschuss der Proteinstruktur zum jeweiligen Zeitpunkt dar, welcher nicht immer die dynamische Natur bzw. Konformation der Proteine widerspiegelt. Regionen innerhalb eines Proteins können in den rekonstruierten Strukturen daher verborgen oder oberflächenexponiert erscheinen, sind es jedoch nicht bzw. nur zeitweise. Auch Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflussen maßgeblich die Struktur eines Proteins, welche jedoch die Strukturanalyse durch ihre Komplexität und dynamische Wechselwirkungen erschweren. Oftmals stehen sich strukturelle und biologische Informationen entgegen und lassen keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der Zugänglichkeit einzelner Aminosäuren oder Subdomänen innerhalb eines Proteins zu. Zwar konnten über Röntgenkristallstrukturanalyse bspw. die Strukturen diverser Ionenkanäle, Enzyme oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) aufgeklärt werden, jedoch sind diese nicht ausreichend für die Entschlüsselung des biologischen Mechanismus (Billinge und Levin, 2007) und erfordern dynamischere Modelle von Proteinen, um die intrinsische Flexibilität der Proteinkonformationen widerzuspiegeln.

Hier könnte der Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit darauffolgender Click-Färbung helfen, die Position einzelner Aminosäuren sowie deren Zugänglichkeit zu bestimmen (engl. accessibility mapping) (Grunbeck et al., 2012; Rannversson et al., 2016; Serfling et al., 2018). Der Austausch einzelner Aminosäuren wird in Proteinen oftmals toleriert, kann jedoch deren Gesamtstruktur je nach Position und Wechselwirkung beeinflussen (Parker, 2001). Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten die Funktionalität bzw. den Einfluss des Aminosäure-Austauschs zu untersuchen: Zum einen kann die Größe des translatierten Konstrukts mit dem unmodifizierten (Wildtyp-) Protein verglichen werden,

da Unterschiede auf eine gestörte Expression bzw. Proteinfaltung hindeuten. Zum anderen können zusätzliche Funktionstest wie bspw. enzymatische Aktivität oder Signalweiterleitung wichtige Indikatoren sein, ob und in welchem Maße der Aminosäure-Austausch Einfluss auf die Proteinfunktion besitzt. Trotz Unsicherheiten bezüglich der Beeinflussung der biologischen Funktion stellt die Prüfung der Zugänglichkeit einer Aminosäureposition über die erfolgreiche Click-Färbung eine interessante und potenzielle Erweiterung der bisherigen Strukturdeterminierung dar und ermöglicht, zumindest teilweise, eine Kartierung zugänglicher und verborgener Positionen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Click-Expansion. Eine alternative Strategie die Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen zu überwinden, stellt die Expansionsmikroskopie (engl. expansion microscopy, ExM) dar. Durch die Einbettung bzw. Verlinkung von Biomolekülen in ein quellbares Hydrogel lassen sich biologische Proben um ein Vielfaches ausdehnen, wodurch eine laterale Auflösung von bis zu ~ 70 nm durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie (cLSM) ermöglicht wird (Chen et al., 2015). In Kombination mit hochauflösenden Mikroskopietechniken wie SIM oder STED konnte eine räumliche Auflösung von ~ 20 - 30 nm erreicht werden (Gambarotto et al., 2019; Gao et al., 2019). Die Markierung der zu untersuchenden Biomoleküle geschieht entweder vor (engl. prelabeling) oder nach (engl. postlabeling) der Expansion der Probe in Wasser bzw. wässrigem Medium. Vor der Expansion des Gels wird eine sog. Homogenisierung durchgeführt (bspw. über Zugabe von Proteasen oder Denaturierung), um die isotrope Ausdehnung der Probe zu gewährleisten (Chozinski et al., 2016; Ku et al., 2016). Dies führt vor allem bei fluoreszierenden Proteinen zur Zerstörung eines Großteils der Fluorophore und damit einhergehend zu Signalverlust. Die Färbung nach der Expansion umgeht diesen Signalverlust, indem die organischen Farbstoffe nicht herausgewaschen oder durch freie Radikale zerstört werden. Jedoch können durch die vorherige Expansion die Epitope für die Antikörperfärbung bzw. die zu markierenden Positionen innerhalb der Proteine auch derart modifiziert bzw. denaturiert werden, dass eine nachträgliche Färbung nicht mehr möglich ist (Gambarotto et al., 2019). Eine Kombination aus ExM und Click-Färbung mittels Einbau von unnatürlichen Aminosäuren in Zielproteine könnte eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, expandierte Proteine ortsspezifisch über Tetrazin-Farbstoffe kovalent zu markieren. Durch die minimale Markierungsgröße von

~ 1 nm könnten darüber hinaus verschiedene Positionen innerhalb eines Proteins fluoreszenzmarkiert und Informationen über die molekulare Proteinarchitektur gewonnen werden.

Bis-Tetrazin-Farbstoffe. Die starke Fluoreszenzlöschung vieler Tetrazin-Farbstoffe sowie Fluorogenität nach der Click-Reaktion lässt sich auf unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Tetrazin zurückführen (siehe 4.1). Die meisten Tetrazin-Derivate sind mono-Tetrazine und eignen sich somit ideal für die stöchiometrische Markierung von funktionalisierten Molekülen wie bspw. der unnatürlichen Aminosäure TCO*-Lysin. Die chemische Synthese von Bis-Tetrazin-Farbstoffen ist beträchtlich schwieriger zu realisieren und Anwendungen derartiger Verbindungen in der Fluoreszenzbildgebung sind bisher vergleichsweise selten (Kormos, 2018). Die Größe von Bis-Tetrazin-Farbstoffen ist mit < 2 nm vergleichsweise klein und ermöglicht die kovalente Bindung von zwei Biomolekülen. Daher stellen Bis-Tetrazin-Farbstoffe eine vielversprechende Möglichkeit dar, zwei Positionen innerhalb eines Proteins zu binden oder die Interaktion von zwei unterschiedlichen Proteinen nachzuweisen. Andere Methoden, wie die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (engl. bimolecular fluorescence complementation, BiFC), welche erst bei räumlicher Nähe einen fluoreszierenden Komplex aus zwei nicht-fluoreszierenden Fragmenten bilden, können zwar ebenfalls Protein-Interaktionen visualisieren, sind jedoch mit >200 Aminosäuren vergleichsweise groß und können so die Proteinfunktionalität beeinträchtigen. Bis-Tetrazin-Verbindungen bergen zudem großes Potenzial bezüglich der Fluorogenität: Hierbei könnten zwei Tetrazine an einem Fluoreszenzfarbstoff eine stärkere Fluoreszenzlöschung und damit ebenfalls einen höheren Turn-On nach der Click-Reaktion verursachen. Die minimale Störung der Proteinfunktion durch den Einbau einzelner unnatürlicher Aminosäuren in Kombination mit der schnellen Reaktionskinetik der Click-Reaktion zwischen TCO und Tetrazin könnten Bis-Tetrazin-Farbstoffe daher zu idealen Fluoreszenzsonden für die Detektion von Protein-Interaktionen im Bereich von wenigen Nanometern machen.

6 Literaturverzeichnis

Abbe, E. (1873). Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie* 9, 413–468.

Aggarwal, B.B., Aiyer, R.A., Pennica, D., Gray, P.W., und Goeddel, D.V. (1987). Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. *Ciba Found. Symp.* 131, 39–51.

Beliu, G., und Sauer, M. (2019). A Trojan Horse for live-cell super-resolution microscopy. *Light: Science & Applications* (Akzeptiert).

Beliu, G., Kurz, A.J., Kuhlemann, A.C., Behringer-Pliess, L., Meub, M., Wolf, N., Seibel, J., Shi, Z.-D., Schnermann, M., Grimm, J.B., et al. (2019). Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy. *Commun. Biol.* 2, 261.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., und Stryer, L. (2013). DNA, RNA und der Fluss der genetischen Information. In *Stryer Biochemie*, J.M. Berg, J.L. Tymoczko, and L. Stryer, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 110–141.

Billinge, S.J.L., und Levin, I. (2007). The Problem with Determining Atomic Structure at the Nanoscale. *Science* 316, 561–565.

Birks, J.B. (1973). *Organic molecular photophysics*. (London; New York: J. Wiley).

Carlson, J.C.T., Mikula, H., und Weissleder, R. (2018). Unraveling Tetrazine-Triggered Bioorthogonal Elimination Enables Chemical Tools for Ultrafast Release and Universal Cleavage. *Journal of the American Chemical Society* 140, 3603–3612.

Chattopadhyay, K., Saffarian, S., Elson, E.L., und Frieden, C. (2002). Measurement of micro-second dynamic motion in the intestinal fatty acid binding protein by using fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99.

Chen, F., Tillberg, P.W., und Boyden, E.S. (2015). Expansion Microscopy. *Science* 347, 543–548.

Chen, P.R., Groff, D., Guo, J., Ou, W., Cellitti, S., Geierstanger, B.H., und Schultz, P.G. (2009). A Facile System for Encoding Unnatural Amino Acids in Mammalian Cells. *Angewandte Chemie International Edition* 48, 4052–4055.

Chin, J.W. (2014). Expanding and Reprogramming the Genetic Code of Cells and Animals. *Annual Review of Biochemistry* 83, 379–408.

Chin, J.W., Cropp, T.A., Anderson, J.C., Mukherji, M., Zhang, Z., und Schultz, P.G. (2003). An Expanded Eukaryotic Genetic Code. *Science* 301, 964–967.

Chozinski, T.J., Halpern, A.R., Okawa, H., Kim, H.-J., Tremel, G.J., Wong, R.O.L., und Vaughan, J.C. (2016). Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. *Nature Methods* 13, 485–488.

- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews* *90*, 1103–1163.
- Combs, C.A. (2010). Fluorescence Microscopy: A Concise Guide to Current Imaging Methods. *Curr Protoc Neurosci* *0 2*, Unit2.1.
- Coons, A.H., Creech, H.J., and Jones, R.N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* *47*, 200–202.
- Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R.J. (1961). General Nature of the Genetic Code for Proteins. *Nature* *192*, 1227–1232.
- Devaraj, N.K. (2018). The Future of Bioorthogonal Chemistry. *ACS Cent. Sci.* *4*, 952–959.
- Devaraj, N.K., Hilderbrand, S., Upadhyay, R., Mazitschek, R., and Weissleder, R. (2010). Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition* *49*, 2869–2872.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S.F. (1999). The Glutamate Receptor Ion Channels. *Pharmacol Rev* *51*, 7–62.
- Dong, X., Wang, Y., and Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* *30*, 379–387.
- Doose, S., Neuweiler, H., and Sauer, M. (2005). A Close Look at Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *ChemPhysChem* *6*, 2277–2285.
- Doose, S., Neuweiler, H., Barsch, H., and Sauer, M. (2007). Probing polyproline structure and dynamics by photoinduced electron transfer provides evidence for deviations from a regular polyproline type II helix. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 17400–17405.
- Doose, S., Neuweiler, H., and Sauer, M. (2009). Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. *ChemPhysChem* *10*, 1389–1398.
- Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*.
- Faire, K. (1999). E-MAP-115 (ensconsin) associates dynamically with microtubules in vivo and is not a physiological modulator of microtubule dynamics. *J. Cell Sci.* *112*.
- Fernández-Suárez, M., and Ting, A.Y. (2008). Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 929–943.
- Gambarotto, D., Zwettler, F.U., Guennec, M.L., Schmidt-Cernohorska, M., Fortun, D., Borgers, S., Heine, J., Schloetel, J.-G., Reuss, M., Unser, M., et al. (2019). Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat Methods* *16*, 71–74.

- Gao, W., Cho, E., Liu, Y., und Lu, Y. (2019). Advances and Challenges in Cell-Free Incorporation of Unnatural Amino Acids Into Proteins. *Front. Pharmacol.* *10*.
- Gong, Y.-H. (2009). Synthesis and physical chemistry of s-tetrazines: which ones are fluorescent and why? *Eur. J. Org. Chem.* *35*.
- Griffiths, G., und Lucocq, J.M. (2014). Antibodies for immunolabeling by light and electron microscopy: not for the faint hearted. *Histochem Cell Biol* *142*, 347–360.
- Grimm, J.B. (2015). A general Method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nat. Methods* *12*.
- Grunbeck, A., Huber, T., Abrol, R., Trzaskowski, B., Goddard, W.A., and Sakmar, T.P. (2012). Genetically Encoded Photo-cross-linkers Map the Binding Site of an Allosteric Drug on a G Protein-Coupled Receptor. *ACS Chem. Biol.* *7*, 967–972.
- Gustafsson, M.G. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* *198*.
- Hang, H.C., Yu, C., Kato, D.L., und Bertozzi, C.R. (2003). A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation. *PNAS* *100*, 14846–14851.
- Heilemann, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew. Chem. Int Ed.* *47*.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A., und Sauer, M. (2009). Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition* *48*, 6903–6908.
- Heim, R., Cubitt, A.B., und Tsien, R.Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* *373*, 663–664.
- Hell, S.W., und Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett., OL* *19*, 780–782.
- Herb, A., Burnashev, N., Werner, P., Sakmann, B., Wisden, W., und Seeburg, P.H. (1992). The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits. *Neuron* *8*, 775–785.
- Hoffmann, J.E. (2015). Highly stable trans-cyclooctene amino acids for live-cell labeling. *Chemistry* *21*.
- Holden, S., und Sage, D. (2016). Imaging: Super-resolution fight club. *Nature Photonics* *10*, 152–153.
- Inokuti, M., und Hirayama, F. (1965). Influence of Energy Transfer by the Exchange Mechanism on Donor Luminescence. *J. Chem. Phys.* *43*, 1978–1989.

- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* *96*, 23–28.
- Jabłoński, A. (1935). Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift Fur Physik* *94*, 38–46.
- Karver, M.R., Weissleder, R., und Hildebrand, S.A. (2011). Synthesis and evaluation of a series of 1,2,4,5-tetrazines for bioorthogonal conjugation. *Biocon. Chem.* *22*.
- Kavarnos, G.J. (1990). Fundamental concepts of photoinduced electron transfer. In *Photoinduced Electron Transfer I*, J. Mattay, ed. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 21–58.
- Knorr, G., Kozma, E., Schaart, J.M., Németh, K., Török, G., und Kele, P. (2018). Bioorthogonally Applicable Fluorogenic Cyanine-Tetrazines for No-Wash Super-Resolution Imaging. *Bioconjugate Chemistry*.
- Kormos, A. (2018). Bistetrazine-cyanines as double-clicking fluorogenic two-point binder or crosslinker probes. *Chem. Eur. J.* *24*.
- Kozma, E., Nikic, I., Varga, B.R., Aramburu, I.V., Kang, J.H., Fackler, O.T., Lemke, E.A., und Kele, P. (2016). Hydrophilic trans-Cyclooctenylated Non-Canonical Amino Acids for Fast Intracellular Protein Labeling. *ChemBioChem*.
- Kozma, E., Demeter, O., und Kele, P. (2017). Bio-orthogonal Fluorescent Labelling of Biopolymers through Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactions. *ChemBioChem* *18*, 486–501.
- Ku, T., Swaney, J., Park, J.-Y., Albanese, A., Murray, E., Cho, J.H., Park, Y.-G., Mangena, V., Chen, J., und Chung, K. (2016). Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues. *Nature Biotechnology* *34*, 973–981.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (New York: Springer).
- Lee, Y., Cho, W., Sung, J., Kim, E., und Park, S.B. (2018). Monochromophoric design strategy for tetrazine-based colorful bioorthogonal probes with a single fluorescent core skeleton. *J. Am. Chem. Soc.* *140*.
- Lemke, E.A. (2014). The Exploding Genetic Code. *ChemBioChem* *15*, 1691–1694.
- Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*.
- Li, J., Yin, Q., und Wu, H. (2013). Structural Basis of Signal Transduction in the TNF Receptor Superfamily. *Adv Immunol* *119*, 135–153.
- Lichtman, J.W., und Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. *Nat Methods* *2*, 910–919.
- van de Linde, S., Kasper, R., Heilemann, M., und Sauer, M. (2008). Photoswitching microscopy with standard fluorophores. *Applied Physics B* *93*, 725–731.

- van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., und Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols* *6*, 991–1009.
- Liu, C.C., und Schultz, P.G. (2010). Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annual Review of Biochemistry* *79*, 413–444.
- Locksley, R.M., Killeen, N., und Lenardos, J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*.
- Luca, G.M.R. (2013). Re-scan confocal microscopy: scanning twice for better resolution. *Biomed. Opt. Express* *4*.
- Lukinavičius, G., Reymond, L., D’Este, E., Masharina, A., Göttfert, F., Ta, H., Güther, A., Fournier, M., Rizzo, S., Waldmann, H., et al. (2014). Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods* *11*, 731–733.
- Meimetis, L.G., Carlson, J.C.T., Giedt, R.J., Kohler, R.H., und Weissleder, R. (2014). Ultrafluorogenic Coumarin-Tetrazine Probes for Real-Time Biological Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* *53*, 7531–7534.
- Miller, A.L., und Berment, W.M. (2009). Regulation of cytokinesis b Rho GTPase flux. *Nat. Cell Biol.* *11*.
- Mitchison, T., und Kirschner, M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* *312*.
- Mukai, T., Lajoie, M.J., Englert, M., und Söll, D. (2017). Rewriting the Genetic Code. *Annual Review of Microbiology* *71*, 557–577.
- Müller, C.B., und Enderlein, J. (2010). Image scanning microscopy. *Phys. Rev. Lett.* *104*.
- Neubert, F., Beliu, G., Terpitz, U., Werner, C., Geis, C., Sauer, M., und Doose, S. (2018). Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging. *Angew. Chem.* *130*, 16602–16607.
- Neuweiler, H., Doose, S., und Sauer, M. (2005). A microscopic view of mini-protein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* *102*.
- Nikic, I. (2016). Debugging eukaryotic genetic code expansion for site-specific click-PAINT super-resolution microscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* *55*.
- Nikic, I., Kang, J.H., Girona, G.E., Aramburu, I.V., und Lemke, E.A. (2015). Labeling proteins on live mammalian cells using click chemistry. *Nat. Protoc.* *10*.

- Nikić, I., Estrada Girona, G., Kang, J.H., Paci, G., Mikhaleva, S., Koehler, C., Shymanska, N.V., Ventura Santos, C., Spitz, D., und Lemke, E.A. (2016). Debugging Eukaryotic Genetic Code Expansion for Site-Specific Click-PAINT Super-Resolution Microscopy. *Angewandte Chemie International Edition* *55*, 16172–16176.
- Okhonin, Victor A. (1986). Method of investigating specimen microstructure. UdSSR Patentdatenbank SU 1374922.
- Oliveira, B.L., Guo, Z., und Bernardes, G.J.L. (2017). Inverse electron demand Diels–Alder reactions in chemical biology. *Chemical Society Reviews* *46*, 4895–4950.
- Parker, J. (2001). Amino Acid Substitution. In *Encyclopedia of Genetics*, S. Brenner, und J.H. Miller, eds. (New York: Academic Press), pp. 57–58.
- Plass, T., Milles, S., Koehler, C., Schultz, C., und Lemke, E.A. (2011). Genetically Encoded Copper-Free Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* *50*, 3878–3881.
- Prescher, J.A., und Bertozzi, C.R. (2005). Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* *1*.
- Rannversson, H., Andersen, J., Sørensen, L., Bang-Andersen, B., Park, M., Huber, T., Sakmar, T.P., und Strømgaard, K. (2016). Genetically encoded photocrosslinkers locate the high-affinity binding site of antidepressant drugs in the human serotonin transporter. *Nat Commun* *7*, 1–9.
- Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., und Ewers, H. (2012). A simple, versatile Method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat. Methods* *9*.
- Rodriguez, E.A., Campbell, R.E., Lin, J.Y., Lin, M.Z., Miyawaki, A., Palmer, A.E., Shu, X., Zhang, J., und Tsien, R.Y. (2017). The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* *42*, 111–129.
- Sakamoto, K., Hayashi, A., Sakamoto, A., Kiga, D., Nakayama, H., Soma, A., Kobayashi, T., Kitabatake, M., Takio, K., Saito, K., et al. (2002). Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* *30*, 4692–4699.
- Sauer, M., und Heilemann, M. (2017). Single-Molecule Localization Microscopy in Eukaryotes. *Chemical Reviews* *117*, 7478–7509.
- Sauer, M., Hofkens, J., und Enderlein, J. (2011). *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles* (Weinheim: Wiley-VCH).
- Schermelleh, L., Ferrand, A., Huser, T., Eggeling, C., Sauer, M., Biehlmaier, O., und Drummen, G.P.C. (2019). Super-resolution microscopy demystified. *Nature Cell Biology* *21*.
- Schwartz, T., Aloush, N., Goliand, I., Segal, I., Nachmias, D., Arbely, E., und Elia, N. (2017). Direct fluorescent-dye labeling of α -tubulin in mammalian cells for live cell and superresolution imaging. *Molecular Biology of the Cell* *28*, 2747–2756.

- Serfling, R., Seidel, L., Böttke, T., und Coin, I. (2018). Optimizing the Genetic Incorporation of Chemical Probes into GPCRs for Photo-crosslinking Mapping and Bioorthogonal Chemistry in Live Mammalian Cells. *JoVE* 57069.
- Sletten, E.M., und Bertozzi, C.R. (2009). Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 6974–6998.
- Specht, E.A., Braselmann, E., und Palmer, A.E. (2017). A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annual Review of Physiology* 79, 93–117.
- Stokes, G. (1852). On the Change of Refrangibility of Light (Royal Society of London).
- Strickler, S.J., und Berg, R.A. (1962). Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules. *J. Chem. Phys.* 37, 814–822.
- Teale, F.W.J., und Weber, G. (1957). Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochem J* 65, 476–482.
- Toomre, D., und Bewersdorf, J. (2010). A new wave of cellular imaging. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26.
- Toseland, C.P. (2013). Fluorescent labeling and modification of proteins. *J Chem Biol* 6, 85–95.
- Troll, T. h. (1982). Reduction potentially of substituted as-triazines and s-tetrazines in acetonitrile. *Electrochim. Acta* 27.
- Uttamapinant, C., Howe, J.D., Lang, K., Beránek, V., Davis, L., Mahesh, M., Barry, N.P., und Chin, J.W. (2015). Genetic Code Expansion Enables Live-Cell and Super-Resolution Imaging of Site-Specifically Labeled Cellular Proteins. *Journal of the American Chemical Society* 137, 4602–4605.
- Vaiana, A.C., Neuweiler, H., Schulz, A., Wolfrum, J., Sauer, M., und Smith, J.C. (2003). Fluorescence Quenching of Dyes by Tryptophan: Interactions at Atomic Detail from Combination of Experiment and Computer Simulation. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14564–14572.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., und Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45–65.
- Walsh, C. (2006). Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory, Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers.
- Watkins, J.C., und Jane, D.E. (2006). The glutamate story. *British Journal of Pharmacology* 147, S100–S108.

Widengren, J., und Schwille, P. (2000). Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* *104*.

Wolter, S. (2012). rapidSTORM: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nat. Methods* *9*.

Xie, J., und Schultz, P.G. (2005). Adding amino acids to the genetic repertoire. *Current Opinion in Chemical Biology* *9*, 548–554.

Zhang, M., Li, M., Zhang, W., Han, Y., und Zhang, Y.-H. (2019). Simple and efficient delivery of cell-impermeable organic fluorescent probes into live cells for live-cell super-resolution imaging. *Light: Science & Applications* *21*.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celcius
µl	-	Mikroliter
AA	-	Aminosäure (engl. amino acid)
AaRS	-	Aminoacyl-tRNA Synthetase
Abb	-	Abbildung
AK	-	Antikörper
Amp	-	Ampicillin
AMPA	-	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxzole-propionic-acid
bp	-	Basenpaare
BiFC	-	bimolecular fluorescence complementation (engl.)
BSA	-	Bovines Serumalbumin
ca.	-	circa
CB	-	Cytoskeleton buffer (engl.)
CPP	-	cell-penetrating peptide (engl.)
CTD	-	C-Terminale Domäne
ddH ₂ O	-	Reinstwasser
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Deoxyribonucleic acid (engl.)
DNS	-	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOL	-	Degree of labeling (engl.)
dsDNA	-	doppelsträngige DNA
dSTORM	-	<i>direct</i> stochastic optical reconstruction microscopy
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	-	(enhanced) green fluorescent protein
EMCCD	-	Electron multiplying charge-coupled device
EMTB	-	Ensconsin microtubule-binding domain (engl.)
EPI	-	Weitfeld-Beleuchtung

7 Abkürzungsverzeichnis

EtOH	-	Ethanol
ExM	-	Expansionsmikroskopie
FA	-	Formaldehyd
FCS	-	Fluorescence correlation spectroscopy (engl.)
FP	-	Fluoreszierendes Protein
FRAP	-	Fluorescence Recovery after Photobleaching (engl.)
FRET	-	Förster Resonanz Energie Transfer
FWHM	-	Halbwertsbreite (engl. full-width half maximum)
GA	-	Glutaraldehyd
HBSS	-	Hank's Balanced Salt Solution (engl.)
HEPES	-	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure
HILO	-	Highly inclined and laminated optical sheet (engl.)
HMSiR	-	(HydroxyMethyl) Silizium-Rhodamin
IgG	-	Immunglobulin G
Kan	-	Kanamycin
kDa	-	Kilodalton
LSM	-	Laser-Scanning Microscopy (engl.)
LTP	-	long-term potentiation (engl.)
MEA	-	β -Mercaptoethylamin
MeOH	-	Methanol
mM	-	milli-Molar
mRNA	-	messenger Ribonucleic acid (engl.)
NaCl	-	Natriumchlorid
NMDA	-	N-Methyl-D-Aspartat
NR	-	NMDA-Rezeptor
NTD	-	N-Terminale Domäne
PA-FP	-	Photoaktivierbares fluoreszierendes Protein
PALM	-	Photoactivatable localization microscopy (engl.)
PBS	-	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	-	Proteindatenbank

7 Abkürzungsverzeichnis

PDL	-	Poly-D-Lysin
PET	-	Photoinduzierter Elektronen Transfer
PSF	-	Punktspreizfunktion
PV	-	Peptidvehikel
PylRS	-	pyrrolysyl-tRNA Synthetase
RCM	-	Rescan Confocal Microscopy (engl.)
RT	-	Raumtemperatur
SIM	-	Structured Illumination Microscopy (engl.)
SMLM	-	Single molecule localization microscopy
SPAAC	-	Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition
SPIEDAC	-	Strain-promoted inverse-electron-demand Diels-Alder Cycloaddition (engl.)
STED	-	Stimulated Emission Depletion (engl.)
TCO*-Lys	-	Trans-Cyclooct-2-en-L-Lysin
TCSPC	-	time-correlated single photon counting (engl.)
TIRF	-	Total internal reflection fluorescence microscopy (engl.)
TMD	-	Transmembran-Domäne
TMR	-	Tetramethylrhodamin
tRNA	-	transfer RNA
Tween-20	-	Polyoxyethylen-20-Sorbitan-Monolaurat
U	-	Unit
uAA	-	unnatürliche Aminosäure
UV	-	Ultraviolett
λ_{Abs}	-	Absorptions-Wellenlänge
λ_{Em}	-	Emissions-Wellenlänge
τ	-	Fluoreszenzlebensdauer

Anhang

A | Chemische Synthese von Docetaxel-TCO

Alle Synthese- und Aufreinigungsschritte wurden im Labor von Prof. Jürgen Seibel (Institut für Organische Chemie, Universität Würzburg) in Zusammenarbeit mit Natalia Wolf durchgeführt.

Sämtliche chemischen Reagenzien für die Synthese wurden von kommerziellen Lieferanten bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet:

Docetaxel (TCI, Eschborn, Deutschland, CAS: 114977-28-5); (E)-Cyclooct-4-en p-Nitrophenol-Aktivester (SiChem, Bremen, Deutschland, CAS: 1438415-89-4); 6-Aminohexansäure (Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland, CAS: 60-32-2). Dimethylformamid und Triethylamin wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden bei 295 K auf einer Bruker Avance III HD 400 (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz) und Bruker Avance III HD 600 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen werden in Teilen pro Million (ppm) in Bezug auf die Lösemittelrestsignale von CD_3OD (MeOD-d_4) = 3,31 ppm für ^1H und (MeOD-d_4) = 49,00 für ^{13}C) angegeben. Die Kopplungskonstanten (J) werden in Hz angegeben und zeigen die Protonen-Spin-Spin-Kopplungen an. Die Multiplizität wird wie folgt abgekürzt: s = Singulett; d = Dublett; t = Triplett; q = Quartett; m = Multiplett; dd = Dublett von Dublett; dt = Dublett von Triplett; br s = Breitbein, br d = Breitdublett; br t = Breittriplett etc. Die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) von synthetisierten Verbindungen wurde mit Bruker Daltonics micrOTOF-Q III mit Elektrospray-Ionisation (ESI) bestätigt. Die Reinigung der Flüssigkeitschromatographie wurde mit dem Kieselgel 60 (0,04 - 0,063 mm) durchgeführt, welches von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) gekauft wurde.

Synthetisches Verfahren und Charakterisierung

Die Synthese von Docetaxel-TCO (**6**) erfolgte in drei Schritten (Abbildung 51). Docetaxel (**1**) wurde mit Ameisensäure entschützt, um Zwischenprodukt **2** zu erhalten (nach Lukinavičius et al., 2014). Die Reaktion von 6-Aminohexansäure (**3**) und (E)-Cyclooct-4-en p-Nitrophenol-Aktivester (**4**) im DMF/H₂O-Gemisch über Nacht führte zu (E)-Cyclooct-4-en-1-yl-N-hexansäurecarbammat (**5**). Die anschließende Amidkoppelung zwischen den Zwischenprodukten **2** und **5** erzeugte das Endprodukt Docetaxel-TCO **6**.

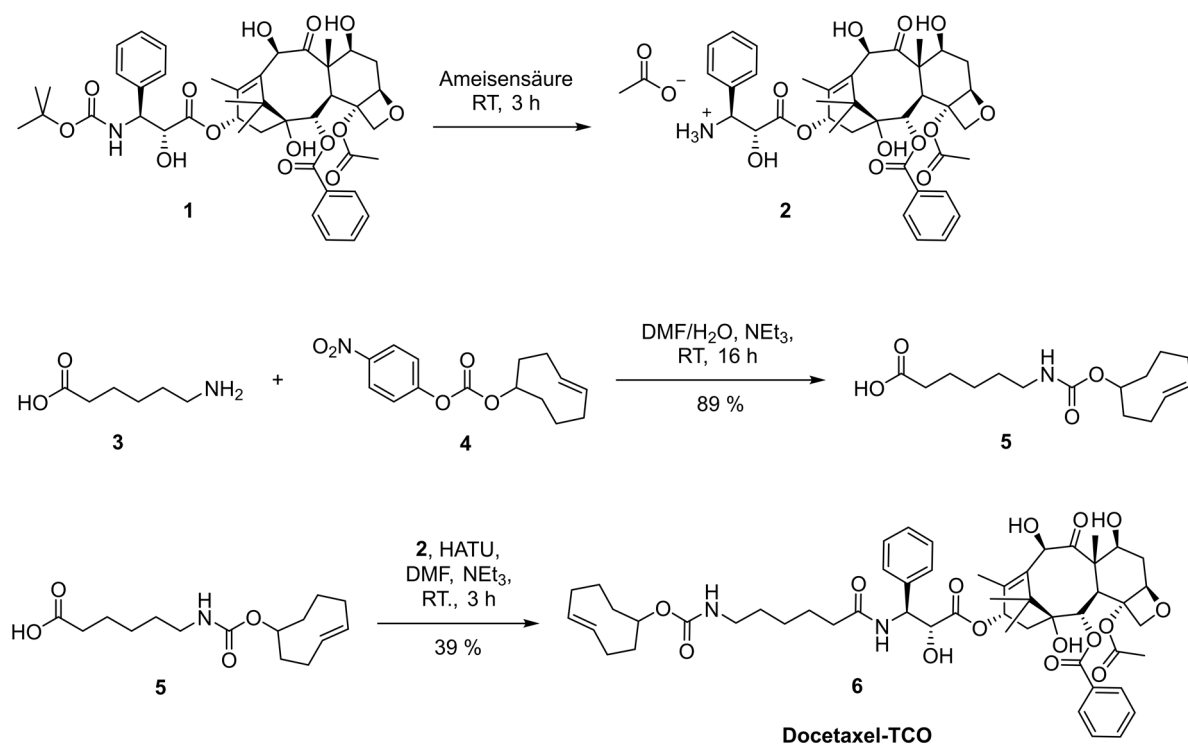


Abbildung 51 - Chemische Synthese von Docetaxel-TCO. Mit Erlaubnis entnommen aus (Beliu et al., 2019).

3'-Aminodocetaxel (**2**)

In einem 5 mL Kolben wurde Docetaxel (**1**) (100 mg, 124 μ mol, 1 Äqu.) in 0,5 mL Ameisensäure gelöst und 3 h lang bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck bis zur Trockenheit verdampft und das erhaltene Salz **2** im nächsten Schritt ohne weitere Reinigung verwendet.

(E)-Cyclooct-4-en-1-yl-N-hexansäurecarbammat (**5**). In einem 5-mL-Kolben wurde 6-Aminohexansäure (**3**) (25,0 mg, 191 μ mol, 1 eq.) in 0,5 mL DMF suspendiert und

0,1 mL H₂O und 132 μ L NEt₃ (953 μ mol, 5 eq.) hinzugefügt. Nach 5 minütigem Rühren wurde (E)-Cyclooct-4-en p-Nitrophenol wurde der aktive Ester (**4**) (55,5 mg, 191 μ mol, 1 eq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht gerührt. Die klargelbe Lösung wurde mit 50 mL AcOEt und 10 mL 1M NH₄Cl verdünnt. Die wässrige Phase wurde getrennt und die organische Phase einmal mit 10 mL Sole gewaschen. Die organische Schicht wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie mit einem Gradienten gereinigt: CHCl₃ \rightarrow CHCl₃:MeOH = 25:1. Das TCO-Carbamat **5** wurde als farbloses Öl (48 mg, 89 %) gewonnen.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): = 5.72–5.64 (m, 1H), 5.59–5.50 (m, 1H), 4.83–4.79 (m, 1H), 3.10 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.42–2.21 (m, 6H), 1.89–1.23 (m, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, MeOD-*d*₄): = 177.7, 158.9, 136.5, 132.7, 71.4, 42.1, 41.7, 35.4, 35.0, 33.9, 31.0, 30.8, 29.1, 27.6, 25.9.

HRMS (ESI): *m/z* kalk. für C₁₅H₂₅NNaO₄⁺ [M+Na]⁺: 306.1676; gefunden: 306.1683 (Δ = 2.4 ppm).

Docetaxel-TCO (**6**)

Einer Lösung von TCO-Carbamat **5** (30,0 mg, 106 μ mol, 1 Äqu.) in 0,5 mL trockenem DMF wurden nacheinander HATU (44,3 mg, 117 μ mol, 1,1 Äqu.) und NEt₃ (74 μ L, 5 Äquiv.) zugesetzt. Nach 10 minütigem Rühren bei RT wurde 3'-Aminodocetaxelformiatsalz **2** (93,5 mg, 122 μ mol, 1,15 eq.) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 3 h weitergerührt. Nach vollständigem Verbrauch von TCO-Carbamat **5** wurde das Reaktionsgemisch mit 50 mL AcOEt und 10 mL 1M NH₄Cl verdünnt. Die wässrige Phase wurde getrennt und die organische Phase einmal mit 10 mL Sole gewaschen. Die organische Schicht wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde zweimal mittels Säulenchromatographie mit einem Gradienten gereinigt: (CHCl₃:MeOH = 25:0.25 \rightarrow CHCl₃:MeOH = 25:1). Das Docetaxel-TCO (**6**) wurde als farbloser Feststoff (40,2 mg, 39 %) erhalten.

¹H NMR (400 MHz, MeOD-*d*₄): = 8.12–8.11 (m, 1H), 8.11–8.10 (m, 1H), 7.68–7.64 (m, 1H), 7.58–7.54 (m, 2H), 7.44–7.37 (m, 4H), 7.30–7.25 (m, 1H), 6.16 (t, *J* = 9.1 Hz,

1H), 5.70–5.45 (m, 4H), 5.27 (s, 1H), 4.99 (dd, $J = 9.0, 0.7$ Hz, 1H), 4.81–4.77 (m, 1H), 4.58 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 4.24–4.17 (m, 3H), 3.87 (d, $J = 7.2$), 3.05 (br t, $J = 6.9, 2$ H), 2.44 (ddd, $J = 14.4, 9.7, 6.5$ Hz, 1H), 2.39–2.14 (m, 10H), 2.10–1.98 (m, 2H), 1.90 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 1.87–1.80 (m, 2H), 1.76–1.59 (m, 7H), 1.57–1.28 (m, 6H), 1.19 (s, 3H), 1.13 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, MeOD- d_4): = 211.1, 175.9, 174.4, 171.8, 167.7, 158.7, 158.6, 140.1, 139.2, 138.0, 136.3, 134.5, 132.5, 131.4, 131.2, 129.7, 129.7, 128.9, 128.4, 85.9, 82.3, 79.1, 77.6, 76.4, 75.6, 74.8, 72.7, 72.5, 71.2, 58.9, 56.8, 47.8, 44.5, 42.0, 41.5, 37.5, 36.9, 36.8, 35.3, 35.2, 33.7, 30.9, 30.7, 29.0, 27.4, 27.1, 26.7, 26.6, 26.0, 23.2, 21.7, 14.4, 10.5.

HRMS (ESI): m/z kalk. für $\text{C}_{53}\text{H}_{69}\text{N}_2\text{O}_{15}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 973.46925; gefunden: 973.46794 ($\Delta = 1.34$ ppm).

B | Aminosäuren

Tabelle 11 - Ein- bzw. Drei-Buchstabencode der natürlichen Aminosäuren

1 Buchstabe	3 Buchstaben	Aminosäure
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin
U	Sec	Selenocystein
O	Pyl	Pyrrolysin

C | Primerlisten

Tabelle 12 - Liste der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese der NMDA-Rezeptor-Untereinheit NR1.

Bezeichnung	Sequenz
forward-K275TAG	5'- GCTCATCAATGGCTAGAATGAGTCAGCCC - 3'
reverse- K275TAG	5'- GGGCTGACTCATTCTAGCCATTGATGAGC - 3'
forward-K298TAG	5'- GTTCACGAACTCCTAGAGTAGGAGAATATCACTGACC - 3'
reverse- K298TAG	5'- GGTCAGTGATATTCTCCTACTCTAGGAGTTCGTGAAC - 3'
forward-K378TAG	5'- CCCAAATGACAGGTAGATCATCTGGCCAGG - 3'
reverse- K378TAG	5'- CCTGGCCAGATGATCTACCTGTCATTTGGG - 3'
forward-K388TAG	5'- GGAGAGACAGAGTAGCCTCGAGGATACCAGATG - 3'
reverse- K388TAG	5'- CATCTGGTATCCTCGAGGCTACTCTGTCTCTCC - 3'
forward-Y392TAG	5'- GAGAAACCTCGAGGATAGCAGATGTCCACCAG - 3'
reverse- Y392TAG	5'- CTGGTGGACATCTGCTATCCTCGAGGTTTCTC - 3'
forward-S395TAG	5'- CCTCGAGGATACCAGATGTAGACCAGACTAAAGATAG - 3'
reverse- S395TAG	5'- CTATCTTTAGTCTGGTCTACATCTGGTATCCTCGAGG - 3'
forward-K421TAG	5'- GAGTGATGGGACATGCTAGGAGGAGTTCACAGTCAATGG - 3'
reverse- K421TAG	5'- CCATTGACTGTGAACTCCTCCTAGCATGTCCCATCACTC - 3'

Tabelle 13 - Liste der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese der Kainat-Rezeptor-Untereinheit GluK2.

Bezeichnung	Sequenz
forward-S47TAG	5'- GTATATTTGAATATGTGGAATAGGGCCCCATGGGAGCAG - 3'
reverse- S47TAG	5'- CTGCTCCCATGGGGCCCTATTCCACATATTCAAATATAC - 3'
forward-S272TAG	5'- GAGCCCTACAGATACTAGGGCGTAAATATGACAGG - 3'
reverse- S272TAG	5'- CCTGTCATATTTACGCCCTAGTATCTGTAGGGCTC - 3'
forward-K306TAG	5'- GTTACAGGCGCCTCCTAGACCTGACTCAGGTTTG - 3'
reverse- K306TAG	5'- CAAACCTGAGTCAGGTCTAGGAGGCGCCTGTAAC - 3'
forward-S309TAG	5'- CCTCCAAAACCTGACTAGGGTTTGCTGGATGGATTTATG - 3'
reverse- S309TAG	5'- CATAAATCCATCCAGCAAACCCCTAGTCAGGTTTTGGAGG - 3'
forward-S343TAG	5'- CCAGATGACAGTCTAGTCCTTGCAATGCAATCGAC - 3'
reverse- S343TAG	5'- GTCGATTGCATTGCAAGGACTAGACTGTCATCTGG - 3'

Tabbelle 14 - Liste der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese der TNF-Rezeptor-Untereinheit TNFR1.

Bezeichnung	Sequenz
forward-S42TAG	5'- GGGAGAAGAGAGATTAGGTGTGTCCCAAGG - 3'
reverse- S42TAG	5'- CCTTGGGGACACACCTAATCTCTCTTCTCCC - 3'
forward-Q77TAG	5'- CCAGGCCCGGGGTAGGATACGGAC - 3'
reverse- Q77TAG	5'- GTCCGTATCCTACCCCGGGCCTGG - 3'
forward-R121TAG	5'- CTTGCACAGTGGACTAGGACACCGTGTGTG - 3'
reverse- R121TAG	5'- CACACACGGTGTCTAGTCCACTGTGCAAG - 3'
forward-S137TAG	5'- GTACCGGCATTATTGGTAGGAAAACCTTTCCAGTGC - 3'
reverse- S137TAG	5'- GCACTGGAAAAGTTTTCTACCAATAATGCCGGTAC - 3'
forward-K161TAG	5'- CTGCCAGGAGTAGCAGAACACCGTGTGC - 3'
reverse- K161TAG	5'- GCACACGGTGTCTGCTACTCCTGGCAG - 3'

Tabelle 15 - Liste der verwendeten Primer für die ortsspezifische Mutagenese der Mikrotubuli-bindenden-Proteins EMTB-3xGFP.

Bezeichnung	Sequenz
forward-A21TAG	5'- CAAGATAAGAAAAATTAGTCCAGCCGCCCTGCCTC - 3'
reverse- A21TAG	5'- GAGGCAGGGCGGCTGGACTAATTTTTCTTATCTTG - 3'
forward-S23TAG	5'- GAAAAATGCCTCCTAGCGCCCTGCCTCTG - 3'
reverse- S23TAG	5'- CAGAGGCAGGGCGCTAGGAGGCATTTTTTC - 3'
forward-K65TAG	5'- GAGGAACGGGAGTAGCAGCTAGCTGCAAG - 3'
reverse- K65TAG	5'- CTTGCAGCTAGCTGCTACTCCCGTTCCTC - 3'
forward-K87TAG	5'- CAGCACTACGAGTAGCACCTGGAAGAGCG - 3'
reverse- K87TAG	5'- CGCTCTTCCAGGTGCTACTCGTAGTGCTG - 3'
forward-K102TAG	5'- GAGCAGAGGCAGTAGGAGGAGCGGAG - 3'
reverse- K102TAG	5'- CTCCGCTCCTCCTACTGCCTCTGCTC - 3'
forward-K122TAG	5'- GAGGAGGACTAGGAACGCCACGAAGCTG - 3'
reverse- K122TAG	5'- CAGCTTCGTGGCGTTCCTAGTCCTCCTC - 3'
forward-S182TAG	5'- GTTGATCCCGTCATTTAGAAGCGGCTCTCCTC - 3'
reverse- S182TAG	5'- GAGGAGAGCCGCTTCTAAATGACGGGATCAAC - 3'
forward-K259TAG	5'- CGATGGATCGACCATAGCTCTTTGTAACACCACC - 3'
reverse- K259TAG	5'- GGTGGTGTACAAAGAGCTATGGTCGATCCATCG - 3'

Publikationsliste

Manuskript 1 – Neubert, Franziska*, **Gerti Beliu***, Ulrich Terpitz, Christian Werner, Christian Geis, Markus Sauer und Sören Doose. “Bioorthogonal Click Chemistry Enables Site-specific Fluorescence Labeling of Functional NMDA Receptors for Super-Resolution Imaging.” *Angewandte Chemie* 57 50 (2018): 16364-16369.

***Geteilte Erst-Autorenschaft (engl. shared-first author)**

Manuskript 2 – **Gerti Beliu**, Andreas Kurz, Alexander Kuhlemann, Lisa Behringer-Pliess, Mara Meub, Natalia Wolf, Jürgen Seibel, Zhen-Dan Shi, Martin J. Schnermann, Jonathan Grimm, Luke Lavis, Sören Doose und Markus Sauer. “Bioorthogonal labeling with tetrazine-dyes for super-resolution microscopy.” *Communications Biology* 2 (2019): 1-13.

Manuskript 3 - Steffen Altrichter*, **Gerti Beliu***, Ramon Guixà-González*, Mareike Hemberger, Ina Brauer, Nicole Scholz, Alexander Kuhlemann, Guillermo Pérez-Hernández³, Peter Hildebrand, Markus Sauer, Tobias Langenhan. “The tethered agonist of adhesion GPCRs is exposed in the intact GAIN domain and receptor heterodimer.”

***Geteilte Erst-Autorenschaft (engl. shared-first author)**

Unter Begutachtung (engl. under review)

Manuskript 4 – **Gerti Beliu** und Markus Sauer “A Trojan horse for live-cell super-resolution microscopy”. Light: Science & Applications (akzeptiert).

Manuskript 5 – Andrea Schulze, **Gerti Beliu**, Dominic A. Helmerich, Jonathan J. Schubert, Laurence H. Pearl, Chrisostomos Prodromou und Hannes Neuweiler. “Cooperation of local motions in the Hsp90 molecular chaperone ATPase mechanism.” *Nature chemical biology* (2016).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Sauer, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik anzufertigen. Dein ansteckender Enthusiasmus, deine immerwährende Unterstützung sowie dein offenes Ohr zeichnen Dich als Mentor aus und ich bin dankbar für die gemeinsame Zeit.

Auch möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Thomas Müller für seine Unterstützung, freundliche Hilfe und wertvollen Rat bedanken.

Zudem möchte ich mich bei allen Kollaborationspartnern bedanken, mit denen ich zusammenarbeiten durfte:

Prof. Dr. Edward Lemke danke ich für die Einführung in das Feld der unnatürlichen Aminosäuren und für die wertvolle Unterstützung zu Beginn der Promotion.

Prof. Dr. Tobias Langenhan gilt mein besonderer Dank für seine freundliche Zusammenarbeit sowie wertvollen Diskussionen und Ratschläge.

Prof. Dr. Daniel Choquet möchte ich für seine freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit sowie der Möglichkeit des Besuches am IINS (Bordeaux) danken.

Bei Dr. Sören Doose möchte ich mich herzlich für die vielen Gespräche und Diskussionen sowie seine wertvolle Zusammenarbeit und Unterstützung in allen Teilprojekten bedanken.

Dr. Hannes Neuweiler möchte ich für seine außerordentlich wertvolle Betreuung und Ausbildung während meiner Studienzeit danken. Seine stete Unterstützung und sein offenes Ohr von der Zeit als Bachelor-Student bis zum heutigen Tage legte den Grundstein für meine wissenschaftliche Entwicklung.

Dr. Ulrich Terpitz möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Durchführung der elektrophysiologischen Messungen im Rahmen des NMDA-Projekts danken.

Danksagung

Prof. Dr. Jürgen Seibel möchte ich für die chemische Synthese sowie fachliche Unterstützung danken. Ebenfalls danke ich herzlich bei Natalia Wolf für ihre wertvolle Zusammenarbeit und vielen Diskussionen.

Franziska Neubert möchte ich für die erfolgreiche und freundliche Zusammenarbeit im Rahmen des NMDA-Projekts danken.

Dr. Teresa Klein möchte ich für die freundschaftlichen & wertvollen Gespräche danken.

Andreas Kurz möchte ich herzlich für seine freundschaftliche Unterstützung danken. Seine Bereitschaft immer eine Lösung für physikalische Probleme zu finden und seine Arbeiten in der Etablierung der RCM waren wichtiger Bestandteil bei der Charakterisierung vieler Farbstoffe.

Alexander Kuhlemann möchte ich herzlich für seine Unterstützung und Bereitschaft Teil der spannenden Projekte mit unnatürlichen Aminosäuren zu sein danken. Durch seine Mitarbeit wurde vielen Projekten eine neue Dynamik verliehen.

Dr. Alexander Zilles und der Firma ATTO-TEC GmbH möchte ich herzlich für die Möglichkeit der Nutzung der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Tetrazin-Farbstoffe danken.

Im Laufe der Jahre wurden aus vielen Kollegen auch sehr gute Freunde. An dieser Stelle möchte ich mich zusätzlich herzlich bei Suhaila Rajab, Jonathan Schubert und Dominic Helmerich bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei Julia Heiby für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit und Gespräche bedanken. Die Zusammenarbeit mit euch ist stets spannend und witzig gewesen.

Mein Dank gilt auch Fabian Zwettler, der durch seine freundschaftliche Art meine ganze Promotion begleitet hat. Gemeinsam mit Andreas Kurz möchte Ich euch beiden herzlich für die gemeinsamen Gespräche, Momente und eure Freundschaft danken.

Zudem möchte ich mich bei meinen Kollegen Andrea Schulze, Sina Wäldchen, Felix Wäldchen, Marvin Jungblut, Jan Schlegel, Nora Trinks, Mara Meub, Julian Lehmann, Patrick Eiring, Sebastian Letschert, Sebastian Reinhard und Christian Werner für die vielen Gespräche im Rahmen der Seminartermine, Kaffeepausen oder Skiseminare bedanken.

Danksagung

Weiter möchte ich mich bei den Technischen Angestellten bedanken. Petra Geßner gilt besonderer Dank für ihre stets kompetente und freundschaftliche Hilfe in allen biologischen Belangen. Lisa Behringer-Pließ möchte ich für die gute Zusammenarbeit und ihr Fachwissen danken. Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Astrid Thal für ihre stets hilfsbereite und unkomplizierte Art bürokratische Hürden zu meistern bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinen wundervollen Eltern Artur und Greta und meiner Schwester Sendi danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Verlobten Laura bedanken. Danke, dass Du immer für mich da bist und mich in allen Lebenslagen unterstützt.

Dank Euch weiß ich immer, wo mein Zuhause ist. Ich weiß mein Glück wirklich zu schätzen.

Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Bioorthogonale Tetrazin-Farbstoffe für die Lebendzell-Markierung und hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Bioorthogonal tetrazine-dyes for live-cell labeling and super-resolution fluorescence microscopy” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides, I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Würzburg, den _____

_____ Gerti Beliu

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gerti Beliu
Geburtstag: 26.07.1990
Geburtsort: Tirana (Albanien)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1997 - 2001 Eichenrain-Grundschule Lindach
2001 - 2010 Hans-Baldung-Gymnasium Schw. Gmünd
Juni 2010 Abitur

Hochschulausbildung

2013 - 2015 Studium Biologie B.Sc.
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
(Untersuchungen zur Dynamik der N-terminalen Domäne des molekularen Chaperons Hsp90)
Betreuer: Dr. Hannes Neuweiler

2013 - 2015 Studium Biologie M.Sc.
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
(Untersuchungen zur Dynamik der ATP-Bindungsdomäne des Chaperons Hsp90 mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie)
Betreuer: Dr. Hannes Neuweiler

Seit 2015 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Markus Sauer
Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik
Universität Würzburg

Würzburg, den _____

Gerti Beliu