

**Untersuchung einer Methode zur
spezifischen Fluoreszenz – Markierung
von Signalproteinen und deren Beobachtung in
lebenden *Escherichia coli***
(Einzelmolekültechnik & Perspektiven)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Exzellenzcluster CellNetworks und Physikalisch-Chemisches Institut
Einzelmolekülspektroskopie
Universität Heidelberg

Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft
Fachgebiet Biochemie der Ernährung
Universität Hohenheim

vorgelegt von
Tanja Margret Ehrhard

aus Heidelberg
2016

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Dirk-Peter Herten
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Lutz Graeve
Eingereicht am:	02. Juni 2016
Mündliche Prüfung am:	04. August 2016

Die vorliegende Arbeit wurde am 25. Juli 2016 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Meiner Familie gewidmet.

Zusammenfassung

Schlagwörter: BG-Farbstoffe, Chemotaxis, Fluoreszenzmarkierung, SNAP-tag, TIRF-Mikroskopie

Störungen in der Signaltransduktion sind häufig die Ursache für Erkrankungen wie Krebs und Stoffwechselstörungen. Ein detailliertes Verständnis der relevanten Mechanismen der Signalübermittlung ist daher eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Therapien und die Herstellung von Medikamenten. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt einzelne Signalproteine und deren Interaktionen in der lebenden Zelle zu beobachten, im Gegensatz zu molekularbiologischen Nachweisverfahren, welche auf Ensemblemittelwerten beruhen. Als Modellsystem für die Signaltransduktion wurde die bakterielle Chemotaxis mit seinem Regulatorprotein CheY ausgewählt. Die Untersuchungen wurden mit der Internen Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) durchgeführt, welche eine fluoreszente Markierung der zu untersuchenden Moleküle erfordert. Um eine spezifische und hintergrundreduzierte Markierung zu gewährleisten, werden helle und photostabile fluoreszente ‚Tags‘ benötigt. In dieser Arbeit wurde das SNAP-tag System benutzt, das den Einsatz unterschiedlicher Farbstoffe erlaubt. Ein Vorteil dieses Systems ist die Verwendung von fluoreszenzgelöschten Benzylguanin (BG)-Farbstoffen, die erst nach erfolgter Markierung eine starke Fluoreszenz zeigen. Für die Entwicklung der Markierungsmethode wurden zunächst in Vorexperimenten die Farbstoffe Atto 620, Atto 633, Atto 655 und Atto 680 eingehend auf ihre Fluorogenität, ihre Photostabilität und ihr Blinkverhalten hin analysiert. Die fundierte Kenntnis dieser Eigenschaften ist essentiell für die korrekte Interpretation der aus biologischen Experimenten gewonnenen Ergebnissen. Ideal für das Verfahren sind Farbstoffe, die ein hohes Fluoreszenzsignal besitzen, über eine lange Beobachtungszeit stabil sind und nicht mit der Funktion des Zielmoleküls interferieren. Die Voruntersuchungen haben gezeigt, dass Atto 633 unter den getesteten Farbstoffen die besten photophysikalischen Eigenschaften für die Markierung mit dem SNAP-tag System besitzt und zudem die beste Zellgängigkeit aufweist. Es ist damit möglich, einzelne Moleküle unter kontinuierlicher Laseranregung über mehrere Sekunden zu beobachten. Darüber hinaus konnte die Markierungseffizienz in gewissen Grenzen durch die Proteinexpression, die Farbstoffkonzentration und die Inkubationszeit des Farbstoffs kontrolliert werden. Eine geringe Markierungseffizienz ist für die Einzelmolekül-Detektion von Vorteil, da eine zu hohe Dichte an fluoreszent markierten Molekülen die Identifikation einzelner Moleküle erschwert.

Anschließend wurde ein Färbeprotokoll etabliert, welches eine spezifische, hintergrundreduzierte Fluoreszenz-Markierung einzelner CheY-Proteine in lebenden *E. coli*

Zellen erlaubt, ohne dass die Funktionsfähigkeit des Proteins beeinträchtigt wird. Echtzeit-Aufnahmen mit einer Zeitauflösung von 30 ms zeigten, dass es möglich ist, einzelne CheY-Moleküle bei der Bindung an einen Interaktionspartner als fluoreszenten Punkt zu beobachten. Aus den Fluoreszenzintensitätsspuren konnten die Bindungszustände mittels numerischer Verfahren als An- und Auszeiten extrahiert werden und deren Wahrscheinlichkeitsverteilung bestimmt werden. Aus diesen quantitativen Untersuchungen zur Bindungskinetik von CheY konnten Hinweise auf spezifische Proteininteraktionen beobachtet, jedoch keine detaillierte Auskunft über Bindungszeiten gegeben werden. Die Ursache hierfür könnten unterschiedliche Wechselwirkungen des Proteins, sowohl spezifischer als auch unspezifischer Art, sein. So wäre eine weitere wichtige Entwicklung dieses Markierungssystems, die Möglichkeit zur gleichzeitigen Färbung von zwei oder mehreren Proteinen mit spektroskopisch unterscheidbaren fluoreszierenden ‚Tags‘ (z.B. dem CLIP-tag), um Kollokalisationsexperimente mit alternierender Laseranregung durchzuführen. Eine weitere Ursache kann man in der Natur des verwendeten Farbstoffes selbst suchen. Laser- und temperaturabhängige Untersuchungen könnten weiteren Aufschluss über das Verhalten der Farbstoffe geben. Somit liefert das beschriebene Fluoreszenz-Markierungsverfahren einen neuen Ansatz für quantitative Untersuchungen von Proteininteraktionen in lebenden Zellen.

Abstract

Keywords: BG-dyes, chemotaxis, fluorescence, labeling, SNAP-tag, TIRF-microscopy

Malfunctions in signal transduction often cause diseases such as cancer and metabolic disorders. A thorough understanding of the relevant mechanisms of signal transduction is therefore an important requirement for the development of therapies and pharmaceuticals. In this thesis, a method was developed, which allows the observation of individual signaling proteins and their interactions in living cells. Therefore this method has advantages compared to molecular detection methods which are based on ensemble averages. As a model system for signal transduction, the bacterial chemotaxis with its regulator protein CheY was selected. The experimental studies were carried out with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM), which requires a fluorescent labeling of the examined molecules. To ensure a specific and background reduced labeling, bright and photostable fluorescent 'tags' are needed. In this work, the SNAP-tag system was used, which allows the use of different dyes. An advantage of this system is the possibility of using fluorescence-quenched benzyl guanine (BG)-dyes, which show a strong fluorescence only after binding to SNAP-tag. For development of the labeling method, the dyes Atto 620, Atto 633, Atto 655 and Atto 680 were analyzed in preliminary experiments regarding their fluorescence, photostability and blinking behavior. The thorough knowledge of these properties is essential for the correct interpretation of the experimental results. Dyes which are ideal for the method have a high fluorescent signal over a long observation time, and they are stable and do not interfere with the function of the target molecule. The preliminary investigations have shown that among the dyes tested, Atto 633 had the best photophysical properties for labeling with the SNAP-tag system and also the best cell permeability. This allows, under continuous laser excitation, to observe individual molecules for several seconds. In addition, the labeling efficiency was controlled by the protein expression, the dye concentration, and the incubation time of the dye. For single-molecule detection, a low labeling efficiency is of advantage since too high density of fluorescently labeled molecules makes the identification of individual molecules difficult.

Subsequently, a labeling protocol was established which allows a specific, background-reduced fluorescence labeling of individual CheY proteins in living *E. coli* cells, without impairment of the protein's functionality. Real-time detection with a time resolution of 30 milliseconds showed that it is possible to observe individual CheY molecules as a fluorescent point during the state of binding to an interaction partner. By means of numerical methods, the state of binding can be extracted from the fluorescence

intensity traces as on/ off and their probability distribution can be determined. These quantitative studies gave indications on specific protein interactions, but no detailed information on binding times could be found. Different interactions of the protein, both specific and non-specific nature, could be the reason. Therefore, another important development of this labeling system would be the opportunity of simultaneous staining of two or more proteins with spectroscopically distinguishable fluorescent tags (e.g. CLIP-tag) to perform colocalization with alternating laser excitation. Another cause might be found in the nature of the dye itself. Laser- and temperature-dependent studies could provide further information concerning the behavior of the dyes. Thus, the described fluorescence labeling method provides a new approach for quantitative studies of protein interactions in living cells.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	6
Inhaltsverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung / Stand der Wissenschaft	14
1.1 Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion	15
1.2 Fluoreszenz.....	16
1.2.1 Jablonski-Diagramm.....	17
1.2.2 Fluoreszenzunterbrechungen / Blinken	19
1.2.3 Absorptions- und Emissionsspektrum.....	20
1.2.4 Fluoreszenzlöschung - Förster-Resonanz Energie Transfer und photoinduzierter Elektronentransfer.....	22
1.3 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie.....	23
1.3.1 Weitfeld-Mikroskopie und Interne Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie	24
1.3.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	26
1.4 Fluoreszente Proben	28
1.4.1 Quantum Dots	28
1.4.2 Fluoreszierende Proteine	28
1.4.3 Organische Farbstoffe	29
1.4.4 Chemische Tags	32
1.4.5 SNAP-tag	34
1.5 Chemotaxis in <i>E. coli</i> und das Signalprotein CheY	35
2 Zielsetzung	39
3 Experimente und Ergebnisse	40
3.1 Herstellung und Charakterisierung der BG-Farbstoffe	40
3.1.1 Attofarbstoffe und deren Kopplung an Benzylguanin	40
3.1.2 Bestimmung der Fluoreszenzlöschung der BG-Farbstoffe.....	41
3.1.3 Reaktion zwischen den BG-Farbstoffen und dem SNAP-Protein.....	41
3.1.4 Detektion der Farbstoffe mittels TIRF-Mikroskopie	44
3.1.5 Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren von immobilisierten Attofarbstoffen und deren Kategorisierung	46
3.1.6 Photostabilität der SNAP- und Oligo-Farbstoffe.....	55
3.1.7 Blinkverhalten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe.....	57

3.2	<i>In vivo</i> Fluoreszenz-Markierung von CheY	62
3.2.1	Zellgängigkeit der BG-Farbstoffe	63
3.2.2	Qualitativer Nachweis von farbstoffmarkiertem SNAP-Protein	66
3.2.3	Qualitativer Nachweis des CheY-SNAP Fusionsprotein	66
3.2.4	Nachweis der Funktionalität des CheY-SNAP Fusionsprotein	67
3.2.5	Markierungseffizienz von BG-Atto 633 und BG-Atto 655	70
3.3	Etablierung einer Fluoreszenz-Markierungsmethode für die Detektion einzelner CheY-Moleküle mittels TIRF-Mikroskopie	74
3.3.1	Optimierung der Waschbedingungen	74
3.3.2	Optimierung der Farbstoffkonzentration	75
3.3.3	Regulation der Expression des SNAP-Fusionsproteins	76
3.4	Einzelmolekül-Messungen zur Beobachtung der Bindung von CheY in lebenden <i>E. coli</i>	77
3.4.1	Beobachtung von CheY-SNAP in dem Zellstamm TE121.....	80
3.4.2	Beobachtung von CheY-SNAP in der Negativkontrolle TE110	82
3.5	Einzelmolekül-Analyse zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von CheY	83
3.5.1	Fluoreszenzintensitätsspuren von CheY-SNAP in TE121 und TE110	83
3.5.2	Charakterisierung der Fluoreszenzintensitätsspuren	88
3.5.3	Bestimmung der Bindungszeiten von CheY-SNAP in lebenden Zellen.....	91
4	Diskussion und Ausblick.....	94
4.1	Herstellung und Charakterisierung der BG-Farbstoffe	94
4.2	<i>In vivo</i> Fluoreszenz-Markierung von CheY	103
4.3	Etablierung einer Fluoreszenz-Markierungsmethode für die Detektion einzelner CheY-Moleküle mittels TIRF-Mikroskopie	105
4.4	Einzelmolekül-Messungen zur Beobachtung der Bindung von CheY in lebenden <i>E. coli</i>	106
4.5	Einzelmolekül-Analyse zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von CheY	108
5	Methoden	113
5.1	Analytisch - Chemische Methoden	113
5.1.1	Kopplung von Attofarbstoffen an Benzylguanin	113
5.1.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	115
5.1.3	Absorptionsspektroskopie	116
5.1.4	Massenspektrometrie	117
5.1.5	Fluoreszenzspektroskopie.....	117
5.1.6	Immobilisation von Attofarbstoffen auf einer Glasoberfläche	118
5.2	Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden	120
5.2.1	Plasmid DNA Aufreinigung	120
5.2.2	Proteinaufreinigung	120

5.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	122
5.2.4	Bestimmung der Markierungseffizienz von BG-MR121.....	124
5.3	Mikrobiologische Methoden.....	130
5.3.1	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	130
5.3.2	Bestimmung der Bakterienanzahl mittels Agarplatten.....	131
5.3.3	Schwärm-Assay	132
5.3.4	Transformation	133
5.3.5	Bestimmung der Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe.....	133
5.3.6	Standard-Markierungsmethode für die Einzelmoleküluntersuchungen am TIRF-Mikroskop.....	134
5.3.7	Herstellung von Zelllysate	135
5.4	Mikroskopie Techniken.....	136
5.4.1	Oberflächenpräparation.....	136
5.4.2	Konfokale Mikroskopie	136
5.4.3	TIRF	137
5.5	Datenanalyse	139
5.5.1	ALEX-TIRF Analysis Software zur Extraktion der Fluoreszenzintensitätsspuren.....	139
5.5.2	„Screen Traces-“ und „accumulateThresholdTraces-“ Software zur Bestimmung der An- und Auszeiten	140
5.5.3	Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der An- bzw. Auszeiten und deren graphischen Darstellung.....	141
6	Materialien	142
6.1	Geräte, Materialien, Chemikalien und Puffer, Computerprogramme.....	142
6.2	Expressionsvektoren, Plasmide und <i>E. coli</i> -Stämme.....	142
7	Anhang.....	145
A.1	Fluoreszenzspektren	145
A.2	Reaktion zwischen den BG-Farbstoffen und dem SNAP-Protein.....	146
A.3	Kategorisierung der $I_F(t)$ -Spuren.....	147
A.4	Bleichverhalten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe.....	147
A.5	Blinkverhalten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe.....	150
A.6	Fluoreszenzintensitätsspuren einzelner Hot-Spots in <i>E. coli</i>	154
A.7	Bindungszeiten von CheY-SNAP in lebenden Zellen.....	161
8	Literaturverzeichnis	162
	Danksagung.....	174
	Lebenslauf	177
	Eidesstattliche Versicherung	178

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
a.u.	Willkürliche Verrechnungseinheiten (engl. arbitrary units)
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APD	Avalanche Photodiode
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BG	O ⁶ -Benzylguanin -NH ₂
CCD	Charged Coupled Device
CCW	gegen den Uhrzeigersinn (engl. counter clockwise)
CW	im Uhrzeigersinn (engl. clockwise)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DOL	Degree of Labeling
EGF	Epidermal growth factor
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FL	Fluoreszenz
FP	Fluoreszierende Proteine
FRET	Förster Resonanz Energie Transfer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
hAGT	Humane O ⁶ -alkylguanine-DNA Alkyltransferase
HF	Fluorwasserstoffsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)

IC	Internal Conversion
I _F (t)-Spur	Fluoreszenzintensitäts-Zeit-Spur
IPTG	Isopropyl β–thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
ISC	Intersystem Crossing
Kan.	Kanamycin
MCP	Membrandurchspannende Methyl-akzeptierendes chemotaktisches Protein
min	Minuten
MW	Molekulargewichts-Marker (engl. Molecular Weight Marker)
MWCO	Molekulargewichts-Grenzwert (engl. Molecular Weight Cutoff)
NHS-Ester	N-Hydroxysuccinimidylester
NIR	Nahes Infrarot
P	Phosphoreszenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
PMT	Photoelektronenvervielfacher (engl. Photomultiplier Tubes)
Power-Law Funktion	Potenzfunktion
PSF	Punktspreiz Funktion (engl. point spread function)
QD	Quantum Dot
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROI	Region of interest
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Singulett
S ₀	Elektronischer Grundzustand
SDS	Sodiumdodecylsulfat

S _N	angeregten Singulett Zustände
Spots	Punkte
T	Triplet
TEAA	Triethylammoniumacetat
Temed	Tetramethyldiamin
TIRFM	Interne Totalreflektions – Fluoreszenzmikroskopie (engl. Total internal reflection fluorescence microscopy)
T _N	Triplet-Zustände
TP	Tetheringpuffer
Trp	Tryptophan
UAA	unnatürliche Aminosäure (engl. unnatural amino acid)
üN	über Nacht
UV-Vis	Ultraviolettes-sichtbares Licht (engl. UV-visible)
VR	Vibrationsrelaxation
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (engl. Yellow fluorescent Protein)
ZL	Zelllysat

1 Einleitung / Stand der Wissenschaft

Die stetige Verbesserung von Therapiemöglichkeiten gegen Krankheiten wie Krebs, Diabetes, Nieren-, Autoimmun- und Herzerkrankungen spiegelt sich in der gestiegenen Lebenserwartung der Bevölkerung wider. Detaillierte Einblicke in die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse sind essentiell für die Entwicklung neuer Therapieansätze und Präventionsmaßnahmen. Bei der Entstehung von Entzündungen sowie zahlreicher Erkrankungen spielen Störungen in der Signalübertragung der Zelle eine bedeutende Rolle. So sind bei Krebs die Signalkaskaden, welche das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung kontrollieren, fast immer verändert. Diese Signalwege sind zum größten Teil entschlüsselt. Dagegen sind die relevanten Mechanismen, welche Krebs-erkrankungen auslösen, immer noch Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Die Kenntnis der Struktur und der Funktion signalübertragender Proteine erlaubt es, Zielstrukturen zu charakterisieren und Medikamente zu entwickeln, die in die Signalwege eingreifen. Dadurch können neue präventive und therapeutische Maßnahmen abgeleitet und eine spezifische, individuelle Behandlung des Patienten ermöglicht werden. Zahlreiche Forschungsarbeiten zur Signaltransduktion beruhen auf Ensemblemessungen, bei der typischerweise eine große Menge von lysierten Zellen oder isolierten Proteinen bzw. Nukleinsäuren herangezogen werden (1). Die spezifischen Mechanismen, welche zwischen den einzelnen Molekülen wirken, lassen sich mit diesen Verfahren allerdings nicht identifizieren. Änderungen der Proteinstruktur oder des Bindungsverhaltens einzelner Moleküle können nicht detektiert werden, da die Momentaufnahmen von vielen Proteinen nur Aussagen über einen Mittelwert zulassen. Im Gegensatz zu diesen Ensemble-Experimenten, ermöglicht die Fluoreszenzdetektion einzelner Moleküle, die Untersuchung von versteckten Heterogenitäten und deren direkte Beobachtung in komplexen biologischen Systemen. Für die Einzelmolekül-Detektion bedarf es zunächst der spezifischen fluoreszenten Markierung der zu beobachtenden Moleküle. Neben den bekannten genetisch-codierten, fluoreszierenden Proteinen (2) gibt es neue Verfahren, um ein zu untersuchendes Protein fluoreszent und kovalent zu markieren. Diese haben den Vorteil, dass ein großes Repertoire fluoreszierender organischer Farbstoffe einsetzbar ist, welche eine bessere Photostabilität und weniger Fluoreszenzschwankungen aufweisen als fluoreszierende Proteine. Zu diesen Verfahren zählen neben dem Tetracystein-tag (3), dem Halo Tag (4) und dem CLIP-tag (5) auch der SNAP-tag (6). Das SNAP-tag System hat den Vorteil, dass die eingesetzten fluoreszenzgelöschten Farbstoffe erst nach der spezifischen Bindung an das zu untersuchende Molekül eine hohe Fluoreszenz aufweisen (7). Dies wirkt sich positiv auf das Signal-Rausch Verhältnis aus. Durch die Möglichkeit Fluorophore bildlich darzustellen, können somit einzelne Biomoleküle nicht-invasiv in ihrer natürlichen Umgebung mit

hoher Spezifität beobachtet (8) und ihre Rolle in zellulären Prozessen beschrieben werden (9), (10). Es ist unter anderem möglich die Struktur und Dynamik von Nukleinsäuren (11), Proteinen (12) und anderen Biomolekülen (13) in der lebenden Zelle zu detektieren (14). Ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Signaltransduktion stellt die bakterielle Chemotaxis dar, da sie relativ einfach, sensitiv und robust ist. Mit Hilfe der Chemotaxis können sich Bakterien in ihrer Umgebung orientieren und auf Lock- und Schreckstoffe reagieren, in dem sie ihre Bewegungsrichtung ändern. Die Chemotaxis, deren Studienanfänge bis in das 19. Jahrhundert zurück reichen (15) zeigt trotz ihrer Einfachheit eine beachtliche Leistungsfähigkeit. Die Anwendung von Einzelmolekül-Techniken in lebenden Bakterien stellt aufgrund der geringen Zellgröße und der extremen dreidimensionalen Form eine große Herausforderung dar. Allerdings wurden in den letzten Jahren sehr große Fortschritte erzielt, wie zum Beispiel die Bestimmung der Anzahl des Proteins MotB innerhalb des Motorkomplexes (16) und die Untersuchung der Mobilität in Membranen (17) und im Cytoplasma (18). Des Weiteren konnte durch Greenfield et al. (19) der Chemorezeptor Tar, das Adapterprotein CheW und das Signalprotein CheY lokalisiert werden. Dennoch kann die Chemotaxis immer noch nicht vollumfänglich erklärt werden. In diesem Zusammenhang bieten Einzelmolekülexperimente neue Optionen und können als Werkzeug eingesetzt werden, um individuelle Moleküle fundamental zu verstehen. So wurde durch Elf et al. (20) die Suche eines Transkriptionsfaktors nach seiner Bindungsstelle an der DNA in lebenden *E. coli*-Zellen erforscht.

1.1 Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion

Die Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion hat in den letzten zwei Jahrzehnten rasant zugenommen und den Biowissenschaften einen tieferen Einblick in die molekularen Prozesse der Zelle verschafft. Moleküle individuell zu beobachten erlaubt es, die Mittelwertbildung aus einer Gruppe von Molekülen zu umgehen. Somit wird bei der Einzelmoleküldetektion nicht aus dem Durchschnittsverhalten eines Molekülensembles auf das Verhalten eines einzelnen Moleküls geschlossen, sondern es können leicht unterschiedliche Eigenschaften der Moleküle (statische Heterogenitäten) als auch dynamische Heterogenitäten (zeitliche Heterogenitäten) aufgedeckt werden (21). Im Vergleich zur Mittelwertbildung in Ensemblemessungen ermöglicht die Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion die Darstellung der Verteilung eines Parameters (z.B. Wahrscheinlichkeitsverteilungen), wobei die Verteilung mehr Information erhält als der Mittelwert alleine. Es ist daher möglich, molekulare Vorgänge, welche in einer zufälligen Art und Weise in Raum und Zeit ablaufen, zu verfolgen. Die Beobachtung von Molekülen in ihrer natürlichen Umgebung in Echt-Zeit, erweitert somit das Verständnis für das individuelle Verhalten der einzelnen Moleküle als auch für deren Interaktion. Es können Moleküle, die auf spezifische zelluläre Signale, Umwelteinflüsse oder Medikamente

reagieren, aufgedeckt und untersucht werden. Hier sind unter anderem z.B. Enzymaktivitäten, Proteinfaltung, Vesikeltransport, Ionenkanalaktivitäten, Membranstrukturen und molekulare Motoren zu nennen. Darüber hinaus können durch das Aufdecken der physikalischen als auch chemischen Eigenschaften technisch-methodische Weiterentwicklungen intensiviert werden (22).

Wie in Xia et al. (10) beschrieben, lassen sich die Techniken der Einzelmoleküldetektion in zwei Kategorien einteilen. Die erste Kategorie basiert auf der Untersuchung von mechanischen Eigenschaften einzelner Biomolekülen (23) und deren Interaktionen (24) mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie oder durch Einsatz von optischen bzw. magnetischen Tweezern (25). Bei der zweiten Kategorie werden mit Hilfe der optischen Mikroskopie durch die Messung von Absorption, Emission (Fluoreszenz) oder Streuung von Licht optische Signale detektiert und in Beziehung zu den zugrunde liegenden biologischen Prozessen gesetzt (26) (27). Nachdem 1989 erstmals einzelne Fluorophore durch ihre Absorption bei tiefen Temperaturen optisch detektiert werden konnten (28) erfolgte ein Jahr später, ebenso bei tiefen Temperaturen die Detektion durch Fluoreszenz (29). Die Entwicklung von hochsensitiven Detektoren, wie Avalanche Photodioden (APDs), Charged Coupled Devices (CCDs, ladungsgekoppelte Bildsensoren) sowie von optisch hochwertigen Systemen machte es möglich die Fluoreszenzdetektion unter Umgebungsbedingungen durchzuführen. Funatsu et al. (30) konnte dann im Jahre 1995 einzelne fluoreszent markierte und auf einer Oberfläche immobilisierte Myosinmoleküle bei Raumtemperatur abbilden und den Adenosintriphosphat (ATP)-Umsatz per Video aufzeichnen. Fünf Jahre später wurde durch Sako et al. (31) auf der Oberfläche von lebenden Zellen der Epidermal growth factor (EGF)-Rezeptor Signalweg mit Hilfe einer fluoreszenten Protein-Fusion und einem markierten Liganden untersucht. Des Weiteren untersuchte Schütz et al. (32) die laterale Heterogenität der Plasmamembran in Atemwegs-Muskelzellen. Hierbei verfolgte er einzelne farbstoffmarkierte Lipide. Seit dieser Zeit hat sich die Einzelmoleküldetektion zu einer unentbehrlichen Technik entwickelt, um zelluläre Vorgänge in lebenden Zellen zu untersuchen (10).

Für ein besseres Verständnis der Einzelmolekül-Fluoreszenzdetektion werden im folgenden Kapitel zunächst die Grundlagen der Fluoreszenz skizziert.

1.2 Fluoreszenz

Es handelt sich in diesem Kapitel um eine Zusammenfassung des Review Fluorescence microscopy (33) und Informationen der Firma Olympus zum Thema Fluoreszenz (34). Des Weiteren wurden die Lehrbücher Lakowicz (35) und Valeur (36) hinzugezogen. Detaillierte Informationen zu diesem Thema sind diesen Büchern zu entnehmen.

Fluoreszenz ist die spontane Emission (Ausendung) von Licht (Ultraviolettes (UV)-VIS (sichtbar, engl. visible) und Infrarot (IR)), nachdem Licht (UV-VIS) auf eine Materie eingewirkt hat (Absorption). Diese Fluoreszenz tritt innerhalb von Nanosekunden nach Absorption von Licht auf.

1.2.1 Jablonski-Diagramm

Die Vorgänge der Absorption und Emission lassen sich mit dem Jablonski-Diagramm beschreiben, welches in vereinfachter Weise die Energiezustände (elektronischen Zustände) eines Moleküls darstellt (Abbildung 1).

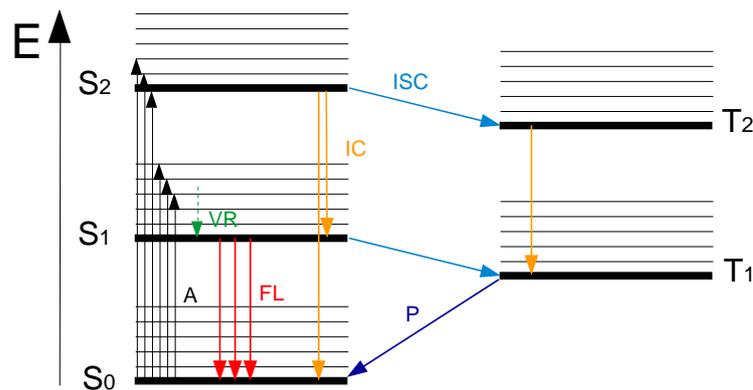


Abbildung 1: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Darstellung des elektronischen Grundzustands S_0 , der angeregten Singulett-Zustände S_N und der Triplett-Zustände T_N . Des Weiteren werden die möglichen Übergänge Absorption A, Fluoreszenz FL, Phosphoreszenz P, Vibrationsrelaxation VR, Internal Conversion IC und Intersystem Crossing ISC gezeigt (37).

Der Singulett-Zustand S_0 bezeichnet die Energie eines Moleküls, das nicht durch Licht angeregt ist (Grundzustand). Wenn ein Fluorophor mit Licht angeregt wird, absorbieren Elektronen die gesamte Energie eines Photons. Diese Energie E steht im umgekehrten Verhältnis zur Wellenlänge des Photons:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1)$$

Hierbei ist h die Planck-Konstante, c die Geschwindigkeit und λ die Wellenlänge des Lichtes in Vakuum. Bei ausreichender Energie kann das Elektron in einen höheren Energiezustand überführt werden. S_1 , S_2 und weitere S-Zustände sind angeregte Singulett-Zustände, bei denen ein äußeres Elektron in ein anderes Orbital angehoben wird. S_2 besitzt mehr Energie als S_1 und S_1 mehr als der Grundzustand S_0 . Die Elektronen verbleiben hier in einem einzelnen Orbital als Paare mit gegensätzlichen d.h. antiparallelen Spins und somit einem Gesamtelektronenspin von null. Die Mindest-

energie, die für die Fluoreszenz benötigt wird ist die Energie eines Photons, welches den Übergang eines Elektrons von S_0 zu S_1 veranlassen kann. Die Zeit für den Übergang, die Absorption (A), ist sehr kurz und liegt im Femtosekundenbereich. Ist die absorbierte Energie größer als die Energie, die für den Übergang vom Grundzustand in den niedrigsten Energiezustand von S_1 benötigt wird, so kommt es zum Übergang in Vibrations- oder Rotationszustände oder einen Übergang in den elektronisch höheren Singulett-Zustand S_2 , wobei höhere elektronische Zustände als S_1 eher unwahrscheinlich sind. Die Zeit in der ein Molekül im angeregten Singulett-Zustand verweilt wird als Fluoreszenzlebensdauer des Moleküls bezeichnet. Die Fluoreszenzlebensdauer wird bestimmt durch die Zeit, die das Molekül im niedrigsten Energiezustand von S_1 verweilt, welches einige Nanosekunden betragen kann (33).

Aus dem angeregten Zustand heraus gibt es unterschiedliche Wege, die das Fluorophor wieder in den Grundzustand zurückbringen und dabei die Abgabe der absorbierten Energie veranlassen kann. Die Vibrationsrelaxation (VR) bringt das Molekül zunächst strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand des gleichen elektronischen Zustands z.B. in das niedrigste Energieniveau von S_1 und benötigt Picosekunden. Während der Vibrationsrelaxation wird die Vibrationsenergie des Fluorophors auf ein Lösungsmittelmolekül übertragen. Nach VR gelangt das Molekül aus dem niedrigsten Schwingungszustand des Energieniveau S_1 durch Emission von Fluoreszenzlicht FL, d.h. Verlust von Energie, zurück in den elektronischen Grundzustand. Alternativ zum Emissionsprozess kann Internal Conversion (IC) stattfinden und damit eine strahlungslose Rückkehr in den elektronischen Grundzustand. IC erlaubt den isoenergetischen Übergang von der niedrigsten Vibrationsenergie eines elektronischen Zustandes in einen hohen Vibrationszustand eines niedrigeren elektronischen Zustands. Hier handelt es sich um einen Übergang zwischen zwei elektronischen Orbitalen. Bei den meisten Farbstoffen ist IC der bevorzugte Prozess für die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand. Nur wenige Farbstoffe zeigen dagegen das Phänomen der Fluoreszenz, weil hier IC weniger effizient abläuft. Gelegentlich kommt es jedoch zu einem verbotenen Übergang in den Triplett-Zustand (T-Zustand). Dieser Übergang wird als Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet. Bei den Triplett-Zuständen handelt es sich um angeregte Zustände, bei denen ebenso ein äußeres Elektron in ein anderes Orbital angehoben wird. Gleichzeitig kommt es jedoch hier zu einer Spin-Umkehr. Die Elektronenpaare liegen anschließend parallel vor, mit einem Gesamtelektronenspin von eins. Der Übergang des Moleküls aus dem Triplett-Zustand in den Grundzustand ist erschwert, da das äußere Elektron sich hierbei wiederum einem verbotenen Übergang unterziehen muss. Die Fluoreszenz wird durch die längere Lebensdauer des Triplett-Zustand vermindert, da das Molekül so lange nur in höhere Triplett-Zustände aber nicht in den S_1 angeregt werden kann und daher auch keine Photonen emittiert. ISC ist gemeinsam mit IC für die Reduzierung der Quantenausbeute von Fluoreszenzfarbstoffen zuständig. In Festkörpern kann beim Übergang in den Grundzustand eine Emission

von Licht, die als Phosphoreszenz (P) bezeichnet wird erfolgen. In Lösung und in Gasen tritt keine P auf, weil der Triplett-Zustand effizient durch Stöße, vor allem mit Sauerstoff, welcher im Grundzustand als Triplett vorliegt, gelöscht wird und somit strahlungslos in S_0 zurückkehrt. Des Weiteren können zusätzlich Triplett-Triplett Übergänge stattfinden, bei denen durch Absorption eines Photons das Molekül in einen höheren Triplett-Zustand gehoben wird. Dies hat zur Folge, dass die Emission von Licht weiter hinausgezögert wird. Für die Fluoreszenzmikroskopie stellen die Triplett-Zustände ein großes Problem dar, da das Triplettmolekül photochemische Reaktionen eingehen kann, die zu irreversiblen Bleichen oder Phototoxizität durch Bildung von freien Radikalen führen kann. Zudem kommt es zu einem Verlust an fluoreszenten Molekülen, da die Triplettmoleküle nicht den schnellen Absorptions- und Emissionszyklus durchlaufen können (33), (34).

1.2.2 Fluoreszenzunterbrechungen / Blinken

Viele Emitter (organische Moleküle, Proteine, Quantum Dots etc.) schalten trotz kontinuierlicher Anregung ihre Fluoreszenz zufällig an und aus. Dieses sogenannte Blinken, d.h. das zufällige Umschalten zwischen hellen An-Zuständen (hohen Fluoreszenzintensitäten) und dunklen Aus-Zuständen (Hintergrundrauschen) ist ein typisches Merkmal der Emission, das bei Einzelmoleküluntersuchungen beobachtet wird. Blinken kann eine erhebliche Beeinträchtigung in Einzelmoleküluntersuchungen darstellen. So können Signalunterbrechungen während der Beobachtung einzelner Moleküle zu Unsicherheit und Ungenauigkeit führen. Daher ist es von sehr großer Bedeutung, das Blinkverhalten des Fluorophors zu kennen, um die in den Einzelmoleküluntersuchungen beobachteten, fluoreszente Signale eindeutig interpretieren zu können. Schnelle Blinkprozesse (Mikro- bis Millisekunden) werden durch den temporären Übergang (ISC) des Moleküls von dem angeregten Singulett-Zustand in den dunklen Triplett-Zustand hervorgerufen. Von diesem Triplett-Zustand, kehrt das Elektron in den Grundzustand zurück, ohne Fluoreszenz auszustrahlen. Daraus ergibt sich, dass die Fluoreszenz eines chromophoren Stoffs durch Auszeiten unterbrochen wird, welche gewöhnlich einige Millisekunden andauern (36), (38), (39). Bei Übergängen zwischen solchen zwei klar abgegrenzten Zuständen zeigen diese Verweilzeiten (An- und Auszeiten) normalerweise eine exponentielle Verteilung (40). Die ersten Untersuchungen hierzu wurden bei tiefen Temperaturen in kristallinen Matrizen durchgeführt (29). Bei darauffolgenden Experimenten mit immobilisierten Molekülen bei RT wurden ebenso nur kurze An- und Auszeiten nachgewiesen, da die Moleküle zu schnell geblincht wurden. Clifford et al. (41) beschreibt in seinen Untersuchungen zum Einzelmolekülblinken am Beispiel des Farbstoffes Atto 647N unter flüssigen Umgebungsbedingungen ein exponentielles Verhalten und demonstriert zugleich, dass das Verhalten von den direkten Umgebungsbedingungen abhängig ist. In Experimenten mit Halbleiter-

Nanokristallen (Quantum Dots) (42) wurden dann sowohl bei tiefen Temperaturen als auch bei RT erstmals lange An- und Auszeiten beobachtet, die nach Kuno et al. auf Ladungsübertragungen zurückzuführen sind. Später wurde gezeigt, dass diese langen Verweilzeiten ebenso bei einzelnen Molekülen auftreten, die in einer festen Matrix eingebettet sind (43), (44), (45). Voraussetzung für diese Beobachtungen ist jedoch, dass die Moleküle photostabil sind und somit eine lange Beobachtungsdauer erlauben. Diese beobachteten Unterbrechungen laufen auf einer Zeitskala von Mikrosekunden bis zu mehreren Hundert Sekunden ab, die nicht dem ISC zugeschrieben werden können (46). Die Verteilungen dieser An- und Auszeiten lassen sich durch ein inverses Potenzgesetz $p(t) \sim t^{-\alpha}$ ($1 < \alpha < 2$) beschreiben wobei die Anzeiten zusätzlich einen Exponential-Cutoff $e^{-t/\tau_{\text{(cut-off)}}$ zeigen (47). Die den langen Zuständen zugrunde liegenden physikalischen Prozesse werden derzeit immer noch untersucht und kontrovers diskutiert. Schuster et al. (45) belegt, dass diese langen Aus-Zustände als eine Vorstufe für irreversibles Bleichen agieren. Triplett-Übergänge oder Übergänge zu anderen dunklen Zuständen oder Fluoreszenzlöschung durch Ladungsübertragung können alle zu Fluoreszenzschwankungen führen. So ist ein bei einem Ladungstransfer entstehendes radikales Kation nicht-fluoreszent, was dazu führt, dass das zu untersuchende Molekül so lange dunkel ist, so lange es sich in diesem geladenen Zustand befindet. Der weitere Weg des ladungsgetrenten dunklen Zustands hängt von den Umgebungsbedingungen ab. In einer festen Matrix (z.B. Polymer) muss das Elektron wieder durch die Matrix, die das Elektron vom Kation trennt, zurück ‚tunneln‘. Dieser Prozess ist weniger wahrscheinlich und bedingt dadurch die langen Auszeiten, die durch eine Power Law Funktion beschrieben werden können. Im Falle einer wässrigen Umgebung kann es für das Elektron oder radikale Kation zur paarigen Rekombination oder zu einer permanenten Trennung kommen. Durch Reduktions- oder Oxidationsmittel kann der fluoreszente Zustand wieder hergestellt werden, indem das Kation reduziert wird oder das Anion oxidiert wird (48). Da dieser Schritt durch Diffusion limitiert wird, ist die Verteilung der Auszeiten einfach-exponentiell und hängt von der Reduktions- bzw. der Oxidationsmittelkonzentration ab.

1.2.3 Absorptions- und Emissionsspektrum

Jedes Fluorophor besitzt aufgrund seines elektronischen Zustandes ein charakteristisches Absorptions- (bzw. Anregungs-) und Emissionsspektrum. Das Absorptions- und das Anregungsspektrum sind unter optimalen Bedingungen, wenn nur ein einziger Farbstofftyp vorliegt, deckungsgleich. Eine zu hohe optische Dichte oder die Anwesenheit von Chromophoren kann zu einem Unterschied zwischen Absorptions- und Anregungsspektrum führen (35). Die in Abbildung 2 dargestellten Absorptions- und Emissionsspektren stellen die relative Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Wellenlänge dar.

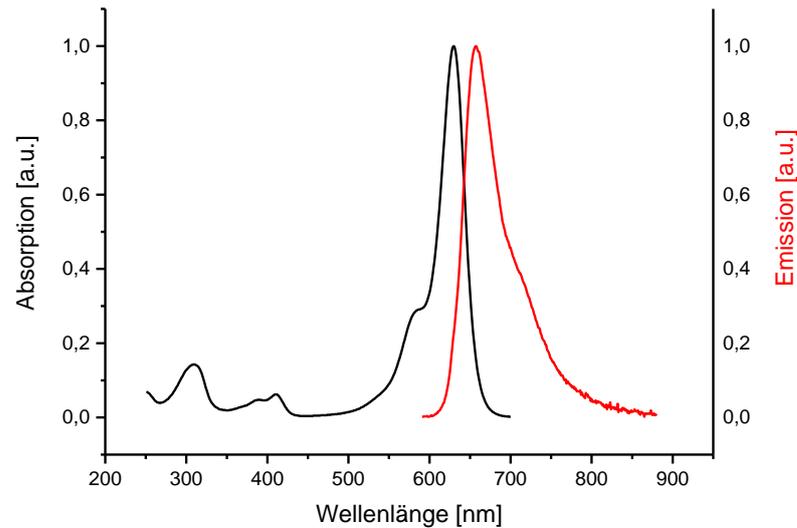


Abbildung 2: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von Atto 633 (49).

Durch systematische Variation der Anregungswellenlänge erhält man dessen Anregungsspektrum (Absorptionsspektrum). Hier wird die relative Intensität des emittierten Lichtes (Fluoreszenz) in Abhängigkeit der Wellenlänge gemessen und graphisch dargestellt (34). Das Emissionsspektrum erhält man in dem man das Fluorophor mit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums anregt. Die relative Fluoreszenzintensität, gemessen bei den unterschiedlichen Wellenlängen, wird in einem Plot abgebildet. Das Emissionsspektrum entspricht dem Wellenlängenbereich, welches das emittierte Photon annehmen kann. Da die Emission aus dem niedrigsten elektronischen Zustand aus S_1 erfolgt, ist die Energie des emittierten Photons typischerweise kleiner, als die des absorbierten Photons. Die Ursache für diese Energiedifferenz beruht auf VR, bei der Energie strahlungslos abgegeben wird. Dies hat zur Folge, dass das Emissionsspektrum im Gegensatz zum Absorptionsspektrum zu längeren Wellenlängen hin verschoben ist, was als Stokes Shift bezeichnet wird. Das Emissionsmaximum ist normalerweise kleiner als das Anregungsmaximum und die Emissionskurve ist oft ein Spiegelbild des Anregungsspektrums (34). Die Fluoreszenzmikroskopie macht sich diese Eigenschaften der Absorption und Fluoreszenz von Stoffen zunutze, um Vorgänge in lebenden Zellen zu beobachten. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Beleuchtung des zu untersuchenden Objekts mit einer bestimmten Wellenlänge und der anschließenden Detektion der zurückkommenden, zu längeren Wellenlängen hin verschobenen Fluoreszenz. Bedingung hierfür ist die Fähigkeit des zu untersuchenden Objekts zur Fluoreszenz und die Trennung des Anregungslichts vom Fluoreszenzlicht.

1.2.4 Fluoreszenzlöschung - Förster-Resonanz Energie Transfer und photoinduzierter Elektronentransfer

Es gibt einige Mechanismen durch die Energie strahlungslos zwischen zwei Farbstoffen übertragen werden, ohne dass eine Absorption oder Emission von Photonen stattfindet. Ein Farbstoff dient als sogenannter Donor (Spender) und der andere Farbstoff als Akzeptor (Empfänger) von Energie.

Sehr oft wird die Löschung durch eine klassische Dipol-Dipol Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und dem Fluoreszenzlöcher (Quencher) verursacht. Dieses Phänomen wurde erstmals 1948 durch Förster (50) als Förster-Resonanz Energie Transfer (FRET) beschrieben. Bei FRET handelt es sich um einen dynamischen Löschemechanismus, da die Energieübertragung stattfindet während der Donor sich im angeregten Zustand befindet. Die FRET-Effizienz hängt von dem Abstand zwischen den Chromophoren ab, der in einem Bereich (Radius R) von 10 Å-100 Å (1-10 nm) oder kleiner liegen muss. Die FRET-Effizienz fällt mit einer Rate von $1/R^6$ ab. FRET hängt ebenso von der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und dem Absorptionsspektrums des Akzeptors ab. Des Weiteren sollen Donor und Akzeptor möglichst parallele elektronische Schwingungsebenen besitzen.

Eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzlöschung basiert auf einer elektronischen Interaktion. So kann zwischen einem angeregten Zustand des Fluorophors und dem Grundzustand des Elektronendonors (Quencher) ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET) stattfinden und somit zu einer Löschung des Fluorophors führen. Ein angeregtes Elektron wird hierbei von dem Elektronendonator auf den Elektronenakzeptor übertragen. Elektronendonoren sind z.B. Guanin und Tryptophan (Trp). Das Löschen eines Fluorophors, das sich im ersten angeregten Singulett-Zustand befindet führt in der Regel zu einer Ladungstrennung und somit zu einem radikalen Ionenpaar $A^{\cdot-}/D^{+\cdot}$, das über eine strahlungslose Ladungsrekombination wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Marmé et al. beschreibt einen photoinduzierten Elektronentransfer zwischen der Nukleinbase Guanin und Farbstoffen aus den Gruppen der Oxazine (51), Rhodamine, Coumarine und Bora-Diaza-Indacene (52). Des Weiteren konnte in intermolekularen Fluoreszenzlöschungs-Experimenten gezeigt werden, dass die Fluoreszenz von bestimmten Farbstoffen (z.B. Fluorescein) ebenso durch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Methionin gelöscht werden, wenn sie an diese gebunden sind. So werden z.B. die Oxazine Atto 655, Atto 680 und MR121 durch Tryptophan sehr gut gelöscht, während die anderen Aminosäuren hier keinen Löscheffekt bewirken. Die Fluoreszenzlöschung dieser rot-absorbierenden Farbstoffe durch Trp wird durch Bildung eines Grundzustand-Komplexes (statisches Quenchen oder Kontakt-Quenchen) geprägt. Das heißt, statisches Quenchen tritt auf, wenn die Moleküle im Grundzustand, d.h. vor der Anregung, einen Komplex bilden. Die Assoziationskonstanten (K_{ass}) liegen für diese Farbstoffe im Bereich von $96-206 \text{ M}^{-1}$ (51) (52). Darüber hinaus untersuchte Marmé

et al. (51) ebenso die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung vom Abstand zwischen Farbstoff und Trp-Resten. Hierzu wurden die Farbstoffe an den Lysinrest eines Peptids gebunden, das am anderen Ende ein Trp-Molekül besitzt (Lys-Gly-Gly-Gly-Trp). Aufgrund des relativ flexiblen Glycin(Gly)-Rests ist ein intramolekularer Kontakt und somit eine Komplexbildung zwischen Farbstoff und Trp-Rest möglich. Für die peptidgebundenen Farbstoffe MR121, Atto 655 und Atto 680 wurde eine verminderte Fluoreszenzlöschung beobachtet. Ihre geringen Fluoreszenzquantenausbeuten weisen jedoch auf die Bildung eines schwach- oder nicht-fluoreszenten Komplexes zwischen Farbstoff und terminalen Trp im Grundzustand hin.

1.3 Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie

Die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie dient dazu, die Signale von einzelnen, individuellen, fluoreszenten Molekülen zum Beispiel in lebenden Zellen, zu messen und sichtbar zu machen. Üblicherweise wird ein inverses Fluoreszenzmikroskop benutzt, bei dem sich das Objektiv unterhalb des Präparats befindet. Durch diesen umgekehrten (inversen) Aufbau schaut man von unten auf das Präparat. Um ein fluoreszentes Signal eines einzelnen Farbstoffes zu detektieren benötigt man eine hochwertige Optik, Objektive mit einer großen numerischen Apertur und hochempfindliche Detektoren (APDs, CCDs) (10). Um ein gutes Signal zu Rausch-Verhältnis zu erhalten ist es ebenso wichtig Streulicht und Hintergrundfluoreszenz zu beseitigen. Autofluoreszenz kann zum Beispiel durch die Zelle selbst, durch Verunreinigungen oder das Lösungsmittel hervorgerufen werden. Dies wird unter anderem dadurch erreicht, dass man das Anregungsvolumen, in dem sich das zu detektierende Fluorophor befindet, reduziert. Da in einem geringen Detektionsvolumen die Anzahl an Lösungsmittelmolekülen gering ist wird die unelastische Raman- sowie elastische Rayleigh-Streuung reduziert (53). Das Detektionsvolumen bei der konfokalen Mikroskopie liegt im Femtoliterbereich. Des Weiteren ermöglicht der Einsatz von Lasern, das Anregungsspektrum möglichst gering zu halten. Die Anregung anderer fluoreszierender Moleküle wird dadurch minimiert. Darüber hinaus kann bei einer Anregungswellenlänge größer als 600 nm die Autofluoreszenz gering gehalten werden. Die Anzahl der Moleküle, die in diesem Spektrum absorbieren, ist in der lebenden Zelle eher gering. Die Möglichkeit der parallelen Einkopplung mehrerer Laserlinien ermöglicht es, unterschiedliche Anregungen synchron durchzuführen und eine gleichmäßige Ausleuchtung zu gewährleisten (54). Bei der Einzelmolekülspektroskopie unterscheidet man zwischen der Weitfeld-Mikroskopie (engl. Wide-Field Imaging) und der konfokalen Mikroskopie (55).

1.3.1 Weitfeld-Mikroskopie und Interne Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie

Die einfachste Methode der Weitfeld-Mikroskopie ist die Epi-Fluoreszenzmikroskopie, bei der das Objektiv nicht nur für die Detektion und Vergrößerung zuständig ist, sondern auch für die Beleuchtung (Anregung). Ein ausgeweiteter Anregungsstrahl wird mittig auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert, welches einen gebündelten Strahl auf die Probe zur Folge hat (Köhler Illumination). Die Fluoreszenz wird durch das gleiche Objektiv gesammelt und von gestreutem Anregungslicht getrennt (55). Von Vorteil ist, dass nur der von der Probe zurückreflektierte, geringe Anteil des Anregungslichts abgeblockt werden muss, um das reine Fluoreszenzsignal zu detektieren. Mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels wird das Anregungslicht vom Emissionslicht getrennt. Dichroitische Spiegel (Beamsplitter) werden in einem Winkel von 45° in den Lichtweg eingesetzt. Hierbei wird das von der Lichtquelle stammende kürzerwellige Licht von dem dichroitischen Beamsplitter reflektiert und das emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht transmittiert. Des Weiteren dienen zwei zusätzliche Filter als Anregungs- und BarrierefILTER. Der Anregungsfilter dient der Vorauswahl der Anregungswellenlänge während der BarrierefILTER nur längerwelligem Licht den Weg zurück zum Detektor erlaubt. Diese drei Interferenzfilter sind sehr spezifisch für eine bestimmte Wellenlänge, welches eine gute Auftrennung von Anregungs- und Emissionslicht gewährleistet (33). Da die Epi-Fluoreszenzmikroskopie ein großes Probenvolumen beleuchtet, kann das Hintergrundsignal von Fluorophoren, die sich außerhalb des Fokus befinden, die eigentliche Detektion stören. Die Interne Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie TIRFM (engl. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) regt im Gegensatz dazu nur eine dünne Schicht nahe dem Deckglas an. Wie in Abbildung 3 dargestellt wird hierbei ein zur Anregung verwendeter Lichtstrahl unter einem bestimmten Winkel in ein Prisma oder Mikroskopobjektiv eingekoppelt (56). Dadurch kommt es zu einer Totalreflektion an der Grenzfläche zwischen Deckglas und wässrigem Medium (Probe). Der Brechungsindex der Probe muss hierzu einen kleineren Brechungsindex als das Deckglas besitzen. Trotz der totalen Reflektion des Anregungslichtes wird an der gegenüberliegenden Seite der Grenzfläche ein evaneszentes Feld erzeugt, welches in z-Richtung in die Probe eindringt. Nur Fluorophore innerhalb dieses evaneszenten Feldes werden angeregt. Die resultierende Fluoreszenz wird durch ein Objektiv gesammelt, gefiltert und durch eine CCD-Kamera detektiert. Die Tiefe des evaneszenten Feldes wird durch den Einfallswinkel, die Wellenlänge und die Brechungsindizes der Probe und des Deckglases bestimmt. Die Intensität fällt exponentiell mit der Entfernung von der Grenzfläche ab und liegt im Bereich von 60-100 nm (57).

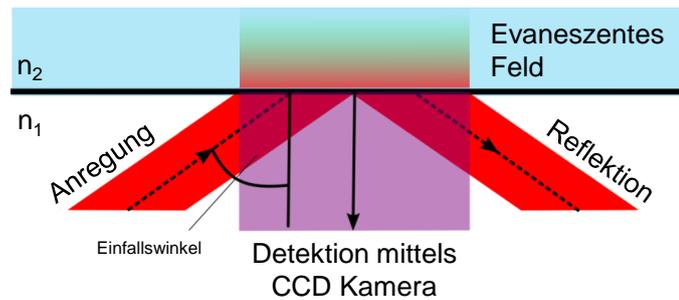


Abbildung 3: Prinzip der TIRF - Mikroskopie.

Da die in dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen fast ausnahmslos an einem TIRF-Mikroskop erfolgten wird im Folgenden genauer auf die physikalischen Grundlagen eingegangen. Für zelluläres Imaging wird meistens die Objektiv-basierte TIRF-Mikroskopie verwendet. Hier wird der Anregungsstrahl (Laserstrahl) im Gegensatz zur Weitfeldmikroskopie wie bereits erwähnt in einem bestimmten Einfallswinkel, das heißt auf einen Punkt im äußeren Umkreis der hinteren Brennebene der Objektivlinse, fokussiert. Somit fällt das Anregungslicht unter dem für TIRF erforderlichen flachen Winkel auf das Deckglas. Beim Austritt des Anregungslichts aus der Objektivlinse durchquert es das Immersionsöl und fällt auf das Deckglas, breitet sich hier aus und trifft auf die Grenzfläche zwischen Glas und wässriger Probe. Wenn der Einfallswinkel des Anregungslichts θ größer ist als der kritische Winkel θ_c so kommt es zu einer internen Totalreflektion.

Für den kritischen Winkel gilt das Snelliussche Gesetz

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_1/n_2) \quad (2)$$

Dabei sind n_1 und n_2 die Brechungsindizes der Probe und des Deckglases. Während Immersionsöl und Deckglas den gleichen Brechungsindex besitzen, muss der Brechungsindex der Probe kleiner sein als der des Glases, um Totalreflektion zu erreichen. Wenn der Einfallswinkel kleiner ist als θ_c breitet sich das Anregungslicht durch die Probe aus (Epi-Fluoreszenz). Ist der Winkel jedoch größer als θ_c so wird das Anregungslicht an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Probe in das Deckglas zurückreflektiert. Ein Teil der einfallenden Energie dringt durch die Grenzfläche und erzeugt in z - Richtung ein evaneszentes Feld, innerhalb derer die Anregung der Probe erfolgt. Die Intensität I des evaneszenten Feldes nimmt exponentiell mit der Entfernung z von der Grenzfläche ab. Fluorophore nahe der Grenzfläche werden daher stärker angeregt als weiter entfernt Gelegene. Die Intensität des evaneszenten Feldes bei jeder beliebigen Entfernung z wird beschrieben durch:

$$I_z = I_0 \cdot e^{-z/d} \quad (3)$$

Wobei I_0 der Intensität des evaneszenten Feldes bei $z = 0$ entspricht. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes d entspricht dem Abstand vom Deckglas, bei der die Anregungsenergie auf 37% ($1/e$) von I_0 abfällt. Für d gilt:

$$d = (\lambda_0/4\pi) \cdot (n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-1/2} \quad (4)$$

λ_0 entspricht der Wellenlänge des Anregungslichtes in Vakuum. Die Eindringtiefe wird somit durch den Einfallswinkel, die Wellenlänge und die Brechungsindizes von Probe und Deckglas beeinflusst. Bei ansteigendem Einfallswinkel nimmt die Eindringtiefe ab und je länger die Wellenlänge desto größer die Eindringtiefe und damit das Anregungsvolumen. Bei einem gegebenen Einfallswinkel, ist die Eindringtiefe von dem Brechungsindex der Probe abhängig. Bei steigendem Brechungsindex der Probe nimmt die Eindringtiefe zu (57). Während die TIRF-Mikroskopie nur die Detektion der Fluorophore nahe der Oberfläche erlaubt, ist es mit der Variable-Angle-TIRF Methode möglich, eine dickere Schicht als bei der TIRF Methode anzuregen. Hierbei wird der Einfallswinkel des Anregungsstrahls variabel gehalten. Durch Verringerung des Einfallswinkels wird ein Teil des Anregungslichts gebrochen. Dadurch wird ein Anregungsstrahl durch die Zelle erzeugt und somit kann z.B. die apikale Membran einer Zelle abgebildet werden (31). Von Vorteil ist, dass diese Schicht dünner ist als bei der Epi-Fluoreszenz (55). Eine weitere Methode, um das Anregungsvolumen und somit den Hintergrund (Autofluoreszenz des Mediums) gering zu halten ist, wie schon angedeutet, die konfokale Mikroskopie.

1.3.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die konfokale (engl. confocal, den gleichen Fokus besitzend) Fluoreszenzmikroskopie beruht auf einer Punktdetektion, bei der ein beugungsbegrenzter Punkt des Anregungslichts das zu untersuchende Objekt Punkt für Punkt abrastert da der Strahl konvergiert und divergiert. Durch Objektive mit hoher numerischer Apertur können Anregungslicht und Detektor auf das gleiche Volumen fokussiert werden. Die beugungsbegrenzte Fokussierung erreicht hierbei ein Beleuchtungsvolumen von 1 fl (10-15 l). Die emittierte Fluoreszenz (Fokalvolumen) wird zusätzlich auf eine Lochblende, die sich vor dem Detektor befindet, abgebildet. Hierbei wird das Licht (Fluoreszenz oder Streulicht), welches nicht aus der Fokusebene stammt, eliminiert und die axiale Ausdehnung eingeschränkt (58). Während die Probe gescannt wird, detektieren Photolawinendi-

den (engl. Avalanche Photodiode, APD) oder Photoelektronenvervielfacher (engl. Photomultiplier Tubes, PMT) die Fluoreszenz jedes einzelnen Punktes. Da die konfokale Mikroskopie nicht auf den Bereich nahe des Deckglases beschränkt ist, kann man tiefer in der Probe gelegene Objekte abbilden und durch vielfaches Scannen entlang der z-Richtung (axial, entlang der optischen Achse) ein dreidimensionales (3D) Bild erzeugen (59). Das Scannen der Probe und die Punktdetektion ermöglicht jedoch nicht, mehrere Areale der Probe gleichzeitig abzubilden. Weitfeldmethoden sind daher für das Verfolgen einzelner Partikel (Single-Particle-Tracking) oder das Abbilden dynamischer Strukturen von Vorteil (55). In Abbildung 4 ist das von Minsky Mitte der 50er Jahre entwickelte und 1957 patentierte Prinzip der konfokalen Mikroskopie schematisch dargestellt (60).

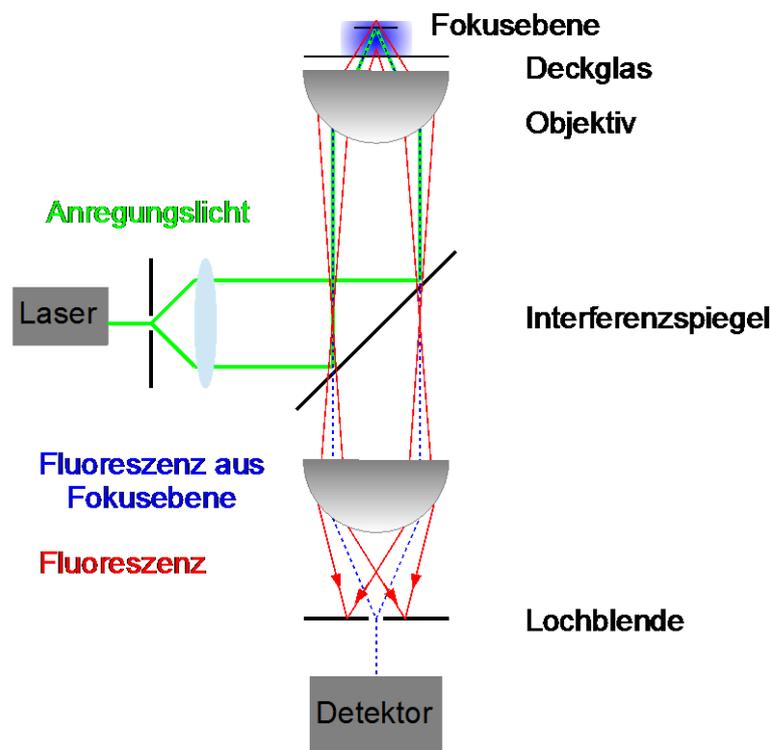


Abbildung 4: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie (37).

Zur Beobachtung und Untersuchung von Biomolekülen in der lebenden Zelle werden in der Fluoreszenzmikroskopie meistens Fluorophore eingesetzt, die nicht zelleigen sind. Ursache hierfür ist, dass die meisten zu untersuchenden, intrinsischen Proteine und Nucleinsäuren keine chromophore Gruppen besitzen, die effektiv in dem für die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie nötigen, sichtbaren Spektralbereich emittieren. Um bei der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie Raman Streuung, Autofluoreszenz und Photobleichen zu minimieren benötigt man photostabile, fluoreszente Proben mit einem hohen Extinktionskoeffizienten und hoher Quantenausbeute, die im sichtbaren Bereich absorbieren (14).

1.4 Fluoreszente Proben

Bei der Auswahl der fluoreszenten Probe sollte auf einen hohen Extinktionskoeffizienten und auf eine hohe Quantenausbeute geachtet werden, d.h. die Probe sollte möglichst hell sein aber auch photostabil sein. Jedoch sind für die Auswahl fluoreszenter Proben noch weitere Merkmale zu beachten. So ist die Größe der fluoreszenten Probe, deren Konjugation an spezifische Stellen des zu untersuchenden Biomoleküls als auch die unspezifischen Interaktionen mit dem Biomolekül und mögliche Intensitätsfluktuationen auf unterschiedlichen Zeitskalen zu berücksichtigen. Fluoreszente Proben umfassen Quantum Dots, Fluoreszierende Proteine (FP) und organische Farbstoffe. Jede dieser Proben weist aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften Vor- und Nachteile auf. Die Auswahl der Probe ist demnach abhängig von dem Design des Einzelmolekülexperiments und dem zu untersuchenden biologischen System.

1.4.1 Quantum Dots

Quantum Dots (QD) sind Halbleiter-Nanokristalle, die sich wie fluoreszente Moleküle verhalten. Sie bestehen aus einem Cadmium-Selen Kern (CdSe), der von einer Zink-Sulfid Hülle umgeben ist. Hier handelt es sich um eine Klasse nicht-genetisch kodierter fluoreszenter Proben. QDs sind sehr viel größer als FPs oder organische Farbstoffe und weisen eine sehr große Helligkeit und Photostabilität auf (61). Zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit werden die QDs mit einer Passivierungsschicht (hydrophiles Polymer) umhüllt. Um sie für biologische Anwendungen einsetzbar zu machen werden sie mit Antikörpern oder anderen biologisch aktiven Peptide oder Kohlenhydrate konjugiert. QDs besitzen größenabhängige optische Eigenschaften. So emittieren kleine CdSe QD Kerne mit einem Durchmesser von 2,3 nm blaues Licht, während größere Kristalle (5,5 nm) rotes Licht emittieren (62). Aufgrund der enormen Größe und einem komplexen Blinkverhalten ist ihr Einsatz in Einzelmolekülexperimenten (z.B. FRET Experimente) jedoch limitiert. QDs werden vor allem für Particle Tracking oder *in vivo* Imaging eingesetzt, bei denen die Blink-Charakteristik nicht stört. Für ein tiefergehendes Verständnis der photophysikalischen Eigenschaften der Quantum Dots sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur verwiesen (61), (63), (64).

1.4.2 Fluoreszierende Proteine

Viele der FPs, die im sichtbaren Bereich absorbieren, wurden aus Korallen oder Quallen gewonnen und durch Mutagenese optimiert. Das grün fluoreszierende Protein GFP (engl. green fluorescent protein) wurde erstmals 1962 von Shimomura et al. (65) in *Aequorea victoria* jellyfish entdeckt. GFP wurde in den Jahren danach gentechnisch so verändert, dass heute eine große Auswahl an blauen, blaugrünen und gelben Mutanten zur Verfügung steht. So erhielt man durch Substitution der Aminosäure Thr²⁰³ im

GFP-Wildtyp durch eine aromatische Aminosäure das bekannte Yellow fluorescent Protein YFP (66). Hierbei kommt es durch Wechselwirkung des π – Elektronensystems des Chromophors und der aromatischen Aminosäure zu einer Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge in den gelben Spektralbereich. Ebenso wurden in anderen Spezies weitere FPs gefunden. Somit konnte die Palette an FPs in den orangenen und roten Spektralbereich ausgedehnt werden (67). Darüber hinaus wurden ebenso die verbesserten ‚enhanced‘ Varianten (z.B. eGFP, eYFP) entwickelt. FPs mit einem Molekulargewicht von rund 25 kDa, besitzen ein Chromophor, welches sich bei der Proteinfaltung spontan ausbildet. Da FPs in situ genetisch exprimiert werden, bedarf es hier keiner chemischen Konjugation mit extrinsischen, fluoreszenten Markern. Somit entfallen bei der Anwendung von FPs das Anfärben der Zellen und die damit verbundenen Fixierungs-, Permeabilisierungs- und Waschschriffe. FPs können ebenso gentechnisch an ein zu untersuchendes Protein fusioniert werden. Somit können sie in einem 1:1 Verhältnis exprimiert werden, was für eine quantitative Bildanalyse von Vorteil ist (68). Im Gegensatz zu organischen Fluorophoren (~ 1 kDa) sind sie jedoch viel größer (~ 25 kDa), zeigen ein stärkeres Blinkverhalten und eine geringere Photostabilität (2).

1.4.3 Organische Farbstoffe

Organische Fluorophore besitzen ausgedehnte konjugierte Kohlenstoffketten mit einem konjugierten π -Elektronensystem, welches sie zur Absorption und Emission im sichtbaren Spektrum befähigen. Eine weitere Eigenschaft konventioneller organischer Farbstoffe ist das irreversible Photobleichen, welches die Photonenzahl eines einzelnen Fluorophors limitiert. Photobleichen ist ein irreversibler photochemischer Prozess, bei dem das Fluorophor die Fähigkeit zur Emission verliert. Die üblichen Farbstoffmoleküle können mehrere Millionen Photonen emittieren, bevor sie gebleichen sind. Für Einzelmolekülmessungen, bei denen Biomoleküle und biologische Vorgänge in der lebenden Zelle untersucht werden, soll das Fluorophor robust sein und ständig, unabhängig von dessen Umgebung, emittieren. Bei der Auswahl eines geeigneten Fluorophors für Einzelmolekülmessungen sollte daher auf einen hohen Extinktionskoeffizienten, eine hohe Quantenausbeute und auf eine hohe Photostabilität geachtet werden. Der Farbstoff sollte im sichtbaren bis nahen Infrarot Spektralbereich absorbieren und ebenso emittieren. Darüber hinaus sollte der Farbstoff eine kurze Fluoreszenzlebensdauer besitzen, damit es den Anregungs- und Emissionszyklus mit einer hohen Frequenz durchlaufen kann. Wichtig ist ebenso, dass die Fluorophore keine Fluoreszenzschwankungen (Aus-Zustände) aufzeigen, die durch Übergänge in den nicht-fluoreszenten, dunklen Triplet-Zustand verursacht werden können (69). Dieser photophysikalische Prozess, bei dem es zu reversiblen, diskreten Fluoreszenzschwankungen kommt nennt man Photoblinken. Photoblinken ist in Ensemblemessungen unbedenklich, da Intensitätsfluktuationen

eines einzelnen Moleküls herausgemittelt werden. Im Gegensatz dazu sind bei der Beobachtung eines einzelnen Moleküls diese Fluktuationen zwischen An- und Aus-Zustand problematisch. Dadurch kann die kontinuierliche Beobachtung von biologischen Prozessen nicht mehr gewährleistet werden. Diese Intensitätsfluktuationen können ebenso fehlgedeutet werden und auf biologische Vorgänge bezogen werden. So kann in FRET-Experimenten der Anstieg und Abfall der Fluoreszenzintensität des Akzeptormoleküls leicht mit Photoblinken verwechselt werden. Werden die unterschiedlichen photophysikalischen Vorgänge, die in einem Fluorophor ablaufen können, nicht richtig verstanden, so kann dies zu einer Fehlinterpretation der Fluoreszenzmessungen führen. Zur gleichen Zeit können jedoch, bei richtiger Interpretation, diese Messungen viel Information über biochemische Prozesse bereitstellen (14). Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Auswahl der Fluorophore ist die Größe der Fluorophore. Die Fluorophore sollten relativ klein sein, damit sie das zu untersuchende biologische System nicht beeinträchtigen bzw. stören. Des Weiteren sollen sie für die Anwendung in der lebenden Zelle wasserlöslich sein und eine funktionelle Gruppe für die Biokonjugation besitzen.

In der optischen Mikroskopie verwendet man Farbstoffe, die ihr Absorptions- und Emissionsmaximum im ultravioletten-sichtbaren (UV/Visible) Bereich besitzen. Jedoch absorbieren Biomolekül wie Wasser und Hämoglobin im UV/Vis ebenso sehr gut. Das Licht wird dadurch leicht gestreut und hat somit auch eine begrenzte Eindringtiefe ins Gewebe bzw. in die Probe. Zusätzlich weisen viele Biomoleküle in diesem Bereich eine Autofluoreszenz auf, welches zu einem hohen Hintergrundrauschen und einem geringen Signal zu Rausch-Verhältnis führt. Fluoreszente Proben, die ihre Absorption und Emission dagegen bei längeren Wellenlängen bis hin zum nahen Infrarot-Bereich (engl. Near infrared NIR) besitzen, sind für *in vivo* Anwendungen besser geeignet. Somit kommt es zu einer geringeren Lichtschädigung der biologischen Probe, einer größeren Eindringtiefe ins Gewebe und einer geringeren Interferenz durch Autofluoreszenz der Biomoleküle (70), (71). Um das beschriebene Photobleichen und die Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden, werden in Einzelmolekülmessungen Fluorophore verwendet, die oberhalb von 450 nm absorbieren. Laut der Firma ATTO-TEC GmbH in Siegen sind Anregungswellenlängen größer als 550 nm oder sogar 600 nm ratsam, um die Interferenz durch Autofluoreszenz der Probe zu reduzieren (72). Um die Fluorophore für biomolekulare Anwendungen kompatibel zu machen, wurden ihnen für die spezifische Markierung funktionelle Gruppen (NHS, Maleimide, Hydrazide) angehängt. Ebenso wurde die Wasserlöslichkeit durch geladene Substituenten wie Sulfon- oder Carbonsäuren erhöht. Durch Blocken reaktiver Stellen oder durch sterische Änderungen konnte die Photostabilität verbessert werden (73). Bis auf ein paar wenige Ausnahmen können die organische Farbstoffe chemisch in Rhodamine, Carbocyanine, Oxazine und Carbopyronine eingeteilt werden. Fluorophore enthalten üblicherweise mehrere kombinierte aromatische Gruppen oder planare oder zyklische Moleküle mit

mehreren π -Bindungen. Die meisten längerwelligen Fluorophore werden durch Modifikationen kurzwelliger Fluorophore erhalten (74). Eine zentrale Rolle spielen hier die von Rhodamin (Abbildung 5) abgeleiteten kationischen Farbstoffe. Rhodaminfarbstoffe absorbieren weit unter 600 nm (520-570 nm). Ihre photophysikalischen Eigenschaften sind sehr stark abhängig von den Substituenten, die an die Aminosäuren gebunden sind und von einer Veresterung der Carboxylgruppe im Phenylring. Um längerwellige Rhodaminderivate zu erhalten können an den Rhodamin-Präkursor heteroaromatische Ringe hinzugefügt werden, um somit eine Erweiterung des Konjugationssystems zu erzielen. Durch Substitution des zentralen Kohlenstoffatoms mit Stickstoff oder der Einführung von elektronenziehenden Gruppen (z.B. Cyano) an das zentrale Kohlenstoffatom kann ebenso eine Verschiebung in den längerwelligen Spektralbereich erreicht werden.

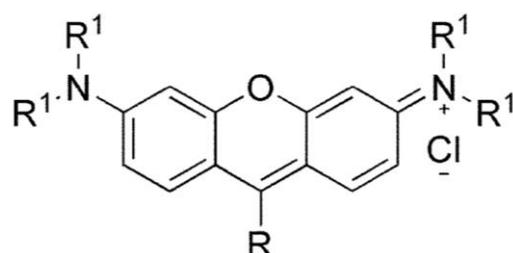


Abbildung 5: Rhodamin (74).

Wird das Sauerstoffatom im Rhodaminfarbstoff durch zwei geminale Methylgruppen ersetzt kommt es ebenso zu einer Verschiebung in Richtung längeren Wellenlängen. Diese modifizierten Farbstoffe zählen zu der Stoffklasse der Carbopyronine (Carborhodamine), welches das fluoreszente Gerüst einiger der kommerziell erhältlichen Attofarbstoffe ist (z.B. Atto 620, Atto 633 und Atto 647N). Eine Rot-Verschiebung ist ebenso in der Stoffklasse der Oxazine zu beobachten. Hier wurde das zentrale Atom des Xanthen-Chromophors durch Stickstoff ersetzt. Zu dieser Stoffklasse zählen unter anderem die Attofarbstoffe Atto 655 und Atto 680 (14). Abbildung 6 zeigt die Attofarbstoffe Atto 647N und Atto 655 als Vertreter der Carbopyronine bzw. der Oxazine.

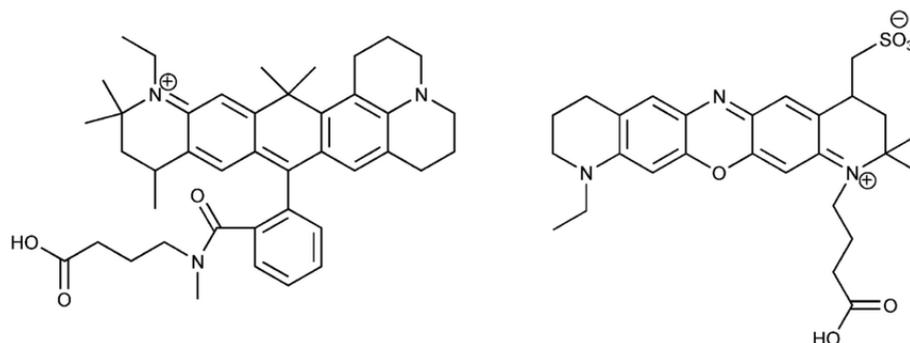


Abbildung 6: Chemische Strukturen der Attofarbstoffe ATTO 647N (links) und ATTO 655 (rechts) (Reproduced from Ref. Chem. Soc. Rev., 2014, 43, 1057 with permission from the Royal Society of Chemistry) (14).

Im Vergleich zu FPs sind organische Farbstoffe aufgrund ihrer besseren Photostabilität, ihrer geringen Größe, ihrem höheren Emissionsgrad und ihrem größeren Angebot im gesamten Spektralbereich für Einzelmolekülexperimente besser geeignet. Jedoch erfordert die Markierung von Zielmolekülen mit organischen Farbstoffen bestimmte Kopplungsreaktionen und Protein-Engineering. Zusätzlich müssen die organischen Farbstoffe zur intrazellulären Färbung in die Zelle eingeschleust werden, was für die meisten bakteriellen Zellen keine große Herausforderung darstellt. Das Einschleusen von organischen Farbstoffen in eukaryotische Zellen erfordert jedoch meistens ein invasives Eingreifen wie durch Mikroinjektion, Elektroporation oder Einschleusung über Mikropartikel, sogenannte Beads. Bei der in situ Markierung stellt der freie, ungebundene fluoreszente Farbstoff ein Problem dar, wenn er nicht vollständig z.B. durch Waschen der Zellen entfernt werden kann. Somit kann die Markierungsspezifität herabgesetzt werden und unzuverlässige Ergebnissen liefern (10). Um dieses Problem zu umgehen wurden Proben (z.B. Benzylguanin-Farbstoff Substrate) entwickelt, die fast keine basale Fluoreszenz aufweisen, jedoch nach Bindung zum Zielprotein stark fluoreszent sind (75). Im nächsten Kapitel werden chemische Tags beschrieben, die zur spezifischen, kovalenten Proteinmarkierung eingesetzt werden.

1.4.4 Chemische Tags

Chemische Tags dienen dazu, die organischen Farbstoffe mit dem zu untersuchenden Protein (Zielprotein) spezifisch zu verbinden. Hierfür gibt es eine große Anzahl an Technologien. Technisch ist die Markierung mit chemischen Tags mit der Markierung durch FPs zu vergleichen. Hierfür wird ein Plasmid kloniert, welches für die Fusion zwischen Zielprotein und chemischem Tag codiert. Danach erfolgt die Einschleusung des Plasmids in die zu untersuchenden Zellen und die Inkubation mit dem organischen Farbstoff. Dabei diffundiert der Farbstoff durch die Zellen und wird spezifisch an den chemischen Tag gebunden. Der ideale chemische Tag sollte folgende Eigenschaften erfüllen. Er sollte so klein wie möglich sein, um die Funktionsfähigkeit des Zielmoleküls

nicht zu beeinträchtigen. Die Markierung sollte spezifisch sein, um ein optimales Signal zu Rausch-Verhältnis zu gewährleisten und sie sollte schnell und quantitativ verlaufen, um eine hohe Markierungsdichte zu erzielen. Des Weiteren sollte der chemische Tag für viele biophysikalische Proben geeignet sein. Das organische Farbstoffsubstrat sollte zellpermeabel sein und ebenso wie der chemische Tag keine Cytotoxizität aufweisen. Der chemische Tag und der verwendete organische Farbstoff sollten sowohl für *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen verwendbar sein. Darüber hinaus sollte die Anwendung sowohl auf der Zelloberfläche wie auch innerhalb der Zelle oder innerhalb von Zellkompartimenten möglich sein. Es ist jedoch schwierig oder eher unwahrscheinlich, all diese Kriterien zu erfüllen. Jeder der chemischen Tags besitzt seine eigenen Vor- und Nachteile (76). Die am häufigsten verwendeten chemischen Tags lassen sich in drei Gruppen einteilen: Proteine, Peptide und unnatürliche Aminosäuren (engl. unnatural amino acids, UAAs) (77).

Protein-Tags sind meistens von Enzymen abgeleitet, die kovalent, irreversibel mit ihrem Substrat, an das der Farbstoff gebunden ist, reagieren. Zu dieser Gruppe zählen HaloTag (34 kDa) (4), CLIP-tag (20 kDa), und SNAP-tag (20 kDa) (5). SNAP-tag wird in dieser Arbeit verwendet, um das zu untersuchende Protein CheY in *E. coli* kovalent mit dem Attofarbstoff Atto 633 zu verknüpfen. Daher wird in 1.4.5 nochmals detailliert auf die Funktionsweise von SNAP-tag eingegangen. Zu den Vorteilen der Protein-Tags zählen die hohe Spezifität, eine große Auswahl an kommerziell erhältlichen Substraten und die Freiheit beliebige Farbstoffe zu verwenden. Nachteil ist jedoch die Größe, die ähnlich der Größe der FPs ist und eventuell die Funktion des Zielproteins beeinträchtigen kann. Neben den Protein-Tags, die kovalente Bindungen eingehen, gibt es ebenso Protein-Tags, die nicht-kovalente Bindungen zum Farbstoff ausbilden. Diese nicht-kovalenten Rezeptor-Liganden Paare können zur Markierung eingesetzt werden, sofern sie eine hohe Selektivität und Affinität besitzen. Hierzu zählt zum Beispiel die Dihydrofolatreduktase DHFR (78).

Peptid-Tags lassen sich in selbstmarkierende Tags als auch in Enzym-vermittelte Tags einteilen. Die selbstmarkierenden Peptid-Tags reagieren direkt mit dem fluoreszenten Stoff während bei der zweiten Gruppe die Reaktion zwischen Tag und markiertem Substrat durch Enzyme vermittelt wird. Die Markierungsspezifität wird dadurch drastisch erhöht. Zu den selbstmarkierenden Peptid-Tags, die kovalente Bindungen ausbilden zählen unter anderem TetraCys (3), hexaHis (79), polyAsp (80) und Bungarotoxin-Binding Peptid (81). Das Texas-red-binding peptide reagiert im Gegensatz dazu nur mit einer nicht-kovalenten Bindung (82).

Unnatürliche Aminosäuren (UAAs) werden *in vivo* in das zu untersuchende Protein eingebaut. Hierzu benötigt man gentechnisch veränderte Organismen, die die notwendige Maschinerie enthalten (z.B. funktionale t-RNA und tRNA-Synthetase) um eine bestimmte UAA spezifisch einzubauen. Durch den Einbau einer UAA können einzelne

spezifische Reaktionsstellen innerhalb eines Proteins geschaffen werden, die der selektiven Markierung mit Fluorophor-Konjugaten dienen (83). Die Markierung mit UAAs bietet den Vorteil einer hohen Spezifität und einer geringen strukturellen Beeinflussung des Zielproteins. Des Weiteren kann die Inkorporationsstelle wohldefiniert ausgewählt werden. Jedoch müssen bei dieser Art der Markierung sehr viele Moleküle innerhalb der Zelle auf kooperative Weise zusammenarbeiten. Dies kann zu einer relativ geringen Ausbeute an UAAs enthaltenden Proteinen führen und somit die Markierungseffizienz beeinflussen (10), (62), (84).

1.4.5 SNAP-tag

SNAP-tag ist ein chemischer Tag, der zur fluoreszenten Markierung von Proteinen dient. Er ist eine kommerzielle Variante des humanen DNA Reparatur Proteins O⁶-alkylguanine-DNA Alkyltransferase (hAGT). hAGT ist ein Kernprotein, das der Reparatur von alkylierten DNA-Strängen dient. Hierbei dealkyliert hAGT den an der O⁶-Position alkylierten Guaninrest der beschädigten DNA und überträgt diese Alkylgruppe auf einen Cystein- Rest in seinem aktiven Zentrum unter Ausbildung einer irreversiblen kovalenten Thioetherbindung. Die Substratspezifität von hAGT ist sehr gering. So reagiert hAGT ebenso mit Benzylguanin, an welches ein Fluorophor gekoppelt ist (6). Das von New England Biolabs (Ipswich, MA) kommerziell erhältliche SNAP-tag™, das eine Mutante des Wildtyp hAGT ist, ist kleiner, besitzt eine 50-fach höhere Spezifität gegenüber para-substituierten O⁶-Benzylguanin (BG) Derivaten und ist nicht nur im Kern lokalisiert. Darüber hinaus zeigt SNAP-tag keine Bindung an native DNA. Für die Markierung muss zunächst SNAP-tag an das Zielprotein (in dieser Arbeit CheY) gentechnisch fusioniert werden. Danach werden Zellen, die das SNAP-tag Fusionsprotein exprimieren mit Benzylguanin-gebundenem Farbstoff (BG-Farbstoff) inkubiert. Hierbei wird der mit dem Farbstoff gekoppelte Benzylrest an ein Cystein im aktiven Zentrum des SNAP-tag kovalent gebunden und Guanin freigesetzt. Diese kovalente Bindung des Farbstoffes an das SNAP-tag Fusionsprotein führt somit zu einer fluoreszenten Markierung des Zielproteins wie in Abbildung 7 dargestellt (85).

Für das SNAP-tag System gibt es ein großes Angebot an fluoreszenten Farbstoffsubstraten. Viele Farbstoffsubstrate sind während des gesamten Markierungsprozesses fluoreszent. Daher ist ein gründliches Waschen der Zellen notwendig, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen und somit ein hohes Signal zu Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Die Fluoreszenz einiger Farbstoffe ist jedoch im BG-Farbstoff in Anwesenheit von Guanin gelöscht (7). Dies beruht auf einem photoinduzierten Elektronentransfer zwischen Guanin (Donor) und angeregtem Farbstoff (Akzeptor). Bei diesem Ladungstransfer bildet sich ein Komplex aus, welcher strahlungslos in den Grundzustand übergeht. Im Grundzustand kann das überschüssige Elektron vom Farbstoff wieder auf Guanin übertragen werden (35). Erst durch die Bindung des Farbstoffes an das

SNAP-tag Fusionsprotein und der Freisetzung von Guanin steigt die Fluoreszenzintensität des an das SNAP Fusionsprotein gebundenen Farbstoffes drastisch an. Ein Überschuss an ungebundenem, gelöschtem BG-Farbstoff trägt aufgrund der Fluoreszenzlöschung nur zu einem geringen Anteil des Fluoreszenzsignals bei. Gelöschte BG-Farbstoffe erzielen somit eine sehr viel höhere Spezifität im Vergleich zu den ungelöschten BG-Farbstoffen.

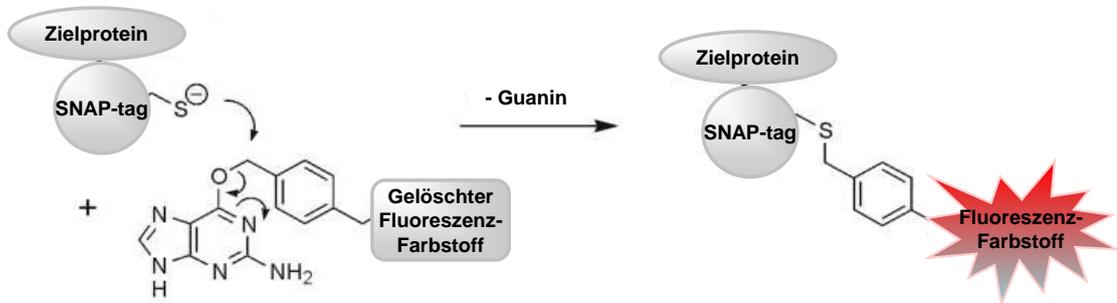


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der kovalenten Markierung eines SNAP-tag Fusionsproteins mit einem Benzylguanin-Substrat.

Eine weitere hAGT Variante ist CLIP-tag, welches mit farbstoffgekoppeltem O²-Benzylcytosin, an welches ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, reagiert. Trotz der Ähnlichkeit zwischen SNAP-tag und CLIP-tag bieten beide Methoden eine hohe Substratspezifität und können somit zusammen verwendet werden, um mehrere Biomoleküle gleichzeitig zu beobachten (5).

1.5 Chemotaxis in *E. coli* und das Signalprotein CheY

Die Signaltransduktion der Chemotaxis vermittelt die Orientierung von beweglichen Bakterienzellen in einem chemischen Gradienten (Abbildung 8). Dadurch ist es den zwei bis drei Mikrometer langen und ca. ein Mikrometer dicken Bakterien möglich, sich durch Rotationsbewegung ihrer Flagellen in Richtung höherer Lockstoffkonzentrationen zu bewegen oder Schreckstoffe zu vermeiden (86), (87), (88), (89).

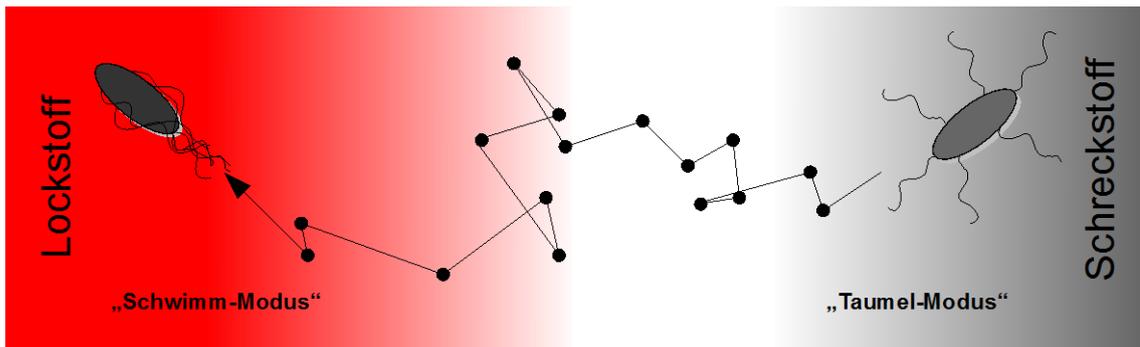


Abbildung 8: Orientierungsverhalten von *E. coli*-Bakterien in einem chemischen Gradienten.

Rotieren die 4-6 Flagellen, die in der Membran über die gesamte Oberfläche der *E. coli*- Zelle verteilt sind gegen den Uhrzeigersinn (counter-clockwise, CCW) so bilden sie ein Bündel und treiben die Zelle für eine bestimmte Zeit in eine gezielte Richtung (schwimmende Bewegung). Bei einer Rotation im Uhrzeigersinn (clockwise, CW) fallen die Geißeln auseinander und bewirken eine taumelnde Bewegung der Zelle und somit eine Neuorientierung (90). Lockstoffe sind für *E. coli* vor allem Aminosäuren und Zucker (z.B. Aspartat, Serin und Ribose). Nickel und Cobalt werden als Schreckstoffe wahrgenommen. Bakterien, die sich in einem Gradienten bewegen, wählen zunächst per Zufall eine Schwimmrichtung aus. Sie können jedoch schnell wahrnehmen, ob diese Schwimmrichtung vorteilhaft ist oder nicht und steuern ihre Bewegung in Richtung einer bevorzugten Umgebung. Hierzu müssen die Bakterien in Sekundenbruchteilen auf die Chemo-Effektor Konzentration reagieren und den Stimulusgrad zu einer gegebenen Zeit mit dem von vor 1-2 Sekunden vergleichen und ebenso ihr Gedächtnis aktualisieren. Typischerweise sind diese Prozesse auf 1-2 Sekunden begrenzt, da sich auf einer längeren Zeitskala die Zelle durch Brownsche Bewegung neu orientieren müsste. Die chemosensorische Signaltransduktion in *E. coli* erfolgt über ein Zweikomponenten – System, welches auf einem Phosphattransfer zwischen einer Sensorkinase und einem Responseregulator beruht (Abbildung 9).

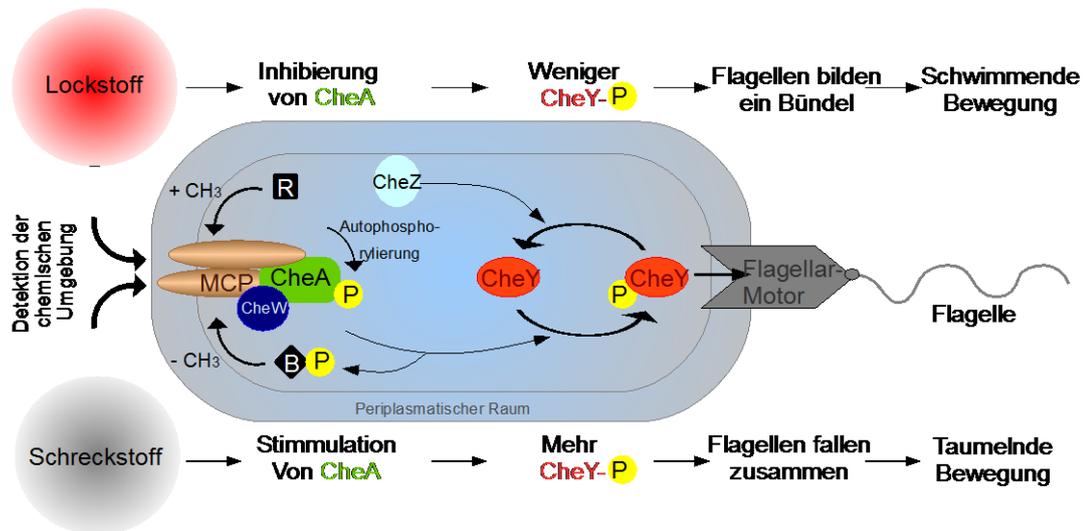


Abbildung 9: Chemotaxis in *E. coli*.

E. coli besitzen fünf verschiedene Chemorezeptortypen (Tar, Tsr, Tap, Trg, Aer), die nicht nur eine Reihe an Aminosäuren, Zucker und Dipeptide, sondern auch den pH-Wert, die Temperatur und das Redoxpotential erkennen (91), (92). Tausende dieser Chemorezeptorproteine bilden große Rezeptor-Cluster, in welchen Rezeptoren mit unterschiedlicher Ligandenspezifität in Gruppen angeordnet sind. Diese Rezeptor-Cluster sind vor allem an den polaren Enden der Zelle und zum Teil entlang des Zellkörpers (lateral) zu finden. Hierdurch wird sichergestellt, dass bei Zellteilung die Cluster auf die Tochterzellen aufgeteilt werden (92). Bei den Chemorezeptoren handelt es sich um membrandurchspannende Methyl-akzeptierende chemotaktische Proteine (MCPs), die eine periplasmatische Ligandenbindungs-Domäne und eine cytoplasmatische Signal- und Adaptationsdomäne besitzen. Zusammen mit Chemotaxis (Che)-Proteinen bilden sie große sensorische Komplexe (93), (94). So binden zum Beispiel die Auto-kinase CheA und das nicht katalytische Linkerprotein CheW an die Signaldomäne (95). MCPs, CheW, CheA und CheZ bilden somit eine stabile Einheit, an die sich CheR, CheB und CheY dynamisch anlagern (86). Eine Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung, die auf die cytoplasmatische Domäne übertragen wird (96) und dadurch die Autophosphorylierungsaktivität der rezeptorassoziierten Kinase CheA moduliert. Bei Bindung eines Lockstoffes wird die Aktivität von CheA vermindert. Ein Anstieg der Schreckstoffkonzentration verstärkt dessen Autophosphorylierungsaktivität (91). CheW besitzt keine katalytische Aktivität. Es unterstützt die CheA Bindung und ist an der rezeptorvermittelten Regulation von CheA beteiligt (97). Phosphoryliertes CheA dient als Phosphat-Donor für die intrazellulären Signalproteine CheY und CheB. Der phosphorylierte Responseregulator CheY wird vom polaren Rezeptorcluster abgelöst und diffundiert zum Flagellenmotor, wo er an die Motorproteine FliM und FliN bindet und eine Änderung der Drehrichtung von CCW nach CW bewirkt und die Zelle dadurch eine taumelnde Bewegung ausführt (98), (99), (100), (101). Eine schnelle Beendigung

der Signaltransduktion und damit Unterdrückung dieser Taumelbewegungen wird durch CheZ und weniger durch die Kinaseaktivität von CheA bewirkt. CheZ ist eine spezifische Phosphatase, welche CheY-P im Bruchteil einer Sekunde dephosphoryliert (88). CheY unterliegt ebenso einer spontanen Dephosphorylierung. Jedoch ist diese spontane Dephosphorylierung, welche innerhalb einiger Sekunden abläuft (94) zu langsam um eine optimale Chemotaxis zu gewährleisten. Im Falle einer konstanten Ligandenkonzentration adaptiert das Signalsystem. Es kehrt zu seinem Grundzustand zurück, welches eine schnelle Reaktion auf neue Konzentrationsänderungen gewährleistet (102). Die für die Adaptation spezifischen, intrazellulären Signalproteine CheR und CheB bewirken durch Methylierung und Demethylierung der Rezeptoren eine Konformationsänderung und daraus folgend eine Änderung in der Kinaseaktivität, der CheY-P Konzentration und der Rotation der Geißeln (96). Eine weitere Anpassung an wechselnde CheY-P Konzentrationen ist die Änderung des Anteils des FliM Motorproteins. Als Antwort auf einen Abfall der CheY-P Konzentration steigt die Anzahl der FliM Untereinheiten, welches die Motorsensitivität erhöht (103), (102). Die Zeiten, in der die verschiedenen Phasen der Chemotaxis ablaufen variieren deutlich. Die Ligandendetektion liegt im Millisekunden Bereich und die intrazelluläre Signalübertragung zum Motor bei hunderten an Millisekunden. Die Adaptation ist von der Stärke der Stimulation abhängig. Daher kann diese im Bereich von zehn bis hunderten Sekunden erfolgen (98), (90).

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Entwicklung und Charakterisierung einer Methode sein, die eine spezifische Fluoreszenz-Markierung von Signalproteinen in lebenden Zellen ermöglicht. Die Markierungsmethode sollte die Beobachtung der Proteindynamik auf Einzelmolekülebene ermöglichen, welche im Gegensatz zu Ensembelmessungen Informationen über statische und dynamische Heterogenitäten des Systems liefern kann. Durch die Kombination einer spezifischen Markierung mit geeigneten organischen Fluoreszenzfarbstoffen und einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung sollten Proteine und deren dynamische Prozesse untersucht werden, die einen tieferen Einblick in die molekularen Vorgänge bei der Signaltransduktion in lebenden Zellen geben können.

Als Modellsystem für die Signaltransduktion sollte die bakterielle Chemotaxis gewählt werden, da sie relativ einfach und robust, aber gleichzeitig sehr leistungsfähig ist. *E. coli*-Zellen können mit Hilfe der Chemotaxis in ihrer Umgebung Konzentrationsänderungen von Lock- und Schreckstoffen erkennen und darauf reagieren. Zahlreiche membrangebundene Rezeptoren, Motorproteine und cytoplasmatische Chemotaxisproteine, wie z.B. das Regulatorprotein CheY sind an dieser Signalweiterleitung beteiligt.

Zur Untersuchung und fluoreszenten Markierung des Regulatorproteins CheY sollte SNAP-tag verwendet werden, ein Proteinmarkierungssystem, welches die spezifische und kovalente Anbindung von nahezu jedem Molekül an ein zu untersuchendes Protein erlaubt. Die genetische Fusion des SNAP-tag an CheY sollte die Markierung des Regulatorproteins mit verschiedenen organischen Fluoreszenzfarbstoffen erlauben. Hierfür ist jedoch ein gut konzipiertes Markierungsprotokoll unabdingbar. Der zu verwendende Farbstoff und die Markierungsmethode müssen sowohl zu den experimentellen Bedingungen als auch zu dem biologischen System passen, da sonst eine unspezifische Markierung die Messergebnisse signifikant verändert. Vor der Durchführung der Einzelmolekülexperimente in lebenden *E. coli*-Zellen sollten daher zunächst unterschiedliche Farbstoffe hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften, ihrer Zellgängigkeit und ihrer Markierungseffizienz untersucht werden. Für die anschließende Untersuchung des Regulatorproteins CheY in lebenden *E. coli*-Zellen auf Einzelmolekülebene, sollte die TIRF-Mikroskopie angewendet werden. Es sollten Proteininteraktionen zwischen CheY und seinen Interaktionspartnern vor und nach Lockstoff-Stimulation beobachtet werden, um daraus Aussagen über die Bindungskinetik von CheY ableiten zu können.

3 Experimente und Ergebnisse

Der vorliegende Teil „Experimente und Ergebnisse“ wird in 5 Abschnitte untergliedert. Im ersten Abschnitt werden die Herstellung der BG-Farbstoffe und ihre Charakterisierung bezüglich der Fluoreszenzlöschung und der Reaktion mit dem SNAP-Protein beschrieben, bevor das photophysikalische Verhalten (Photostabilität und Blinken) der Farbstoffe mittels TIRF-Mikroskopie untersucht wird. Im zweiten Abschnitt wird die *in vivo* Fluoreszenz-Markierung von Biomolekülen am Beispiel des Chemotaxisproteins CheY mit dem SNAP-tag System demonstriert und qualitativ wie quantitativ untersucht. Der dritte Abschnitt zeigt die Entwicklung und Etablierung einer Fluoreszenz-Markierungsmethode, die die Detektion einzelner CheY-Moleküle in lebenden Zellen erlaubt. Die Beobachtung einzelner CheY-Moleküle wird in Abschnitt 4 präsentiert während im letzten Abschnitt auf die Untersuchungen zum Bindungsverhalten des CheY-Proteins eingegangen wird. Das detaillierte Durchführungsprotokoll jedes Versuchs ist dem Methodenteil 5 dieser Arbeit zu entnehmen.

3.1 Herstellung und Charakterisierung der BG-Farbstoffe

3.1.1 Attofarbstoffe und deren Kopplung an Benzylguanin

Bei den für diese Arbeit ausgewählten Farbstoffe Atto 620, Atto 633, Atto 655 und Atto 680 handelt es sich um kommerziell erhältliche Produkte der Firma ATTO-TEC, die im roten Wellenlängenbereich emittieren. In diesem Spektralbereich ist die Autofluoreszenz der Zelle deutlich vermindert, welches eine hintergrundreduzierte Detektion von Biomolekülen ermöglicht. Laut ATTO-TEC ist die Stabilität der Chromophore sehr hoch und des Weiteren sind sie mehr oder weniger temperatur- und lösungsmittelunabhängig (72). Die Farbstoffe Atto 620 und Atto 633 stammen aus der Gruppe der Carbopyronine während Atto 655 und Atto 680 den Oxazinen zugeordnet sind. Die Spezifikation des jeweiligen Farbstoffs ist dem Material- und Methodenteil 5.1 zu entnehmen. Die Farbstoffe wurden als NHS-Ester mit Benzylguanin versetzt. In einer nucleophilen Substitutionsreaktion wird der Farbstoff unter Freisetzung von N-Hydroxysuccinimid an Benzylguanin gebunden (5.1.1). Durch eine anschließende Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography – HPLC) wurde der BG-Farbstoff aus dem Kopplungsgemisch abgetrennt und somit aufgereinigt (5.1.2). Die Bestimmung der Konzentration der BG-Farbstoffe erfolgte über die Absorptionsspektroskopie (5.1.3) und die Überprüfung der Molekülmasse durch Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie ESI-MS (5.1.4). In den folgenden Untersuchungen

wurde in Zusammenarbeit mit Katharina Dach und Anne Schubert im Rahmen einer Master- (104) bzw. einer Staatsexamens-Arbeit (37) die Fluoreszenzlöschung der BG-Farbstoffe sowie deren Reaktion mit dem SNAP-Protein untersucht.

3.1.2 Bestimmung der Fluoreszenzlöschung der BG-Farbstoffe

Da die Anwesenheit von Guanin im BG-Farbstoff die Fluoreszenz des Farbstoffes durch photoinduzierten Elektronentransfer vermindert bzw. vollständig löschen kann, soll in diesem Abschnitt die Effizienz dieser Löschung bestimmt werden. Hierzu wurde die Fluoreszenz der BG-Farbstoffe (10^{-6} M) mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen (5.1.5) und mit der Fluoreszenz des freien Farbstoffes (10^{-6} M) verglichen. Die entsprechenden Fluoreszenzspektren sind dem Anhang A1 zu entnehmen. Der relative Anteil der Fluoreszenzlöschung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Relativer Anteil der Fluoreszenzlöschung der BG- Farbstoffe in %.

BG-Farbstoff	Fluoreszenzlöschung des BG-Farbstoffs [%]
BG-Atto 620	89
BG-Atto 633	84
BG-Atto 655	98
BG-Atto 680	98

Die Daten zeigen, dass die Oxazine Atto 655 und Atto 680 in Anwesenheit von Guanin mit 98% die höchste Fluoreszenzlöschung aufweisen, gefolgt von den Carbopyroninen Atto 620 bzw. Atto 633 mit 89% bzw. 84%.

3.1.3 Reaktion zwischen den BG-Farbstoffen und dem SNAP-Protein

Wie im Theorieteil (1.4.5) erläutert, reagieren die BG-Farbstoffe mit dem SNAP-Protein. Bei dieser Reaktion wird Guanin freigesetzt. Dadurch entfällt der durch Guanin hervorgerufene photoinduzierte Elektronentransfer. Demzufolge steigt die Fluoreszenz des an das SNAP-Protein gekoppelten Farbstoffs wieder an, was hier als ein Indikator für die Reaktion zwischen BG-Farbstoff und SNAP-Protein dient. Zur Überprüfung der Effizienz dieser Kopplungsreaktion wurden diese BG-Farbstoffe mit aufgereinigtem SNAP-Protein (5.2.2) versetzt und der resultierende Fluoreszenzanstieg gemessen (5.1.5). In einer Messreihe (Abbildung 10) wurde zunächst am Beispiel von BG-Atto 655 die Effizienz der Kopplungsreaktion in Abhängigkeit der SNAP-Konzentration er-

mittelt. Die BG-Atto 655 Konzentration betrug 10^{-6} M, die des SNAP-Proteins 10^{-6} , 2×10^{-6} bzw. 5×10^{-6} M. Die ansteigende Fluoreszenzintensität I_F wurde bei Raumtemperatur über eine Dauer von 80 Minuten mit einem Fluoreszenz-Spektrophotometer detektiert (5.1.5). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Graphen auf den Anfangswert der Fluoreszenzintensität (gemessen bei 684 nm) normiert und gegen die Zeit nach Zugabe von SNAP-Protein graphisch dargestellt. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit werden die Anfangswerte typischerweise (105) mit einer linearen Funktion angepasst und die Steigungen der Kurven bestimmt:

$$\bar{I}_F = b \cdot t + a \quad (5)$$

Der Parameter a und die Reaktionsrate b der linearen Anpassungsgleichung sind in A.2 in Tabelle 12 mit den zugehörigen Standardabweichungen gelistet.

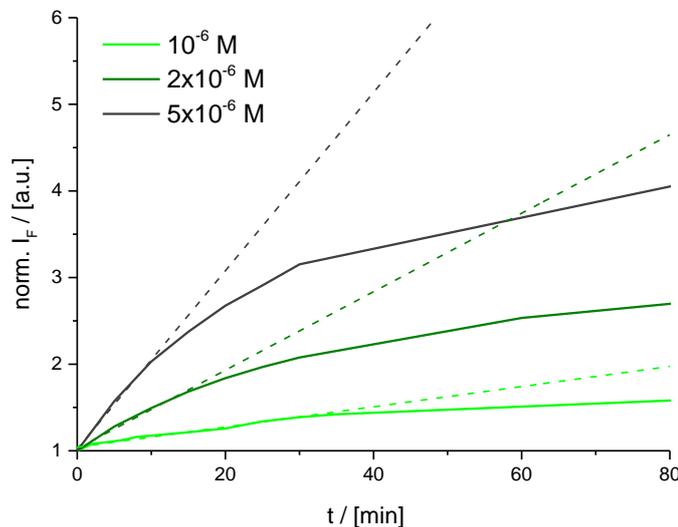


Abbildung 10: Fluoreszenzanstieg von BG-Atto 655 (10^{-6} M) nach Zugabe unterschiedlicher SNAP-Konzentrationen (10^{-6} , 2×10^{-6} bzw. 5×10^{-6} M). Die Graphen sind auf den Anfangswert der Fluoreszenzintensität (gemessen bei 684 nm) normiert. Die gestrichelten Linien sind die linearen Anpassungskurven.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, reagiert BG-Atto 655 mit dem SNAP-Protein unter einem Anstieg der Fluoreszenzintensität I_F . Je höher die SNAP-Protein Konzentrationen desto höher die Reaktionsrate b und damit I_F , bis schließlich ein Gleichgewicht erreicht wird. Bei einer äquivalenten SNAP-Proteinkonzentration (10^{-6} M) beträgt die Reaktionsrate $b = 0,01 \text{ min}^{-1}$ während sie bei einem zweifachen bzw. einem 5-fachen Überschuss auf $0,05 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,1 \text{ min}^{-1}$ ansteigt. Bei einem 5-fachen Überschuss des SNAP-Proteins hat sich die Fluoreszenzintensität innerhalb der ersten 30 Minuten verdreifacht (3,2 x), während sie bei einem zweifachen Überschuss bzw. einer äquivalenten Konzentration

nur auf das 2,1-fache bzw. 1,4-fache angestiegen ist. Im Folgenden wurden die Fluoreszenzanstiege der verschiedenen BG-Farbstoffe nach SNAP-Protein Zugabe ermittelt. Bei diesen Experimenten wurde zunächst die Fluoreszenz des jeweiligen BG-Farbstoffs (10^{-6} M) gemessen. Im Anschluss wurde SNAP-Protein hinzugefügt. Bei diesen Messungen wurde eine 50-fach höhere Konzentration des SNAP-Proteins ($c = 5 \times 10^{-5}$ M) verwendet, um eine relativ schnelle Kopplung zu gewährleisten. Die Messung der Fluoreszenz im Abstand von 5 Minuten wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrophotometer aufgezeichnet. Die zugehörigen Fluoreszenzspektren sind im Anhang A.1 zu finden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Effizienzen der Kopplungsreaktion der BG-Farbstoffe von Atto 620, Atto 633, Atto 655 und Atto 680 wurden die Integrale der Fluoreszenzspektren der jeweiligen Farbstoffe auf den Anfangswert normiert und gegen die Zeit nach Zugabe von SNAP-Protein graphisch dargestellt (Abbildung 11). Die Kurven wurden ebenfalls mit einer linearen Funktion angepasst (5). Die zugehörigen Parameter sind im Anhang A.2 in Tabelle 13 aufgeführt.

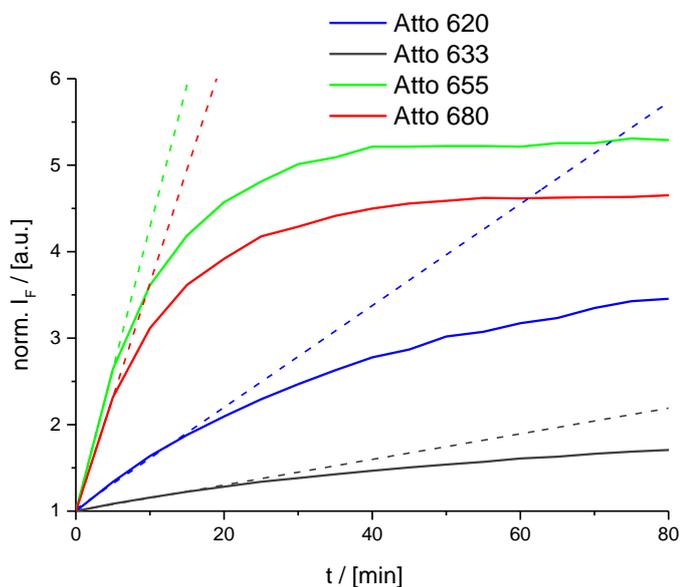


Abbildung 11: Fluoreszenzanstieg für BG-Atto 620 (blau), BG-Atto 633 (schwarz), BG-Atto 655 (grün) und BG-Atto 680 (rot) in Abhängigkeit der Zeit nach Zugabe von SNAP-Protein (5×10^{-5} M). Die gestrichelten Linien sind Anpassungskurven (lineare Fitfunktionen).

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass bei allen BG-Farbstoffen eine Reaktion mit SNAP-Protein zu verzeichnen ist. Die Kopplungsreaktion zwischen BG-Atto 655 mit 5×10^{-5} M SNAP-Protein zeigt eine viel schnellere Kopplungsreaktion ($0,33 \text{ min}^{-1}$) als mit 5×10^{-6} M SNAP-Protein ($0,1 \text{ min}^{-1}$) in Abbildung 10. Beim Vergleich der Kopplungsreaktionen der BG-Farbstoffe 620, 633, 655 und 680 sind unterschiedliche Geschwindigkeiten zu verzeichnen. Die als BG-Farbstoff vorliegenden Oxazine Atto 655 ($0,33 \text{ min}^{-1}$) und Atto 680 ($0,26 \text{ min}^{-1}$) reagieren deutlich schneller mit dem SNAP-Protein, als die BG-Farbstoffe der Carbopyronine Atto 620 ($0,06 \text{ min}^{-1}$) und Atto 633 ($0,02 \text{ min}^{-1}$). Demzu-

folge wurde nach 30 Minuten bei BG-Atto 655 die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Anfangswert verfünffacht und bei BG-Atto 680 etwas mehr als vervierfacht (4,3x). Bei BG-Atto 620 bzw. BG-Atto 633 hingegen war der Anstieg der Fluoreszenz nach 30 Minuten geringer. Für BG-Atto 620 wurde ein 2,5-facher Anstieg verzeichnet, während bei BG-Atto 633 sich die Fluoreszenzintensität nur um das 1,4-fache erhöht hat.

3.1.4 Detektion der Farbstoffe mittels TIRF-Mikroskopie

Für die Einzelmoleküldetektion ist es sehr wichtig zu verstehen, wie die Eigenschaften der verwendeten Fluorophore die in den Experimenten gemessenen Intensitätssignale beeinflussen können. So können Prozesse wie Bleichen oder Photoblinken des verwendeten Farbstoffs zu irrtümlichen Interpretationen der biologischen Daten führen. Im Gegensatz dazu kann jedoch bei eingehender Kenntnis dieser photophysikalischen Eigenschaften aus den gemessenen Fluoreszenzsignalen Informationen über das untersuchte biologische System gewonnen werden (14). Für die Untersuchung von Proteininteraktionen in einem lebenden biologischen System ist es daher wichtig einen Farbstoff zu verwenden, der eine hohe Photostabilität und keine Fluoreszenzunterbrechungen aufweist und somit eine kontinuierliche Beobachtung erlaubt. Um zu evaluieren, welcher Farbstoff durch ein geringes Maß an Fluoreszenzunterbrechungen und einer hohen Photostabilität gekennzeichnet ist und somit für die kontinuierliche Beobachtung von Molekülen in einem lebenden biologischen System in Kapitel 3.2 tauglich ist, wurde in den nächsten Experimenten das Blink- und Photobleich-Verhalten der an SNAP gekoppelten Attofarbstoffe mittels TIRF-Mikroskopie (5.4.3) untersucht. Hierzu wurden die Farbstoffe als sog. SNAP-Farbstoffe auf einer Oberfläche immobilisiert. Dies erfolgte durch die Kopplung der BG-Farbstoffe an das SNAP-Protein, welches wie im Methodenteil (5.1.6) beschrieben, über einen Antikörper auf eine Glasoberfläche gebunden wurde. Um des Weiteren eine Aussage treffen zu können, ob das SNAP-Protein einen Einfluss auf das photophysikalische Verhalten der Farbstoffe ausübt, wurden die 4 Farbstoffe ohne SNAP-Protein an die Oberfläche gebunden. Diese Immobilisierung erfolgte durch eine Standardmethode, bei der wie in Abbildung 12 dargestellt der Farbstoff an ein Oligonukleotid gekoppelt wird und als sogenannter Oligo-Farbstoff über die Biotin-Streptavidin Technik immobilisiert wird (5.1.6). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass mit dieser Methode nur bedingt Rückschlüsse auf den Einfluss des SNAP-Proteins möglich sind, da ebenso das Oligonukleotid den Farbstoff beeinflussen kann.

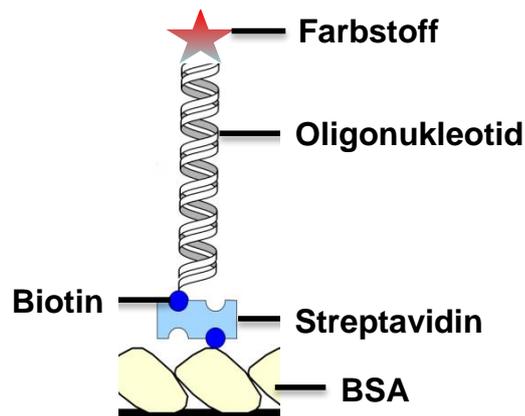


Abbildung 12: Biotin-Streptavidin Technik.

Zur TIRF-Mikroskopie wurden die Proben mit Tetheringpuffer (TP) bedeckt. Um des Weiteren den Einfluss der chemischen beziehungsweise biologischen Umgebung auf das photophysikalische Verhalten zu verifizieren und sich dem biologischen Ideal anzunähern wurde der für die Untersuchungen in lebenden *E. coli*-Zellen verwendete Farbstoffe Atto 633 auch in Zelllysat (ZL) untersucht und somit die Umgebungsbedingungen in der Zelle nachgeahmt. Mittels TIRF Mikroskopie wurden von den immobilisierten Fluorophore Filme bestehend aus 2000 Bildern mit einer Belichtungszeit von 30 Millisekunden (ms) aufgenommen. Abbildung 13 zeigt links exemplarisch die TIRF-Aufnahmen von SNAP- und rechts von Oligo-Atto 633 Molekülen in TP.

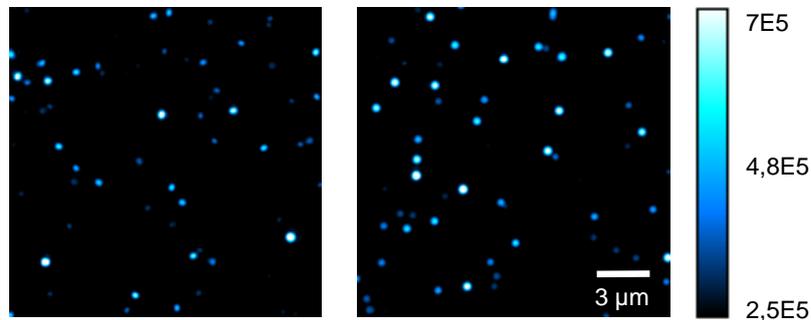


Abbildung 13: Summenbildausschnitt eines TIRF-Filmes (2000 Bilder) von einzelnen, auf einer Glasoberfläche immobilisierten SNAP- (links) und Oligo-Atto 633 Molekülen (rechts) in TP, mit einer Belichtungszeit von 30 ms.

In den Summenbildern sind einzelne immobilisierte Atto 633 Moleküle als eindeutig separierte fluoreszente Punkte mit unterschiedlichen Intensitäten und unterschiedlichen Durchmessern zu erkennen. Die sehr großen, hellen Punkte bei den SNAP-Farbstoffen (links) und den Oligo-Farbstoffen (rechts) werden wahrscheinlich durch die mögliche Anbindung mehrerer Farbstoffmoleküle hervorgerufen.

Mit diesen beiden Methoden ist es somit möglich die Atto-Farbstoffe auf einer Lab-Tek Oberfläche zu immobilisieren, um das Fluoreszenzverhalten der Farbstoffe über einen bestimmten Zeitraum zu untersuchen. Hierzu wurden im folgenden Kapitel die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Punkte mit der im Methodenteil beschriebenen ALEX-TIRF Analysis Software (5.5.1) extrahiert und in Abhängigkeit der Messdauer dargestellt.

3.1.5 Fluoreszenzintensitäts-Zeitspuren von immobilisierten Attofarbstoffen und deren Kategorisierung

Der einfachste und gängigste Weg die detektierte Fluoreszenz zu repräsentieren ist die Fluoreszenzintensitäts-Zeit ($I_F(t)$)-Spur. Die detektierte Intensität I_F wird als eine Funktion in Abhängigkeit der Zeit t beschrieben. Vorteil der $I_F(t)$ -Spur ist, dass es sich hier um die Rohdaten handelt, die frei sind von jeglichen Änderungen oder Approximationen (106). Zur Untersuchung des Blinken und des Photobleichen der einzelnen SNAP- und Oligo-Farbstoffe, wurden zunächst die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Spots über die gesamte Zeit des aufgenommenen Filmes, wie im Methodenteil 5.5.1 beschrieben, extrahiert. Abbildung 14 und Abbildung 15 demonstrieren exemplarisch am Beispiel von SNAP-Atto 633 die Fluoreszenzintensitäts-Zeit Spuren von 4 einzelnen Spots und die zugehörigen TIRF-Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeiten der Filmaufnahme. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es sich bei diesen 4 Beispielen um Fluoreszenzintensitäten handelt, die nicht um das Hintergrundrauschen korrigiert sind. Abbildung 14a zeigt einen Spot, der in dem ersten Summenbild (9-12 Sekunden) eine viel stärkere Fluoreszenzintensität besitzt als im darauffolgenden Summenbild (21-24 Sekunden) bevor die Fluoreszenz in den letzten Summenbildern erlischt. Dieses Verhalten wird ebenso in der zugehörigen $I_F(t)$ -Spur widergespiegelt, bei der die Fluoreszenz über mehrere Stufen abnimmt und schließlich abrupt auf das Hintergrundrauschen abfällt. Die zwei Bleichschritte weisen zusammen mit der sehr hohen I_F auf zwei gebundene Farbstoffmoleküle hin, die stufenweise gebleicht werden. Ein typisches Merkmal, welches in $I_F(t)$ -Spuren beobachtet wird sind Fluktuationen, die die Spur in An- und Aus-Zustände teilt. So zeigen die Farbstoffmoleküle in Abbildung 14b und Abbildung 15a über die gesamte Messdauer Fluktuationen der I_F . Während in Abbildung 14b das Molekül eine mehr oder weniger konstante I_F mit sehr schnellen, nicht detektierbaren Fluktuationen aufweist, besitzt das Farbstoffmolekül in Abbildung 15a Fluktuationen mit langen An- und Auszeiten. Photoblinkzustände mit einer Dauer von einigen Sekunden sind zu beobachten. Die langen Auszeiten sind ebenso in den Filmaufnahmen erkennbar. So ist in den Zeiträumen von 15-18 Sekunden und zwischen 36-39 Sekunden kein Signal zu erkennen. Das Farbstoffmolekül in Abbildung 15b zeigt nur in dem ersten Summenbild einen deutlichen, fluoreszenten Spot während in den darauffolgenden Summenbildern keine Fluoreszenz an der gleichen Stelle mehr zu ver-

zeichnen ist. Dieses Verhalten ist ebenso in der zugehörigen $I_F(t)$ -Spur zu erkennen. Das zunächst konstante Fluoreszenzsignal unterliegt nach einer bestimmten Zeit (hier ca. 6 Sekunden) einem irreversiblen Photobleichen, welches durch den spontanen Abfall der I_F zurück auf das Hintergrundrauschen erkennbar ist.

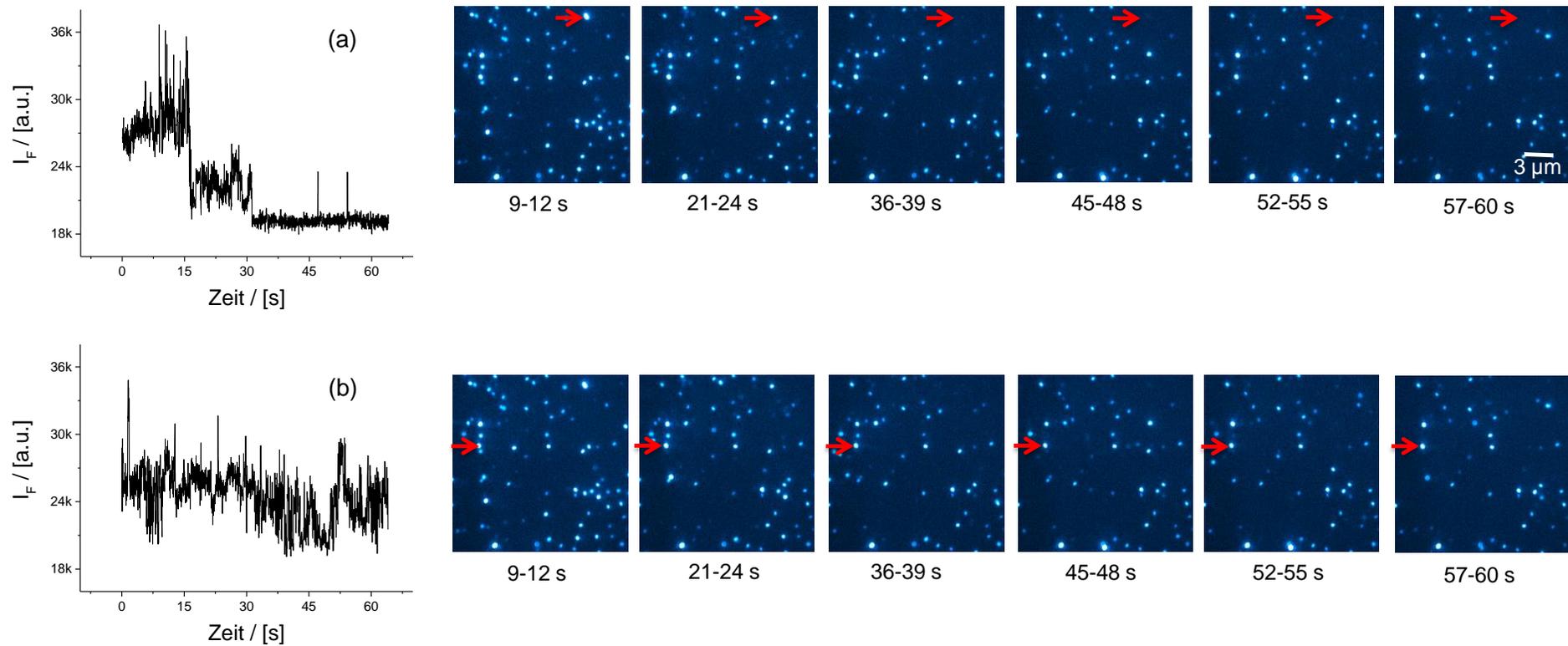


Abbildung 14: Fluoreszenzintensitätsspur und zugehörige TIRF-Aufnahmen, als repräsentative Beispiele einzelner SNAP- und Oligo-Farbstoffe am Beispiel von SNAP-Atto 633. Die dargestellten Daten sind Rohdaten, die mit der AndorSolis Software gewonnen wurden. Bei den Fluoreszenzintensitäten I_F handelt es sich um die Summe der Intensitäten aller Pixel eines ROIs (ROI, Region of interest), der um den fluoreszenten Punkt gelegt wurde. Rote Pfeile markieren den zugehörigen fluoreszenten Punkt.

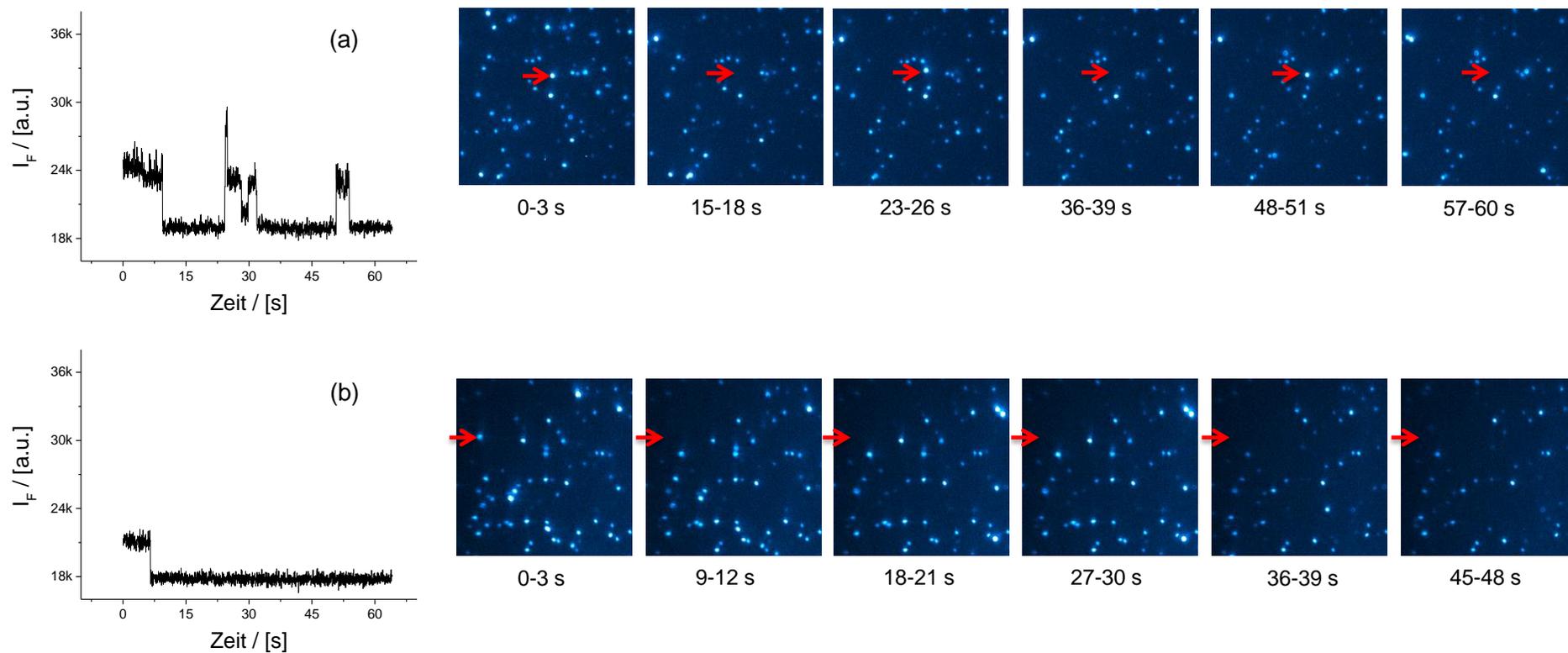
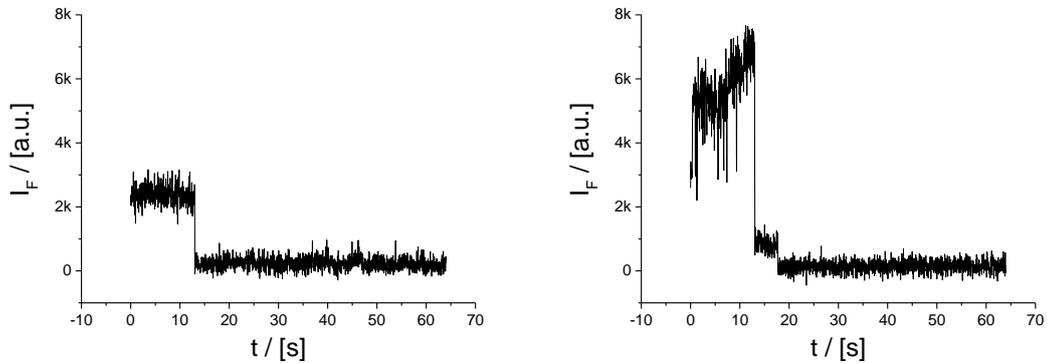


Abbildung 15: Fluoreszenzintensitätsspur und zugehörige TIRF-Aufnahmen, als repräsentative Beispiele einzelner SNAP- und Oligo-Farbstoffe am Beispiel von SNAP-Atto 633. Die dargestellten Daten sind Rohdaten, die mit der AndorSolis Software gewonnen wurden. Bei den Fluoreszenzintensitäten I_F handelt es sich um die Summe der Intensitäten aller Pixel eines ROIs, der um den fluoreszenten Punkt gelegt wurde. Rote Pfeile markieren den zugehörigen fluoreszenten Punkt.

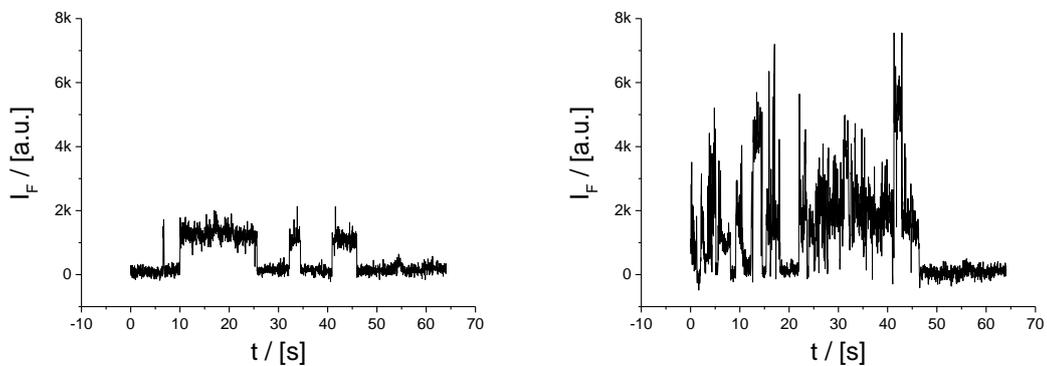
Zusammenfassend lassen sich die $I_F(t)$ -Spuren aller SNAP- und Oligo-Farbstoffe, aufgrund ihrer An/Aus-Zeiten Charakteristik, in die Kategorien I-III eingruppiert (Abbildung 16). Je Kategorie werden zwei Beispiele mit unterschiedlich hoher Fluoreszenzintensität gezeigt. Zur Kategorisierung wurden die um das Hintergrundrauschen korrigierten Fluoreszenzintensitäten verwendet. Daher liegen die Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 16 deutlich unterhalb der Fluoreszenzintensitäten aus Abbildung 14 und Abbildung 15. Es ist zu beachten, dass es sich, wie bereits erwähnt bei den detektierten Spots nicht immer eindeutig um nur ein gebundenes Farbstoffmolekül handeln kann. So weisen sehr hohe Intensitäten (10000 a.u.) üblicherweise auf mehrere Fluorophore hin. Dies kann durch die in Kapitel 3.1.4 beschriebene Immobilisierung der Attofarbstoffe hervorgerufen werden. Der bei der Immobilisierung der SNAP-Farbstoffe verwendete Antikörper weist zwei mögliche Bindungsstellen auf, an die der SNAP-Farbstoff binden kann. Dies kann dazu führen, dass zwei Farbstoffmoleküle gleichzeitig im Fokus sind und als ein einziges Signal detektiert wird. Das gleiche Phänomen ist bei den Oligo-Farbstoffen zu beobachten, bei denen bis zu drei Oligo-Farbstoffe an ein Streptavidin binden können.

Nachfolgend sind die $I_F(t)$ -Spuren in die Kategorien I-III eingeteilt.

(I) Emissionsspuren, die nach kurzer Zeit gebleicht sind



(II) Emissionsspuren mit langen An- und Auszeiten



(III) Emissionsspuren, die eine kontinuierliche Fluoreszenz aufweisen

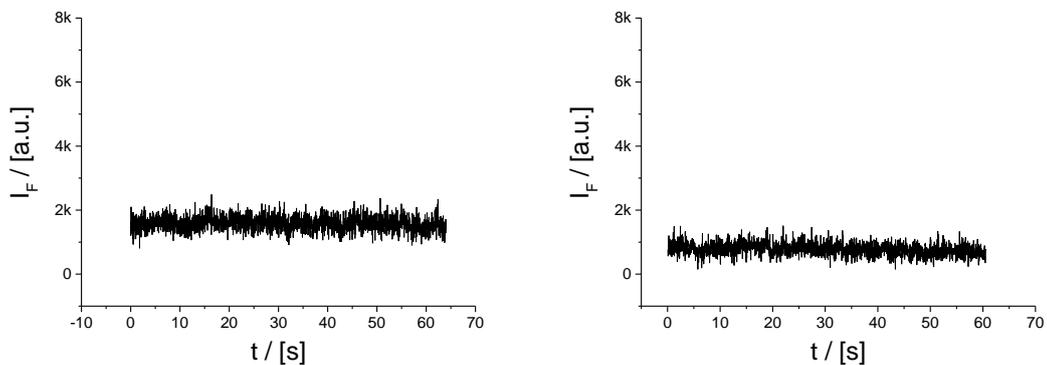


Abbildung 16: Kategorisierung der Fluoreszenzintensitätsspuren der SNAP- und Oligo-Farbstoffe. Zur Gruppe I zählen Fluoreszenzintensitätsspuren, die einen oder mehrere Bleichschritt(e) besitzen. Der Gruppe II sind Spuren zugeordnet, deren Emissionen durch Fluktuationen mit An- und Auszeiten charakterisiert sind. Gruppe III umfasst Emissionsspuren, die eine konstant hohe oder niedrige Fluoreszenzintensität aufweisen.

Kategorie I umfasst alle Farbstoffmoleküle, die innerhalb von ca. 10-20 Sekunden in einer oder mehreren Stufe(n) einen deutlichen Intensitätsverlust von ihrer hohen An-

fangsintensität auf die Hintergrundintensität aufzeigen. Dieses Verhalten spiegelt Photobleichen wider, ein irreversibler Prozess, bei dem das π -Elektronensystem des Fluorophors zerstört wird und die Fluoreszenz schlagartig erlischt. Die Fluoreszenzabnahme erfolgt nicht kontinuierlich, sondern ist gekennzeichnet durch einen abrupten Sprung. Die stufenartige I_F -Abnahme weist auf mehrere gebundene Farbstoffmoleküle hin, deren Fluoreszenz zunächst als einziges Signal detektiert wird. Anschließend unterliegen diese Farbstoffmoleküle nacheinander dem Photobleichen. Auch hier zeigt das neu erreichte Intensitätsniveau keine großen Schwankungen.

Kategorie II beinhaltet Emissionsspuren, die durch lange bis zu mehreren Sekunden andauernden An- und Auszeiten charakterisiert sind. Photoblinkzustände mit einer Dauer von einigen Sekunden sind zu beobachten. Hier finden Übergänge in den höheren, als auch tieferen Intensitätsbereich hinein statt, bei denen die jeweiligen Intensitätsniveaus nicht zwingend im gleichen Grenzbereich liegen müssen.

Kategorie III sind Emissionsspuren zugeordnet, die ein konstant hohes (>1000 a.u.) bzw. niedriges (< 1000 a.u.) Intensitätssignal aufweisen und somit die Untersuchung der Bindungen (Bindungskinetiken) über die gesamte Messdauer erlaubt. Kategorie III stellt somit die bevorzugte Gruppe der Farbstoffe dar, die für die Messung von Proteininteraktionen geeignet ist.

Alle SNAP- und Oligo-Farbstoffe wurden den verschiedenen Klassen zugeordnet (Abbildung 17). Die Anzahl der $I_F(t)$ -Spuren, die für die Kategorisierung verwendet wurden sind Tabelle 14 und Tabelle 15 aus dem Anhang A.3 zu entnehmen. In Abbildung 17 ist links die Einteilung der SNAP-Farbstoffe und rechts die Einteilung der Oligo-Farbstoffe dargestellt, die bei der Untersuchung mit TP bedeckt waren.

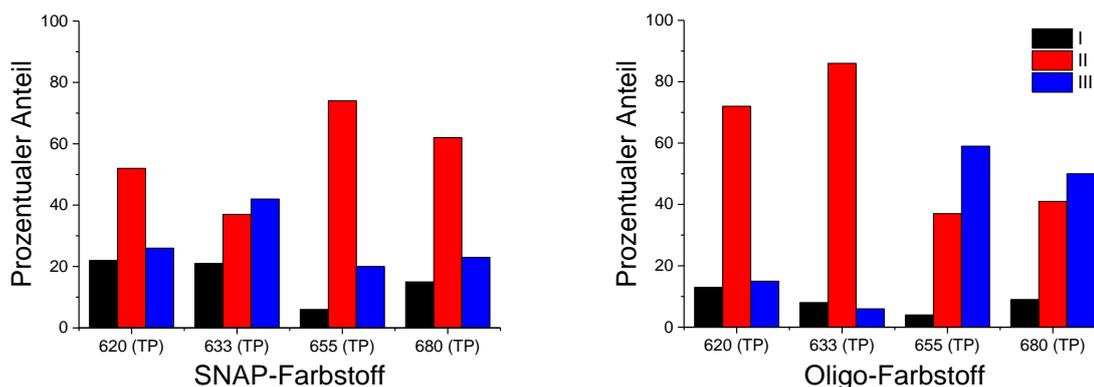


Abbildung 17: Einteilung der Emissionsspuren der SNAP- und Oligo-Farbstoffmoleküle in drei Kategorien (I-III). Gruppe I präsentiert Spuren, die über eine bzw. mehrere Stufe(n) gebleicht wurden. Gruppe II zeigt Fluoreszenzunterbrechungen während Gruppe III eine über die gesamte Messdauer kontinuierliche Fluoreszenz aufweist.

Innerhalb der SNAP-Farbstoffe ist auffällig, dass Atto 633 im Vergleich zu den anderen Farbstoffen den höchsten Anteil (42%) an $I_F(t)$ -Spuren aufweist, die eine kontinuierliche Fluoreszenz (Kategorie III, blau,) zeigen. Für Atto 620, 655 und 680 liegt der Anteil der Gruppe III nur bei ca. 20 - 26%. Diese Farbstoffe sind eher durch einen sehr hohen Anteil an $I_F(t)$ -Spuren gekennzeichnet (52%, 74% und 62%), die durch Fluoreszenzunterbrechungen geprägt sind, die ein konstantes Beobachten von Molekülen nicht erlaubt (Kategorie II, rot).

Ist Atto 633 an ein Oligonukleotid gebunden so nimmt überraschenderweise der Anteil an $I_F(t)$ -Spuren mit detektierbaren Fluoreszenzunterbrechungen (Kategorie II, rot) drastisch zu (86%), während der Anteil an $I_F(t)$ -Spuren mit kontinuierlicher Fluoreszenz (Kategorie III, blau) auf einen sehr geringen Prozentsatz (6%) abfällt. Dies ist ebenfalls bei Atto 620, welcher ebenso zur Gruppe der Carbopyronine zählt, deutlich erkennbar. Der Anteil der Emissionsspuren aus Kategorie II beträgt 72%, während Kategorie III mit kontinuierlicher Fluoreszenz nur bei 15% liegt. Interessanterweise steigt jedoch bei den zur Gruppe der Oxazine gehörenden Attofarbstoffe 655 und 680, welche an ein Oligonukleotid gebunden sind, der Anteil der Klasse III drastisch an (59% bzw. 50%).

Es ist auffällig, dass die SNAP-Farbstoffe im Vergleich zu den Oligo-Farbstoffen einen höheren Prozentsatz an gebleichten $I_F(t)$ -Spuren (Kategorie I, schwarz) aufweisen. Eine Ausnahme ist hier Atto 655, bei dem die gebleichten Moleküle in beiden Gruppen den geringsten Anteil von 6% bzw. 4% ausmachen. Bei den SNAP-Farbstoffen Atto 620, Atto 633 und Atto 680 liegt dieser Anteil bei ca. 15-22%, während bei den Oligo-Farbstoffen dieser Anteil nur 8-13% ausmacht. Im Detail betrachtet ist zu erkennen, dass sowohl bei den SNAP-Farbstoffen als auch bei den Oligo-Farbstoffen die Carbopyronine (Atto 620 und Atto 633) stärkerem Photobleichen unterliegen als die Oxazine (Atto 655 und Atto 680).

Um die Umgebungsbedingungen in der Zelle nachzuahmen wurde in einer weiteren Untersuchung der in den Lebendzelleexperimenten zur Markierung des CheY-SNAP Fusionsprotein verwendetet Farbstoff Atto 633 in Zelllysate (ZL) charakterisiert und mit SNAP-Atto 633, der mit TP bedeckt war, verglichen (Abbildung 18). Ist SNAP-Atto 633 anstelle von TP mit ZL umgeben, fällt der Anteil an $I_F(t)$ -Spuren, die eine konstante Fluoreszenz aufweisen (Gruppe III, blau) von 42% auf 31% ab. Dieser Anteil liegt jedoch immer noch im Vergleich zu den Farbstoffen Atto 620, 655 und 680, die an SNAP gebunden sind und von TP umgeben sind, deutlich höher. In ZL steigt der Anteil blinkender SNAP-Atto 633 Molekülen (Gruppe II, rot) im Vergleich zu TP von 37% auf 50% an, liegt aber immer noch deutlich unterhalb dem Anteil der blinkenden Spuren von SNAP-Atto 620, 655 und 680 in TP. Bezüglich Photobleichen zeigt SNAP-Atto 633 sowohl in TP als auch in ZL keinen großen Unterschied (Gruppe I, schwarz) (21% bzw. 19%).

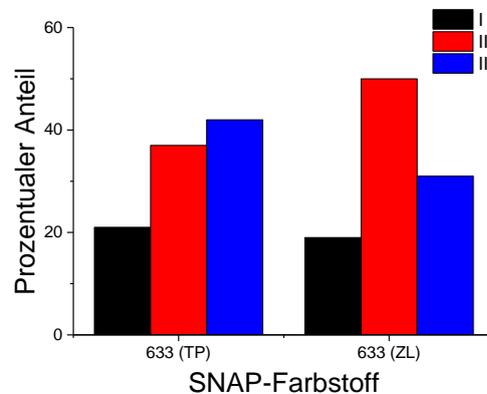


Abbildung 18: Einteilung der Emissionsspuren von SNAP-Atto 633 Farbstoffmolekülen, die mit TP bedeckt sind (links) im Vergleich zu den SNAP-Atto 633 Molekülen, die sich während der Messungen in ZL befinden (rechts). Gruppe I präsentiert Spuren, die über eine bzw. mehrere Stufe(n) gebleicht wurden. Gruppe II zeigt Fluoreszenzunterbrechungen während Gruppe III eine über die gesamte Messdauer kontinuierliche Fluoreszenz aufweist.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass Atto 633 an SNAP gebunden einen geeigneten Farbstoff für Untersuchungen von Proteininteraktionen in lebenden Zellen darstellt. Die Attofarbstoffe 620, 655 und 680 weisen an SNAP gebunden einen sehr hohen Anteil blinkender Farbstoffmoleküle auf, die ein kontinuierliches Beobachten einzelner Moleküle erschwert. Die Kenntnis dieser Eigenschaften spielt eine wichtige Rolle für die Interpretation der in Kapitel 3.2 beschriebenen Zelleexperimente. SNAP-Atto 633 bietet somit eine lange Detektionsdauer, die die Messung biologischer Prozesse ermöglicht und die Ergebnisse der Untersuchungen nicht negativ beeinflusst.

3.1.6 Photostabilität der SNAP- und Oligo-Farbstoffe

Wie bereits erwähnt ist ebenso die Photostabilität des verwendeten Farbstoffs für eine kontinuierliche Beobachtung von Biomolekülen eine wichtige Voraussetzung. Farbstoffmoleküle aus Kategorie I (siehe 3.1.5), die innerhalb 10-20 Sekunden gebleicht sind machen das Verfolgen von biologischen Prozessen unmöglich. Zur Beschreibung der Photostabilität wurde je SNAP- und Oligo-Farbstoff die Abnahme der Fluoreszenzintensität eines Ensembles von einzelnen Molekülen untersucht. Die Anzahl der untersuchten Farbstoffmoleküle je Ensemble ist Tabelle 16 und Tabelle 17 aus Anhang A.4 zu entnehmen. Abbildung 19 zeigt exemplarisch TIRF-Bilder einzelner SNAP-Atto 633 Farbstoffmoleküle in TP. Es wurde ein Film, bestehend aus 2000 Bildern, mit einer Belichtungszeit von 30 ms aufgenommen. Die Bilder, die immer das gleiche Gesichtsfeld abbilden, wurden jeweils durch Summation von 167 aufeinanderfolgenden Bildern zu den Zeitintervallen 0 bis 5 Sekunden, 25-30 Sekunden und 55-60 Sekunden gewonnen.

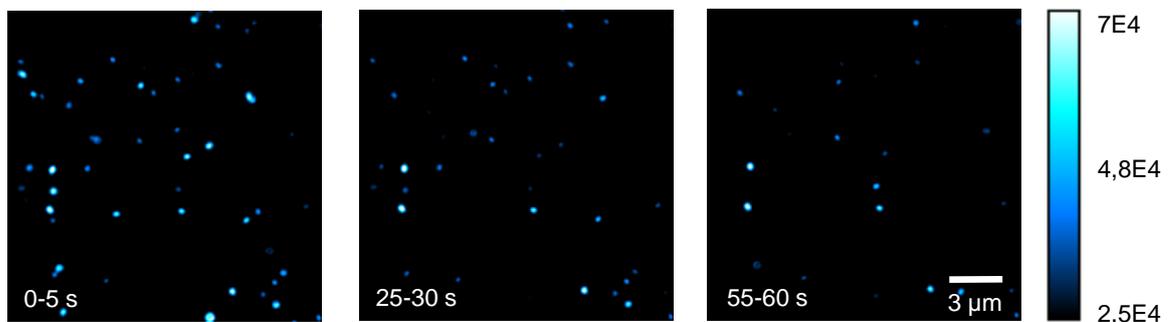


Abbildung 19: Änderung der Fluoreszenzintensität einer Einzelmolekül-Oberfläche von SNAP-Atto 633 Molekülen (in TP) während einer Detektionszeit von 60 Sekunden. Die TIRF-Bilder wurden durch Summation der Intensitäten von 167 aufeinanderfolgenden Bildern zu den Zeitintervallen 0 bis 5 Sekunden, 25 bis 30 Sekunden und 55 bis 50 Sekunden erhalten.

Für jeden Punkt mit einem Radius von drei Pixeln wurden die Intensitäten durch Summation der Intensitätswerte aller Pixel berechnet und um die Hintergrund-Intensitätswerte korrigiert. Die Hintergrund-Intensitätswerte wurden aus einem drei Pixel breiten Ring berechnet, der $r+2$ Pixel von dem Zentrum des detektierten Punktes entfernt liegt. Danach wurden diese korrigierten Fluoreszenzintensitäten (I_F) aller Farbstoffmoleküle eines Farbstoffensembles zu jedem Zeitpunkt des Filmes aufsummiert und mit OriginPro 9.1G als Bleichkurven gegen die entsprechende Zeit geplottet (Abbildung 20). Um die Vergleichbarkeit zu gewähren, wurde jeder Graph auf die maximale Fluoreszenz der jeweiligen Bleichkurve normiert. Die Kurven wurden mit einer Exponentialfunktion gefittet (6).

$$\bar{I}_F = Ae^{-\frac{t}{T}} + y_0 \quad (6)$$

Die Parameter der Fitfunktionen (A , T , y_0) und die abgeleiteten Parameter k (Bleichrate) und τ (Halbwertszeit) sind im Anhang A.4 in Tabelle 16 und Tabelle 17 mit den zugehörigen Standardabweichungen gelistet. Des Weiteren sind die aus der Exponentialfunktion abgeleiteten Fluoreszenzintensitäten (I_F) zum Zeitpunkt $t = 60$ Sekunden (Messende) aufgeführt.

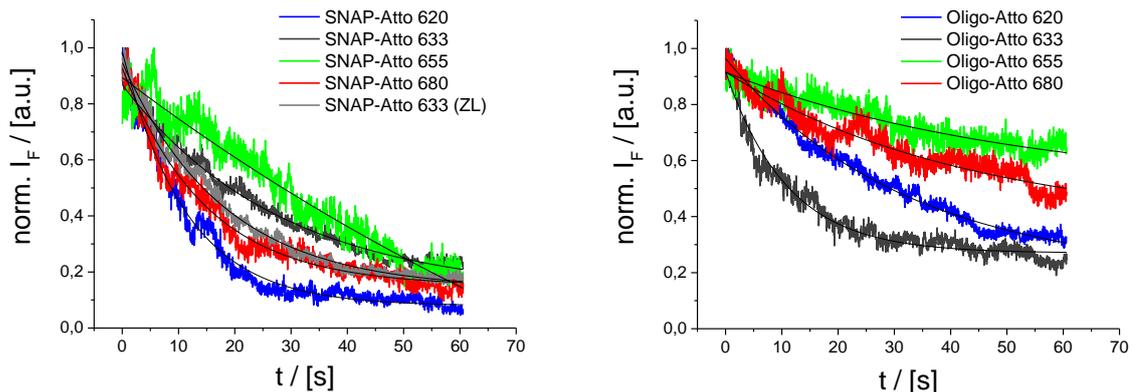


Abbildung 20: Bleichkurven. Abnahme der I_F eines Ensembles der SNAP- (links) und Oligo-Farbstoffe (rechts) in TP. Des Weiteren wird links die Bleichkurve von SNAP-Atto 633 in ZL dargestellt (graue Kurve). Die schwarzen Linien sind Anpassungskurven (Exponential-Fitfunktionen).

Aus den Bleichkurven ist sofort ersichtlich, dass die Oligo-Farbstoffe (rechts) Atto 620, Atto 655 und Atto 680 (mit Ausnahme von Atto 633) im Vergleich zu den Bleichkurven der zugehörigen SNAP-Konstrukte (links) eine langsamere Abnahme der Fluoreszenzintensität aufweisen. Es ist zu beobachten, dass die Fluoreszenzen der Oligo-Farbstoffe (620, 655 und 680) bis zum Versuchsende ($t = 60$ s) auf 27-63% ihrer Ursprungsintensität abfallen. Bei Atto 620 reduziert sich die I_F auf 31%, gefolgt von Atto 680 auf ca. 51% und für Atto 655 auf 63%. Im Gegensatz dazu sinken die Fluoreszenzintensitäten der SNAP-Farbstoffe auf sehr viel niedrigere Werte (ca. 8-21% der Ursprungsintensität). Für Atto 620 verbleiben 8% der Ursprungsintensität, für Atto 680 16% und 21% für Atto 655. Die Bleichraten der SNAP-Farbstoffe Atto 620 und Atto 680 ($0,088 \text{ s}^{-1}$ und $0,068 \text{ s}^{-1}$) liegen im Vergleich zu den jeweiligen Oligo-Farbstoffen ($0,031 \text{ s}^{-1}$ und $0,023 \text{ s}^{-1}$) sehr viel höher. Atto 655 zeigt bei den SNAP-Konstrukten die kleinste Bleichrate ($0,025 \text{ s}^{-1}$) bzw. die größte Photostabilität. Im Oligo-Konstrukt weist Atto 655 ebenso die kleinste Bleichrate auf ($0,019 \text{ s}^{-1}$).

Der Attofarbstoff 633 bildet eine Ausnahme. Das SNAP-Protein hat bei Atto 633 im Vergleich zu den anderen Farbstoffen einen geringeren negativen Einfluss. In Tethe-

ringpuffer (TP) unterliegt hier das SNAP-Konstrukt einem langsameren Photobleichen ($0,036 \text{ s}^{-1}$) während im Oligo-Konstrukt Atto 633 mehr als doppelt so schnell gebleicht wird ($0,091 \text{ s}^{-1}$). An SNAP- als auch an ein Oligonukleotid gebunden zeigt Atto 633 am Ende der Messdauer eine Restfluoreszenz von 21 bzw. 27%. Die Fluoreszenzintensität von SNAP-Atto 633, fällt in ZL etwas schneller ($0,056 \text{ s}^{-1}$) ab als in TP und liegt am Ende der Messdauer bei ca. 16% (A.4).

Die Ergebnisse zur Untersuchung des Bleichverhaltens im Ensemble spiegelt die Erkenntnis aus der Kategorisierung der Fluoreszenzintensitätsspuren in 3.1.5 wider. Die Oligo-Konstrukte zeigen eine höhere Photostabilität im Vergleich zu den SNAP-Konstrukten. In beiden Gruppen zeigt Atto 655 im Vergleich zu den anderen Attofarbstoffen die höchste Photostabilität. Bei den SNAP-Konstrukten stellt Atto 633 neben Atto 655 sowohl in TP als auch in ZL eine langsamere Abnahme der Fluoreszenz dar als die Attofarbstoffe 620 und 680 und gewährleistet somit die Detektion einzelner Moleküle über einen langen Zeitraum um zeitliche Änderungen des zu beobachtenden Moleküls aufdecken zu können.

3.1.7 Blinkverhalten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe

Wie in den letzten Abschnitten gezeigt, weisen Farbstoffmoleküle in ihren Fluoreszenzintensitätsspuren zufällige Fluktuationen zwischen emittierenden An-Zuständen und nicht-emittierenden Aus-Zuständen auf. Die Zeiten dieser Zustände bewegen sich im Bereich von Mikrosekunden bis Hunderten von Sekunden (47) (46). Während in Ensemble-Messungen diese Fluoreszenzschwankungen herausgemittelt werden können, stellen sie bei der Untersuchung einzelner Moleküle ein Problem dar, da sie ein kontinuierliches Verfolgen biologischer Prozesse erschweren. In diesem Kapitel sollen daher die Fluoreszenzfluktuationen mit der Länge ihrer An- und Auszeiten bestimmt werden. Die Separation der An- und Aus-Zustände innerhalb einer Fluoreszenzintensitäts-Zeitspur wurde durch Setzen eines Grenzwertes (Threshold), der die An-Zustände (oberhalb des Grenzwertes) und die Aus-Zustände (unterhalb des Grenzwertes) definiert, erreicht (Abbildung 21). Ein kleiner Ausschnitt der Zeitspur (30,8 – 34,3 Sekunden) ist vergrößert dargestellt, um die Komplexität auf unterschiedlichen Zeitskalen zu veranschaulichen.

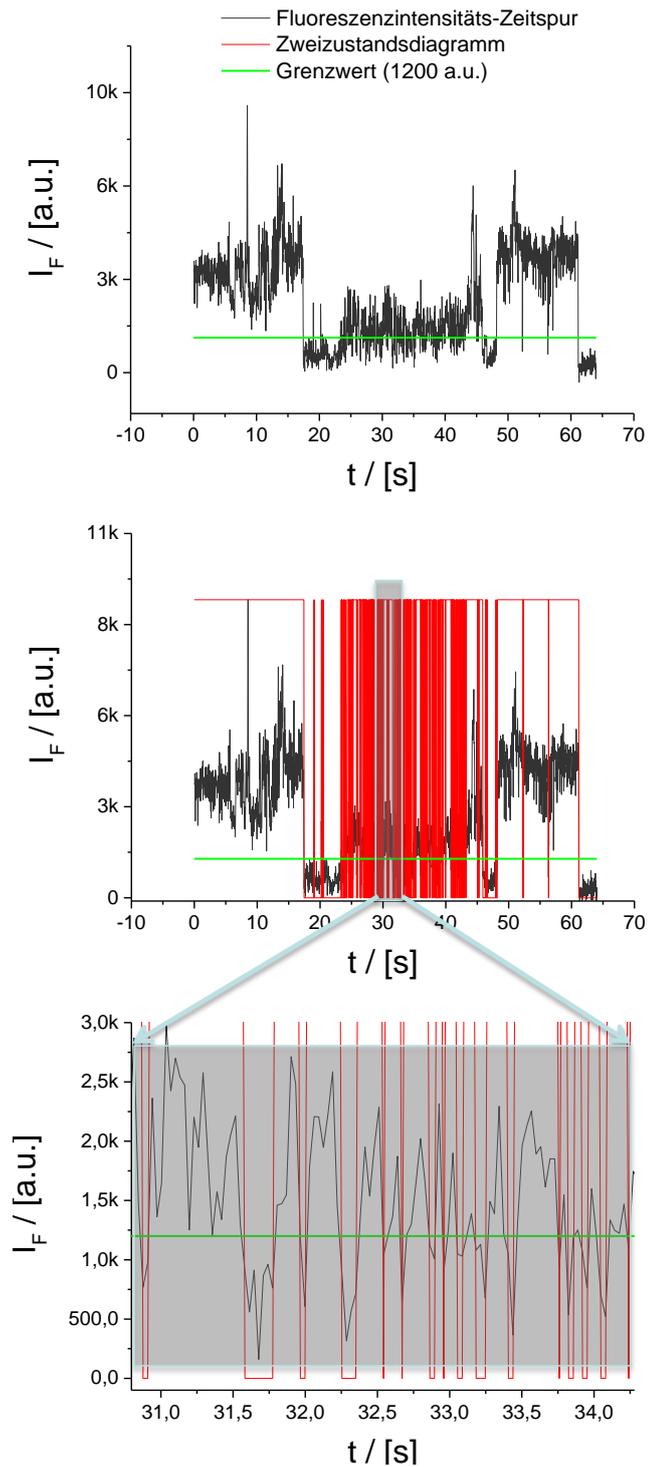


Abbildung 21: Eine Fluoreszenzintensitäts-Zeitspur eines SNAP-Atto 633 Moleküls zeigt die Fluoreszenzunterbrechungen. Der Grenzwert von 1200 a.u. teilt die Spur in die An- und Aus-Zustände (Zweizustandssystem). Die vergrößerte Ansicht stellt den Zeitraum von 30,8 - 34,3 Sekunden dar.

Da die Anzahl der An- bzw. Auszeiten einer Fluoreszenzintensitätsspur eines einzelnen Farbstoffmoleküls nur sehr gering ist, ist eine statistische Analyse basierend auf einem einzelnen Molekül ungenau. Daher wurde eine kombinierte Verteilung der An- bzw. Auszeiten mehrerer Moleküle verwendet. Unter kontinuierlicher Laser-Anregung wurden die Fluktuationen der Emissionsintensität in Zeitintervallen von 30 ms über einen Zeitraum von 60 Sekunden mit einem TIRF-Mikroskop aufgenommen. Die detaillierte Vorgehensweise der Extraktion von An- bzw. Auszeiten und die Darstellung der zugehörigen Wahrscheinlichkeitsverteilung sind im Methodenteil 5.5.2 und 5.5.3 beschrieben. Abbildung 22 zeigt exemplarisch die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Anzeiten (a) und der Auszeiten (b) von 70 SNAP-Atto 633 Molekülen.

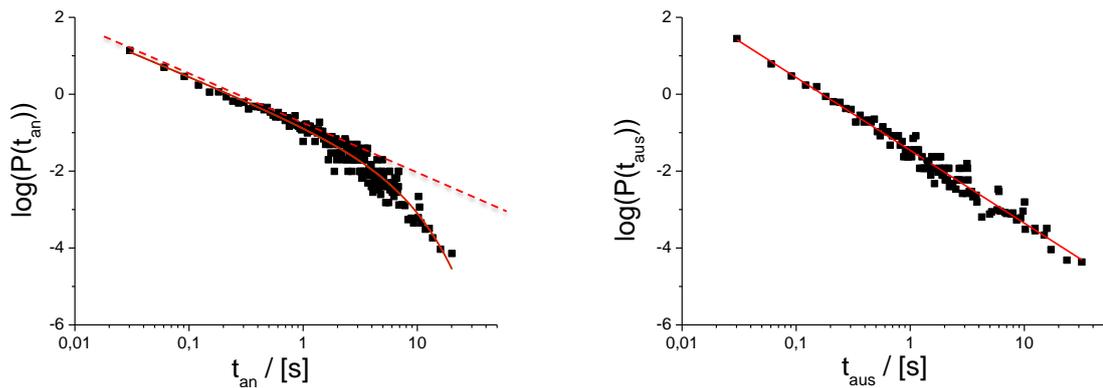


Abbildung 22: Normierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten (links) und Auszeiten (rechts) von 70 SNAP-Atto 633 Moleküle in TP. Die roten Linien sind Ausgleichskurven (Fitfunktionen), die auf ein Verhalten nach dem Potenzgesetz hinweisen. Bei den Anzeiten (links) ist der Potenzfunktion ein exponentieller Cut-Off überlagert. Die gestrichelte rote Linie repräsentiert hier den Verlauf der Potenzfunktion ohne Cut-Off.

Aus der doppel-logarithmischen Darstellung $\log(P(t_{an/aus}))$ über $t_{an/aus}$ ist ersichtlich, dass sich die An- und Auszeiten über mehrere Größenordnungen erstrecken. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung umfasst ca. 6 Größenordnungen und die Länge der An- und Auszeiten ca. drei. Die Verteilung lässt sich mit einer inversen Potenzfunktion (Power-Law Funktion) approximieren (siehe Kapitel 5.5.3), wobei der Präfaktor A die Amplitude und der Exponent $\alpha_{an/aus}$ die Steigung der Potenzfunktion in der doppel-logarithmischen Darstellung repräsentiert. Der Potenzfunktion kann ein sekundärer Prozess überlagert sein, der sich durch einen exponentiellen Cut-Off beschreiben lässt:

$$\log(p(\Delta t_{an/aus})) = \log(A \Delta t_{an/aus}^{-\alpha_{an/aus}}) + \log\left(e^{\frac{-\Delta t_{an/aus}}{\tau_{Cut-Off(an/aus)}}}\right) \quad (7)$$

Dieser durch den Exponenten $\tau_{an/aus}$ gekennzeichnete sekundäre Prozess ist insbesondere bei den Anzeiten signifikant. Die roten Kurven in Abbildung 22 stellen die Ausgleichskurven (Fitfunktionen) dar, die die Verteilung der An- bzw. Auszeiten beschrei-

ben. Bei den Anzeiten ist der Potenzfunktion ein exponentieller Cut-Off überlagert. Die gestrichelte rote Linie repräsentiert den Verlauf der Potenzfunktion ohne Cut-Off.

In Abbildung 23 sind die Fitfunktionen der Anzeiten der SNAP- (links) und Oligo-Farbstoffe (rechts) dargestellt. Die zugehörigen normierten Wahrscheinlichkeitsverteilungen sind in Abbildung 56 im Anhang A.5 dargestellt. Die zugehörigen charakteristischen Parameter für das Potenzgesetz (α_{an}) und den Cut-Off (τ_{an}) der Anzeiten-Verteilung und die Anzahl der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren sind im Anhang A.5 aufgelistet.

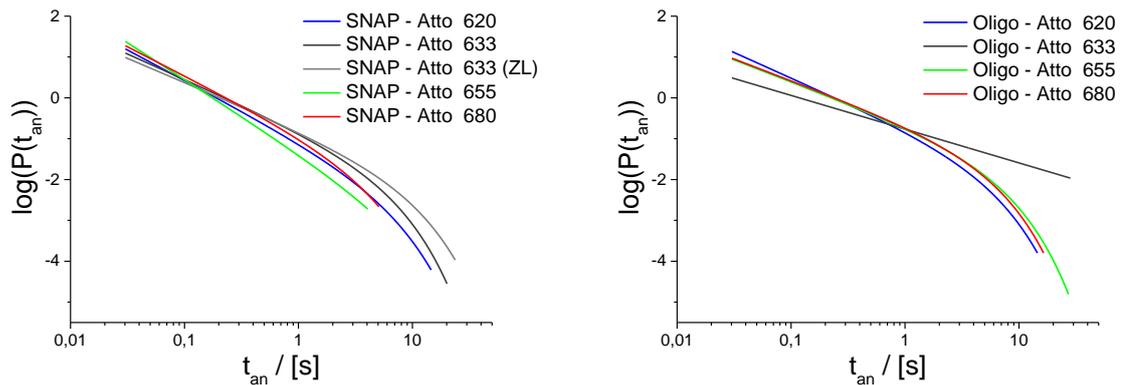


Abbildung 23: Fitfunktionen der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten von SNAP (links)- und Oligo-Farbstoffen (rechts), die mit TP bedeckt sind sowie von SNAP-Atto 633, welches sich in ZL befindet. Die Fitfunktionen weisen auf ein Verhalten nach dem Potenzgesetz mit exponentiellem Cut-Off hin. Nur Oligo-Atto 633 zeigt eine reine Potenzfunktion.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten werden sehr gut durch die Potenzfunktion mit Cut-Off (7) repräsentiert. Nur Oligo-Atto 633 zeigt eine reine Potenzfunktion ohne signifikanten Cut-Off. Es ist auffallend, dass die SNAP-Konstrukte einen steileren Verlauf ihrer Kurven zeigen als die Oligo-Konstrukte. Der Exponent α_{an} beschreibt in der doppel-logarithmischen Darstellung diese Steigung bzw. die Abklingrate der Potenzfunktion. Je größer α_{an} , desto steiler der Graph und desto schneller fallen die Werte der Wahrscheinlichkeiten ab. Die α_{an} -Werte der SNAP-Konstrukte liegen zwischen 1,18 und 1,8. Hier zeigt SNAP-Atto 655 die größte Abklingrate (1,8), gefolgt von SNAP-Atto 620 (1,48) und SNAP-Atto 680 (1,42). Den geringsten Wert zeigt SNAP-Atto 633. Sowohl in TP als auch ZL liegt er bei $\sim 1,2$. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeiten für lange Anzeiten bei SNAP-Atto 633 höher ist als bei den anderen SNAP-gebundenen Farbstoffen. Nur bei SNAP-Atto 633 sind Anzeiten größer als 20 Sekunden wahrscheinlich. Die α_{an} -Werte der Oligo-Konstrukte liegen unter 1,24 ($0,83 < \alpha < 1,24$). Oligo-Atto 620 zeigt hier den höchsten α_{an} -Wert (1,24). Danach folgen Oligo-Atto 655 und Oligo-Atto 680 mit 1,1. Auch bei den Oligo-Konstrukten besitzt Atto 633 mit Abstand die langsamste Abklingrate (0,83) und demzufolge eine höhere Wahrscheinlichkeit für lange Anzeiten.

Bis auf Oligo-Atto 633 zeigen die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten aller SNAP- und Oligo-Konstrukte einen ausgeprägten Cut-Off, der durch den Parameter τ_{an} charakterisiert wird. Je kleiner τ_{an} , desto stärker wird der Cut-Off wirksam. Während der Cut-Off die maximalen Anzeiten der Farbstoffkonstrukte limitiert werden die kurzen Anzeiten kaum beeinflusst. Diesen Effekt erkennt man an der Abweichung der Kurve von dem reinen Potenzfunktion-Verhalten. Für die SNAP-Konstrukte zeigt Atto 680 mit $\tau_{an} = 2,8$ s die größte Abweichung. Bei SNAP-Atto 633 in ZL ($\tau_{an} = 6,7$ s) wird im Vergleich zu Messungen in TP ($\tau_{an} = 4,1$ s) eine geringere Abweichung von dem Potenzfunktions-Verhalten beobachtet. Eine ebenso geringe Abweichung zeigt SNAP-Atto 655 mit $\tau_{an} = 6,2$ s. Für SNAP-Atto 620 gilt $\tau_{an} = 4,4$ s. Bei den Oligo-Konstrukten bewegen sich die Werte um $\tau_{an} = 4$ s. Hingegen kann jedoch die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Anzeiten von Oligo-Atto 633 durch ein reines Potenzgesetz, ohne signifikanten Cut-Off, beschrieben werden. In Abbildung 24 sind die Fitfunktionen der Auszeiten der SNAP- (links) und Oligo-Farbstoffe (rechts) graphisch dargestellt. Im Anhang A.5 in Abbildung 57 sind die zugehörigen normierten Wahrscheinlichkeitsverteilungen dargestellt. Ebenso sind im Anhang A.5 die Anzahl der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren und die das Potenzgesetz und den Cut-Off beschreibenden Parameter α_{an} und τ_{an} aufgeführt (Tabelle 20 und Tabelle 21). Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Auszeiten sowohl der SNAP- als auch der Oligokonstrukte lassen sich sehr gut durch eine reine Potenzfunktion beschreiben. Lediglich bei SNAP-Atto 655 ist eine deutliche Abweichung vom Potenzgesetz zu beobachten.

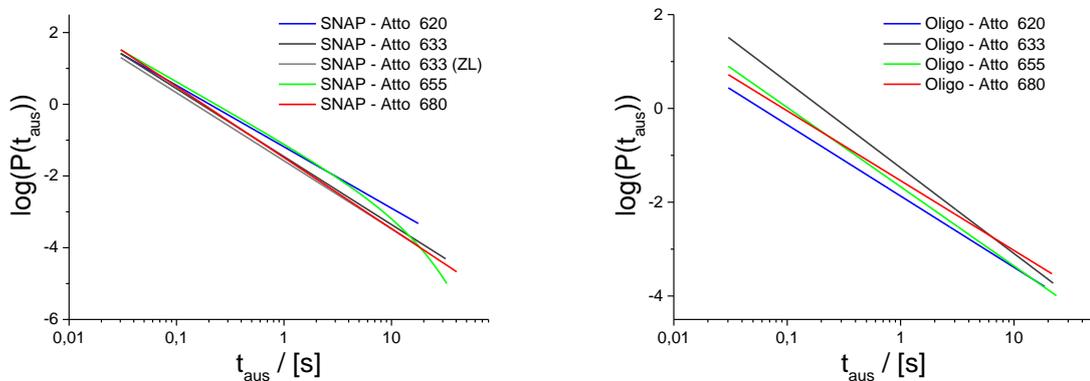


Abbildung 24: Fitfunktionen der Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Auszeiten von SNAP (links)- und Oligo-Farbstoffen (rechts), die mit TP bedeckt sind sowie von SNAP-Atto 633, welches sich in ZL befindet. Die Fitfunktionen weisen auf ein Verhalten nach dem Potenzgesetz ohne Cut-Off hin. Nur der Potenzfunktion von SNAP-Atto 655 ist ein exponentieller Cut-Off überlagert.

Auch bei den Auszeiten zeigen die SNAP-Konstrukte einen steileren Verlauf der Anpassungskurven. Die α_{aus} -Werte (Anhang A.5, Tabelle 20) der SNAP-Farbstoff Konstrukte liegen zwischen 1,71 und 1,98. SNAP-Atto 680 zeigt die größte Abklingrate (1,98), gefolgt von SNAP-Atto 633 (1,9 in ZL; 1,89 in TP) und SNAP-Atto 620 (1,71).

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Auszeiten von SNAP-Atto 655 wird zusätzlich zum Potenzgesetz ($\alpha_{\text{aus}} = 1,71$) noch mit einem exponentiellen Cut-Off ($\tau_{\text{an}} = 10,6$ s) approximiert. Die α_{aus} -Werte der Oligo-Farbstoffe liegen mit Werten zwischen 1,49 und 1,83 unter den α_{aus} -Werten der SNAP-Farbstoffe (Anhang A.5, Tabelle 21). Die Farbstoffe Atto 633 und Atto 655 zeigen an ein Oligonukleotid gebunden die gleichen α_{aus} -Werte wie an SNAP gebunden ($\alpha_{\text{aus}} = 1,7 - 1,9$). Als Oligo-Farbstoff zeigen Atto 620 und Atto 680 deutlich niedrigere α_{aus} -Werte, wenn sie an Oligo gebunden sind (Oligo-Atto 620, 1,52; Oligo-Atto 680, 1,49). Dies spiegelt sich auch an dem, im Vergleich zu den entsprechenden SNAP-Konstrukten, flacheren Verlauf der Kurven wider, die die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Auszeiten beschreiben (Abbildung 24).

Die α_{an} -Werte sind für nahezu alle Proben, außer für SNAP-Atto 655, kleiner als die zugehörigen α_{aus} -Werte. Im Vergleich zu den Aus-Zuständen sind im Falle von $\alpha_{\text{an}} < \alpha_{\text{aus}}$ für die An-Zustände lange Ereignisse eher wahrscheinlich als kurze Ereignisse. Der Farbstoff verweilt somit mehr Zeit im An-Zustand. An SNAP gebunden, zeigt Atto 633 die höchste Wahrscheinlichkeit für lange Anzeiten (> 20 Sekunden) und eine niedrige Wahrscheinlichkeit für lange Auszeiten und bietet somit einen Vorteil für die Untersuchungen von einzelnen SNAP-Fusionsproteinmolekülen über einen längeren Zeitraum.

Die durch den α -Wert beschriebene Potenzfunktion weist auf eine komplexe Blinkkinetik hin, bei der die Fluoreszenzlöschung nicht durch ISC hervorgerufen sein kann. Fluoreszenzlöschung durch benachbarte Moleküle wie Guanin und Tryptophan auf der Basis eines photoinduzierten Elektronentransfers können hierfür eine Ursache sein. Der durch den Parameter τ charakterisierte exponentielle Cut-Off, der vor allem bei den Anzeiten beobachtet wurde beschreibt einen sekundären Prozess, der lange Anzeiten limitiert und diese am hinteren Ende der Potenzfunktion eliminiert und z.B. durch Photozerstörung hervorgerufen sein könnte.

3.2 *In vivo* Fluoreszenz-Markierung von CheY

Nach der eingehenden Charakterisierung der verwendeten BG-Farbstoffe hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften wurde in diesem Kapitel das SNAP-tag System untersucht. Es sollte evaluiert werden, ob sich dieses System zusammen mit den in dieser Arbeit charakterisierten BG-Farbstoffe zur spezifischen *in vivo* Fluoreszenz-Markierung einzelner Biomoleküle eignet. Hierzu wurde das cytoplasmatische Signalprotein CheY ausgewählt, das in der Signalübermittlung der bakteriellen Chemotaxis eine zentrale Rolle spielt. CheY wurde an SNAP-tag fusioniert (21) und in den Bakterienstamm TE121 (6.2) transformiert. Zur Überprüfung der Zellgängigkeit der BG-Farbstoffe wurden die Zellen mit BG-Atto 620, BG-Atto 633, BG-Atto 655 und BG-Atto 680 angefärbt. Anschließend wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

qualitativ nachgewiesen, dass der Farbstoff innerhalb der Zelle kovalent an SNAP-tag gebunden ist. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das vollständige Fusionsprotein CheY-SNAP exprimiert wird und physiologisch funktionsfähig ist. Am Ende des Kapitels wurde die Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe BG-Atto 633 und BG-Atto 655 bestimmt.

3.2.1 Zellgängigkeit der BG-Farbstoffe

Eine wichtige Voraussetzung für ein *in vivo* Markierungsverfahren stellt die Zellgängigkeit des BG-Farbstoffs dar. Ein Farbstoff muss die Fähigkeit besitzen, durch die Zellmembran zu diffundieren, um überhaupt ein Protein innerhalb der Zelle spezifisch markieren zu können. So müssen die BG-Farbstoffe die *E. coli*-Zellmembran zunächst überwinden, um das in der Zelle exprimierte CheY-SNAP Fusionsprotein zu markieren. Zur Untersuchung der Zellgängigkeit der BG-Farbstoffe wurde zunächst in TE121-Zellen (6.2) die Proteinexpression von CheY-SNAP-tag mit 10 μM IPTG induziert und die Zellen nach Standardprotokoll (5.3.6) mit 5 μM BG-Farbstoff angefärbt und für die Mikroskopie auf LabTek- Kammerdeckgläser immobilisiert (5.4.1). Als Negativkontrolle wurde der Stamm VS102 verwendet, der kein CheY-SNAP-tag exprimiert. Die Negativkontrolle wurde wie die TE121-Zellen mit IPTG versetzt und mit den BG-Farbstoffen angefärbt. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils an gefärbten Zellen wurden Fluoreszenzbilder und die zugehörigen Durchlichtbilder an einem Weißlichtlaser-Konfokal-Mikroskop TCS SP5 X der Firma Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (5.4.2) aufgenommen. Abbildung 25 zeigt die überlagerten Durchlicht- und Fluoreszenzbilder von CheY-SNAP-tag exprimierenden *E. coli*-Zellen (obere Reihe) und der Negativkontrolle (untere Reihe), nach Färbung mit den BG-Farbstoffen (a) BG-Atto 620, (b) BG-Atto 633, (c) BG-Atto 655 und (d) BG-Atto 680. Die Überlagerung der Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der TE121-Zellen zeigen, dass sich die gefärbten Zellen in der Intensität des Fluoreszenzsignals unterscheiden. Eine mögliche Ursache hierfür ist ein von Zelle zu Zelle unterschiedliches Verhalten, welches zu einer unterschiedlichen Aufnahme des BG-Farbstoffs führt (Zell-zu-Zell Variation). Ebenso kann eine von Zelle zu Zelle unterschiedliche CheY-SNAP-tag Expression und der daraus resultierenden unterschiedlichen Proteinkonzentration ein möglicher Grund dafür sein. Des Weiteren sind die in der Literatur beschriebenen ‚Tag zu Tag Variationen‘ zu beobachten (107). Die Aufnahmen zeigen eine sehr gute Zellgängigkeit für die BG-Farbstoffe der Carbopyronine Atto 620 und Atto 633. 72% bzw. 87% der Zellen wurden mit BG-Atto 620 bzw. BG-Atto 633 angefärbt. Im Gegensatz dazu wurden nur 10% bzw. max. 5% der Zellen mit den BG-Farbstoffen der Oxazine Atto 655 bzw. Atto 680 markiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Zellgängigkeit des Farbstoffs maßgeblich von der Farbstoffgruppe abhängig ist. Die BG-Farbstoffe der sehr hydrophilen Oxazine (Atto 655 und Atto 680) sind somit für eine *in vivo* Anfärbung von Biomolekülen unter diesen experi-

mentellen Bedingungen nicht brauchbar. Die Ursache der unterschiedlichen Zellgängigkeit kann auf die unterschiedlichen Farbstoffstrukturen zurückzuführen sein, die eine unterschiedliche Internalisierung der BG-Farbstoffe bedingen könnten. Eine Aussage über den genauen Transportmechanismus kann jedoch hier nicht gemacht werden. Die Zellen der Negativ-Kontrollen, die kein CheY-SNAP-tag exprimieren, zeigen wie zu erwarten nach der Inkubation mit den BG-Farbstoffen und den anschließenden Waschsritten kein Farbstoffsignal. Dies ist ein Hinweis dafür, dass ungebundene oder unspezifisch adsorbierte BG-Farbstoffe (BG-Atto 620 und BG-Atto 633) sowie Reste von frei-vorliegendem Farbstoff-NHS-Ester effektiv aus der Zelle herausgewaschen wurden und somit eine hintergrundreduzierte Markierung von Zellen möglich ist, die für die Anwendung in hoch-sensitiven Einzelmolekülexperimenten unerlässlich ist.

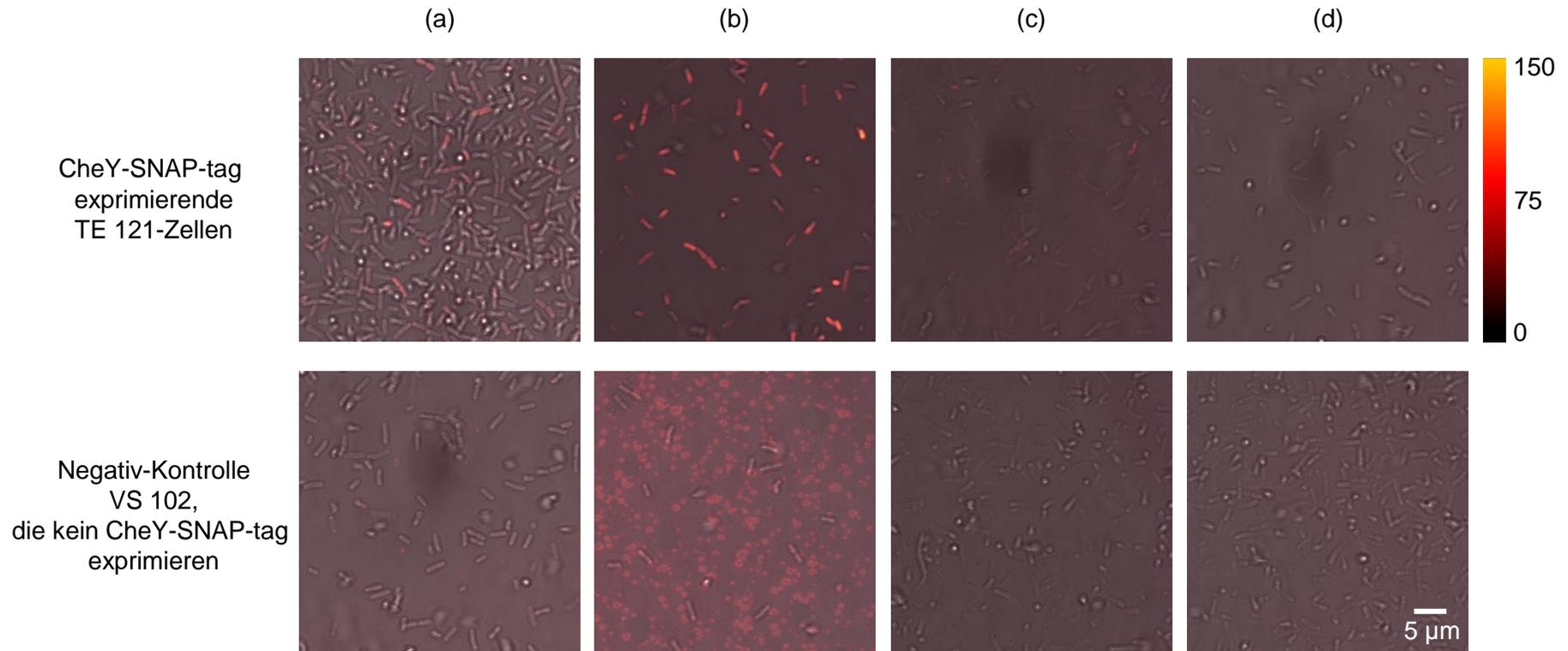


Abbildung 25: Überlagerung der Durchlicht- und Fluoreszenzbilder von CheY-SNAP-tag exprimierenden TE121-Zellen (obere Reihe) nach Färbung mit verschiedenen BG-Farbstoffen (a) BG-Atto 620, (b) BG-Atto 633, (c) BG-Atto 655 und (d) BG-Atto 680. In der unteren Reihe sind die zugehörigen übereinandergelegten Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der mit den BG-Farbstoffen inkubierten Negativkontrolle VS102, die kein CheY-SNAP-tag exprimieren, dargestellt. Der Kalibrationsstab gilt für die Fluoreszenzintensität des angefärbten CheY-SNAP-tag Proteins.

3.2.2 Qualitativer Nachweis von farbstoffmarkiertem SNAP-Protein

Als nächstes stellte sich die Frage, ob es sich bei dem Signal, welches mit der Konfokalmikroskopie innerhalb der Zelle detektiert wurde, eindeutig um farbstoffmarkiertes CheY-SNAP Fusionsprotein handelt. Es ist sicherzustellen, dass die Bindung zwischen Farbstoff und SNAP-Protein kovalent ist. Des Weiteren sollte ausgeschlossen werden, dass der Farbstoff innerhalb der Zelle vom SNAP-Protein abgespalten wird und als freier Farbstoff detektiert wird. Hierzu wurden SNAP-Protein exprimierende Zellen des Stammes SS10 wie unter 5.3.5 beschrieben kultiviert, die SNAP-Proteinexpression induziert und die Zellen mit 6 μM BG-Atto 633 inkubiert. Danach erfolgte die Proteinaufreinigung (5.2.2) des in der Zelle farbstoffmarkierten SNAP-Proteins und der Nachweis mittels Gelelektrophorese (5.2.3). Abbildung 26 zeigt ein 12%-iges Polyacrylamidgel mit (1) Atto 633-markiertem SNAP-Protein (Elutionsfraktion E1). Zusätzlich ist ein Proteinmarkergemisch (MW) aufgetragen, um das Molekulargewicht der Proteinbanden abzuschätzen. Das Gel wurde direkt nach dem Lauf bei 700 nm gescannt und das Signal des Farbstoffs Atto 633 detektiert. Wie zu erwarten befindet sich die Bande auf der Höhe von ca. 20 kDa, was dem SNAP-Molekulargewicht entspricht. Somit konnte nachgewiesen werden, dass innerhalb der Zelle, der Farbstoff nicht abgespalten und frei vorliegt, sondern kovalent an das SNAP-Protein gebunden ist.

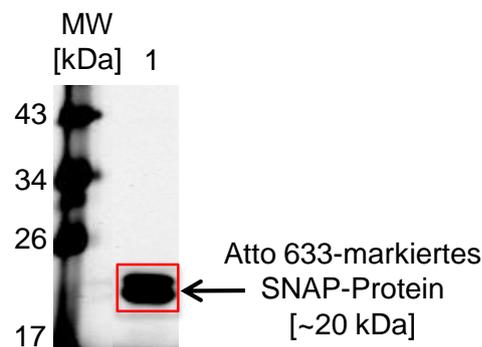


Abbildung 26: Nachweis von Atto 633 markiertem SNAP-Protein (20 kDa) mittels PAGE. Im Gel wurde die nach der Proteinaufreinigung eluierte Fraktion E1 aufgetrennt und direkt nach Gellauf bei 700 nm gescannt.

3.2.3 Qualitativer Nachweis des CheY-SNAP Fusionsprotein

Um des Weiteren nachzuweisen, dass das vollständige Fusionsprotein CheY-SNAP exprimiert wird und die Proteine CheY und SNAP-tag nicht getrennt in der Zelle vorliegen, wurde in TE121-Zellen die CheY-SNAP Proteinexpression mit 10 μM IPTG über Nacht induziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen im Ultraschallbad 20 Minuten inkubiert und die Zellen dadurch aufgebrochen. Das freigesetzte exprimierte CheY-SNAP Fusionsprotein wurde anschließend mit 5 μM BG-Atto 633 versetzt und für 15

min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellysate in einem Polyacrylamidgel (5.2.3) aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente der Bakterienstamm LL4, der kein CheY-SNAP exprimiert. Die Negativkontrolle wurde analog zu den TE121-Zellen behandelt. Abbildung 27 zeigt das bei 700 nm in einem Odyssey Gelscanner gescannte Gel direkt nach dem Gellauf. Im Lysat der Zellen TE121 in Tasche 2 konnte ein Signal des Attofarbstoffes Atto 633 auf der Höhe des Molekulargewichts von 34 kDa detektiert werden. Das Molekulargewicht von 34 kDa entspricht dem des CheY-SNAP Proteins und stellt somit den Nachweis für die vollständige Expression des CheY-SNAP Proteins dar. Die Negativkontrolle in Tasche 1 zeigt wie zu erwarten keine Proteinbande.

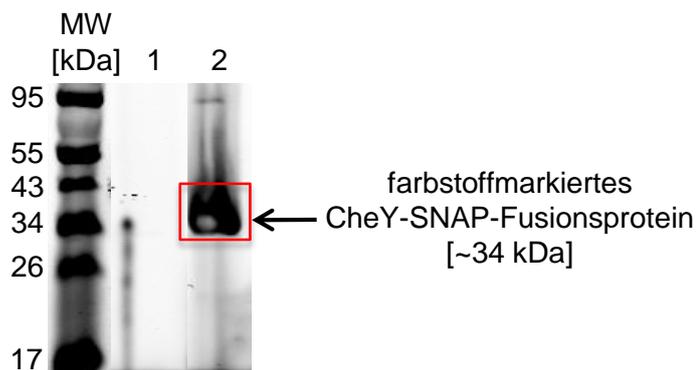


Abbildung 27: Nachweis von Atto 633 markiertem CheY-SNAP Fusionsprotein (34 kDa) mittels PAGE. Im Gel wurden die Zellysate der Negativkontrolle (1) und der CheY-SNAP exprimierenden TE121-Zellen (2) aufgetrennt und direkt nach Gellauf bei 700 nm gescannt.

3.2.4 Nachweis der Funktionalität des CheY-SNAP Fusionsprotein

Bei der Fluoreszenz-Markierung von Biomolekülen ist es wichtig, dass der chemische Tag die Funktion des Zielproteins durch seine Größe nicht beeinträchtigt. SNAP-tag ist mit einem Molekulargewicht von 20 kDa sehr viel größer als das zu markierende CheY-Molekül (14 kDa). Um auszuschließen, dass die genetische Fusion von SNAP-tag an das zu beobachtende Protein eventuell dessen Funktion und dessen Lokalisierungsverhalten beeinträchtigt, ist es von größter Bedeutung, das chemotaktische Verhalten und damit die Funktionalität des Fusionsproteins zu untersuchen. Hierfür wurde CheY-SNAP-tag in eine Null-Mutante transformiert (Δ CheY) und die Rückgewinnung der physiologischen Aktivität mittels Weichagar-Schwärmplatten (5.3.3) untersucht. Bei einem funktionsfähigen CheY-SNAP-tag Protein verfügen die *E. coli*-Zellen über ein intaktes Chemotaxissystem. Dies hat zur Folge, dass *E. coli*-Zellen die im Weichagar enthaltenen Nährstoffe verstoffwechseln und sich dadurch ringförmig ausbreiten. Als Positivkontrolle wurde der Wildtyp HCB33 verwendet, welcher chromosomal codiertes CheY exprimiert. VS100 (Δ cheY) ist die Negativkontrolle. Zur Überprüfung der Funktionalität des CheY-SNAP-tag Fusionsprotein wurden VS100 Zellen (Δ cheY) mit dem

aufgereinigten CheY-SNAP-tag codierenden Plasmids pTE2 transformiert (5.2.1 und 5.3.4). Als weitere Positivkontrolle dienten VS100-Zellen, die das funktionsfähige Fusionsprotein CheY-eYFP (pVS18) exprimieren. Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Victor Sourjik, Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH), zur Verfügung gestellt. In Abbildung 28 oben sind 4 Weichagarplatten mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG (0 μ M, 3 μ M, 10 μ M und 50 μ M) zu sehen. IPTG ist der Induktor für die Genexpression von pTrc-Konstrukten. Auf den Platten sind jeweils die Bakterienstämme (a) HCB33 (Wildtyp), (b) VS100 (Δ cheY), (c) VS 100 Zellen, die CheY-eYFP exprimieren und (d) VS100 mit plasmidcodierendem CheY-SNAP-tag (pTE2). in gleicher Anordnung aufgetragen. In Abbildung 28 unten wurden die Schwärmflächen mit ImageJ vermessen, relativ zur Schwärmfläche der Positivkontrolle gesetzt und in Abhängigkeit der IPTG-Konzentration graphisch dargestellt.

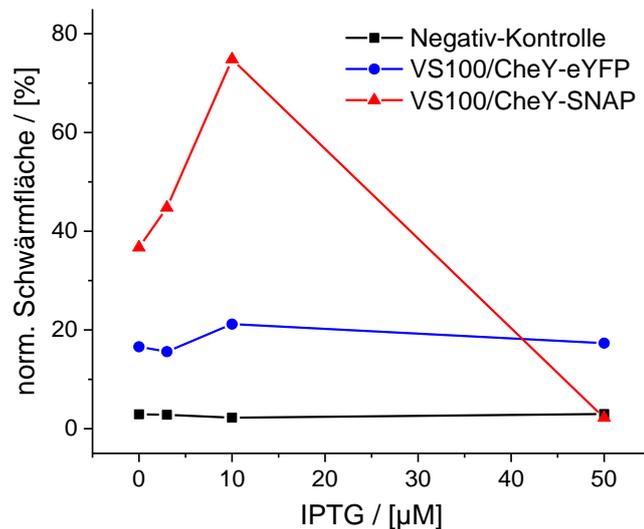
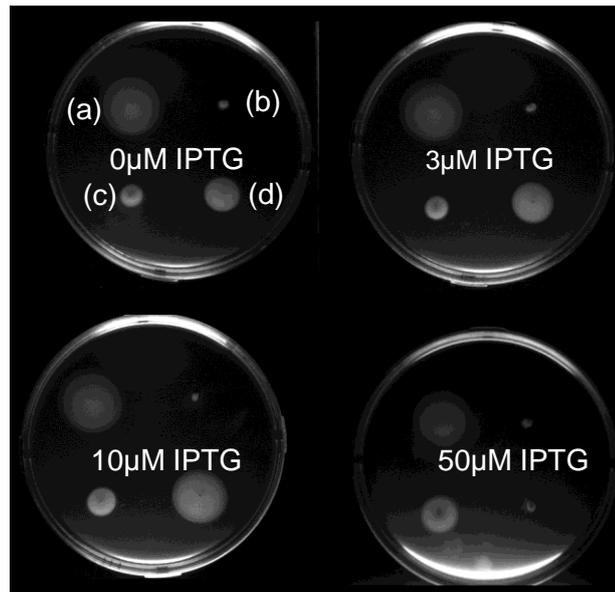


Abbildung 28: Schwärmverhalten von Bakterienstämmen mit plasmidcodiertem CheY-SNAP bzw. CheY-eYFP, sowie mit chromosomal codiertem CheY (Wt, Positivkontrolle) und $\Delta cheY$ (Negativkontrolle). Oben: Dargestellt sind Schwärmplatten mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen. Die unterschiedlichen Bakterienstämme (Schwärmringformation) sind immer gleich angeordnet. (a) HCB33 (Positivkontrolle), (b) VS100 (Negativkontrolle), (c) VS100/CheY-eYFP und (d) VS100/CheY-SNAP-tag. Unten: Normierte Schwärmfläche bei ansteigender Expression von plasmidcodiertem CheY-SNAP (rot) und plasmidcodiertem CheY-eYFP (blau) relativ zum Wildtyp (chromosomal codiertes CheY). In schwarz ist die Negativ-Kontrolle ($\Delta cheY$) dargestellt.

Wie das Experiment zeigt, wird das Ausbreiten der Zellen auf den Weichagarplatten durch das Kontrollfusionsproteins CheY-eYFP als auch des Fusionsproteins CheY-SNAP erzielt. Während durch CheY-eYFP bei einer Induktion mit 10 μM IPTG 21% der

Funktionsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp wieder hergestellt wurde erzielte CheY-SNAP eine Funktionalität von 75%. Des Weiteren wurde gezeigt, dass für CheY-SNAP bei einem Induktionsniveau von 50 μM IPTG kein Schwärmen der Zellen zu beobachten ist. Wie in (107) beschrieben, muss die intrazelluläre CheY-P Konzentration innerhalb eines sehr engen Konzentrationsbereichs sein, damit die Zelle chemotaktisch aktiv ist. Es lässt sich schlussfolgern, dass eine zu hohe CheY-SNAP-tag Konzentration innerhalb der Zelle das Schwärmen negativ beeinflusst. Daher wird in zukünftigen Versuchen ein Induktionsniveau von 10 μM IPTG empfohlen.

3.2.5 Markierungseffizienz von BG-Atto 633 und BG-Atto 655

Die Effizienz eines Markierungsverfahrens stellt nicht nur hinsichtlich der Sensitivität, sondern auch hinsichtlich einer Quantifizierung der Proteinkonzentration des zu untersuchenden Proteins, einen wichtigen Parameter dar. Daher wurde in den folgenden Experimenten *in vivo* der prozentuale Anteil an markiertem SNAP-Protein, das heißt die Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe bestimmt. Hierzu wurde das sehr gut zellgängige BG-Atto 633 aus der Gruppe der Carbopyronine und das wenig zellpermeable BG-Atto 655 aus der Gruppe der Oxazine untersucht. Wie im Methodenteil 5.3.5 beschrieben wurde in SS10-Zellen die SNAP-Protein-Expression bei einer optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) von 0,45 mit 1 mM IPTG induziert und gleichzeitig mit 6 μM BG-Farbstoff für 40 Minuten angefärbt. Danach erfolgte die Aufreinigung (5.2.2) und anschließende Absorptionmessung des farbstoffmarkierten SNAP-Proteins. BG-Atto 633 zeigte in zwei Experimenten eine Markierungseffizienz von 0,1% und 0,26%. Für BG-Atto 655 konnte jedoch in zwei gleichzeitig durchgeführten Versuchen keine Markierung verzeichnet werden (Abbildung 29).

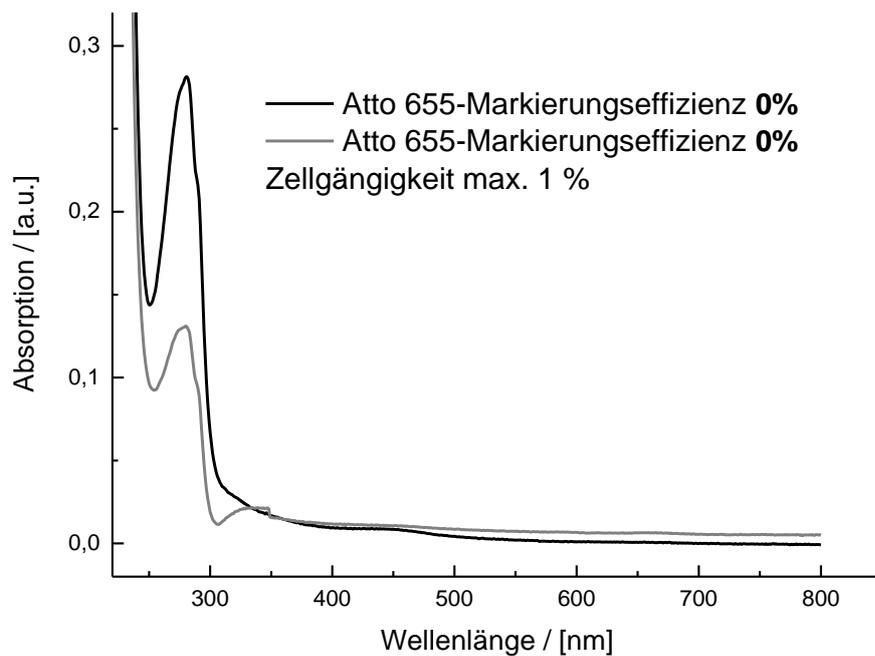
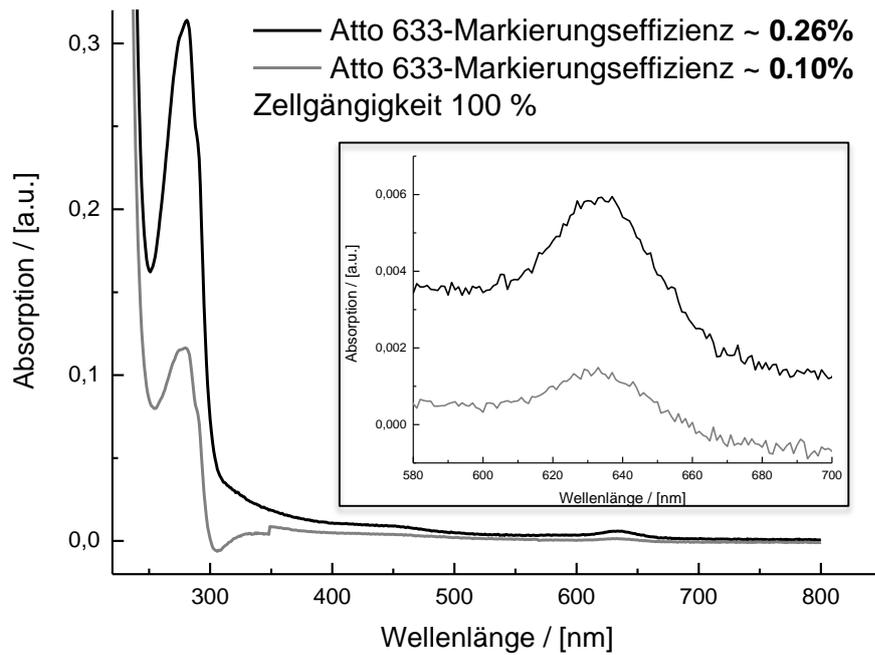


Abbildung 29: UV/Vis-Spektren von Atto 633 markiertem SNAP-Protein (oben) und Atto 655 markiertem SNAP-Protein (unten).

In allen UV/Vis-Spektren ist ein deutlicher Peak des SNAP-Proteins ($\lambda_{\text{Abs SNAP-Protein}} = 280 \text{ nm}$) zu erkennen. Bei Atto 633 ist ein Anstieg der Absorption bei $\lambda_{\text{Abs. Atto 633}} = 629 \text{ nm}$ messbar, während bei der Absorptionswellenlänge des Farbstoffes Atto 655 ($\lambda_{\text{Abs. Atto 655}} = 663 \text{ nm}$) kein Signal erkennbar ist.

Um die Markierungseffizienzen der unterschiedlichen Farbstoffe vergleichbar zu machen, muss der Anteil tatsächlich markierter Zellen berücksichtigt werden. Hierzu wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen die Zellen angefärbt und mit einem TCS SP5 X Mikroskop der prozentuale Anteil markierter Zellen bestimmt (5.4.2). In Abbildung 30 sind die überlagerten Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der SNAP-Protein exprimierenden *E. coli*-Zellen nach Färbung mit BG-Atto 633 (links) und BG-Atto 655 (rechts) zu sehen.

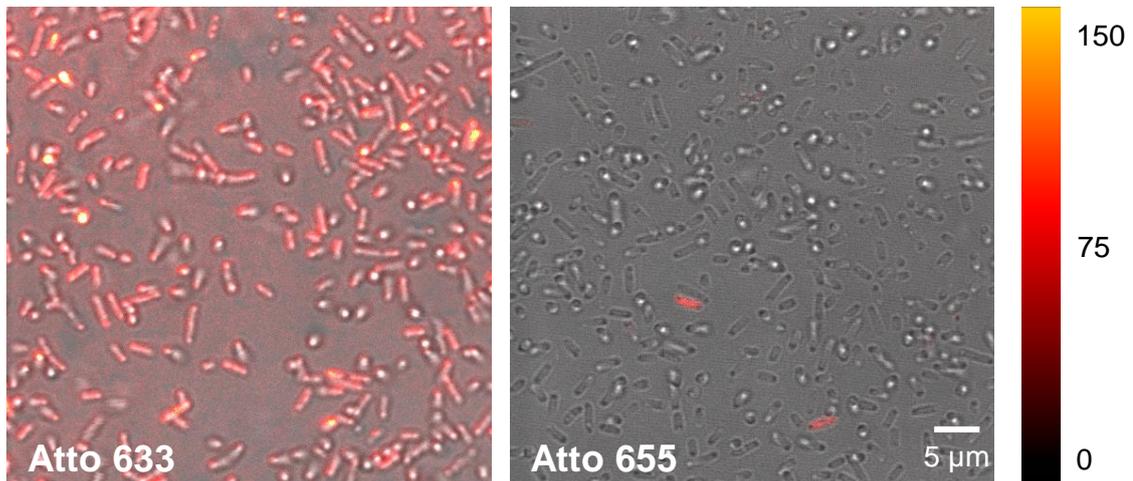


Abbildung 30: Überlagerte Fluoreszenz- und Durchlichtbilder zur Bestimmung der Zellgängigkeit von BG-Atto 633 (links) und BG-Atto 655 (rechts) bei einer Proteinexpression mit 1 mM IPTG und gleichzeitiger Färbung mit 5 µM BG-Farbstoff Substrat für 40 min.

Die überlagerten Bilder zeigen, dass BG-Atto 633 100% der *E. coli*-Zellen anfärbt, während BG-Atto 655 in diesem Bildausschnitt nur einen geringen Bruchteil (~ 1,3%) markiert. In weiteren Bildausschnitten konnten für BG-Atto 655 keine gefärbten Zellen nachgewiesen werden, welches die Markierungseffizienz von 0% erklärt. In dieser Arbeit wurde ebenso, unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben, die Markierungseffizienz von BG-MR 121 bestimmt. Die genaue Beschreibung des Experiments, die zugehörigen UV-Vis Spektren und die Untersuchung der Zellgängigkeit sind 5.2.4 zu entnehmen. Bei einer Zellgängigkeit von 100% betrug die Markierungseffizienz hier 4,57%.

Um die Markierungseffizienz von BG-Atto 655 zu steigern, wurde in einem weiteren Experiment nach 40-minütiger Induktion die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit 10 ml PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und somit die SNAP-Protein Expression durch Herauswaschen des IPTG beendet. Danach erfolgte eine Nachfärbung des exprimierten SNAP-Proteins mit einem Überschuss an BG-Atto 655. Hierzu wurden die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert und mit 16 µM BG-Atto 655 für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS erfolgte die Proteinaufreinigung. Mit diesem Markierungsprotokoll konnte in zwei parallel durchgeführten Experimenten für BG-Atto 655 eine Markierungseffizienz von 1,31% und 1,71% erzielt wer-

den (Abbildung 31). Da für diese Nachfärbung keine Untersuchung der Zellgängigkeit vorliegt können die Werte nicht auf den Anteil der unter diesen experimentellen Bedingungen markierten Zellen normiert werden und erschweren somit die Vergleichbarkeit.

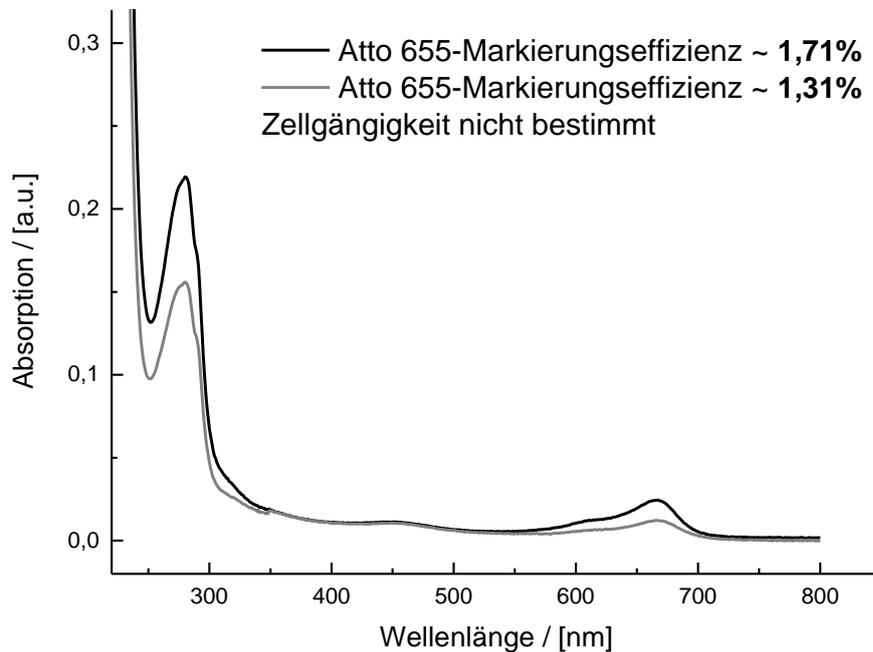


Abbildung 31: Markierungseffizienz von BG-Atto 655 mit Nachfärben.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ebenso die Anzahl der exprimierten SNAP-Proteinmoleküle bestimmt. Dazu wurde zunächst die Zellzahl des Stammes SS10 (6.2) pro ml Bakterienkultur in Abhängigkeit der optischen Dichte bestimmt. Die Zellen wurden bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD_{600nm}) auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Die detaillierte Versuchsbeschreibung ist in 5.3.2 zu finden. Die Anzahl der Kolonien wurden gezählt und daraus die Zellzahl pro ml bestimmt. In Abbildung 53 im Methodenteil 5.3.2 ist die Zellzahl/ml in Abhängigkeit der optischen Dichte graphisch dargestellt. 40 Minuten nach Induktion wurden bei einer optischen Dichte von 0,76 in einem Liter Bakterienkultur $8,8 \times 10^{11}$ Zellen nachgewiesen. Die zelluläre Konzentration des exprimierten SNAP-Proteins konnte unter Verwendung der in Kapitel 5.2.4 berechneten Molarität des SNAP-Proteins ($3,1 \mu M$) und der hier ermittelten Zellzahl bestimmt werden. Daraus ergibt sich, dass bei einer 40-minütigen Induktion mit 1 mM IPTG, bei einer Molarität von $3,1 \mu mol$ Protein pro Liter und einer Zellzahl von $8,8 \times 10^{11}$ Zellen pro Liter unter Einbeziehung der Avogadro-Konstanten ($N_A=6,022 \times 10^{23} mol^{-1}$) $2,1 \times 10^6$ SNAP-Proteinmoleküle pro Zelle exprimiert werden.

3.3 Etablierung einer Fluoreszenz-Markierungsmethode für die Detektion einzelner CheY-Moleküle mittels TIRF-Mikroskopie

In diesem Kapitel wurde ein Markierungsverfahren etabliert, das die Untersuchung einzelner Moleküle mittels TIRF-Mikroskopie erlaubt. Eine geeignete, hintergrundreduzierte Methode zur Markierung einzelner Proteine ist für Echtzeit-Visualisierungen in lebenden Organismen bedeutend, da sie eine Beobachtung von Proteindynamiken ermöglichen kann. Da die Farbstoffkonzentration für Einzelmoleküluntersuchungen ohnehin klein sein muss ($\sim 10^{-9}$ M), stellt eine geringe Zellgängigkeit und geringe Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe kein Problem dar. Zur Entwicklung des Färbeprotokolls wurden die Anzahl der Waschschrte, eine ideale Farbstoffkonzentration und eine probate Induktion der CheY-SNAP-tag Expression evaluiert. Die exakte Durchführung der Experimente ist dem Methodenteil 5.3.6 zu entnehmen. Abweichungen davon werden in den folgenden Experimenten direkt aufgeführt.

3.3.1 Optimierung der Waschbedingungen

Ungelöschter BG-Farbstoff und frei vorliegender Farbstoff-NHS-Ester, aber auch andere Verunreinigungen erhöhen das unspezifische Hintergrundsignal auf der Deckglasoberfläche und innerhalb der Zelle. Zunächst wurde untersucht, wie oft die Zellen nach der BG-Farbstoff Färbung gewaschen werden müssen, um das Hintergrundsignal deutlich zu reduzieren. Hierzu wurde aus einer Übernachtskultur des Zellstammes TE2 (6.2) eine Tageskultur angeimpft und die Zellen ohne IPTG-Induktion (Basalexpression) bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0.68 kultiviert. Die anschließenden Waschschrte und die Herstellung der Zellsuspension erfolgten in 1x PBS. Anschließend wurden 480 μ l der Zellsuspension mit 400 nM BG-Atto 655 für 30 min bei 30 °C angefärbt und danach ein- bis dreimal mit 1xPBS gewaschen. Für die TIRF-Mikroskopie wurden die Zellen auf LabTek- Kammerdeckgläser immobilisiert (5.4.1). Die TIRF-Aufnahmen in Abbildung 32 zeigen den Fluoreszenzhintergrund nach ein- bis dreimaligem Waschen.

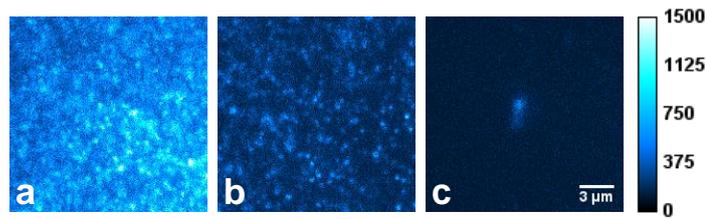


Abbildung 32: TIRF-Aufnahmen nach Färbung von basal exprimiertem ($0\mu\text{M}$ IPTG) CheY-SNAP-tag mit 400 nM BG-Atto 655 und a) einem, b) zwei und c) drei Waschschritten(n).

Das Experiment veranschaulicht, dass zur Beseitigung von ungelöschtem BG-Farbstoff und freiem Farbstoff mindestens 3 Waschschriffe notwendig sind, um somit effektiv die Hintergrundfluoreszenz auf der LabTek-Oberfläche zu minimieren. Damit die Zellen nicht unnötigem Stress ausgesetzt werden, sind mehr als drei Waschschriffe nicht zu empfehlen. Daher sollte zur Reduktion des intrazellulären Hintergrundsignals im nächsten Versuch die Farbstoffkonzentration angepasst werden.

3.3.2 Optimierung der Farbstoffkonzentration

Zur Bestimmung der für Einzelmolekülexperimente optimalen Farbstoffkonzentration wurden die Zellen des Stammes 49-1, welche das Fusionsprotein CheY-SNAP exprimieren, nach Standardprotokoll ohne Induktion der Proteinexpression für 2 Stunden bei 37°C kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Zellen mit BG-Atto 655 in unterschiedlichen Konzentrationen (50 nM , 100 nM , 500 nM , $1\text{ }\mu\text{M}$, $5\text{ }\mu\text{M}$) bei 30°C für 30 Minuten. Für die drei anschließenden Waschschriffe wurden in diesem Experiment 1x PBS verwendet. Die in Abbildung 33 dargestellten Summenbilder aus den TIRF-Videos zeigen die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale innerhalb einer *E. coli*-Zelle bei Verwendung der verschiedenen Farbstoffkonzentrationen.

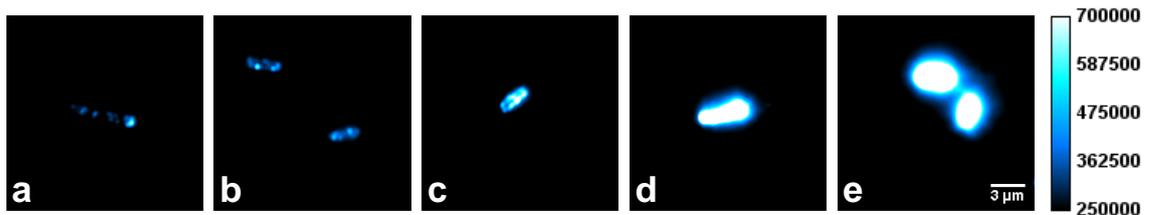


Abbildung 33: Summenbilder aus TIRF-Videos, jeweils bestehend aus 2000 Einzelbildern. Das in den Zellen basal exprimierte ($0\mu\text{M}$ IPTG) CheY-SNAP-tag wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an BG-Atto 655 angefärbt a) 50 nM , b) 100 nM , c) 500 nM , d) $1\text{ }\mu\text{M}$, e) $5\text{ }\mu\text{M}$.

In Abbildung 33 ist zu sehen, dass eine Konzentration kleiner als 50 nM ausreicht, um einzelne Proteinmoleküle anzufärben und mittels TIRF-Mikroskopie zu detektieren. Bei geringer Konzentration ist ein punktförmiges Fluoreszenzsignal vorwiegend am Zellpol als auch lateral verteilt zu beobachten. Mit zunehmender Konzentration steigt zusätzlich das Hintergrundsignal in der Zelle an, welches dann bei einer Konzentration größer

als 500 nM zu einem homogen verteilten, starken Fluoreszenzsignal führt, das die gesamte Zelle überstrahlt. Um das Hintergrund-Fluoreszenzsignal für die Einzelmolekül-Experimente weiter zu reduzieren, wurde in den folgenden Experimenten die BG-Farbstoffkonzentration auf 10 nM weiter reduziert und gleichzeitig das Fluoreszenzsignal des zu untersuchenden Fusionsprotein durch die Stärke der Proteinexpression reguliert werden.

3.3.3 Regulation der Expression des SNAP-Fusionsproteins

In den hier aufgeführten Experimenten sollte untersucht werden, ob das zu detektierende Fluoreszenzsignal des SNAP-Fusionsproteins über dessen Konzentration gesteuert werden kann. Hierzu wurde das Protein in den Zellen TE 120/121 bei unterschiedlichen Konzentrationen des Induktors IPTG (0 μ M, 10 μ M und 60 μ M) exprimiert. Bei einer optischen Dichte OD_{600} von 0,3 wurden die Zellen mit 10 nM BG-Atto 633 angefärbt. In Abbildung 34 sind die Summenbilder aus den TIRF-Videos zu sehen, bei denen die Proteinexpression durch Erhöhung der IPTG - Konzentration gesteigert wurde.

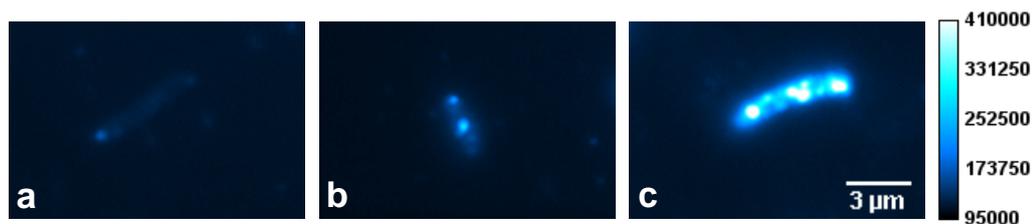


Abbildung 34: Summenbilder aus TIRF-Videos, jeweils bestehend aus 1000 Einzelbildern. Die Expression von CheY-SNAP-tag wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an IPTG induziert a) 0 μ M, b) 10 μ M, c) 60 μ M. CheY-SNAP-tag wurde mit 10 nM BG-Atto 633 angefärbt.

Wie Abbildung 34 zu entnehmen ist, steigt das intrazelluläre Fluoreszenzsignal mit steigender IPTG-Konzentration von 0 bis 60 μ M an. Bei der basalen Expression des Fusionsproteins ist lediglich an den Polen ein geringes Fluoreszenzsignal zu beobachten, während bei steigender Proteinexpression ebenso laterale Anhäufungen des CheY-SNAP Proteins detektiert werden. Bei den lateralen Anhäufungen kann es sich sowohl um an den Motor als auch an laterale Rezeptor-Cluster gebundenes CheY-SNAP Protein handeln. Da jedoch bei gesteigerter Proteinexpression der Anteil des im Cytoplasma diffundierendem CheY-SNAP Protein und somit das Fluoreszenzsignal in der Zelle drastisch zunimmt, wurde für die weiteren Experimente eine IPTG-Konzentration von 10 μ M verwendet. Somit wurde ein Standard-Markierungsprotokoll etabliert, bei dem einzelne SNAP-Fusionsproteine in lebenden *E. coli*-Zellen fluoreszent markiert werden können und deren Beobachtung mittels TIRF-Mikroskopie erlaubt. Durch Verwendung gelöschter BG-Farbstoffe in einer sehr geringen Konzentration (10 nM), einer Expression des SNAP-Fusionsprotein mit 10 μ M IPTG und dem

dreimaligen Herauswaschen von freiem BG-Farbstoff konnte die Hintergrundfluoreszenz auf ein minimales Maß reduziert werden. Das zusammengefasste Standard-Markierungsprotokoll ist dem Methodenteil 5.3.6 zu entnehmen.

3.4 Einzelmolekül-Messungen zur Beobachtung der Bindung von CheY in lebenden *E. coli*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine hintergrundreduzierte spezifische Fluoreszenz-Markierung von Biomolekülen möglich ist, ohne dessen Funktionsfähigkeit zu beeinträchtigen, wurde als nächstes getestet, ob diese Methode geeignet ist, das Verhalten bzw. die Bindung einzelner Moleküle zu beobachten. In dieser Arbeit wurde die Bindung des fluoreszent markierten, cytoplasmatischen Signalproteins CheY an die Motorproteine und an CheA untersucht. CheA ist an die in der *E. coli*-Membran fest verankerten Chemorezeptoren gebunden und an der Signalübermittlung beteiligt. Die Bindung eines Schreckstoffes an die Chemorezeptoren bewirkt eine Stimulation von CheA und eine damit verbundene Autophosphorylierung von CheA. CheA wiederum phosphoryliert demzufolge CheY, welches zum Flagellenmotor diffundiert, der in der Membran der *E. coli*-Zellen verankert ist. Nach Bindung von CheY-P an die Motorproteine (FliM, FliN) erfolgt eine Richtungsänderung der Drehbewegung der Flagellen. Dies führt zu einem Zusammenfallen der Flagellen. Das Flagellenbündel löst sich auf und versetzt somit die Zelle in einen taumelnden Zustand (1.5). Für die Untersuchung dieser Interaktionen wurden die Zellstämme TE121 und TE110 (Negativkontrolle) verwendet (6.2). Die Herstellung dieser Stämme ist im Methodenteil 5.3.4 beschrieben.

TE121 ($\Delta(\textit{cheY-cheZ}) \Delta\textit{flgM}$) trägt eine Deletion des Anti-Stigma-Faktors FlgM und zusätzliche Deletionen von CheY und CheZ. In diesen Stamm wurde das CheY-SNAP codierende Plasmid pTE2 und das eYFP-CheR codierende Plasmid pVS229 transformiert. Durch die Deletion des Anti-Stigma-Faktors ($\Delta\textit{flgM}$) wird die negative Transkriptionskontrolle verhindert, was zu einer um etwa 6,6-fach erhöhten Proteinexpression führt (108). Dadurch bilden die Zellen größere und daher besser zu detektierende Rezeptorcluster. Die Funktionalität des Chemotaxissystem und dessen Proteinstöchiometrie bleibt davon unberührt. Aufgrund des Fehlens von endogenem CheY ($\Delta\textit{cheY}$) wird in dem Stamm TE121 ausschließlich das Fusionsprotein CheY-SNAP exprimiert. Dies hat zur Folge, dass CheY-SNAP nicht mit endogenem CheY um die Bindungsstellen von CheA und den Bindungsstellen der Motorproteine konkurrieren muss. Durch das Fehlen des Proteins CheZ ($\Delta\textit{cheZ}$) entfällt die Dephosphorylierung von CheY. Dies führt zu einem erhöhten Anteil und einer längeren Lebensdauer von phosphoryliertem CheY. Durch die langsamere Dephosphorylierungskinetik liegt das Gleichgewicht zwischen phosphoryliertem und unphosphoryliertem Zustand folglich auf der Seite von phosphoryliertem CheY-SNAP, was dazu führt, dass die Flagellenmotorproteine stän-

dig mit phosphoryliertem CheY-SNAP besetzt sind und eine Rotation der Flagellen im Uhrzeigersinn veranlasst. Die Zelle wird somit in einen taumelnden Zustand versetzt. Phosphoryliertes CheY zeigt im Vergleich zur unphosphorylierten Form eine signifikant höhere Affinität zu FliM (109). Erst nach Zugabe eines Lockstoffes (z.B. Methylaspartat, MA) sinkt die Konzentration an phosphoryliertem CheY-SNAP ab, was eine Drehrichtung gegen den Uhrzeigersinn und somit eine schwimmende Bewegung in Richtung des Lockstoffes zur Folge hat. Das durch das Plasmid pVS229 codierte eYFP-CheR Protein dient zur Sicherstellung, dass sich das im roten Spektralbereich detektierte Signal des CheY-SNAP Proteins im Bereich der Zelle befindet. Da eYFP-CheR an den Rezeptoren lokalisiert ist, kann bei Anregung mit einem 488 nm Laser im grünen Spektralbereich ein starkes Fluoreszenzsignal an den polaren Enden der Zelle detektiert werden. Durch Überlagerung des roten Fluoreszenzbildes von CheY-SNAP mit dem grünen Fluoreszenzbild von eYFP-Che-R wurde überprüft, ob das rot fluoreszierende Signal im Bereich der Zelle liegt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Fluorophor zwischen Deckglas und Zelle befindet (Abbildung 35 links).

TE110 ($\Delta flhC$) dient als Negativkontrolle für die Untersuchungen zur Bindungskinetik. Unspezifische Wechselwirkungen des CheY-SNAP sollen mit Hilfe der Negativkontrolle von ‚echten‘ Bindungen an den Motor und Rezeptor im Zellstamm TE121 unterschieden werden. TE110 trägt eine Deletion des Transkriptionsaktivator FlhC ($\Delta flhC$), was die Expression der endogenen Chemotaxis- und Motorproteine blockiert (110). In diesem Stamm, in welchem somit Rezeptorcluster und Flagellenproteine fehlen, wurden das CheY-SNAP codierende Plasmid pTE2 und das eYFP codierende Plasmid pDK7 transformiert. Da das CheY-SNAP Fusionsprotein in diesem Stamm keine spezifischen Bindungspartner besitzt, können nur unspezifische Wechselwirkungen des exprimierten Fusionsprotein CheY-SNAP zu beobachten sein. In diesem Stamm dient das eYFP-codierende Plasmid pDK7 zur Überprüfung, ob sich das CheY-SNAP Signal im Bereich der Zelle befindet. Da eYFP frei im Cytoplasma vorliegt, sind die TE110-Zellen bei Anregung mit der Wellenlänge 488 nm als komplett fluoreszent markierte Zellen im grünen Spektralbereich detektierbar (Abbildung 35 rechts).

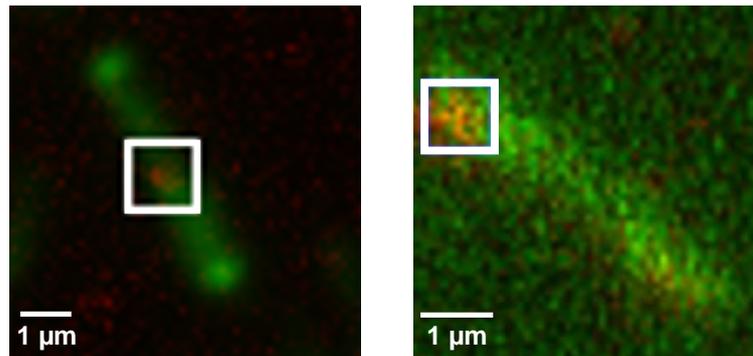


Abbildung 35: Überlagerung von TIRF-Bildern, die im roten Spektralbereich aufgenommen wurden mit TIRF-Bildern aus dem grünen Spektralbereich. Links: *E. coli*-Zelle des Stammes TE121, welche CheY-SNAP (rotes Signal) und eYFP-CheR (grünes Signal) exprimieren. Rechts: *E. coli*-Zellen der Negativkontrolle TE110, die CheY-SNAP (rotes Signal) und eYFP (grünes Signal) exprimieren.

In den folgenden Untersuchungen sollte CheY-SNAP in den Stämmen TE121 und TE110 über einen Zeitraum von 60 Sekunden beobachtet werden. Hierzu wurde das CheY-SNAP Protein mit BG-Atto 633 nach dem Standard-Markierungsprotokoll (5.3.6) angefärbt. Vor der Immobilisation der Zellen, erfolgte mittels Durchlichtmikroskopie eine Untersuchung der *E. coli*-Zellen auf ihre Vitalität. Die Untersuchung des fluoreszenten CheY-SNAP Proteins erfolgte mit der internen Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie. Zunächst wurden Filme, bestehend aus 2000 Bildern, aufgenommen. Hierzu wurden die Zellen mit einem 635 nm Diodenlaser mit einer Laserintensität von 1 mW und einer Belichtungszeit von 0,03 Sekunden angeregt. Mit den TIRF-Experimenten wurde die Lokalisation der CheY-SNAP Moleküle (3.4.1 und 3.4.2) und deren Bindungskinetik (3.5) untersucht. Gebundene und ungebundene Proteine können aufgrund ihrer unterschiedlichen Diffusionseigenschaften unterschieden werden. Cytoplasmatische als auch membrangebundene Moleküle, die unterschiedliche Diffusionseigenschaften besitzen, produzieren sehr unterschiedliche Intensitätsprofile (9). In Abbildung 36 ist das Summenbild aus 2000 aufeinanderfolgenden TIRF-Aufnahmen einer mit Atto 633 angefärbten Bakterienzelle des CheY-SNAP exprimierenden Stammes TE121 zu sehen.

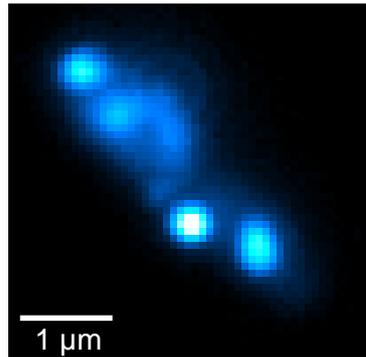


Abbildung 36: *E. coli*-Zelle des *CheY-SNAP* exprimierenden Stammes TE121.

Das Signal eines schnell diffundierenden Moleküls ist zu einem nicht detektierbaren Signal ausgeweitet, während gebundene Moleküle ein klares beugungsbegrenztes Signal (Hot Spots) erkennen lassen.

3.4.1 Beobachtung von CheY-SNAP in dem Zellstamm TE121

In Abbildung 37 ist eine Zeitserie eines 2000 Bilder langen TIRF-Films einer Bakterienzelle des Stammes TE121 zu sehen. Zur Darstellung der Zeitserie wurden jeweils 100 Bilder zu unterschiedlichen Zeitintervallen aufsummiert. So entspricht zum Beispiel das Summenbild aus den Einzelbildern 1-100 dem Zeitraum 0-3 Sekunden. Es werden Hot Spots von fluoreszenten CheY-SNAP Molekülen gezeigt. Innerhalb der ersten 12 Sekunden der Filmaufnahme ist ein sehr starkes Signal (roter Pfeil) an einem Pol der Bakterienzelle zu beobachten. Nach Zugabe des Lockstoffes Methylaspartat (MA) bei ca. 12 Sekunden verringert sich das Intensitätssignal an dieser Stelle. 12 Sekunden später erscheint an einer weiteren Stelle innerhalb der Zelle ein Hot Spot (grüner Pfeil). Nach 36 Sekunden steigt das Fluoreszenzsignal (gelber Pfeil) lateral und am unteren Pol wieder an. Des Weiteren ist Abbildung 37 zu entnehmen, dass das Fluoreszenzsignal innerhalb der gesamten Zelle bis zum Ende des Filmes, verursacht durch Photobleichen, abnimmt.

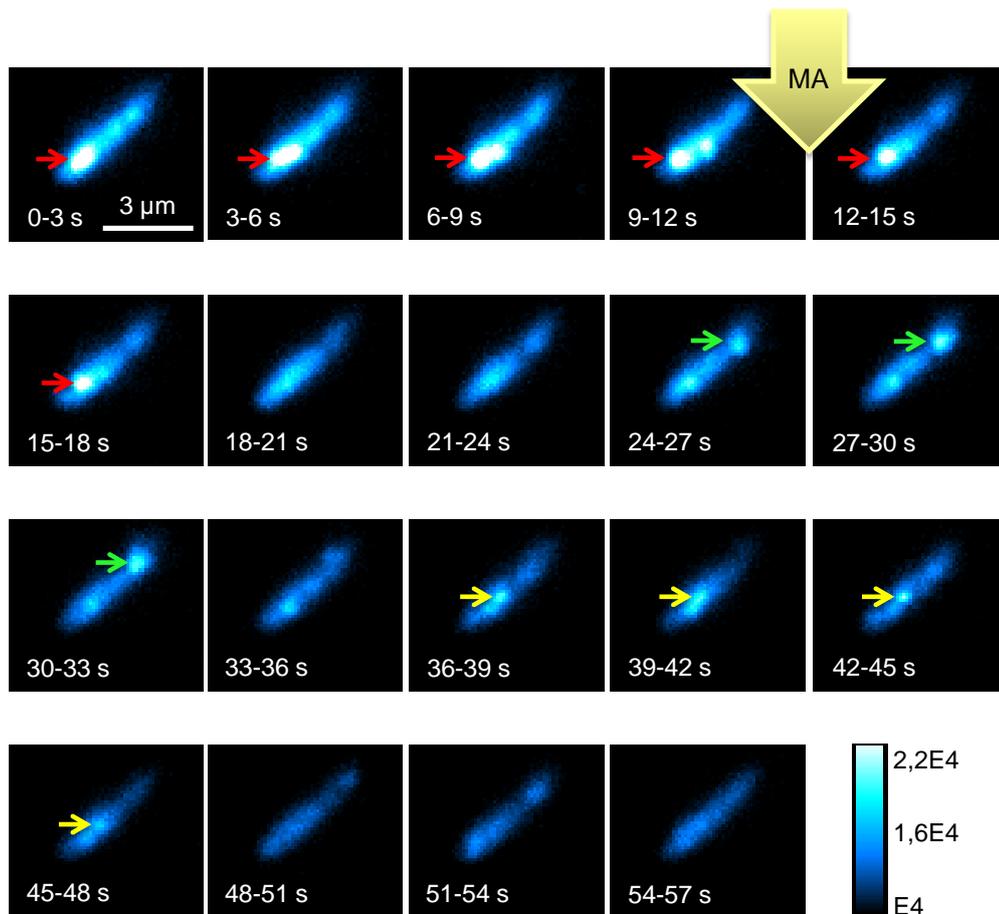


Abbildung 37: Zeitserie einer Bakterienzelle des Stammes TE121. Es werden Hot Spots von CheY-SNAP Molekülen gezeigt, die mit Atto 633 markiert sind. Der TIRF-Film, bestehend aus 2000 Bildern, erfolgte an einem TIRF-Mikroskop mit einer Belichtungszeit von 0,03 Sekunden. Die Anregungsintensität des 635 nm Diodenlasers betrug 1 mW. Zur Darstellung des Films wurden jeweils 100 Bilder (3 Sekunden) zu unterschiedlichen Zeitintervallen aufsummiert. Der gelbe große Pfeil nach 12 Sekunden Aufnahmezeit kennzeichnet die Zugabe des Lockstoffes Methylaspartat (MA).

Da die Zellen TE121 kein CheZ exprimieren, kann phosphoryliertes CheY-SNAP nicht dephosphoryliert werden. Somit liegt das Gleichgewicht auf der Seite des phosphorylierten CheY-SNAP Proteins, welches an den Motor bindet und somit zu einem Fluoreszenzsignal innerhalb der ersten 12 Sekunden führen könnte. Durch den Lockstoff MA kommt es zur Hemmung der Kinase CheA, welches zu einer verminderten Phosphorylierung von CheY-SNAP führt und somit einen Abfall des Fluoreszenzsignal am Motor bewirken könnte. Die Signalübermittlung zum Motor liegt normalerweise im Bereich von einigen hundert Millisekunden (98) (90). Beim Erreichen einer konstanten Ligandenkonzentration adaptiert das Chemotaxis System und kehrt zu seinem Grundzustand zurück, um eine schnelle Reaktion auf weitere Konzentrationsänderungen sicher zu stellen. Dieser Vorgang kann im Bereich von zehn bis hundert Sekunden

erfolgen (98), (90). Somit könnte es sich beim Zeitpunkt 24 Sekunden um CheY-SNAP Moleküle handeln, die am Rezeptor durch Interaktion mit CheA wieder phosphoryliert werden. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals nach 36 Sekunden könnte durch Bindung von neu phosphoryliertem CheY-SNAP an den Motor verursacht sein.

3.4.2 Beobachtung von CheY-SNAP in der Negativkontrolle TE110

Bei den Untersuchungen der Negativkontrolle TE110 zeigten nur 50% der ausgewerteten Zellen (n=12) vereinzelt Hot-Spots. In Abbildung 38 ist eine Zeitserie eines 2000 Bilder langen TIRF-Films einer Bakterienzelle zu sehen. Es werden hier ebenfalls Summenbilder bestehend aus jeweils 100 Bildern zu unterschiedlichen Zeitintervallen dargestellt. Bis auf zwei Ausnahmen (roter und gelber Pfeil) ist im Bereich der gezeigten Zelle während der gesamten Messdauer kein Hot Spot zu erkennen. Auch in diesem TIRF-Film ist mit zunehmender Zeit Photobleichen zu beobachten.

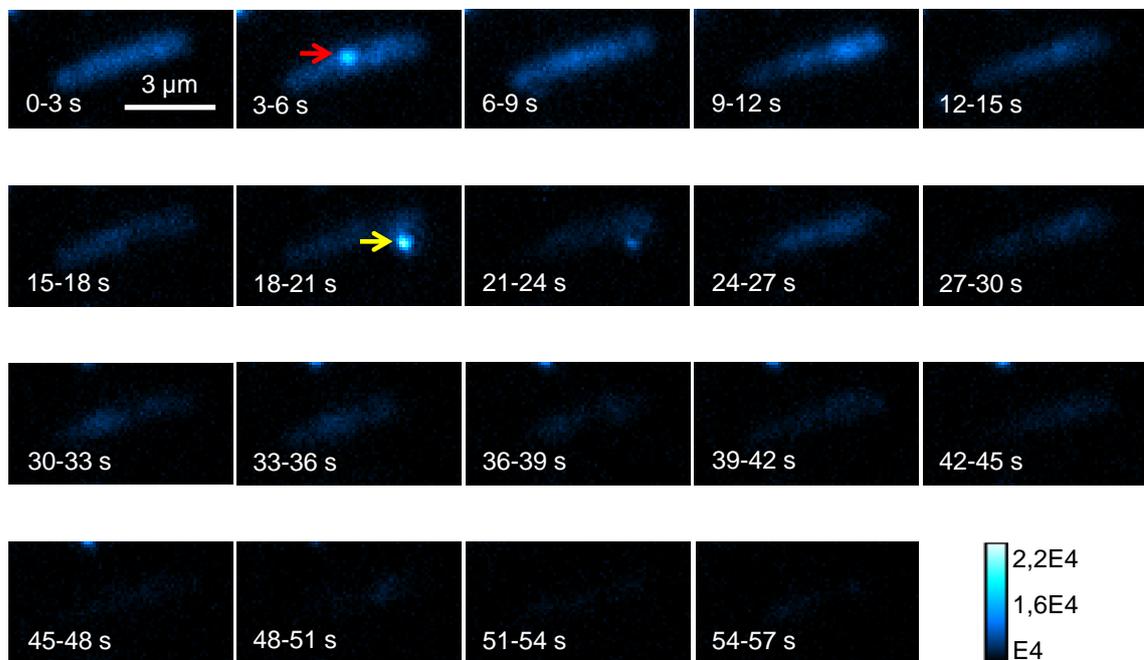


Abbildung 38: Zeitserie einer Bakterienzelle der Negativ-Kontrolle TE110. An einem TIRF-Mikroskop wurde ein Film, bestehend aus 2000 Bildern aufgenommen. Zur Darstellung wurden jeweils 100 Bilder zu unterschiedlichen Zeitintervallen aufsummiert.

Im Bakterienstamm TE110 ist wie bereits erwähnt der Transkriptionsaktivator FlhC deletiert. Demzufolge werden keine Chemotaxisproteine und Motorproteine exprimiert. In den TIRF-Messungen kann daher nur cytoplasmatische Proteindiffusion oder ein beugungsbegrenztes Signal durch unspezifische Wechselwirkungen detektierbar sein. Ebenso kann frei vorliegender Farbstoff der bei der BG-Farbstoff Aufreinigung (5.1.2) nicht vollständig entfernt wurde und nicht aus der Zelle herausgewaschen wurde, an der Zelloberfläche anhaften und ein unspezifisches Signal verursachen.

3.5 Einzelmolekül-Analyse zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von CheY

Durch die Bestimmung der Dauer und Intervalle von molekularen Interaktionen können Rückschlüsse auf die Reaktionskinetiken gemacht werden. Die Dauer in der zwei Moleküle kolokalisieren werden hier als ‚Anzeiten‘ und die Intervalle zwischen der Dissoziation zweier Moleküle bis zur Assoziation der nächsten Moleküle werden als ‚Auszeiten‘ definiert. An dieser Stelle ist zu beachten, dass diese An- und Auszeiten nicht mit den An- und Auszeiten der Blinkkinetik der Farbstoffe zu verwechseln sind. Bei den Farbstoffen beschreiben die An- bzw. Auszeiten die Verweildauer des immobilisierten Farbstoffes in seinem fluoreszenten bzw. seinem dunklen Zustand. In diesem Kapitel wurden die Assoziation zwischen fluoreszent markiertem CheY-SNAP und den Motorproteinen bzw. CheA (Anzeiten) und die Dauer zwischen Ablösung und Bindung (Auszeiten) untersucht. Es wurde überprüft ob der Einfluss des Lockstoffes MA auf die Bindung von CheY-SNAP und die damit verbundene Änderung der Bindungskinetik mittels TIRF-Mikroskopie bestimmt werden kann. Um die An- und Auszeiten und somit die Bindungskinetik von CheY zu ermitteln, wurden die Intensitätsverläufe beugungsbegrenzter Fluoreszenzsignale, den Hot Spots, dargestellt (3.5.1), charakterisiert (3.5.2) und schließlich die Verweildauern (An- und Auszeiten) während CheY-SNAP-tag an einen interagierenden Partner bindet oder von ihm abgelöst ist, untersucht (3.5.3).

3.5.1 Fluoreszenzintensitätsspuren von CheY-SNAP in TE121 und TE110

In diesem Abschnitt wurden die Intensitätsverläufe der einzelnen Hot-Spots in den Zellen TE121 mit und ohne Lockstoff (\pm MA) und in der Negativkontrolle TE110 untersucht. In Abbildung 39 - Abbildung 41 sind beispielhaft Hot-Spots zu unterschiedlichen Zeitintervallen der TIRF-Aufnahmen abgebildet und ihre hintergrund-korrigierten Fluoreszenzintensitäts-Spuren graphisch dargestellt (5.5.1). Abbildung 39 zeigt die Untersuchung einer Zelle des Stammes TE121. Die drei in der Zelle detektierten Hot-Spots weisen am Anfang des Filmes Fluoreszenzintensitäten (I_F) zwischen 1000 a.u. bis ca. 8000 a.u. auf. Die $I_F(t)$ -Spur (a, rot) zeigt innerhalb der ersten 23 Sekunden Intensitäten zwischen 1000 a.u. und 4000 a.u. Danach fällt das Signal auf das Hintergrundrauschen ab ($I_F < 500$ a.u.). Hot-Spot b (grün) zeigt während der Messung Fluoreszenzschwankungen ($1000 \text{ a.u.} < I_F < 6000 \text{ a.u.}$) mit unterschiedlich langen An- und Aus-Zuständen. Im Gegensatz dazu reduziert sich das Signal des Hot-Spots c (grau) schon nach ca. 15 Sekunden deutlich.

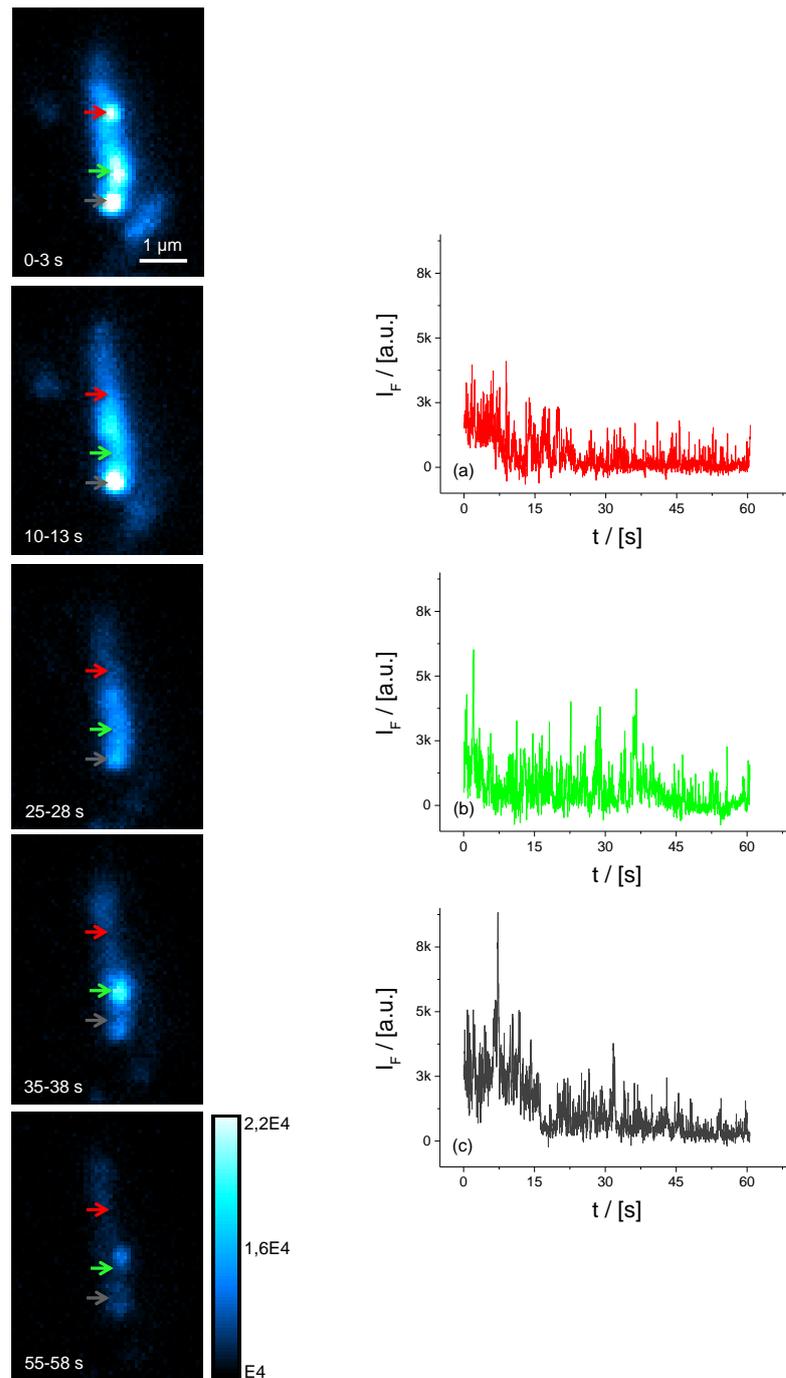


Abbildung 39: Die TIRF-Aufnahmen einer TE121 Bakterienzelle (links) zu unterschiedlichen Zeitintervalle zeigen 3 Hot Spots (roter, grüner und grauer Pfeil). Rechts sind die $I_F(t)$ -Spuren der jeweiligen Hot Spots abgebildet.

Um den Einfluss eines Lockstoffes auf das Bindungsverhalten von CheY-SNAP zu untersuchen, wurden TE 121-Zellen nach ca. 10 Sekunden Messdauer mit Methylaspartat (1mM MA) versetzt und das Fluoreszenzverhalten der Hot-Spots beobachtet (Abbildung 40).

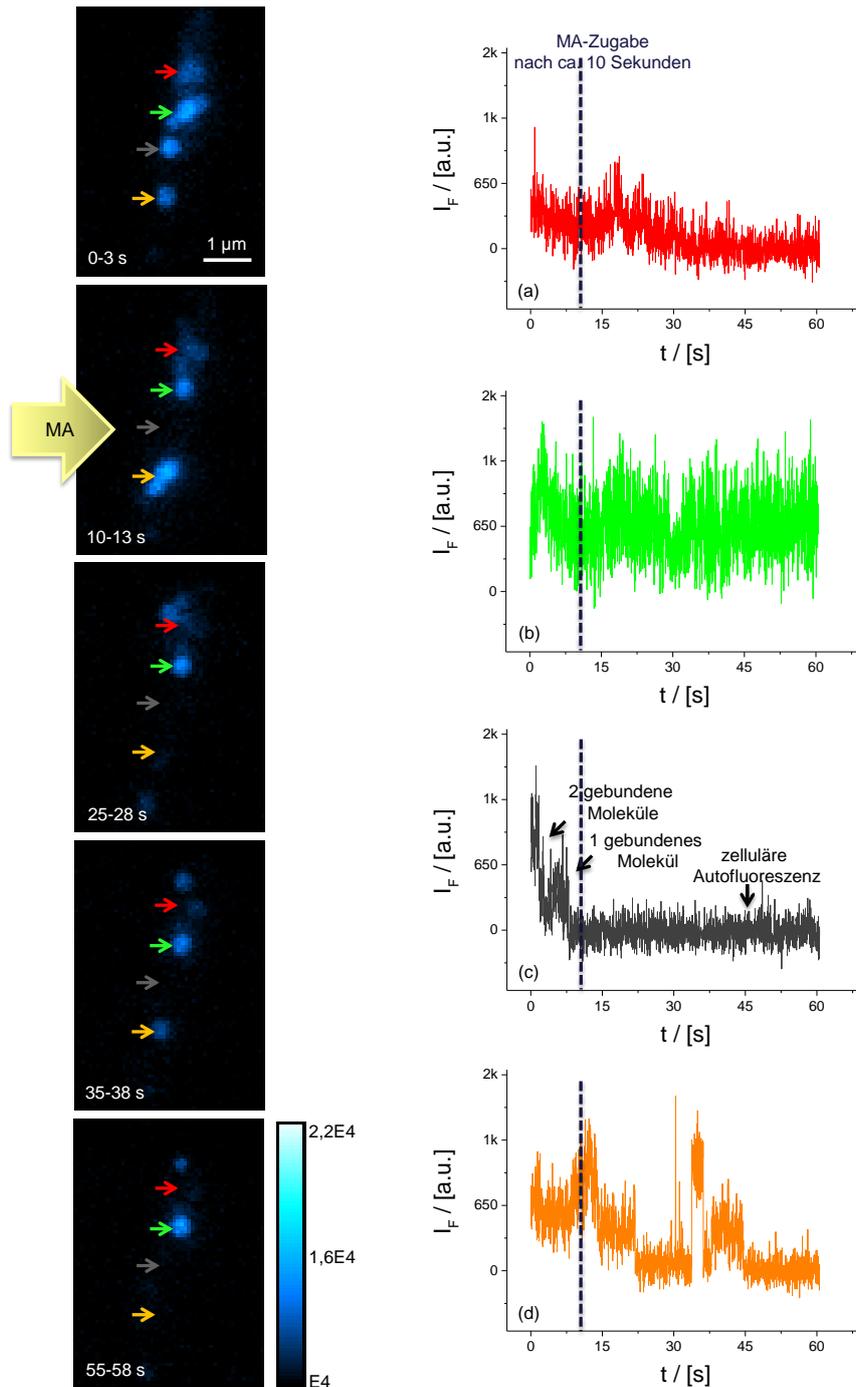


Abbildung 40: Die TIRF-Aufnahmen einer TE121 Bakterienzelle (links) zu unterschiedlichen Zeitintervalle zeigen 4 Hot Spots (roter, grüner, grauer und orangener Pfeil). Rechts sind die $I_F(t)$ -Spuren der jeweiligen Hot Spots abgebildet. Der gelbe dicke Pfeil (links) kennzeichnet die Zugabe von Methylaspartat (MA) bei ca. 10 Sekunden (rechts: graue gestrichelte Linie).

Im Vergleich zu den Messungen ohne MA zeigen die Hot-Spots hier sehr viel geringere Intensitätswerte ($I_F < 2000$ a.u.). Während Hot-Spot (a) ein langsam abfallendes Fluoreszenzsignal zeigt, ist bei Hot-Spot (b) über die gesamte Messdauer ein konstantes Signal ($650 \text{ a.u.} < I_F < 1\text{k}$) zu beobachten. Hot-Spot (c) und (d) lassen eindeutige Inten-

sitätssprünge mit längeren Verweildauern erkennen. Bei Hot-Spot (c) ist die Fluoreszenz schon vor MA-Zugabe in zwei Stufen auf das Hintergrundrauschen zurückgegangen. Bei Hot-Spot (d) verdoppelt sich die Intensität vor MA-Zugabe bei ca. 7 Sekunden und bildet einen sog. Fluoreszenz-Cluster, der durch eine über mehrere Sekunden konstant anhaltende Fluoreszenzintensität gekennzeichnet ist. Nach Lockstoffgabe löst sich dieser Cluster schlagartig in 2 deutlichen Sprüngen auf. Bei ca. 35 Sekunden ist eine weitere schlagartige Clusterbildung zu erkennen, dem wiederum eine durch zwei distinkte Schritte gekennzeichnet Clusterauflösung folgt.

Schließlich wurden ebenso die Hot-Spots in der Negativ-Kontrolle TE110 untersucht (Abbildung 41). Auch hier werden Fluoreszenzintensitäten von 2000 bis 3000 a.u. beobachtet. Wie bei TE121 \pm MA zeigen die Hot-Spots in der Negativkontrolle TE110 Fluoreszenzschwankungen mit unterschiedlich langen An- und Auszeiten (a, b) und z.T. auch ein Abfallen auf das Hintergrundrauschen (c).

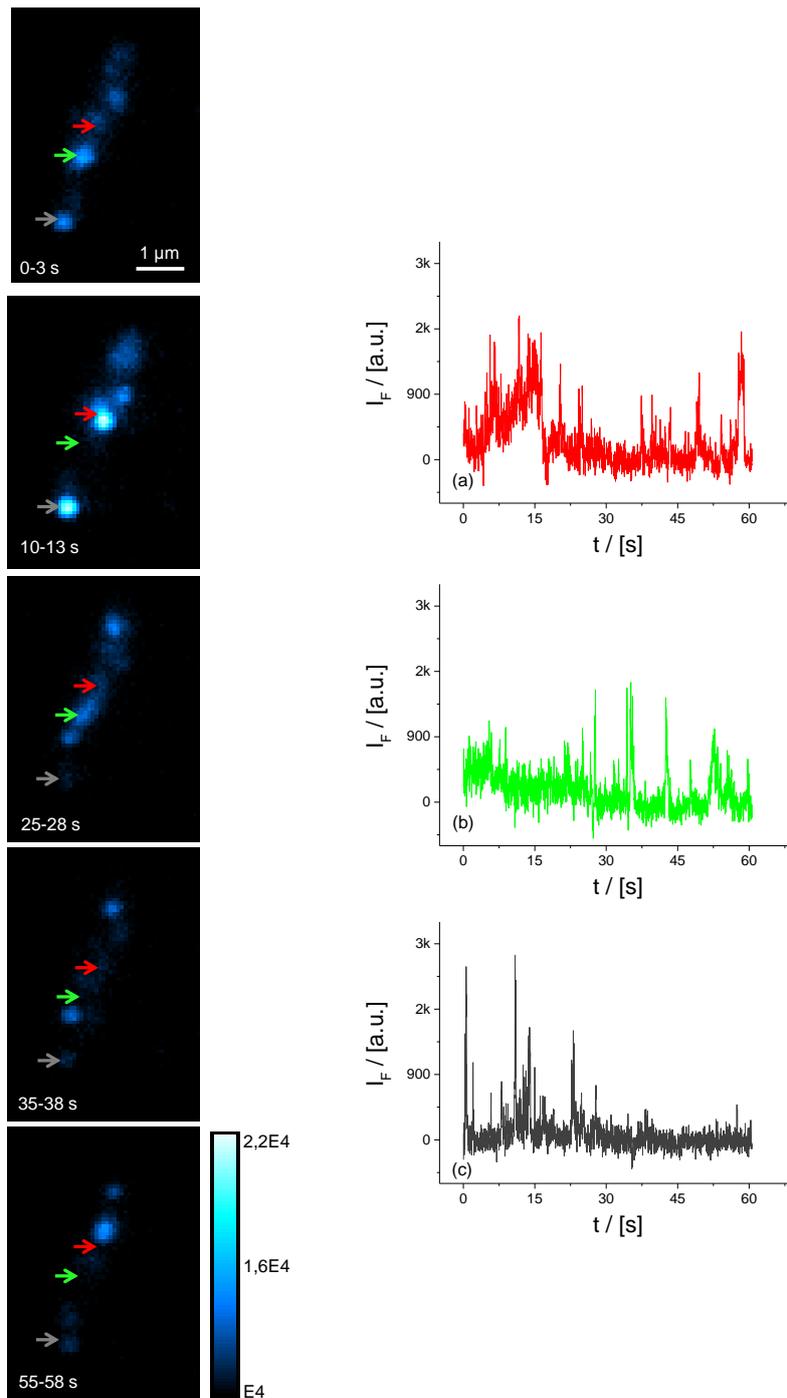


Abbildung 41: Die TIRF-Aufnahmen einer TE110 Bakterienzelle (links) zu unterschiedlichen Zeitintervalle zeigen 3 Hot Spots (roter, grüner und grauer Pfeil). Rechts sind die $I_F(t)$ -Spuren der jeweiligen Hot Spots abgebildet

Da im Stamm TE 121 aufgrund einer CheZ-Deletion vermehrt phosphoryliertes CheY-SNAP vorliegt, können die hier beobachteten hohen Fluoreszenzintensitäten ($I_F > 2000$ a.u.) ein Hinweis auf mehrere am Motor gebundene Moleküle sein. Ein Abfallen des Signals könnte durch die Ablösung von CheY-SNAP hervorgerufen werden. Somit

können durch den Wechsel zwischen Bindung und Ablösung von CheY-SNAP am Motor aber auch durch Interaktion mit CheA Fluoreszenzschwankungen hervorgerufen werden. Ein Abfallen der Fluoreszenzintensität nach Lockstoffzugabe kann durch eine verminderte Phosphorylierung von CheY-SNAP verursacht worden sein. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass an dieser Stelle nicht unterschieden werden kann ob es sich bei diesen Intensitätsänderungen tatsächlich um Interaktionen von CheY-SNAP handelt, oder ob es sich um Photobleichen oder Photoblinken des Farbstoffs handelt. Da in der Negativkontrolle TE 110 keine Rezeptorcluster und Motorproteine exprimiert werden, kann es sich bei den beobachteten Hot Spots nur um unspezifisches Signal handeln. Die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten zwischen den verschiedenen Zellexperimenten könnten durch Unterschiede in der Expression von CheY-SNAP, der Aufnahme von BG-Atto 633 oder der Markierungseffizienz verursacht sein. Hier spielen ‚Zell zu Zell Variationen‘ und ‚Tag zu Tag Variationen‘ eine nicht zu unterschätzende Rolle (3.2.1).

3.5.2 Charakterisierung der Fluoreszenzintensitätsspuren

In diesem Kapitel wurden die aus den Hot-Spots extrahierten $I_F(t)$ -Spuren der Zellen TE121 \pm MA und der Negativkontrolle TE110 hinsichtlich Bildung und Auflösung der Fluoreszenz-Cluster in unterschiedliche Kategorien eingeteilt und charakterisiert. Bei dieser Art der Kategorisierung muss berücksichtigt werden, dass es sich hier nur um eine semiquantitative Auswertung handelt, die auf einer subjektiven Einschätzung basiert und somit nur einen groben Richtwert darstellt und als Hilfsmodell dient.

Die $I_F(t)$ -Spuren wurden in folgende Kategorien eingeteilt (Abbildung 42):

- I. $I_F(t)$ -Spuren, die keine Fluoreszenz-Cluster zeigen
- II. $I_F(t)$ -Spuren, die große kompakte Strukturen mit einer über mehrere Sekunden anhaltenden Fluoreszenz (Fluoreszenz-Cluster) aufweisen.
 - II a. $I_F(t)$ -Spuren, die einen Zerfall dieser Cluster zeigen (Clusterauflösung).
 - II b. I_F -Spuren, die eine Bildung der Cluster zeigen (Clusterbildung).

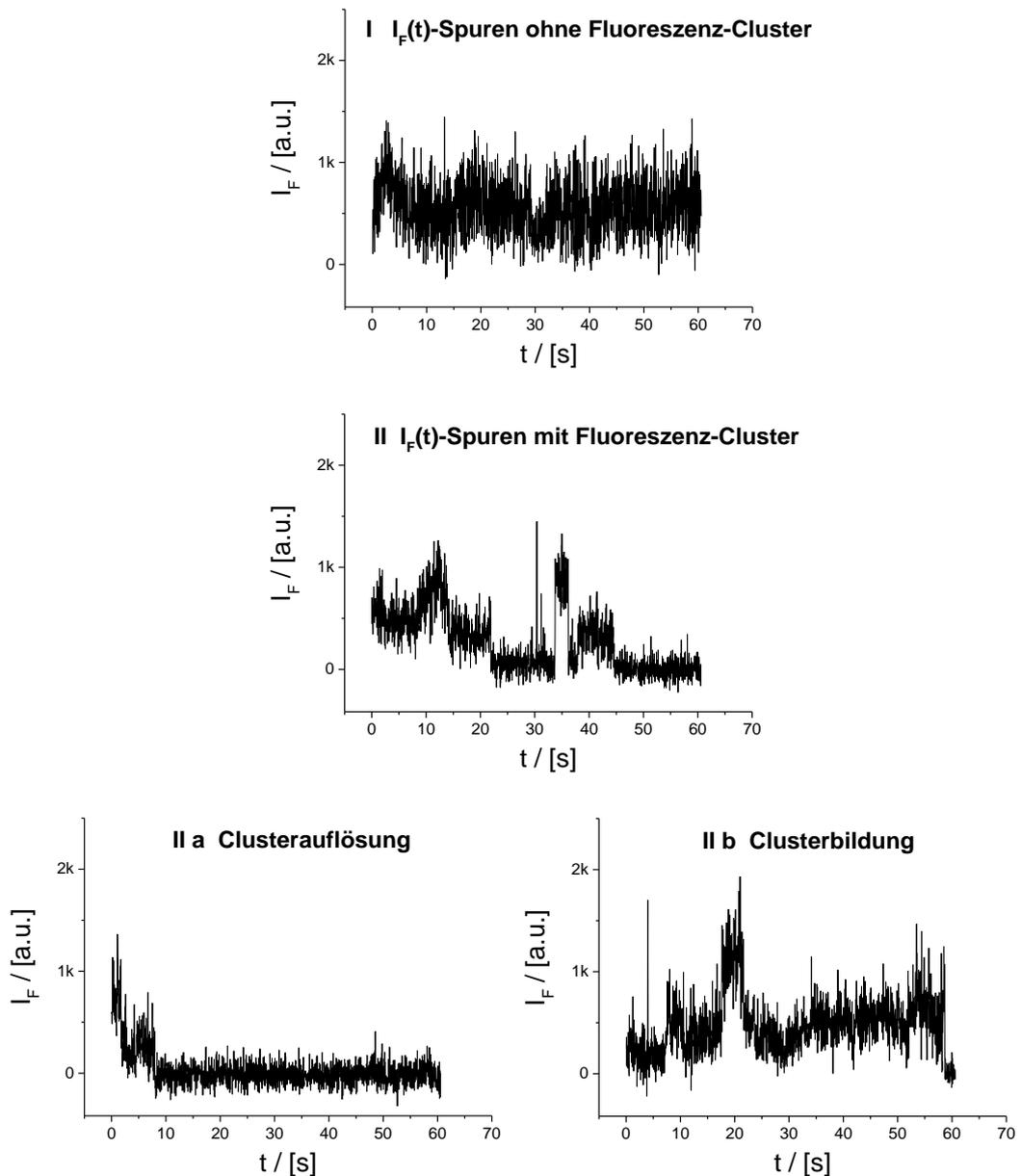


Abbildung 42: Einteilung der $I_F(t)$ -Spuren in die Kategorien (I) $I_F(t)$ -Spuren ohne Fluoreszenz-Cluster und die Kategorie (II) $I_F(t)$ -Spuren mit Fluoreszenz-Cluster. Des Weiteren wurde innerhalb der Kategorie II nochmals zwischen Clusterauflösung (II a) und Clusterbildung (II b) unterschieden.

Es wurde der prozentuale Anteil dieser Spuren in den Zellstämmen TE121 (mit und ohne MA) und TE110 bestimmt und in Abbildung 43 dargestellt. Für TE121 wurden 26 $I_F(t)$ -Spuren aus 7 Zellen, für TE121 + MA 39 $I_F(t)$ -Spuren aus 14 Zellen und für die Negativkontrolle 26 Spuren aus insgesamt 12 Zellen ausgewertet, wobei 50% der Negativkontrolle gar keine Hot Spots zeigten (Tabelle 22, A.6.).

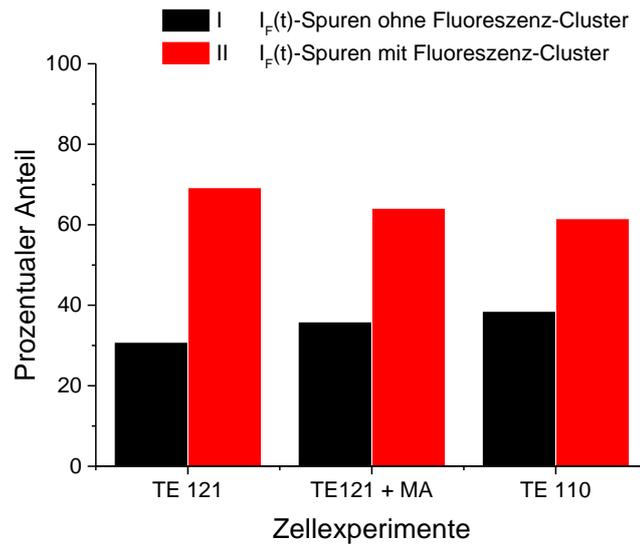


Abbildung 43: Prozentualer Anteil der Kategorien I und II in den Zellexperimenten des Stammes TE121 (mit und ohne MA) und der Negativkontrolle TE110.

Abbildung 43 zeigt, dass in den Zellexperimenten des Stammes TE121 ± MA und der Negativkontrolle der Anteil an $I_F(t)$ -Spuren, die Cluster zeigen (Kategorie II) sehr viel höher ist als der Anteil an Spuren, die keine Clusterbildung aufweisen. Nach Zugabe des Lockstoffs zum Zellstamm TE121 nimmt der Anteil an Kategorie II interessanterweise von 69% auf 64% ab. In Abbildung 44 ist die Kategorie II in Clusterauflösung (II a) und Clusterbildung (II b) aufgeteilt.

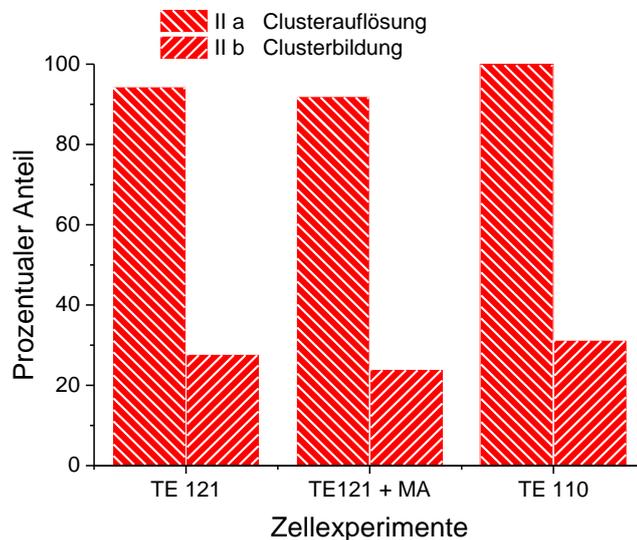


Abbildung 44: Prozentualer Anteil der Kategorien IIa (Clusterauflösung) und IIb (Clusterbildung) in den Zellexperimenten des Stammes TE121 mit und ohne MA und der Negativkontrolle TE110.

Zu beachten ist, dass einige der $I_F(t)$ -Spuren sowohl Clusterauflösung als auch Clusterbildung zeigen und daher sowohl zu Kategorie II a als auch zu Kategorie II b zählen.

Dies hat zur Folge, dass die Summe der prozentualen Anteile größer 100% betragen kann. Es werden in allen drei Experimenten sehr viel mehr Clusterauflösungen als Clusterbildungen beobachtet. So zeigen TE121 mit und ohne MA als auch die Negativkontrolle einen Anteil von 94%, 92% und 100%. Bei Zugabe von MA zum Stamm TE121 sinkt der Anteil an Clusterbildungen von 28% auf 24%.

Die Fluoreszenz-Cluster können durch die Bindung oder Ablösung einer oder mehrerer CheY-SNAP Moleküle verursacht werden und somit ein Protein-Cluster darstellen. Im Stamm TE121 sowohl mit als auch ohne MA kann es sich um Bindungen an CheA als auch um Bindungen an die Motorproteine handeln. Wie die Negativkontrolle zeigt, sind jedoch auch unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Strukturen denkbar.

3.5.3 Bestimmung der Bindungszeiten von CheY-SNAP in lebenden Zellen

Im Folgenden wurden die Bindungszeiten von CheY untersucht. Hierzu wurden die Verweildauern, während der CheY an ein anderes Molekül bindet und somit als Hot Spot sichtbar ist, von den Zeitspannen separiert, in denen CheY nicht bindet und der Hot Spot dunkel ist. Innerhalb einer $I_F(t)$ -Spur eines Hot Spots wurden durch Auswahl eines Fluoreszenzintensitäts-Grenzwertes (Threshold) die An-Zustände (oberhalb des Grenzwertes) und die Aus-Zustände (unterhalb des Grenzwertes) voneinander getrennt (3.1.7). Die in diesen Experimenten gemessenen Anzeiten werden als Bindungszeiten des CheY-SNAP Proteins an einen interagierenden Partner interpretiert. Potentielle Bindungspartner im Stamm TE121, die zu einer spezifischen Bindung führen, sind das Motorprotein FliM und CheA am Rezeptor. Andere Strukturen an der Zellmembran bzw. innerhalb der Zelle können jedoch auch zu einer vorübergehenden unspezifischen Wechselwirkung mit CheY führen. Um diese unspezifischen Bindungen von den spezifischen Bindungen zu unterscheiden, wurde ebenso die Bindungskinetik von CheY-SNAP im Zellstamm TE110, der keine Motor- und Chemotaxisproteine exprimiert, untersucht. Die Extraktion der An- und Auszeiten und die Berechnung der zugehörigen Wahrscheinlichkeitsverteilung sind den Methodenteilen 5.5.2 und 5.5.3 zu entnehmen. Für TE121 \pm MA und TE110 wurden die An- und Auszeiten mehrerer Hot Spots bestimmt. Die Anzahl der untersuchten Zellen und die Anzahl der Hot Spots, deren $I_F(t)$ -Spuren zur Bestimmung der Bindungskinetik verwendet wurden, sind Tabelle 23 im Anhang A.7 zu entnehmen. Die aus den $I_F(t)$ -Spuren gewonnenen Wahrscheinlichkeitsverteilungen der An- und Auszeiten sind in Abbildung 45 als kombinierte Verteilung mehrerer Hot Spots dargestellt. Die zugehörigen Parameter der Ausgleichskurve sind in Tabelle 24 im Anhang A.7 dokumentiert.

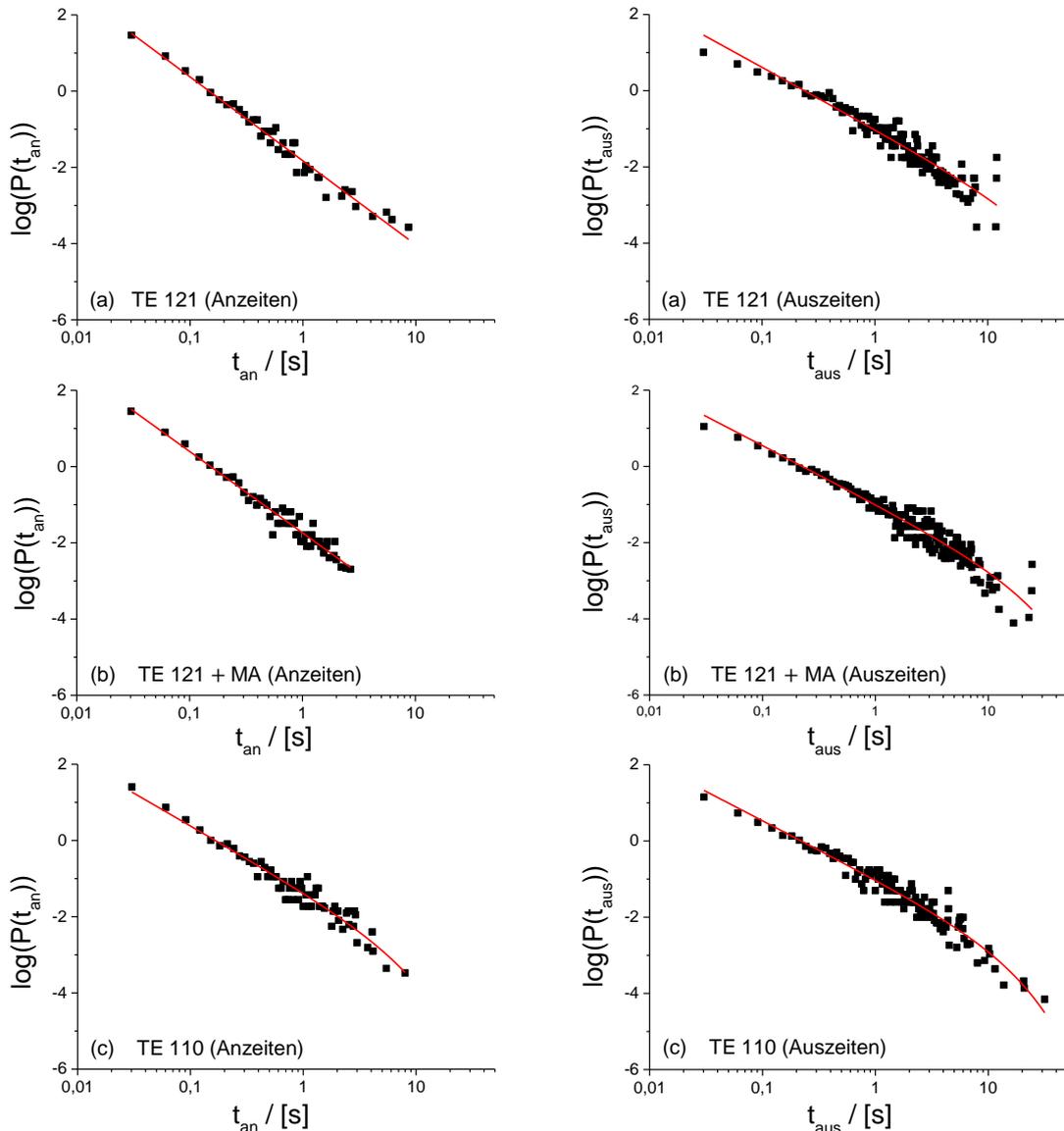


Abbildung 45: Normierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten (links) und Auszeiten (rechts) von CheY-SNAP in *E. coli*-Zellen des Stammes (a) TE121, (b) TE121 + MA und (c) TE110. Die roten Linien sind Ausgleichskurven (Fitfunktion), die auf ein Verhalten nach dem Potenzgesetz mit z.T. exponentiellem Cut-Off hinweisen.

Der doppel-logarithmischen Darstellung $\log(P(t_{an/aus}))$ über $t_{an/aus}$ lässt sich entnehmen, dass sich die Anzeiten (linke Spalte) und die Auszeiten (rechte Spalte) über mehrere Größenordnungen in ihrer Wahrscheinlichkeit und ihrer Länge erstrecken. Die Wahrscheinlichkeiten der An- und Auszeiten umfassen für all drei Experimente (a, b und c) 6 Größenordnungen, wobei die Länge der Anzeiten sich unterscheiden. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der An- und Auszeiten lassen sich durch eine inverse Potenzfunktion darstellen (7). Während TE121 Zellen ohne Lockstoff (a) Anzeiten bis zu 10 Sekunden aufweisen, treten nach Lockstoff-Zugabe (b) Anzeiten > 3 Sekunden nicht mehr auf.

Die Anzeitenverteilung für TE121 mit Lockstoff zeigt in der graphischen Darstellung in dem Bereich von 0,1 bis 3 Sekunden Varianzen. Im Vergleich dazu zeigt das Experiment mit TE110-Zellen (c) eine Potenzfunktion, welche eine höhere Wahrscheinlichkeit für Anzeiten im Bereich von 0,1 bis 3 Sekunden hat und ebenso Varianzen aufweist. Bei den langen Anzeiten ist hier jedoch der Potenzfunktion ein sekundärer Prozess überlagert, der durch einen exponentiellen Cut-Off beschrieben werden kann und das hintere Ende der Potenzfunktion mit den langen Anzeiten abschneidet (7). Die Wahrscheinlichkeiten der Anzeiten des Stammes TE121 im Bereich von 0,1 s und 3 s ist im Vergleich zu TE121 + MA und TE110 vermindert. Bei den Anzeiten der TE121 Zellen sind dagegen keine starken Varianzen in diesem Bereich zu erkennen.

Der Exponent α , der die Steigung bzw. die Abklingrate der Potenzfunktion beschreibt ist bei den Anzeiten im Zellstamm TE121 sowohl mit als auch ohne MA größer ($\alpha_{an} = 2,2$) als für die Anzeiten im Zellstamm TE110 ($\alpha_{an} = 1,71 \pm 0,1$). Je größer α , desto steiler der Graph und desto schneller fallen die Wahrscheinlichkeitswerte ab. Dies spiegelt den geringeren Anteil der Anzeiten zwischen 0,1 und 3 Sekunden in TE121 wider. Des Weiteren sind die Anzeiten im Zellstamm TE110 durch einen zusätzlichen Parameter (τ_{an}) gekennzeichnet, der einen exponentiellen Cut-Off beschreibt. τ_{an} schneidet die Potenzfunktion am hinteren Ende ab und eliminiert somit lange Anzeiten. Wie oben erwähnt zeigen TE 121 Zellen mit und ohne MA im Rahmen der Fehlergenauigkeit eine nahezu gleiche Steigung ihrer Potenzfunktion. Die Auszeiten zeigen in allen drei Experimenten einen im Vergleich zu den Anzeiten kleineren α -Wert ($\alpha_{aus} \sim 1,5$). Im Vergleich zu den Anzeiten sind im Falle von $\alpha_{aus} < \alpha_{an}$ für die Auszeiten lange Ereignisse eher wahrscheinlich als kurze Ereignisse. Den Potenzfunktionen der Auszeiten in allen drei Experimenten ist zusätzlich ein exponentieller Cut-Off überlagert, der sehr lange Auszeiten am hinteren Ende der Potenzfunktion abschneidet.

4 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein Markierungsverfahren entwickelt, das geeignet ist einzelne Proteine fluoreszent zu markieren und in lebenden *E. coli*-Zellen mittels Einzelmolekülmessungen zu beobachten. Es wurde untersucht ob Aussagen über das spezifische Bindungsverhalten des zu beobachteten Proteins getroffen werden können. Für die Fluoreszenz-Markierung der zu untersuchenden Proteine wurde das SNAP-tag System zusammen mit gelöschten BG-Farbstoffen verwendet. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit Experimenten zur Charakterisierung von BG-Farbstoffen zur Markierung von Proteinen mit dem SNAP-tag System. Für diese Voruntersuchungen wurden zunächst vier verschiedene Attofarbstoffe ausgewählt und hinsichtlich ihrer Photophysik, ihrer Zellgängigkeit und ihrer Markierungseffizienz charakterisiert. Daraus konnten wichtige Erkenntnisse für die Verwendung eines geeigneten Farbstoffes für das SNAP-tag System gewonnen werden. Diese flossen in die weiteren Teile der Arbeit ein. Hierbei wurde die Anwendbarkeit des SNAP-tag Systems untersucht. In lebenden Bakterienzellen wurde das Chemotaxisprotein CheY an SNAP-tag fusioniert und dessen Funktionsfähigkeit analysiert. Schließlich wurden für die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie geeignete Experimentbedingungen evaluiert und ein Markierungsprotokoll entwickelt. Mittels TIRF-Mikroskopie wurden CheY-SNAP Proteine *in vivo* beobachtet und deren Bindungsverhalten untersucht.

4.1 Herstellung und Charakterisierung der BG-Farbstoffe

Zur spezifischen hintergrundreduzierten Markierung von Proteinen in *E. coli* wurde das SNAP-tag System (1.4.5) benutzt, welches die Verwendung von gelöschten BG-Farbstoff-Konstrukten erlaubt. In dieser Arbeit wurden die BG-Farbstoffe der Carbopyronine Atto 620 und Atto 633 und der Oxazine Atto 655 und Atto 680 untersucht. Diese Farbstoffe wurden ausgewählt, da sie im roten Wellenlängenbereich (620-700 nm) emittieren und ein stabiles Chromophor besitzen. Der rote Spektralbereich ist von Vorteil für Untersuchungen in der lebenden Zelle, da in diesem Bereich die Autofluoreszenz der Zelle im Vergleich zur blauen oder grünen Anregung deutlich vermindert ist. Zunächst wurden die BG-Farbstoff-Konstrukte bezüglich ihrer Fluoreszenzlöschung und ihrer Reaktionsfähigkeit mit dem SNAP-Protein untersucht. Für die BG-Farbstoffe konnte eine deutliche Fluoreszenzreduzierung nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzlöschung der beiden Oxazine liegt demnach bei 98% während sie für die Carbopyronine Atto 620 und Atto 633 bei 89% bzw. 84% liegt (3.1.2). Die Fluoreszenzintensität von Farbstoffen kann durch die Bindung an BG-NH₂ aufgrund intramolekularer Fluo-

reszenzlöschung deutlich reduziert sein. Als Mechanismus der Fluoreszenzlöschung wird ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET) vom Grundzustand des Guanins zum Singulettzustand des Farbstoffmoleküls angenommen (7), (111) wie in Kapitel 1.2.4 beschrieben. Die PET-Effizienz ist hierbei abhängig vom elektrischen Potential des Guanins und des verwendeten Farbstoffs (112) sowie von dem Abstand zwischen Guanin und Farbstoff. Die Unterschiede in der Fluoreszenzlöschung der verwendeten Farbstoffe sind vermutlich auf die Struktur der Farbstoffe zurückzuführen. Da die chemische Struktur der verwendeten Farbstoffe, außer für Atto 655 von der Firma ATTO-TEC nicht preisgegeben werden, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Möglicherweise unterscheiden sich die BG-Farbstoffe im Abstand zwischen der chromophoren Gruppe und Guanin. So kann es sein, dass die chromophore Gruppe der Farbstoffe Atto 655 und Atto 680 näher am Guanin liegen und dadurch stärker beeinflusst werden. Da die Effizienz des photoinduzierten Elektronentransfers ebenfalls von dem geringen Oxidationspotential von Guanin und dem Reduktionspotential der verwendeten Farbstoffe abhängig ist, liegt es nahe, dass die BG-Farbstoffe Atto 655 und Atto 680, die eine höhere Fluoreszenzlöschung zeigen, ein höheres Reduktionspotential aufweisen als die Carbopyronine Atto 620 und Atto 633 (51). Die bei den BG-Farbstoffen beobachtete hohe Fluoreszenzlöschung bietet den Vorteil, dass ein Überschuss an BG-Farbstoff, der bei der Fluoreszenz-Markierung mit SNAP-tag nicht gebunden wird, im Vergleich zu ungelöschten BG-Farbstoffen nur zu einem geringen Anteil des Fluoreszenzsignals beiträgt. Somit wird eine sehr viel höhere Spezifität gewährleistet.

Neben der Fluoreszenzlöschung ist gleichermaßen auch der Anstieg der Fluoreszenz nach kovalenter Bindung der BG-Farbstoffe an SNAP-tag, unter Freisetzung von Guanin, eine weitere wichtige Voraussetzung, um ein hohes Signal zu Rausch-Verhältnis und somit eine hintergrundreduzierte Markierung zu erzielen. Am Beispiel von BG-Atto 655 wurde gezeigt, dass mit einer zunehmenden SNAP-Konzentration die Reaktionsrate und damit die Fluoreszenzintensität ansteigen. Bei einer zum BG-Farbstoff äquivalenten SNAP-Konzentration beträgt die Reaktionsrate $b = 0,01 \text{ min}^{-1}$ während sie bei einem zweifachen, 5-fachen und 50-fachen Überschuss auf $0,05 \text{ min}^{-1}$, $0,1 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,33 \text{ min}^{-1}$ ansteigt und sich somit die Fluoreszenzintensitäten nach 30 Minuten Reaktionszeit um das 1,4-, 2,1-, 3,2- bzw. 5-fache erhöht haben. Zur Untersuchung der vier BG-Farbstoffe wurden diese daher mit einem 50-fachen Überschuss an SNAP-Protein versetzt, um eine schnelle Reaktion zu gewährleisten. Es wurde gezeigt, dass alle BG-Farbstoffe mit SNAP-tag unter einem Anstieg der Fluoreszenzintensität reagieren. Die Reaktionen verliefen jedoch unterschiedlich. Die BG-Farbstoffe der Oxazine Atto 655 und Atto 680 reagierten deutlich schneller als die BG-Farbstoffe der Carbopyronine Atto 620 und Atto 633. Die Reaktionsraten von BG-Atto 655 und BG-Atto 680 lagen bei $0,33 \text{ min}^{-1}$ bzw. $0,26 \text{ min}^{-1}$ und führten nach 30 Minuten zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität um das 5-fache bzw. um das 4,3-fache. Bei den BG-Farbstoffen der Carbopyronine Atto 620 und Atto 633 lagen die Reaktionsraten sehr viel niedriger ($0,06$

min^{-1} und $0,02 \text{ min}^{-1}$), welches nur eine 2,5-fache und 1,4 fache Erhöhung der Fluoreszenzintensität zur Folge hatte. Somit konnte für alle vier BG-Farbstoffe gezeigt werden, dass nach kovalenter Bindung an SNAP-tag die Fluoreszenzintensität signifikant ansteigt, da Guanin bei der Reaktion abgespalten wird und nicht mehr für den intramolekularen Elektronentransfer zur Verfügung steht. Ein maximaler Anstieg der Fluoreszenzintensität auf die Fluoreszenzintensität des freien Farbstoffes wurde jedoch für keine der vier BG-Farbstoffe erzielt, was unter anderem auf die unvollständige Übertragung des Fluorophors von BG auf das SNAP-Protein zurückzuführen ist.

Es wurde gezeigt, dass die Oxazine Atto 655 und Atto 680 im Vergleich zu den Carbo-pyroninen Atto 620 und Atto 633 als BG-Farbstoff besser gelöscht sind und eine schnellere Reaktion mit dem SNAP-Protein zeigen. Daraus lässt sich ableiten, dass intramolekulares Löschen im BG-Farbstoffkonjugat mit den molekularen Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffs zusammenhängt. An das SNAP-Protein gebunden kann die Fluoreszenz ebenso durch die unterschiedlichen Aminosäuren des Proteins durch eine Vielzahl von möglichen Interaktionen bestimmt werden. Ebenso können die Umgebungsbedingungen des farbstoffmarkierten Proteins die Fluoreszenz durch viele unterschiedliche Einflüsse und Wechselwirkungen beeinflussen, die ebenso von der Struktur des Farbstoffs abhängig sind. Zu denen in der Spektroskopie bekannten Einflussfaktoren zählen unter anderem die lokale Ladung, die Polarität, die Wasserlöslichkeit und die Viskosität (35). Aufgrund der zahlreichen Varianten ist es schwierig den Einfluss, den diese Parameter auf die Fluoreszenzeigenschaften ausüben können, vorherzusagen. Dazu sind weitere Experimente notwendig, bei denen die unterschiedlichen Parameter systematisch untersucht werden, um die unbekanntenen Einflussfaktoren in der Reaktion von SNAP-Protein mit Oxazin- bzw. Carbo-pyronin-Farbstoffen zu ermitteln.

Für die Verwendung der BG-Farbstoffe mit dem SNAP-tag System als Markierungsmethode ist es wichtig, das photophysikalische Verhalten der Farbstoffe zu kennen. Hierzu zählen die Photostabilität (Photobleichen) und die Fluoreszenzunterbrechungen (Blinken) der Farbstoffe. Eine geringe Photostabilität und Fluoreszenzunterbrechungen des Farbstoffmoleküls erschweren das kontinuierliche Beobachten und Verfolgen einzelner Moleküle. Eine einfache Methode diese Eigenschaften zu untersuchen ist die Beobachtung der Fluoreszenzintensitäten einzelner immobilisierter Farbstoffmoleküle über einen bestimmten Zeitraum mittels TIRF-Mikroskopie. Eine Mittelwertbildung, wie sie bei Ensemblemessungen üblich ist, wird somit umgangen. Zudem sind die so gewonnenen Daten frei von jeglichen Änderungen und Approximationen.

Die Farbstoffe wurden zum einen als SNAP-Farbstoffe über eine Antikörperbindung bzw. als Oligo-Farbstoffe über eine Biotin-Streptavidin Bindung auf einer Glasoberfläche immobilisiert und mit TP bedeckt. Durch diese zwei Immobilisierungsarten sollte der Einfluss des SNAP-Proteins auf das Blinkverhalten des Farbstoffs evaluiert wer-

den, wobei zu berücksichtigen ist, dass nur eingeschränkt Rückschlüsse möglich sind, da ebenso die Nukleobasen des Oligonukleotids den Farbstoff beeinflussen können.

Die Farbstoffmoleküle wurden bei der TIRF-Mikroskopie als klar abgegrenzte, fluoreszente Punkte (Spots) detektiert, die sich in ihrer Helligkeit und in ihrem Durchmesser unterscheiden. Die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten und Durchmesser sind bei den SNAP-Farbstoffen auf die gleichzeitige Bindung mehrerer SNAP-Farbstoffe an den SNAP-Antikörper zurückzuführen, der zwei mögliche Bindungsstellen aufweist. Bei der Immobilisierung der Oligo-Farbstoffe stehen am Streptavidin maximal drei freie Bindungsstellen zur Verfügung. Die Fluoreszenzintensitäten der detektierten Farbstoffspots wurden aus den Filmen extrahiert und als Fluoreszenzspuren in Abhängigkeit der Zeit graphisch dargestellt. Die Fluoreszenzspuren zeigten in Übereinstimmung mit der vom Auge detektierten unterschiedlichen Helligkeiten, unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten, die in mehreren Stufen auf das Hintergrundsignal geblichen wurden und somit auf die Bindung mehrerer Farbstoffmoleküle hinweisen. Die Fluoreszenzspuren wurden aufgrund ihres Erscheinungsbilds in drei unterschiedliche Kategorien eingeteilt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Farbstoff Atto 633 an SNAP gebunden im Vergleich zu den Farbstoffen Atto 620, Atto 655 und Atto 680 mit 42% den höchsten Anteil an Fluoreszenzspuren aufweist, die keine Fluoreszenzunterbrechungen zeigen (Kategorie III). Befindet sich SNAP-Atto 633 jedoch in Zellysat, einer Umgebung, die die Bedingungen innerhalb einer Zelle nachahmen soll, so fällt der Anteil dieser Spuren auf 31% ab, liegt jedoch immer noch höher im Vergleich zu den von TP umgebenden SNAP-Farbstoffen Atto 620, Atto 655 und Atto 680, bei denen Kategorie III nur ca. 20 – 26% der Fluoreszenzspuren ausmacht. Diese Farbstoffe weisen sich eher durch eine hohe Zahl an Spuren der Kategorie II aus, die Fluoreszenzunterbrechungen mit langen An- und Aus-Zuständen (52%, 74% und 62%) besitzen. Dieser Sachverhalt kann die Anwendung dieser Farbstoffe innerhalb der Zelle erschweren, da die Photophysik des Farbstoffs an sich die eigentlich zu beobachtenden Bindungsereignisse von Proteinen überlagern kann und keine Unterscheidung möglich ist, ob die Fluoreszenzunterbrechungen eine Eigenheit des Farbstoffs sind oder ob eine Proteininteraktion vorliegt. Die Untersuchungen der Oligo-Farbstoffen zeigten, dass an Oligonukleotide gebundene Atto 633 Farbstoffmoleküle einen mehr als doppelt so hohen Anteil (86%) an Fluoreszenzspuren mit Fluoreszenzunterbrechungen (Kategorie II) aufweisen, während der Anteil an kontinuierlich fluoreszierenden Molekülen (Kategorie III) auf einen geringen Prozentsatz von 6% abfällt. Dies führt zur Vermutung, dass im Falle von Atto 633 das SNAP-Protein einen positiven, stabilisierenden Einfluss auf Fluoreszenzunterbrechungen ausübt. Dieser Einfluss ist ebenso bei Atto 620 zu beobachten. Wie Atto 633 zählt dieser Farbstoff zur Gruppe der Carbopyronine. Im Gegensatz dazu zeigen die zur Gruppe der Oxazine zählenden Attofarbstoffe 655 und 680 ein umgekehrtes Verhalten. An SNAP gebunden zeigen sie einen hohen Anteil an Spuren mit Fluoreszenzunter-

brechungen, während an ein Oligonukleotid gebunden dieser Anteil drastisch abfällt und der Anteil an kontinuierlich fluoreszierenden Molekülen deutlich ansteigt. Atto 633 bietet somit unter den untersuchten Attofarbstoffen hinsichtlich der Fluoreszenzunterbrechungen die besten Eigenschaften. Eine langanhaltende Fluoreszenz ermöglicht ein kontinuierliches Beobachten von SNAP-Fusionsproteinen über die gesamte Messdauer und somit die Untersuchung biologischer Prozesse. Wenngleich Atto 633 mit den besten photophysikalischen Eigenschaften in dieser Arbeit charakterisiert wurde, so muss jedoch für andere Experimente überprüft werden ob der Farbstoff im Einzelfall geeignet ist. Innerhalb Kategorie I stellt Atto 655 sowohl an SNAP als auch an Oligonukleotid gebunden den photostabilsten Farbstoff dar. Der Anteil der Fluoreszenzspuren, die in den ersten 10-20 Sekunden gebleicht sind beträgt hier nur 6 bzw. 4%. In Kategorie I ist ebenso auffällig, dass die Oligo-Farbstoffe ein deutlich photostabileres Verhalten als die SNAP-Farbstoffe besitzen. Hier zeigt sich wiederum, dass die Attofarbstoffe der Carbopyronine sowohl an SNAP als auch an Oligonukleotid innerhalb der ersten 10-20 Sekunden häufiger einer Photozerstörung unterliegen als die Oxazine. Um die Photostabilität der Farbstoffe ebenso im Ensemble zu beschreiben, wurde die Abnahme der Fluoreszenzintensität einer Farbstoffmolekül-Gruppe in Abhängigkeit der Zeit als Bleichkurve dargestellt und die Bleichraten verglichen. Auch hier zeigt sich mit Ausnahme von Atto 633, dass die Oligo gebundenen Farbstoffe einem langsameren Photobleichen unterliegen als die SNAP gebundenen Farbstoffe. Während die Oligo-Farbstoffe nach 60 Sekunden auf 27 - 63% ihrer ursprünglichen Fluoreszenzintensität abfallen, zeigen die SNAP-Farbstoffe nur noch eine Restfluoreszenz von 8 - 21%, wobei Atto 655 wie erwartet in beiden Gruppen den photostabilsten Farbstoff darstellt. Der Attofarbstoff 633 sticht bei diesen Photostabilitätsuntersuchungen hervor. Er zeigt ein gegenteiliges Verhalten. An SNAP gebunden zeigt er ein viel langsames Bleichen als im Oligo gebundenen Zustand. Mit einer Bleichrate von $0,036 \text{ s}^{-1}$ in TP bzw. $0,056 \text{ s}^{-1}$ in ZL fällt die Fluoreszenz von SNAP-Atto 633 auf 21% bzw. 16% der Ursprungsintensität, während im Oligo-Konstrukt Atto 633 in den ersten 20 Sekunden sehr viel schneller ($0,091 \text{ s}^{-1}$) gebleicht wird. Farbstoffe der gleichen Stoffklasse (Carbopyronine, Oxazine) zeigen somit ähnliche photophysikalische Eigenschaften. Darüber hinaus üben Moleküle in der Nachbarschaft (unterschiedliche Puffer, unterschiedlicher pH) oder an den Farbstoff kovalent gebundene Moleküle (SNAP-Protein bzw. Oligonukleotid) eine Wirkung auf das Verhalten des Farbstoffes aus.

Da die Kategorisierung der Farbstoffe keine weiteren Auskünfte über die Komplexität des Blinkverhaltens, d.h. das aperiodische Umschalten zwischen hellen An-Zuständen und dunklen Aus-Zuständen gibt, wurde im nächsten Schritt eine Verteilung der Dauer dieser Zustände von mehreren Molekülen je Farbstoffkonstrukt bestimmt. Hierfür wurde für jede Fluoreszenzintensitäts-Zeitspur eine Grenzwert-Intensität gewählt (5.5.2), um die An - (über dem Grenzwert) und Aus-Zustände (unterhalb des Grenzwertes) zu definieren.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der so gewonnenen An- und Aus-Zeiten zeigen, dass die Übergangszeiten vom dunklen Zustand in den fluoreszenten Zustand als auch vom fluoreszenten Zustand zurück in den dunklen Zustand sowohl bei den SNAP- als auch bei den Oligofarbstoffen über drei Größenordnungen erstreckt, während die zugehörigen Wahrscheinlichkeiten sechs Größenordnungen umfasst. Diese Verteilungen, die sich durch eine Potenzfunktion (Power Law) beschreiben lassen, weisen somit auf eine komplexe Kinetik hin, wobei vor allem den Anzeiten noch ein sekundärer Prozess überlagert ist. Dieser Prozess wird durch einen exponentiellen Cut-Off beschrieben, der lange Anzeiten limitiert und diese am hinteren Ende der Potenzfunktion abschneidet und möglicherweise auf Photozerstörung zurückzuführen ist. Die Anzeitenverteilungen der SNAP-Farbstoffe zeigen alle in ihrer Potenzfunktion einen steileren Verlauf als die zugehörigen Oligo-Farbstoffe, welches ein schnelleres Abfallen der Wahrscheinlichkeitswerte zur Folge hat. Demnach sind lange Anzeiten weniger wahrscheinlich. Diese Tatsache spiegelt die geringere Photostabilität der SNAP-Farbstoffe wider, die bei der Kategorisierung der Fluoreszenzspuren und bei den Untersuchungen zum Photobleichen beobachtet wurden. Innerhalb der SNAP-gebundenen Farbstoffe sticht Atto 633 im Vergleich zu den anderen Attofarbstoffen durch sehr viel längere Anzeiten hervor. Die Anzeiten bewegen sich für SNAP-Atto 633 sowohl in TP als auch in ZL im Bereich von 0,03 - 20 Sekunden, während die anderen SNAP-Farbstoffe nur Anzeiten mit einer Länge von max. 15 Sekunden zeigen. Bei den Oligo-Konstrukten stechen Atto 633 und Atto 655 mit Anzeiten bis zu 30 Sekunden hervor. Außer Oligo-Atto 633 zeigen alle Anzeiten den oben beschriebenen exponentiellen Cut-Off. Ein exponentieller Cut-Off wurde ebenso in der Literatur bei Untersuchungen mit Nanokristallen beobachtet und als abhängig von der Temperatur, der Laserintensität und der Morphologie beschrieben (113), (46), (42). Diese Sensitivität kann somit Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um den Mechanismus der Fluoreszenzunterbrechungen der in dieser Arbeit verwendeten Attofarbstoffe genauer zu analysieren.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Auszeiten aller Farbstoffkonstrukte lassen sich ebenfalls durch eine Potenzfunktion beschreiben, wobei jedoch mit Ausnahme von SNAP-Atto 655 kein Cut-Off vorhanden ist. Dieses statistische Verhalten wurde bereits von Shimizu et al. (42) beschrieben. Sie zeigten bei Untersuchungen mit Quantum-Dots, dass die Auszeiten nur durch ein reines Power-Law Verhalten ohne überlagertem exponentiellen Cut-Off beschrieben werden und somit unabhängig von der Temperatur und der Laserintensität sind. Auch bei den Auszeiten zeigen die SNAP-Konstrukte einen stärkeren Abfall der Potenzfunktion. Die Auszeiten aller Farbstoff-Konstrukte werden durch einen stärkeren Abfall der Potenzfunktion als bei den Anzeiten charakterisiert. Dies bedeutet, dass lange Anzeiten eher wahrscheinlich sind als die zugehörigen Auszeiten und somit der Farbstoff mehr Zeit im An-Zustand verweilt. Zusammenfassend ist zu beobachten, dass Atto 633 für Untersuchungen von einzelnen SNAP-Fusionsproteinmolekülen der am besten geeignete Farbstoff ist. Unter den in dieser

Arbeit untersuchten Farbstoffen zeigt er an SNAP gebunden die höchste Wahrscheinlichkeit für lange Anzeiten (20 Sekunden) und eine niedrigere Wahrscheinlichkeit für lange Auszeiten. Bei SNAP-Atto 633 wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen den Messungen in Tetheringpuffer oder in Zelllysate, welches das Zellmilieu nachahmen soll, gefunden. Zu beachten hierbei ist, dass das Medium in der lebenden Zelle reduzierendere Eigenschaften aufweisen kann als das untersuchte Zelllysate bzw. der Tetheringpuffer und somit eine andere Blinkcharakteristik des Farbstoffs hervorrufen kann. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass Atto 633 an SNAP gebunden ebenso Spuren aufweist, die Photobleichen (20% der Spuren in TP und ZL) als auch Fluoreszenzunterbrechungen (37% der Spuren in TP und 50% in ZL) zeigen und somit zu einer gewissen Unsicherheit bei der Verwendung dieses Farbstoffes führen kann.

Normalerweise erwartet man beim Blinken einzelner Moleküle unter flüssigen Umgebungsbedingungen einen Übergang zwischen zwei klar abgegrenzten An- und Aus-Zuständen, die auf einem Intersystem Crossing (ISC) beruhen, eine exponentielle Verteilung dieser Verweilzeiten (40), (41), (42). Obwohl alle die in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten Farbstoff-Konstrukte in einer wässrigen Umgebung untersucht wurden, beobachtete man für dessen Verweilzeiten ein Power-Law Verhalten, wie es bei Quantum Dots und in polymeren Matrizen beobachtet wurde. ISC kommt als Ursache für das Power-Law Verhalten nicht in Frage, da dieser Übergang im Mikrosekundenbereich liegt. Diskutiert werden dagegen Übergänge in andere dunklen Zustände und Ladungstrennung (45), (42). Dies führt zur Vermutung, dass eine Löschung der in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe erfolgt sein muss. Mechanismen, die zur Fluoreszenzlöschung führen können, sind z.B. FRET oder PET (1.2.4). Eine Löschung der Fluoreszenz der untersuchten Attofarbstoffe kann somit wie bereits gezeigt durch Guanin oder auch durch weitere natürlich vorkommende Stoffe wie die Aminosäure Tryptophan (Trp) ausgelöst werden und die Ursache für ein Power-Law Verhalten der An- und Auszeiten sein. Im Falle der an SNAP-Protein gebundene Attofarbstoffe können die im SNAP-Protein enthaltenen intrinsischen Tryptophane eine Löschung der Fluorophore hervorrufen. Eine Fluoreszenzlöschung von rot-absorbierenden Farbstoffen durch Trp wird in der Literatur als statisches Quenchen oder Kontakt-Quenchen beschrieben, bei denen die Moleküle im Grundzustand, d.h. vor der Anregung, einen Komplex bilden (51), (52).

Das SNAP-Protein besitzt drei Tryptophane (blau) die in einem Abstand (grüne gestrichelte Linien) von ca. 15 Å von dem Fluorophor entfernt liegen und somit PET verursachen können. Mit Hilfe des Programms Chem 3D Pro wurden die Abstände des Fluorophors (grün) zu den Tryptophanen im SNAP-Protein bestimmt.

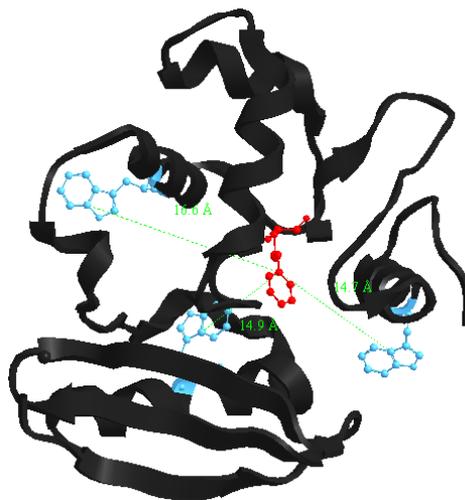


Abbildung 46: Dreidimensionale Proteinstruktur von SNAP-tag (schwarz) mit seinen drei Tryptophanen (blau) und der Bindungsstelle des Farbstoffs, der über den Benzylrest (rot) an das SNAP-Protein gebunden ist. Die Abstände des Fluorophors zu den 3 Tryptophanen im SNAP-Protein werden durch die gestrichelten grünen Linien dargestellt.

Bei den Oligo-Farbstoffen besitzt das zur Immobilisierung verwendete Streptavidin in jeder hydrophoben Bindungstasche vier Trp-Reste, die in intermolekularen Fluoreszenzexperimenten mit den Farbstoffen Atto 655, Atto 680 und MR121 zu einer erheblichen Fluoreszenzlöschung geführt hatten. Nach Zugabe eines Überschusses an Biotin wurde jedoch ein starker Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute verzeichnet (51). Somit ist eine Fluoreszenzlöschung durch die im Streptavidin enthaltenen Trp-Moleküle bei den in dieser Arbeit untersuchten Oligo-Farbstoffen nicht zu erwarten, da diese über Biotin in den Taschen des Streptavidins gebunden werden. Ebenso ist ein intramolekularer Kontakt und somit eine Komplexbildung zwischen Farbstoff und Trp des Streptavidin aufgrund der starren Struktur des Oligonukleotids eher unwahrscheinlich. Die in den Proteinen BSA und Streptavidin enthaltenen Tryptophane sind somit zu weit von den Fluorophoren entfernt, um PET zu verursachen. Im Falle der in dieser Arbeit über BSA-Biotin Streptavidin immobilisierten Farbstoffe kann somit nur die Nukleinbase Guanin, die in dem zur Immobilisation verwendeten Oligonukleotid (5'-CCC GCG CTT GCT TTG CGT TTT T-3') enthalten ist, die Fluoreszenzlöschung hervorrufen. Das erste Guanin Molekül befindet sich fünf Basenpaare von dem Fluorophor entfernt. Durch die Hybridisierung dieses Stranges mit dem komplementären Gegenstrang erfolgt eine Stabilisierung des Oligonukleotids.

In den Untersuchungen zur Blinkkinetik der SNAP- und Oligo-Farbstoffe zeigten die SNAP-Farbstoffe eine geringere Wahrscheinlichkeit für lange Anzeiten als die Oligo-Farbstoffe. Dies kann auf stärkere Löschemanismen in den SNAP-Konstrukten zurückzuführen sein. Die im SNAP-Protein enthaltene Aminosäure Tryptophan besitzt bei pH=7 ein niedrigeres Oxidationspotential ($\sim 1,0$ V, relativ zur Normalwasserstoffelekt-

rode) als die im Oligonukleotid enthaltene Nukleinbase Guanin ($\sim 1,25$ V, relativ zur Normalwasserstoffelektrode) und ist daher ein besserer Elektronendonator und damit ein effizienterer Quencher (52). Somit ist anzunehmen, dass die Löschung durch Trp stärker ist als durch Guanin. Für alle Konstrukte konnte jedoch gezeigt werden, dass die Farbstoffe mehr Zeit im An-Zustand verbringen als im Aus-Zustand.

Die Mechanismen, die dem Power-Law Verhalten zugrunde liegen, bleiben jedoch immer noch weitestgehend offen. Es gibt hierzu zahlreiche Studien (39), (44), (46), (113). Allerdings wurden diese nicht an den gleichen Fluorophoren und nicht im gleichen Labor durchgeführt. Dies erschwert die direkte Korrelation der Erkenntnisse. Daher sind weitere intensitäts- und temperaturabhängige Untersuchungen der in dieser Arbeit verwendeten Attofarbstoffe notwendig, um einen eindeutigen Blinkmechanismus zu identifizieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt, welcher nicht vernachlässigt werden darf, ist die Analysemethode. In dieser Arbeit wurde die Thresholding-Methode verwendet, bei der die An- und Auszeiten durch Setzen eines Schwellenwerts/Grenzwerts bestimmt werden. Laut Amecke et al. (46) kann der Schwellenwert das resultierende Power-Law Verhalten beeinflussen. Es sollten für die An- und Aus-Zustände unterschiedliche Grenzwerte verwendet werden, die jeweils ziemlich nahe dem zugehörigen Zustand liegt, d.h. möglichst außerhalb dessen Poisson-Rauschen. Vergleiche zwischen verschiedenen Messungen sind nur zielführend, wenn ein bestimmter Schwellenwert bei einer ähnlichen Fraktion an An-Zuständen angewandt wird. Dies ist bei Spuren, die keinen deutlichen Peak zeigen nicht möglich. Des Weiteren weist Amecke et al. darauf hin, dass trotz der scheinbar besseren Statistik, eine geringere Betonung auf den kurzen Anzeiten liegen soll, da diese meistens verfälscht sind. Aufgrund des höheren Rauschens des An-Zustands sind die konventionell gewählten Grenzwerte meistens zu klein und somit passend für die Aus-Zustände aber völlig unzureichend für die An-Zustände. Des Weiteren erschweren Emissionsspuren, die geblichen werden bzw. bei denen die Fluoreszenzintensität während der Untersuchungszeit stetig abnimmt, das Festlegen eines geeigneten Grenzwerts. Bei solchen Spuren wurde die Analyse nur auf einen Teil der Emissionsspur begrenzt bzw. nicht ausgewertet.

Die hier beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass die Kenntnis des photophysikalischen Verhaltens des verwendeten Farbstoffs bei unterschiedlichen Konditionen unabdingbar ist für die Entwicklung von biologischen Untersuchungen. Des Weiteren ist es wichtig die experimentellen Versuchsbedingungen, wie z.B. die Laserintensität, die Temperatur und die Proteinstruktur oder DNA-Sequenz des Zielmoleküls (zu untersuchenden Moleküls) zu kennen. Das Blinkverhalten ist ein gutes Beispiel, welches zeigt, dass die Kenntnis der photophysikalischen Eigenschaften essentiell ist, da ansonsten Fehlinterpretationen wahrscheinlich sind. Je mehr Informationen man über die Photophysik der Farbstoffe besitzt, desto präziser lassen sich die Einzelmolekül-Daten analysieren.

4.2 *In vivo* Fluoreszenz-Markierung von CheY

Um die Anwendbarkeit der BG-Farbstoffe zusammen mit dem SNAP-tag System als Hintergrundreduziertes Markierungsverfahren zur Untersuchung biologischer Systeme in lebenden Zellen zu testen, wurden die Experimente auf das Signalprotein CheY, welches in der bakteriellen Chemotaxis (1.5) eine zentrale Rolle spielt, ausgedehnt.

Untersuchungen zur Zellgängigkeit der BG-Farbstoffe zeigten, dass der Anteil markierter CheY-SNAP-tag exprimierender *E. coli*-Zellen von den Eigenschaften des BG-Farbstoffs abhängig ist. Während die BG-Farbstoffe der moderat hydrophilen Carbopyronine Atto 620 und Atto 633 zu einer Anfärbung von 72% bzw. 87% der *E. coli*-Zellen führten konnten die sehr hydrophilen Oxazine Atto 655 und Atto 680 die Zellmembran von nur 10% bzw. 5% der Zellen durchdringen. Untersuchungen mit der Negativkontrolle, die kein SNAP-Fusionsprotein exprimiert, zeigten, dass die BG-Farbstoffe nur spezifisch binden und sich ungebundener BG-Farbstoff problemlos aus der Zelle herauswaschen lässt. Diese Beobachtungen decken sich mit den in Stöhr et al. (7) beschriebenen Ergebnissen. Somit kommen nur BG-Atto 620 und BG-Atto 633 als Farbstoffe für die Beobachtung von CheY-SNAP in lebenden Zellen in Frage, da sich diese hindernislos in die Zellen einbringen lassen. Die schlechte Zellgängigkeit der Oxazine könnte laut Stöhr auf die Größe dieser Farbstoffklasse zurückgeführt werden, die sehr voluminös ist und daher die Zellmembranen nur sehr schlecht durchdringen können (114).

Mittels PAGE konnte in weiterführenden Experimenten sichergestellt werden, dass innerhalb der Zelle das SNAP-Protein nicht von CheY abgespalten ist und somit eine spezifische Bindung zwischen CheY und dem SNAP-Protein vorliegt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen SNAP-Protein und Farbstoff spezifisch und kovalent ist.

Neben der Fähigkeit zur spezifischen Anfärbung von Biomolekülen soll das Markierungsverfahren zusätzlich die Fähigkeit besitzen, die Funktionsfähigkeit des zu untersuchenden Moleküls durch die Größe des fluoreszenten Tags nicht zu beeinträchtigen. Im Vergleich zu fluoreszenten Proteinen ist SNAP-tag mit einem Molekulargewicht von 20 kDa zwar etwas kleiner, jedoch relativ zum Zielprotein CheY um das 1,4-fache größer. Mit einem Schwärm-Assay (5.3.3) konnte nachgewiesen werden, dass das Fusionsprotein CheY-SNAP im Vergleich zum Wildtyp zu 75% funktionsfähig ist. Durch Transformation des Fusionsproteins in eine Nullmutante konnte die Chemotaxis der Zellen wieder hergestellt und somit das Ausbreiten der Zellen ermöglicht werden. Die Ursache für die nicht 100%-ige Funktionsfähigkeit von CheY-SNAP ist möglicherweise durch die Fusion des SNAP-Proteins an CheY und das resultierende Molekulargewicht zurückzuführen, das sich mehr als verdoppelt hat. Im Vergleich zu dem Kontrollfusionsprotein CheY-YFP war die Funktionsfähigkeit des CheY-SNAP Proteins bei einer

Induktion mit 10 μM IPTG um das 3,6-fache höher. Dies kann auf die geringere Größe des SNAP-Proteins (20 kDa) im Vergleich zu YFP (26,4 kDa) (115) zurückzuführen sein. Bei einem Induktionsniveau von 50 μM IPTG ist kein Schwärmen der CheY-SNAP exprimierenden Zellen möglich. Die intrazelluläre CheY-P Konzentration muss innerhalb eines sehr engen Konzentrationsbereichs sein, damit die Zelle chemotaktisch aktiv ist (107). Eine zu hohe CheY-SNAP Konzentration beeinflusst das Schwärmverhalten negativ. Daher wurde in den Zellexperimenten, die zur Untersuchung der Chemotaxis dienten, ein Induktionsniveau von 10 μM IPTG verwendet (3.3.3).

Es wurde ebenso die Anzahl exprimierter SNAP-tag Moleküle während des Induktionsverlaufs abgeschätzt und die Markierungseffizienz von BG-Atto 633 als Vertreter der Carbopyronine und BG-Atto 655 als Vertreter der Oxazine bestimmt. Die Markierungseffizienz von BG-Atto 633 lag bei einer 40 minütigen Inkubation mit 6 μM BG-Farbstoff bei gleichzeitiger Proteinexpression mit 1 mM IPTG und einer Zellgängigkeit von 100% in 2 Experimenten bei 0,1% und 0,26%. Für BG-Atto 655 konnte unter diesen Bedingungen keine Markierung verzeichnet werden, was u.a. durch die geringe Zellgängigkeit von 1% bedingt sein kann. Erst durch Stoppen der Proteinexpression und einer Nachfärbung mit einer mehr als 2,5 fachen BG-Farbstoffkonzentration (16 μM) für eine weitere Stunde konnte die Markierungseffizienz von BG-Atto 655 in zwei Experimenten auf etwa 1,5% erhöht werden. Um diese Markierungseffizienz mit den anderen Werten vergleichbar zu machen und auf den Anteil tatsächlich markierter Zellen zu normieren muss in weiterführenden Experimenten die Zellgängigkeit von BG-Atto 655 unter diesen Bedingungen bestimmt werden. Es ist davon auszugehen, dass eine erhöhte Farbstoffkonzentration oder längere Inkubationsdauer nicht nur zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität innerhalb der Zelle führen, sondern auch einen Anstieg der Zellgängigkeit bewirkt. So beschreibt Stöhr (114) bei einer zweistündigen Färbung mit 5 μM BG-Atto 655 eine Zellgängigkeit von 20%. Auch für das BG-Substrat des Farbstoffes MR 121, welches in Stöhr et al. (7) bei einer 50%-igen Zellgängigkeit eine Markierungseffizienz von 2% zeigte, konnte in dieser Arbeit durch eine ungefähr 10x höheren Farbstoffkonzentration und Steuerung der Proteinexpression die Markierungseffizienz auf etwa 4,6% bei 100%-iger Zellgängigkeit erhöht werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Steigerung der Markierungseffizienz durch eine höhere BG-Farbstoffkonzentration, eine längere Inkubationszeit, das Stoppen der Proteinexpression und Nachfärbung erzielt werden kann. Zum einen ist dies darauf zurückzuführen, dass hierdurch ein größerer Anteil der Zellen tatsächlich angefärbt wird. Zudem bewirkt eine verlängerte Inkubationszeit und höhere Farbstoffkonzentration innerhalb der Zelle die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens der Moleküle und somit die Bindung des Farbstoffs an das SNAP-Protein. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings der Kostenfaktor für das BG-Farbstoffsubstrat. Ebenso sollte beachtet werden, dass die Zellen durch eine längere Inkubationszeit einer erhöhten Stresssituation ausgesetzt sind und somit keine normalen physiologischen Vorgänge innerhalb

der Zelle beobachtet werden können. Wenngleich die Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe gering ist, kann dies für Einzelmolekülmessungen, bei denen geringe Konzentrationen im Bereich von 10^{-9} M von Vorteil sind, erstrebenswert sein.

4.3 Etablierung einer Fluoreszenz-Markierungsmethode für die Detektion einzelner CheY-Moleküle mittels TIRF-Mikroskopie

Um CheY auf Einzelmolekülebene zu untersuchen wurde im nächsten Schritt ein Markierungsprotokoll etabliert, welches bei einem hohen Signal zu Rausch – Verhältnis die Beobachtung einzelner CheY-Moleküle mittels TIRF-Mikroskopie erlaubt und die Beschreibung der CheY-Interaktionen ermöglicht. Durch dreimaliges Waschen der angefärbten Zellen konnte überschüssiger, unvollständig gelöschter BG-Farbstoff bzw. freivorliegender Farbstoff von der LabTek-Oberfläche und aus den Zellen herausgewaschen und somit das Signal innerhalb der Zelle von dem Signal auf der LabTek-Oberfläche diskriminiert werden. Um das starke intrazelluläre Fluoreszenzsignal der Zelle weiter zu reduzieren und Stressreaktionen der Zelle durch die Waschschrte zu vermeiden, wurde die Konzentration des BG-Farbstoffs auf 10 nM reduziert und die Protein-Dichte mit einer IPTG-Konzentration von 10 μ M gesteuert. Somit konnten einzelne fluoreszente Spots, die durch markiertes und am Rezeptor bzw. Motor gebundenes CheY-SNAP Protein zurückzuführen sind, detektiert werden. Ein weiteres wichtiges Argument, welches für die Verwendung einer Konzentration von 10 μ M IPTG spricht, ist die Tatsache, dass bei einer höheren Induktion die Chemotaxis gestört ist (3.2.4). Bei diesem Markierungsverfahren ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich die Zellen nicht immer gleich verhalten. Mit der plasmidcodierten Proteinexpression ist es schwer exakte Expressionslevel zu erreichen. Außerdem variieren die bei der Transformation aufgenommene Plasmidanzahl und die IPTG-Aufnahme von Zelle zu Zelle. Zusätzlich bewirken zufällige Einflussfaktoren Störungen in der Genexpression und führen zur Zellindividualität. Daraus ergeben sich Unterschiede in der Proteinexpression innerhalb einer einzelnen Population und zwischen den Versuchstagen. Dies hat zur Folge, dass sich auch innerhalb einer LabTek Kammer Zellen befinden, die nicht alle die gleiche Zellfärbung zeigen. Dadurch reduziert sich die Anzahl der Zellen, die zur Einzelmoleküluntersuchung tauglich sind. Zellen, die am Versuchsende gemessen werden, sind im Vergleich zu den am Anfang gemessenen Zellen sehr viel länger an die Zelloberfläche gebunden und somit einer größeren Stressreaktion ausgesetzt, was die Untersuchung eines intakten biologischen Systems erschwert. Daher wurden die Zellen nacheinander angefärbt und sofort mikroskopiert. Allerdings führt dies dazu, dass die Untersuchung sehr zeitintensiv ist und sowohl die Anzahl detektierter Zellen als auch die Anzahl einzelner Moleküle reduziert werden.

4.4 Einzelmolekül-Messungen zur Beobachtung der Bindung von CheY in lebenden *E. coli*

Die im letzten Abschnitt dargestellte hintergrundreduzierte, spezifische Fluoreszenz-Markierungsmethode wurde entwickelt, um das Bindungsverhalten des bakteriellen Chemotaxisprotein CheY zu untersuchen. Bei allen Zellexperimenten wurden innerhalb einer Zelle unterschiedliche Fluoreszenzintensitätsprofile beobachtet. Cytoplasmatisches CheY-SNAP kann aufgrund von schnellen Brownschen Molekularbewegungen nur als ein weit ausgedehntes Signal beobachtet werden. Erst nach dessen Bindung an stationäre Strukturen (Motorproteine, membranassoziierte Protein) oder an sehr langsam bewegende Moleküle, kann ein klares, beugungsbegrenztes Signal als ein Hot Spot visualisiert werden (9), (116). Somit kann im Zellstamm TE121 eine spezifische Bindung von CheY-SNAP an einen Proteinkomplex einen Hot Spot verursachen, wobei die Stärke des Fluoreszenzsignals ein Hinweis auf die Anzahl gebundener Proteine sein kann. Innerhalb der Zellen konnte eine Dynamik beobachtet werden. Hot Spots, die vor MA-Zugabe durch eine Bindung von CheY-SNAP an CheA bzw. an FliM verursacht werden, können nach Lockstoffzugabe eine Abnahme ihres Fluoreszenzsignals zeigen, da sich CheY-SNAP Moleküle von den Interaktionspartner ablösen und somit ungebunden, nicht detektierbar im Cytoplasma vorliegen. Nach einer gewissen Zeit binden diese an anderen Stellen innerhalb der Zelle und bilden einen neuen Hot Spot. Dies kann auf eine Adaptation (102) des Systems zurückzuführen sein, bei der die Kinase CheA aktiviert wird, dadurch mit CheY interagiert und dieses wiederum in einem phosphorylierten Zustand an die Motorproteine bindet. Bei einem Abfall der CheY-P Konzentration adaptiert das System jedoch auch durch einen Anstieg der FliM Untereinheiten, welches zu einem Anstieg der Bindungsmöglichkeiten führt und somit die Motorsensitivität erhöht (103). CheY-SNAP Fusionsproteine, die eine ähnliche Funktion besitzen, häufen sich somit zu bestimmten Zeiten in bestimmten Regionen an, wie z.B. an den Motorproteinen oder an CheA (117). In diesem komplexen Umfeld liegen somit die einzelnen Proteine als individuelle Einheit vor, während andere Kopien des gleichen Proteins bestimmte Orte besetzen und eine subzelluläre Organisation bewirken. Auch ohne Lockstoff konnte bei TE121, bei dem das Gleichgewicht auf der Seite von phosphoryliertem CheY-SNAP liegt, eine gewisse Dynamik von CheY-SNAP beobachtet werden. Auch hier zeigten manche Hot Spots während der TIRF-Aufnahme eine Abnahme der Fluoreszenzintensität z.T. bis auf das Hintergrundrauschen, während an anderen Stellen neue Hot Spots auftreten. Dies ist auf den ständigen Austausch von CheY an den Motor zurückzuführen. Während CheY an den Motor bindet, dissoziieren andere CheY-Moleküle vom Motor ab, wobei jedoch im Zellstamm TE121 ein hoher Anteil an CheY gebunden vorliegen sollte. Um Sicherzustellen, um welche Bindungen es sich genau handelt, sind in weiterführenden Experimenten Co-Markierungen der verschiedenen Interaktionspartner notwendig. So können z.B. das

Motorprotein FlIM und die an die Rezeptoren assoziierte Kinase CheA über einen anderen chemischen Tag (z.B. Clip-tag) mit einem in einem anderen Wellenlängenbereich fluoreszierenden Farbstoff markiert werden. Durch alternierende Laseranregung kann die Kolo-kalisation von CheY-SNAP und dessen Interaktionspartner untersucht werden. Alternativ können bei geeigneter Auswahl der Farbstoffe FRET-Experimente durchgeführt werden, um die Bindung von CheY-SNAP an das Motorprotein bzw. an CheA zu untersuchen.

Die Detektion einzelner Moleküle kann durch eine hohe Proteindichte innerhalb der Zelle erschwert werden. Durch Steuerung der CheY-SNAP Protein Expression kann die Konzentration des Proteins zwar geregelt werden, jedoch nicht die Anzahl der Bindungen an einen Komplex. Im Zellstamm TE121 verursacht die CheZ-Deletion eine erhöhte Konzentration an phosphoryliertem CheY-SNAP Protein und dadurch eine Bindung von vielen Molekülen an den Motorkomplex. Eine weitere Ursache für die erhöhte Proteindichte ist die Deletion des Anti-Stigmafaktors, welche zu einer 6,6-fach erhöhten Proteinkonzentration führt. Bei der Bindung von CheY-SNAP ist der Abstand zwischen den einzelnen Proteinen kleiner als die Wellenlänge des bei der TIRF-Mikroskopie verwendeten Laserlichts. Das bedeutet, dass fluoreszent markierte Proteine, die weniger als 250 nm benachbart sind, nur als eine einzelne, fluoreszente Einheit erscheinen. Diese Einheiten können jedoch in Abhängigkeit der Anzahl gebundener Moleküle unterschiedliche Helligkeiten aufweisen. In dieser Situation ist es schwer die einzelnen Fluorophore zu unterscheiden und somit die räumliche Organisation der Zelle in der Längenskala von einigen hundert Nanometer zu untersuchen (118).

Neben spezifischen Bindungen können jedoch auch unspezifische Bindungen Hot Spots hervorrufen, welche in der Negativkontrolle TE110 untersucht wurden. Spezifische Bindungen sind in diesem Zellstamm aufgrund fehlender Chemotaxisproteine nicht möglich. In der Hälfte der untersuchten Zellen ($n = 12$) konnte kein beugungsbegrenztes Signal detektiert werden. Bei den restlichen sechs Zellen wurden Hot Spots nachgewiesen, deren Helligkeit und Größe denen von TE121 ähnlich sind und man keinen klaren Unterschied zu diesen definieren kann. Da das Cytoplasma der Bakterienzelle vollgepackt ist mit Makromolekülen, die ca. 30-40% des Zellvolumens ausmachen (119), können unspezifische Wechselwirkungen auftreten. Dies beeinflusst die räumliche Aufteilung und begünstigt ebenso die Assoziation von Molekülen und verlangsamt die Diffusion. Als weitere Ursache kommt ein unvollständiger Knockout der Chemotaxisproteine in Frage.

Die TIRF-Aufnahmen zeigten in beiden Stämmen über die gesamte Messdauer eine einheitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität. In den TIRF-Messungen ist es wichtig, die ungewöhnliche Geometrie des Anregungsfeldes zu berücksichtigen und dies ebenso bei der Auswahl der Laserintensität zu beachten. Fluorophore, die in der Nähe des Ursprungs des evaneszenten Feldes liegen, werden stärker gebleicht als diejenigen

die weiter entfernt liegen. Abhängig von der Verweildauer im evaneszenten Feld entstehen unterschiedliche Effekte. Ein mit Atto 633 fluoreszent markiertes CheY-SNAP Protein, welches mit CheA interagiert oder am Motor bindet, wird gebleicht, da es im Anregungsfeld verweilt. Fluoreszent markierte cytoplasmatische CheY-SNAP Proteine, die in und aus dem Anregungsfeld diffundieren werden nicht so schnell gebleicht. Ursache ist hier der konstante Austausch zwischen Molekülen im evaneszenten Feld und derer, die sich in der großen Masse des Cytoplasmas aufhalten. Photobleichen und Photolyse sind zu berücksichtigen, wenn sich fluoreszent markiertes CheY-SNAP Protein in der Nähe des Deckglases befindet. Hitze und freie Radikale die durch das Anregungslicht bei der Fluoreszenzmikroskopie hervorgerufen werden, können zelluläre Proteine und Strukturen zerstören und eventuell zum Zelltod führen (57), (120). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Leistungsdichte des Lasers Änderungen im Zellmetabolismus verursacht. Aufgrund des Zelltods zeigt die Zelle eventuell ein unnatürliches Verhalten, was zur Messung von Artefakten führen kann.

4.5 Einzelmolekül-Analyse zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von CheY

Die in der Zelle beobachteten Proteininteraktionen sollten nicht nur qualitativ beschrieben, sondern auch quantitativ analysiert werden. Um die spezifischen Funktionen der Proteine genau zu verstehen, ist es unabdingbar zu wissen, wie schnell Proteine assoziieren oder dissoziieren. Anhand der $I_F(t)$ -Spuren ist es möglich eine Zeitserie von Proteininteraktionen zu beobachten. Diskrete Intensitätssprünge in den $I_F(t)$ -Spuren, die eine schlagartige Fluoreszenzerhöhung anzeigen, können ein Hinweis auf Bindung eines oder mehrerer Moleküle sein und somit zu einer Bildung eines sog. Fluoreszenz-Clusters führen. Im umgekehrten Fall kann ein schlagartiger Intensitätsabfall durch eine Ablösung eines CheY-SNAP Moleküls verursacht werden, welches zur sogenannten Clusterauflösung führt. Da aus dieser Beobachtung nicht eindeutig auf die Anzahl der gebundenen Moleküle geschlossen werden kann, könnten in weiteren Untersuchungen der $I_F(t)$ -Spuren die Fluoreszenzintensitäten in einem Histogramm dargestellt werden, welches für ein, zwei oder mehrere Moleküle eine, zwei oder mehrere Gauss-Verteilungen angibt.

Bei der Kategorisierung der $I_F(t)$ -Spuren zeigten sowohl die Zellen des Stammes TE121 ± MA als auch die der Negativkontrolle TE110 einen sehr viel höheren Anteil an Fluoreszenzspuren mit Fluoreszenz-Cluster als ohne Fluoreszenz-Cluster. Die Fluoreszenz-Cluster weisen auf das Vorliegen eines Proteinkomplexes (Protein-Cluster) hin, an den Moleküle binden oder von dem sich Moleküle ablösen. Diese Bindungen können im Zellstamm TE121 auf die Interaktion von CheY-SNAP mit dem Motorprotein oder mit CheA zurückzuführen sein. Jedoch kann es sich auch um unspezifische

Wechselwirkungen von CheY-SNAP mit anderen Membran- oder Proteinstrukturen handeln. Dies wird durch die Untersuchungen im Zellstamm TE110 bestätigt. 62% der Spuren in TE110 weisen ebenso Cluster auf, die nur auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen sein können, da in diesen Zellen kein spezifischer Interaktionspartner exprimiert wird, vorausgesetzt der Knockout des Transkriptionsaktivators FlhC ist vollständig. Nach Zugabe des Lockstoffs MA zu TE121 sinkt der Anteil an Spuren, die Cluster zeigen um 5% ab, was auf die durch den Lockstoff hervorgerufene verminderte Kinaseaktivität von CheA zurückzuführen sein kann. Eine verminderte Kinaseaktivität führt zu einer verminderten Phosphorylierung von CheY und dadurch zu einer verminderten Bindung an die Motorproteine. Diese Hypothese wird durch die Unterteilung der Kategorie II bestätigt. Der Anteil der Clusterbildungen sinkt nach Lockstoffzugabe um etwa 4% ab. Die Spuren, die nach MA-Zugabe trotzdem Clusterbildungen zeigen, sind darauf zurückzuführen, dass während der Chemotaxis ständig phosphoryliertes CheY an den Motor gebunden ist und die Reaktion auf einen Stimulus nur eine Reaktion auf die CheY-P Konzentrationsänderung ist. Das System reagiert somit auf sehr kleine Änderungen in der Anzahl der phosphorylierten CheY-Proteine und damit auf die Anzahl besetzter Motorproteine. Die Negativkontrolle zeigt im Vergleich zu den Zellexperimenten mit TE121 einen höheren Anteil an Clusterbildungen (31%) was darauf hinweist, dass die unspezifischen Bindungen einen nicht vernachlässigbaren Einfluss haben können und sich auf die weitere Analyse negativ auswirken können. Auffällig ist in allen drei Zellexperimenten der hohe Anteil an Clusterauflösungen im Vergleich zu den Clusterbildungen. Ursache hierfür könnte eine Fehlinterpretation in der Kategorisierung der $I_F(t)$ -Spuren sein. Bei der Beschreibung der Clusterauflösung, ist zu berücksichtigen, dass die Auflösung der beobachteten Fluoreszenz-Cluster vor allem am Ende der Spur nicht nur eine Ablösung des CheY-SNAP von einem Interaktionspartner beschreiben kann, sondern es sich hier auch um spontanes Bleichen des Farbstoffmoleküls handeln könnte. Des Weiteren können die $I_F(t)$ -Spuren, welche Cluster zeigen, ebenso mit der Photophysik des verwendeten Farbstoffs Atto 633 verwechselt werden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dieser Auswertung um eine semiquantitative Methode handelt, da sie auf einer subjektiven Einschätzung des Experimentators beruht und somit nur als Hilfsmodell dienen kann.

Die in den Fluoreszenzintensitätsspuren beobachteten Proteininteraktionen können somit eine Sequenz von fluoreszenten An- und dunklen Aus-Zuständen liefern. In einem weiteren Schritt wurden diese Zustände durch die Threshold-Methode voneinander getrennt und die Wahrscheinlichkeitsverteilungen der zugehörigen An- und Auszeiten als kombinierte Verteilung mehrerer Hot Spots dargestellt (Abbildung 47). Zum Vergleich wird die Verteilung der Anzeiten von immobilisiertem SNAP- Atto 633 gezeigt. Zu beachten ist, dass die Anzeiten des SNAP gebundenen Farbstoffs nicht einen Bindungszustand, sondern die Dauer in dem der Farbstoff fluoreszent ist, beschreibt.

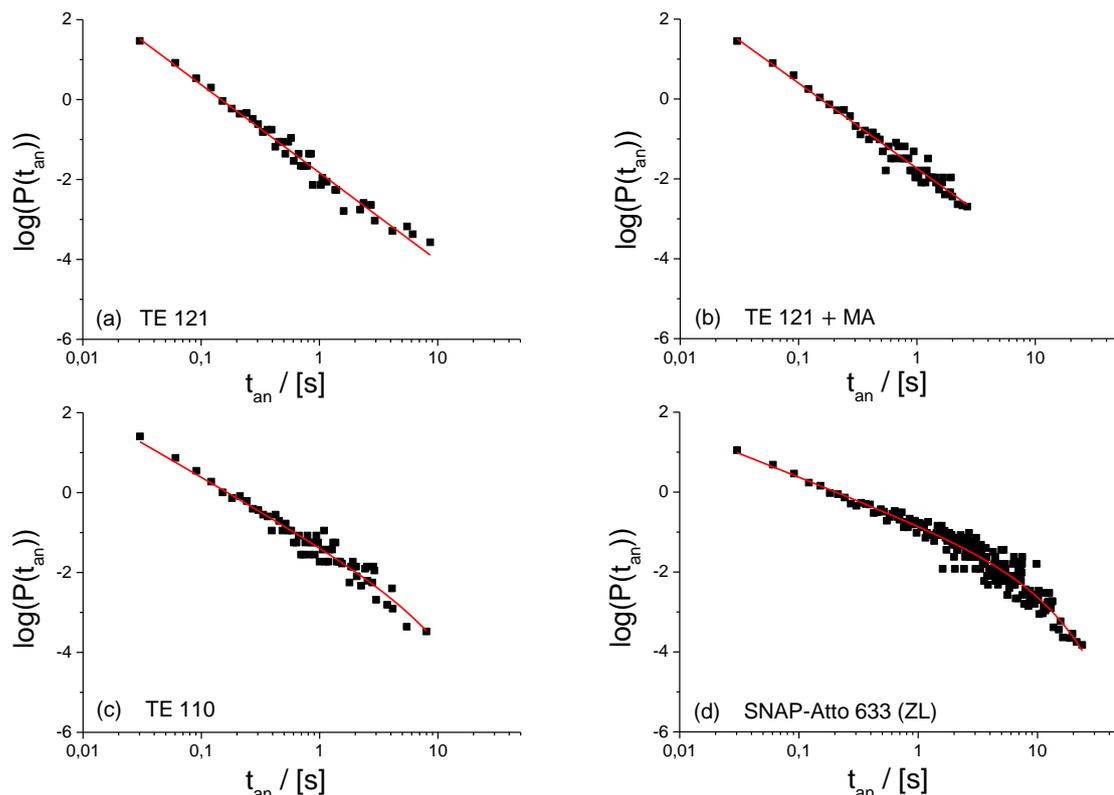


Abbildung 47: Normierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten von CheY-SNAP in *E. coli*-Zellen des Stammes (a) TE121, (b) TE121+MA, (c) TE110 und von (d) auf der Oberfläche gebundenem Atto 633.

Die Verteilung der Anzeiten im Zellstamm TE121 mit und ohne Lockstoff können durch eine reine Potenzfunktion approximiert werden. Die α -Werte von TE 121 sowohl mit als auch ohne MA zeigen im Rahmen der Fehlergenauigkeit den gleichen Wert. Während ohne Lockstoff die Anzeiten eine Länge von bis zu 10 Sekunden zeigen, werden nach Lockstoffgabe ($\alpha_{an} = 2,1 \pm 0,06$) Bindungszeiten größer als drei Sekunden nicht mehr beobachtet. Jedoch erhöht sich augenscheinlich die Wahrscheinlichkeit der Anzeiten im Zeitintervall von 0,1 bis 3 Sekunden und eine größere Varianz tritt in diesem Bereich auf. Die Anzeiten der TE121-Zellen werden als Bindung von phosphoryliertem CheY-SNAP an einen Interaktionspartner (FliM, die CheA) interpretiert, wobei ohne Lockstoff, ein großer Anteil von CheY an den Motor bindet, da CheY aufgrund der CheZ-Deletion in der phosphorylierten Form vorliegt. Die Potenzfunktion mit $\alpha_{an} = 2,2 \pm 0,06$ beschreibt somit hauptsächlich die Bindung des phosphorylierten CheY an das Motorprotein FliM. Nach Zugabe eines Lockstoffs sinkt die Kinaseaktivität von CheA, was zu einem geringeren Anteil an phosphoryliertem CheY-SNAP führt. Aufgrund einer geringeren Bindungsaffinität von unphosphoryliertem CheY-SNAP finden weniger Bindungen bzw. weniger lange Bindungen am Motor statt. Sourjik und Berg (121) zeigten in Untersuchungen zur Chemotaxis, dass nach Zugabe eines Lockstoffes die Menge an

FliM gebundenem CheY-P exponentiell mit einer Geschwindigkeitskonstante von 2 s^{-1} abfällt. Nach Zugabe eines Schreckstoffs wurde eine FliM-Belegung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von 20 s^{-1} beobachtet. Der erhöhte Anteil an unphosphoryliertem CheY-SNAP, welches im Cytoplasma diffundiert, kann somit unspezifische Bindungen, die im Bereich von 0,1 bis 3 Sekunden liegen, eingehen. Dies hat zur Folge, dass sich der Anteil der Anzeiten in diesem Bereich erhöht und stärkere Varianzen auftreten (b). Die Negativkontrolle TE110 zeigt wie TE121+ MA Varianzen im Bereich von 0,1 bis 3 Sekunden, während längere Anzeiten durch einen exponentiellen Cut-Off abgeschnitten sind. Im Gegensatz dazu zeigt TE121 keine Varianzen in diesem Bereich. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass der Großteil von CheY-SNAP in TE121 spezifisch gebunden vorliegt und demnach nicht für unspezifische Bindungen, die im Bereich von 0,1 bis 3 Sekunden liegen (vgl. unten TE110), zur Verfügung steht. Anzeiten im Bereich von 0,1 bis 3 Sekunden, wie sie in der Negativkontrolle gehäuft vorliegen, können demnach auf unspezifische Bindungen mit anderen Membran- oder Proteinstrukturen zurückzuführen sein, während Anzeiten im Bereich von 3 bis 10 Sekunden möglicherweise die spezifischen Bindungen an das Motorprotein FliM und an CheA beschreiben. Des Weiteren ist in Abbildung 47d die Verteilung der Anzeiten von Atto 633, welches an SNAP gebunden auf einer Glasoberfläche immobilisiert ist, abgebildet. Bei den Farbstoffen beschreiben die Anzeiten hier keine Bindungen, sondern die Dauer in welcher der Farbstoff fluoreszent ist. Wie in Abbildung 47d dargestellt, zeigt Atto 633 an SNAP gebunden eine gehäufte Verteilung seiner Anzeiten im Bereich von 1 bis 15 Sekunden, was die Beobachtung der langen spezifischen Bindungen von CheY-SNAP möglich macht. Da in allen drei Zellexperimenten der α_{an} -Wert der Anzeitenverteilung (~ 2) größer ist als der zugehörige α_{aus} -Wert ($\sim 1,5$) der Auszeitenverteilung, liegt CheY-SNAP vermehrt im ungebundenen Zustand vor, was in Übereinstimmung mit dem beobachteten hohen Anteil der Clusterauflösungen ist. Eine einheitliche Bindungszeit konnte nicht definiert werden. Statistiken, die auf einem Potenzgesetz beruhen, sind ein Hinweis auf eine komplexe Ordnung, die z.B. durch Interaktionen des CheY-SNAP Proteins mit vielen unterschiedlichen Bindungspartnern verursacht sein können. Spezifische Bindungen mit FliM bzw. CheA sowie auch unspezifische Bindungen innerhalb des vollgepackten Cytoplasmas können somit eine eindeutige Bestimmung der Bindungskinetik unmöglich machen. Kollokalisationsexperimente könnten z.B. in TE121 die Bindungspartner identifizieren. Hierzu bedarf es der gleichzeitigen Markierung der beiden Proteine mit spektroskopisch unterscheidbaren fluoreszenten ‚Tags‘ (z.B. dem CLIP-tag), die durch alternierende Laseranregung detektiert werden können. In weiteren Experimenten ist in der Negativkontrolle die Expression der Chemotaxis- und Motorproteine zu überprüfen, da ein unvollständiger Knockout die Ursache für spezifische Wechselwirkungen in TE110-Zellen sein könnte. Eine nicht zu vernachlässigende Limitierung der Methode liegt in der Natur des Farbstoffes selbst. Weitere Experimente, bei denen die Temperatur- und Laserabhängigkeit des Farbstof-

fes untersucht werden, sind erforderlich um einen tieferen Einblick in dessen Photo-physik zu gewinnen. Für Moleküle, die sich zwischen Motor und Cytoplasma hin und her bewegen, reflektiert die Wahrscheinlichkeitsverteilung nur dann die richtigen An- und Auszustände, wenn die Dissoziationsrate deutlich schneller ist, als die Photo-bleichrate bzw. die Blinkkinetik. Daher sind die genaue Kenntnis dieser photophysikalischen Eigenschaften und das Verständnis der unspezifischen Wechselwirkungen essen- tiell, um biologische Vorgänge in der Zelle richtig zu interpretieren. Die Datenanaly- se spielt in der Einzelmolekül-Detektion zentrale Rolle. Bei den Einzelmolekülmessun- gen entsteht eine große Datenmenge, die häufig manuell oder halbautomatisch analy- siert wird und zudem eine subjektive Sichtweise des Wissenschaftlers mit einfließen lässt. Mit Hilfe einer vollautomatisierten Datenanalyse lässt sich die Auswertung be- schleunigen und die Vergleichbarkeit der Daten zwischen den verschiedenen Arbeits- gruppen verbessern. Das in dieser Arbeit beschriebene Fluoreszenz- Markierungsverfahren stellt einen neuen Ansatz für quantitative Untersuchungen von Proteininteraktionen in lebenden Zellen dar. Die richtige Interpretation dieser Vorgänge ist notwendig, um diese zu kontrollieren und ggf. zu beeinflussen, falls die regulären Signalwege gestört sind.

5 Methoden

5.1 Analytisch - Chemische Methoden

5.1.1 Kopplung von Attofarbstoffen an Benzylguanin

Die verwendeten Farbstoffe Atto 620, Atto 633, Atto 655 und Atto 680 wurden von der Firma ATTO TEC, Deutschland als N-Hydroxysuccinimidylester (NHS-Ester) bezogen. Sie wurden in dem polaren organischen Lösungsmittel Dimethylformamid (DMF) gelöst (2mg/ml) und bei -20°C gelagert. Eingesetzt wurden die verwendeten Farbstoffe als NHS-Ester, da dieser im Vergleich zur freien Carbonsäure des Farbstoffes eine höhere Reaktivität aufweist und somit besser mit der Aminogruppe des Benzylguanins reagieren kann. In Tabelle 2 sind die optischen Eigenschaften der Attofarbstoffe gelistet. Das Oxazinderivat MR121, wurde freundlicherweise von K.H. Drexhage (Universität-Gesamthochschule, Siegen) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe mit Angabe der Farbstoffklasse, der maximalen Absorptions (λ_{abs})- und Fluoreszenzwellenlänge (λ_{fl}), dem Extinktionskoeffizienten (ϵ_{max}), Information zur elektrischen Ladung bzw. Wasserlöslichkeit, Fluoreszenzquantenausbeute η_{fl} , Fluoreszenzabklingzeit τ_{fl} , Correction Factor CF und Molekulargewicht (MW) des jeweiligen Farbstoff NHS-Ester. Daten entnommen aus (72).

Farbstoffe	Farbstoffklasse	Anregung λ_{abs} (nm)	Emission λ_{fl} (nm)	Extinktionsk. ϵ_{max} ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Eigenschaften	η_{fl} (%)	τ_{fl} (ns)	CF ₂₆₀ bzw. CF ₂₈₀	MW NHS- Ester (g/mol)
Atto 620	Carbopyronin	619	643	1,2	Kationisch Moderat hydrophil	50	2,9	0,05 0,07	709
Atto 633	Carbopyronin	629	657	1,3	Kationisch Moderat hydrophil	64	3.3	0.05 0,06	749
Atto 655	Oxazin	663	684	1,25	Zwitterionisch Sehr hydrophil	30	1.8	0.24 0,08	887
Atto 680	Oxazin	680	700	1,25	Zwitterionisch Sehr hydrophil	30	1,7	0,3 0,17	828
MR-121	Oxazin	660	675	1,25	Nicht veröffentlicht	30	1,9 ?	Nicht veröf- fentlicht	504

Zur Kopplung der Farbstoffe an Benzylguanin wurde 1mM O⁶-Benzylguanin (BG)-NH₂ (Covalys, Witterswill, Schweiz) in DMF gelöst und mit 1,3 Äquivalente des Farbstoff-NHS Esters versetzt. Die Reaktionsmischung wurde nach Zugabe von 2µl der katalytisch wirksamen Hilfsbase Diisopropylethylamin (DIPEA) über Nacht (ÜN) bei Raumtemperatur (RT) und Lichtausschluss bei 750 rpm geschüttelt. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 48 dargestellt. Es handelt sich um eine nucleophile Substitutionsreaktion (S_N2t) bei der der Farbstoff-NHS-Ester mit der Aminofunktion von Benzylguanin zu einem N-Hydroxysuccinimid und dem Benzylguanin-Farbstoff Substrat reagiert.

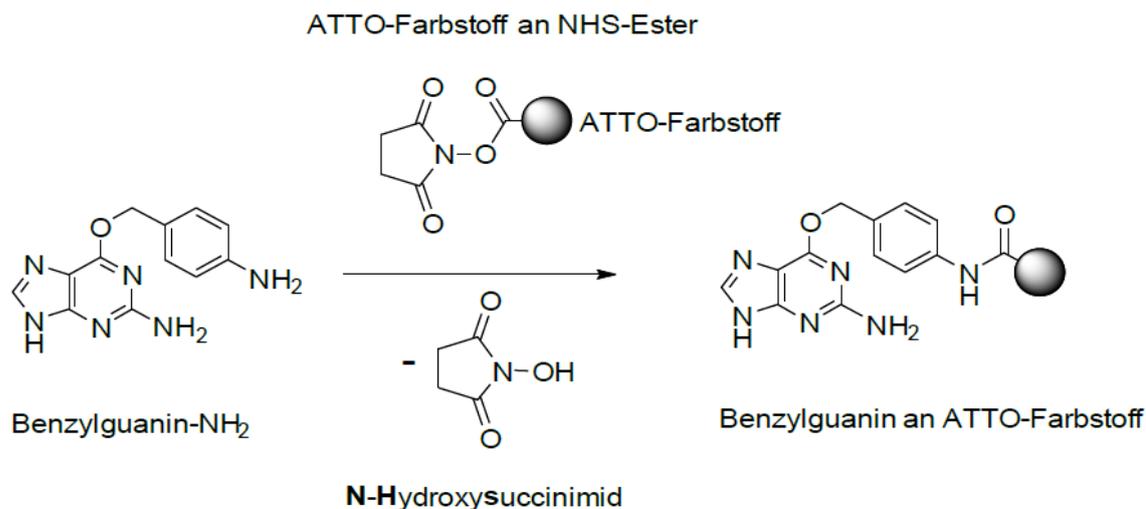


Abbildung 48: Reaktionsmechanismus zur Kopplung eines Attofarbstoffes an BG-NH₂ (37).

Die Abtrennung des synthetisierten BG-Farbstoffs aus der Kopplungsmischung erfolgte am nächsten Tag mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography – HPLC). Die Abtrennung des BG- Substrats aus der Kopplungsmischung ist besonders wichtig, da nicht umgesetztes BG-NH₂ in den vorgesehenen Zellexperimenten mit CheY-SNAP reagieren könnte und somit eine quantitative Auswertung verfälschen würde. Weiterhin würde frei vorliegender Farbstoff-NHS Ester in den Zellexperimenten zu starkem Hintergrundsignal führen, welches die Detektion der Fluoreszenz des farbstoffmarkierten CheY- SNAP stört.

5.1.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist ein Verfahren bei dem die aufzureinigende Substanz zusammen mit einem Elutionsmittel (mobile Phase) unter Druck durch eine Trennsäule gepresst wird. Die Trennsäule enthält ein festes adsorbierendes Material, die sogenannte stationäre Phase. Durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Substanzen des aufzutrennenden Gemisches mit der stationären

Phase verbleiben diese unterschiedlich lang auf der Säule und werden dadurch aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten fraktioniert (122).

Die Aufreinigung der Kopplungsreaktionen erfolgte durch Umkehrphasen HPLC (Reversed-Phase HPLC) mit einer HyperClone™ Umkehrphasensäule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Diese Säule ist zur Aufreinigung von Stoffmengen bis 5 nmol geeignet. Ihre Länge beträgt 250 mm mit einem Innendurchmesser von 4,60 mm. Die stationäre Phase besteht aus unpolarem Material (Oktadecylsilan-Hypersil C18) mit einer Partikelgröße von 5 µm und einer Porengröße von 120 Å.

Das Elutionsmittel wurde über eine Dauer von 30 Minuten über einen linearen Gradienten von 100% des polaren Eluenten A (0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) in ddH₂O, pH=7,4) zu dem unpolarem Eluenten B (0,1 M TEAA in 25% ddH₂O, 75% Acetonitril) variiert. TEAA, welches bei 4 °C gelagert werden muss, besteht zu 12% (v/v) Essigsäure und 27,5% (v/v) Triethylamin in ddH₂O (HPLC-Qualität), pH=7,4. Durch den linearen Gradienten wurden zunächst polare Substanzen (z.B. nicht umgesetztes Benzylguanin) und später die unpolaren Substanzen (z.B. ungeladener Farbstoff) eluiert. Mit einem in der HPLC Anlage (1100 Series LC, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) integrierten Fluoreszenzspektrometer erfolgte die Analyse der unterschiedlichen Fraktionen. Die Absorption zur Detektion von Benzylguanin erfolgte bei 260nm und zur Detektion der verwendeten Farbstoffe bei der Absorptionswellenlänge des jeweiligen Farbstoffes. Um eine Interferenz/Überlappung des Anregungslichts und des Emissionslichts zu umgehen erfolgte die Anregung der Fluoreszenz etwas unterhalb des Absorptionsmaximums des jeweiligen Farbstoffes. Die Detektion des jeweiligen Farbstoffes erfolgte an dessen Emissionsmaximum. Die isolierten BG-Farbstoff Fraktionen wurden in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator plus, Eppendorf, Köln, Deutschland) über Nacht evaporiert und danach in DMF gelöst, um deren Konzentration durch Absorptionsspektroskopie zu ermitteln.

5.1.3 Absorptionsspektroskopie

Die Messung der Konzentrationen der aufgereinigten BG-Farbstoff Substrate erfolgte in Suprasil®-Quarzglas-Halbmikroküvetten an einem UV / Vis-Absorptionsspektrometer (500 Cary Scan) der Firma Varian, Darmstadt, Deutschland. Die Konzentration c wurde mit Hilfe des Lambert-Beersche Gesetz wie folgt bestimmt:

$$c = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (8)$$

A entspricht dem Wert der Absorption, die beim Absorptionsmaximum des Farbstoffes gemessen wurde. Die Dicke d der Messküvette (0,3cm) entspricht der Weglänge des Anregungslichts innerhalb der Messküvette. Die Extinktionskoeffizienten ε der jeweiligen Farbstoffe sind der Tabelle 2 des Methodenteils 5.1.1 zu entnehmen. Es wird davon ausgegangen, dass die Extinktionskoeffizienten von ungekoppelten und BG-gekoppelten Farbstoffen gleich sind. Anhand der gemessenen Absorptionen lässt sich bei den Kopplungsreaktionen mit z.B. Benzylguanin, SNAP-Protein oder einem Oligonukleotid ebenso das Ausmaß der Markierung (DOL, Degree of Labeling) bestimmen:

$$DOL = \frac{A_{dye} \cdot \varepsilon_{Kopplungspartner}}{(A_{280} - A_{dye} \cdot CF_{280})\varepsilon_{dye}} \quad (9)$$

Die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe sind Tabelle 2 zu entnehmen. Der Extinktionskoeffizient des SNAP-Proteins beträgt ($21000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.1.4 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Molekülmassen der verschiedenen BG-Farbstoffe erfolgte durch Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg. Bei der Massenspektrometrie wird die zu untersuchende Substanz in Ionen überführt, um diese nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung aufzutrennen. Die detektierten Ionen werden in ein Massenspektrum umgerechnet. Bei ESI erfolgt die Ionisation aus der flüssigen Phase. ESI ist eine sehr schonende Ionisationsmethode bei der der Analyt schrittweise vom Atmosphärendruck ins Hochvakuum überführt wird, wodurch gewährleistet wird, dass die zu analysierenden Moleküle intakt bleiben und die Bestimmung der Molekülmasse möglich ist (123).

5.1.5 Fluoreszenzspektroskopie

Die Löschung der BG-Farbstoff Substrate und deren Funktionalität gegenüber SNAP-Protein wurden bei Raumtemperatur in Suprasil®-Quarzglas-Halbmikroküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) mit einem Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer der Firma Varian, Darmstadt, Deutschland untersucht. Die Verdünnung der Proben erfolgte in ddH₂O.

Zur Bestimmung der Löschung der BG-Farbstoffen (3.1.2) wurde je Farbstoff die Fluoreszenz des freien Attofarbstoff NHS Esters (10^{-6} M) bestimmt und in Relation zur Fluoreszenz des zugehörigen BG-Farbstoffs (10^{-6} M) gesetzt.

Um die Funktionalität der BG-Farbstoffe (3.1.3) zu ermitteln wurden dem jeweiligen BG- Substrat (10^{-6} M) SNAP-Protein zugesetzt und eine Messung der Fluoreszenz im Abstand von 5 Minuten aufgezeichnet. Die Dauer der Messungen und die Konzentrationen des SNAP-Proteins ist den jeweiligen Experimenten zu entnehmen. Die jeweiligen Spektren sind im Anhang A.1 zu finden.

5.1.6 Immobilisation von Attorfarbstoffen auf einer Glasoberfläche

Herstellung von SNAP-gekoppelten Attorfarbstoffen (SNAP-Farbstoffe) und deren Immobilisation.

Zur Kopplung der Farbstoffe an das SNAP-Protein wurde 10^{-5} M des jeweiligen BG-Substrats mit 10^{-5} M aufgereinigtem SNAP-Protein (5.2.2) in 400 μ l Dialysepuffer (100 mM NaCl, 1mM DTT, 20% Glycerin, 40 mM Hepes in ddH₂O, pH=7,9, 0,22 μ m sterilfiltriert, 4°C) bei 37°C und 400 rpm für 30 Minuten umgesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Lichtausschluss, um vorzeitiges Bleichen der Farbstoffe zu vermeiden. Um nicht abreagierten Farbstoff zu entfernen, erfolgte über Nacht unter Lichtausschluss bei 4°C eine Dialyse. Hierzu wurden Dialysekammern (Slide-A-Lyzer, Kapazität von 0,1 bis 0,5 ml) mit einem MWCO (Molecular Weight Cutoff) von 10 KDa, der Firma Fisher Thermo Scientific, Deutschland verwendet. Die Probe wurde bei 4°C gelagert. Die Endkonzentration des SNAP-Farbstoffes wurde mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt (5.1.3). Für die TIRF-Aufnahmen wurden die SNAP-Farbstoffe über eine Antikörper (AK)-Bindung auf der Oberfläche von 8 Well Lab-Tek™ Kammerdeckgläser (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) immobilisiert. Hierzu wurden die Lab-Tek Oberflächen wie unter 5.4.1 beschrieben mit HF gereinigt und anschließend mit 120 μ l eines BSA/AK Gemischs bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Konzentration des AK (Pierce Anti 6xHis Epitope Tag, Mouse Monoclonal Antikörper von Pierce, Thermo Scientific, Deutschland) betrug 2 μ g/ml und die des BSA 10mg/ml in PBS. Am nächsten Tag wurde ungebundenes BSA/AK Gemisch dreimal mit 300 μ l PBS abgewaschen. Anschließend wurde in jede Kammer 300 μ l SNAP-Farbstoff (10^{-10} M) gegeben. Dabei erfolgte die Bindung der SNAP-Farbstoffe über das 6x-His-tag des SNAP-Proteins (5.2.2) an den Anti 6x His Antikörper auf der Glasoberfläche. Die Bindung wurde mittels TIRF-Mikroskopie beobachtet. Nachdem eine gleichmäßige Verteilung der SNAP-Farbstoffe erzielt wurde, wurde der ungebundene SNAP-Farbstoff dreimal mit 300 μ l Tetheringpuffer (TP) (5.3.6) abgewaschen. Da der Antikörper zwei Bindungsstellen besitzt ist es möglich, dass entweder ein oder zwei SNAP- Farbstoffe an einen Antikörper binden. Die Proben wurden für die TIRF-Aufnahmen mit 300 μ l TP bedeckt. Für SNAP-Atto 633 erfolgte ebenso eine Messung in 300 μ l Zellysat.

Herstellung von Oligo-gekoppelten Attorfarbstoffen (Oligo-Farbstoffe) und deren Immobilisation.

Zur Kopplung der Attorfarbstoffe N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester an ein Oligonukleotid wurde eine einzelsträngige 22mer Oligonukleotidsequenz (5'-CCC GCG CTT GCT TTG CGT TTT T-3', IBA, Germany) verwendet, die am 5'-Ende biotinyliert und am 3'-Ende mit einer NH₂-Gruppe modifiziert ist (124). Die farbstoffmarkierten Oligonukleotide wurden durch eine Standardkopplungsreaktion zwischen NH₂-modifiziertem Oligonukleotid und der NHS-Gruppe des Farbstoffs hergestellt. Die NHS-Gruppe des Farbstoffs wurde durch das Oligonukleotid substituiert und somit der Farbstoff an das Oligonukleotid gebunden, während die NHS-Gruppe freigesetzt wurde. Für die Kopplungsreaktionen wurden 20 µl des Oligonukleotids (200 µM) mit einem 5-fachen Überschuss des Attorfarbstoff-NHS Esters für 16 Stunden bei 27°C, 750 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC und anschließender Evaporation. Die Oligo-Farbstoffe wurden in ddH₂O gelöst. Am Absorptionsspektrometer (5.1.3) wurde deren Konzentration bestimmt. Anschließend erfolgte zur Stabilisierung der einzelsträngigen Oligonukleotide eine Hybridisierung mit einer komplementären Oligonukleotidsequenz (5'-AAA AAC GCA AAG CAA GCG CGG G-3', IBA, Germany) (124). In einem Volumen von 50 µl wurden 200 pmol des Oligo-Farbstoffs mit 300 pmol des komplementären Stranges in PBS verdünnt. Die Proben wurden in einem PCR-Gerät (PTC-100, MJ Research, Waltham, USA) auf 90°C erhitzt. Für 4 Minuten erfolgte bei 90°C die Entfaltung der einzelsträngigen Oligonukleotide. Um eine effiziente Hybridisierung der komplementären Einzelstränge zu ermöglichen, wurden die Proben langsam (1°C / 30 Sekunden) auf 25°C abgekühlt und anschließend bei -20°C aufbewahrt. Für die TIRF-Aufnahmen wurden die Oligo-Farbstoffe über eine Biotin-Streptavidin-Biotin Bindung auf der Oberfläche von 8 Well Lab-Tek™ Kammerdeckgläser (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) immobilisiert. Zunächst wurden die Lab-Tek Oberflächen mit Fluorwasserstoffsäure (HF) (5.4.1) gereinigt. Für die Passivierung der Oberflächen und die spätere Bindung der Oligo-Farbstoffe wurde jede Lab-Tek Kammer mit 200 µl eines BSA/Biotin-Gemisches (10:1) gefüllt. Das Gemisch besteht aus 5 mg/ml BSA (Cohn Fraction V, lyophilisiert, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und BSA-Biotin (8-16 mol Biotin pro mol Albumin, lyophilisiert, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in PBS (Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Die Inkubation wurde bei 4°C für 16 Stunden durchgeführt. Das negativ geladene BSA bindet unspezifisch an die Oberfläche und verhindert eine Bindung und damit Verunreinigung mit anderen Molekülen, die ein erhöhtes Hintergrundrauschen bei den TIRF-Aufnahmen verursachen könnten. Nach dreimaligem Waschen mit 300 µl PBS wurden bei RT 200 µl rekombinantes Streptavidin (0,1mg/ml) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 20 Minuten an die BSA-Oberfläche gebunden und anschließend ungebundenes Streptavidin dreimal mit 300 µl PBS abgespült. Schließlich erfolgte für 5 Minuten bei RT die Inkubation mit den

Oligo-Farbstoffen (10^{-11} M), die über das biotinylierte Oligonukleotid an das Streptavidin gebunden wurden. Um ungebundene Probe zu entfernen fand ein letzter Waschschritt mit PBS statt. Da Streptavidin mehrere Bindungsstellen für Biotin besitzt ist es möglich, dass mehrere Oligo-Farbstoffe an ein BSA-Biotin Molekül gebunden sind. Für die TIRF-Aufnahmen wurden die Oberflächen mit TP bzw. Zellysat (5.3.7) bedeckt.

5.2 Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden

5.2.1 Plasmid DNA Aufreinigung

Um Plasmid DNA aus *E. coli*-Zellen zu isolieren wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Diese Aufreinigung beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, bei der durch RNase und EDTA die Bakterienmembran destabilisiert und RNA beseitigt wird. Das Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat) bewirkt bei alkalischem pH die Denaturierung von Membranproteinen und chromosomaler DNA. Durch anschließende Neutralisation wird die Plasmid-DNA renaturiert. Eine folgende Zentrifugation beseitigt aufgrund der Größe, Struktur und Verankerung mit den Zellresten eine Beseitigung der bakteriellen Proteine, Membranen und der chromosomalen DNA. Die im Überstand verbleibende Plasmid-DNA wird auf eine Silikatsäule aufgetragen und gebunden. Durch einen alkoholhaltigen Puffer werden Salzurückstände und andere Verunreinigungen beseitigt. In einem letzten Schritt wird die Plasmid-DNA mit 50 μ l ddH₂O eluiert, welches in einer Konzentration von ca. 50-300ng DNA/ μ l resultierte.

5.2.2 Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung des SNAP-tag Proteins erfolgte durch die immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC, immobilized metal ion affinity chromatography), bei der Proteine kovalent an auf einer Säule immobilisierte Metallionen (hier Nickel) gebunden werden. Durch Zugabe von Imidazol, welches eine stärkere Bindungsaffinität zu Nickel aufweist, wird das gebundene Protein verdrängt und somit eluiert. Da viele Proteine keine Metallionenaffinität besitzen, müssen den aufzureinigenden Proteine durch gentechnische Methoden zunächst ein metalionenaffiner Protein-tag (z.B. 6xHis-tag) hinzugefügt werden.

In dieser Arbeit wurde der Bakterienstamm SS10 verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um den Stamm M15 der die Plasmide pSS7 und pREP4 trägt. pSS7 besteht aus dem Expressionsvektor pQE60, bei dem ein 6x His-tag C-terminal an SNAP-tag fusioniert ist. Durch das Lac-Repressor codierende Plasmid pREP4 wird die Proteinexpression des Fusionsproteins 6x His-tag-SNAP-tag (SNAP-Protein) gesteuert, in dem

der Lac-Repressor an den Operator bindet und somit die Expression des Fusionsproteins blockiert. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird die Proteinexpression induziert. Das heißt, IPTG bindet an den Lac-Repressor, löst ihn dadurch vom Promotor ab, verhindert somit die Repression und die Proteinexpression wird gestartet.

Zur Proteinaufreinigung wurde eine 10 ml Übernachtkultur in LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika (100 μ g/ml Ampicillin; 50 μ g/ml Kanamycin) bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurde in einem 5l-Kolben (mit Schikane) eine Tageskultur bestehend aus 1l LB Medium, 10ml Übernachtkultur und den Antibiotika (s.o.) angesetzt und bei 37 °C geschüttelt. Bei einer optischen Dichte(OD_{600nm}) von 0,6 wurde die Proteinexpression des SNAP-Proteins mit 1mM IPTG induziert. Nach 4,5 Stunden Inkubation bei 37 °C erfolgte die Zellernte durch Abzentrifugieren der Zellsuspension für 20 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C. Um das exprimierte rekombinante Protein aufzureinigen wurde der Protino®Ni-IDA-Kit 2000 packed columns Kit (MACHEREY – NAGEL, Düren, Germany) verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die hier durchgeführten Schritte erfolgten alle bei 4 °C. Hierfür wurden die abzentrifugierten Zellen mit 4 °C kaltem Lysis Equilibration Wash (LEW)-Puffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , pH=8.0; 3 ml LEW-Puffer/g Zellpellet) und Lysozym (Roth, Karlsruhe, Deutschland) (c=1 mg/ml) für 30 Minuten lysiert und anschließend mit Ultraschall behandelt bis diese Zellsuspension nicht mehr zähflüssig war. Durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 Minuten wurden die Zelltrümmer beseitigt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen für 20 Minuten. Der Überstand wurde mit einem sterilen Rotilabo-Spritzenfilter (0,45 μ m Porengröße, d=33 mm) der Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland sterilfiltriert und anschließend auf die Protino®Ni-IDA-Säulen gegeben. Die Säulen wurden nach Angaben des Herstellers mit LEW-Puffer gewaschen und das an die Säule gebundene Protein mit Elutionspuffer (50mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH=8.0) eluiert. Zu unterschiedlichen Zeiten dieser Proteinaufreinigung wurde jeweils eine Probe entnommen (Zellsuspension vor Induktion bei $OD_{600nm}=0,6$ und 4,5 Stunden nach Induktion, eine Probe nach dem Binden an der Ni-IDA Säule, eine Probe nach dem 1. Waschen der Ni-IDA Säule, eine Probe nach dem 2. Waschen der Ni-IDA Säule und jeweils eine Probe der aufeinanderfolgenden Elutionsfraktionen (E1-E10). Diese Proben wurden mit 1/3 Volumen 3x-Lämmli-Puffer (6% SDS, 30% Glycerin, 180 mM TRIS/Cl pH 6.8, 0.03% Bromphenol Blau, 3% Mercaptoethanol) versetzt, bei 90 °C für 10 Minuten denaturiert und in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80 °C bis zur Verwendung bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese gelagert. Mittels der PAGE (5.2.3) wurden die unterschiedlichen Proben auf ihren Gehalt an SNAP-tag-6x His-tag (20 kDa) untersucht. Die Elutionsfraktionen mit dem höchsten Gehalt an SNAP-tag-6x-His-tag Protein (20 kDa) wurden vereinigt. Anschließend erfolgte eine Dialyse in Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (2K MWCO; Thermo Scientific, Deutschland),

um das Imidazol zu entfernen. Die Dialyse erfolgte unter zweimaligem Wechsel des Dialysepuffers (100 mM NaCl, 1mM DTT, 20% Glycerin, 40 mM Hepes, pH=7,9) über Nacht bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Nanodrop (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Das aufgereinigte SNAP-tag-6xHis-tag Protein wurde bei 4 °C gelagert. Zur Erstellung der Kalibrationskurve (5.2.4) wurde das Protein in ddH₂O verdünnt, mit 1x-Lämmli-Puffer versetzt und zur PAGE eingesetzt.

5.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Technik, bei der Proteine eines Proteingemisches entsprechend ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Lugtenberg et al. 1975). Hierzu muss zunächst die Tertiär- und Sekundärstrukturen des Proteins aufgebrochen werden. Dies wird durch Versetzen der Probe mit 1x-Lämmli-Puffer und anschließendem Erhitzen bei 90 °C erwirkt (5.2.2). Das Aufbrechen der Tertiärstruktur wird durch die Anwesenheit von Mercaptoethanol begünstigt, welches Disulfidbrücken spaltet. SDS, ein weiterer Inhaltsstoff, verleiht den Proteinen eine negative Ladung, welches gewährleistet, dass die resultierenden negativ geladenen Aminosäurenstränge nur entsprechend ihres Molekulargewichts im elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Zur Auftrennung des SNAP-Proteins (20 kDa) wurden 12%-ige Polyacrylamidgele (10 x 8 cm) hergestellt. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines 12%-igen Polyacrylamidgels.

Größe des Gels: 10 x 8 cm	Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	3,3 ml	680 µl
Acrylamid (30% Acrylamid, 1,5% N,N-Methylenbisacrylamid in ddH ₂ O) (4 °C)	4 ml	170 µl
1 M Tris/HCl, pH 6,8 (RT)	-	130 µl
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 (RT)	2,5 ml	-
10% Ammoniumpersulfat (APS) (-20 °C)	100 µl	10 µl
10% Sodiumdodecylsulfat (RT)	100 µl	10 µl
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (Temed) (4 °C)	4 µl	1 µl

Zunächst wurde das Trenngel gemischt, zwischen die zwei Glasplatten einer Minigelvorrichtung (Minigel-Kammer, Biorad, München, Deutschland) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation (ca. 1 Stunde) wurde das Isopropanol durch Ausspülen mit ddH₂O entfernt und das Sammelgelgemisch auf das Trenngel gegeben und ein Kamm mit 10 Taschen eingesteckt. Nach 30 minütiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Glasplatten in die Minigelvorrichtung eingespannt, 1x-Laufpuffer (5x Laufpuffer: 15.1 g TRIS Base, 94 g Glycin, 50 ml 10% SDS in einem Liter ddH₂O) eingefüllt und der Kamm herausgezogen. Zur Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 15 µl jeder mit Lämmli-Puffer versetzten Probe (5.2.2) in eine Tasche eines 12%-igen Polyacrylamidgels gefüllt. Als Referenz wurde parallel in einer weiteren Tasche 5 µl eines Proteinmarkergemisches (MW, Molecular Weight Marker; PageRuler™, Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetrennt. Zunächst wurden die Proben für 5 min bei 80 Volt in das Sammelgel einlaufen gelassen. Danach erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 120 Volt für 1,5 Stunden. Dabei wandern kleine Proteine im Vergleich zu größeren Proteinen langsamer von Kathode zu Anode, was eine Auftrennung von Proteingemischen zur Folge hat. Als Laufmedium diente 1x Laufpuffer. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele für 30 min mit Coomassie-Färbelösung (0,025% (w/v) Coomassie® Brilliant Blau G-250, 80% (v/v) Methanol, 16% (v/v) Essigsäure) angefärbt und über Nacht in Entfärbelösung (5% (v/v) Methanol, 7% (v/v) Essigsäure) entfärbt. Am nächsten Tag wurden die Proteinbanden mit einem Gelscanner bei 700 nm bildlich dargestellt (Odyssey, Li-Cor, Bad Homburg, Deutschland).

5.2.4 Bestimmung der Markierungseffizienz von BG-MR121

Wie in Stöhr et.al (7) beschrieben, wurde in einem ersten Basisexperiment zur Bestimmung der Markierungseffizienz von BG-MR121 eine Tageskultur (5.3.1) des Bakterienstammes SS10 (6.2) bei einer optischen Dichte von $OD_{600nm} = 0,6$ mit 1mM IPTG für 3,5 Stunden induziert und anschließend die Zellen mit ~ 500 nM BG-MR121 für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung des exprimierten MR121-markierten SNAP-Proteins erfolgte mit dem Protino®Ni-IDA-Kit 2000 (5.2.2). Zur Kontrolle wurden Proben zu unterschiedlichen Zeiten des Experimentes genommen und in einem 12%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (5.2.3). Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt und bei 700 nm mit einem Odyssey-Gelscanner bildlich dargestellt (Abbildung 49). Die verwendeten Materialien und die detaillierte Durchführung der Experimente sind aus den darauf verwiesenen Methodenteilen zu entnehmen.

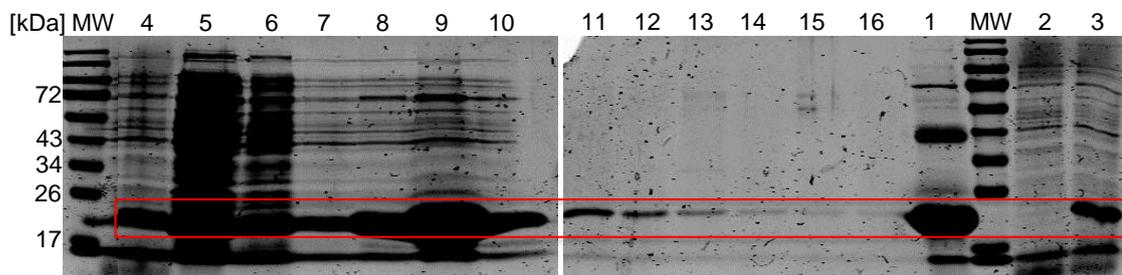


Abbildung 49: 12%-ige Polyacrylamidgels zum Nachweis des MR121-markierten SNAP-Proteins (20 kDa) zu unterschiedlichen Zeiten der Proteinaufreinigung. (2) Zellysate vor Induktion, (3) Zellysate nach Induktion, (4) Probe nach dem Binden an der Ni-IDA Säule, (5) Probe nach dem 1. Waschen der Ni-IDA Säule, (6) Probe nach dem 2. Waschen der Ni-IDA Säule, (7)-(16) aufeinanderfolgende Elutionsfraktionen (E1-E10). (1) Aufgereinigtes SNAP-Protein. Zur Bestimmung der Proteingröße diente ein Molekulargewichtsmarker (MW). Der rote Kasten markiert das aufgetrennte, MR121-markierte SNAP-Protein mit einem Molekulargewicht von 20 kDa.

Wie der rote Kasten in Abbildung 49 zeigt, besitzen die Elutionsfraktionen E1-E4 (Spur 7-9) den höchsten Anteil an MR121-markiertem SNAP-Protein (20 kDa), während wie zu erwarten das Zellysate vor Induktion in Spur 2 keine SNAP-Proteinbande zeigt. Die Proteinbanden bei dem aufgereinigten SNAP-Protein in der Höhe von ungefähr 40 und 60 kDa lassen Dimerisierungs- bzw. Trimerisierungsprodukte des SNAP-Proteins vermuten. Für die Proteinaufreinigung wurden die Elutionsfraktionen E1-E4 vereinigt und über Nacht dialysiert. In einem UV-Vis Spektrophotometer (5.1.3) wurden von der vereinigten Elutionsfraktion die Absorptionen des Proteins und des Farbstoffes gemessen (siehe Abbildung 52) und der Markierungsgrad bestimmt (DOL, Degree of Labeling). Die Markierungseffizienz in diesem Basisexperiment lag bei ca. 2%, unter Berücksichtigung, dass bei diesen experimentellen Bedingungen nur 50% der Zellen mit BG-MR121 angefärbt werden (7).

In weiteren Versuchen sollte die Markierungseffizienz von BG-MR121 erhöht werden. Hierzu sollte eine stöchiometrische Markierung des Proteins gewährleistet werden. Daher wurde zunächst die Konzentration an exprimiertem SNAP-Protein im Zelllysate zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion (1mM IPTG) bestimmt, um damit die Konzentration an BG-Farbstoff Substrat anzupassen. Hierzu wurden wie im Methodenteil 5.3.1 beschrieben Zellen des Stammes SS10 kultiviert. Die Tageskultur wurde bei einer optischen Dichte $OD_{600nm} = 0,45$ mit 1 mM IPTG induziert und bei 37 °C geschüttelt. Zu den Zeiten 20, 40, 60, 90 und 120 Minuten nach IPTG-Zugabe wurde jeweils 200 µl Zellsuspension entnommen und mit 100 µl 3x-Lämmli-puffer versetzt. Diese Proben wurden für 10 Minuten bei 90 °C erhitzt und auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel, wie in 5.2.3 beschrieben, aufgetragen. Um die Konzentration an exprimiertem SNAP-Protein im Zelllysate zu ermitteln wurde auf dem gleichen Gel eine Verdünnungsreihe von aufgereinigtem SNAP-Protein (2-60 µM) (5.2.2) aufgetragen und eine Kalibrationskurve erstellt. Somit konnte die Konzentration von SNAP-Protein im Zelllysate nach unterschiedlichen Induktionszeiten berechnet werden. Das coomassiegefärbte 12%-ige Polyacrylamidgel wurde mit einem Odyssey-Gelscanner bei 700 nm gescannt und die Proteinbanden bildlich dargestellt. Die Spuren 1-8 zeigen die Verdünnungsreihe des aufgereinigten SNAP-tag-6x-His-tag Proteins in abnehmender Konzentration. Die Bakterien-Zelllysate sind in den Spuren 9-14 aufgetragen (vor Induktion mit 1 mM IPTG bis 2 Stunden nach Induktion). Zur Bestimmung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde ebenso 5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (MW) aufgetragen (Abbildung 50).

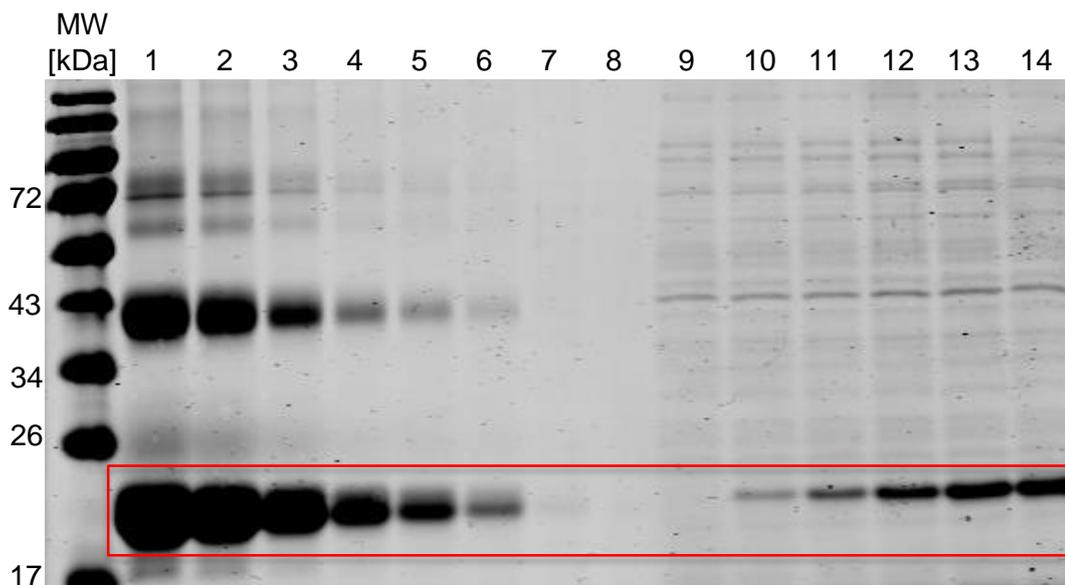


Abbildung 50: 12%-iges Polyacrylamidgel. Die Spuren 1-8 zeigen eine Verdünnungsreihe von aufgereinigtem SNAP-Protein (20kDa): (1) 60 μ M, (2) 40 μ M, (3) 20 μ M, (4) 10 μ M, (5) 8 μ M, (6) 6 μ M, (7) 4 μ M und (8) 2 μ M. In den Spuren 9-14 sind Bakterienzellysate vor und nach Induktion mit 1 mM IPTG aufgetragen: (9) vor Induktion, (10) 20 Minuten nach Induktion, (11) 40 Minuten nach Induktion, (12) 60 Minuten nach Induktion, (13) 90 Minuten nach Induktion und (14) 120 Minuten nach Induktion. MW entspricht 5 μ l eines Proteinmarkergemisches.

Mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.34I, W. Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) wurden die Intensitäten (Markierungsstärke) der SNAP-Protein Banden (20 kDa) im SDS-Polyacrylamidgel für die Verdünnungsreihe des aufgereinigten SNAP-tag Proteins und der Zellysate-Proben bestimmt. Auch hier zeigen die Spuren 1-6 der SNAP-Protein Verdünnungsreihe drei prägnante Proteinbanden, die wie bereits erwähnt ein Monomer (20 kDa), ein Dimer (40 kDa) und ein Trimer (60 kDa) des SNAP-Proteins vermuten lassen. Die Zellysate zeigen ebenso eindeutige SNAP-Proteinbanden bei 20 kDa. Zur Bestimmung der SNAP-Proteinkonzentration im Zellysate wurde eine Kalibrationskurve erstellt. Hierzu wurden die SNAP-Konzentrationen der Verdünnungsreihe in Abhängigkeit der Markierungsstärke mit OriginPro 9.1G graphisch dargestellt (siehe Abbildung 51) und die Daten mit einer polynomialen Anpassungsfunktion gefittet. Mit Hilfe dieser Anpassungsfunktion konnte somit aus den Markierungsstärken der Zellysate-SNAP-Protein-Banden auf die SNAP-Proteinkonzentration im Zellysate zurückgeschlossen werden.

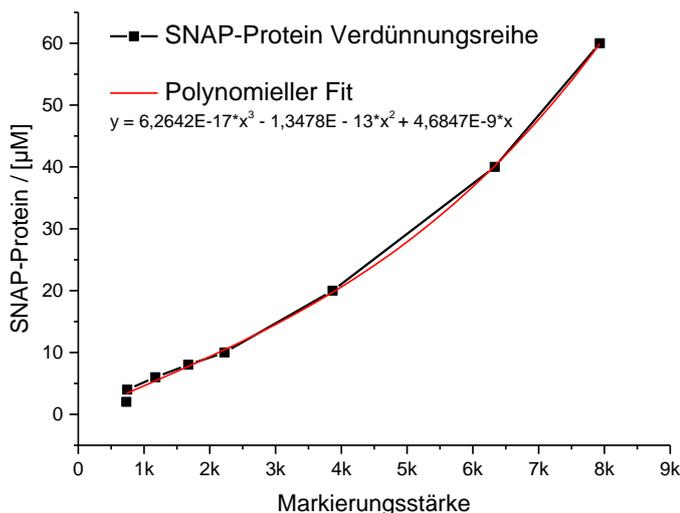


Abbildung 51: Kalibrationskurve. SNAP-Proteinkonzentration in Abhängigkeit der Markierungsstärke mit zugehöriger polynomialer Anpassungsgleichung.

In Tabelle 4 sind die SNAP-Proteinkonzentrationen nach unterschiedlicher Induktionsdauer und die zugehörige optische Dichte (OD_{600nm}) der Bakterienzellsuspension aufgelistet.

Tabelle 4: SNAP-Proteinkonzentration im Zellysats nach unterschiedlicher Induktionszeit mit 1 mM IPTG und die dazugehörige optische Dichte der Zellsuspension bei 600 nm.

Induktionszeit	c_{SNAP} [µM]	Optische Dichte (OD_{600nm}) der Zellsuspension
Vor Induktion	0	0,45
20 min nach Induktion	1,16	0,58
40 min nach Induktion	2,66*	0,71
60 min nach Induktion	4,9	0,79
90 min nach Induktion	7,45	0,92
120 min nach Induktion	8,43	1,19

In zwei weiteren identisch durchgeführten Experimenten wurde nach einer 40 minütigen Induktion mit 1mM IPTG 2,91 µM und 3,21 µM SNAP-Protein exprimiert, welches eine mittlere SNAP-Proteinkonzentration von 3,1 µM ergibt. Um eine Steigerung der Markierungseffizienz von MR121 zu erzielen, wurden basierend auf den ermittelten Proteinkonzentrationen, in einem weiteren Versuch die experimentellen Bedingungen modifiziert. Eine Tageskultur des Stammes SS10 wurde bei einer optischen Dichte $OD_{600nm} = 0,45$ mit 1mM IPTG induziert und nun jedoch gleichzeitig mit einem Über-

schuss an BG-MR121(6 μM) versetzt und nur für 40 Minuten inkubiert. Somit wurde gewährleistet, dass das nach 40 Minuten exprimierte SNAP-Protein ($c=2,66 \mu\text{M}$) stöchiometrisch angefärbt werden kann. Das detaillierte Durchführungsprotokoll ist unter 5.3.5 beschrieben. Die Absorption des aufgereinigten MR121-markierten SNAP-Proteins wurde in einem UV/Vis-Absorptionsspektrometer (5.1.3) bestimmt. Das zugehörige UV/VIS Spektrum ist zusammen mit dem Spektrum aus dem ersten Basisexperiment in Abbildung 52 oben dargestellt. Des Weiteren ist in dieser Abbildung unten die Untersuchung der Zellgängigkeit von BG-MR 121 unter den experimentellen Bedingungen des modifizierten Markierungsexperiments gezeigt. Zu sehen ist das überlagerte Fluoreszenz- und Durchlichtbild, welche mit dem TCS SP5 X Mikroskop zur Bestimmung des prozentualen Anteils tatsächlich gefärbter Zellen aufgenommen wurden (5.4.2).

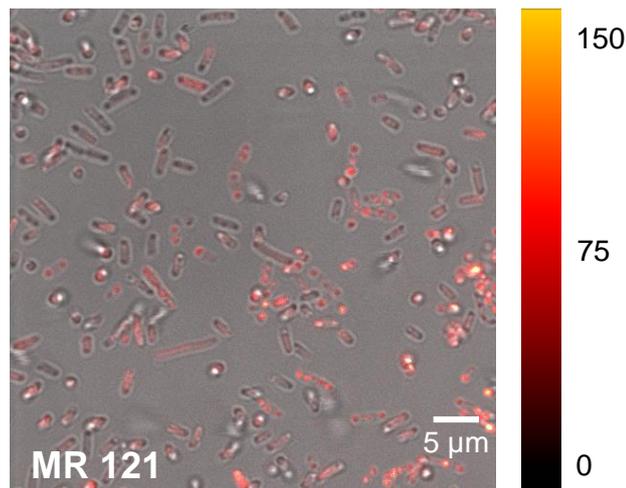
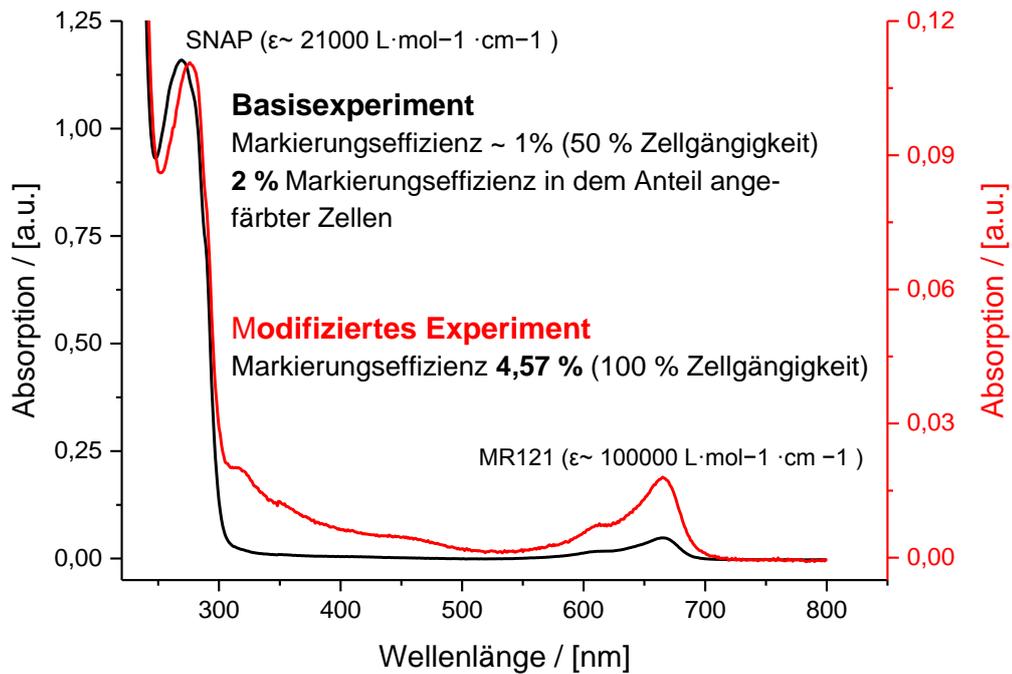


Abbildung 52: Markierungseffizienz von BG-MR121. Oben: UV/Vis Spektren des MR121-markierten SNAP-Proteins aus dem ersten Basisexperiment (schwarz) und dem zweiten, modifizierten Markierungsexperiment (rot). Unten: Überlagertes Fluoreszenz- und Durchlichtbild zur Bestimmung der Zellgängigkeit von MR121 bei einer Proteinexpression mit 1 mM IPTG und gleichzeitiger Färbung mit 5 μ M BG-MR 121 für 40 min (modifiziertes Experiment).

In den UV/Vis Spektren in Abbildung 52 sind zwei Peaks zu erkennen. Der Peak bei 280 nm stellt das Absorptionsmaximum des SNAP-Proteins dar, während der Peak bei 660 nm dem Absorptionsmaximum des Farbstoffes MR121 entspricht. Wie zu erkennen, konnte bei dem modifizierten Experiment durch Anpassen der Farbstoffkonzentration und Steuerung der Proteinexpression eine Erhöhung der Markierungseffizienz von 2% auf ~4,6% bei einer Zellgängigkeit von 100% erhöht werden.

5.3 Mikrobiologische Methoden

5.3.1 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Bakterienkultivierung

Für die **Übernachtkultur** wurden 5 ml TB-Medium (Tabelle 5) mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Tabelle 6), mit dem Bakterienglycerolstock angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator (Multitron, Infors HT, Basel, Schweiz) inkubiert. Die Antibiotikaresistenz des jeweiligen Bakterienstammes ist den in Tabelle 10 gelisteten Plasmiden im Materialteil 6.2 zu entnehmen. Am nächsten Tag wurden zur Herstellung der **Tageskultur** 10 ml TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika, den nötigen Induktoren (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) oder Arabinose) und 100 μ l (1:100) der Übernachtskultur versetzt und bei 34 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,4 wurden die Zellen für die unterschiedlichen Experimente eingesetzt.

Tabelle 5: Verwendete Kulturmedien.

TB (Tryptone broth) Medium
1% Bacto Tryptone (Becton Dickinson, Germany) und 0,5% Natriumchlorid (Sigma Aldrich, USA) wurden in ddH ₂ O gelöst, mit NaOH pH=7 eingestellt, autoklaviert und bei RT gelagert.
LB (Luria broth) Medium
20% LB Broth (Sigma Aldrich, USA) wurde in ddH ₂ O gelöst, autoklaviert und bei RT gelagert.

Tabelle 6: Verwendete Antibiotika und Induktoren.

	Einzusetzende Konzentration	Stock-Konzentration	Hersteller
Antibiotika			
Amp.	100 µg/ml	100 mg/ml	Ampicillin Natrium Salz, Sigma Aldrich, Belgien
Kan.	50 µg/ml	50 mg/ml	Kanamycin B Sulfat, Sigma Aldrich, Deutschland
Induktoren			
IPTG	10 µM Abweichungen sind im Experimenterteil separat aufgeführt.	1 M	Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside, Sigma Aldrich, Deutschland
Arabinose	0,01%	10%	L-(+)-Arabinose, Sigma Aldrich, Deutschland
Die Antibiotika und Induktoren wurden in ddH ₂ O gelöst, steril filtriert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.			

Lagerung von *E. coli*

Zur Aufbewahrung der Bakterienstämme wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium (Tabelle 5) angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 Minuten abzentrifugiert (3750 rpm), das Pellet in 1 ml TB Medium/ 20% Glycerin resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

5.3.2 Bestimmung der Bakterienanzahl mittels Agarplatten

Zur Bestimmung der Zellzahl in Abhängigkeit der optischen Dichte (OD_{600nm}) wurde eine Tageskultur des Bakterienstammes SS10 (6.2) bei 37 °C, 180 rpm kultiviert und jeweils ein Milliliter der Zellsuspension bei unterschiedlichen optischen Dichten (OD_{600nm}) (0,38, 0,49, 0,63, 0,76, 1,06) entnommen. Jede Probe wurde sofort 1:10⁶ verdünnt und auf LB-Agarplatten* ausplattiert. Für jede Probe wurden 3 Platten angesetzt auf denen unterschiedliche Volumina an Zellsuspension ausgestrichen wurden (50 µl, 80 µl und 100 µl). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien. Hieraus wurde für jede optische Dichte die Zellzahl pro Milliliter Bakterienkultur bestimmt und graphisch in Abbildung 53 dargestellt. Die Zellzahl entspricht dem Mittelwert aus 3 voneinander unabhängigen, identisch durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

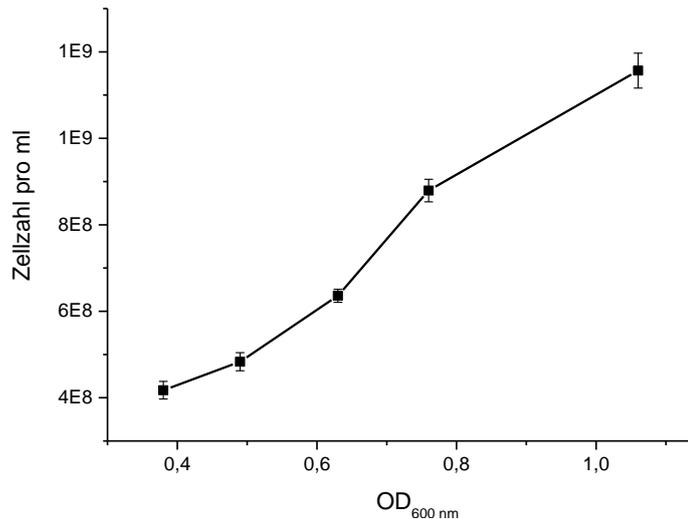


Abbildung 53: Bakterienzellzahl pro ml in Abhängigkeit der optischen Dichte (OD_{600nm}).

In diesen Untersuchungen wurden 40 Minuten nach Induktion mit 1 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 0,76 in einem Liter Bakterienkultur $8,8 \times 10^{11}$ Zellen nachgewiesen.

Zur Herstellung von LB-Agar Platten wurde 1,5% Agar (Sigma Aldrich, Spanien) in LB Medium (Tabelle 5 in 5.3.1) gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden die entsprechenden Antibiotika (siehe Tabelle 6 in 5.3.1) hinzugefügt und in Petrischalen gegossen. Die LB-Agar Platten wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

5.3.3 Schwärm-Assay

E. coli-Zellen, die ein funktionierendes Chemotaxis-System besitzen, breiten sich auf Soft-Agar Platten aufgrund eines Nährstoffgradienten radial aus. Dieser Nährstoffgradient wird durch Verstoffwechselung der unterschiedlichen Nährstoffe im Agar hervorgerufen. Für die Überprüfung eines funktionalen CheY-SNAP-tag Proteins wurden Soft-Agar Platten hergestellt. Hierzu wurde 0,3% Agar in TB Medium gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 90 ml mit den notwendigen Induktoren und Antibiotika (siehe Tabelle 6 in 5.3.1) versetzt und in eine Petrischale gefüllt. Nach Abkühlen und Aushärten der Platten wurden 3 µl der jeweiligen Über-Nacht Kultur vorsichtig in das Soft-Agar injiziert. Hierbei wurden die Negativ- und Positivkontrollen zusammen mit den zu untersuchenden Bakterienstämmen auf eine Platte aufgetragen. Die Platten wurden anschließend für ca. 11 Stunden bei 34 °C inkubiert bis die Positivkontrolle einen deutlichen Schwärmring zeigte. Mit einem Geldokumentationssystem (Intas Gel iX Imager, Royal Biotech GmbH, Germany) wurden Bilder der Platten gemacht. Unter Verwendung des Bildverarbeitungsprogramm ImageJ wurden die

Schwärmflächen der verschiedenen Zellstämme bestimmt und diese relativ zur Schwärmfläche der Positivkontrolle gesetzt.

5.3.4 Transformation

In dieser Arbeit wurden die Zellstämme TE110, TE118, TE119 und TE121 (6.2) durch Transformation der entsprechenden Plasmide in die Wirtsbakterienzelle hergestellt. Die hierzu verwendeten Plasmide mussten zunächst aus den Spenderbakterienzellen mit dem Quiagen Miniprep Kit (5.2.1) extrahiert werden. Die hierzu nötigen Zellstämme und Plasmide wurden uns freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Victor Sourjik (ZMBH, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt und sind tabellarisch im Materialteil 6.2 aufgeführt.

Für die Transformationen wurde zunächst 5 ml einer Über-Nachtkultur (5.3.1) des zu transformierenden Stammes in LB-Medium angesetzt und wie in Chung et al. (125) beschrieben durchgeführt. Dazu wurde aus der Über-Nacht-Kultur eine 5 ml Tageskultur in LB-Medium hergestellt und die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 120 rpm geschüttelt bis eine optische Dichte von 0,3 erreicht war. Anschließend wurde zu 50 µl der Tageskultur 50 µl 2xTSS (20% Polyethylenglycol, 10% DMSO, 70 mM MgCl₂ in LB-Medium) und 0,5 µl der zu transformierenden, aufgereinigten Plasmide hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde bei 300 rpm und 37 °C für eine Stunde geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 13.000 rpm für 5 Minuten in einer Biofuge pico (Heraeus, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 60 µl LB-Medium resuspendiert. Davon wurden 20 µl auf Agar-Platten (5.3.2) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt und in 5 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Kulturen abzentrifugiert (3750 rpm, 10 min) und die Pellets in 1 ml TB-Medium, welches 20% Glycerin enthält, resuspendiert. Der Glycerin-Stock wurde bei -80 °C aufbewahrt.

5.3.5 Bestimmung der Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz der BG-Farbstoffe BG-MR121, BG-Atto633 und BG-Atto 655 wurden die Zellen SS10 verwendet. Zunächst wurden die Zellen über Nacht in LB-Medium mit Amp. (100 µg/ml) und Kann. (50 µg/ml) bei 37°C und 180 rpm angezogen. Am nächsten Tag wurde die Über-Nachtkultur 1:100 in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (s.o.) verdünnt und bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,45 erfolgte die Induktion der Zellen mit 1mM IPTG und die gleichzeitige Färbung mit BG-Farbstoff ($c=6 \mu M$) für 40 Minuten bei 37 °C, 120 rpm und Lichtausschluss. Anschließend wurden die Zellen bei 3750 rpm, RT

für 20 Minuten abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit LB-Medium wurde das Pellet zur Proteinaufreinigung mit dem Protino®Ni-IDA-Kit 2000 eingesetzt (5.2.2). Die Fraktionen der Proteinaufreinigung wurden in einem Polyacrylamidgel auf ihren Gehalt an markiertem SNAP-Protein untersucht. Die Elutionsfraktionen mit dem höchsten Gehalt an markiertem SNAP-Protein wurden vereinigt und dialysiert (5.2.3). Anschließend wurde die Absorption des SNAP-Proteins und des Farbstoffes gemessen und somit die Markierungseffizienz bestimmt (5.1.3).

5.3.6 Standard-Markierungsmethode für die Einzelmoleküluntersuchungen am TIRF-Mikroskop

Standard-Zellwachstums Protokoll

Wie in 5.3.1 beschrieben wurden die zu untersuchenden Zellen kultiviert. Die Proteinexpression von CheY-SNAP-tag bzw. des YFP-Fusionsprotein erfolgte mit 10 μ M IPTG bzw. 0,01% Arabinose. Nach ca. dreistündiger Inkubation bei 34 °C und 180 rpm war eine optische Dichte von ca. 0,4 und somit das exponentielle Wachstum erreicht. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (10 Minuten, 3750 rpm, RT) und das Zellpellet anschließend für 5 Minuten in 10 ml Tethering-Puffer (Tabelle 7) auf einem Kippschüttler (Shaker DRS-12, neoLab, Heidelberg, Deutschland) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 1 ml Tethering-Puffer resuspendiert und diese Zellsuspension zur Färbung eingesetzt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Tetheringpuffers.

Tetheringpuffer	
5 mM KH_2PO_4	Potassium Phosphat monobasic Sigma Aldrich, Japan
5 mM K_2HPO_4	Potassium Phosphat dibasic Sigma Aldrich, Germany
100 μ M EDTA (pH = 8)	Ethylendiamintetraacetat Sigma Aldrich, USA
1 μ M L-Methionin	Sigma Aldrich, Deutschland
10 mM Milchsäure	L-(+)-Milchsäure, AppliChem, Germany
In ddH ₂ O gelöst, pH=7 (KOH), sterilfiltriert (0,22 μ m), Lagerung bei RT.	

Färbe-Protokoll

400 μ l der Zellsuspension wurden mit 10 nM des entsprechenden BG-Farbstoffes für 15 Minuten bei 37 °C unter Schütteln bei 300 rpm angefärbt. Anschließend wurden die Zellen in einer Heraeus Tischzentrifuge abzentrifugiert (5 Minuten, 13000 rpm, RT). Danach erfolgten drei Waschschrte in Tethering-Puffer. Hierzu wurde das Pellet in 1 ml Tethering-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (ca. 300 rpm). Danach wurden die Zellen mittels Durchlichtmikroskopie auf ihre Vitalität hin untersucht. Zur Immobilisierung der Zellen wurde nach dem letzten Zentrifugations-schritt das Pellet in 24 μ l Tethering-Puffer gut resuspendiert und punktförmig in eine mit HF gereinigten und Poly-L-Lysin beschichteten LabTek-Kammer pipettiert (5.4.1). Nach 15 Minuten wurden die nicht immobilisierten Zellen abgenommen und die Kammer dreimal mit 200 μ l Tethering-Puffer gewaschen. Für die TIRF-Messungen waren die Zellen mit 200 μ l Tethering-Puffer bedeckt. Alle in diesem Färbeprotokoll aufgeführten Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter Lichtausschluss.

5.3.7 Herstellung von Zelllysats

Zur Gewinnung des Zelllysats für die unter (5.1.6) aufgeführten Experimente wurde 1l TB-Medium mit *E. coli*-Zellen des Stammes TE114 angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm in einem Schüttelinkubator (Multitron, Infors HT, Basel, Schweiz) vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen bei 4°C für 20 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert (Allegra X-12 Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) Das Zellpellet wurde in 50 ml Tethering-Puffer resuspendiert und auf einem Kippschüttler (Shaker DRS-12, neoLab, Heidelberg, Deutschland) für 20 Minuten bei 4°C gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurde das Medium abgeschüttet und das Zellpellet für 30 Minuten im Ultraschallbad (Emmi-5, EMAG Technologies, Frankfurt/Main, Deutschland) lysiert. Durch Abzentrifugieren der Probe in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus, Osterode, Deutschland) bei 13000 rpm und RT wurde das Cytoplasma von den Zelltrümmern getrennt und als sogenanntes Zelllysats verwendet.

5.4 Mikroskopie Techniken

5.4.1 Oberflächenpräparation

HF-Reinigung

Alle Mikroskopie-Aufnahmen wurden in 8 Well Lab-Tek™ Kammerdeckgläser (Nunc A/S, Roskilde, DK) durchgeführt. Zur Beseitigung von Verunreinigungen wurden die Lab-Tek Oberflächen zunächst mit 300µl 0,1M Fluorwasserstoffsäure (HF) (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) für mindestens 30 Sekunden gereinigt und dreimal mit 300µl ddH₂O gespült. Diese Reinigung wurde ein weiteres Mal wiederholt. Hierbei werden organische Moleküle beseitigt und die Oberfläche positiv geladen.

Poly-L-Lysin Beschichtung

Zur Immobilisierung der Bakterienzellen auf der Oberfläche des Lab-Teks wurden die mit HF gereinigten Deckgläser mit Poly-L-Lysin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) beschichtet. Dadurch erhält die Oberfläche eine positive Ladung, an der durch elektrostatische Interaktion mit der negative-geladenen Zellmembran, die Bakterien immobilisiert werden. Hierzu wurden die HF-gereinigten Lab-Teks mit 300 µl Poly-L-Lysin für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

5.4.2 Konfokale Mikroskopie

Die Überprüfung der Zellgängigkeit der BG-Farbstoffsubstrate erfolgte an dem kommerziell erhältlichen inversen, konfokalen TCS SP5 X Mikroskop (LEICA DMI6000B) der Firma Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, Deutschland). Als Objektiv wurde das 63x Wasser-Immersionsobjektiv (HCX PL APO CS 63.0x/1.20 WATER UV) verwendet. Die Anregung erfolgte mit einem Weißlichtlaser HCX PL APO CS 63.0x1.20 WATER UV (SuperK Extreme, Koheras, Dänemark). Mit Hilfe eines akusto-optischen Strahlteilers können die Laserlinien zwischen 470 nm und 670 nm ausgewählt werden. Die Detektion der mit den unterschiedlichen BG-Attofarbstoff Substraten angefärbten SNAP-exprimierenden *E. coli*-Zellen erfolgte mit einem PMT. Zur Aufnahme der Transmissionsbilder fand die Anregung bei 514 nm statt. Bei einer Verstärkung von 500 Volt wurde das Detektionsfenster (Emissions-Bandbreite) des PMT auf den Bereich zwischen 524 nm bis 609 nm eingestellt. Die Anregungswellenlängen für die unterschiedlichen BG-Attofarbstoffe Substraten, die zugehörige Laserintensität, die Scan-Geschwindigkeit und das Detektionsfenster des PMT mit der zugehörigen Verstärkung ist Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Verwendete Einstellungsparameter bei der konfokalen Mikroskopie zur Überprüfung der Zellgängigkeit der BG-Attocfarbstoff Substrate.

BG-Attocfarbstoff Substrate	620	633	655	680
Anregungswellenlänge (nm)	619	629	663	670
Laserintensität (%)	30	30	30	30
Detektionsfenster des PMT (nm)	629 - 730	639 - 740	673 - 760	680 - 770
Verstärkung (Volt)	800	800	800	800
Scan-Geschwindigkeit (Hz)	100	100	100	100

Die Auswertung und Darstellung der Bilder erfolgte mit der LAS AF Software der Firma Leica Microsystems GmbH.

5.4.3 TIRF

Die meisten Experimente dieser Arbeit wurden an einem TIRF-Mikroskop durchgeführt. Das verwendete TIRF-Setup wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Michael Schwering (126) und Dr. Kristin Grußmayer (127) eigenständig aufgebaut und wird in Abbildung 54 in vereinfachter Weise dargestellt. Das Setup besitzt für die Anregung insgesamt drei Laserlinien: rot (635 nm Diodenlaser, TECRL-25G-635, World Star Tech, Toronto, Canada), grün (532 nm Diodenlaser, TECGL-30, World Star Tech, Toronto, Canada) und blau, von denen in dieser Arbeit nur die rote und blaue Laserlinie verwendet wurden. Durch spezielle Aufreinigungsfilter werden zunächst die Laser von unerwünschten Nebenlinien getrennt. Danach werden die Laser in eine Glasfaser (single-mode optical fiber, Thorlabs, Newton, NJ) eingekoppelt, um zu gewährleisten dass jeweils die gleiche Fläche der Probe beleuchtet/angeregt wird. Danach erfolgt die Einkopplung der Laser in einen akusto-optischen Kristall (AOTF, engl. Acousto Optic Tunable Filter, akusto-optischer verstellbarer Filter) (AOTF.nC-VIS, AA Optoelectronic, Orsay Cedex, Frankreich), der das Laserlicht entsprechend der Wellenlänge und des Ultraschallbereichs separiert. Durch Änderung des Ultraschallbereichs können einzelne oder mehrere Wellenlängen ausgewählt werden. Der AOTF wird über eine LabView-Software gesteuert, die die Auswahl des benötigten Lasers und die Einstellung der Laserintensität ermöglicht. Die zugehörige Laserintensität wird mit einem Leistungsmesser (Powermeter: Ophir Orion-PD, Ophir Spiricon Europe GmbH, Darmstadt, Germany) im Strahlengang vor dem Mikroskop gemessen. Eine Lochblende vor dem AOTF schützt diesen vor Überstrahlung. Das aus dem AOTF austretende Laserlicht wird in ein inverses Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena) und durch ein Öl-Immersionsobjektiv (Objektiv: Nikon CFI Apochromat TIRF 100x Oil, N.A. 1.49, Nikon

Deutschland, Düsseldorf; Immersionsöl: Zeiss Immersol TM 518F $n=1.518$ (23 C), Carl Zeiss, Jena) gelenkt. Wesentlichster Bestandteil des TIRF-Mikroskops ist der dichroitische Spiegel (Dual Line Beam Splitter z 532/633, AHF Analysentechnik, Tübingen), der das Anregungslicht von dem schwächeren Fluoreszenzlicht trennt. Durch das laterale Verschieben eines zusätzlichen Spiegel, der sich noch vor dem dichroitischen Spiegel befindet, lässt sich stufenlos zwischen Weitfeld- und TIRF-Modus einstellen. Für TIRF-Messungen wird der Spiegel so eingestellt, dass der Einfallswinkel des Anregungslichtes eine Totalreflektion bewirkt. Das durch den dichroitischen Spiegel in den Detektionspfad eintretende Fluoreszenzlicht wird durch eine Rechtecksblende fokussiert, um das Beobachtungsfeld rechtwinklig zu machen. Der erste Filter im Detektionspfad ist ein Triple-Notch Filter (488/532/631-640 nm, AHF Analysentechnik, Tübingen), welcher nur Licht bestimmter Wellenlängen durchlässt und damit einfallende Anregungswellenlängen blockt/beseitigt. Ein Strahlteiler (Strahlenteiler 640 DCXR, AHF Analysentechnik, Tübingen) trennt die zwei Emissionswellenlängenbereiche. Für jeden Emissionswellenlängenbereich gibt es im Anschluss jeweils einen Sperrfilter (SMD-Sperrfilter HQ 685/70, Sperrfilter 550/55, AHF Analysentechnik, Tübingen), der diesen Emissionsbereich weiter eingrenzt. Die Detektion erfolgte mit einer EM-CCD-Kamera (engl. Electron multiplying CCD camera, iXonEM+ 897, Andor, Belfast, UK), wobei die spektral aufgetrennten Lichtstrahlen auf die zwei Chip-Hälften gelenkt wurden. Eine Chiphälfte besteht aus 512x256 Pixel, wobei jeder Pixel eine Größe von ca. 90 nm besitzt (128). Das Photonensignal lässt sich durch Elektronenvervielfachung verstärken. Für die TIRF-Experimente wurden folgende Einstellungen gewählt: Beleuchtungszeit: 0,03 s, rote Laserintensität: 1 mW, blaue Laserintensität: 0,5 mW, EM-Gain level: 200. Filme bestehend aus 1000-2000 Bildern wurden entsprechend des Software-Herstellers aufgenommen (Andor Solis, Andor, Belfast, UK).

YFP wurde mit dem blauen Laser (488 nm) angeregt, die Fluoreszenz erfolgte im grünen Spektralbereich (Filter 500/555 nm).

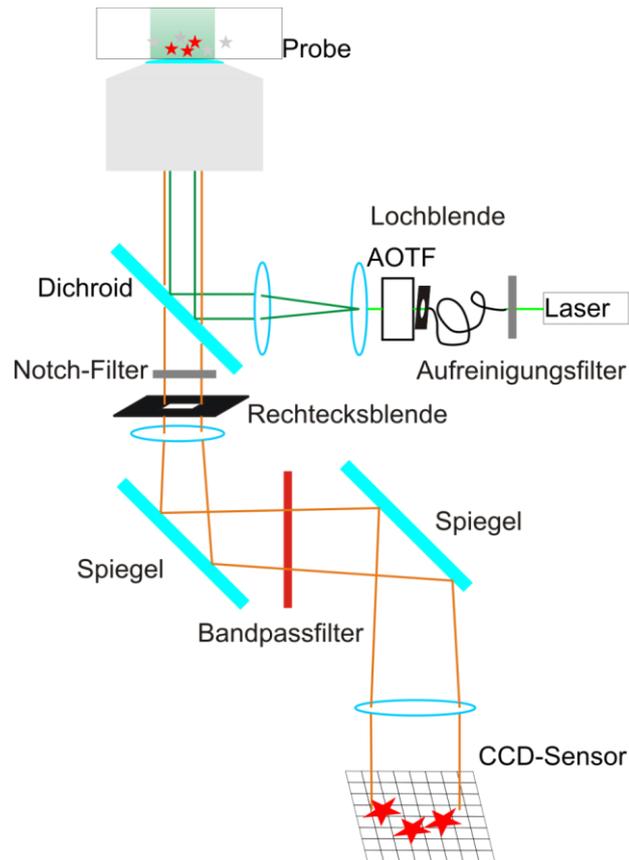


Abbildung 54: Schematische Darstellung eines TIRF-Mikroskops (126).

5.5 Datenanalyse

5.5.1 ALEX-TIRF Analysis Software zur Extraktion der Fluoreszenzintensitätsspuren

Aus den in den TIRF-Experimenten erhaltenen Filmen wurden mit der von Grußmayer (127) entwickelten MATLAB basierten ALEX-TIRF Analysis Software die Fluoreszenzintensitätsspuren der einzelnen detektierten Punkte extrahiert. Hierzu summiert die Software alle einzelnen Bilder des aufgenommenen Films auf. Der resultierende Fluoreszenzintensitätswert wird skaliert, wobei ein Wert von 0 für die niedrigste und der Wert 255 für die höchste Fluoreszenzintensität steht (8 Bit). Ein sogenannter Spot-Picking Algorithmus dient dazu, einzelne Punkte (Spots) zu selektieren. Hierfür wurde ein Suchradius von 3 Pixeln gewählt, welches einem Radius von 270 nm entspricht und zur Detektion einzelner Farbstoffmoleküle geeignet ist. Nach manueller Festlegung eines bestimmten Intensitäts-Grenzwertes werden die fluoreszenten Punkte, die einem eindeutigen Fluoreszenzsignal eines Farbstoffmoleküls entsprechen, automatisch detektiert und von Fluoreszenz, die durch Autofluoreszenz oder Verschmutzung hervorgerufen wird, getrennt. Der Grenzwert gibt somit die geringste Helligkeit an, welches

ein lokales Maximum charakterisiert. In dieser Arbeit wurde für die Filme der verschiedenen Farbstoffkonstrukte und der Zellexperimente ein Grenzwert zwischen 40 und 70 gewählt. Für jeden Punkt wurden die Intensitäten durch Summation der Intensitätswerte aller Pixel berechnet. Ebenso wurden die Hintergrund-Intensitätswerte aus einem drei Pixel breiten Ring berechnet, der $r+2$ Pixel von dem Zentrum des detektierten Punktes entfernt liegt. Nach Subtraktion der Hintergrundintensitäten wurden die korrigierten Intensitätswerte jeden Bildes als Fluoreszenzintensitäts-Bildspur als csv-Datei ausgegeben. Die Intensitäts-Spuren wurden mit OriginPro 9.1G gegen die entsprechende Zeit geplottet. Die Belichtungszeit betrug 30 ms. Danach erfolgte die Einteilung nach unterschiedlichen Kriterien (3.1.5).

5.5.2 ‚Screen Traces-‘ und ‚accumulateThresholdTraces-‘ Software zur Bestimmung der An- und Auszeiten

Mit einer in unserer Arbeitsgruppe von Dr. Anton Kurz entwickelten MATLAB basierten Software (‚Screen Traces‘) ist es möglich mehrere Einzelmolekül-Intensitätsspuren, welche mit Hilfe der ALEX-TIRF Analysis Software exportiert wurden, relativ schnell und einfach zu betrachten. Zudem ist es möglich die Spuren nach unterschiedlichen Kriterien zu sortieren. Ebenso kann für die Intensität jeder einzelnen Spur ein geeigneter (individueller) Grenzwert (Threshold) gesetzt werden, um aus den Intensitätsspuren ein Zweizustandssystem (An- und Auszustand) und somit eine binäre Datenreihe zu generieren. In dieser Arbeit wurden zur Analyse der An- und Auszeiten die Intensitätsspuren zunächst sortiert. Spuren, die innerhalb weniger Sekunden sofort gebleicht waren, wurden verworfen. Ebenso wurden Spuren, deren Intensitäten Werte größer als 5000 Counts zeigten, und somit auf die Anwesenheit mehrerer Farbstoffmoleküle hindeuten, eliminiert. Spuren mit Intensitätswerten kleiner als 500 Counts wurden auf Hintergrundrauschen zurückgeführt und ebenso verworfen. Darüber hinaus ist es durch Setzen von ROIs möglich, nur solche Bereiche der Intensitätsspur auszuwählen, bei denen es sich eindeutig um die Intensität eines einzelnen Moleküls handelt. Bei Spuren, die gegen Ende der Messdauer eine Tendenz zu langsam abfallenden Fluoreszenzintensitäten aufweisen, wurde ebenso ein ROI gesetzt, um diesen Drift zu eliminieren.

Eine weitere von Dr. Anton Kurz entwickelte MATLAB basierte Software (‚accumulateThresholdTraces‘) diente anschließend dazu, die Häufigkeiten der gemessenen Anzei-
ten Δt aus den binären Spuren zu extrahieren. Die An- bzw. Auszeiten wurden als Gesamtanzahl der Bilder (Frames), während derer ein Punkt detektiert wurde bzw. nicht detektiert wurde, angegeben. Um eine Angabe der An- bzw. Auszeiten in Sekunden zu erhalten wurde die Anzahl der Bilder mit der im TIRF-Experiment verwendeten Belichtungszeit (30 ms) multipliziert.

5.5.3 Wahrscheinlichkeitsdichteverteilung der An- bzw. Auszeiten und deren graphischen Darstellung

Im nächsten Schritt wurden Wahrscheinlichkeiten für die Häufigkeit der einzelnen An-Zeiten mit der nachstehenden Gleichung berechnet.

$$p(\Delta t_i) = \frac{n_i}{1/2(\Delta t_{i+1} - \Delta t_{i-1})} \quad (10)$$

$p(\Delta t_i)$ entspricht der Wahrscheinlichkeit. n_i ist die Häufigkeit von An-Zeiten der Dauer Δt_i . Δt_{i+1} bzw. Δt_{i-1} entsprechen der nächst höheren bzw. der nächst niedrigeren An-Zeit, die in dem Experiment beobachtet wurden. Die einzelnen Wahrscheinlichkeitswerte wurden mit dem Integral über alle $p(\Delta t_i)$ normiert:

$$x = \frac{p(\Delta t_i)}{\int_0^{t_N} p(\Delta t_i)} \quad (11)$$

Die normierten Wahrscheinlichkeitswerte wurden anschließend logarithmiert und in doppelt-logarithmisch dargestellt. Die so ermittelten Werte wurden mit einem Potenzgesetz approximiert wobei bei einigen An- und Auszeiten ein sekundärer Prozess überlagert ist, welcher durch einen exponentiellen Cut-Off approximiert werden kann (7).

6 Materialien

6.1 Geräte, Materialien, Chemikalien und Puffer, Computerprogramme

Die verwendeten Geräte und deren Hersteller sind dem Methodenteil zu entnehmen.

6.2 Expressionsvektoren, Plasmide und *E. coli*-Stämme

Tabelle 9: Expressionsvektoren.

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pTrc99A	Expressionsvektor mit Amp.-Resistenz, Genexpression steht unter der Kontrolle des Lac-Repressors und ist durch die Zugabe von IPTG induzierbar.	Amann et al., 1988
pBad33	Expressionsvektor mit Kan.-Resistenz, Genexpression ist durch die Zugabe von L-Arabinose induzierbar.	Guzman et al., 1995

Tabelle 10: Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Plasmid	Vektor	Gen	Klonierungsstelle	Resistenz	Induktion	Quelle
pTE2	pTrc99a	<i>cheY-SNAP-tag</i>	Bam HI/NotI	Amp.	IPTG	Ehrhard, 2008
pDK7	pBAD33	<i>eyfp</i>		Kan.	Arabinose	
pSS7	pQE-60	<i>SNAP-tag-6xHis-tag</i>	NcoI/BamHI	Amp.	IPTG	Sonja Schulmeister, ZMBH, Uni Heidelberg
pREP4	pREP4	<i>Lac-Repressor für T5 Promotor</i>				Sonja Schulmeister, ZMBH, Uni Heidelberg
pVS18	pTrc99a	<i>cheY-eyfp</i>		Amp.	IPTG	Sourjik und Berg (2002)
pVS229	pBAD33	<i>eyfp-cheR</i>		Kan.	Arabinose	Victor Sourjik, ZMBH, Uni Heidelberg

Tabelle 11: *E. coli*-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

<i>E. coli</i>-Stamm	Relevanter Genotyp	Quelle
DH5 α	F ⁻	(129), (130)
LL4	$\Delta(\textit{cheY-cheZ}) \Delta\textit{flgM}$	(107)
M15	$\Delta\textit{m}!5$	(131)
RP437 (HCB33)	Chemotaxis Wildtyp (wt)	(132)
SS10	pSS7 und pREP4 in M15	(110)
VS100	$\Delta\textit{cheY}$	(133)
VS102	$\Delta\textit{flgM}$	(134)
VS116	$\Delta\textit{flhC}$	(135)
TE2	pTE2 in VS102	(21)
TE118	pVS18 in VS100	Diese Arbeit
TE119	pTE2 in VS100	Diese Arbeit
TE110 (Negativ-Kontrolle)	pTE2 und pDK7 in VS116	Diese Arbeit
TE121	pTE2 und pVS229 in LL4	Diese Arbeit
Alle die in dieser Arbeit verwendeten Zellstämme sind Abkömmlinge des <i>E. coli</i> K-12 Stammes RP437, der üblicherweise als Wild-typ für Chemotaxis-Untersuchungen verwendet wird.		
Die Bakterienstämme sind in TB Medium mit 20% Glycerol bei -80 °C als Glycerolstock gelagert (5.3.1).		

7 Anhang

A.1 Fluoreszenzspektren

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlöschung der BG-Farbstoffe und der Effizienz der Kopplungsreaktion zwischen den BG-Farbstoffen und SNAP-Protein wurden die Fluoreszenzspektren der jeweiligen freien Farbstoff NHS-Ester ($c = 10^{-6}$ M) und die Fluoreszenz der zugehörigen BG-Farbstoffe ($c = 10^{-6}$ M) gemessen. Zur Bestimmung der Effizienz der Kopplungsreaktion wurden die BG-Farbstoffe mit SNAP-Protein ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ M) versetzt. Im Abstand von 5 Minuten nach SNAP-Zugabe wurden die Fluoreszenzspektren aufgenommen und somit der Fluoreszenzanstieg gemessen (Abbildung 55).

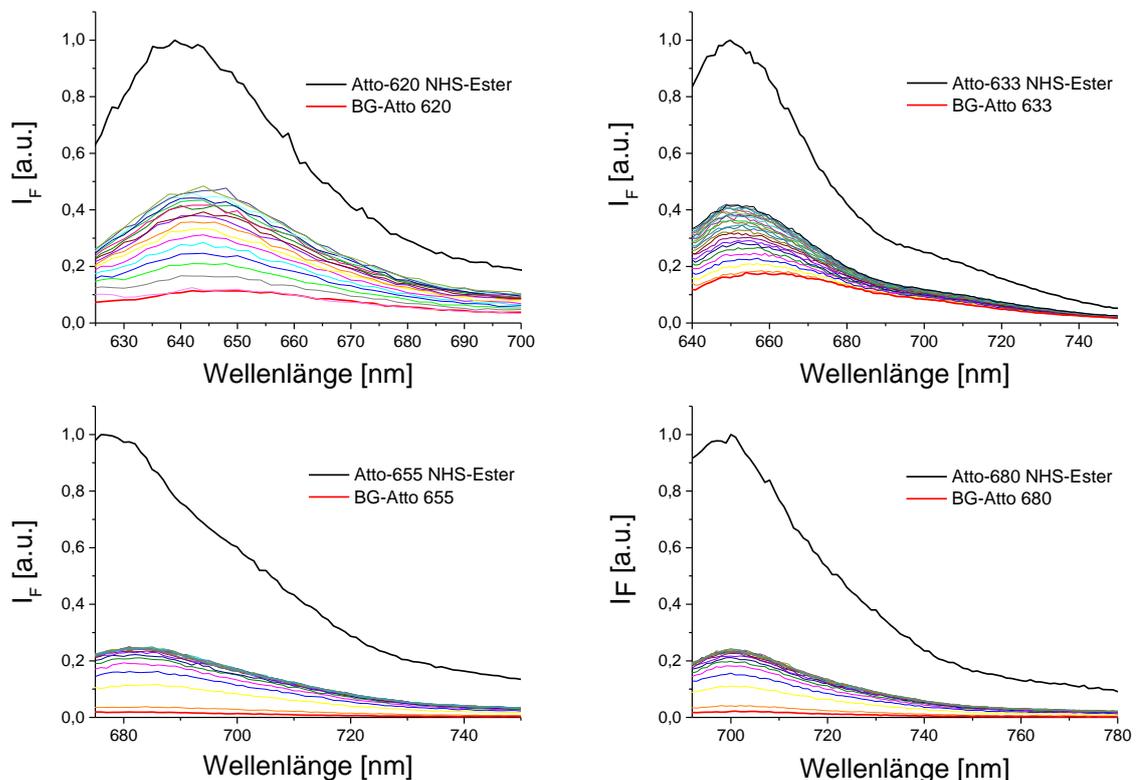


Abbildung 55: Fluoreszenzspektren der reinen Farbstoff NHS-Ester ($c = 10^{-6}$ M), der zugehörigen BG-Farbstoffe ($c = 10^{-6}$ M) und nach Zugabe von SNAP-Protein ($c = 5 \cdot 10^{-5}$ M) in Zeitabständen von 5 Minuten für Atto 620, Atto 633, Atto 655 und Atto 680. Zur Vergleichbarkeit wurden die Graphen auf die maximale Fluoreszenz des jeweiligen reinen Farbstoff NHS-Esters normiert.

A.2 Reaktion zwischen den BG-Farbstoffen und dem SNAP-Protein

Der Parameter a und die Reaktionsrate b der linearen Fitfunktionen sind in Tabelle 12 und Tabelle 13 mit den zugehörigen Standardabweichungen gelistet.

Tabelle 12: Der Parameter a und die Reaktionsrate b der linearen Anpassungsfunktionen zur Reaktion zwischen BG-Atto 655 ($10^{-6} M$) und unterschiedlichen SNAP-Protein Konzentrationen.

	$10^{-6} M$ SNAP	$2 \times 10^{-6} M$ SNAP	$5 \times 10^{-6} M$ SNAP
Lineare Anpassungsfunktion $\bar{I}_F = b \cdot t + a$			
b [min^{-1}]	$0,01 \pm 7E-4$	$0,05 \pm 0,003$	$0,1 \pm 0,007$
a [a.u.]	$1,04 \pm 0,01$	$1,02 \pm 0,03$	$1,02 \pm 0,043$

Tabelle 13: Der Parameter a und die Reaktionsrate b der linearen Anpassungsfunktionen zur Reaktion der unterschiedlichen BG-Farbstoffe ($10^{-6} M$) mit dem SNAP-Protein ($5 \times 10^{-5} M$).

	BG-Atto 620	BG-Atto 633	BG-Atto 655	BG-Atto 680
Lineare Anpassungsfunktion $\bar{I}_F = b \cdot t + a$				
b [min^{-1}]	$0,06 \pm 0,003$	$0,02 \pm 6E-4$	$0,33 \pm 4E-7$	$0,26 \pm 2E-7$
a [a.u.]	$1,02 \pm 0,028$	$1,005 \pm 0,005$	1	1

A.3 Kategorisierung der $I_F(t)$ -Spuren

Tabelle 14: Anzahl n der $I_F(t)$ -Spuren, die für die Kategorisierung der SNAP-Farbstoffe verwendet wurden.

	SNAP-Atto 620	SNAP-Atto 633 (TP) (ZL)		SNAP- Atto 655	SNAP- Atto 680
n	58	53	117	53	40

Tabelle 15: Anzahl n der $I_F(t)$ -Spuren, die für die Kategorisierung der Oligo-Farbstoffe verwendet wurden.

	Oligo-Atto 620	Oligo-Atto 633	Oligo-Atto 655	Oligo-Atto 680
n	234	296	242	251

Die Anzahl der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren der SNAP- und Oligo-Farbstoffe unterscheiden sich deutlich. Dies kann auf die unterschiedliche Immobilisierungsmethode zurückzuführen sein (5.1.6).

A.4 Bleichverhalten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe

Um die Bleichkinetiken der SNAP- und Oligo-Farbstoffe zu beschreiben wurden die Bleichkurven mit einer einfachen Exponentialfunktion gefittet (6). Die zugehörigen Parameter (y_0 , A , T), die abgeleiteten Parameter (k , τ) und die aus der Exponentialfunktion ermittelte I_F zum Zeitpunkt $t = 60$ Sekunden (Messende) sind Tabelle 16 und Tabelle 17 zu entnehmen. Ebenso wird die Anzahl n analysierter Moleküle angegeben.

Tabelle 16: Parameter der exponentiellen Anpassungsfunktion der Bleichkinetik von n SNAP-Farbstoffen mit der Fluoreszenzintensität I_F zum Zeitpunkt $t = 60$ Sekunden.

	SNAP-Atto 620	SNAP-Atto 633		SNAP- Atto 655	SNAP- Atto 680
		(TP)	(ZL)		
n	95	140	104	28	91
Exponentielle Anpassungsfunktion					
$\bar{I}_F = Ae^{\frac{-t}{T}} + y_0$					
y_0 [a.u.]	0,08±0,001	0,12±0,003	0,14±0,002	0	0,15±0,002
A [a.u.]	0,91±0,003	0,75±0,002	0,81±0,002	0,95±0,004	0,78±0,003
T [s]	11,35±0,08	28,02±0,27	17,81±0,12	40,69±0,28	14,78±0,15
Bleichrate $k = 1/T$ [s ⁻¹]	0,088 ± 6E-4	0,036 ± 3E-4	0,056 ± 4E-4	0,025 ± 2E-4	0,068 ± 7E-4
Halbwertszeit $\tau = T \cdot \ln(2)$ [s]	7,87±0,06	19,42±0,19	12,34±0,09	28,21±0,19	10,24±0,10
$I_{F(60\text{Sekunden})}$ [a.u.]	0,08	0,21	0,16	0,21	0,16

Tabelle 17: Parameter der exponentiellen Anpassungsfunktion der Bleichkinetik von n Oligo-Farbstoffen mit der Fluoreszenzintensität I_F zum Zeitpunkt $t = 60$ Sekunden.

	Oligo-Atto 620	Oligo-Atto 633	Oligo-Atto 655	Oligo-Atto 680
n	122	63	58	33
Exponentielle Anpassungsfunktion				
$\bar{I}_F = Ae^{\frac{-t}{T}} + y_0$				
y_0 [a.u.]	$0,189 \pm 0,004$	$0,270 \pm 0,001$	$0,500 \pm 0,015$	$0,368 \pm 0,011$
A [a.u.]	$0,775 \pm 0,003$	$0,648 \pm 0,003$	$0,419 \pm 0,013$	$0,549 \pm 0,010$
T [s]	$32,08 \pm 0,35$	$10,96 \pm 0,11$	$52,51 \pm 3,10$	$42,84 \pm 1,68$
Bleichrate $K = 1/T$ [s ⁻¹]	$0,031 \pm 3E-4$	$0,091 \pm 9E-4$	$0,019 \pm 0,001$	$0,023 \pm 9E-4$
Halbwertszeit $\tau = T \cdot \ln(2)$ [s]	$22,24 \pm 0,24$	$7,60 \pm 0,08$	$36,40 \pm 2,15$	$29,70 \pm 1,16$
$I_{F(60\text{Sekunden})}$ [a.u.]	0,31	0,27	0,63	0,51

A.5 Blinkverhalten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe

Anzeiten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe

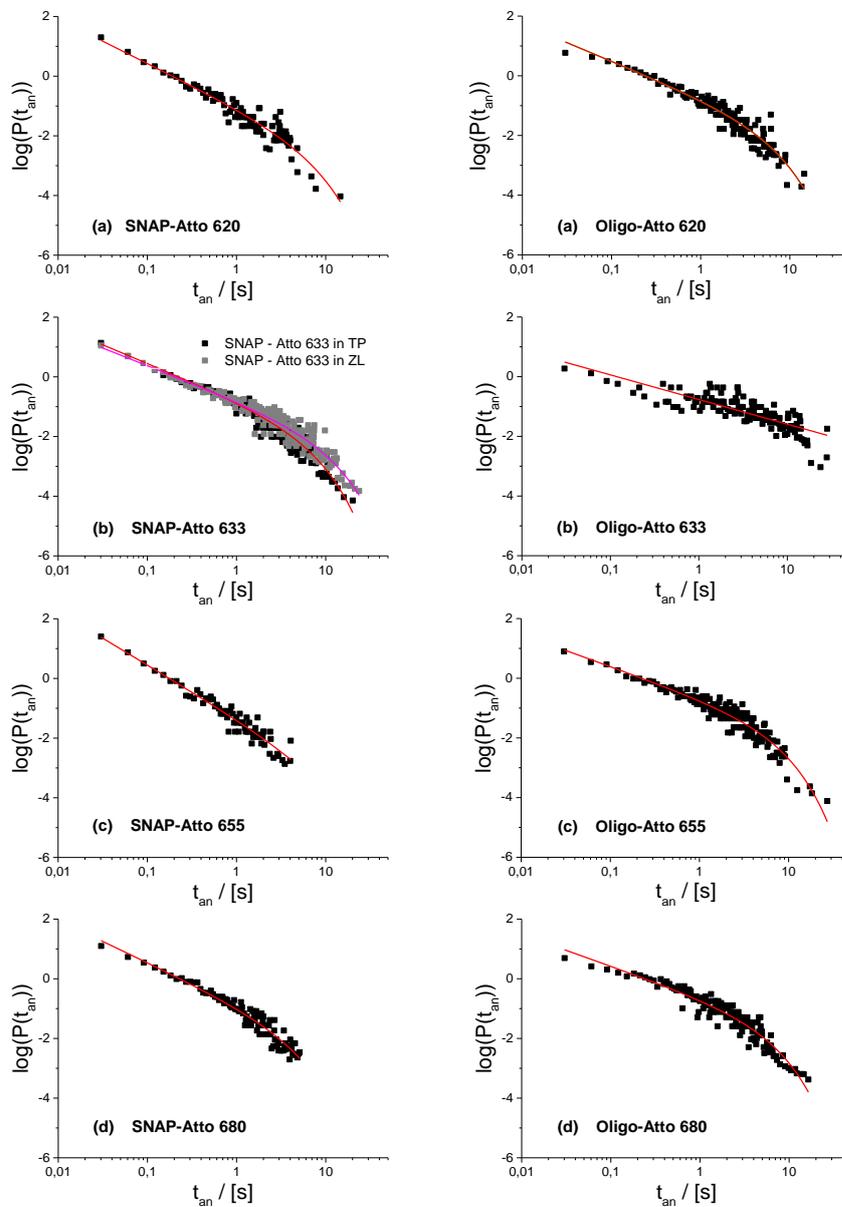


Abbildung 56: Normierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Anzeiten der SNAP (links)- und Oligo-Farbstoffe (rechts), die mit TP bedeckt sind sowie von SNAP-Atto 633, welches sich in ZL befindet. Die roten Linien sind Ausgleichskurven (Fitfunktionen), die auf ein Verhalten nach dem Potenzgesetz mit exponentiellem Cut-Off hinweisen. Lediglich Oligo-Atto 633 zeigt eine reine Potenzfunktion.

Tabelle 18: Parameter der Potenzfunktion (A_{an} , α_{an}) und des exponentiellen Cut-Offs (τ_{an}) der Anzeiten der SNAP-Farbstoffe mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das korrigierte R-Quadrat (R^2) beschreibt die Güte der Ausgleichskurve (Fitfunktion). Ebenso ist die Anzahl n der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren gelistet.

SNAP-Farbstoff	620	633		655	680
		(TP)	(ZL)		
n	32	70	62	34	33
Potenzfunktion mit exponentiellem Cut-Off					
$\log(p(\Delta t)) = \log(A\Delta t^{-\alpha}) + \log\left(e^{\frac{-\Delta t}{\tau_{Cut-Off}}}\right)$					
A_{an}	$0,09 \pm 0,010$	$0,16 \pm 0,010$	$0,16 \pm 0,009$	$0,05 \pm 0,008$	$0,13 \pm 0,017$
α_{an}	$1,48 \pm 0,100$	$1,24 \pm 0,063$	$1,18 \pm 0,058$	$1,80 \pm 0,122$	$1,42 \pm 0,094$
τ_{an} [s]	$4,4 \pm 1,0$	$4,1 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,7$	$6,2 \pm 4,9$	$2,8 \pm 0,6$
R^2	0,91	0,93	0,92	0,93	0,93

Tabelle 19: Parameter der Potenzfunktion (A_{an} , α_{an}) und des exponentiellen Cut-Offs (τ_{an}) der Anzeiten der Oligo-Farbstoffe mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das korrigierte R-Quadrat (R^2) beschreibt die Güte der Ausgleichskurve (Fitfunktion). Ebenso ist die Anzahl n der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren gelistet.

Oligo-Farbstoff	620	633	655	680
n	34	30	30	27
Potenzfunktion mit exponentiellem Cut-Off				
$\log(p(\Delta t)) = \log(A\Delta t^{-\alpha}) + \log\left(e^{\frac{-\Delta t}{\tau_{Cut-Off}}}\right)$				
A_{an}	$0,18 \pm 0,014$	$0,17 \pm 0,013$	$0,21 \pm 0,013$	$0,23 \pm 0,015$
α_{an}	$1,24 \pm 0,077$	$0,83 \pm 0,047$	$1,07 \pm 0,061$	$1,06 \pm 0,067$
τ_{an} [s]	$3,9 \pm 0,5$	---	$4,6 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,4$
R^2	0,92	0,67	0,91	0,92

Auszeiten der SNAP- und Oligo-Farbstoffe

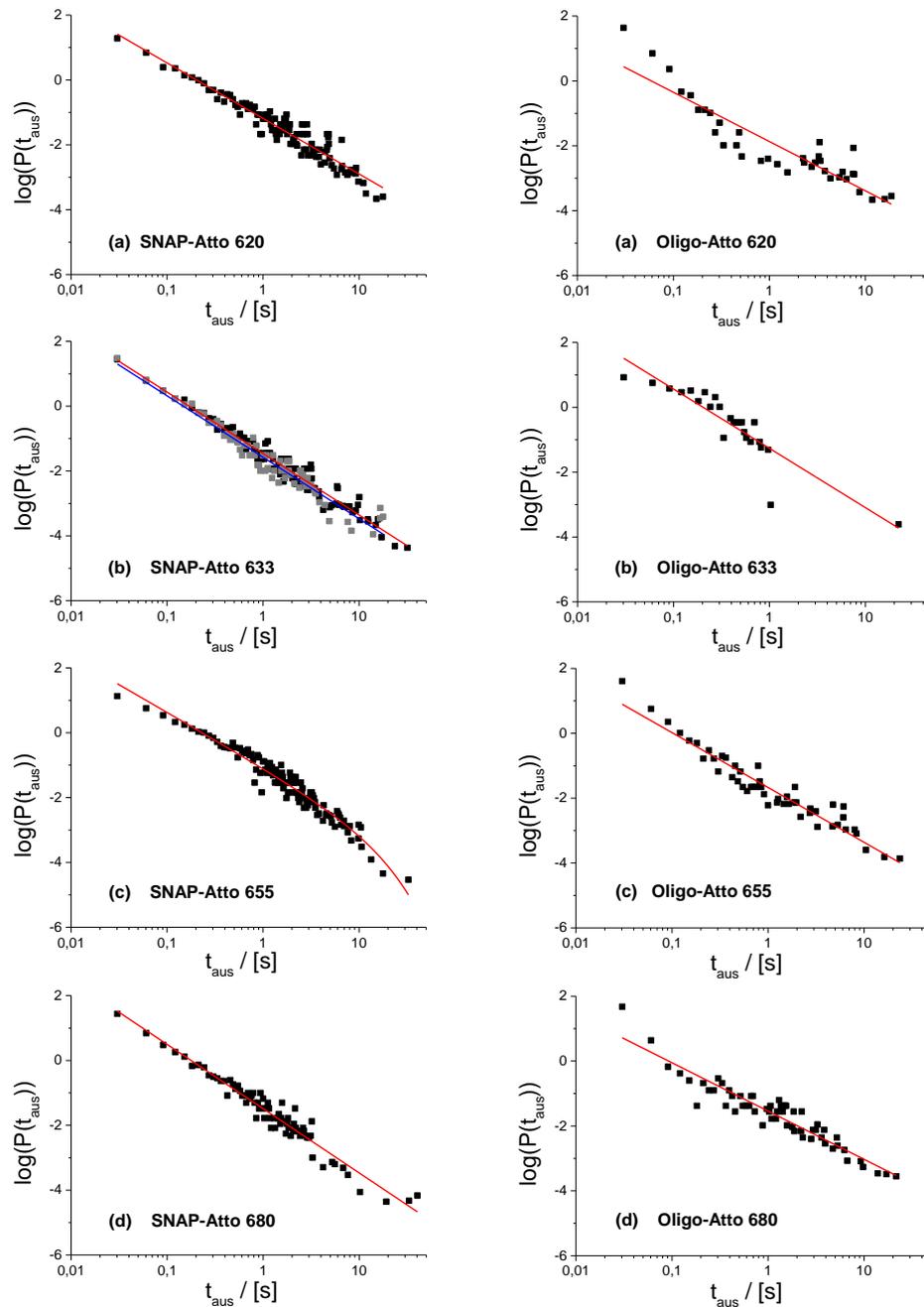


Abbildung 57: Normierte Wahrscheinlichkeitsverteilungen der Auszeiten der SNAP (links)- und Oligo-Farbstoffe (rechts), die mit TP bedeckt sind sowie von SNAP-Atto 633, welches sich in ZL befindet. Die roten Linien sind Ausgleichskurven (Fitfunktionen), die auf ein Verhalten nach dem Potenzgesetz hinweisen. Der Potenzfunktion von SNAP-Atto 655 ist ein exponentieller Cut-Off überlagert.

Tabelle 20: Parameter der Potenzfunktion (A_{aus} , α_{aus}) und des exponentiellen Cut-Offs (τ_{aus}) der Auszeiten der SNAP-Farbstoffe mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das korrigierte R-Quadrat (R^2) beschreibt die Güte der Ausgleichskurve (Fitfunktion). Ebenso ist die Anzahl n der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren gelistet.

SNAP-Farbstoff	620	633		655	680
		(TP)	(ZL)		
n	32	70	62	34	33
Potenzfunktion mit exponentiellem Cut-Off					
$\log(p(\Delta t)) = \log(A\Delta t^{-\alpha}) + \log\left(e^{\frac{-\Delta t}{\tau_{Cut-Off}}}\right)$					
A_{aus}	$0,07 \pm 0,004$	$0,04 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,002$	$0,08 \pm 0,005$	$0,03 \pm 0,002$
α_{aus}	$1,71 \pm 0,049$	$1,89 \pm 0,038$	$1,90 \pm 0,057$	$1,71 \pm 0,060$	$1,98 \pm 0,051$
τ_{aus} [s]	--	--	--	$10,6 \pm 2,0$	--
R^2	0,92	0,96	0,94	0,95	0,95

Tabelle 21: Parameter der Potenzfunktion (A_{aus} , α_{aus}) und des exponentiellen Cut-Offs (τ_{aus}) der Auszeiten der Oligo-Farbstoffe mit den zugehörigen Standardabweichungen. Das korrigierte R-Quadrat (R^2) beschreibt die Güte der Ausgleichskurve (Fitfunktion). Ebenso ist die Anzahl n der untersuchten $I_F(t)$ -Spuren gelistet.

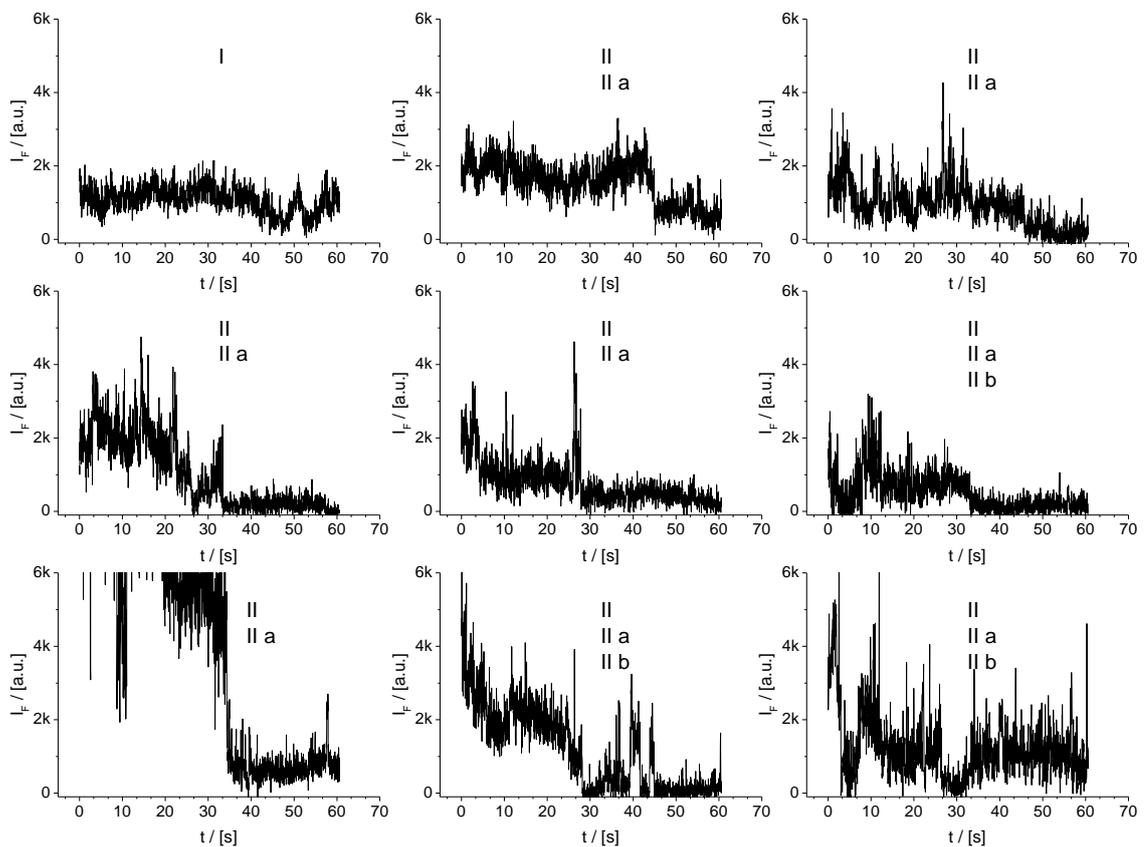
Oligo-Farbstoff	620	633	655	680
n	34	30	30	27
Potenzfunktion mit exponentiellem Cut-Off				
$\log(p(\Delta t)) = \log(A\Delta t^{-\alpha}) + \log\left(e^{\frac{-\Delta t}{\tau_{Cut-Off}}}\right)$				
A_{aus}	$0,01 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,015$	$0,02 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,003$
α_{aus}	$1,52 \pm 0,114$	$1,83 \pm 0,179$	$1,69 \pm 0,068$	$1,49 \pm 0,068$
τ_{aus} [s]	--	--	--	--
R^2	0,83	0,81	0,93	0,89

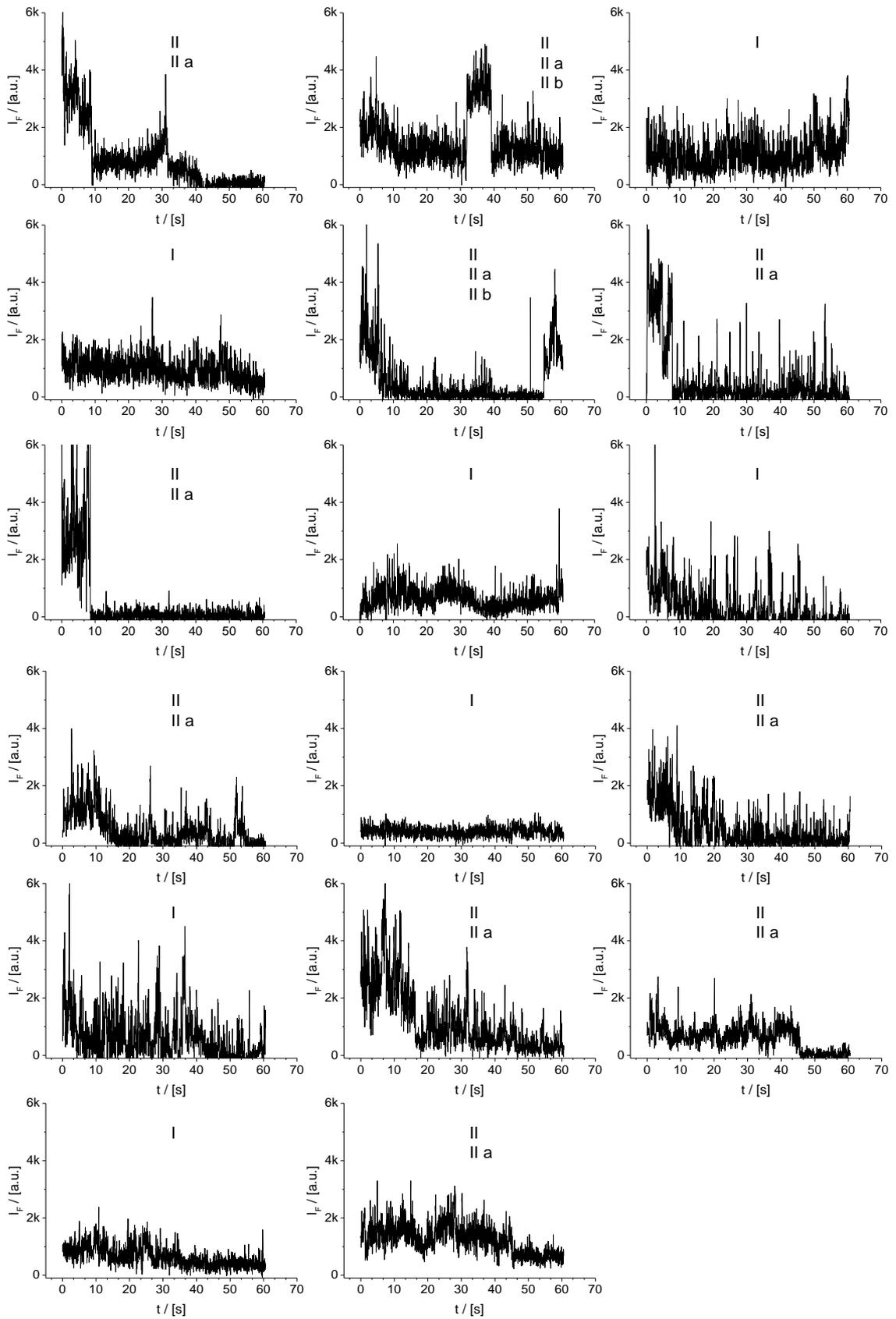
A.6 Fluoreszenzintensitätsspuren einzelner Hot-Spots in *E. coli*

Die Fluoreszenzintensitätsspuren der einzelnen Hot-Spots in *E. coli* wurden in die unterschiedlichen Kategorien eingeteilt:

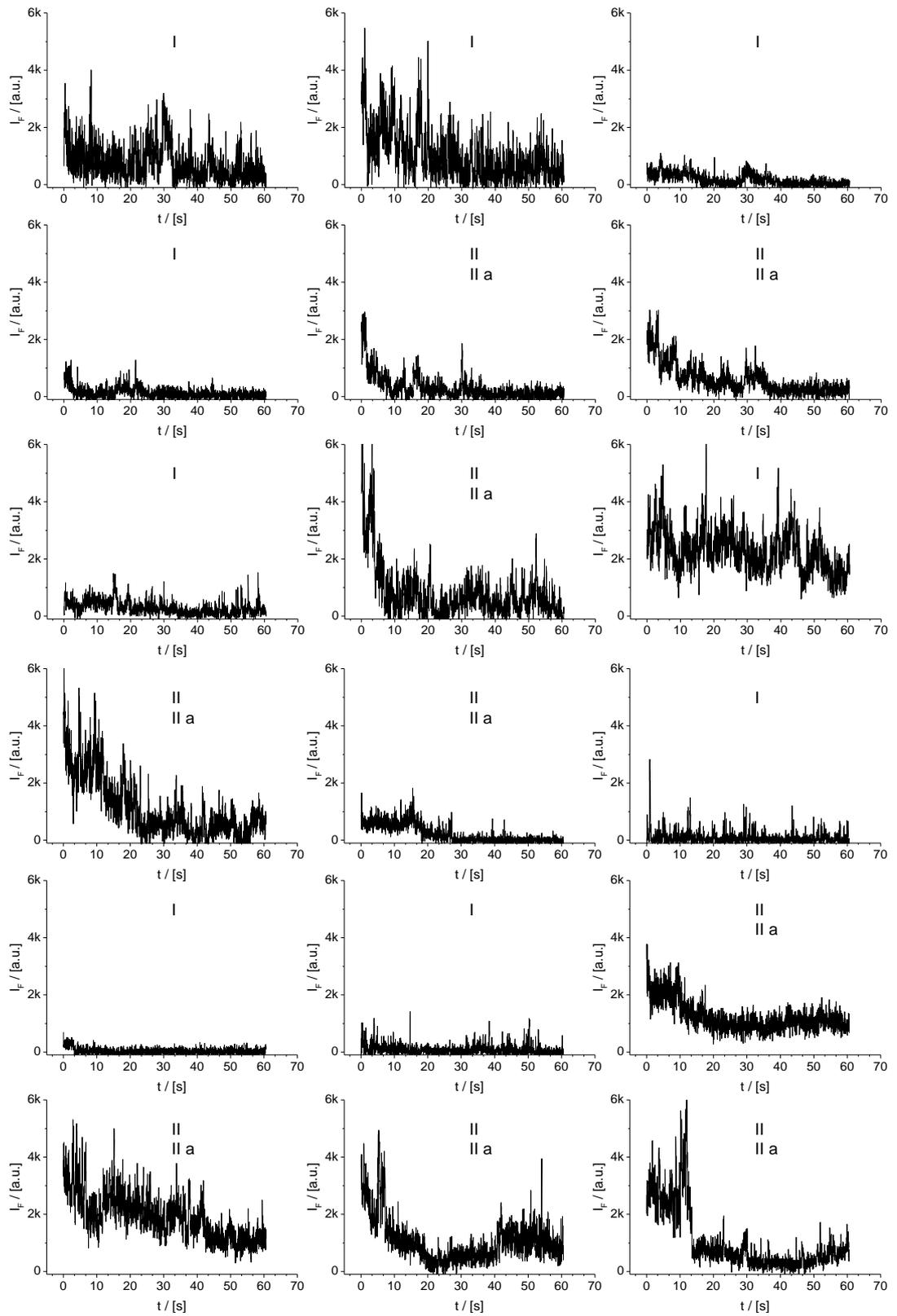
- I. Spuren, die unspezifisches Signal und somit unspezifische Wechselwirkung zeigen.
- II. Spuren, die große kompakte Strukturen (Cluster) aufweisen.
 - II a. Spuren, die Clusterzerfall/ Clusterauflösung zeigen.
 - II b. Spuren, die Clusterbildung zeigen.

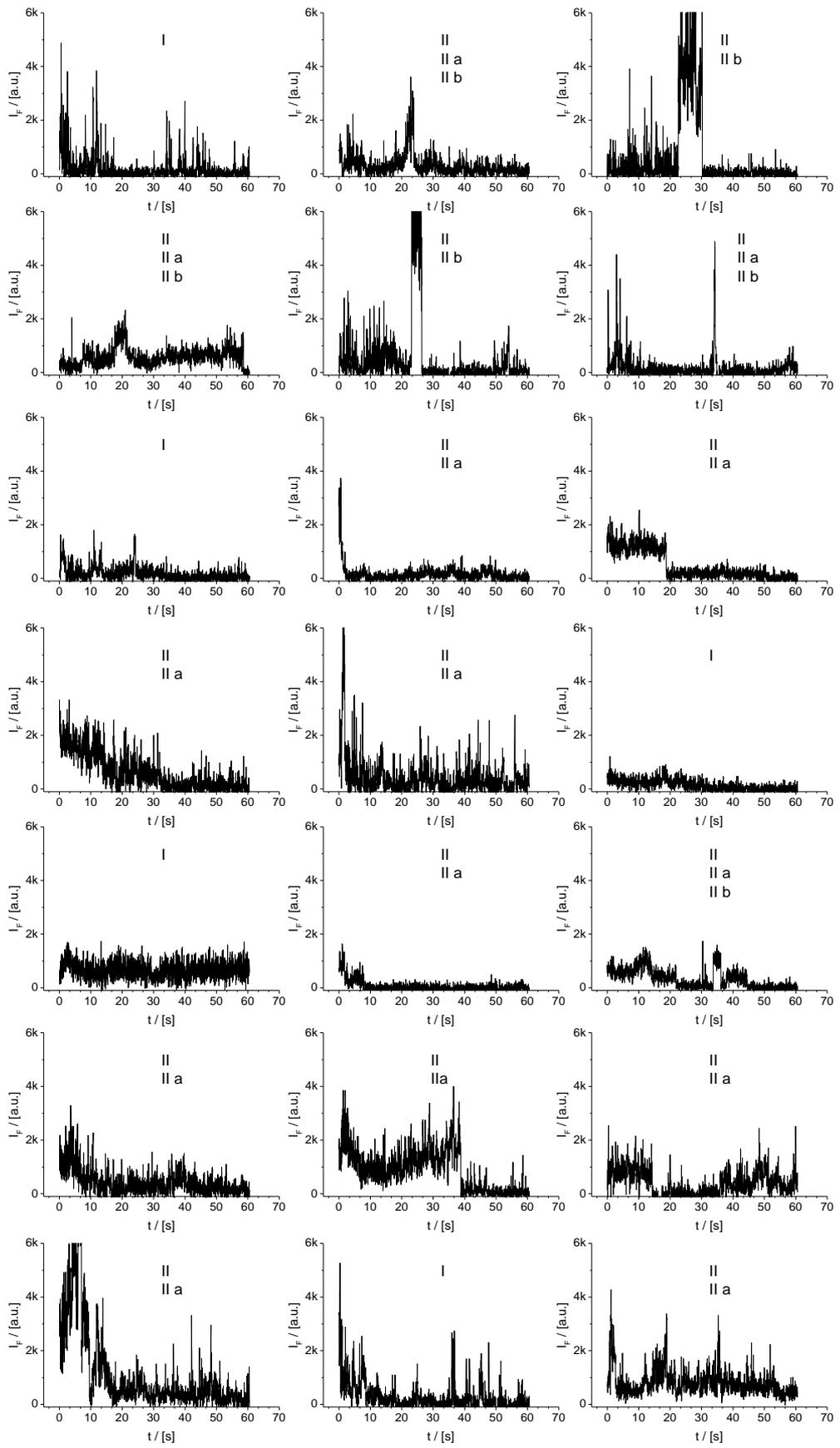
Fluoreszenzintensitätsspuren in TE121



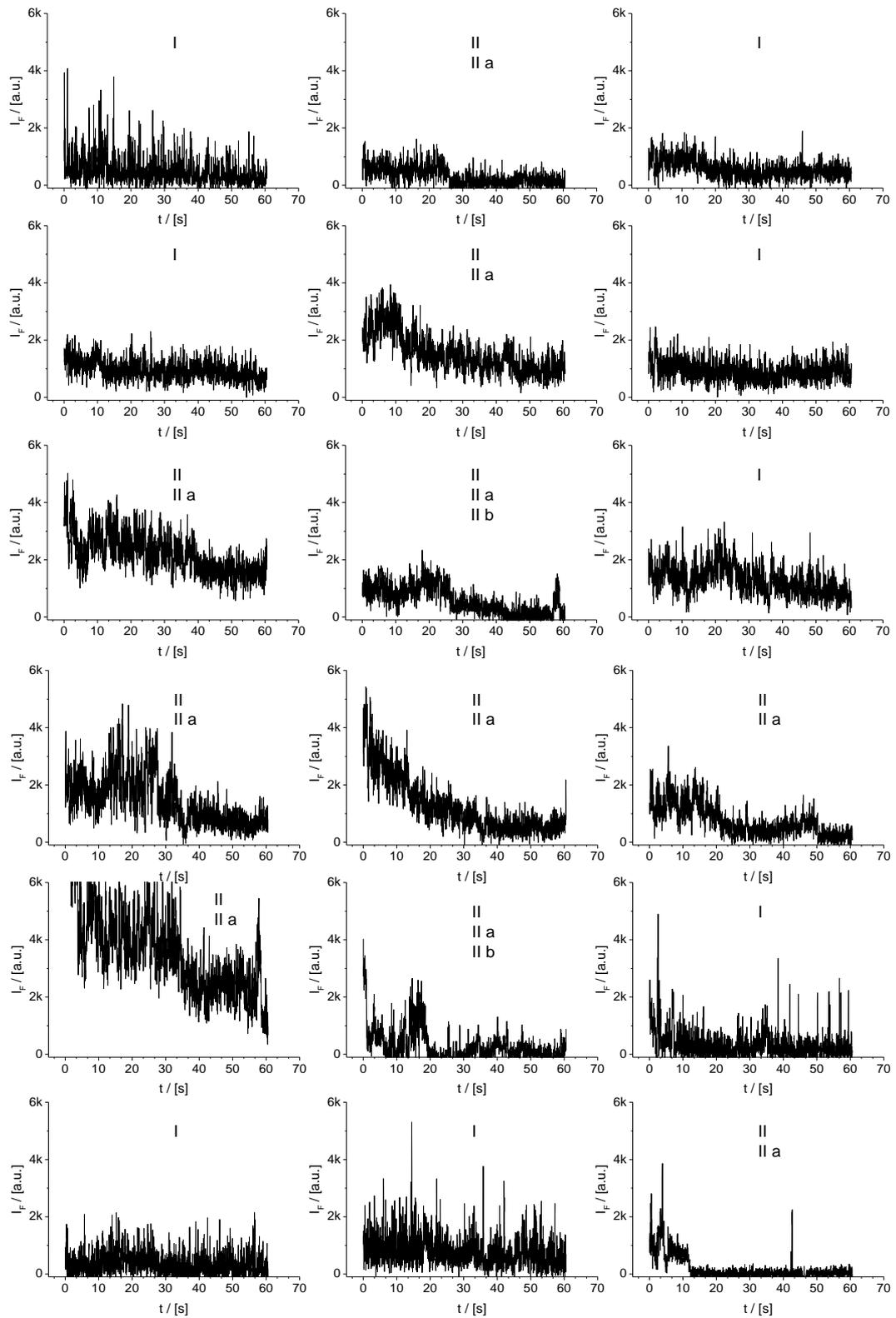


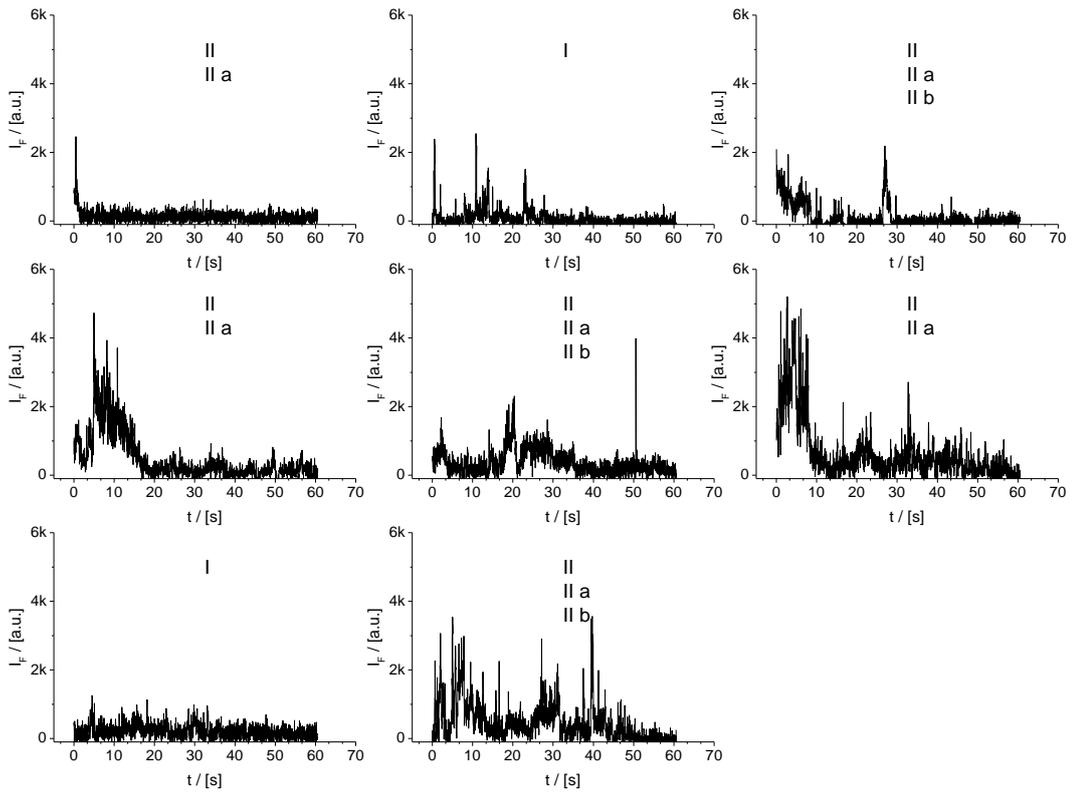
Fluoreszenzintensitätspuren in TE121 + MA





Fluoreszenzintensitätspuren in TE110





In Tabelle 22 sind die I_F -Spuren der Hot-Spots aus den unterschiedlichen Zellexperimenten tabellarisch mit ihren prozentualen Anteilen in die verschiedenen Kategorien eingeteilt.

Tabelle 22: Einteilung der Fluoreszenzintensitätsspuren der Hot-Spots aus den Zellen TE121, TE121 + MA und TE 110 in die Kategorien I und II bzw. II a und II b. Angegeben ist die Anzahl der ausgewerteten Zellen, die Anzahl der daraus extrahierten $I_F(t)$ -Spuren, die zur Kategorisierung herangezogenen wurden und deren prozentualer Anteil in den unterschiedlichen Kategorien.

Kategorie	I (unspec. WW)	II (Cluster)	IIa (Cluster- auflösung)	IIb (Cluster- bildung)
TE121 7 Zellen 26 $I_F(t)$ -Spuren	8 (30,8%)	18 (69,2%)	17 (94,4%)	5 (27,8%)
TE121 + MA 14 Zellen 39 $I_F(t)$ -Spuren	14 (35,9%)	25 (64,1%)	23 (92%)	6 (24%)
TE110 12 Zellen 26 $I_F(t)$ -Spuren <i>6 Zellen davon zeigten keine Hot Spots.</i>	10 (38,5%)	16 (61,5%)	16 (100%)	5 (31,3%)

A.7 Bindungszeiten von CheY-SNAP in lebenden Zellen

Tabelle 23: Anzahl der untersuchten Zellen und Anzahl der daraus extrahierten $I_F(t)$ -Spuren, die für die Bestimmung der Bindungskinetik verwendet wurden.

	Anzahl der zur Analyse verwendeten Zellen	Anzahl der extrahierten $I_F(t)$ -Spuren, die für die Bindungskinetik ausgewertet wurden
TE121	13	36
TE121 + MA	14	34
TE110	6	20

Tabelle 24: Parameter der Potenzfunktion (A , α) und des exponentiellen Cut-Offs (τ) der An- und Auszeiten in den drei Zellexperimenten TE121, TE121 + MA und TE110. Das korrigierte R-Quadrat (R^2) beschreibt die Güte der Ausgleichskurve (Fitfunktion).

	121	121+MA	110	121	121+MA	110
	Anzeiten			Auszeiten		
A	0,0148 $\pm 0,0011$	0,0184 $\pm 0,0012$	0,0478 $\pm 0,0065$	0,0967 $\pm 0,0091$	0,1030 $\pm 0,0067$	0,1002 $\pm 0,0063$
α	2,200 $\pm 0,0568$	2,134 $\pm 0,0622$	1,708 $\pm 0,1004$	1,629 $\pm 0,0897$	1,534 $\pm 0,0645$	1,5 $\pm 0,0613$
τ [s]	---	---	5,77341 $\pm 2,61$	22,37 $\pm 20,61$	16,55 $\pm 5,08$	11,335 $\pm 2,18$
R^2	0,97	0,96	0,94	0,89	0,91	0,94

8 Literaturverzeichnis

1. **Xie et al.** *Single-Molecule Approach to Molecular Biology in Living Bacterial Cells*. *Ann. Rev. Biophysics*. 2008, *Bd. 37*, S. 417-44.
2. **Kremers, G.J., et al.** *Fluorescent proteins at a glance*. *Journal of Cell Science*. 2011, *Bd. 124*, S. 157-160.
3. **Griffin et al.** *Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells*. *SCIENCE*. 1998, *Bd. 281*, S. 269-272.
4. **Los, G.V., et al.** *HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis*. 2008, *Bd. 3*, S. 373–382.
5. **Gautier, A., et al.** *An Engineered Protein Tag for Multiprotein Labeling in Living Cells*. *Chem Biol*. 2008, *Bd. 15*, S. 128–136.
6. **Keppler, A., et al.** *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. *Nature Biotechnology*. 2003, *Bd. 21*, S. 86-89.
7. **Stöhr et al.** *Quenched Substrates for Live-Cell Labeling of SNAP-Tagged Fusion Proteins with Improved Fluorescent Background*. *Anal. Chem.* . 2010, *Bd. 82*, S. 8186–8193.
8. **Sako, Y., et al.** *Live cell single-molecule detection in systems biology*. *WIREs Syst. Biol. Med*. 2012, *Bd. 4*, S. 183-192.
9. **Gahlmann, A. und Moerner, W.E.** *Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging*. *Nature Reviews Microbiology*. 2014, *Bd. 12*, S. 9-22.
10. **Xia et al.** *Single-Molecule Fluorescence Imaging in Living Cells*. *Annu. Rev. Chem*. 2013, *Bd. 64*, S. 459-80.
11. **Lilley, D.M.J. und Wilson, T.J.** *Fluorescence resonance energy transfer as a structural tool for nucleic acids*. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2000, *Bd. 4*, S. 507–517.
12. **Park et al.** *Single-molecule fluorescence to study molecular motors*. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2007, *Bd. 40*, S. 87-111.
13. **Eggeling, C., et al.** *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. *NATURE*. 2009, *Bd. 457*, S. 1159-63.

14. **Stennett, E.M., Ciuba, M.A. und Levitus, M.** *Photophysical processes in single molecule organic fluorescent probes.* Chem. Soc. Rev. 2014, Bd. 43, S. 1057-75.
15. **Drews, Gerhart .** *Contributions of Theodor Wilhelm Engelmann on phototaxis, chemotaxis, and photosynthesis.* Photosynthesis Research. 83, 2005, S. 25–34.
16. **Leake, M.C., et al.** *Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes.* Nature. 2006, Bd. 443, S. 355-358.
17. **Spector, J., et al.** *Mobility of BtuB and OmpF in the Escherichia coli outer membrane: implications for dynamic formation of a translocon complex.* Biophys. J. 2010, Bd. 99, S. 3880-3886.
18. **Niu, L. und Yu, J.** *Investigating intracellular dynamics of FtsZ cytoskeleton with photoactivation single-molecule tracking.* Biophys. J. 2008, Bd. 95, S. 2009–2016.
19. **Greenfield, D., et al.** *Selforganization of the Escherichia coli chemotaxis network imaged with super-resolution light microscopy.* PLoS Biol. 2009, Bd. 7, S. 1000137.
20. **Hammar, P., et al.** *The lac repressor displays facilitated diffusion in living cells.* Science. 2012, Bd. 336, S. 1595–1598.
21. **Ehrhard, T.** *Charakterisierung neuartiger Fluoreszenzsonden zur in vivo Proteinmarkierung in E. coli.* Universität Heidelberg. 2008. Diplomarbeit.
22. *Single Molecule Detection.* [Online] Andor Technology Ltd. [Zitat vom: 15. Juli 2015.] <http://www.andor.com/learning-academy/single-molecule-detection-introduction>.
23. **Clausen-Schaumann et al.** *Force spectroscopy with single biomolecules.* Curr. Opin. Chem. Biol. 2000, Bd. 4, S. 524–30.
24. **Jiang, Y., et al.** *Specific aptamer-protein interaction studied by atomic force microscopy.* Anal. Chem. 2003, Bd. 75, S. 2112–16.
25. **Walter et al.** *Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit.* Nature Methods. 2008, Bd. 5 No.6, S. 475-489.
26. **Xie et al.** *Optical studies of single molecules at room temperature.* Annu. Rev. Phys. Chem. 1998, Bd. 49, S. 441-80.
27. **Kulzer, F. und Orrit, M.** *Single-molecule optics.* Annu. Rev. Phys. Chem. 2004, Bd. 55, S. 585–611.
28. **Moerner, W.E. und Kador, L.** *Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid.* Phys. Rev. Lett. 1989, Bd. 62, S. 2535–38.

29. **Orrit, M. und Bernard, J.** *Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a paraterphenyl crystal.* Phys. Rev. Lett. 1990, Bd. 65, S. 2716–19.
30. **Funatsu, T., et al.** *Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution.* Nature. 1995, Bd. 374, S. 555–59.
31. **Sako, Y., Minoghchi, S. und Yanagida, T.** *Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells.* Nature Cell Biology. 2000, Bd. 2, S. 168-72.
32. **Schütz, G.J., et al.** *Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy.* EMBO J. 2000, Bd. 19, S. 892–901.
33. **Lichtman, J.W. und Conchello, J.A.** *Fluorescence microscopy.* Nature Methods. 2005, Bd. 2, S. 910-19.
34. *Fluoroexcitation.* [Online] Olympus. [Zitat vom: 15. März 2015.]
<http://www.olympusmicro.com/primer/lightandcolor/fluoroexcitation.html>.
35. **Lakowicz, J.R.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* 3. New York : Springer, 2006.
36. **Valeur, B.** *Molecular Fluorescence.* 1. Weinheim : WILEY-VCH, 2002.
37. **Schubert, A.** *Charakterisierung verschiedener Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Signalproteinen und deren Beobachtung in lebenden E.coli.* Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg. 2013. Examensarbeit.
38. **Yip et al.** *Classifying the Photophysical Dynamics of Single- and Multiple-Chromophoric Molecules by Single Molecule Spectroscopy.* J. Phys. Chem. 1998, Bd. 102, S. 7564-7575.
39. **Hoogenboom, J.P.** *Accurate and unbiased estimation of power-law exponents from single-emitter blinking data.* The Journal of Chemical Physics. 2006, Bd. 125, S. 204713/1-204713-12.
40. **Moerner, W. E.** *Those Blinking Single Molecules.* Science. 1997, Bd. 277, S. 1059-1060.
41. **Clifford, J.N., et al.** *Fluorescence of Single Molecules in Polymer Films: Sensitivity of Blinking to Local Environment.* J. Phys. Chem. B. 2007, Bd. 111, 25, S. 6987-6991.
42. **Shimizu et al.** *Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots.* PHYSICAL REVIEW B. 2001, Bd. 63, S. 205316-1 - 205316-5.

43. **Haase et al.** *Exponential and power-law kinetics in single-molecule fluorescence intermittency.* J. Phys. Chem. B. 2004, Bd. 108, S. 10445–10450.
44. **Hoogenboom et al.** *Power-law blinking in the fluorescence of single organic molecules.* ChemPhysChem. 2007, Bd. 8, S. 823–833.
45. **Schuster, F., Cichos, F. und von Borczyskowski, C.** *Influence of self-trapped states on the fluorescence intermittency of single molecules.* Applied Physics Letters. 2005, Bd. 87, S. 051915-1 - 051915-3.
46. **Amecke, N., Heber, A. und Cichos, F.** *Distortion of power law blinking with binning and thresholding.* J. Chem. Phys. 2014, Bd. 140, S. 114306-1 - 114306-8.
47. **Frantsuzov, P., et al.** *Universal emission intermittency in quantum dots, nanorods and nanowires.* Nature Physics. 2008, Bd. 4, S. 519-522.
48. **Vogelsang et al.** *A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes.* Angew. Chem., Int. Ed. 2008, Bd. 47, S. 5465–5469.
49. ATTO 633. [Online] Atto-Tec. [Zitat vom: 15. März 2015.] https://www.attotec.com/attotecshop/product_info.php?info=p110_atto-633.html.
50. **Förster, T.** *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.* Ann. Phys. 1948, Bd. 6, S. 55-75.
51. **Marmé, N., et al.** *Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan.* Bioconjugate Chem. 2003, Bd. 14, S. 1133–1139.
52. **Marmé, N.; Knemeyer, J.-P.** *Sensitive bioanalysis - combining single-molecule spectroscopy with mono-labeled self-quenching probes.* Anal Bioanal Chem. 2007, Bd. 388, S. 1075–1085.
53. **Demtröder, W.** *Laserspektroskopie. 2.* Berlin : Springer-Verlag, 2013.
54. **Reynaud, E.G., et al.** *Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage.* HFSP Journal. 2008, Bd. 2:5, S. 266-275.
55. **Lord, S.J., Lee, H.D. und Moerner, W.E.** *Single-Molecule Spectroscopy and Imaging of Biomolecules in Living Cells.* Anal. Chem. 2010, Bd. 82, S. 2192-2203.
56. **Herten, D.P. und Sauer, M.** *Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie- Analytik an der ultimativen Grenze der Empfindlichkeit.* BUNSEN-MAGAZIN. 2003, S. 5-16.

57. **Mattheyses et al.** *Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist.* Journal of Cell Science. 2010, Bd. 123, S. 3621-3628.
58. **Herten, D.P.** *Optische Einzelmolekülspektroskopie.* Chem. Unserer Zeit. 2008, Bd. 42, S. 192-199.
59. **Pawley, J.B.** *Handbook of Biological Confocal Microscopy.* 3. s.l. : Springer-Verlag, 2006.
60. **Minsky, M.** *Microscopy Aperatus.* Patent # 3013467 A USA, 7. November 1957.
61. **Michalet et al.** *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics.* Science. 2005, Bd. 307, S. 538–544.
62. **Fernández-Suárez, M. und Ting, A.Y.** *Fluorescent probes for superresolution-resolution imaging in living cells.* NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY. 2008, Bd. 9, S. 929-943.
63. **Medintz et al.** *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing.* Nature Materials. 2005, Bd. 4, S. 435-446.
64. **Alivisatos, A. P.** *Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots.* Science, New Series. 1996, Bd. 271, S. 933-937.
65. **Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y.** *Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea.* J. Cell Comp. Physiol. 1962, Bd. 59, S. 223-239.
66. **Remington, S.J.** *Green fluorescent protein: A perspective.* PROTEIN SCIENCE. 19. Juli 2011, Bd. 20, S. 1509—1519.
67. **Shaner et al.** *Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins.* NATURE METHODS. 2008, Bd. 5, S. 545-551.
68. **Patterson et al.** *Use of the Green Fluorescent Protein and Its Mutants in Quantitative Fluorescence Microscopy.* Biophysical Journal. 1997, Bd. 73, S. 2782-2790.
69. **Tinnefeld, P. und Sauer, M.** *Branching Out of Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy: Challenges for Chemistry and Influence on Biology.* Angew. Chem. Int. Ed. 2005, Bd. 44, S. 2642-2671.
70. **Yuan et al.** *Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging.* Chem. Soc. Rev. 2013, Bd. 42, S. 622--661.
71. **Nolting et al.** *NEAR-INFRARED DYES: Probe Development and Applications in Optical Molecular Imaging.* Curr Org Synth. 2011. 2011, Bd. 8, S. 521–534.

72. **ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland.** *Fluorescent Labels and Dyes.* 2015. Produktkatalog.
73. **Ha, T. und Tinnefeld, P.** *Photophysics of Fluorescent Probes for Single-Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging.* *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2012, Bd. 63, S. 595-617.
74. **Fu et al.** *A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom.* *Chem. Commun.* 2008, S. 1780–1782.
75. **Komatsu, T., et al.** *Real-Time Measurements of Protein Dynamics Using Fluorescence Activation-Coupled Protein Labeling Method.* *J. Am. Chem. Soc.* 2011, Bd. 133, S. 6745–6751.
76. **Wombacher, R. und Cornish, V.W.** *Chemical tags: applications in live cell fluorescence imaging.* *J. Biophotonics.* 2011, Bd. 4, S. 391–402.
77. **Jing, C. und Cornish, V.** *Chemical Tags for Labeling Proteins Inside Living Cells.* *Accounts of Chemical Research.* 2011, Bd. 44, S. 784–792 .
78. **Miller, L.W., et al.** *Methotrexate conjugates: a molecular in vivo protein tag.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004, Bd. 43, S. 1672–75.
79. **Guignet, E.G., Hovius, R. und Vogel, H.** *Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells.* *Nat Biotechnol.* 2004, Bd. 22, S. 440-444.
80. **Honda, K., et al.** *Pyrene Excimer-Based Dual-Emission Fused Protein by Using a ZnII–DpaTyr Probe.* *ChemBioChem.* 2007, Bd. 8, S. 1370 – 1372.
81. **Sekine-Aizawa, Y. und Haganir, R.L.** *Imaging of receptor trafficking by using alpha-bungarotoxin-binding-site-tagged receptors.* *PNAS.* 2004, Bd. 101, S. 17114–17119.
82. **Marks, K.M., Rosinov, M. und Nolan, G.P.** *In Vivo Targeting of Organic Calcium Sensors via Genetically Selected Peptides.* *Chem. Biol.* 2004, Bd. 11, S. 347–356.
83. **Walters, N.G.** *Methods in Enzymology.* 1. s.l. : Elsevier, 2010. S. 188-189. Bde. 472 *Single Molecule Tools: Fluorescence Based Approaches, Part A.*
84. **Pantoja, R., et al.** *Single-Molecule Imaging of a Fluorescent Unnatural Amino Acid.* *Biophysical Journal.* 2009, Bd. 96, S. 226–237.
85. **Dean, K.M. und Palmer, A.E.** *Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging.* *Nature Chemical Biology.* 2014, Bd. 10, S. 512-523.
86. **Sourjik, V.; Armitage, J.P.** *Spatial organization in bacterial chemotaxis.* *The EMBO Journal, Focus Review.* 2010, Bd. 29, S. 2724–2733.

87. **Sourjik, V.; Berg, H.C.** *Functional interactions between receptors in bacterial chemotaxis.* NATURE. 2004, Bd. 428, S. 437-441.
88. **Wadhams, G. H.; Armitage, J. P.** *MAKING SENSE OF IT ALL: BACTERIAL CHEMOTAXIS.* NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY. 2004, Bd. 5, S. 1024-1037.
89. **Vladimirov, N.; Sourjik, V.** *Chemotaxis: how bacteria use memory.* Biol. Chem. 2009, Bd. 390, S. 1097–1104.
90. **Tindall et al.** *Theoretical insights into bacterial chemotaxis.* WIREs Syst Biol Med. 2012, Bd. 4, S. 247–259.
91. **Kentner, D.; Sourjik, V.** *Curr Opin Microbiol.* 2006, Bd. 9, S. 619-24.
92. **Maddock, J. R.; Shapiro, L.** *Polar Location of the Chemoreceptor Complex in the Escherichia coli Cell.* SCIENCE. 1993, Bd. 259, S. 1717-1723.
93. **Erbse, A. H.; Falke, J. J.** *The Core Signaling Proteins of Bacterial Chemotaxis Assemble To Form an Ultrastable Complex.* Biochemistry. 2009, Bd. 48, S. 6975–6987.
94. **Krell, T., et al.** *Diversity at its best: bacterial taxis.* Environmental Microbiology. 2011, Bd. 13, S. 1115–1124.
95. **Park et al.** *Reconstruction of the chemotaxis receptor–kinase assembly.* Nature Structural & Molecular Biology. 2006, Bd. 13, S. 400-407.
96. **Hansen, C.H., Endres, R.G. und Wingreen, N.S.** *Chemotaxis in Escherichia coli: a molecular model for robust precise adaptation.* PLoS Comput Biol. 2008, Bd. 4, S. 14-27.
97. **Ames, P.; Parkinson, J. S.** *Constitutively signaling fragments of Tsr, the Escherichia coli serine chemoreceptor.* J. Bacteriol. 1994, Bd. 179, S. 6340–6348.
98. **Porter, S.L., Wadhams, G.H. und Armitage, J.P.** *Signal processing in complex chemotaxis pathways.* Nature Reviews Microbiology. 2011, Bd. 9, S. 153-165.
99. **Dyer, C.M., et al.** *A molecular mechanism of bacterial flagellar motor switching.* J. Mol. Biol. 2009, Bd. 24, S. 71-84.
100. **Sarkar, M.K., Paul, K. und Blair, D.** *Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in Escherichia coli.* Proc. Nat.l Acad. Science. 2010, Bd. 107, S. 9370–9375.

101. **Welch et al.** Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Science.* 1993, *Bd. 90*, S. 8787–8791.
102. **Hazelbauer, G.L.** Adaptation by target remodelling. *NATURE.* 2012, *Bd. 484*, S. 173-175.
103. **Yuan et al.** Adaptation at the output of the chemotaxis signalling pathway. *NATURE.* 2012, *Bd. 484*, S. 233-237.
104. **Dach, K.** Investigation of protein-protein interactions in the chemotaxis network of living E.coli using single molecule methods. *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg* . 2011. *Masterarbeit.*
105. **Atkins, P.W.** Physikalische Chemie. *Zweite Auflage.* Weinheim : VCH, 1996.
106. **Lippitz, M., Kulzer, F. und Orrit, M.** Statistical Evaluation of Single Nano-Object Fluorescence. *ChemPhysChem.* 2005, *Bd. 6*, S. 770 – 789.
107. **Løvdok, L.** Gene expression noise and robustness in the Escherichia coli chemotaxis pathway. *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.* 2008. *Dissertation.*
108. **Kollmann et al.** Design principles of a bacterial signalling network. *Nature.* 2005, *Bd. 438*, S. 504-507.
109. **Welch et al.** Effects of phosphorylation, Mg^{2+} , and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry.* 1994, *Bd. 33*, S. 10470-10476.
110. **Schulmeister, S.** Rezeptormethylierung und Stabilität von Chemotaxisclustern in Escherichia coli. *Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg.* 2010. *Dissertation.*
111. **Buschmann, V., Weston, K.D. und Sauer, M.** Spectroscopic Study and Evaluation of Red-Absorbing Fluorescent Dyes. *Bioconjugate Chem.* 2003, *Bd. 14*, S. 195–204.
112. **Sauer, M.** Single-Molecule-Sensitive Fluorescent Sensors Based on Photoinduced Intramolecular Charge Transfer. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 2003, S. 1790 – 1793.
113. **Cichos, F., von Borzyskowski, C. und Orrit, M.** Power-law intermittency of single emitters. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2007, *Bd. 12*, S. 272–284.
114. **Stöhr, Katharina.** Fluoreszenzgelöschte Sonden für diagnostische und analytische Anwendungen. *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.* 2008. *Dissertation.*

115. *Yellow Fluorescent Protein*. [Online] [Zitat vom: 14. 12 2015.]
<http://www.biovision.com/yellow-fluorescent-protein-2224.html>.
116. **Li, G.-W.; Xie, S.** Central dogma at the single-molecule level in living cells. *NATURE*. 2011, *Bd.* 475, S. 308-315.
117. **Macvanin, M.; Adhya, S.** Architectural organization in *E. coli* nucleoid. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012, *Bd.* 1819, S. 830-835.
118. **McEvoy et al.** Q&A: Single-molecule localization microscopy for biological imaging. *BMC Biology*. 8:106, S. 1-9.
119. **Ellis, R.J.** Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 2001, *Bd.* 26 No.10, S. 597-604.
120. **Wagner et al.** Light dose is a limiting factor to maintain cell viability in fluorescence microscopy and single molecule detection. *Int. J. Mol. Sci.* . 2010, *Bd.* 11, S. 956-966.
121. **Sourjik, V.; Berg, H. C.** Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *PNAS*. 2002, *Bd.* 99, 20, S. 12669 – 12674.
122. **Meyer, V.R.** Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. Weinheim, Germany : Wiley-VCH, 2009.
123. **Gross, J.H.** Massenspektrometrie. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, 2013.
124. **Brox, D., et al.** Ensemble and Single-Molecule Studies on Fluorescence Quenching in Transition Metal Bipyridine-Complexes. *PLoS One*. 2013, *Bd.* 8, Issue 3, e58049, S. 1-7.
125. **Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H.** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989, *Bd.* 86, S. 2172-2175.
126. **Schwering, Michael.** Die Entwicklung neuer Methoden in der Fluoreszenzmikroskopie auf Basis reversibler chemischer Reaktionen. *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*. 2012. *Dissertation*.
127. **Grußmayer, K.S.** DNA Biosensors for Transcription Factor Detection with Single Molecule Fluorescence Spectroscopy. *Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*. 2011. *Diplomarbeit*.
128. **Rybina, A., et al.** Distinguishing Alternative Reaction Pathways by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, *Bd.* 52, S. 6322-6325.

129. **Hanahan, D.** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J Mol Biol. 1983.
130. *Invitrogen™ cell and molecular biology products.* [Online] Thermofisher Scientific. [Zitat vom: 15. 12 2015.]
https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/invitrogen.html?gclid=CKCouJ7u8ckCFUE_GwodnegJYA&s_kwcid=AL!3652!3!83052612507!p!!g!!invitrogen&ef_id=VnqDKAAAATjyIP3q:20151223111904:s.
131. **Villarejo, M.R. und Zabin, I.** *Beta-galactosidase from termination and deletion mutant.* J. Bacteriol. 1974, Bd. 120, S. 466-474.
132. **Parkinson, J.S. und Houts, S.E.** *Isolation and behavior of Escherichia coli deletion mutants lacking chemotaxis functions.* J. Bacteriol. 1982, Bd. 151, S. 106-113.
133. **Sourjik, V. und Berg, H.C.** *Localization of components of the chemotaxis machinery of Escherichia coli using fluorescent protein fusions.* Mol Microbiol. 2000, Bd. 37, S. 740-751.
134. **Kollmann, M.C., et al.** *Design principles of a bacterial signalling network.* Nature. 2005, Bd. 438, S. 504-507.
135. **Kentner, D., et al.** *Determinants of chemoreceptor cluster formation in Escherichia coli.* Mol Microbiol. 2006, Bd. 61, S. 407-417.
136. **Shapiro et al.** *Generating and exploiting polarity in bacteria.* Science. 298, 2002, S. 1942–1946.
137. —. *Why and how bacteria localize proteins.* Science. 326, 2009, S. 1225–1228.
138. **Kuo, S. C.; Koshland, D.E.Jr.** *Roles of CheY and CheZ gene products in controlling flagellar rotation in bacterial chemotaxis of Escherichia-coli.* Journal of Bacteriology. 1987, Bd. 169, S. 1307-1314.
139. **Li, M., Hazelbauer, G. L.** *Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signalling complex.* J Bacteriol. 2004, Bd. 186, S. 3687 – 3694.
140. **Stewart, R. C.; Van Bruggen, R.** *Phosphorylation and Binding Interactions of CheY Studied by Use of Badan-Labeled Protein.* Biochemistry. 2004, Bd. 43, S. 8766-8777.
141. **Yeow et al.** *Characterizing the fluorescence intermittency and photobleaching kinetics of dye molecules immobilized on a glass surface.* J. Phys. Chem. A. 2006, Bd. 110, S. 1726-1734.
142. **Weber et al.** *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin.* Science. 1989, Bd. 243, S. 85-88.

143. **Stewart et al.** *Rapid Phosphotransfer to CheY from a CheA Protein Lacking the CheY-Binding Domain.* *Biochemistry.* 2000, Bd. 39, S. 13157-13165 .
144. **Andrews, S.; Bray D.** . *Stochastic simulation of chemical reactions with spatial resolution and single molecule detail.* *Phys Biol.* 2004, Bd. 1, S. 137-51.
145. **Sewitz, S.; Lipkow, K.** *Simulating the Bacterial Chemotaxis Pathway at High Spatio-temporal Detail.* *Current Chemical Biology.* 2013, Bd. 7, S. 214-223.
146. **Jasuja et al.** *Chemotactic Responses of Escherichia coli to Small Jumps of Photoreleased L-Aspartate.* *Biophysical Journal.* 1999, Bd. 76, S. 1706–1719.
147. **Stewart, R. C.** *Kinetic Characterization of Phosphotransfer between CheA and CheY in the Bacterial Chemotaxis Signal Transduction Pathway.* *Biochemistry.* 1997, Bd. 36, S. 2030-2040.
148. **Richie, K., et al.** *Single-molecule imaging in live bacteria cells.* *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012, Bd. 368, S. 1611.
149. **Schuster, S.C., et al.** *Assembly and function of a quaternary signal transduction complex monitored by surface plasmon resonance.* *Nature.* 1993, Bd. 365, S. 343–347.
150. **Mayover, T.L., Halkides, C.J. und Stewart, R.C.** *Kinetic Characterization of CheY Phosphorylation Reactions: Comparison of P-CheA and Small-Molecule Phosphodonors.* *Biochemistry.* 1999, Bd. 38, S. 2259-2271 .
151. **Stewart, R.C., Jahreis, K. und Parkinson, J.S.** *Rapid Phosphotransfer to CheY from a CheA Protein Lacking the CheY-Binding Domain.* *Biochemistry.* 2000, Bd. 39, S. 13157-13165.
152. **Moal, I.H. und Bates, P.A.** *Kinetic Rate Constant Prediction Supports the Conformational Selection Mechanism of Protein Binding.* *PLoS Computational Biology.* 1002351, 2012, Bd. 8, 1, S. 1-13.
153. **Barak, R.; Eisenbach, M.** *Regulation of interaction between signaling protein CheY and flagellar motor during bacterial chemotaxis. [Buchverf.] Stadtman, E. R.; Chock, P. B.* *Current Topics in Cellular Regulation.* San Diego : Academic Press, 1996, Bd. 34, S. 137-158.
154. **Orrit, M.** *Chemical and physical aspects of charge transfer in the fluorescence intermittency of single molecules and quantum dots.* *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010, Bd. 9, S. 637–642.
155. **Barak, R. und Eisenbach, M.** *Correlation between Phosphorylation of the Chemotaxis Protein CheY and its Activity at the Flagellar Motor.* *Biochemistry.* 1992, Bd. 31, S. 1821-1826.

156. **Eccleston, A. und Ritu, D.** *Signalling in cancer.* Nature. 2006, Bd. 441, 7092, S. 423.
157. **Crivat, G. und Taraska, J.W.** *Imaging proteins inside cells with fluorescent tags.* Trends in Biotechnology. 2012, Bd. 30, S. 8-16.

Danksagung

Nun liegt die Dissertation nach vielen Jahren intensiver Arbeit vor und es ist Zeit sich bei denjenigen Personen zu bedanken, die mir in dieser Phase mit Rat und Tat zur Seite standen:

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dirk-Peter Herten, für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit in der Gruppe für Einzelmolekülspektroskopie an der Universität Heidelberg durchführen zu können. Ich danke ihm für die fachliche aber auch mentale Unterstützung, das Verständnis und Vertrauen, welches er mir in all den Jahren entgegengebracht hat. Ohne die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seiner Offenheit gegenüber der Vereinbarkeit von Familie und Beruf wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. Lutz Graeve für die Betreuung meiner Arbeit seitens der Universität Hohenheim. Besonders möchte ich mich bei ihm für das außergewöhnliche Engagement bedanken, das er stets seinen Studenten entgegenbringt.

Prof. Dr. Victor Sourjik für die wertvolle Einweisung in die Welt der Mikrobiologie am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg und der Bereitstellung zahlreicher Bakterienstämme und Plasmide. Ebenso den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe Anette Müller, Gabi Schwarz, Dr. Hui Li, Dr. Linda Løvdok und Dr. Silke Neumann für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Vor allem danke ich Dr. Sonja Schulmeister für ihre intensive und kompetente Betreuung.

Meinen ehemaligen und aktuellen Arbeitskollegen Dr. Anne Unger, Andreas Haderspeck, Dr. Anton Kurz, Dr. Arina Rybina, Dr. Christina Spassova, Dr. Daniel Barzan, Dominik Brox, Ilse Valtierra, Dr. Jessica Balbo, Klaus Yserentant, Dr. Konstantinos Lympelopoulos, Dr. Kristin Grußmayer, Martin Seefeld, Dr. Michael Schwering und Siegfried Hänselmann. Danke, nicht nur für eure fachliche Unterstützung oder das Korrekturlesen, sondern auch für das tolle Arbeitsklima, das durch zahlreiche Kuchen versüßt wurde.

Jessi, herzlichen Dank für deine unermüdliche Motivation sei es bei Tag, bei Nacht, im Labor oder am Telefon und natürlich auch für die vielen Stunden, die du geopfert hast, um mit mir meine Daten zu diskutieren und mir wertvolle Anregungen zu geben. Unsere gemeinsamen, privaten Unternehmungen haben mich immer wieder aufgeheitert und bleiben für mich unvergesslich. Die dadurch entstandene Freundschaft ist mir sehr wichtig. Ich freue mich schon jetzt auf viele weitere gemeinsame Aktivitäten mit dir.

Dominik, dir danke ich für deine stete Hilfsbereitschaft und deine Ausgeglichenheit, die zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima beiträgt.

Arina, dir sei herzlichst gedankt für die Einweisung in die Welt der Wahrscheinlichkeiten und der Datenanalyse, dein Einfühlungsvermögen und die daraus erwachsene Freundschaft.

Christina, dir danke ich für deinen Optimismus, mit dem du mich stets motiviert hast.

Micha, für die Ruhe und Ausgeglichenheit, mit der du alle Fragen rund um die TIRF-Mikroskopie geduldig beantwortet hast, danke ich dir.

Kostas, dir danke ich für die hilfreiche und kompetente Unterstützung bei vielen biologischen Fragestellungen und für die fruchtbaren Diskussionen.

Anton, Klaus und Kristin, ihr wart eine unersetzbare, große Hilfe für meine Computerprobleme. Ihr wart zur Seite, wenn der Computer gestreikt hatte und außer ‚Error‘ kein Land in Sicht war. Ein herzliches Dankeschön auch für die Entwicklung der zahlreichen MATLAB-Auswertungsprogramme.

Anne Schubert, Christian Burgard, Katharina Dach, Ruben Drews, Sebastian Steinhäuser, Stefanie Bäßler, Steffen Daum und Thimon Schwaebel, die mich durch ihre Forschungs-, Master- und Zulassungsarbeiten unterstützt haben. Vielen Dank für die nächtlichen TIRF-Messungen auf der Suche nach einzelnen Molekülen, bei denen wir oftmals viel Spaß hatten.

Allen, die mir mit Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft im BioQuant-Alltag begegnet sind. Vor allem Sybille Schurin und Sabrina Wetzel (BioQuant-Verwaltung), Daniel Browne und Dr. Marc Hemberger (BioQuant-IT), Dr. Angret Joester (ehem. BioQuant Betriebsleitung), Monika Beilharz und Peter Schawerna (Laborbetreuung).

Prof. Dr. med. Peter R. Galle und seiner Ehefrau Dr. med. Monika Galle für den motivierenden Zuspruch, der mich zu meiner Weiterbildung animiert hat und auch für die unvergessliche, gemeinsame Zeit an der Medizinischen Klinik Heidelberg, die mich wesentlich geprägt hat.

Allen meinen lieben Freunden, vor allem Dr. Amelie Rehtanz, Edda Seitz, Martina Meyer-Reichert, Martina Pilz, Dr. Miriam Möndel, Dr. Susanne Baureis und meinen ‚Sandkastenfreundinnen‘ Barbara Graf und Sabine Gütter. Danke für den Zuspruch, die Geduld und die vielen schönen Momente. Ich freue mich auf viele weitere Stunden mit Euch, sei es am Telefon, beim Laufen, bei einem Glas Wein oder auch bei einem Salbei-Limette Tee. Nicht vergessen sind all meine Freunde und Verwandten, die hier nicht namentlich genannt sind, mich jedoch stets moralisch unterstützt haben.

Birgit Wagner, die mir wie eine große Schwester in jeder Lebenslage zur Seite steht und mich aufmuntert. Herzlichen Dank, dass du mir immer wieder die Augen für das wirklich Wichtige öffnest.

Meinen fürsorglichen Eltern, die mich von jeher und in jeder Hinsicht unterstützten, immer an meiner Seite standen und an mich glaubten. Gerne hätte ich ihnen diese Arbeit gezeigt. Ebenso von Herzen meinem Bruder, auf den ich immer zählen kann, auch wenn wir uns nur selten sehen.

Meinen Schwiegereltern, die mir in jeder Beziehung, insbesondere durch ihre uneingeschränkte Bereitschaft zur Kinderbetreuung, eine besondere Hilfe waren.

Meinem Mann, Dr. Jan Ehrhard gilt der größte Dank. Ich danke dir von ganzem Herzen für deinen unermüdlichen Rückhalt, deiner wertvollen fachlichen Unterstützung und deiner immerwährenden Motivation, diese Arbeit zu vollenden. Nicht minder unseren beiden Söhnen Max und Paul. Euch danke ich von ganzem Herzen für das liebevolle Verständnis, oftmals auf meine Anwesenheit zu verzichten und auf Eure Geduld mit mir.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Tanja Margret Ehrhard (geb. Seltenreich)
Geburtsdaten: 9. September 1971 in Heidelberg
Nationalität: deutsch
Zivilstand: verheiratet
Kinder: 2, im Alter von 13 und 15 Jahren

Werdegang

seit 05/2014 Promotion in der Arbeitsgruppe „Einzelmolekülspektroskopie“ am Physikalisch-Chemischen Institut (PCI) / Exzellenzcluster CellNetworks, BioQuant, Universität Heidelberg und am Institut für Biologische Chemie und Ernährungswissenschaft, Fachgebiet Biochemie der Ernährung, Universität Hohenheim

07/2008-06/2014 Wissenschaftliche Angestellte in der Arbeitsgruppe „Einzelmolekülspektroskopie“ am PCI und Exzellenzcluster CellNetworks, BioQuant, Universität Heidelberg

10/1997-06/2008 Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Hohenheim

01/2008-06/2008 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Einzelmolekülspektroskopie“ am PCI und Exzellenzcluster CellNetworks, BioQuant, Universität Heidelberg

10/2002-12/2007 Urlaubssemester (Kindererziehung)

09/1994-06/1997 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Bruchsal
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

07/1991-08/1994 Tätigkeit als Biologielaborantin
Zell- und Molekularbiologisches Forschungslabor
an der Medizinischen Klinik Heidelberg

08/1988-06/1991 Ausbildung zur Biologielaborantin am Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg

09/1982-06/1988 Realschule Wiesloch

Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Untersuchung einer Methode zur spezifischen Fluoreszenz – Markierung von Signalproteinen und deren Beobachtung in lebenden *Escherichia coli*
(Einzelmolekültechnik & Perspektiven)

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift