

# INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Dominik Brox

geboren in Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Oktober 2016





**Synthese modularer  
chemischer Schalter für die  
optische Mikro- und  
Nanoskopie**

Gutachter Prof. Dr. Dirk-Peter Herten  
Prof. Dr. Reiner Dahint



Meiner Freundin Christiane  
und meinen Eltern, Wolfgang und Christine.

„The difference between science and screwing around  
is writing it down.“

*Adam Savage, MythBusters*



# Zusammenfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein elementares Werkzeug zur Untersuchung molekularer Vorgänge auf der Nanometerskala, das sich in den Lebenswissenschaften breit etabliert hat. Durch spektrale Separation können mehrere mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Proteine verfolgt und ihre Interaktionen untereinander sogar in lebenden Zellen aufgeklärt werden. Limitiert wird dies jedoch durch Beugungseffekte, die die Auflösung optischer Abbildungen auf etwa 200 nm begrenzt, sowie durch chromatische Aberrationen, welche eine Korrelation verschiedener Strukturen bei Verwendung mehrerer Farbkanäle erschwert. Mit Hilfe molekularer Fluoreszenzschalter können beide Limitationen zugleich überwunden werden: durch chemisch induziertes Einzelmolekülblinken für die Lokalisationsmikroskopie (CHIRON - *Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy*) und chemisches Multiplexing (CHEMPLEXING) zur monochromatischen Abbildung mehrerer Strukturen.

Als Vorarbeit wurden modulare chemische Schalter entwickelt, die basierend auf einem DNA-Doppelstrang einen Liganden in räumliche Nähe eines Farbstoffs bringen und durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Koordination reversibel in ihrer Emission geschaltet werden können. Die Fluoreszenzlöschung erfolgt dabei durch einen photoinduzierten Elektronentransfer. Durch Variation von Ligand und Farbstoff wurden neue Verbindungen mit höherer Affinität, geringerer Restfluoreszenz im gelöschten Zustand und einer höheren Photostabilität erhalten. In Lokalisationsexperimenten konnte das chemisch induzierte Blinken einzelner Moleküle ausgenutzt werden, um eine Auflösung von rund 90 nm zu erreichen. Zudem wurde das chemische Multiplexing als Methode zur Abbildung mehrerer Strukturen in einem Farbkanal etabliert. Durch Kombination herkömmlicher Immunfluoreszenz mit chemischen Schaltern konnten so bis zu vier Strukturen in einer Probe in zwei spektralen Kanälen sequentiell abgebildet werden. Des Weiteren wurden die Grenzen der Methode ausgetestet und auch ihre Anwendbarkeit in der hochauflösenden STED-Mikroskopie demonstriert.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden darüber hinaus neue, auf den Aminosäuren Lysin und 3-Amino-Alanin basierende chemische Schalter mit Dipicolylamin als Ligand entwickelt. Um diese für eine breite Nutzung zugänglich zu machen wurden verschiedene Funktionalitäten (Propargyl-Gruppe, Biotin, (Methyl)-Tetrazin, Halogenalkan, Benzylguanin) verwendet. Am überzeugendsten zeigte

sich dabei die Kombination aus Propyl-Atto565 und Biotin-Linker an Dipicolyl-Alanin mit einer Komplexbildungskonstante für  $\text{Cu}^{2+}$  von  $(3.03 \pm 0.61) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und eine sehr niedrige Restfluoreszenz des gelöschten Zustands von  $(0.9 \pm 0.1) \%$ . In Lokalisationsexperimenten an markierten Mikrotubuli in NIH 3T3 Zellen konnte eine Auflösung von  $(89 \pm 14) \text{ nm}$  erreicht werden. Auch beim chemische Multiplexing, sowohl im konfokalen als auch im STED-Mikroskop, konnte eine Auflösung von etwa 90 nm in beiden Kanälen demonstriert werden.

Das eingeführte Halogenalkan-Derivat als Substrat für das enzymatische Halo-Tag lieferte ebenso gute Ergebnisse wie die Derivate mit Tetrazin- und Methyl-Tetrazin-Funktionalität zur Markierung mittels Kupfer-freier Click-Reaktion. Damit eröffnen sich für die chemischen Schalter vielfältige Methoden zur Markierung, die nun theoretisch auch in lebenden genetisch veränderten Zellen durchführbar sind.

# Abstract

Fluorescence microscopy is a well established tool in the life sciences to study molecular processes at microscopic scales. Multiple fluorescently labeled target proteins can be observed and specific interactions can be investigated using separated spectral channels. However, the optical resolution is limited by diffraction to about 200 nm and chromatic aberrations prevent the direct correlation of multiple spectral channels. Molecular fluorescent chemosensors present a way to circumvent both limitations. Chemically induced single-molecule blinking can be used for localization microscopy (*CHIRON - chemically improved resolution for optical nanoscopy*), while chemical multiplexing microscopy (*CHEMPLEXING*) allows for aberration-free monochromatic imaging of multiple labels.

The preliminary chemical switches investigated in this work were based on a DNA duplex that brings a ligand moiety and a fluorescent dye in close proximity. Reversible complexation of  $\text{Cu}^{2+}$  ions quenches the fluorescence via a photo-induced electron transfer mechanism. The variation of ligand and dye yielded in new probes showing higher affinity, a lowered residual fluorescence in the quenched state and an increased photostability compared to the previously established dye TMR. The localization of single blinking probe molecules on microtubuli in fixed HeLa cells achieved a resolution of 90 nm. The chemical multiplexing was established as a technique to sequentially image different structures without chromatic aberrations. By combining standard immunofluorescence labeling with chemical switches up to four different structures in two color channels could be imaged. Besides exploring the limitations of this approach its feasibility with other super-resolution microscopy techniques like STED was also demonstrated.

Based on these findings a new generation of the modular chemical switches was created by implementing dipicolylamine as a ligand moiety in lysine and 3-aminoalanine. A broad applicability was achieved through different functionalities (propargyl, biotin, (methyl-)tetrazine, halogenated alkane, benzylguanine) that were incorporated in the amino acid based switches. The best results were obtained by combining the dye Propyl-Atto565 and a biotin linker with the dipicolylalanine, showing a complexation constant for  $\text{Cu}^{2+}$  of  $(3.03 \pm 0.61) 10^7 \text{ M}^{-1}$  and a very low residual fluorescence in the quenched state of  $(0.9 \pm 0.1) \%$ . Localization experiments on microtubuli in fixed NIH 3T3 cells yielded a resolution of  $(89 \pm 14) \text{ nm}$ . The combination of chemical multiplexing and STED microscopy

resulted in a resolution of 90 nm in both virtual color channels.

Both the haloalkane derivatives—substrates for the enzymatic Halo-Tag—and the tetrazine and methyl-tetrazine derivatives—for labeling via copper-free click chemistry—showed promising results. This opens the way for a broad application of the chemical switches in the life science, which may now even be used in living genetically modified cells.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>I. Einleitung und Grundlagen</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung und Grundlagen</b>	<b>3</b>
1.1. Grundlagen der Fluoreszenz . . . . .	4
1.2. Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	12
1.3. Fluoreszenzmikroskopie an und unterhalb der Beugungsgrenze . . . . .	14
1.4. Markierungsstrategien . . . . .	28
1.5. Chemische Schalter . . . . .	31
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	34
<b>II. Experimente und Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>2. Die chemischen Schalter der ersten Generation</b>	<b>37</b>
2.1. Ensemble-Experimente . . . . .	37
2.2. Untersuchungen zum Löschmechanismus . . . . .	42
2.3. Einfluss unterschiedlicher Liganden und Farbstoffe . . . . .	46
2.4. Einzelmolekülcharakterisierung . . . . .	48
2.5. Hoch aufgelöste Mikroskopie: CHIRON . . . . .	54
2.6. Chemisches Multiplexing . . . . .	58
<b>3. Die chemischen Schalter der zweiten Generation</b>	<b>69</b>
3.1. Funktionalisierungsstrategien . . . . .	73
3.2. Propargylierung und Farbstoffmarkierung mittels Click-Chemie . . . . .	74
3.3. Synthese von Halo-Tag-Derivaten . . . . .	92
3.4. Synthese von Benzylguanin-Derivaten . . . . .	96
3.5. Synthese von Tetrazin-Derivaten . . . . .	98

---

<b>III. Diskussion und Ausblick</b>	<b>103</b>
<b>4. Diskussion und Ausblick</b>	<b>105</b>
4.1. Charakterisierung des bestehenden Sondenkonzepts . . . . .	105
4.2. Weiterentwicklung der chemischen Schalter . . . . .	109
4.3. Alternative chemische Schalter . . . . .	114
<b>IV. Materialien, Methoden und Synthesevorschriften</b>	<b>117</b>
<b>5. Materialien und Methoden</b>	<b>119</b>
5.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien . . . . .	119
5.2. Aufreinigung und Analytik . . . . .	122
5.3. Probenvorbereitung . . . . .	123
5.4. Ensemble-Techniken . . . . .	130
5.5. Mikroskopie . . . . .	132
5.6. Datenauswertung . . . . .	137
<b>6. Synthesevorschriften</b>	<b>139</b>
6.1. Funktionalisierung von Lysin . . . . .	139
6.2. Funktionalisierung von Alanin . . . . .	154
6.3. Funktionalisierung von <i>p</i> -Amino-Phenylalanin . . . . .	169
6.4. Synthese von Linkern . . . . .	171
6.5. Markierungsmethoden . . . . .	177
6.6. Funktionalisierung von DNA . . . . .	185
<b>V. Anhang</b>	<b>187</b>
<b>A. Herleitung der verwendeten Formeln</b>	<b>189</b>
<b>B. Löschmechanismus</b>	<b>195</b>
<b>C. Ensemble-Daten</b>	<b>197</b>
C.1. Fluoreszenztitrationen . . . . .	197
C.2. Fluoreszenzlebensdauer-messungen . . . . .	202
<b>D. Mikroskopie-Daten</b>	<b>205</b>
D.1. Einzelmolekül-Experimente . . . . .	205
D.2. Lokalisationengenauigkeit . . . . .	206
D.3. Lokalisationsexperimente . . . . .	207

---

D.4. Chemisches Multiplexing . . . . .	210
D.5. STED-Experimente . . . . .	212
D.6. Markierung mit Halo-Derivaten . . . . .	214
D.7. Markierung mittels Kupfer-freier Click-Reaktion . . . . .	215
<b>E. Cytotoxizität von CuSO<sub>4</sub></b>	<b>217</b>
<b>F. Alternative chemische Schalter</b>	<b>219</b>
<b>G. NMR-Spektren</b>	<b>221</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>241</b>
<b>H. Abkürzungen</b>	<b>255</b>
<b>Publikationen und Poster</b>	<b>257</b>
<b>Danksagung</b>	<b>259</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>261</b>



**Teil I.**

# **Einleitung und Grundlagen**



# Kapitel 1.

## Einleitung und Grundlagen

Für Jahrhunderte lag die Grenze der erlebbaren Welt etwa beim Durchmesser eines Haares, also bei Dingen, die gerade noch mit dem bloßen Auge sichtbar sind. Obwohl schon in der Antike einfache Linsen aus mit Wasser gefüllten Glasgefäßen bekannt waren, um in die Welt des „Mikroskopischen“ abzutauchen, wurden erst Anfang des siebzehnten Jahrhunderts die ersten Mikroskope entwickelt. Seiner Zeit weit voraus war damals ANTONI VAN LEEUWENHOEK, dessen Mikroskope mit nur einer Linse eine Abbildungsqualität aufwiesen, die Jahrzehnte lang unerreicht blieb. Er war einer der Ersten, der mikroskopische Zeichnungen von Insekten, Bakterien und in Kapillaren zirkulierenden roten Blutkörperchen anfertigte.<sup>[1,2]</sup> Erst 1873 veröffentlichte ERNST ABBE eine Abhandlung zur Theorie der Mikroskopie.<sup>[3]</sup> Durch das immer bessere Verständnis rückte von nun an die Grenze des Beobachtbaren immer weiter in Richtung der von ABBE beschriebenen fundamentalen Auflösungsgrenze optischer Abbildungen, die bei etwa der halben Betrachtungswellenlänge liegt, also bei circa 250 nm. Für die Mikroskopie mit sichtbarem Licht galt diese Grenze bis ins zwanzigste Jahrhundert, bis mit der Entwicklung der 4Pi-Mikroskopie und den Nahfeld-Techniken Möglichkeiten gefunden wurden, diese fundamentale Grenze zu umgehen. In der Weitfeldmikroskopie veränderten die deterministischen Methoden um die Jahrtausendwende und stochastischen Methoden ab 2006 die Gegebenheiten und machten die nanoskopische Welt einer breiten Masse an Wissenschaftlern zugänglich. Dies wurde schließlich mit dem Nobelpreis für Chemie 2014 gewürdigt, der an ERIC BETZIG, STEFAN W. HELL und W.E. MOERNER „für die Entwicklung hoch aufgelöster Fluoreszenzmikroskopie“ verliehen wurde.<sup>[4]</sup>

Es haben sich mittlerweile zahlreiche Mikroskopietechniken in den Lebenswissenschaften etabliert und die Auflösungsgrenze nähert sich der molekularen Größenordnung an, die bis dahin hauptsächlich der Elektronenmikroskopie vorbehalten war. Neben der stetigen Weiterentwicklung optischer und elektronischer Komponenten spielt dabei auch die Entwicklung neuer Markierungsmethoden und besserer Fluoreszenzmarker eine entscheidende Rolle.

Der Großteil der etablierten hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopietechni-

ken basiert auf reversiblen oder irreversiblen lichtgetriebenen Schalten von Fluorophoren. Die spezifischen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe diktieren dabei die Art und Weise des Schaltmechanismus und legen damit auch die Anforderungen an die Mikroskopiemethode fest. Das in dieser Arbeit eingesetzte Konzept zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie setzt dagegen auf einen von der Anregungsquelle unabhängigen Schaltmechanismus durch chemische Interaktion. Dies wurde bereits von einigen Gruppen demonstriert, wobei hierfür unterschiedliche Ansätze zum Einsatz kamen.

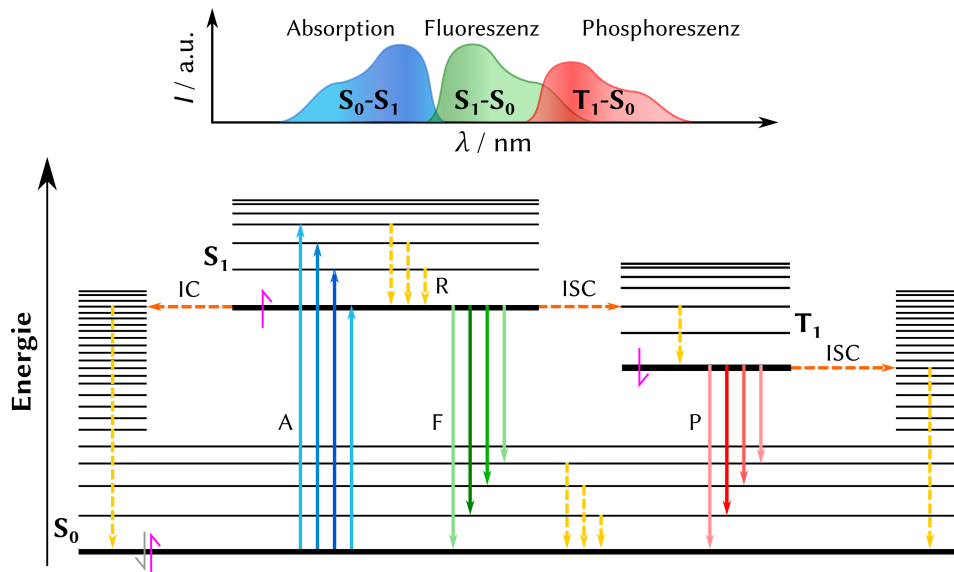
Zur Entwicklung modularer chemischer Fluoreszenzschalter bedarf es daher tiefgreifender Kenntnisse in Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung, in (hoch auflösenden) Mikroskopietechniken und Markierungsmethoden. Daher soll darauf im Weiteren eingegangen werden.

### 1.1. Grundlagen der Fluoreszenz<sup>[5,6]</sup>

Die grundlegende Entdeckung der Fluoreszenz 1852 durch GEORGE GABRIEL STOKES hat die heutigen Lebenswissenschaften entscheidend geprägt.<sup>[7]</sup> Aber erst mit dem Aufkommen von fluoreszierenden Proteinen ab 1962 verbreitete sich die Fluoreszenzmikroskopie endgültig in Biologie und angrenzenden Gebieten. Nachdem von OSAMU SHIMOMURA mit dem GFP (engl. *green fluorescent protein*) die Herkunft der grünlichen Fluoreszenz der Qualle *Aequorea aequorea* gefunden war,<sup>[8]</sup> wurden in den nachfolgenden Jahrzehnten zahlreiche neue, modifizierte fluoreszierende Proteine mit immer besseren Eigenschaften entwickelt.<sup>[9]</sup> Schließlich wurde für die Entdeckung des GFP 2008 der Nobelpreis der Chemie an OSAMU SHIMOMURA, MARTIN CHALFIE und ROGER TSIEN verliehen.<sup>[10,11]</sup>

Das Phänomen der Fluoreszenz lässt sich anhand eines einfachen Jablonski-Diagramms beschreiben, wie es in Abbildung 1.1 gezeigt ist. Trifft ein Photon auf ein Molekül, kann es zu dessen Absorption kommen, die absorbierte Energie bringt das Molekül in einen elektronisch angeregten Zustand. Dieser Vorgang läuft auf einer Zeitskala von  $10^{-15}$  s ab, sodass sich die Position der Atomkerne während der Absorption nicht ändert (Born-Oppenheimer-Näherung). Ein Übergang vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  kann auch mit einem Wechsel des Schwingungszustandes einhergehen (Franck-Condon-Prinzip). Da bei Raumtemperatur im elektronischen Grundzustand nach der Boltzmann-Verteilung hauptsächlich der Schwingungsgrundzustand besetzt ist, erfolgt von hier ausgehend die Anregung. Je nach absorbierter Wellenlänge befindet sich das Molekül nach der Absorption in einem schwingungsangeregten Niveau des elektronisch angeregten Zustands. Nach solch einem vibronischen Übergang erfolgt innerhalb von etwa  $10^{-11}$ – $10^{-14}$  s eine schnelle





**Abbildung 1.1.:** Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Beschreibung der intramolekularen Vorgänge bei der Wechselwirkung von Licht mit Materie: dargestellt sind der elektronische Singulett-Grundzustand  $S_0$  mit den ersten Schwingungsniveaus, sowie der erste elektronisch angeregte Singulett-Zustand  $S_1$  und der erste Triplett-Zustand  $T_1$ . Durchgezogene Pfeile markieren Übergänge, bei denen Photonen absorbiert oder emittiert werden, gestrichelte Pfeile strahlungslose Übergänge. Absorption A, Fluoreszenz F, Phosphoreszenz P, vibronische Relaxation R, innere Konversion IC, Spinumkehr ISC. Im oberen Bereich sind typische Spektren der elektronischen Übergänge dargestellt: Absorption  $S_0 - S_1$  (blau), sowie Emission  $S_1 - S_0$  (Fluoreszenz, grün) und  $T_1 - S_0$  (Phosphoreszenz, rot).

Relaxation durch Stöße mit umgebenden Molekülen in den Schwingungsgrundzustand von  $S_1$ . Dies ist mit  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  s ein relativ langlebiger Zustand, von dem aus nun zahlreiche unterschiedliche Prozesse stattfinden können, um das Molekül zurück in den Grundzustand zu bringen. Der für diese Arbeit wichtigste Prozess ist die Fluoreszenz, also die Rückkehr des Moleküls in den Zustand  $S_0$  unter Emission eines Photons. Dieser Prozess erfolgt ebenso wie die Absorption unter Erhalt des Gesamtspins, ist daher quantenmechanisch erlaubt. Die Energie des emittierten Photons ist allerdings geringer als die des absorbierten Photons, da durch die Relaxation bereits Energie verloren ging. Diese spektrale Verschiebung zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum wird als Stokes-Shift bezeichnet.

In Konkurrenz zur Emission steht die innere Konversion, ein strahlungsloser

elektronischer Übergang, der auf einer Zeitskala von  $10^{-9}$ – $10^{-11}$  s abläuft und das angeregte Molekül in einen hoch angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands  $S_0$  bringt. Von hieraus wird die Energie auf interne Freiheitsgrade verteilt oder an die Umgebung abgegeben.

Ein weiterer Prozess, der ausgehend vom Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  stattfinden kann ist die Spinumkehr. Dieser Prozess ist quantenmechanisch verboten, kann jedoch durch Spin-Bahn-Kopplung mit einem Schweratom in der Umgebung dennoch ablaufen, dann auf einer Zeitskala von  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  s. Das Molekül geht dabei in einen Triplett-Zustand über, dessen Lebensdauer mit  $10^{-6}$ – $10^2$  s sehr lange ist. Dies beruht auf dem Spinverbot für Übergänge zwischen elektronischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität. Aus dem Triplett-Zustand kann nun ein Photon emittiert werden (Phosphoreszenz), was in Lösung allerdings sehr unwahrscheinlich ist und hauptsächlich in Festkörpern vorkommt. Zudem kann nochmals eine Spinumkehr in den hoch schwingungsangeregten  $S_0$ -Zustand stattfinden. Weitere mögliche Wege umfassen die Fluoreszenzlöschung als aktiven Prozess um das Molekül strahlungslos in den Grundzustand zurückzuführen, sowie photochemische Reaktionen aus dem angeregten  $S_1$ -Zustand heraus. Auf die Fluoreszenzlöschung wird später noch ausführlich eingegangen, für photochemische Reaktionen sei z. B. auf ANGELO ALBINI und MAURIZIO FAGNONI verwiesen.<sup>[12]</sup>

Die durchschnittliche Verweildauer des Moleküls bis zur Emission wird als Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  bezeichnet und ist eine molekulare Eigenschaft des Fluorophors. Nach einem kurzen Anregungspuls ist  $\tau$  diejenige Zeit, nach der der Anteil an angeregten Molekülen auf  $1/e$  gesunken ist.

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr}} \quad (1.1)$$

Hier ist  $k_F$  die Emissionsrate,  $k_{nr}$  ist die Summe aller möglichen strahlungslosen Übergangsraten  $k_{nr} = k_{IC} + k_{ISC} + k_Q + k_R$ , wobei  $k_{IC}$  und  $k_{ISC}$  jeweils die Übergangsraten für innere Konversion (IC) und Spinumkehr (ISC, intersystem crossing),  $k_Q$  die Rate der Fluoreszenzlöschung und  $k_R$  die Rate photochemischer Reaktionen aus dem angeregten Zustand sind. Interne Konversion tritt dabei immer auf und bestimmt maßgeblich, ob sich ein Molekül als Fluoreszenzfarbstoff eignet oder nicht. Die Wahrscheinlichkeit für eine Spinumkehr ist stark vom betrachteten Molekül und seiner Umgebung abhängig, da dies ein quantenmechanisch verbotener Übergang ist, der in Anwesenheit von Schweratomen durch Spin-Bahnkopplung dennoch stattfinden kann.

Eine weitere wichtige Kenngröße eines Fluorophors ist seine Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$ . Sie beschreibt den Anteil angeregter Moleküle, die durch Emission eines Photons in den Grundzustand zurück kehren und ist gegeben durch:

$$\Phi_F = \tau k_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} \quad (1.2)$$

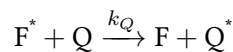
Typischerweise ist die Quantenausbeute  $\Phi \leq 1$ . Sie wird stark von den Umgebungsbedingungen wie Temperatur, pH, Polarität des Lösungsmittels und dessen Fähigkeit, Wasserstoffbrücken auszubilden, beeinflusst. Außerdem beeinflussen Fluoreszenzlöcher die Fluoreszenzlebensdauer. Dabei handelt es sich um Moleküle, die den angeregten Zustand effektiv entvölkern.

### 1.1.1. Fluoreszenzlöschung

Neben den bereits erwähnten intramolekularen Vorgängen nach der Absorption eines Photons soll nun näher auf intermolekulare Interaktionen eingegangen werden, die die Photophysik beeinflussen. Wird dabei die Emissionsrate verringert, spricht man von Fluoreszenzlöschung. Eine Interaktion des angeregten Moleküls mit einem Fluoreszenzlöcher  $Q$  (Quencher) während der Zeitspanne der Fluoreszenzlebensdauer kann in niedrig viskosen Lösungsmitteln diffusionskontrolliert sein, dies wird dann als dynamische Fluoreszenzlöschung bezeichnet. In hoch viskosen Lösungsmitteln ist die Diffusionsgeschwindigkeit so gering, dass dynamische Löschung erst bei sehr hohen Konzentrationen der Löschmoleküle auftritt. Bei weitreichenden Interaktionen, wie dem Förster Resonanzenergietransfer FRET (die Dipol-Dipol-Kopplung wirkt auf einer Längenskala von etwa 80 Å),<sup>[5]</sup> läuft der Prozess nicht diffusionskontrolliert ab, da die Interaktionssphäre im Vergleich zur Diffusionsstrecke während der Fluoreszenzlebensdauer sehr groß ist. Ein Spezialfall der dynamischen Fluoreszenzlöschung tritt ein, wenn die Fluoreszenzlöcher in sehr großem Überschuss vorliegen oder das Lösungsmittel selbst als Quencher wirkt, der Löschprozess ist dann *pseudo*-erster Ordnung.

### Dynamische Fluoreszenzlöschung

Ein Stoß zwischen dem angeregten Fluorophor  $F^*$  und  $Q$  führt zu einem Energieübertrag, wobei  $F^*$  in den Grundzustand zurückkehrt und  $Q^*$  die aufgenommene Energie meist an das Umgebungsmedium abgibt.



Typische Fluoreszenzlöcher sind z. B. Halogenid-Anionen wie  $I^-$ , aber auch molekularer Sauerstoff oder Acrylamid.<sup>[13]</sup> Mechanistisch wird die Fluoreszenz meist durch Spinumkehr gelöscht, da der so entstehende Triplett-Zustand eine lange Lebensdauer besitzt und dieser zudem selbst effektiv durch gelösten molekularen Sauerstoff gelöscht wird. Weitere Mechanismen sind Ladungstransfer

oder ein Elektronenaustausch, im Falle der Löschung durch Halogenid-Ionen sind alle drei Mechanismen denkbar, eine genaue Aussage ist schwer zu treffen.

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  in Anwesenheit der Fluoreszenzlöcher  $Q$  ist gegeben durch

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{nr} + k_Q[Q]} \quad (1.3)$$

mit der bimolekularen Löschkonstante  $k_Q$  und der Konzentration des Fluoreszenzlöschers  $[Q]$ . Aus den Fluoreszenzquantenausbeuten in Abwesenheit und Anwesenheit des Quenchers,  $\Phi_0$  und  $\Phi$ , nach Gleichung 1.2 und 1.3 ergibt sich folgender Ausdruck:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{k_F + k_{nr} + k_Q[Q]}{k_F + k_{nr}} \quad (1.4)$$

Aus Gleichung 1.4 lässt sich nun mit der Fluoreszenzlebensdauer in Abwesenheit der Löschmoleküle  $\tau_0$  (Gl. 1.1) und in Anwesenheit der Löschmoleküle (Gl. 1.5)

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{nr} + k_Q[Q]} \quad (1.5)$$

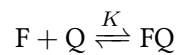
ein Ausdruck herleiten, der als Stern-Volmer-Gleichung der bimolekularen Fluoreszenzlöschung bekannt ist (Gl. 1.6):

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} \propto \frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \frac{k_Q[Q]}{k_F + k_{nr}} = 1 + k_Q\tau_0[Q] \quad (1.6)$$

Hier sind  $F_0$  und  $F$  die Fluoreszenzintensitäten in Abwesenheit und Anwesenheit des Löschmoleküls  $Q$ . Eine Auftragung von  $\frac{F_0}{F}$  gegen die Konzentration  $[Q]$  ergibt eine Gerade, aus deren Steigung die Stern-Volmer-Konstante  $K_{SV} = k_Q\tau_0$  ermittelt werden kann.

### Statische Fluoreszenzlöschung

Die statische Fluoreszenzlöschung hingegen beruht auf der Bildung eines Grundzustandskomplexes, der nicht fluoresziert.



Für die Konzentration an freiem Fluorophor  $[F]$  folgt aus dem Massenwirkungsgesetz mit der Gleichgewichtskonstante  $K$

$$[F] = \frac{[FQ]}{K[Q]} \quad (1.7)$$

Die Gesamtkonzentration  $[F]_0$  des Fluorophor ist gegeben durch:

$$[F]_0 = [F] + [FQ] = [FQ] \left( 1 + \frac{1}{K[Q]} \right) \quad (1.8)$$

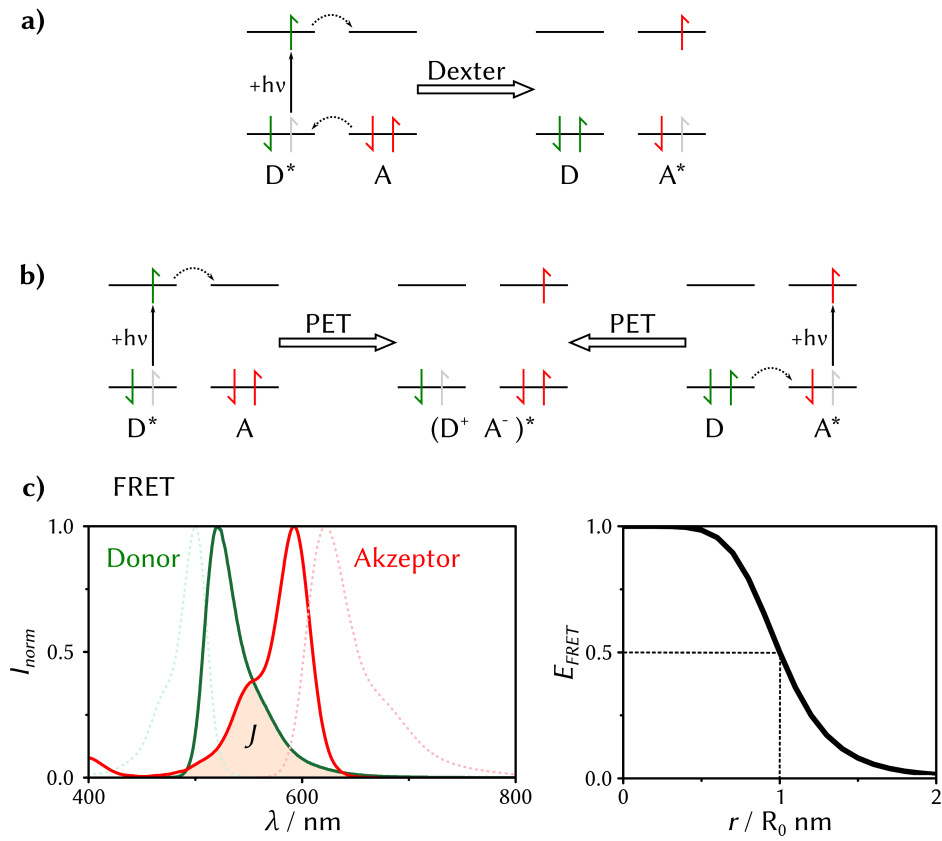
Durch Bildung des Quotienten  $\frac{F_0}{F}$  erhält man unter der Annahme der Proportionalität der gemessenen Intensität zur Konzentration folgenden Ausdruck für die Stern-Volmer-Gleichung 1.9 der statischen Fluoreszenzlöschung:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad (1.9)$$

Da der gebildete Komplex  $[FQ]$  nicht fluoreszent ist, hat die Komplexbildung keinen Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer. Im Gegensatz zur dynamischen Fluoreszenzlöschung ist  $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$ , unabhängig von der Anzahl an Quencher-Molekülen. So lassen sich die beiden Mechanismen durch Messung der Fluoreszenzlebensdauer auseinander halten. Zudem reagieren beide Löschmechanismen unterschiedlich auf eine Temperaturveränderung. Während die dynamische Löschung durch Erhöhung der Temperatur auf Grund erhöhter Diffusionsgeschwindigkeit zunimmt, fällt die statische Löschung bei höheren Temperaturen auf Grund des Zerfalls der meist labilen Komplexe geringer aus.<sup>[13]</sup> Darüber hinaus treten beide Phänomene selten getrennt von einander auf, meist kommt es zu kombinierter Fluoreszenzlöschung. Das äußert sich im Stern-Volmer-Plot, der Auftragung von  $\frac{F_0}{F}$  gegen die Konzentration der Fluoreszenzlöcher  $[Q]$ , durch eine Abweichung von der Linearität. Dieser weist dann eine positive Krümmung auf. Auch eine negative Krümmung des Stern-Volmer-Plots existiert und deutet meist auf zwei Spezies des Fluorophors mit unterschiedlich guter Zugänglichkeit für den Quencher hin, wie es z.B. bei der Löschung der drei Tryptophan-Reste im Protein ENDO-NUCLEASE III durch  $I^-$  auftritt.<sup>[13]</sup>

### Elektronentransferprozesse

Die Fluoreszenzlöschung kann durch Austausch von Elektronen zwischen dem angeregten Fluorophor und einem in der Nähe befindlichen Elektronendonator oder -akzeptor stattfinden. Erfolgt der Elektronenaustausch, wie in Abbildung 1.2a dargestellt, vom angeregten Fluorophor aus auf den Akzeptor, so spricht man vom Dexter-Elektronentransfer.<sup>[14]</sup> Dabei kann der Prozess schrittweise oder konzentriert ablaufen. Da ein direkter Kontakt der beteiligten Orbitale erforderlich ist, findet der Prozess auf einer Längenskala unterhalb von einem Nanometer statt. In



**Abbildung 1.2.:** Fluoreszenzlöschung durch Elektronen- und Energietransfer: (a) Dexter-Elektronentransfer, der sowohl konzertiert als auch schrittweise ablaufen kann. (b) photoinduzierter Elektronentransfer, wobei der Fluorophor sowohl als Donor (links) als auch als Akzeptor (rechts) fungieren kann. Das Ergebnis ist davon unabhängig ein angeregter Komplex (exciplex, von *excited state complex*). (c) Förster-Resonanzenergietransfer, der vom spektralen Überlapp  $J$  des Donor-Emissionsspektrums (grün) und des Akzeptor-Absorptionsspektrums (rot) abhängt. Die Effizienz des Energieübertrags skaliert mit  $\frac{1}{1+r^6}$ , im Abstand des Förster-Radius  $R_0$  liegt die Löscheffizienz bei 50 %.

Lösung bedeutet das in Konsequenz, dass der Quencher eine Konzentration von etwa 1 M aufweisen muss.<sup>[13]</sup>

Des Weiteren existiert der photoinduzierte Elektronentransfer (PET), welcher in Abbildung 1.2b skizziert ist. Hier bildet sich ein Komplex im angeregten Zustand  $(D^+A^-)^*$ , wobei der Fluorophor sowohl als Elektronendonator als auch als

-akzeptor auftreten kann, je nach Redoxpotential von Fluorophor und Quencher. Der angeregte Quencher relaxiert dann entweder unter Emission eines Photons oder aber strahlungslos, was der Regelfall ist. Klassisches Beispiel für Fluoreszenzlöschung durch PET sind chemische Schalter, die substituierte Anilin-Gruppen tragen, wie viele kommerziell erhältliche Sonden für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen (siehe auch Kapitel 1.5).

### Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer

Die bisher beschriebenen Prozesse, die zur Löschung der Fluoreszenz führen, benötigen einen direkten molekularen Kontakt, welcher entweder durch Diffusion oder durch Komplexbildung hergestellt wird. Es existieren aber auch weiter reichende Interaktionen, die zur Löschung der Fluoreszenz führen können, indem die Energie des angeregten Donor-Fluorophors  $D$  strahlungslos durch Dipol-Dipol-Interaktion auf einen geeigneten Akzeptor  $A$  übertragen wird.<sup>[15]</sup> Dabei spielt es keine Rolle, ob der Akzeptor selbst fluoresziert oder die aufgenommene Energie in Form von Wärme abgegeben wird. Dieser als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bekannte Mechanismus ist in Abbildung 1.2c skizziert. Hier fungiert der Fluorophor als Donor  $D$  und überträgt seine Energie strahlungslos an geeignete Akzeptoren  $A$  in der Nähe. Der Prozess ist sehr sensitiv gegenüber des Abstands beider Teilnehmer wie auch deren relative Orientierung.<sup>[5]</sup>

Die Geschwindigkeit des Energieaustauschs  $k_{FRET}$  skaliert in Abhängigkeit des Abstands zwischen Donor und Akzeptor mit  $\frac{1}{r^6}$ , die Reichweite der Wechselwirkung wird durch den Förster-Radius  $R_0$  bestimmt.

$$k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.10)$$

Hier ist  $\tau_D$  die Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Farbstoffs und  $r$  der Donor-Akzeptor-Abstand. Dabei ist  $R_0$  charakteristisch für das Donor-Akzeptor-Paar und hängt vor allem vom spektralen Überlapp  $J$  des Donor-Emissionsspektrums und des Akzeptor-Absorptionsspektrum ab. Dennoch handelt es sich nicht um einen strahlenden Prozess. Stattdessen ist es ein rein elektrodynamischer Vorgang, bei dem der Emissions- und der Absorptionsdipol von Donor und Akzeptor miteinander in Resonanz treten. Der Förster-Radius ist gegeben durch

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 \phi_D}{n^4} J(\lambda) = \frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 \phi_D}{n^4} \int_0^\infty \overline{f_D}(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.11)$$

Weitere Faktoren, die den Förster-Radius beeinflussen, sind die Quantenausbeute  $\phi_D$  des Donorfarbstoffs, der Brechungsindex  $n$  des Mediums zwischen Donor und Akzeptor sowie deren relative räumliche Orientierung, die durch den Faktor  $\kappa^2$  beschrieben wird. Dieser Orientierungsfaktor kann Werte von  $0 \leq \kappa^2 \leq 4$  annehmen. Für frei rotierende Farbstoffmoleküle nimmt er einen Wert von  $\kappa^2 = 2/3$  an. Die Effizienz des Energieübertrags lässt sich nach Gleichung 1.12 berechnen. Im Abstand von  $R_0$  liegt die Effizienz der Energieübertragung  $E_{FRET}$  gerade bei 50 %.

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.12)$$

Die direkte Abstandsabhängigkeit der Effizienz des Energieübertrags  $E_{FRET}$  auf der Nanometer-Skala wird in den Lebenswissenschaften häufig genutzt. Auf Einzelmolekülebene können so auch kleine Änderungen des Abstandes zeitlich verfolgt werden.<sup>[16]</sup> Auch zur Bestimmung von Protein-Konformationen und Protein-Protein-Interaktionen wird FRET häufig genutzt,<sup>[17-20]</sup> zudem basieren einige Biosensoren auf diesem Mechanismus.<sup>[21]</sup>

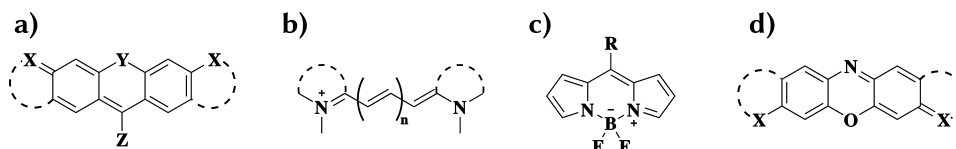
## 1.2. Fluoreszenzfarbstoffe

Da nur wenige Verbindungen in der Natur fluoreszent sind, eignet sich die Fluoreszenz besonders zum Anfärben von Proben in den Lebenswissenschaften (siehe dazu Kapitel 1.4). Dafür existiert eine ganze Bandbreite an verschiedenen Fluorophoren, die sich in Größe, Photostabilität, Photophysik und der Nutzbarkeit in lebenden Zellen unterscheiden.

Genetisch kodierte fluoreszierende Proteine besitzen den Vorteil, dass sie das Zielprotein direkt mit dem Fluorophor markieren, allerdings ist die Photostabilität häufig recht gering und die Proteine sind mit etwa 4 nm relativ groß. Das andere Extrem stellen anorganische Quantenpunkte dar, die eine immens hohe Photostabilität besitzen, etwa 5–50 nm messen, häufig aber eine komplizierte Photophysik besitzen. Organische Fluorophore hingegen sind vergleichsweise klein (etwa 1 nm) und lassen sich meist leicht funktionalisieren, zudem lassen sich die photophysikalischen Eigenschaften gut steuern.

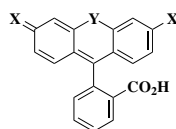
In Abbildung 1.3 sind einige typische organische Farbstoff-Klassen dargestellt, die Xantheme, BODIPYs, Cyanine und Oxazine. In Tabelle 1.1 sind einige Vertreter der Xanthen-Farbstoffe (Abb. 1.3a) mit den entsprechenden Absorptions- und Emissionswellenlängen zusammengefasst. In diese Gruppe fallen weit verbreitete Farbstoffe wie Fluorescein und die Rhodamine. Während Fluorescein (X = O, Y = O) gelb-grünlich fluoresziert führt der Austausch der Gruppe X durch  $\text{NH}_2$





**Abbildung 1.3.:** Grundgerüste einiger organischer Fluoreszenzfarbstoffe: **(a)** Xanthen-Farbstoffe; X = O, NR<sub>2</sub>; Y = O, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; Z = H, Alkyl, (subst.) Phenyl. **(b)** Cyanin-Farbstoffe. **(c)** BODIPY-Farbstoffe (Bor-Dipyrrromethan); R = Alkyl, subst. Phenyl. **(d)** Oxazin-Farbstoffe; X = O, N.

**Tabelle 1.1.:** Einfluss der Substitution von Xanthen-Farbstoffen auf die Absorptions- und Emissionswellenlänge.



Farbstoff	X	Y	$\lambda_{abs}$ / nm	$\lambda_{em}$ / nm
Fluorescein <sup>a</sup>	O	O	492	518
Rhodamin 123 <sup>a</sup>	NH <sub>2</sub>	O	512	531
Tetramethylrhodamin <sup>a</sup>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	O	540	565
Carborhodamin <sup>b</sup>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	609	635
Siliziumrhodamin <sup>b</sup>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	645	661

<sup>a</sup> Die spektralen Daten gelten für Lösungen in PBS pH 7.4 und sind der Webseite <http://www.fluorophores.org> entnommen.

<sup>b</sup> Quelle der spektralen Daten sind interne Informationen der Firma *Atto-Tec*.

(Rhodamin 123) zu einer spektralen Verschiebung um 20 nm ins Gelbe. Substitution der Protonen an den Stickstoffen durch Methylgruppen (Tetramethylrhodamin, TMR) führt zu gelb-oranger Fluoreszenz. Ein Austausch der Gruppe Y hat einen deutlich größeren Einfluss: ein Carborhodamin mit Y = C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> fluoresziert orange-rot, ein Siliziumrhodamin mit Y = Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ist rot fluoreszierend.<sup>[22–25]</sup> Zudem führt eine Überbrückung der Reste an den Stickstoffatomen zu einer erhöhten Quantenausbeute, da Schwingungs- und Rotationsfreiheitsgrade eingeschränkt werden, die sonst zur strahlungslosen Relaxation beitragen.<sup>[26]</sup> Sind die Reste mit dem  $\pi$ -Elektronensystem konjugiert, erfolgt eine rotverschobene Emission.

Weitere Farbstoffklassen wie die BODIPYs (Bor-Dipyrromethane), die Cyanin-Farbstoffe und die Oxazine sind in Abbildung 1.3b-d dargestellt. Auch hier lassen sich die spektralen Eigenschaften durch Substitution und Vergrößerung des  $\pi$ -Elektronensystems beeinflussen, um so Quantenausbeuten von über 80% und eine Emission im sichtbaren Bereich oder nahen IR (500–700 nm) zu erzielen. Bei geeigneter Wahl der Substituenten lassen sich auch fluorogene Farbstoffe erzeugen, die erst nach Konjugation an ihren Gegenpart fluoreszieren. Beispielsweise zeigten RALPH WEISSELEDER und Mitarbeiter einen bis zu 1600-fachen Fluoreszenzanstieg an Tetrazin-modifizierten BODIPY-Farbstoffen nach Click-Reaktion des Tetrazins mit (*S*)(*E*)-Cyclooct-4-enol.<sup>[27]</sup>

Ebenfalls fluorogen sind Siliziumrhodamine (Abb. 1.3a) mit  $X = N(CH_3)_2$ ,  $Y = Si(CH_3)_2$ ,  $Z = 2,4$ -Dicarboxyphenyl), deren  $\pi$ -System durch intramolekulare Spirolacton-Bildung unterbrochen werden kann (vergleiche dazu auch Abb. 1.9a). Die geschlossene, nicht fluoreszierende Spiro-Form liegt bevorzugt in wässriger Lösung vor. Nach Konjugation an ein Biomolekül liegt durch die veränderte lokale Dielektrizitätskonstante bevorzugt die offene, fluoreszente Form vor.<sup>[28]</sup>

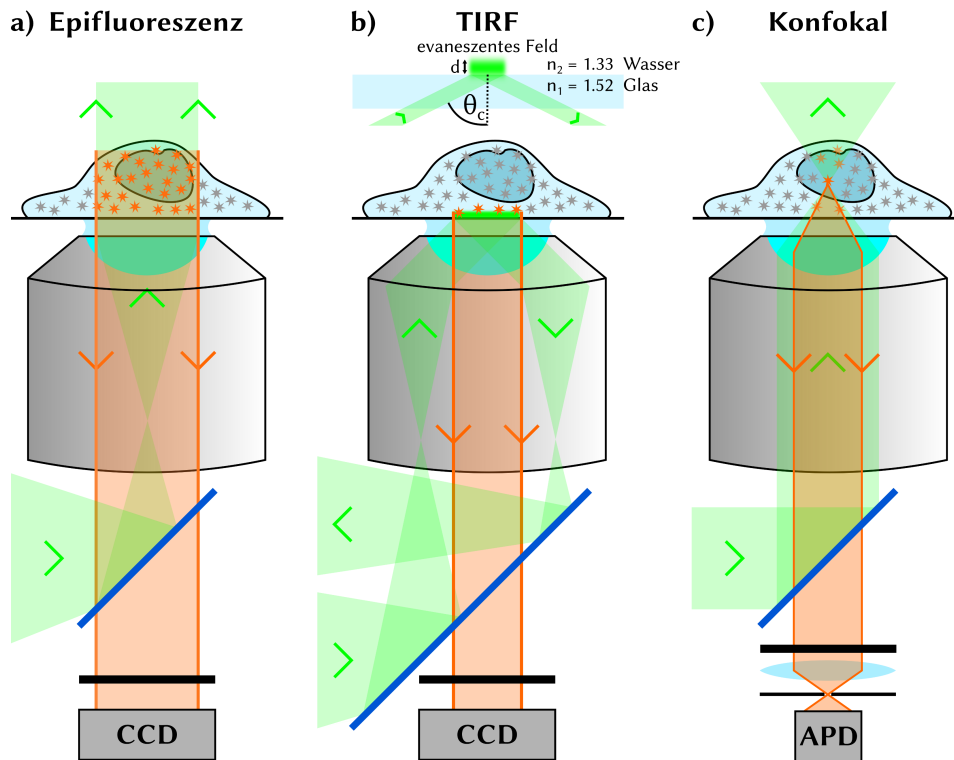
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluoreszenzfarbstoffe der Firma *Atto-Tec* verwendet, welche in die Kategorie der Rhodamine (Atto488, Atto565, Atto590)<sup>1</sup>, der Carborhodamine (Atto646N)<sup>[29,30]</sup> sowie der Oxazine (Atto655)<sup>1</sup> fallen. Zu Atto542 und Atto633 sind keine Angaben zur Farbstoffklasse veröffentlicht.

### 1.3. Fluoreszenzmikroskopie an und unterhalb der Beugungsgrenze

Das Phänomen der Fluoreszenz spielt in den Lebenswissenschaften eine entscheidende Rolle, da es in der Mikroskopie einzigartigen Kontrast und Selektivität ermöglicht. Die spezifische Detektion von Tumorgewebe,<sup>[32,33]</sup> die auch live während einer Operation erfolgen kann,<sup>[34]</sup> ist nur eine der zahlreichen Anwendungen. Auch in der Grundlagenforschung in Biologie, Biophysik und den angrenzenden Forschungsgebieten der Lebenswissenschaften ist die Fluoreszenzmikroskopie ein nicht wegzudenkendes Werkzeug.

Der Großteil aller Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie-Techniken, sowohl lange bestehende als auch neu entwickelte, lassen sich in eine der drei in Abbildung 1.4 dargestellten Kategorien einordnen. Die dargestellten Techniken basieren allesamt auf invertierten Mikroskopen, bei denen das Objektiv unterhalb der Probe angebracht ist und die Betrachtung durch ein Deckglas hindurch erfolgt. Bei Verwendung qualitativ hochwertiger Objektive mit hoher numerischer Apertur befindet sich (meist) ein Immersionsmedium zwischen Objektiv und Deckglas. Beim

<sup>1</sup>Quelle der Informationen ist die Webseite des Herstellers, <http://www.atto-tec.de>.



**Abbildung 1.4.:** Vergleich verschiedener Mikroskopietechniken: Vereinfachter schematischer Strahlengang (a) im Epifluoreszenz-Mikroskop, (b) im TIRF-Mikroskop und (c) im konfokalen Mikroskop. Grün dargestellt ist jeweils das Anregungslicht, in rot ist das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht gekennzeichnet. In dunkelblau sind die dichroitischen Spiegel zur Einkopplung des Anregungslichts dargestellt. CCD engl. *charge coupled device*, APD engl. *avalanche photo diode*. Adaptiert nach PARK *et al.*<sup>[31]</sup>

Epifluoreszenzmikroskop, wie in Abbildung 1.4a dargestellt, erfolgt die Fluoreszenzanregung durch das Objektiv hindurch. Die Lichtquelle kann eine Quecksilberdampfampe, eine Halogenlampe, eine LED oder auch ein Laser sein. Sie wird durch einen dichroitischen Strahlteiler in das Objektiv eingekoppelt und ist auf die hintere Brennebene des Objektivs (engl. *back focal plane*) fokussiert. Dadurch tritt das Licht kollimiert aus dem Objektiv aus und durchleuchtet die gesamte Probe. Das Objektiv sammelt daher auftretendes Fluoreszenzlicht aus allen Schichten, welches den Strahlteiler passiert, durch geeignete Filter aufbereitet und mit einer Kamera detektiert wird.

Im Gegensatz dazu steht die interne Totalreflexionsfluoreszenz-Mikroskopie (TIRF), die in Abbildung 1.4b dargestellt ist, und nur eine sehr dünne Schicht der Probe direkt oberhalb des Deckglases abbildet. Die Anregung erfolgt mit Laserlicht, welches auf die hintere Brennebene fokussiert ist, das Objektiv aber versetzt zur optischen Achse trifft. Bei Verwendung von speziellen TIRF-Objektiven mit sehr hoher numerischer Apertur ( $NA$ , ein Maß für die Fähigkeit des Objektivs, Licht zu sammeln) tritt das Laserlicht in einem flachen Winkel aus dem Objektiv aus und trifft die Grenzfläche Deckglas-Probe in einem Winkel größer dem kritischen Winkel  $\theta_c$ , sodass Totalreflexion stattfindet (siehe Abb. 1.4b oben). Der kritische Winkel ist abhängig von den Brechungsindizes der beiden Medien (siehe Gl. 1.13) und beträgt bei Verwendung von Glas ( $n_1 = 1.52$ ) und Wasser ( $n_2 = 1.33$ ) etwa  $61^\circ$ . Daraus ergibt sich für solch ein TIRF-Objektiv nach  $NA = n \sin(\theta)$  eine minimale numerische Apertur von 1.38.

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (1.13)$$

Die quantenmechanische Natur des Lichts führt zur Ausbildung eines evaneszenten Feldes, das in die Probe eindringt. Seine Intensität nimmt nach Gleichung 1.14 exponentiell mit der Eindringtiefe ab, in einer Tiefe  $d$  (Gl. 1.15) ist sie auf den Faktor  $\frac{1}{e}$  abgeklungen.

$$I(z) = I_0 \exp\left(-\frac{z}{d}\right) \quad (1.14)$$

$$d = \frac{\lambda_i}{4\pi n_1 \sqrt{\sin^2(\theta_i) - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (1.15)$$

Hier sind  $n_1$  und  $n_2$  die Brechungsindizes des optisch dünneren bzw. dickeren Mediums und  $\theta_i$  der Einfallswinkel des Anregungslichts der Wellenlänge  $\lambda_i$  in Bezug auf die Oberflächennormale (wie in Abb. 1.4b oben dargestellt). Die Eindringtiefe liegt für Licht von 561 nm unter Verwendung eines Objektivs mit  $NA = 1.49$  mit einem Einstrahlwinkel von  $70^\circ$  an einer Glas/Wasser-Grenzfläche ( $n_1 = 1.52$ ,  $n_2 = 1.33$ ) bei 173 nm, daher werden hier nur Objekte abgebildet, die sich direkt oberhalb der Grenzfläche befinden. Im Vergleich zum Epifluoreszenzmikroskop besitzt das TIRF-Mikroskop ein deutlich besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis. Die Detektion erfolgt bei der TIRF-Mikroskopie auch mittels einer Kamera.

Die dritte in Abbildung 1.4c dargestellte Mikroskopietechnik ist die konfokale Mikroskopie. Hier wird ein kollimierter Laserstrahl in das Objektiv eingekoppelt, wodurch dieser fokussiert aus dem Objektiv austritt. Am Fokuspunkt hat dieser eine beugungs begrenzte laterale Ausdehnung mit einem Durchmesser von etwa

300 nm. Da die Fluoreszenzanregung proportional zur Intensität des eingestrah-  
 lten Lichts ist, stammt der Hauptteil der Fluoreszenz aus dem Fokuspunkt. Zusätz-  
 lich erfolgt die Detektion durch eine Lochblende, welche von außerhalb des Fokus-  
 punktes stammendes Fluoreszenzlicht ausblendet. Dadurch erreicht das Konfokal-  
 mikroskop im Vergleich zum Epifluoreszenzmikroskop sowohl lateral als auch axi-  
 al eine leicht verbesserte Auflösung (siehe auch Tabelle 1.2). Außerdem lässt sich  
 die axiale Position des Fokus variieren, weshalb man mit einem Konfokalmikro-  
 skop optische Schnitte einer Probe anfertigen kann. Da Fluoreszenz nur in einem  
 Punkt generiert wird, muss die Probe mit dem Laser abgerastert werden. Das ge-  
 schieht entweder durch bewegen der Probe oder durch einen Strahlscanner. Zur  
 Detektion kommt hier ein Punktdetektor, eine sogenannte Lawinenphotodiode  
 (APD), zum Einsatz.

### Die Beugungsgrenze

Alle bisher vorgestellten Mikroskopiertechniken unterliegen der fundamentalen  
 Auflösungsgrenze durch Beugung. Dies wurde von ERNST ABBE im Jahre 1873  
 entdeckt und hat bis Heute seine Gültigkeit. Nach ABBE sind im Durchlichtmi-  
 kroskop (bei Betrachtung durch ein Objektiv mit  $NA = n \sin(\theta)$ ) zwei Linien  
 nicht mehr voneinander zu unterscheiden, wenn sie den Minimalabstand  $d_{min}$   
 unterschreiten.

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2n \sin(\theta)} \quad (1.16)$$

Für die Fluoreszenzmikroskopie mit selbstleuchtenden Objekten lässt sich die  
 Auflösungsgrenze nach dem Rayleigh-Kriterium beschreiben, die auf LORD RAY-  
 LEIGH (JOHN WILLIAM STRUTT) zurückgeht.<sup>[35]</sup> Die laterale Auflösung in der Bil-  
 debene ist gegeben durch Gleichung 1.17:

$$d_{lateral} = 0.61 \frac{\lambda}{n_1 \sin(\theta)} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (1.17)$$

Die axiale Auflösung entlang der optischen Achse berechnet sich nach Gleichung  
 1.18.

$$d_{axial} = \frac{2\lambda n_1}{NA^2} \quad (1.18)$$

Praktisch führt das für einen Fluoreszenzfarbstoff wie Atto565 mit dem Emissions-  
 maximum bei 592 nm zu einer lateralen Auflösung von  $d_{lateral} \approx 242$  nm, für  
 einen Farbstoff wie Atto647N mit Emissionsmaximum bei 664 nm zu  $d_{lateral} \approx$   
 272 nm. In axialer Richtung ergeben sich entsprechende Auflösungen von 809 nm

bzw. 908 nm.

### Aberrationen<sup>[36]</sup>

Beim Abbilden durch ein optisches System werden immer auch Aberrationen eingeführt, da keine Linse zu einhundert Prozent perfekt ist. Die wichtigsten Aberrationen sind sphärische und chromatische Aberrationen sowie Astigmatismus. Bei der sphärischen Aberration werden achsferne Strahlen in einem anderen Brennpunkt gesammelt als achснаhe Strahlen. Chromatische Aberration führt dazu, dass es zu einer wellenlängenabhängigen Verschiebung des Brennpunktes kommt. Astigmatismus tritt auf, wenn Licht nicht senkrecht auf eine Linse fällt, es wird dann nicht mehr in einem Punkt gesammelt sondern entlang einer Linie. All diese Aberrationen lassen sich durch Verwendung hochwertiger Linsen und exakte Justage des optischen Strahlengangs verringern, aber nie vollständig beseitigen. Gerade die chromatische Aberration spielt in der Mehrfarbenmikroskopie eine entscheidende Rolle, da hier ortsbezogene Korrelationen verschiedener Strukturen hergestellt werden sollen. Trotz Verwendung speziell Farbfehler-korrigierter, sogenannter *apochromatischer*, Objektive treten chromatische Aberrationen immer auf und müssen nachträglich mathematisch korrigiert werden.

**Tabelle 1.2.:** Vergleich einiger Fluoreszenzmikroskopie- und Hochauflösungstechniken und deren typischen lateralen und axialen Auflösungen  $d_{lat/ax}$ , bezogen auf rotes Fluoreszenzlicht bei 650 nm und Immersions-Objektive mit hoher numerischer Apertur.

Technik	Beschreibung	$d_{lat/ax}$ / nm
Weitfeld	Beleuchtung der kompletten Probe mit beliebiger Lichtquelle; Detektion mittels Kamera; Hintergrund aus Ebenen über und unter der Fokusebene	~300/800
Konfokal	Beleuchtung mit fokussiertem Laserlicht; Detektion mittels Punktdetektor und Abrastern der Probe; Detektion durch Lochblende, dadurch gutes Ausblenden von Fluoreszenz außerhalb des Fokus	~150/500

Technik	Beschreibung	$d_{lat/ax}$ / nm
4Pi	Konfokales Mikroskop mit zwei gegenüberliegend platzierten Objektiven; kohärente Beleuchtung mit Laserlicht durch beide Objektive; annähernd isotrope Auflösung	~150/150
TIRF	Beleuchtung mit Laserlicht; Totalreflexion an Probengrenzfläche, wodurch ein evaneszentes Feld entsteht, dadurch gute axiale Auflösung; Detektion mittels Kamera	~300/150
SPIM	Beleuchtung mit einer Lichtscheibe senkrecht zur Detektionsebene; Detektion mittels Kamera; durch Sektionierung 3D-fähig; reduziertes Photobleichen außerhalb der Fokusebene; kombinierbar mit Lokalisationsmethoden zur Verbesserung der lateralen Auflösung	~300/500 [37] 63/140 <sup>[38]</sup>
STORM	Stochastisches licht-getriebenes Schalten von organischen Farbstoffen (ursprünglich ein Paar aus Cy3 und Cy5), um pro Zeiteinheit nur einzelne Emitter abbilden und lokalisieren zu können; Rekonstruktion der Struktur nach Aufnahme von mehreren 10.000 Bildern; Möglichkeit der isotropen Auflösung z. B. durch Verwendung von Astigmatismus	< 10/20 <sup>[39]</sup>
(F)PALM	Stochastische Photoaktivierung von fluoreszierenden Proteinen; meist Kombination aus Abbilden und Photobleichen; Rekonstruktion der Struktur aus mehreren 10.000 Bildern; Möglichkeit der isotropen Auflösung	~30/75 <sup>[40]</sup>
dSTORM	Eine Variante von STORM, die käuflich erhältliche Farbstoffe durch spezielle Puffersysteme licht-getrieben schaltet	~21/150 [41] ~45/150 [42]

Technik	Beschreibung	$d_{lat/ax}$ / nm
CHIRON	Lokalisationsmethode, die chemische induziertes Blinken von Farbstoffen ausnutzt; reversible Bindung von $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen an Fluoreszenzsonde führt zu Fluoreszenzlöschung; benötigt keine besondere Hardware, daher kompatibel mit vielen Mikroskopietechniken	~80/150 [43,44]
PAINT	Weitfeldmethode; Transiente Bindung eines Markers an eine Zielstruktur, wodurch dieser lokalisiert werden kann; viele Dissoziations-Assoziationszyklen, kein Problem mit Photobleichen; kombinierbar mit SPIM	~45/104 [45]
STED	Anregung durch Laserlicht; zweite Lichtquelle mit geformtem Profil zur licht-getriebenen Verkleinerung des Anregungsvolumens durch stimulierte Emission; Detektion mittels Punktdetektor,; Abrastern der Probe; Parallelisierung möglich	~34/700 ~35/90 <sup>[46]</sup>

### 1.3.1. Hochauflösende Mikroskopie<sup>[47,48]</sup>

Da sich alle molekularen Prozesse im Größenbereich deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze abspielen, sind die Methoden zur Umgehung dieser Grenze in den Lebenswissenschaften mittlerweile weit verbreitet.<sup>[49,50]</sup> In Tabelle 1.2 werden einige der gängigsten Methoden kurz beschrieben. Darauf soll nun im Folgenden näher eingegangen werden.

Hochauflösende optische Mikroskopie lässt sich in drei Teilbereiche untergliedern: die wahren hoch auflösenden Techniken, die deterministischen und die stochastischen Methoden. Prominentestes Beispiel echter hoch auflösender Mikroskopie ist die 4Pi-Mikroskopie, aber auch alle Nahfeldmethoden (hier ist der Abstand einer mikroskopischen Apertur kleiner als die Betrachtungswellenlänge) zählen hierzu.<sup>[51]</sup> Außerdem gehören alle Methoden mit strukturierter Beleuchtung wie SIM (engl. *structured illumination microscopy*) in diese Kategorie.<sup>[52,53]</sup> Aus der Reihe der deterministischen Methoden hat sich die STED-Mikroskopie nicht erst durch die Verleihung der Chemie-Nobelpreises 2014 etabliert. Die stochastischen Lokalisationsmethoden STORM und PALM sind ähnlich weit verbreitet, in diese Kategorie fällt auch die im Arbeitskreis HERTEN entwickelte Methode CHIRON, die im Rahmen dieser Arbeit weiter entwickelt wurde (siehe auch Kapitel 1.5.1).<sup>[43]</sup> Stochastische Fluktuationen macht sich auch die Methode SOFI



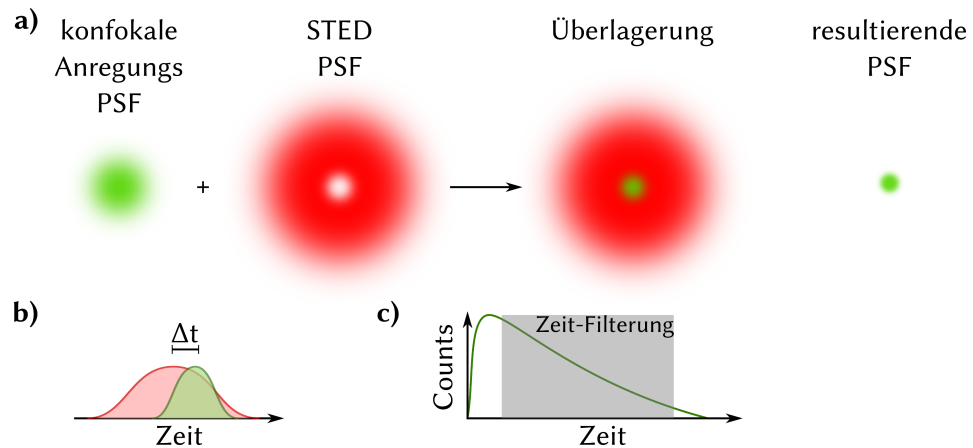
(engl. *super-resolution optical fluctuation imaging*) zu Nutzen. Dabei werden auf mathematischem Wege korrelierte Signalfluktuationen von unkorreliertem Hintergrund getrennt, die Auflösung ist typischerweise zwei- bis dreifach höher als im beugungsbegrenzten Fall.<sup>[54,55]</sup> Im Vergleich zu Lokalisationsmethoden wie STORM lässt SOFI eine deutlich höhere Markierungsdichte zu, da die Methode auch mit räumlich überlappenden Emittlern zurecht kommt.<sup>[56]</sup>

### STED-Mikroskopie<sup>[46,57,58]</sup>

Grundlage der STED-Mikroskopie ist die gezielte Präparation von Fluorophoren in zwei Zuständen, einem fluoreszierenden An-Zustand und einem nicht fluoreszierenden Aus-Zustand. Dazu bedient man sich des Phänomens der stimulierten Emission, welches auf der bosonischen Natur von Photonen beruht, um angeregte Fluorophore gezielt zurück in den Grundzustand zu bringen. Ein STED-Mikroskop basiert auf einem herkömmlichen konfokalen Mikroskop, in dem neben dem Anregungslaser noch ein zweiter, rotverschobener Laser eingesetzt wird. In Abbildung 1.5a sind die lateralen Profile der beiden Laserquellen dargestellt. Der beugungsbegrenzte Anregungslaser wird präzise mit dem STED-Laser überlagert, der durch eine spezielle Phasenplatte eine „Donut“-Form mit zentraler Intensitäts-Nullstelle aufweist. Die Wellenlänge des STED-Lasers ist so gewählt, dass sie nicht zur Anregung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe führt, wohl aber mit dem Emissionsspektrum überlappt und so stimulierte Emission erzeugen kann. Im ausgesparten Zentrum der Anregung bleiben die Fluorophore hingegen im angeregten Zustand. Je höher die Intensität des STED-Lasers ist, desto größer ist der Anteil an stimulierter Emission und desto kleiner wird die resultierende Punktbildfunktion (PFS, engl. *point spread function*), aus der die Emission erfolgt. Die Auflösungsgrenze  $d_{min}$  enthält demnach einen Term, der von der STED-Intensität abhängt, wobei  $I_{sat}$  die Intensität ist, bei der die Fluoreszenz auf einen Faktor  $1/e$  reduziert ist.<sup>[59]</sup>

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2n \sin(\theta) \sqrt{1 + \frac{I_{STED}}{I_{sat}}}} \quad (1.19)$$

Die zeitliche Abfolge von STED- und Anregungspuls, wie in Abbildung 1.5b dargestellt, garantiert eine effektive und möglichst vollständige stimulierte Emission direkt nach der Anregung. Zusätzlich kann das detektierte Signal noch durch Anwendung eines Zeitfilters von stimuliert emittierten Photonen bereinigt werden, was die Auflösung nochmals verbessert (gated-STED).<sup>[60,61]</sup> Bisweilen wird statt eines gepulsten STED-Lasers auch ein Dauerstrichlaser eingesetzt und nur gepulst angeregt (cw-STED).<sup>[62]</sup>



**Abbildung 1.5.:** Prinzip der STED-Mikroskopie: (a) die konfokale Anregungs-PSF (Punktbildfunktion von engl. *point spread function*) wird mit einer Donutförmigen STED-PSF überlagert. Dadurch kommt es zu stimulierter Emission im Randbereich der Anregungs-PSF, was zu einer verkleinerten, effektiven PSF führt. (b) Typisches Pulsschema von Anregungs- und STED-Laser. Der leichte Versatz  $\Delta t$  sorgt für eine effektive stimulierte Emission. (c) Durch zeitkorrelierte Einzelphotonendetektion lässt sich das detektierte Signal nachträglich durch Anlegen eines Zeit-Filters optimieren, um die direkt nach dem Anregungspuls stimulierte emittierten Photonen auszublenden und nur das zeitlich versetzte Signal aus der resultierenden PSF zu verarbeiten.

Es sei angemerkt, dass der klassische STED-Ansatz nur die laterale Auflösung relevant beeinflusst, die axiale Auflösung entspricht der eines konfokalen Mikroskops. Abhilfe schaffen hier entsprechende Phasenplatten oder z. B. die Kombination von STED- und 4Pi-Mikroskopie.<sup>[63]</sup> Zur Verringerung der Messzeit wurden zudem parallelisierte STED-Ansätze mit vier oder mehr fokalen Volumina entwickelt.<sup>[64,65]</sup> Auch Mehrfarbenanwendungen wurden bereits demonstriert.<sup>[59]</sup> Die typische Auflösung liegt im Bereich von 20–30 nm und ist stark von der Helligkeit und Photostabilität der verwendeten Fluorophore abhängig. So wurden an extrem photostabilen Diamantfehlstellen Auflösungen von bis zu 2.4 nm erreicht.<sup>[66]</sup>

### Lokalisation einzelner Moleküle

Im Gegensatz zu der deterministischen STED-Mikroskopie, bei der der Ursprung der emittierten Fluoreszenz genau vorbestimmt ist, arbeiten Lokalisationsmikroskopietechniken stochastisch.<sup>[67]</sup> Auch hier werden Fluorophore in zwei Zustän-

den präpariert, jedoch statistisch Verteilt über das gesamte Gesichtsfeld der Kamera, die hier zur Detektion verwendet wird. Jegliche Farbstoffe, die sich stochastisch schalten lassen, sind prinzipiell für Lokalisationsansätze geeignet. Historisch haben sich zwei Methoden entwickelt, die unterschiedliche Farbstoffe anwenden: STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) basiert auf organische Farbstoffe, die durch Laserbestrahlung in einen langlebigen Dunkelzustand getrieben und stochastisch mit einem Aktivierungslaser in den fluoreszierenden Zustand zurückgeholt werden. PALM und FPALM hingegen (engl. *photo activated localization microscopy* bzw. *fluorescence photo-activation localization microscopy*) setzen auf photoaktivierbare oder photoschaltbare fluoreszierende Proteine, die stochastisch durch einen Aktivierungspuls in den An-Zustand geschaltet, abgebildet und photozerstört werden. Alle drei Methoden wurden zeitnah im Jahr 2006 publiziert: STORM von XIAOWEI ZHUANG und Mitarbeitern in Harvard,<sup>[68]</sup> PALM in der Arbeitsgruppe von ERIC BETZIG am Janelia Farm Research Campus,<sup>[69]</sup> und FPALM von einer Gruppe um SAMUEL T. HESS an der University of Maine.<sup>[70]</sup>

Mittlerweile sind diese Techniken in den Lebenswissenschaften weit verbreitet.<sup>[71]</sup> STORM findet u. a. in der korrelativen Licht- und Elektronenmikroskopie Einsatz,<sup>[72, 73]</sup> es wurden ganze Verbände von Neuronen aus Mäusehirnen in hoher Auflösung vermessen,<sup>[74]</sup> auch spektral aufgelöste Lokalisationsmikroskopie wurde demonstriert.<sup>[75]</sup> Ebenso verbreitet ist PALM, durch die genetische Einführung der fluoreszierenden Proteine wird diese Technik häufig in lebenden Zellen eingesetzt, um z. B. die Dynamik von Aktin in Dendriten zu untersuchen.<sup>[76]</sup>

Eine weitere, mit vielen käuflich erhältlichen Farbstoffen kompatible, Methode ist das von Markus Sauer und Mitarbeitern 2008 veröffentlichte direct-STORM (dSTORM),<sup>[41]</sup> was mittlerweile ebenso wie STORM und PALM weit verbreitet ist.<sup>[42, 77–81]</sup> Die Lokalisation von transient bindenden Molekülen wird bei PAINT (engl. *point accumulation for imaging in nanoscale topography*) verwendet, hier können einfach großflächige Strukturen wie Membranen oder die DNA im Zellkern abgebildet werden.<sup>[24]</sup> Auch STB (engl. *superresolution by transient binding*) verwendet die transiente Bindung, hier von kurzen Farbstoff-markierten Oligonukleotiden an DNA-Origami.<sup>[82]</sup> Die Verbindung von Lokalisationstechniken mit der Lichtscheibenmikroskopie SPIM (engl. *selective plane illumination microscopy*) ermöglicht eine 3D-Hochauflösung auch in dickeren Proben wie z. B. in Drosophila Embryonen,<sup>[38, 83]</sup> in Kombination mit der 4Pi-Mikroskopie wurde eine isotrope Auflösung von 10–20 nm in bis zu 10 µm dicken Proben erreicht.<sup>[84]</sup>

Unabhängig von der Herangehensweise erfolgt in der Lokalisationsmikroskopie nach der Datenaufnahme eine Nachbearbeitung, in der die Punktabbildungsfunktionen der einzelnen Moleküle gesucht und mit einer geeigneten Funktion angepasst werden. In Abbildung 1.6a ist der Schnitt durch ein Beugungsscheibchen (schwarz) dargestellt, mit der sich die Intensitätsverteilung des Bildes eines

Punktemitters beschreiben lässt. Diese wird in der Lokalisationsmikroskopie näherungsweise durch eine Gauß-Funktion angepasst (rot), welche das zentrale Maximum gut beschreibt und mit der sich der Schwerpunkt der Intensitätsverteilung gut bestimmen lässt. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 1.6b die tatsächliche detektierte Intensitätsverteilung eines Punktemitters dargestellt.

In Abbildung 1.6c ist eine dicht markierte Struktur skizziert, die im Epifluoreszenzmikroskop nicht aufgelöst werden kann. Durch stochastische Aufnahme einzelner Emitter und deren genauer Lokalisation kann ein Bild rekonstruiert werden, das eine deutlich bessere Auflösung besitzt. Typischerweise werden Aufnahmen mit mehreren zehntausend Bildern angefertigt, in jedem Bild werden einzelne Emitter gesucht und ihre Position bestimmt, und aus der Summe aller Lokalisationen wird dann das hoch auflösende Bild generiert.

Die Präzision einer Lokalisation lässt sich durch Gleichung 1.20 beschreiben (eine ausführliche Behandlung des Themas erfolgt z. B. durch KEVIN BRAECKMANS *et al.*).<sup>[85]</sup>

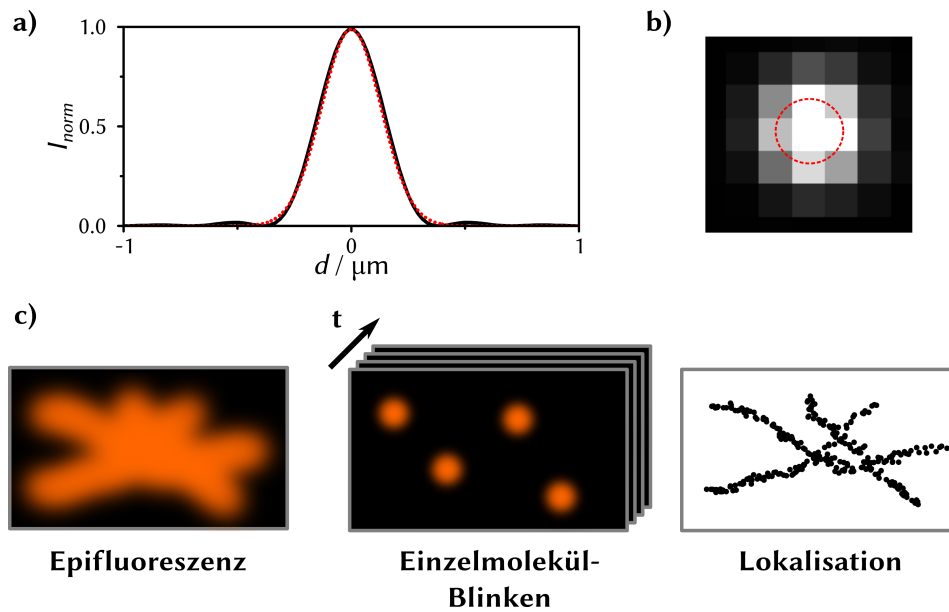
$$\sigma_{x,y} \geq \sqrt{\frac{s_{x,y}^2}{N} + \frac{a^2}{12N} + \frac{8\pi s_{x,y}^4 b^2}{a^2 N^2}} \quad (1.20)$$

wobei  $s_{x,y}$  die Standardabweichung der Gauß-Verteilung in x- und y-Richtung,  $N$  die Anzahl an detektierten Photonen,  $a$  die Pixelgröße des Detektors und  $b$  die Varianz des Hintergrundes (Hintergrundfluoreszenz und Detektorrauschen) ist. Bei ausreichend hohem Signal-Hintergrund-Verhältnis muss in guter Näherung lediglich das Poissonsche Schrotrauschen (engl. *shot noise*) betrachtet werden, womit sich der Ausdruck zu Gleichung 1.21 vereinfacht.<sup>[85,86]</sup>

$$\sigma_{x,y} \approx \frac{s_{x,y}}{\sqrt{N}} \quad (1.21)$$

Wird ein Molekül also in mehreren aufeinanderfolgenden Bildern erkannt und alle detektierten Photonen aufaddiert, kann so eine deutlich höhere Lokalisationsgenauigkeit erreicht werden. Eine in Mikroskopiebildern auch häufig bestimmte Größe ist die Halbwertsbreite (FWHM, engl. *full width at half maximum*), die mit der Standardabweichung über  $FWHM = 2\sqrt{2 \ln(2)}\sigma$  zusammenhängt.

Wird eine besonders dichte Struktur betrachtet, für die zudem eine hohe Auflösung benötigt wird, geraten die Lokalisationsmethoden schnell an ihre Grenzen. Nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem muss ein Signal mindestens mit seiner doppelten Frequenz abgetastet werden um eindeutig bestimmt werden zu können. Übertragen auf die Lokalisationsmikroskopie bedeutet das, dass zur Rekonstruktion einer dichten dreidimensionalen Struktur mit einer Auflösung von 20 nm bis zu 37.500 einzelne Moleküle in einem beugungsbegrenzten Voxel von



**Abbildung 1.6.:** Prinzip der Lokalisationsmikroskopie: (a) Laterale beugungsbe-  
grenzte Intensitätsverteilung, die sich mit der Bessel-Funktion erster Ordnung  
beschreiben lässt (schwarz) und sowie die häufig zur Anpassung verwendete  
Gauß'sche Normalverteilung, die das Hauptmaximum gut nachbildet (rot) (b)  
Mikroskopisches Abbild eines Punktemitters auf einem Detektor mit einer Pi-  
xelgröße von 105 nm. In rot eingezeichnet ist in etwa die Halbwertsbreite. (c)  
Eine dicht markierte nanoskopische Struktur wird im Mikroskop beugungsbe-  
grenzt mit einer lateralen Auflösung von etwa der halben Betrachtungswellen-  
länge abgebildet (links). Besitzt man die Kontrolle über die Fluoreszenzfarbstof-  
fe können pro Zeiteinheit einzelne Farbstoffe räumlich getrennt voneinander  
abgebildet werden. Wiederholt man diesen Prozess lange genug, werden durch  
die stochastische Natur des Schaltprozesses alle Farbstoff mindestens einmal  
abgebildet (mitte). Ein Algorithmus findet in den Einzelbildern die genaue Posi-  
tion der abgebildeten Farbstoffe und rekonstruiert so die tatsächliche Struktur  
(rechts).

250x250x600 nm lokalisiert werden müssten.<sup>[24]</sup> Dies ist sowohl im Hinblick auf  
die erreichbare Markierungsdichte als auch bezüglich der Schalteffizienz proble-  
matisch, da hier ein Verhältnis von An- zu Auszustand von mindestens 1:37 500  
erreicht werden muss, damit es nicht zu Überlappungen mehrerer Punktabbil-  
dungsfunktionen kommt. In der Praxis muss dieser Wert sogar noch deutlich hö-  
her ausfallen

## Dreidimensionale Mikroskopie

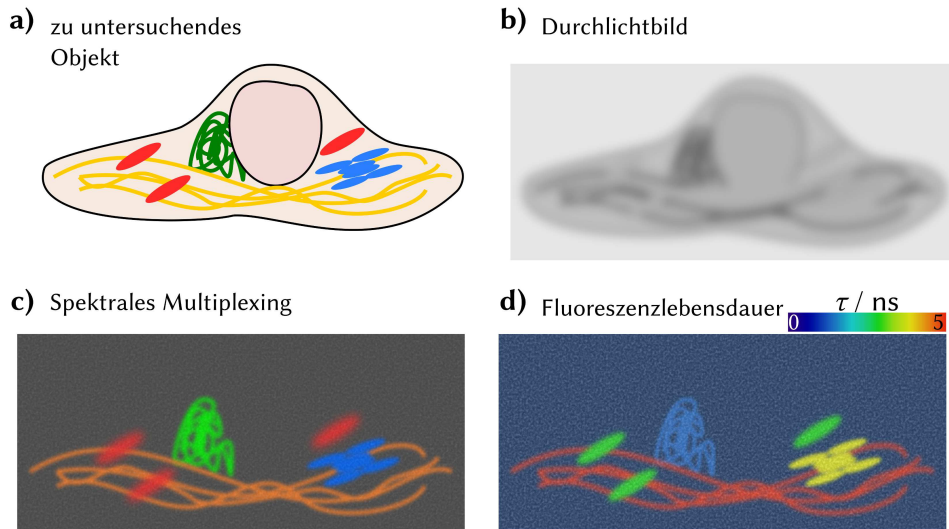
Während sowohl die konfokale und auch die Lichtscheibenmikroskopie inhärent zur dreidimensionalen Segmentierung der Probe fähig sind, besteht diese Möglichkeit nicht in der Epifluoreszenz- und der TIRF-Mikroskopie. Hier bedarf es zusätzlicher optischer Instrumente, um die dritte Dimension zu erfassen. So haben sich mehrere Möglichkeiten etabliert, die sich in der Qualität der erreichbaren Genauigkeit, natürlich aber auch im Preis unterscheiden. Die einfachste Möglichkeit besteht darin, eine zweite Fokusebene einzuführen und aus dem Grad der Defokussierung einzelner Punktabbilder auf die tatsächliche axiale Position zu schließen.<sup>[40]</sup> Es wurden bis zu neun Fokusebenen eingeführt, wodurch sich bis zu 4  $\mu\text{m}$  dicke Proben vermessen lassen.<sup>[87]</sup> Des Weiteren lässt sich die PSF auch durch Phasenplatten beeinflussen, sodass die axiale Position durch ein spezifisches Muster kodiert wird (double-helix PSF).<sup>[88]</sup> Eine weitere, einfach zu implementierende Option ist das Einbringen einer zylindrischen Linse, die gezielt Astigmatismus erzeugt. Durch den Grad und die Richtung der Verzerrung der PSF lässt sich auf die axiale Position schließen.<sup>[89]</sup> All diese Methoden benötigen jedoch eine exakte Kalibrierung, an Hand derer die genaue Zuordnung der axialen Position erfolgt.

### 1.3.2. Verschiedene Arten von Multiplexing in der Mikroskopie

Die einfachste Art der Mikroskopie ist die Durchlichtmikroskopie. Kontrast gebend sind Variationen des Brechungsindex der Probe, wodurch das eingestrahlte Licht unterschiedlich gestreut wird. In Abbildung 1.7 ist schematisch eine Zelle (Abb. 1.7a) und das zugehörige Durchlichtbild (Abb. 1.7b) dargestellt. Dieses Bild ist sehr kontrastarmes, intrazelluläre Strukturen lassen sich so nicht gut beobachten. Um guten Kontrast zu erzeugen bedient man sich der Fluoreszenz.

Multiplexing, also das parallele Beobachten mehrerer Strukturen, lässt sich in der Fluoreszenzmikroskopie auf unterschiedliche Weise durchführen. Die gängigste Methode ist spektrales Multiplexing, wobei das detektierte Fluoreszenzlicht mittels Strahlteiler in mehrere Kanäle aufgetrennt und auf einem oder mehreren Detektoren registriert wird.<sup>[90-94]</sup> In Kombination mit mehreren Anregungslinien lassen sich so drei bis vier Farbstoffe parallel relativ problemlos trennen. Bei einer größeren Anzahl verschiedener Farbstoffe erfolgt zunehmend ein spektrales Ineinanderlaufen, was eine nachträgliche Dekonvolution erforderlich macht. Neben spektraler Separation wurden auch Methoden entwickelt, die Multiplexing durch Polarisation erreichen.<sup>[95-97]</sup>

Wird in einem konfokalen Mikroskop zusätzlich die Ankunftszeit der detektierten Photonen mit ausgelesen (TCSPC, engl. *time correlated single-photon counting*), lässt sich dadurch die Fluoreszenzlebensdauer als weiterer Parameter zum



**Abbildung 1.7.:** Möglichkeiten zum Multiplexing in der Mikroskopie: (a) eine biologische Struktur wie eine Zelle enthält zahlreiche verschiedene Strukturelemente wie z. B. Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Lysosome und Strukturfilamente. (b) Im Durchlichtbild wird der Kontrast durch Unterschiede im Brechungsindex hervorgerufen, was zu einer kontrastarmen Abbildung führt. (c) Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die gezielte Detektion einzelner Strukturen, die spezifisch mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden müssen. Die Separation erfolgt mit entsprechenden Filtern. (d) Die ortsaufgelöste Messung der Fluoreszenzlebensdauer ermöglicht ebenfalls eine Separation unterschiedlicher Marker.

Multiplexing verwenden (FLIM, engl. *fluorescence lifetime imaging*).<sup>[98]</sup> In Verbindung mit STED-Mikroskopie wurden bereits mehrere spektral sehr ähnliche Farbstoffe anhand ihrer Lebensdauer getrennt.<sup>[99,100]</sup>

Ein sequentieller Ansatz, der auf Photobleichen und Schalten beruht, wurde z. B. von VLADIMIR BELOV und Mitarbeitern entwickelt.<sup>[101]</sup> Hier werden zwei photoschaltbare mit einem nicht-schaltbaren Farbstoff kombiniert, die alle drei im selben Spektralbereich emittieren. Als orthogonale Schaltmechanismen wurde hier die reversible Spirolactam-Bildung sowie eine irreversible Öffnung einer Diazoketon-Spiroverbindung ausgewählt.

## 1.4. Markierungsstrategien

Integraler Bestandteil der Fluoreszenzmikroskopie ist die selektive und spezifische Markierung der gewünschten Zielstruktur mit einem Fluorophor. Eine Übersicht über gängige Markierungsmethoden gibt Abbildung 1.8. Hier lässt sich auch die Größe der Marker vergleichen, was für die hochauflösende Mikroskopie von entscheidendem Interesse ist. Je kleiner die Marker ausfallen, desto besser ist die erreichbare Auflösung. Durch Nutzung gentechnischer Methoden und der Entwicklung immer neuer fluoreszierender Proteine wurde eine Möglichkeit geschaffen, Proben ohne zusätzliche Manipulation untersuchen zu können.<sup>[9, 102]</sup> Zudem lassen sich mit diesen Methoden auch lebende Zellen untersuchen und damit biologisch relevante Prozesse studieren. Allerdings bedarf es eines relativ großen Aufwands, um genetisch veränderte Organismen zu erschaffen und es ist sicherzustellen, dass die genetische Veränderung keinen Einfluss auf den zu beobachtenden Prozess hat.

Mit deutlich geringerem Aufwand lassen sich fixierte Proben untersuchen. Hier hat sich über die Jahre die Immunfluoreszenz als das Mittel der Wahl herauskristallisiert. Die enorme Spezifität von Antikörpern (Immunglobulin G, IgG) ist nur schwer synthetisch nachzubilden, zudem lassen sich für fast jedes beliebige Ziel Antikörper produzieren. Mittlerweile werden sogar Therapeutika auf Antikörperbasis vertrieben, jedes Jahr kommen vor allem im Bereich der Krebstherapie zahlreiche neue therapeutische Antikörperpräparate hinzu.<sup>[103, 104]</sup>

Die einfachste Art der Immunfluoreszenz stellt die indirekte Markierung der Zielstruktur mit Primär- und Sekundäntikörpern dar (Abb. 1.8a). Hierbei wird zunächst ein Antikörper gegen das Zielprotein (Primäntikörper) eingesetzt, der wiederum von einem zweiten, Farbstoff-markierten Antikörper erkannt wird (Sekundäntikörper)<sup>2</sup>. Der Sekundäntikörper hat als Zielprotein die Immunglobuline einer bestimmten Spezies (z. B. Maus), in welcher wiederum der Primäntikörper produziert wurde. Dies hat den Vorteil, dass ein Sekundäntikörper zur Markierung von vielen Zielproteinen genutzt werden kann, da lediglich der Primäntikörper ausgetauscht werden muss. Zusätzlich erfolgt durch die Sekundäntikörper eine Signalverstärkung, da mitunter mehr als ein Sekundäntikörper pro Primäntikörper binden kann und die Sekundäntikörper meist mehrere Farbstoffmoleküle tragen. Das macht eine Quantifizierung mit dieser Technik sehr schwer. Eine Abhilfe schafft die Nutzung Farbstoff-markierter Primänti-

---

<sup>2</sup>Es sei darauf hingewiesen, dass sowohl mono- als auch als polyklonale Antikörper verkauft werden. Ein monoklonaler Antikörper erkennt im Zielprotein nur ein einziges Epitop, polyklonale Antikörper(-mischungen) hingegen erkennen zahlreiche Epitope auf der Zielproteinoberfläche. Zur Quantifizierung sind daher monoklonale Antikörper bevorzugt, eine Signalverstärkung erreicht man bei Verwendung polyklonaler Antikörper.<sup>[105]</sup>

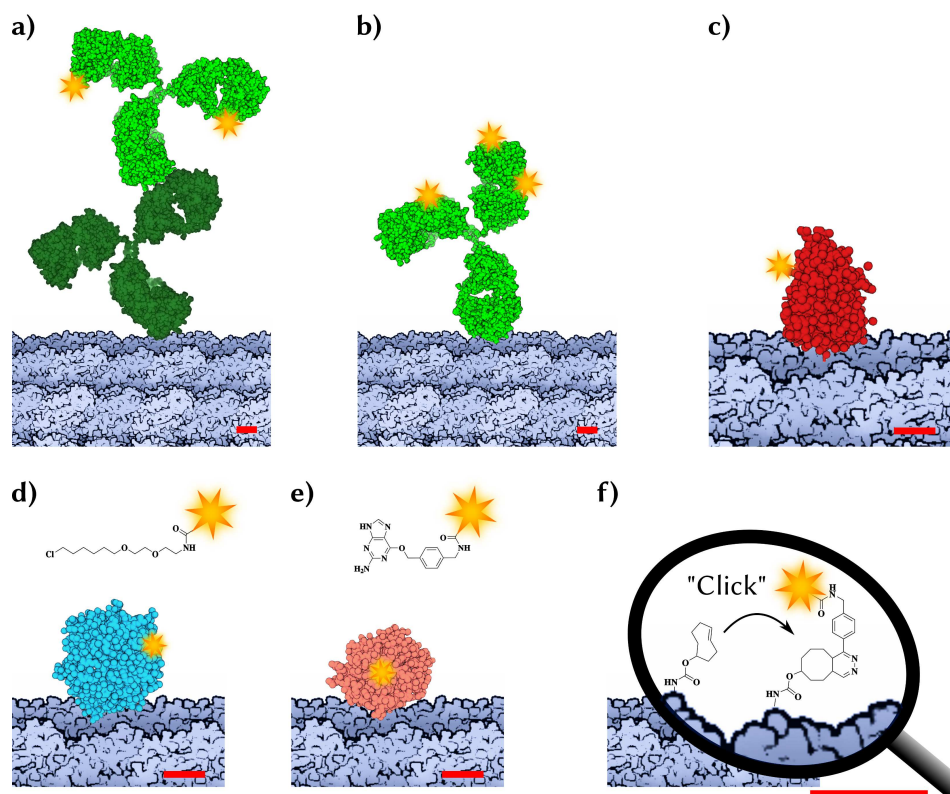


körper (Abb. 1.8b) oder Einzeldomänen-Antikörper (Abb. 1.8c). Hier lässt sich die Markierungsstöchiometrie genau bestimmen, Einzeldomänen-Antikörper lassen sich sogar stöchiometrisch markieren.<sup>[106]</sup> Ein Nachteil dieser Ansätze ist die zum Teil recht große Dissoziationskonstante  $K_d$ , sodass Antikörper durch zu ofttes Waschen entfernt werden können.<sup>[107]</sup> Dem entgegen stehen enzymatische Markierungsmethoden, die das Erstellen eines Fusionskonstruktes aus Zielprotein und Enzym erfordern. Dieser Aufwand lohnt, da die meisten enzymatischen Markierungsreaktionen orthogonal zu den Reaktionen in der Zielzelle sind und damit eine effiziente Markierung mit geringem Hintergrund ermöglichen.

Die am weitesten verbreiteten enzymatischen Tags sind das Halo-Tag (Abb. 1.8d),<sup>[108]</sup> sowie das SNAP-Tag (Abb. 1.8e).<sup>[109-113]</sup> Beide Tags beruhen auf etwa 20 kDa großen Enzymen, die genetisch so modifiziert sind, dass sie sich stöchiometrisch und kovalent mit ihrem Liganden markieren. Trägt der Ligand einen Fluoreszenzfarbstoff (wie in Abb. 1.8d+e dargestellt), erzielt man eine stöchiometrische 1:1 Markierung des Zielproteins, die bei zellgängigen Substraten auch in lebenden Zellen möglich ist.<sup>[26, 114]</sup> Zudem existieren für diese Tags fluorogene Marker, die erst nach erfolgter Reaktion mit ihrem Enzym fluoreszieren, was nochmals zu einer deutlichen Reduktion des Hintergrundsignals führt.<sup>[22]</sup>

Des Weiteren existieren enzymatische Tags wie  $\beta$ -Lactamase-Tag,<sup>[115]</sup> Dihydrofolat-Reduktase-Tag,<sup>[116, 117]</sup> oder die Tags *FLAsH* und *ReAsH*,<sup>[118-120]</sup> die auf der Reaktion von fluorogenen 1,3-Dithio-2-arsolan-modifizierten Farbstoffen mit einem Tetracystein-Motiv beruhen. Zur Einführung der beiden letztgenannten Tags ist nur eine geringfügige Modifikation des Zielproteins vonnöten, welche die Einführung eines Tetra-Cystein-Motivs (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) umfasst. Dadurch wird die Größe der Markierung im Vergleich zu den enzymatischen Methoden nochmals deutlich verringert. Zwei weitere, kleine Markierungs-Tags wurden von SCHÜTZ und MOOTZ vorgeschlagen, das sogenannte Click-Tag und das Amine-Tag.<sup>[121]</sup> Hierbei handelt es sich um Peptide, die chemisch entweder via Click-Chemie oder NHS-Aktivester-Chemie mit Farbstoffen markiert und dann durch Intein-vermitteltes Proteinspleißen an den Terminus des Proteins kovalent gekoppelt werden.<sup>[122]</sup>

Die in Abbildung 1.8f skizzierte Markierung beruht auf der Einführung einer bio-orthogonalen Funktionalität durch genetische Punktmutation. Eine künstliche, in das Zielprotein eingeführte Aminosäure trägt eine reaktive Gruppe, die dann durch eine „Click-Reaktion“ in der lebenden oder fixierten Zelle zur stöchiometrischen Markierung genutzt werden kann.<sup>[123]</sup> Hierfür eignet sich sowohl die Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Alkin-Azid-Cycloaddition (Huisgen-Click-Reaktion),<sup>[124-126]</sup> als auch die Reaktion gespannter Alkine mit Aziden (SPAAC, engl. *strain-promoted alkyne-azide cycloaddition*) und die Reaktion von Tetrazinen mit gespannten C-C-Doppel und Dreifachbindungen (SPIEDAC, engl. *strain-promoted*



**Abbildung 1.8.:** Schematischer Vergleich unterschiedlicher Markierungsmethoden. Als Zielprotein ist jeweils ein Mikrotubuli (dunkelblau) dargestellt. **(a)** Markierung mittels primärem und sekundärem IgG; **(b)** Farbstoff-markierter primärer IgG; **(c)** Farbstoff-markierter cameloider Einzeldomänen-Antikörper (Nanobody); **(d)** Fusionskonstrukt des Halo-Tag mit seinem Farbstoff-markierten Halogenalkan-Liganden; **(e)** Fusionskonstrukt des SNAP-Tag mit seinem Farbstoff-markierten Benzylguanin-Liganden; **(f)** Markierung mittels Farbstoff-markierten Tetrazinen durch „Click“-Chemie mit unnatürlichen Aminosäuren. Die Längenskala beträgt jeweils 2 nm, bei **f** bezieht sie sich auf den vergrößerten Ausschnitt. Die Proteinstrukturen stammen aus der Proteindatenbank. <http://www.rcsb.org/pdb>: 3J2U, 1IGT, 1F2X, 1BN6, 3KZZ.

*invers-electron-demand Diels-Alder cycloaddition*).<sup>[127-134]</sup> Der Vorteil der Click-Reaktionen mit gespannten Mehrfachbindungen gegenüber der Huisgen-Cycloaddition ist ihre problemlose Anwendbarkeit in lebenden Zellen, da sie ohne Katalysator ablaufen. Diese Herangehensweise liefert die bei weitem kompakteste

Markierung, ist jedoch bislang nur in Prokaryoten wie *E. coli* oder in Hefen demonstriert worden. In Eukaryoten ist sie nicht ohne weiteres durchführbar, da hier Reparaturmechanismen per „knock-out“ umgangen werden müssen.<sup>[135]</sup>

## 1.5. Chemische Schalter

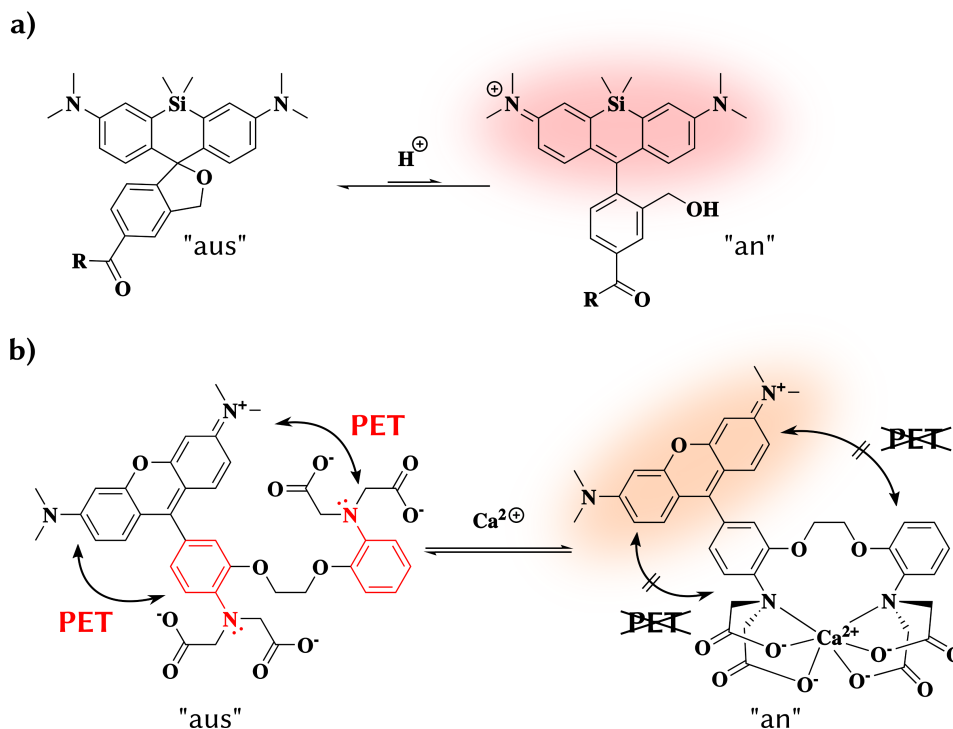
Die bisher vorgestellten Methoden zur Hochauflösung, sei es via STED oder mittels einer Lokalisationsmethode, basieren auf der lichtgetriebenen Schaltung von Fluorophoren zwischen zwei Zuständen. Diese Schaltung lässt sich jedoch auch auf chemischem Wege erreichen, was zudem den Vorteil hat, dass weder spezielle Lichtquellen noch sonstige, teure Hardware benötigt werden. Zudem wird dadurch die in die Probe eingetragene Energiemenge reduziert. Eine Vielzahl irreversible schaltbarer Sonden für kleine Moleküle wie NO,  $^1\text{O}_2$  oder  $\text{ClO}^-$  oder spezifische Enzyme wie die Glutathion-S-Transferase wird in der Medizin und Diagnostik bereits eingesetzt.<sup>[136]</sup> Während irreversible Reaktionen für Lokalisationsmethoden nach dem PALM-Prinzip einsetzbar sind, eignen sich reversible Schaltprozesse für Lokalisation analog zu STORM.

Generell muss zwischen zwei Klassen chemischer Schalter unterschieden werden: solche, deren Fluoreszenz durch eine chemische Interaktion ausgeschaltet wird („Turn-Off“) und solche, die sich anschalten lassen („Turn-On“). Letztere besitzen den Vorteil, dass das Hintergrundsignal vergleichsweise gering ausfällt und damit mit einer höheren Markierungsdichte bei gleichzeitig geringen Konzentrationen des Interaktionspartners gearbeitet werden kann.

Zahlreiche Verbindungen lassen sich durch einen Kationenaustausch schalten.<sup>[137]</sup> Die Bandbreite umfasst Liganden für diverse Metall-Kationen wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$ , um nur einige zu nennen.<sup>[138-140]</sup> Einen guten Überblick über Metall-Kationen-sensitive Chemosensoren gibt z. B. MAURO MICHELONI.<sup>[141]</sup> Auch Fluoreszenzsonden die auf pH-Änderungen reagieren oder Anionen detektieren, wurden beschrieben.<sup>[142]</sup>

Eine immer prominenter werdende Klasse an chemischen Schaltern macht sich die intramolekulare Spirocyclisierung substituierter Xanthenfarbstoffe zunutze,<sup>[143]</sup> die bei geeigneter Wahl des Nukleophils in wässriger Lösung spontan und reversibel ablaufen kann und von YASUTERU URANO und seinen Mitarbeitern bereits zur Lokalisationsmikroskopie eingesetzt wurde (siehe Abb. 1.9a).<sup>[28]</sup>

Ein weiteres, in Abbildung 1.9b dargestelltes, auch kommerziell weit verbreitetes System basiert auf dem BAPTA-Grundgerüst (1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethan-*N,N,N',N'*-tetraacetat), welches ein guter Chelator für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist.<sup>[144, 145]</sup> Die enthaltenen Anilin-Gruppen wirken in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  als PET-Fluoreszenzlöscher, nach Metallkoordination wird die Konjugation der freien Elektro-



**Abbildung 1.9.:** Beispiele für chemisch schaltbare Fluoreszenzsonden: (a) Spontan schaltendes Siliziumrhodamin von URANO,<sup>[28]</sup> (b) Calcium-Sonde, basierend auf einem BAPTA-Liganden.<sup>[144, 145]</sup>

nenpaare am Stickstoff mit dem aromatischen Ring unterbrochen, was zu einem starken Fluoreszenzanstieg führt.<sup>[5, 146]</sup>

### 1.5.1. CHIRON - Chemische Schalter in der hoch auflösenden Mikroskopie

Das Sondenkonzept der chemischen Schalter, welches in dieser Arbeit verwendet wird, geht zurück auf eine Entwicklung aus dem Arbeitskreis von Prof. KRÄMER am Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg.<sup>[44, 147, 148]</sup> Grundlage ist ein mit Bipyridin und TMR markierte DNA-Doppelstrang (siehe Kapitel 2.1), der als Chemosensor für  $\text{Cu}^{2+}$  wirkt. Im freien Zustand zeigt die Sonde eine ausgeprägte Fluoreszenz, durch Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  wird diese stark gelöscht. Diese Reaktion ist reversibel, bei Beobachtung einzelner immobilisierter Sonden lassen sich diskrete Fluktuationen zwischen den zwei Zuständen beob-

achten,<sup>[147,149]</sup> die auf die Bildung und den Zerfall des Komplexes zurückzuführen sind. Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst dabei die Dauer der An-Zustände. Mit steigender  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration werden diese zunehmend kürzer. Die Länge der Aus-Zustände wird nicht durch die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst, sie ist lediglich von der Stabilität des gebildeten Komplexes abhängig. Da die Fluktuationen für den Komplex  $[\text{Bipyridin-Cu}]^{2+}$  auf der Millisekunden-Zeitskala stattfinden, konnten sie zum Zweck der Lokalisationsmikroskopie eingesetzt werden. Diese in der Arbeitsgruppe Herten etablierte Methode wurde CHIRON getauft (engl. *Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy*).<sup>[43,44]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass im mikromolaren Bereich markierte Filamente in fixierten Zellen mit einer deutlich unter der Beugungsgrenze liegenden Auflösung abgebildet werden können. Zudem wurde demonstriert, dass der Prozess unabhängig von der Anregungsleistung abläuft, wodurch die Methode prinzipiell mit jedem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop durchführbar ist, da keine speziellen Laser vonnöten sind.<sup>[43]</sup>

## 1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten verschiedene modulare chemische Schalter untersucht werden. Die bereits existierende erste Generation, die in Kapitel 1.5.1 beschrieben wurde, basiert auf einer doppelsträngigen DNA, die einen Bipyridin-Liganden in räumliche Nähe zum Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin bringt (TMR-Bipy). In dieser Arbeit sollte dieses Konzept um neue Liganden und Farbstoffe erweitert werden, um so den Einfluss der Ligandenstärke und der elektronischen Struktur des Farbstoffs aufzuklären. Neben der Charakterisierung der synthetisierten Schalter im Ensemble und auf Einzelmolekülebene sollte die Entwicklung mikroskopischer und nanoskopischer Methoden vorangetrieben werden. Das durch die reversible Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen an den Liganden induzierte Einzelmolekülblinken von TMR-Bipy eröffnet Einblicke in die nanoskopische Welt und sollte in dieser Arbeit auch mit weiteren Liganden und Farbstoffen ausgeführt werden. Zusätzliches Ziel war es, mit den chemischen Schaltern eine Methode zur monochromatischen Multiplexing-Mikroskopie zu etablieren, die auf selektivem, reversiblen An- und Ausschalten von TMR-Bipy basiert. Diese erlaubt eine direkte Korrelation verschiedener Strukturen ohne chromatische Aberrationen korrigieren zu müssen.

Basierend auf all diesen Erkenntnissen sollte zudem eine neue Generation chemischer Schalter entwickelt und charakterisiert werden, die bekannte Nachteile der ersten Generation umgeht: so sollte ein organisches Grundgerüst an die Stelle des DNA-Doppelstrangs treten, zudem sollte die Verknüpfung der chemischen Schalter mit ihrem Ziel von der Streptavidin-Biotin-Technik auf enzymatische Markierungsmethoden und Click-Chemie erweitert werden, um eine breite Anwendbarkeit sicherzustellen. Die neu synthetisierten chemischen Schalter sollten dann ebenfalls im Ensemble und auf Einzelmolekülniveau charakterisiert werden und ihre Anwendbarkeit für CHIRON und das chemische Multiplexing untersucht werden. Zusätzlich sollen die alternativen Markierungsmethoden wie die Markierung mit dem enzymatischen Snap- und Halo-Tag sowie die Markierung mittels Kupfer-freier Tetrazin-Click-Chemie untersucht werden.

Im folgenden Kapitel werden nun zuerst die Experimente mit den chemischen Schaltern der ersten Generation dargelegt. Daran anschließend widmet sich das Kapitel den neu entwickelten chemischen Schalter der zweiten Generation.

**Teil II.**

# **Experimente und Ergebnisse**





## Kapitel 2.

# Die chemischen Schalter der ersten Generation

*Teile der Ergebnisse, die im Folgenden vorgestellt werden, wurden bereits in BROX et al., PLoS ONE 2013<sup>[149]</sup> sowie in BROX et al., ChemPhysChem 2014<sup>[150]</sup> veröffentlicht.*

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse basieren auf Vorarbeiten aus den Arbeitskreisen von Prof. KRÄMER und Prof. HERTEN.<sup>[43, 147]</sup> Das bestehende Sondenkonzept (siehe dazu Abschnitt 1.5.1 und 2.1) wurde hier aufgegriffen und in einigen Parametern systematisch variiert. Es wurden neben dem etablierten Bipyridin weitere Liganden inkorporiert und die Sonde mit verschiedenen Farbstoffen markiert und untersucht.

Das folgende Kapitel behandelt zuerst die Charakterisierung der chemischen Schalter im Ensemble und untersucht hier die Komplexbildung, die zur Fluoreszenzlöschung führt. Darüber hinaus wurden die Schalter in Einzelmolekül-Experimenten untersucht um die Komplexbildung auch aus dem thermodynamischen Gleichgewicht heraus zu bestimmen. Des Weiteren wurden die chemischen Schalter dann in der Mikroskopie eingesetzt, um zelluläre Strukturen in hoher, nicht mehr beugungsbegrenzter Auflösung nach dem CHIRON-Prinzip abzubilden.<sup>[43]</sup> Außerdem wurde mit dem chemischen Multiplexing eine neue Methode zur aberrationsfreien Abbildung verschiedener biologischer Strukturen etabliert und charakterisiert.

### 2.1. Ensemble-Experimente

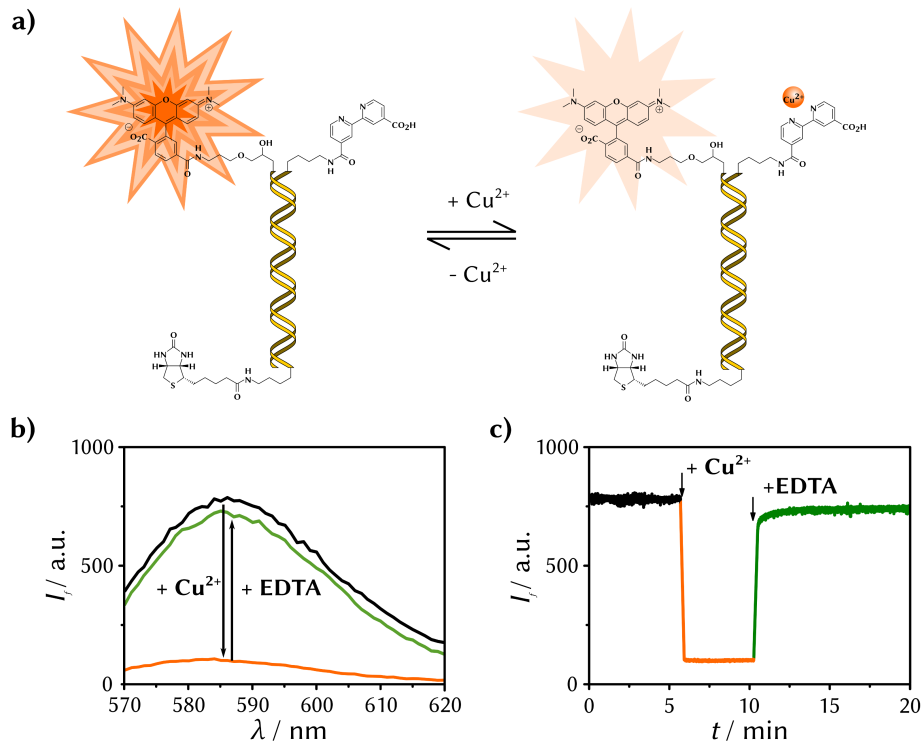
Die hier untersuchte Fluoreszenzsonde ist aus vier Elementen aufgebaut: einem Fluoreszenzfarbstoff, der das Messsignal liefert, einem Liganden, der zweiwertige  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen kurzzeitig komplexiert, einem Biotin-Linker, welcher zur Immobilisierung in weiteren Experimenten verwendet wird und schließlich der 22mer

DNA-Doppelhelix, die alle Teile verbindet. Eine schematische Darstellung der Sonde liefert Abbildung 2.1a. Hier trägt die Sonde eine 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure (Bipy) als Komplexliganden und ein Tetramethylrhodamin (TMR) als Fluoreszenzfarbstoff. Sie wird im Folgenden mit TMR-Bipy bezeichnet.

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Sonde in zwei Zuständen vorliegen kann, im freien, stark fluoreszierenden Zustand (links) sowie als Metallkomplex mit deutlich reduzierter Fluoreszenz (rechts).<sup>[147]</sup> Messungen der Fluoreszenzspektren von TMR-Bipy in 10 mM MOPS-Puffer zeigten nach Zugabe eines Äquivalents  $\text{CuSO}_4$  eine Fluoreszenzabnahme auf etwa 15 % (Abb. 2.1b schwarze und orange Kurve). Nach Zugabe eines Äquivalents EDTA konnte die Fluoreszenz auf 95 % des Ausgangswertes wiederhergestellt werden (grüne Kurve). Die gleiche Messung wurde Zeitaufgelöst durchgeführt (Abb. 2.1c). Dabei wurde die Fluoreszenz am Emissionsmaximum von 585 nm über die Zeit betrachtet, während die Zugabe und direkte Vermischung von je einem Äquivalent  $\text{CuSO}_4$  und EDTA erfolgte. Hier zeigt sich, dass Komplexierung und Dekomplexierung der Sonde quasi instantan ablaufen und nicht vom Spektrometer aufgelöst werden können. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die weitere Anwendung der Sonde in der Mikroskopie (siehe Kapitel 2.6).

Um einen detaillierteren Eindruck der Fluoreszenzlöschung von TMR-Bipy mit  $\text{Cu}^{2+}$  zu erhalten wurde eine genaue Fluoreszenz-Titration durchgeführt. Hierzu wurden Fluoreszenzspektren einer 500 nM Lösung der Sonde in MOPS-Puffer bei ansteigender Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$  aufgenommen (Abb. 2.2a). Durch Zugabe von kleinen Aliquots einer konzentrierten  $\text{CuSO}_4$ -Lösung wurde die Verdünnung minimal gehalten und konnte somit vernachlässigt werden. Aus den Rohdaten wurde ein Stern-Volmer-Plot erstellt, wie in Abbildung 2.2b (schwarz) dargestellt ist.<sup>[13]</sup> Zur Anpassung wurde hier das von Dr. ALEXANDER KIEL vorgeschlagene Modell, basierend auf einem Zwei-Zustands-System mit einem stark fluoreszierenden und einem schwach fluoreszierenden Zustand verwendet, welches in Abbildung 2.2c skizziert ist. Hier liegt im chemischen Gleichgewicht neben der freien Fluoreszenzsonde L auch die komplexierte Form M-L vor. Beide können mit ankommenden Photonen interagieren und einen elektronisch angeregten Zustand einnehmen ( $L^*$  bzw.  $M-L^*$ ), von denen sie aber mit unterschiedlichen Relaxationsraten zurück in ihre elektronischen Grundzustände zurückkehren. Der Metallkomplex hat eine deutlich verminderte Emissionsrate und damit eine deutlich verringerte messbare Fluoreszenzintensität. Die gemessene Fluoreszenzintensität bei einer gewissen Konzentration an M ist also die Summe aus Fluoreszenz der freien und der komplexierten Sonde.

Aus diesem Schema wurde eine Formel (Gleichung 2.1) zur Anpassung der Stern-Volmer-Kurven der Fluoreszenzlöschung erarbeitet, dessen Herleitung in Kapitel A.1 beschrieben wird.



**Abbildung 2.1.:** Sondendesign und Ensemble-Experimente der chemischen Schalter: (a) Schematische Darstellung des Zwei-Zustands-Systems von TMR-Bipy. Die Sonde zeigt im freien Zustand eine hohe (links), nach Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  eine erniedrigte Fluoreszenzintensität. (b) Emissionsspektrum des freien TMR-Bipy ohne  $\text{Cu}^{2+}$  (schwarz) sowie nach Zugabe von einem Äquivalent  $\text{Cu}^{2+}$  (orange) und zusätzlich einem Äquivalent EDTA. (c) Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität von TMR-Bipy bei Zugabe von einem Äquivalent  $\text{Cu}^{2+}$  und einem Äquivalent EDTA.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + K[M]}{1 + K[M]\phi_{aus}} \quad (2.1)$$

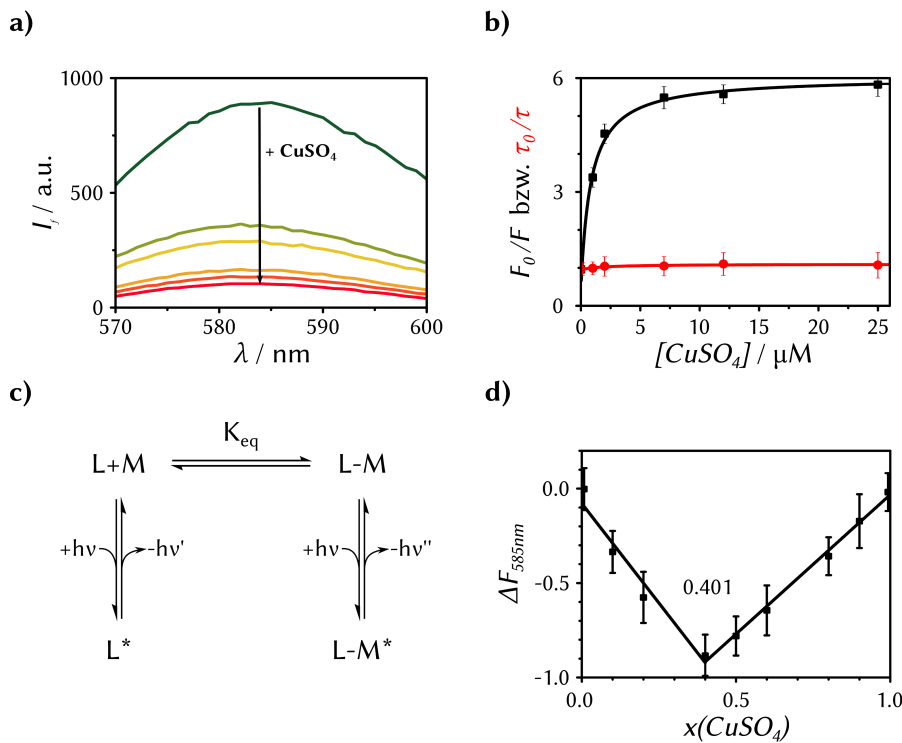
Hier ist  $K$  die Komplexbildungskonstante des Bipyridin- $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes und  $\phi_{aus} = \frac{\phi_L}{\phi_{ML}}$  die relative Quantenausbeute der komplexierten Sonde. Diese Formel ist lediglich eine Näherungslösung und macht einige Vorannahmen (siehe Kapitel A.1 im Anhang), liefert für die Stern-Volmer-Plots in diesem Kapitel aber gute Ergebnisse, weshalb hier Gleichung 2.1 zur Anpassung angewandt wurde. Hieraus wurde ein Wert von  $K = (4.26 \pm 0.48) 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  für die Komplexbil-

dungskonstante erhalten, und für die relative Quantenausbeute der komplexierten Verbindung ein Wert von  $\phi_{aus} = (16.4 \pm 0.3) \%$ .

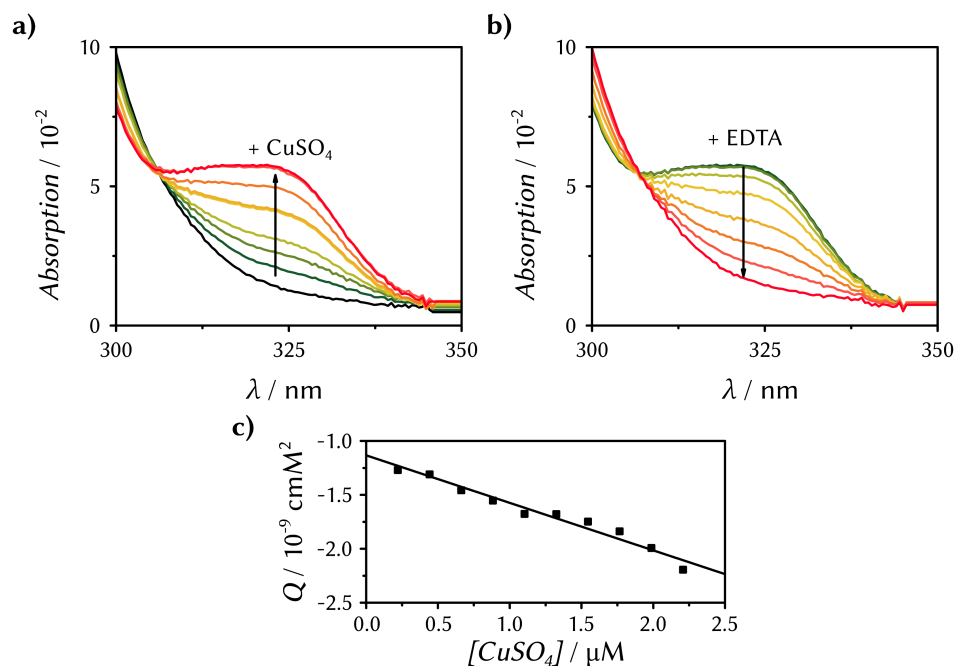
Als weitere Messgröße zur Untersuchung der Art und Weise der Fluoreszenzlöschung wurden parallel zu den Intensitätsmessungen jeweils die Fluoreszenzlebensdauer von TMR-Bipy in Abhängigkeit der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration bestimmt und ebenfalls als Stern-Volmer-Plot aufgetragen (Abb. 2.2b, rot). Dieser weist im Gegensatz zum Stern-Volmer-Plot der Intensität nur eine minimale Steigung auf, was auf einen statischen Löschmechanismus hindeutet. Der Löschmechanismus wird genauer in Kapitel 2.2 untersucht.

Eine weitere Größe, die aus Fluoreszenzmessungen bestimmt wurde, ist die Komplexstöchiometrie zwischen TMR-Bipy und  $\text{Cu}^{2+}$ . Dazu wurde die Methode der kontinuierlichen Veränderung nach PAUL JOB angewandt.<sup>[151]</sup> Hier wird eine Messgröße bei variierendem Molenbruch der beiden Bindungspartner unter konstanter Gesamtkonzentration untersucht. Im vorliegenden Fall wurden Stammlösungen von  $\text{CuSO}_4$  und TMR-Bipy in 10 mM MOPS-Puffer zu je  $1 \mu\text{M}$  hergestellt und in verschiedenen Verhältnissen gemischt. Die Gesamtkonzentration an Sonde und  $\text{Cu}^{2+}$  blieb dabei jeweils bei  $1 \mu\text{M}$ . Durch die zunehmende Verdünnung der Sonde nimmt die gemessene Fluoreszenzintensität linear ab. Alle zusätzlichen Prozesse, die zur Verringerung der Intensität führen, rühren von der Komplexbildung her. Es wurde daher die Differenz von gemessener und erwarteter Fluoreszenz am Emissionsmaximum bei 585 nm gegen den Molenbruch von  $\text{Cu}^{2+}$  in Lösung aufgetragen, was in Abbildung 2.2d dargestellt ist. Es zeigt sich, dass die Abweichung bei etwa 0.4 am Größten ist, hier also die ideale Stöchiometrie vorliegt. Dieser Wert weicht leicht vom erwarteten Wert von 0.5 ab, was darauf hindeutet, dass die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen nicht ausschließlich mit dem Bipyridin-Liganden, sondern womöglich auch mit dem stark negativ geladenen DNA-Rückgrat interagieren.

Zur weiteren Untersuchung der Komplexbildung wurde eine Kontrollprobe, ein DNA-Doppelstrang ohne Farbstoff, aber mit Bipyridin und Biotin-Linker, mit einer  $\text{CuSO}_4$ -Lösung titriert. Im Absorptionsspektrum der Bipy-DNA tritt neben der Bande bei 260 nm eine weitere, kaum sichtbare Bande bei etwa 300 nm auf, welche lediglich als kleine Schulter wahrgenommen werden kann. Bei Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  in Schritten von 0.1 Äquivalenten nimmt die Absorption im Bereich von 320 nm zu, bis sie schließlich ab einem Äquivalent konstant bleibt (Abbildung 2.3a). Die Zugabe von EDTA in Schritten von 0.1 Äquivalenten führte zu einer erneuten Abnahme dieser Bande (Abb. 2.3b). Aus den Kurven in 2.3a wurde nach der Methode von BENESI und HILDEBRAND die Komplexbildungskonstante abgeschätzt.<sup>[149, 152]</sup> Hierzu wurde die Änderung der Absorption bei 320 nm betrachtet und als Wert  $Q = d[L]_0[\text{Cu}^{2+}]/\Delta A$  gegen die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen. Aus diesem Graph wird  $K$  als Quotient der Steigung und des y-Achsenabschnitts berechnet. Dies lieferte einen Wert von  $K = (3.38 \pm 0.84) \cdot 10^6 \text{ M}$ .



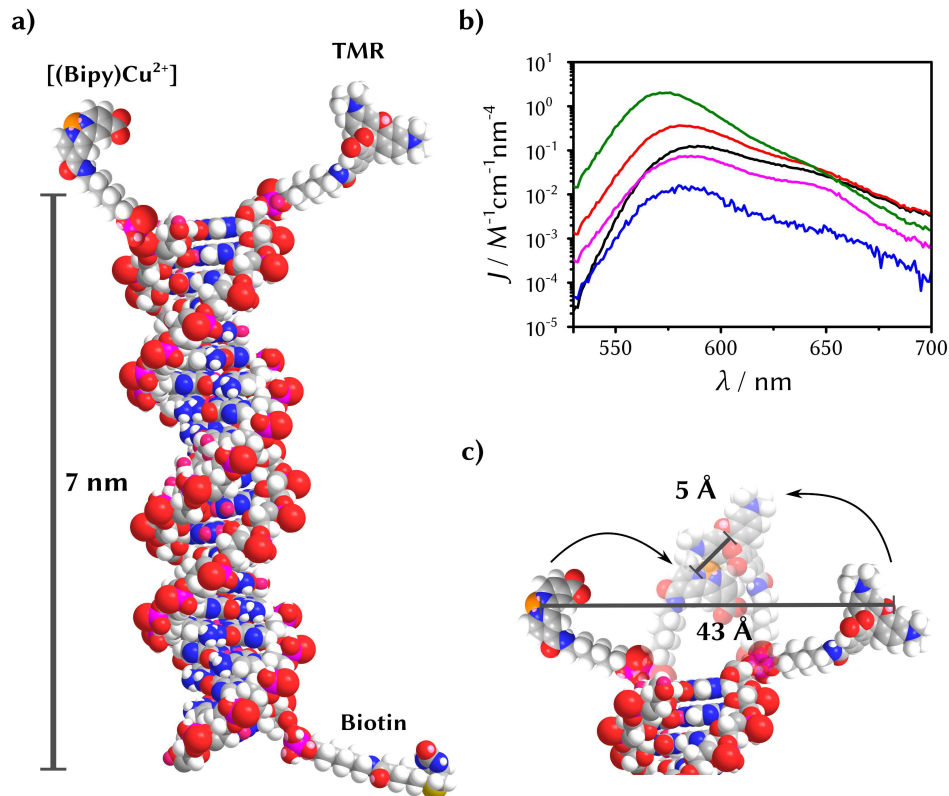
**Abbildung 2.2.:** Ensemble-Titration von TMR-Bipy mit  $\text{Cu}^{2+}$ : (a) Emissionsspektren einer 500 nm Lösung in 10 mM MOPS-Puffer nach Zugabe von 1–20  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ -Lösung. (b) Stern-Volmer-Plot der Fluoreszenzintensität (schwarz) und der Fluoreszenzlebensdauer (rot). Aufgetragen ist jeweils der Quotient aus Messwert in Abwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  und Messwert bei entsprechender  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration ( $F_0/F$  bzw.  $\tau_0/\tau$ ). (c) Schematische Darstellung der möglichen Zustände, in denen sich die Fluoreszenzsonde befinden kann. L Fluoreszenzsonde, M Metallion, ML Komplex,  $L^*$ ,  $ML^*$  elektronisch angeregte Zustände,  $K_{eq}$  Komplexbildungskonstante. (d) Job Plot der Komplexbildung der TMR-Bipy-Sonde mit  $\text{CuSO}_4$ . Der Molenbruch an  $\text{CuSO}_4$  wurde von 0 bis 1 variiert, während die Gesamtkonzentration an TMR-Bipy und  $\text{CuSO}_4$  konstant gehalten wurde (es wurden Stammlösungen von je 1  $\mu\text{M}$  in MOPS-Puffer hergestellt und in unterschiedlichem Verhältnis gemischt). Aufgetragen ist die Abweichung der gemessenen Fluoreszenz von der durch die zunehmende Verdünnung erwarteten Fluoreszenz. Der Knick der Kurve bei 0.4 gibt die Stöchiometrie der Komplexbildung wieder.



**Abbildung 2.3.:** Absorptionsspektren eines mit Bipyridin markierten DNA-Doppelstrangs bei (a) Zugabe von einem Äquivalent CuSO<sub>4</sub>-Lösung und (b) einem Äquivalent EDTA, jeweils in Schritten von 0.1 Äquivalenten. (c) Aus den Daten in a generierter Plot nach Benesi-Hildebrand. Es ist der Parameter  $Q = d[L]_0[Cu^{2+}]/\Delta A$  gegen die Cu<sup>2+</sup>-Konzentration aufgetragen. Der Quotient aus Steigung und y-Achsenabschnitt liefert die Komplexbildungskonstante K.

## 2.2. Untersuchungen zum Löschmechanismus

Um den Löschmechanismus zu charakterisieren wurden in einer Vorarbeit Modellierungen von SVENJA JOHANNA WÖRNER unter Anleitung von Prof. MARKUS PERNPOINTNER zusammen mit Dr. BODO MARTIN und Prof. PETER COMBA durchgeführt.<sup>[153]</sup> Hier wurde der DNA-Doppelstrang mitsamt TMR und Bipyridin und deren flexiblen Linkern modelliert, um Strukturen zu finden, die lokalen Energieminima entsprechen. Es wurden Strukturen verworfen, die einen hohen TMR-Bipyridin-Abstand aufwiesen, da diese nicht zur Fluoreszenzlöschung führen. So konnte eine Konformation gefunden werden, in der dieser Abstand nur 3.4 Å beträgt. Nach Hinzufügen eines Cu<sup>2+</sup>-Ions finden sich Strukturen mit einem Cu<sup>2+</sup>-TMR-Abstand von 5 Å, wobei der Ligand durch Wasserstoffbrückenbindungen



**Abbildung 2.4.:** Untersuchungen zum Löschmechanismus durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen: (a) Kugel-Stäbchen-Modell von TMR-Bipy. (b) Überlappungsintegrale  $J$  für TMR-Bipy mit verschiedenen 3d-Metallionen:  $\text{Cu}^{2+}$  (schwarz),  $\text{Ni}^{2+}$  (blau),  $\text{Co}^{2+}$  (pink),  $\text{Mn}^{2+}$  (rot) und  $\text{Fe}^{2+}$  (grün). Für die Berechnung wurde Gleichung 2.2 verwendet. (c) Schematische Repräsentation des Maximal- und Minimalabstands von Farbstoff und Kupferkomplex, bedingt durch deren flexible Linker.

mit dem DNA-Rückgrat teilweise fixiert wird.<sup>[149]</sup> Diese Strukturen wurden der weiteren Untersuchung des Löschmechanismus zugrunde gelegt. Eine schematische Darstellung des Größenverhältnisses von TMR-Bipy ist in Abbildung 2.4a gezeigt. Die doppelsträngige DNA dominiert mit ihren 7 nm Länge das Molekül und separiert Farbstoff und Ligand von der Biotin-Kopplungsfunktion.

Zur Erklärung der Fluoreszenzlöschung kommen mehrere Mechanismen in Frage. Eine Löschung durch strahlungslosen Energietransfer ist möglich, da die 3d-Metall-Komplexe des Bipyridin alle eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Absorptionsbande im sichtbaren Spektralbereich besitzen. Diese überlappt mit dem

**Tabelle 2.1.:** Berechnete Försterradien und die zugehörigen berechneten FRET-Effizienzen (für einen Ligand-Farbstoff-Abstand von 5 Å) verschiedener 3d-Metallkationen in TMR-Bipy sowie die experimentell bestimmte maximale Fluoreszenzlöschung.

Kation	$R_0$	$E_{FRET}$	$E_{exp} = 1 - F_{min}/F_0$
Cu <sup>2+</sup>	1.5 nm	0.998	0.95 ± 0.01
Ni <sup>2+</sup>	1.0 nm	0.999	0.79 ± 0.01
Co <sup>2+</sup>	1.4 nm	0.999	0.33 ± 0.05
Mn <sup>2+</sup>	1.8 nm	0.997	0.42 ± 0.04
Fe <sup>2+</sup>	2.3 nm	1.000	0.51 ± 0.02

Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs und kann somit als Energie-Akzeptor fungieren. Des Weiteren kann auch ein photoinduzierter Elektronentransferprozess (PET) oder ein Dexter Elektronentransfer (DET) zur Fluoreszenzlöschung führen. Die genannten Prozesse finden auf unterschiedlichen Längenskalen statt. Während für PET und DET ein direkter Kontakt der Orbitale vonnöten ist (typischerweise im Bereich von etwa 10 Å) reicht die Längenskala bei FRET je nach spektralem Überlapp bis zu 10 nm.<sup>[13]</sup> Eine Unterscheidung kann schwierig sein, wenn die Abstände experimentell nicht definiert eingestellt werden können. Einfacher ist daher das Ausschlussprinzip. Aus den vorab durchgeführten Simulationen wurde eine Struktur mit minimalem M<sup>2+</sup>-Bipyridin-TMR-Abstand von 5 Å ermittelt. Dieser Abstand wurde zur Berechnung von FRET-Effizienzen genutzt, welche dann mit dem Experiment verglichen wurden, um FRET als Mechanismus ausschließen zu können.

Zur Quantifizierung wurden die jeweiligen M<sup>2+</sup>-Bipyridin-TMR Überlappungsintegrale  $J$  nach Gleichung 2.2) bestimmt.

$$J = \int \overline{f_D}(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.2)$$

Hier ist  $\overline{f_D}(\lambda)$  das auf eins flächennormierte Fluoreszenzspektrum von TMR-Bipy (500 nm in 10 mM MOPS-Puffer),  $\epsilon_A(\lambda)$  ist das jeweilige Extinktionsspektrum von 1:1 Mischungen der 3d-Metallkationen Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> (jeweils als Chloride) mit dem Bipyridin-DNA-Doppelstrang ohne Farbstoff (500 nm in 10 mM MOPS-Puffer). Die daraus berechneten Überlappungsintegrale in Abbildung 2.4b unterscheiden sich um zwei Größenordnungen von Ni<sup>2+</sup> hin zu Fe<sup>2+</sup>.

Aus den Überlappungsintegralen konnte dann nach Gleichung 2.3 der jeweilige Försterradius  $R_0$  berechnet werden. Dieser ist genau der Abstand, bei dem die



Hälfte der Moleküle ihre Energie durch Energietransfer verlieren, die beobachtete Fluoreszenz des Donorfarbstoffs also  $F = 0.5F_0$  entspricht (siehe auch Kapitel 1.1.1).<sup>[13]</sup>

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000(\ln 10) \kappa^2 \phi_D}{128\pi^5 N_A} \frac{J}{n^4}} \quad (2.3)$$

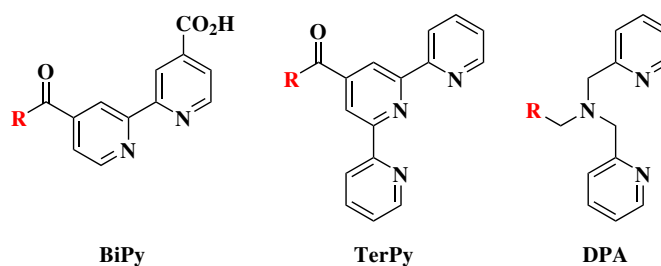
Hier ist  $N_A$  die Avogadro-Konstante,  $\kappa^2$  ist ein Faktor für die räumliche Ausrichtung des Übergangsdipolmoments. Für die TMR-Bipy-Sonde wurde angenommen, dass sowohl  $M^{2+}$ -Bipyridin als auch TMR frei rotieren können, somit wird ein Wert von  $\kappa^2 = 2/3$  angenommen.<sup>[13]</sup>  $\phi_D$  ist die Quantenausbeute von TMR an einer doppelsträngigen DNA und wurde wie in der Literatur beschrieben als 0.1 angenommen.<sup>[154]</sup> Der Brechungsindex des Mediums zwischen Donor und Akzeptor wurde auf  $n = 1.33$  gesetzt, da er primär durch den 10 mM MOPS-Puffer bestimmt wird.<sup>[155]</sup> Aus den Försterradien können nach Gleichung 2.4 die FRET-Effizienzen  $E_{FRET}$  berechnet werden.

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2.4)$$

Die theoretischen FRET-Effizienzen des aus MD-Simulationen erhaltenen minimalen Abstands von TMR und dem  $M^{2+}$ -Bipyridin-Komplex von 5 Å sind in Tabelle 2.1 angegeben.<sup>[149]</sup> Hier sollte bei allen getesteten 3d-Metallionen eine gleichmäßig starke Löschung durch FRET stattfinden. Da dies experimentell nicht auftritt, muss ein anderer Mechanismus als FRET vorliegen. Dies lässt PET und DET als wahrscheinlichste Mechanismen übrig. Hierfür ist ein direkter Kontakt zwischen Bipyridin und TMR nötig, der den Modellierungen zufolge möglich ist. Allerdings unterliegt der Abstand einer starken Fluktuation, wie in Abbildung 2.4c illustriert ist. Basierend auf der Länge der verwendeten Linker und dem Durchmesser der DNA-Doppelhelix reicht hier der Abstand von unter 5 Å auf über 40 Å. Der wahre zeitlich gemittelte Abstand ist schwer zu bestimmen, aber die beobachtete Restfluoreszenz im gelöschten Zustand deutet auf eine Abstandsfluktuation und damit eine Unterbrechung der Fluoreszenzlöschung im Mikrosekundenbereich hin. Die Übergangsrate für den Dexter Elektronentransfer  $k_{DET}$  ist nach

$$k_{DET} \propto J \exp\left(\frac{-2r}{L}\right) \quad (2.5)$$

neben dem Abstand  $r$  und der Summe der Van-der-Waals Radien von Donor und Akzeptor auch von deren spektralem Überlapp  $J$  abhängig. Daher würde man auch hier eine Steigerung der Löscheffizienz mit steigendem  $J$  erwarten, was ex-



**Abbildung 2.5.:** Verschiedene Komplexliganden, die für die chemischen Schalter der ersten Generation zur Verwendung kamen: Dicarboxy-Bipyridin (BiPy), Terpyridin (TerPy) und Dipicolylamin (DPA).

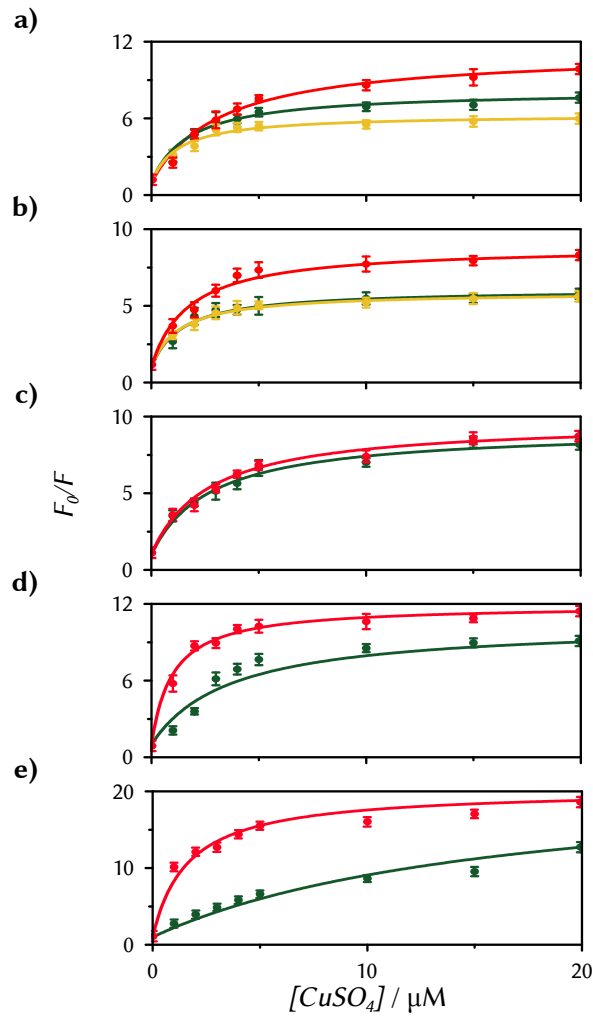
perimentell nicht der Fall ist. Das schließt DET zwar nicht völlig aus, deutet aber auf PET als wahrscheinlichsten Lösmechanismus hin.

### 2.3. Einfluss unterschiedlicher Liganden und Farbstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben dem ursprünglichen Bipyridin-Liganden auch weitere Komplexliganden in das System eingebaut (Abbildung 2.5). Es wurden zwei dreizählige Liganden ausgewählt, Terpyridin und Dipicolylamin, um die Affinität und Komplexstabilität gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$  weiter zu erhöhen. Beide Liganden wurden über einen kurzen, flexiblen Linker an der DNA fixiert. Im Falle des Terpyridin kam wie in der Bipyridin-Sonde ein  $\text{C}_6$ -Aminolinker zum Einsatz. Die [2,2':6',2''-Terpyridin]-4'-carbonsäure wurde an die freie Aminogruppe des noch auf Festphase immobilisierte Oligonukleotid durch in-situ Aktivierung der Carbonsäure unter basischen Bedingungen gekoppelt. Vor Abspaltung von der Festphase wurde mehrmals gewaschen, das Produkt nach Abspaltung mittels HPLC aufgereinigt und mittels MALDI-TOF verifiziert.

Das mit Di-(2-picoly)amin markierte Oligonukleotid wurde fertig bezogen und direkt verwendet. Die Farbstoffmarkierung des Gegenstranges erfolgte ebenfalls an einem  $\text{C}_6$ -Aminolinker. Dieser wurde in basischer Umgebung mit den Farbstoff-Aktivestern zur Reaktion gebracht und mittels HPLC aufgereinigt. Die Identifizierung der Produkte erfolgte mit Hilfe der eingebauten Absorptions- und Emissionsspektrometer, aus separat aufgenommenen Absorptionsspektren wurde der Markierungsgrad (DOL, Gleichung 5.1) bestimmt und nur Fraktionen mit einem DOL von 0.9–1.1 verwendet.

Die einzelnen Sonden wurden schließlich aus Stammlösungen der Farbstoff-



**Abbildung 2.6.:** Stern-Volmer-Plots der Titrations chemischer Schalter mit unterschiedlichen Liganden (grün: Bipyridin, rot: Dipicolylamin, gelb: Terpyridin) und verschiedenen Farbstoffen: (a) Atto565, (b) TMR, (c) Atto665, (d) Atto550, (e) Atto647N.

und Liganden-DNA-Stränge hybridisiert und in MOPS-Puffer vermessen. Die Ergebnisse der Titrations einiger Sonden sind in Abbildung 2.6 dargestellt. Die Parameter aus den jeweiligen Anpassungen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Die Wahl des Farbstoffes hat im Zusammenspiel mit Bipyridin als Ligand nur einen untergeordneten Einfluss. Alle hier getesteten Farbstoffe liefern Werte für

**Tabelle 2.2.:** Ergebnisse der Anpassung von Gleichung 2.1 an die in Abbildung 2.6 dargestellten Stern-Volmer-Plots mit dem zugehörigen korrigierten Bestimmtheitsmaß  $R_{\text{kor.}}^2$ .

Sonde	$K / 10^6 \text{ M}^{-1}$	$\phi_{\text{aus}} / \%$	$R_{\text{kor.}}^2$
TMR-Bipy	$4.26 \pm 0.48$	$16.4 \pm 0.3$	0.9869
TMR-Terpy	$4.53 \pm 0.26$	$16.9 \pm 0.2$	0.9918
TMR-DPA	$5.12 \pm 0.44$	$11.3 \pm 0.2$	0.9916
Atto565-Bipy	$4.58 \pm 0.54$	$12.2 \pm 0.3$	0.9600
Atto565-Terpy	$5.03 \pm 0.61$	$15.9 \pm 0.4$	0.9746
Atto565-DPA	$5.46 \pm 0.29$	$8.9 \pm 0.2$	0.9846
Atto550-Bipy	$2.86 \pm 0.49$	$9.5 \pm 0.5$	0.9579
Atto550-DPA	$12.19 \pm 1.31$	$8.4 \pm 0.1$	0.9548
Atto647N-Bipy	$1.36 \pm 0.15$	$4.5 \pm 0.3$	0.9700
Atto647N-DPA	$12.42 \pm 2.42$	$4.9 \pm 0.2$	0.9660
Atto665-Bipy	$3.30 \pm 0.26$	$10.9 \pm 0.2$	0.9878
Atto665-DPA	$3.62 \pm 0.28$	$10.3 \pm 0.3$	0.9805

$\log(K)$  im Bereich von 6.1–6.7 und liegen damit im Rahmen der in Vorarbeiten bestimmten Werte ( $\log(K) = 6.4$  [44] bzw.  $\log(K) = 6.6$  [148]). Die Varianz von  $\log(K)$  bei Verwendung von Dipicolylamin als Ligand lag bei 6.56–7.09. Die beiden mit Terpyridin als Ligand getesteten Farbstoffe lieferten vergleichbare Werte von 6.56–7.02. Im Hinblick auf die erreichbare Restfluoreszenz der Sonde, ausgedrückt durch die Quantenausbeute des gelöschten Zustandes, ist Dipicolylamin der bevorzugte Ligand. Abgesehen von Atto647N-Bipy war hier  $\phi_{\text{aus}}$  jeweils geringer als für die Bipyridin-Sonden. Auch die mit Terpyridin getesteten Farbstoffe lieferten keine niedrigeren Restfluoreszenzen. Daher wurde der Fokus in den folgenden Experimenten auf die Liganden Bipyridin und Dipicolylamin gesetzt.

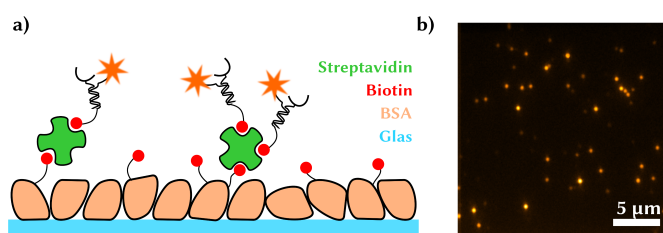
## 2.4. Einzelmolekülcharakterisierung

Im thermodynamischen Gleichgewicht kann die Gleichgewichtskonstante nicht mit Ensemble-Methoden bestimmt werden, da hier keine makroskopische Änderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit zu erwarten ist. Beobachtet man die Reaktion jedoch auf Einzelmolekülebene, so sind diskrete Fluktuationen zwischen An- und Aus-Zustand zu beobachten.<sup>[147]</sup> Für TMR-Bipy wurde dies bereits in Vor-

arbeiten von Dr. ALEXANDER KIEL und Dr. MICHAEL SCHWERING durchgeführt. [44, 148] In dieser Arbeit wird nun Atto565-Bipy und Atto565-DPA genauer in Einzelmolekülexperimenten untersucht.

Um ein Einzelmolekülexperiment durchführen zu können, mussten einzelne chemische Schalter spezifisch auf einer Glasoberfläche immobilisiert werden. Dazu kam eine im Arbeitskreis HERTEN etablierte Methode zum Einsatz, die in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Hierbei macht man sich zu Nutzen, dass Proteine auf geladenen Glasoberflächen unspezifisch adhären. Eine mit 0.1 M Flusssäure gereinigte Glasoberfläche wurde mit aufgereinigtem Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin), einem 66 kDa schweren und etwa 4 nm großen Protein, [156] bedeckt. 12.5 % der Proteine waren zudem biotinyliert, was zur Immobilisierung genutzt wurde: die Interaktion von Biotin und dem Protein Streptavidin ist eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindungen in der Natur ( $K_d \approx 10^{-14} \text{ M}^{-1}$ ), außerdem besitzt Streptavidin vier Bindungsstellen für Biotin und kann daher als Anker zwischen dem auf der Oberfläche liegenden BSA-Biotin und den biotinylierten chemischen Schaltern genutzt werden. [157] Abbildung 2.7a zeigt schematisch die schrittweise aufgebaute Oberfläche zur Immobilisierung der chemischen Schalter, in Abbildung 2.7b ist ein Bild einzelner immobilisierter Schalter ( $26 \times 26 \mu\text{m}^2$ ) gezeigt. Die Oberflächendichte konnte durch die Wahl der Sondenkonzentration während der Immobilisierung gewählt werden. Typischerweise lag sie bei  $10^{-10} \text{ M}$ , die Inkubationszeit lag im Bereich von 10–15 Minuten. Bei geeigneter Bedeckung wurden die Oberflächen mehrmals mit PBS gewaschen, mit einem Puffer definierter  $\text{CuSO}_4$ -Konzentration bedeckt und nach fünfminütigem Abwarten der Gleichgewichtseinstellung im Einzelmolekül-TIRF-Mikroskop vermessen. Es wurde jeweils nur der zentrale Bereich des Gesichtsfeldes zur Auswertung herangezogen ( $256 \times 256$  Pixel) um eine gleichmäßige Ausleuchtung der Probe durch den Anregungslaser und damit eine vergleichbare Helligkeit der einzelnen Moleküle zu gewährleisten. Die Aufnahmen wurden bei einer Belichtungszeit von 20 ms durchgeführt, um möglichst auch schnelle Fluktuationen detektieren zu können. Von jeder Sonde wurden etwa 10–20 Videos aufgenommen und mit einer im Arbeitskreis entwickelten MATLAB-Software analysiert (für Details siehe Kapitel 5.6). Diese erkennt anhand eines Intensitätsgrenzwerts lokale Maxima und gibt deren zeitlichen Intensitätsverlauf, korrigiert um den lokalen Hintergrund, aus.

In Abbildung 2.8a sind vier repräsentative Einzelmolekülspuren von Atto565-Bipy dargestellt. In Abwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen (schwarz) zeigen die Moleküle alle eine konstante Emission ohne größere Fluktuationen. Dass es sich um die Spur eines einzelnen Moleküls handelt, wird durch das Vorhandensein eines einzelnen Bleichschrittes bei etwa 49 Sekunden deutlich. In Anwesenheit von 200 nM  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen wird ein Blinken der Moleküle induziert, das auf der



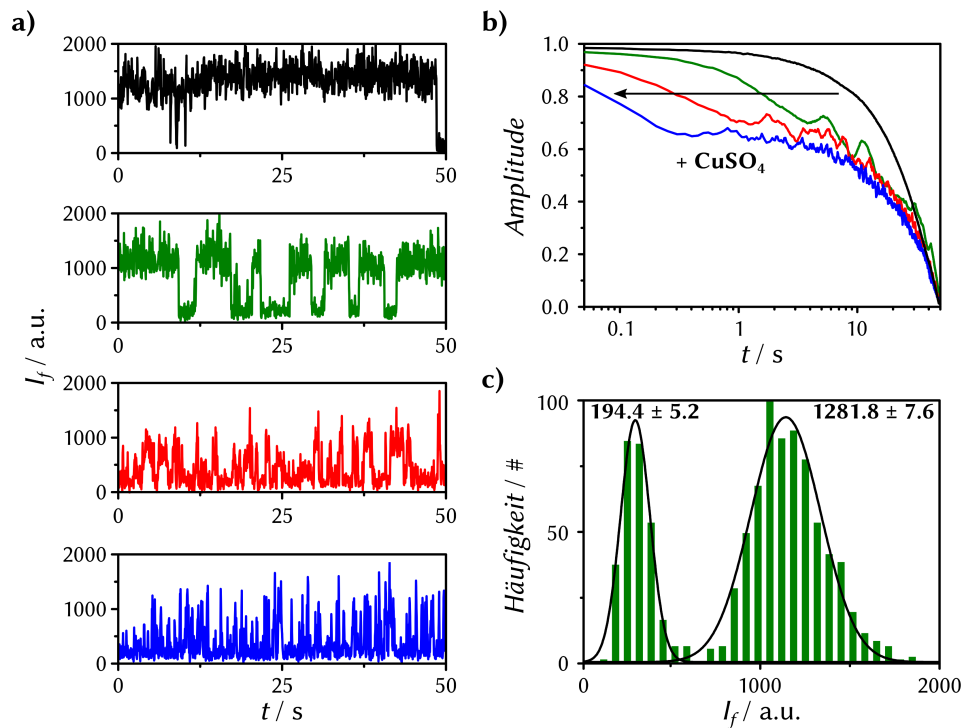
**Abbildung 2.7.:** Schematische Darstellung der Oberflächenpräparation für Einzelmolekülexperimente: (a) auf eine gereinigte Glasoberfläche definierter Dicke (150 nm) wird eine Mischung aus BSA und BSA-Biotin (braun) adsorbiert. Die vereinzelt Biotin-Reste (rot) werden dann mit Streptavidin (grün) besetzt, an das wiederum die biotinylierten chemischen Schalter binden können. Das optimale Mischungsverhältnis von BSA und BSA-Biotin von 8:1 erlaubt das beobachten räumlich getrennter, einzelner Moleküle. (b) Fluoreszenzbild einzelner immobilisierter TMR-DPA-Moleküle.

Sekunden-Zeitskala liegt. Zugabe größerer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen (rot 1 mM, blau 5 mM) verkürzt die Dauer der An-Zustände deutlich auf etwa 200 bzw. 20 ms.

Diese Verkürzung der An-Zustände wird auch in Abbildung 2.8b deutlich, die die jeweiligen Autokorrelationen der Spuren in 2.8a darstellt. Alle Autokorrelationen weisen eine Komponente auf, die mit der Länge der aufgenommenen Spuren übereinstimmt (50 Sekunden). Eine weitere Komponente beruht auf dem  $\text{Cu}^{2+}$ -induzierten Blinken und wird mit steigender Konzentration deutlich kürzer.

Die Spur für 200 nM  $\text{Cu}^{2+}$  wurde zudem in ein Histogramm umgewandelt (Abb. 2.8c). Hier werden deutlich die beiden Populationen des An- und Aus-Zustandes sichtbar. Durch Anpassen zweier Gauß-Funktionen wurde deren Helligkeit zu  $(1281.8 \pm 7.6)$  bzw.  $(194.4 \pm 5.2)$  Counts bestimmt, woraus die relative Quantenausbeute des gelöschten Zustand  $\phi_{aus}$  zu  $(15.2 \pm 0.4) \%$  errechnet wurde. Dieser Wert ist etwa dreimal so groß wie die im Ensemble bestimmten Werte, was auf die geringe Stichprobe von nur einer Spur zurückzuführen ist. Nimmt man insgesamt 17 Spuren in Betracht, so erhält man für  $\phi_{aus}$  einen Wert von  $(8.4 \pm 1.5) \%$ , was vergleichbar zu Werten der anderen Bipyridin-Sonden ist.<sup>[149]</sup>

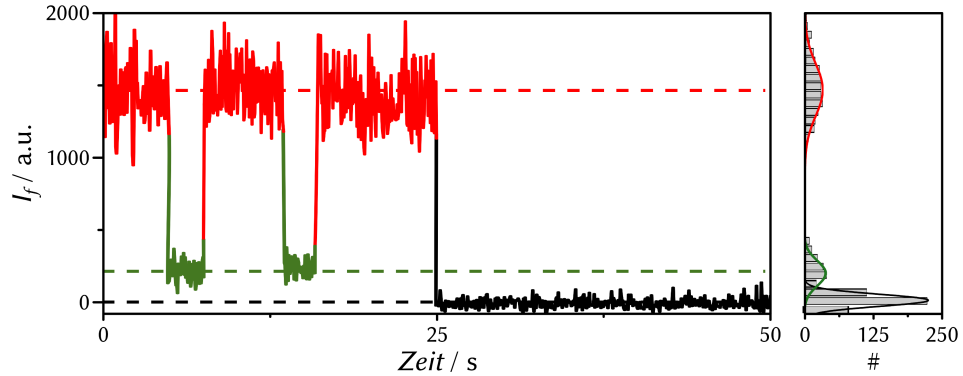
Ist die Messdauer ausreichend lange gewählt, findet man zunehmend Fluoreszenzspuren, die nicht nur zwei, sondern drei Zustände aufweisen. Solch eine Spur ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Zu Anfang der Spur wechselt das Molekül zwischen einem An- und einem Aus-Zustand (rot und grün). Bei etwa 25 Sekunden erfolgt ein einstufiger Bleichschritt, ab jetzt werden lediglich Hintergrundfluktuationen gemessen (schwarz). Die drei Zustände sind auch im zugehörigen Intensitätshistogramm auf der rechten Seite deutlich getrennt und wurden mit drei



**Abbildung 2.8.:** Einzelmoleküluntersuchung von Atto565-Bipy: **(a)** Intensitätsspuren einzelner, immobilisierter Sonden in PBS mit unterschiedlichen  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen, ohne (schwarz), 200 nm (grün), 1  $\mu\text{M}$  (rot), 5  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  (blau); **(b)** Autokorrelation der vier Spuren in **a**, die mit zunehmender  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration schnellere Fluktuationen zeigt; **(c)** Histogramm über die grüne Spur in **a**. Durch Anpassen von Gauß-Funktionen wurden so die mittleren Helligkeiten zweier Zustände und daraus die relative Quantenausbeute im gelöschten Zustand bestimmt.

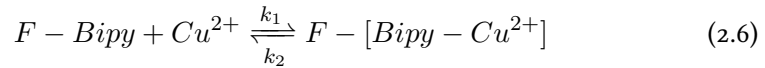
Gauß-Funktionen angepasst. Daraus erhält man für den An-Zustand eine Helligkeit von  $(1465.7 \pm 34.9)$ , für den Aus-Zustand  $(220.4 \pm 26.4)$  und für den Hintergrund schließlich  $(45.0 \pm 8.5)$  Counts.

Aus den Einzelmolekülspuren bei verschiedenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen wurden mit Hilfe eines im Arbeitskreis vorhandenen MATLAB-Programms die An- und Aus-Zeiten bestimmt. Dazu wurde für alle Spuren eines Videos ein globaler Schwellwertes gewählt, anhand dessen die Spur in diskret aufeinanderfolgende An- und Aus-Zustände aufgeteilt wurde. Die jeweilige Länge der einzelnen Zustände wurde in ein Histogramm überführt, welches in Abbildung 2.10a für die



**Abbildung 2.9.:** Beispielspur eines einzelnen Atto565-Bipy-Moleküls, das während der Aufnahmezeit irreversibel geblichen ist. Zu erkennen sind drei Zustände: der An-Zustand (rot), der Aus-Zustand (grün) und der gebleichte Zustand, in dem nur noch Hintergrundfluktuationen auftreten (schwarz).

An- und die Aus-Zeiten getrennt dargestellt ist. Die Messungen wurden bei  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen von 0.01, 0.2, 1 und 5  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Es wurden 157–169 einzelne Spuren analysiert und die Histogramme jeweils auf eins normiert. Für das schon in Kapitel 2.1 vorgestellte Zwei-Zustandssystem mit der Reaktionsgleichung



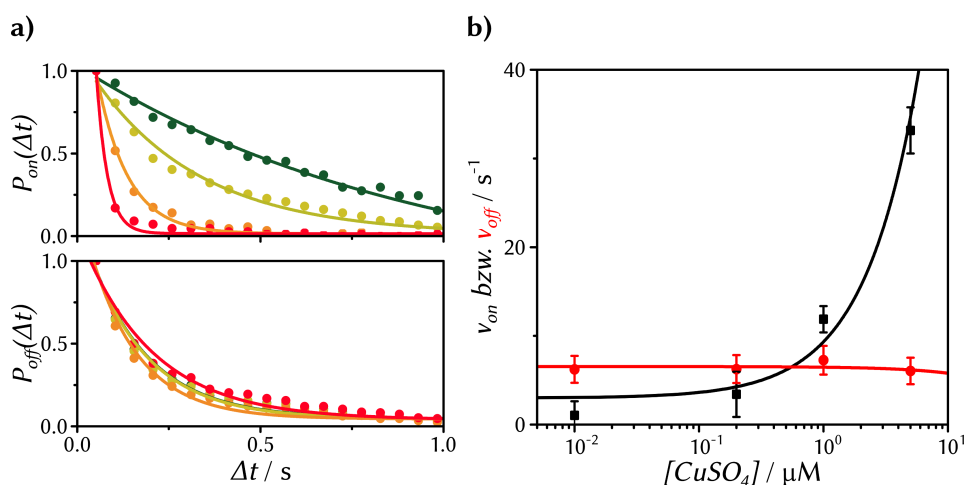
folgt für die im Einzelmolekülexperiment beobachtbaren Wahrscheinlichkeiten, das Molekül für ein diskretes Zeitintervall  $\Delta t$  in einem der beiden Zustände anzutreffen (für die Herleitung siehe Kapitel A.2):<sup>[147]</sup>

$$P_{an}(\Delta t) = \exp(-k_a[\text{Cu}^{2+}]\Delta t) = \exp(-v_{an}\Delta t) \quad (2.7)$$

$$P_{aus}(\Delta t) = \exp(-k_d\Delta t) = \exp(-v_{aus}\Delta t) \quad (2.8)$$

Mit Hilfe dieser beiden Gleichungen wurden die in Abbildung 2.10a gezeigten Histogramme angepasst und daraus die jeweiligen Übergangsraten bestimmt. Diese sind in Abbildung 2.10b gegen die entsprechenden  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen aufgetragen (zur Besseren Visualisierung wurde eine logarithmische Konzentrations-Achse gewählt). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aus-Raten  $v_{aus}$  unabhängig von der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration in Lösung sind (rot). Diese wurden daher für die Dis-





**Abbildung 2.10.:** Einzelmolekülanalyse des Blinkverhaltens von Atto565-Bipy: (a) Histogramm über die Länge der An-Zustände (oben) und Aus-Zustände (unten) von 157–169 immobilisierten Atto565-Bipy-Molekülen bei  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen von 10 nM (dunkelgrün), 200 nM (gelb), 1  $\mu\text{M}$  (orange) und 5  $\mu\text{M}$  (rot). Die Belichtungszeit lag bei 50 ms, die Laserleistung bei 2 mW. (b) Auftragung der aus a berechneten An- (schwarz) und Aus-Raten (rot) gegen die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration. Die Aus-Raten sind wie zu erwarten konzentrationsunabhängig, die An-Raten nehmen mit steigender  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration linear zu.

soziationsrate gemittelt zu einem Wert von  $k_d = (6.20 \pm 0.91) \text{ s}^{-1}$ . Die An-Raten steigen linear mit der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration an (schwarz). Eine lineare Anpassung lieferte für die Assoziationsrate einen Wert  $k_a = (6.33 \pm 0.94) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Daraus lässt sich nach

$$K = \frac{k_a}{k_d} \quad (2.9)$$

die Gleichgewichtskonstante zu  $K = (1.20 \pm 0.21) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  berechnen, sie liegt damit in der gleichen Größenordnung wie die aus Ensemble-Messungen bestimmten Konstanten und die aus Vorarbeiten erhaltenen Ergebnisse.

Eine äquivalente Untersuchung (siehe Abbildung D.1 im Anhang) für Atto565-DPA ergab für die Assoziationsrate  $k_a = (3.07 \pm 1.64) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und für die Dissoziationsrate  $k_d = (2.44 \pm 0.61) \text{ s}^{-1}$ . Daraus errechnet sich die Gleichgewichtskonstante zu  $K = (1.26 \pm 0.74) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , was etwa zwei Größenordnungen kleiner ist als der Literaturwert für den  $\text{Cu}^{2+}$ -Dipicolylamin-Komplex (et-

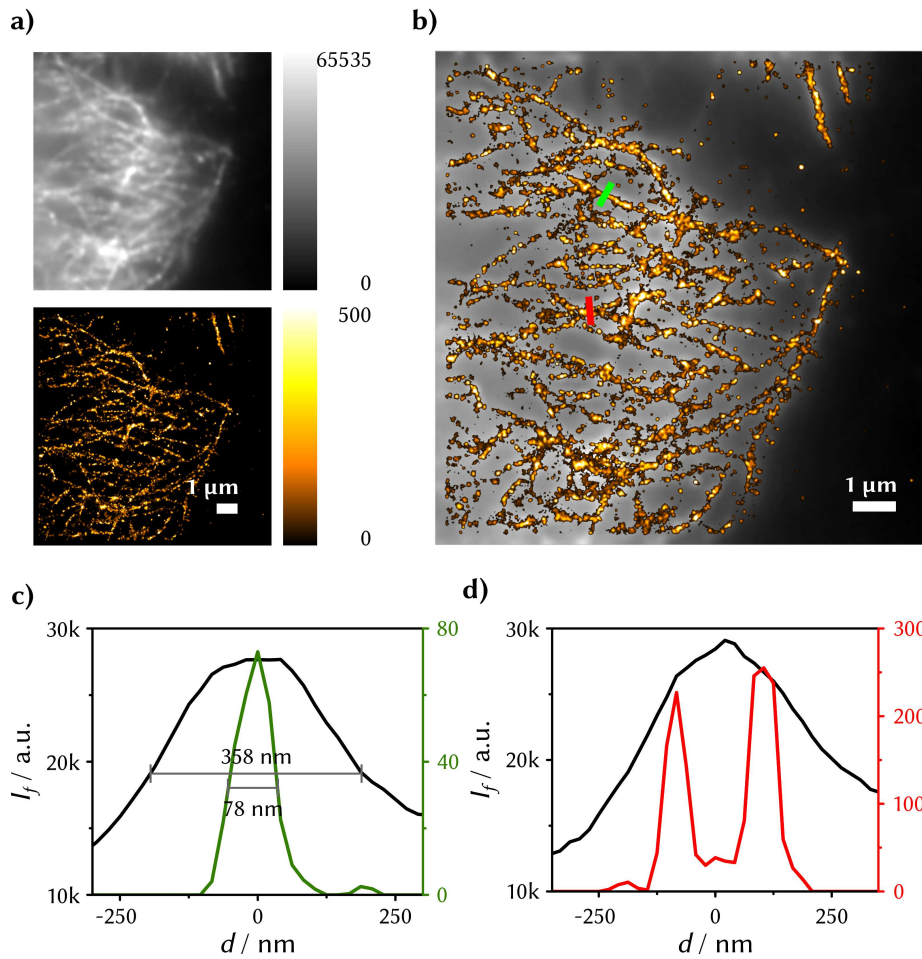
wa  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[158]</sup> Die lässt sich auf die chemische Modifikation am zentralen Stickstoff-Atom des Dipicolylamin-Liganden, über die der Ligand in die Sonde eingebaut ist, erklären. Außerdem hat die hohe Ladungsdichte an der DNA einen destabilisierenden Einfluss auf den Komplex.

Im Vergleich zu den in Kapitel 2.3 im Ensemble bestimmten Werten für die Komplexbildungskonstante weichen die aus Einzelmolekülexperimenten gewonnenen Werte um etwa eine halbe Größenordnung ab. Dabei wird für Atto565-Bipy der Wert im Vergleich zum Ensemblewert unterschätzt, für Atto565-DPA dagegen überschätzt. Generell stören in den Einzelmolekülexperimenten durch die Immobilisierung etwaige Verunreinigungen nur wenig, da nur die spezifisch interagierenden Sonden die Waschschritte überstehen. Auch unvollständig hybridisierte und damit nicht funktionale Sonden spielen nur eine untergeordnete Rolle, da diese schnell ausbleichen und so die Messung nicht signifikant verfälschen. In den Ensembleexperimenten hingegen wirken sich sowohl unvollständige Sonden als auch mögliche Verunreinigungen auf das Messergebnis aus. Zudem kann sich die Immobilisierung auch negativ auf die chemischen Sonden auswirken, wenn es zu ungewollten Interaktionen mit der Oberfläche oder den zur Immobilisierung verwendeten Proteinen kommt.

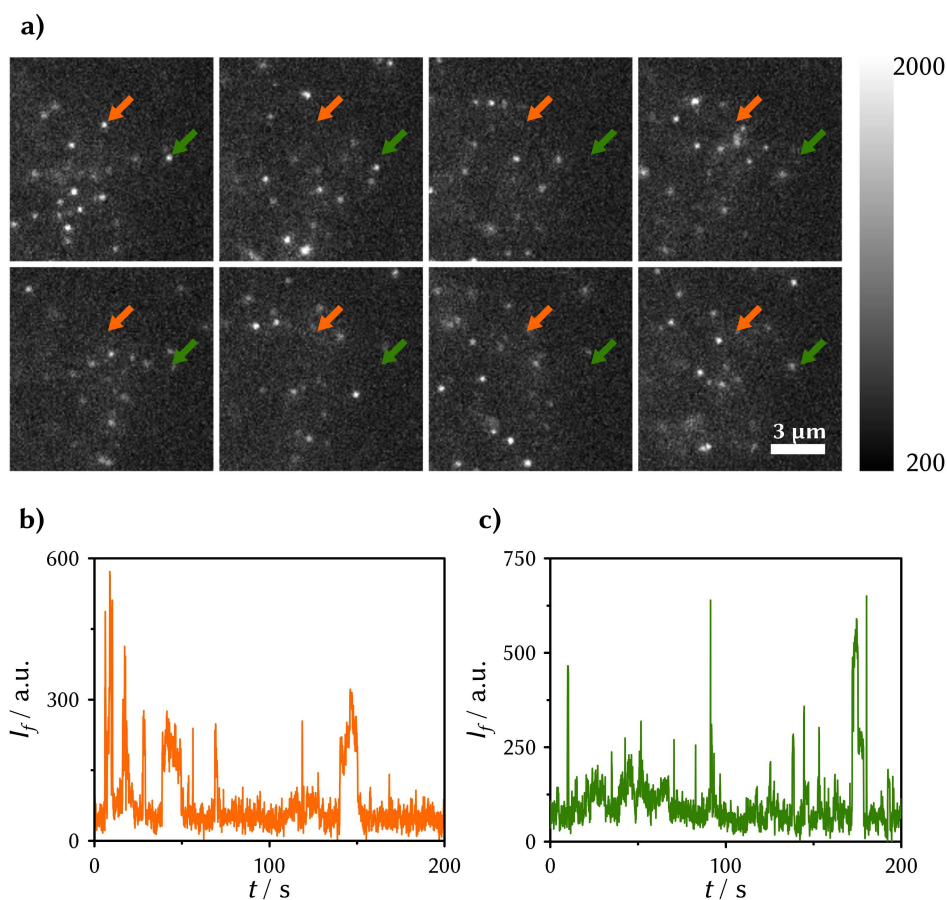
## 2.5. Hoch aufgelöste Mikroskopie: CHIRON - Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy

In Vorarbeiten wurde bereits das chemisch induzierte Blinken von TMR-Bipy zur hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie eingesetzt.<sup>[43]</sup> In dieser Arbeit wurden auch die mit Dipicolylamin modifizierten chemischen Schalter hierzu eingesetzt. Die zugehörigen Experimente werden im Folgenden vorgestellt. Zum Einsatz kam hierbei Atto565-DPA in HeLa-Zellen, in denen Mikrotubuli mit einem anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin Antikörper und Streptavidin markiert waren. Die Zellen wurden an einem selbstgebauten Mikroskop unter TIRF-Beleuchtung betrachtet, was eine Detektion einzelner, blinkender Moleküle mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis gewährleistete. Außerdem sorgt die große Einschränkung der Anregung in axialer Richtung für eine enorme Reduzierung von Hintergrund aus tieferen Schichten der Zelle, da nur die im evaneszenten Feld liegenden Filamente direkt oberhalb der Glasoberfläche abgebildet wurden.

Für die Aufnahme wurde ein Laser mit 532 nm bei einer Anregungsleistung von 2 mW verwendet und die Fluoreszenz eines  $128 \times 128$  Pixel großen Ausschnitts am Rande einer Zelle für etwa 200 s (10 000 Bilder bei einer Belichtungszeit von 50 ms) aufgenommen. Die Zellen wurden dazu in 10 mM MOPS-Puffer



**Abbildung 2.11.:** Lokalisations-Experiment in markierten HeLa-Zellen: (a) Mikrotubuli wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin, Streptavidin und Atto565-DPA markiert. Die Zellen wurden in 10 mM MOPS-Puffer in Anwesenheit von  $15 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  mikroskopiert. Es wurde bei 532 nm mit einer Leistung von 2 mW angeregt und ein Video von 10 000 Bildern bei 20 Hz aufgenommen. Es ist das Summenbild (oben) über das gesamte Video sowie das Lokalisationsergebnis, welches mit der frei verfügbaren Software „rapidSTORM“ erstellt wurde (unten) dargestellt. (b) Überlagerung des beugungsbegrenzten Summenbilds mit dem Lokalisationsbild. Die Profile entlang der grünen und roten Linie sind in (c) und (d) abgebildet. Das einzelne Mikrotubuli in c wird mit einer Halbwertsbreite von 78 nm abgebildet, die beiden Filamente in d sind 178 nm voneinander entfernt.



**Abbildung 2.12.:** Einzelbilder aus dem Abbildung 2.11 zugrunde liegenden Video: (a) Dargestellt sind die Einzelbilder 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600 und 8700. Es sind die Positionen zweier in Bild 8000 fluoreszierenden Moleküle farblich markiert. Der Intensitätsverlauf über das gesamte Video an diesen Punkten ist in (b) und (c) dargestellt.

bei einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von  $15 \mu\text{M}$  vermessen. Bei dieser Konzentration befinden sich die meisten Sonden im Aus-Zustand und die Länge der An-Zustände entspricht etwa der Belichtungszeit, wodurch blinkende Moleküle jeweils in etwa ein bis zwei aufeinander folgenden Bildern abgebildet werden.

Vom so entstandene Video wurde nun einerseits ein Summenbild generiert, was in Abbildung 2.11a oben dargestellt ist. Außerdem wurde mithilfe der Software „rapidSTORM“ von STEVE WOLTER ein Lokalisationsbild erstellt (Abb. 2.11a un-

ten). Dazu wird ein Schwellwert gewählt, über dem ein Signal als positiv gewertet wird. Die Software entscheidet dann anhand der Elliptizität und Größe, ob es sich um das Abbild eines einzelnen Moleküls handelt. Von allen positiv gefundenen Molekülen wird anschließend das jeweilige Zentrum auf Sub-Pixel-Genauigkeit bestimmt (hier mit einer Sub-Rastergröße von 30 nm/Pixel). Über alle Bilder des Videos werden alle gefundenen Lokalisationen zu einem hoch aufgelösten Bild zusammengefasst.

In Abbildung 2.11b ist eine Überlagerung der beiden Bilder gezeigt, die verdeutlicht, dass die meisten Filamente im Lokalisationsbild auftauchen. Entlang der roten und grünen Linie sind zudem die Profile des beugungsbegrenzten und hoch aufgelösten Bildes ausgelesen worden (Abbildung 2.11c+d). Das Filament in 2.11c hat im beugungsbegrenzten Bild eine Halbwertsbreite von 358 nm, im hoch aufgelösten Bild nimmt sie auf 78 nm ab. Dies ist etwa 10 nm mehr als die für die hier angewandte Markierungsstrategie erwartete Maximalauflösung (vergleiche dazu Abbildung D.6 im Anhang). In 2.11d ist eine Stelle ausgewählt, die im beugungsbegrenzten Bild als ein Filament erscheint. Im hoch aufgelösten Bild wird jedoch deutlich, dass es sich hier um zwei parallel laufende, nahe beieinander liegende Mikrotubuli mit einem Abstand von 178 nm handelt.

Die hier in hoher Auflösung abgebildeten Mikrotubuli scheinen jedoch nicht vollständig intakt zu sein, im Lokalisationsbild in Abbildung 2.11a ist eine bruchstückhafte Rekonstruktion zu erkennen. Dies liegt vermutlich nicht an der Probenpräparation, sondern ist entweder auf eine unvollständige Markierung oder auf ein Artefakt der Lokalisationstechnik zurückzuführen.<sup>[159]</sup> Selbst bei durchgängiger Markierung wirkt sich eine Dissoziation des DNA-Doppelstrangs auf das Blinkverhalten der Sonden aus, was unvollständige Lokalisationsbilder erzeugt. Zudem kann auch die Restfluoreszenz von Atto565-DPA einen Grund für Artefakte darstellen, da bei sehr dichter Markierung etwa zehn gelöschte chemische Schalter, die sich im Abstand der Beugungsgrenze zueinander befinden, auf Grund ihrer Restfluoreszenz wie eine nicht gelöschte Sonde abgebildet werden. Aufgrund dieser Limitierungen besteht die Notwendigkeit, das existierende Sondenkonzept zu überarbeiten.

Aus dem Video, das Abbildung 2.11 zu Grunde liegt, wurden acht Einzelbilder aus dem letzten Fünftel des Videos ausgewählt, die in Abbildung 2.12a dargestellt sind. Hier ist gut zu erkennen, dass in der Zelle jeweils wechselnde, einzelne Moleküle mit gutem Signal-Hintergrund-Verhältnis erkennbar sind. Die Position zweier dieser Moleküle, die in Bild 8000 fluoreszieren, ist jeweils mit dem roten und grünen Pfeil markiert. An diesen Punkten wurde die Fluoreszenzintensität (mittlere Intensität eines Kreises mit Radius 3 Pixel) über das ganze Video ausgelesen, was in Abbildung 2.12b für den roten Pfeil und 2.12c für den grünen Pfeil dargestellt ist. An beiden Positionen kommt es mehrmals zu deutlichen Fluoreszenz-

fluktuationen. Die unterschiedliche Intensität der einzelnen Fluktuationen rührt daher, dass nicht alle fluoreszierenden Moleküle exakt an der Beobachtungsstelle liegen und daher manchmal nur ein Teil ihrer Fluoreszenz ausgelesen wird.

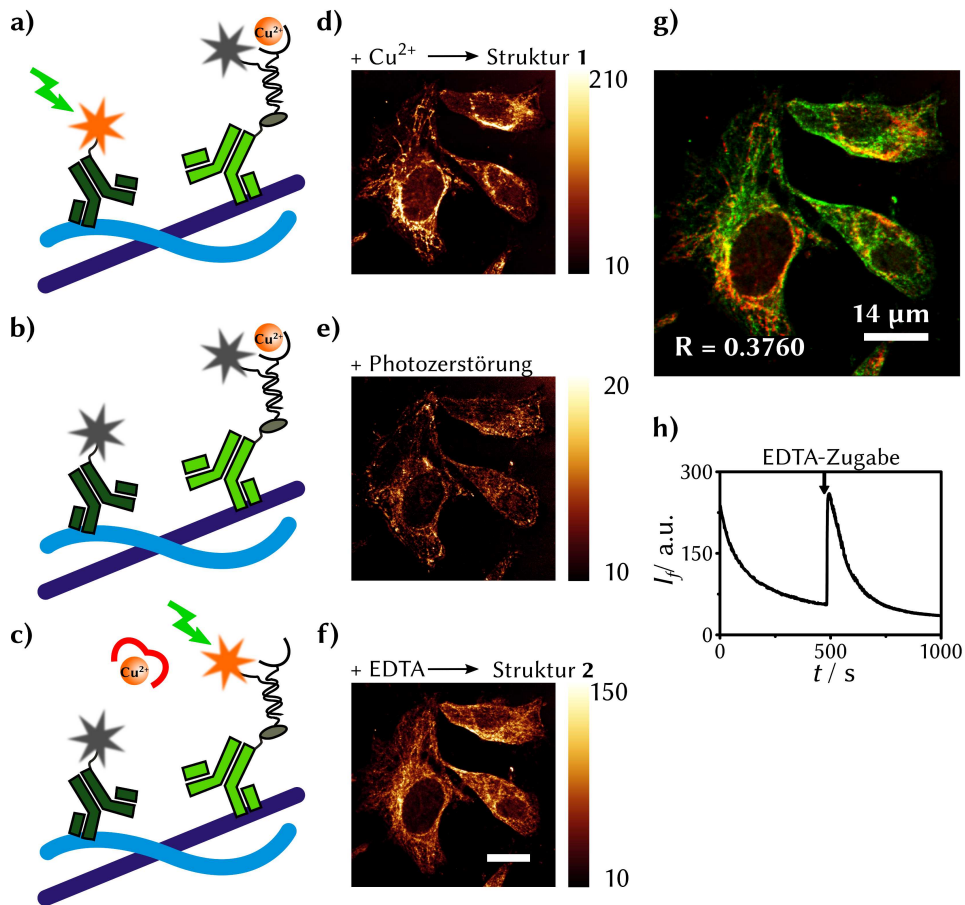
## 2.6. Chemisches Multiplexing

*Die Ergebnisse des folgenden Unterkapitels sind in BROX et al.<sup>[150]</sup> veröffentlicht worden. Die Darlegung folgt daher im Wesentlichen der Argumentation der Publikation.*

Die Experimente im folgenden Unterkapitel zeigen eine weitere Anwendungsmöglichkeit der chemischen Schalter auf: die aberrationsfreie mikroskopische Aufnahme von mehr als einer markierten Struktur in nur einem Farbkanal. Die Methode wird durch Kolo-kalisation ein und derselben Struktur validiert und ihre Limitierungen ausgeleuchtet. Des Weiteren werden verschiedene zelluläre Strukturen abgebildet und die Methode auf zwei Farben und damit vier Strukturen ausgeweitet. Zusätzlich wird die prinzipielle Eignung der Methode mit anderen, hoch auflösenden Mikroskopietechniken am Beispiel der STED-Mikroskopie demonstriert.

### Ein-Farben-Multiplexing

Um die Möglichkeiten des chemischen Multiplexing aufzuzeigen, wurden zweifach markierte HeLa-Zellen verwendet. In einem ersten Experiment wurden zwei Typen von Strukturfilamenten mit Fluoreszenzfarbstoffen der gleichen Farbe markiert. Mikrotubuli wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin, Streptavidin und TMR-Bipy markiert. Zusätzlich wurden Vimentin-Intermediärfilamente mit anti-Vimentin-TMR markiert. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 2.13 dargestellt. In 2.13a-c sind Markierung und sequentielle Aufnahme skizziert. Die beiden Strukturen sind in dunkelblau (Mikrotubuli) und hellblau (Vimentin) dargestellt. Die jeweiligen Primär-Antikörper (hellgrün: anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin, dunkelgrün: anti-Vimentin-TMR) binden spezifisch an ihre Zielproteine. Über Streptavidin wurde TMR-Bipy an die biotinylierten Antikörper gebunden. Da die Bindungen alle stark genug sind (für Antikörper liegen die Assoziationskonstanten  $K_a$  im Bereich von  $10^8$ – $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , für Streptavidin-Biotin sind es etwa  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ), konnten die so markierten Zellen gut von freien, nicht gebundenen Proteinen oder der Sonde durch mehrmaliges Waschen befreit werden.<sup>[160]</sup> In Abbildung 2.13d-f sind drei konfokalen Fluoreszenzbilder solch einer doppelt markierten Zelle gezeigt. Die Fluoreszenz wurde bei 550 nm angeregt und mit einer PMT im Bereich von 560–620 nm detektiert.



**Abbildung 2.13.:** Chemisches Multiplexing in doppelt markierten HeLa-Zellen. Mikrotubuli (dunkelblau) wurden mit biotinylierten anti- $\alpha$ -Tubulin-Primärantikörpern (hellgrün), Streptavidin (grau) und TMR-Bipy, Vimentin (hellblau) mit anti-Vimentin-TMR Primärantikörpern (dunkelgrün) markiert. (a) TMR-Bipy an Mikrotubuli ist durch Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  ausgeschaltet, sodass lediglich Vimentin abgebildet wird. (b) Nach Photozerstörung verbleibt eine geringe Restfluoreszenz. (c) Durch Zugabe von EDTA (rot) wird schließlich das  $\text{Cu}^{2+}$  entfernt und die Fluoreszenz von TMR-Bipy wieder angeschaltet, sodass die Mikrotubuli abgebildet werden können. (d-f) Die zu a-c zugehörigen konfokalen Fluoreszenzbilder zeigen die Intensitätsabnahme durch Photozerstörung um den Faktor zwölf sowie einen acht-fachen Fluoreszenzanstieg nach EDTA-Zugabe. (g) Falschfarbenbild aus d und e mit dem zugehörigen Pearson-Korrelationskoeffizienten  $R$ . (h) Das Profil der mittleren Intensität einer Zelle über die Zeit zeigt in einem entsprechenden Experiment das Photobleichen und den spontanen Intensitätsanstieg nach EDTA-Zugabe.

In 2.13d ist lediglich Vimentin (Struktur 1) sichtbar, da die chemischen Schalter an den Mikrotubuli (Struktur 2) durch Verwendung einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von  $20\ \mu\text{M}$  ausgeschaltet waren. Nach einiger Zeit bei konstanter Laserbelichtung<sup>1</sup> sind alle Farbstoffe durch Photozerstörung irreversibel gebleichen, sodass lediglich die schwache Fluoreszenz der gelöschten chemischen Schalter an den Mikrotubuli abgebildet wurde (2.13e). Nach Zugabe von  $50\ \mu\text{M}$  EDTA wurde die Fluoreszenz der chemischen Schalter durch Entfernung des  $\text{Cu}^{2+}$  wieder eingeschaltet und konnte abgebildet werden (2.13f). Aus den beiden Bildern in 2.13d+f wurde ein Falschfarbenbild generiert, welches in 2.13g dargestellt ist (Mikrotubuli: grün, Vimentin: rot). Die hier gewählten Strukturen beanspruchen teilweise den gleichen Raum, was in den gelben Bereichen der Zelle deutlich wird. Es gibt aber auch große Bereiche der Zelle, in denen jeweils nur eine Struktur vorliegt. Um das Maß an Kolo-kalisation der beiden Strukturen quantifizieren zu können, wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient  $R$  berechnet (Gl. 2.10). Hierbei wird die Intensität der beiden Bilder in 2.13g Pixelweise verglichen. Korrelieren die beiden Bilder, nimmt  $R$  einen Wert von 1 an, sind sie anti-korreliert, wird  $R = -1$ . Existiert keine Korrelation, wird  $R = 0$ .

$$R = \frac{\sum_m \sum_n (A_{nm} - \bar{A})(B_{mn} - \bar{B})}{\sqrt{\sum_m \sum_n (A_{mn} - \bar{A})^2 \sum_m \sum_n (B_{mn} - \bar{B})^2}} \quad (2.10)$$

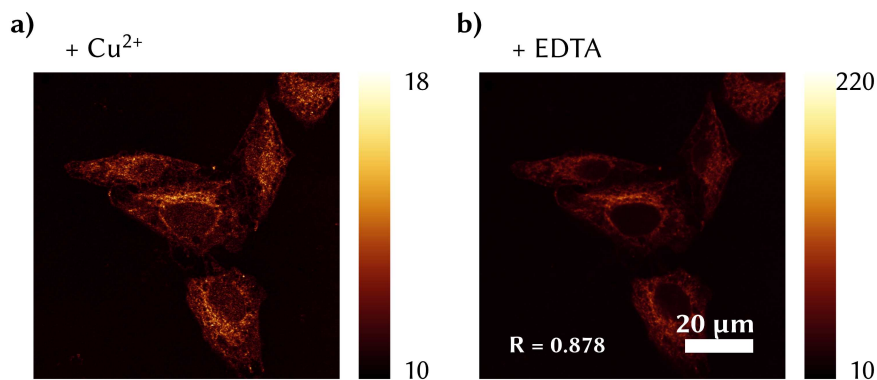
Hier sind A und B die beiden zu vergleichenden Bilder,  $A_{nm}$  und  $B_{nm}$  die jeweiligen Intensitätswerte für Pixel in Zeile  $n$  und Spalte  $m$ ,  $\bar{A}$  und  $\bar{B}$  sind die jeweiligen mittleren Intensitäten der beiden Bilder. Für die beiden hier gewählten Strukturen, Mikrotubuli und Vimentin-Filamente, erhält man einen Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.376$ . Die beiden Bilder zeigen also eine mäßige Korrelation. Da beide Filament-Sorten im Zellinneren einen ähnlichen Raum beanspruchen, ist diese Korrelation nicht ungewöhnlich.

Darüber hinaus wurde der Intensitätsverlauf einer markierten Zelle über die Zeit ausgelesen (die Daten stammen aus einem Experiment, das auf einem Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt wurde), was in Abbildung 2.13h dargestellt ist. Zu Beginn des Experiments nimmt die Fluoreszenz mono-exponentiell mit der Zeit ab. Nach etwa 500 Sekunden wurde EDTA zugegeben, was zu einem sofortigen Fluoreszenzanstieg auf etwa das Ausgangsniveau führte.

In einem Kontrollexperiment wurde das Übersprechen der Restfluoreszenz des gelöschten TMR-Bipy untersucht, wie in Abbildung 2.14 dargestellt ist. Hier wurden in HeLa-Zellen lediglich Mikrotubuli mit TMR-Bipy (anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin,

<sup>1</sup>Es wurden fünf Laserlinien bei 518 nm, 526 nm, 534 nm, 542 nm und 550 nm zum schnelleren Ausbleichen von Struktur 1 verwendet. Insgesamt wurde für etwa 2–3 min gebleichen.

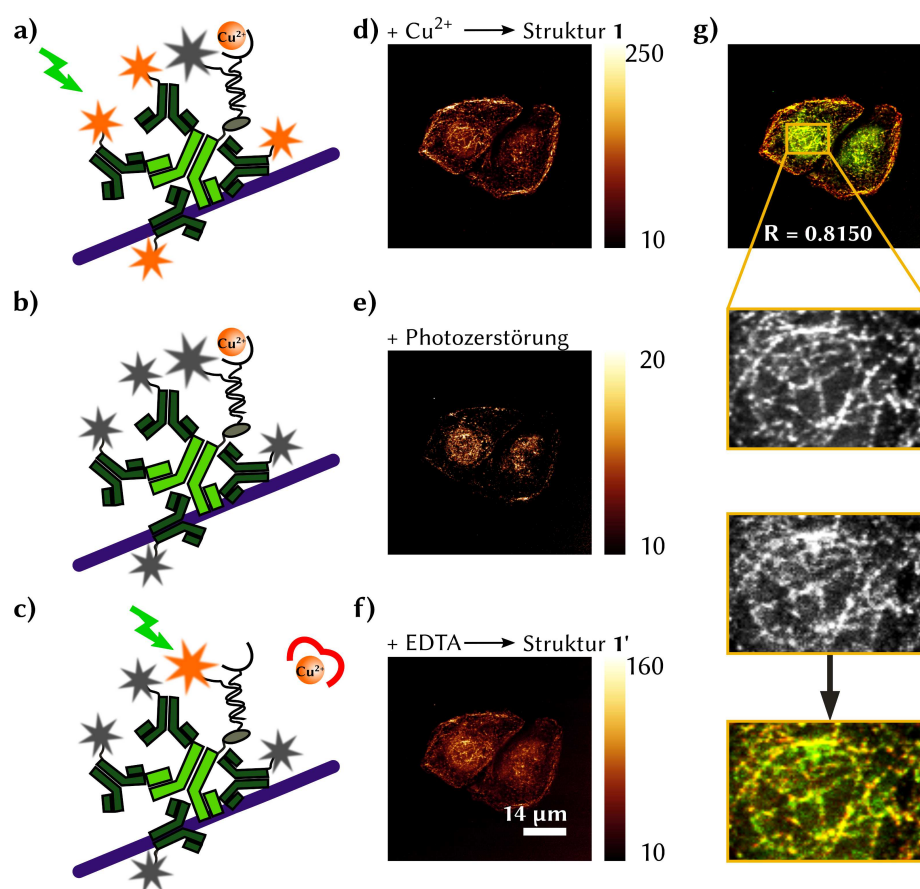




**Abbildung 2.14.:** Kontrollexperiment zum chemischen Multiplexing: eine HeLa-Zelle wurde mit biotinyliertem anti- $\alpha$ -Tubulin, Streptavidin und TMR-Bipy markiert. (a) In Anwesenheit von  $25 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  wird nur die Restfluoreszenz der gelöschten Sonde abgebildet. (b) Nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  EDTA erfolgt ein 12-facher Intensitätsanstieg.

Streptavidin, TMR-Bipy) markiert. Unter den normalen Messbedingungen – bei  $25 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  in PBS-Puffer – wurde die Fluoreszenz der gelöschten Sonden (2.14a) und der Sonden nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  EDTA (2.14b) abgebildet. Auch hier zeigt sich ein Fluoreszenzanstieg um etwa den Faktor 12. Der berechnete Korrelationskoeffizient von  $R = 0.878$  zeigt ebenfalls deutlich, dass hier die selben Strukturen abgebildet werden. Dass keine perfekte Korrelation vorliegt, lässt sich auf die sehr verschiedenen Gesamtintensitäten der Bilder zurückführen.

Zur Validierung des chemischen Multiplexing mit TMR-Bipy wurde in HeLa-Zellen eine Struktur doppelt markiert. Die Mikrotubuli wurden zum einen mit biotinylierten anti- $\alpha$ -Tubulin-Primärantikörpern, Streptavidin und TMR-Bipy, zum anderen mit TMR-markierten anti-Maus-Sekundärantikörpern markiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.15 dargestellt. Das Experiment wurde in PBS-Puffer durchgeführt, hier schaltet  $\text{Cu}^{2+}$  die Fluoreszenz von TMR-Bipy aus, sodass lediglich die TMR-Sekundärantikörper fluoreszieren (2.15a). Nach Photozerstörung der Farbstoffe bleibt nur eine geringe Restfluoreszenz übrig (2.15b), und Zugabe von EDTA (rot) entfernt schließlich das  $\text{Cu}^{2+}$  und schaltet die Fluoreszenz von TMR-Bipy wieder an (2.15c). Die zugehörigen Fluoreszenzbilder in Abbildung 2.15d-f zeigen das Ausbleichen der Fluoreszenz um etwa den Faktor zehn sowie einen etwa achtfachen Fluoreszenzanstieg nach EDTA-Zugabe. In Abbildung 2.15g ist die Überlagerung von 2.15d+f dargestellt. Hier sieht man, im Gegensatz zum Falschfarbenbild in Abbildung 2.13g, eine sehr gute Überlagerung der beiden



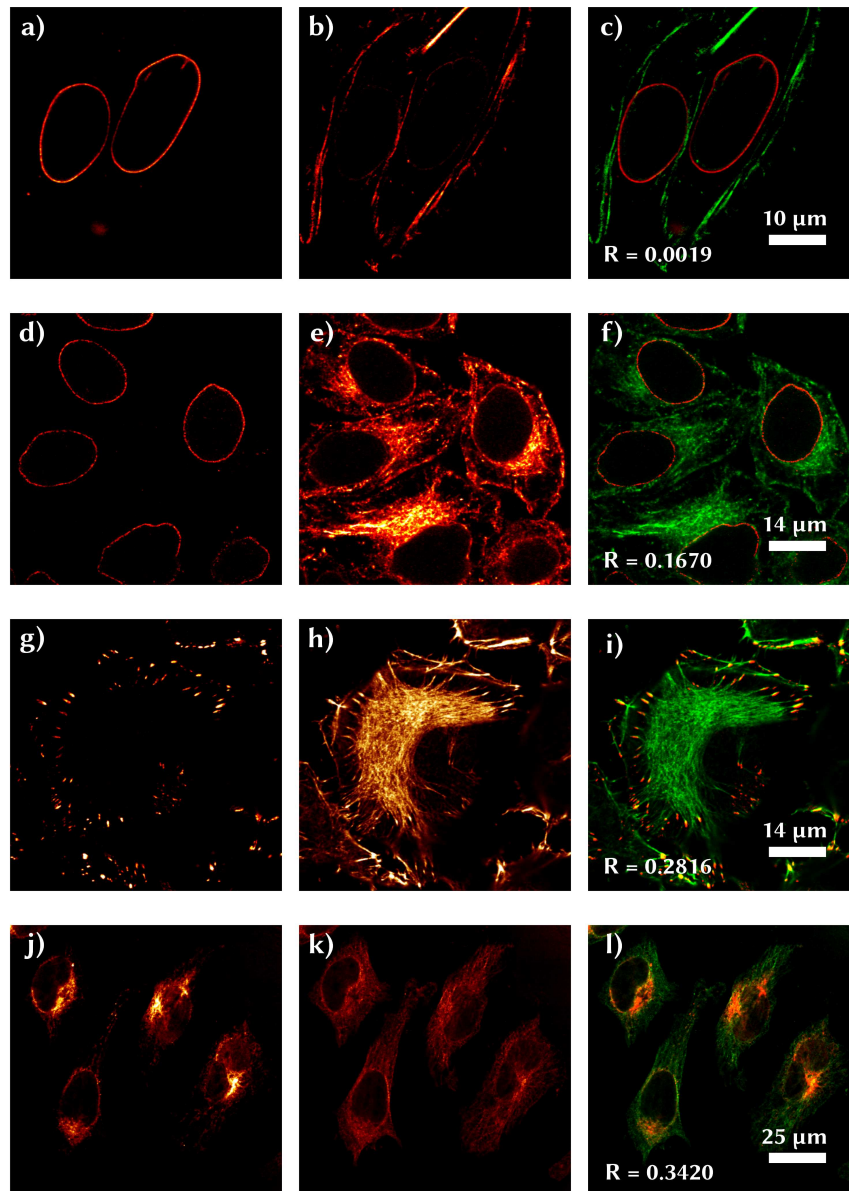
**Abbildung 2.15.:** Validierung des chemischen Multiplexing: Microtubuli (dunkelblau) wurden doppelt markiert, zum Einen mit biotinylierten Primärantikörpern (hellgrün), Streptavidin (grau) und TMR-Bipy, zum Anderen mit TMR-markierten Sekundärantikörpern (dunkelgrün). (a) Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  schaltet TMR-Bipy aus, sodass lediglich die TMR-Sekundärantikörper fluoreszieren. (b) Nach Photozerstörung der Farbstoffe bleibt nur eine geringe Restfluoreszenz übrig. (c) Zugabe von EDTA (rot) entfernt schließlich das  $\text{Cu}^{2+}$  und schaltet die Fluoreszenz von TMR-Bipy wieder an. (d-f) Die zu a-c zugehörigen konfokalen Fluoreszenzbilder zeigen das Ausbleichen der Fluoreszenz um etwa den Faktor zehn sowie einen etwa achtfachen Fluoreszenzanstieg nach EDTA-Zugabe. (g) Aus d und f wurde ein Falschfarbenbild erstellt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt eine gute Kollokalisierung der beiden Markierungen.

Strukturen. Auch der Korrelationskoeffizient von  $R = 0.815$  zeigt das. Im vergrößerten Ausschnitt ist ein kleiner Teilbereich der Zelle gezeigt. Hier sind praktisch die gleichen Filamente zu Beginn und am Ende des Experiments sichtbar.

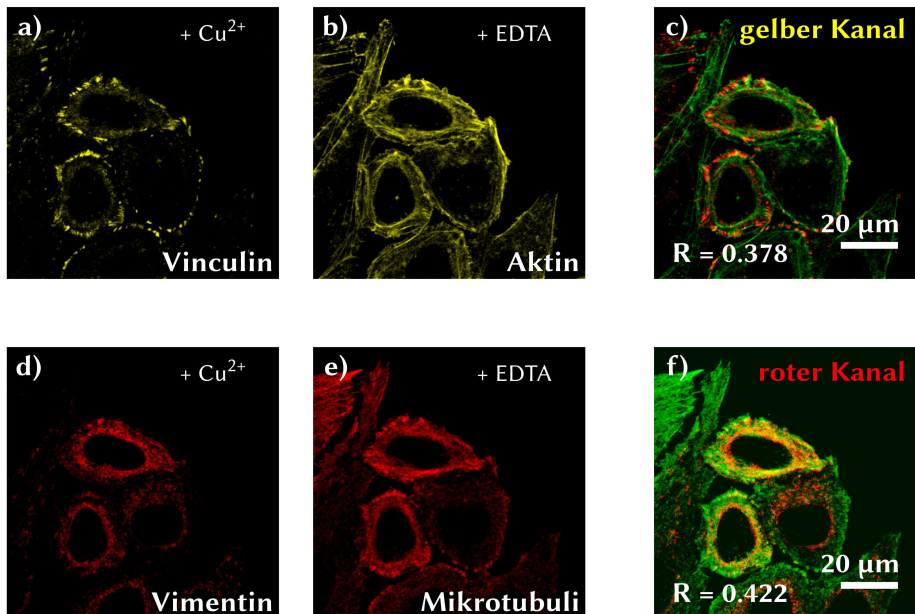
Nachdem die Grenzen des chemischen Multiplexing ausgelotet waren, wurden nun verschiedenste zelluläre Strukturen abgebildet. Hierzu wurden sowohl Mikrotubuli als auch Aktin-Filamente mit TMR-Bipy markiert, zusätzlich wurden nukleare Lamina (Lamin,<sup>[161]</sup> ein Protein, das im Zellkern eine stützende Funktion inne hat), Intermediärfilamente (Vimentin,<sup>[162]</sup> ein Protein welches Organellen im Zytosol verankert), und fokale Adhäsionspunkte (Vinculin,<sup>[163]</sup> ein Strukturprotein, das unter anderem in Fokalkontakt-Komplexen vorkommt) ausgewählt. Diese Experimente sind in Abbildung 2.16 dargestellt. Die erste Spalte ist jeweils das Bild der direkten Markierung, in der zweiten Spalte sind die mit den chemischen Schaltern erzeugten Bildern dargestellt. Die dritte Spalte beinhaltet die zugehörigen, überlagerten Falschfarbenbilder. 2.16a-c ist Lamin neben Aktin abgebildet worden. Diese beiden Strukturen überlappen räumlich so gut wie nicht. Das schlägt sich in einem Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.002$  wieder. Die Aufnahme von Lamin und Tubulin in 2.16d-f zeigt etwas mehr Überlapp, da die Mikrotubuli vom Zellkern ausgehen. Hier ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.167$ . In 2.16g-h ist Vinculin und Aktin dargestellt. Diese Strukturen überlappen deutlich. Das markierte Vinculin liegt jeweils am Ende eines Aktin-Filaments. Es ergibt sich so ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.286$ . Zuletzt wurden ein weiteres Mal Vimentin und Tubulin gleichzeitig markiert (Abb. 2.16j-l), was auch hier einen Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.342$  liefert, da beide Proteinfilamente einen ähnlichen Raum in der Zelle beanspruchen.

### Zwei-Farben-Multiplexing

Des Weiteren wurden auch echte Zwei-Farben-Experimente durchgeführt, wobei durch das chemische Multiplexing hier insgesamt vier Strukturen in einem Experiment abgebildet wurden. Es kamen zwei chemische Schalter zum Einsatz, TMR-Bipy und Att647N-Bipy, sowie direkt markierte anti-Vinculin-TMR und anti-Lamin-Atto647N-Antikörper. Die Zellen wurden sequentiell mit den chemischen Schaltern markiert. Zuerst wurden Mikrotubuli mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin, Streptavidin und Atto647N-Bipy markiert, wonach noch verbleibende freie Biotin-Bindungsstellen zur Vermeidung von Kreuzmarkierungen mit einer 1 mM Biotin-Lösung blockiert wurden. Danach wurde mit Phalloidin-Biotin und TMR-Bipy markiert und schließlich die beiden farbstoffmarkierten Antikörper angebracht. Die so markierten Zellen wurden dann in zwei getrennten Farbkanälen am konfokalen SP5X vor und nach Photobleichen und Zugabe von EDTA abgebildet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.17 dargestellt. Insgesamt sind die Bilder vor al-



**Abbildung 2.16.:** Chemisches Multiplexing: konfokale Fluoreszenzaufnahmen der direkt markierten Strukturen (linke Spalte), der mit dem chemischen Schalter markierten Struktur (mittlere Spalte) sowie das zugehörige Falschfarbenbild inklusive der entsprechenden Pearson-Korrelationskoeffizienten  $R$  (rechte Spalte). (a-c) Lamin und Aktin, (d-f) Lamin und  $\alpha$ -Tubulin, (g-i) Vinculin und Aktin, (j-l) Vimentin und  $\alpha$ -Tubulin.



**Abbildung 2.17.:** Zwei-Farben Multiplexing mit TMR und Atto647N: konfokale Fluoreszenzaufnahmen, direkt markierte Strukturen (links), mit dem chemischen Schalter markierte Struktur (mitte) sowie das zugehörige Falschfarbenbild inklusive Pearson-Korrelationskoeffizienten  $R$  (rechts). (a-c) Fluoreszenzbilder im gelben Kanal (560-620 nm) zeigen anti-Vinculin-TMR (a) und Phalloidin-Biotin, Streptavidin und TMR-Bipy (b) sowie das Falschfarbenbild (c) mit dem zugehörigen Pearson-Korrelationskoeffizienten  $R$ . (d-f) Fluoreszenzbilder im roten Kanal (660-720 nm) zeigen anti-Lamin-Atto647N (d) und anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin, Streptavidin und Atto647N-Bipy (e) sowie das zugehörige Falschfarbenbild (f) mit dem zugehörigen Pearson-Korrelationskoeffizienten  $R$ .

lem im roten Kanal deutlich verrauschter als beim Ein-Farben-Multiplexing, was auf die viel aufwendigere Markierungsprozedur und ein nicht zu vernachlässigendes Übersprechen der TMR-Farbstoffe in den Atto647N-Kanal zurückzuführen ist. Prinzipiell ist aber auch eine Drei-Farben-Anwendung unter Zuhilfenahme eines Farbstoffpaares im blauen Teil des sichtbaren Spektralbereichs denkbar, darauf wurde hier aber verzichtet, da die chemischen Schalter in diesem Farbbereich deutlich schlechtere Eigenschaften aufweisen.

### STED-Multiplexing

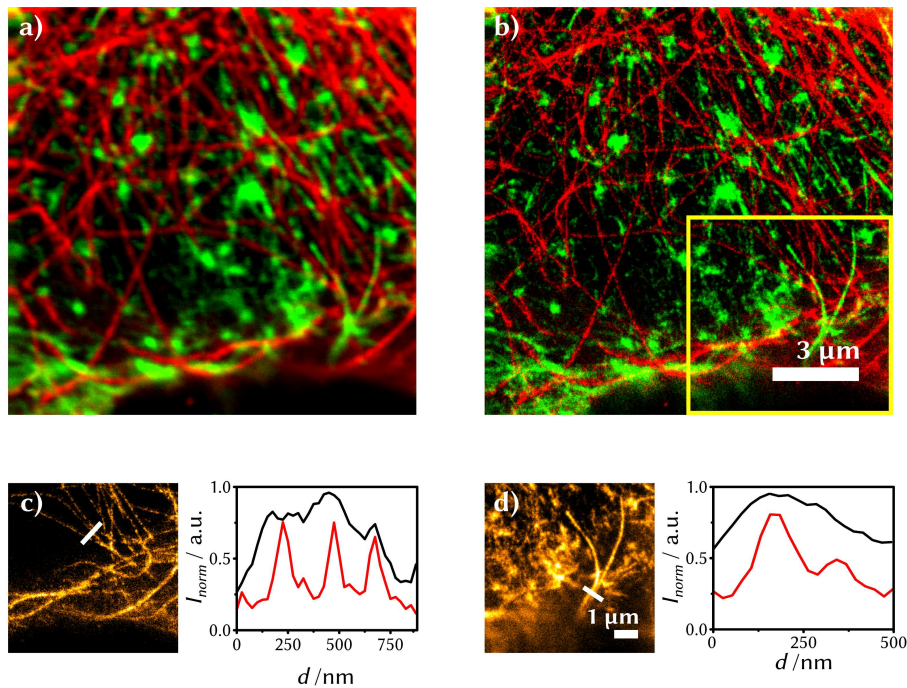
Der Einsatz chemischer Schalter ermöglicht auch das Abbilden zweier Strukturen in einem Experiment an einem einfachen Ein-Farben-STED-Mikroskop. Hier kann in einfacher Art und Weise ein Zwei-Farben-Experiment in hoher Auflösung durchgeführt werden, ohne dafür das bestehende Mikroskop manipulieren zu müssen. Da die Messungen meist sowieso zeitintensiv sind, ist die erforderliche sequentielle Aufnahme der beiden Strukturen nicht von Nachteil.

Die hier gezeigten Experimente wurden im Arbeitskreis von Prof. STEFAN HELL mit Hilfe von Dr. JOHANN ENGELHARDT durchgeführt. Als chemischer Schalter wurde für diese Experimente Atto565-Bipy gewählt. Die Auflösung in der STED-Mikroskopie hängt direkt von der verwendeten Leistung des STED-Lasers ab, daher muss ein entsprechend photostabiler Farbstoff gewählt werden, um trotz erhöhtem Photobleichen eine dichte Markierung zu gewährleisten. Da Atto565 eine deutlich bessere Photostabilität als TMR besitzt, fiel die Wahl auf diesen Farbstoff. Außerdem ist eine schnelle und möglichst vollständige Wiederherstellung der gelöschten Fluoreszenz der chemischen Schalter vonnöten, weshalb die Bipyridin-Sonde zum Einsatz kam.

Für die Experimente wurden doppelt markierte HeLa-Zellen eingesetzt, die eine besonders dichte Markierung erforderten. Deshalb wurde hier die Aktinfilamente mit der Atto565-Bipy-Sonde über Phalloidin-Biotin und Streptavidin markiert. Die zweite Struktur wurde zur Signalverstärkung indes mit anti- $\alpha$ -Tubulin-Primärantikörpern und anti-Maus-Atto565-Sekundärantikörpern markiert.

Diese Experimente wurden in PBS bei einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  durchgeführt. Es kam eine Anregungslinie von  $532 \text{ nm}$  sowie eine starke STED-Linie von  $654 \text{ nm}$  zum Einsatz. Das Mikroskop lieferte gleichzeitig ein reguläres, beugungsbegrenztes konfokales Bild sowie ein STED-Bild. Nach Aufnahme des ersten Bildes wurde das Gesichtsfeld für einige Minuten sowohl mit dem Anregungs- als auch mit dem STED-Laser bestrahlt, bis fast keine Fluoreszenz mehr sichtbar war. Dann wurde nach Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  EDTA-Lösung ein weiteres Bild aufgenommen. Die überlagerten konfokalen und STED-Bilder sind in Abbildung 2.18a-b dargestellt, wobei bereits beim bloßen Betrachten der Auflösungsunterschied erkennbar ist. Deutlicher wird dies bei der Detailansicht des gelben Kastens (Abb. 2.18c-d). Hier ist jeweils der Ausschnitt aus dem STED-Bild der direkten Markierung in 2.18c und der schaltbaren Markierung mit Atto565-Bipy in 2.18d abgebildet, entlang der jeweiligen weißen Linie sind jeweils die Profile des konfokalen und des STED-Bildes verglichen. Im Falle der Mikrotubuli werden im STED-Bild drei einzelne Filamente sichtbar, die im konfokalen Bild nur eine breite Struktur bilden. Dasselbe gilt für das Aktin-Bild. Hier werden zwei dicht beieinander liegende Filamente aufgelöst, was im konfokalen Bild verborgen bleibt.





**Abbildung 2.18.:** Multiplexing in der STED-Mikroskopie: Mikrotubuli wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin Primärantikörpern und anti-Maus-Atto565 Sekundärantikörpern markiert (rot), Aktinfilamente wurden mit Phalloidin-Biotin, Streptavidin und Atto565-bipy markiert (grün). Die Messung wurde in PBS mit  $25 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  und Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  EDTA durchgeführt. (a) Beugungsbegrenztes, konfokales Falschfarbenbild von Mikrotubuli (rot) und Aktin (grün), (b) zugehöriges STED-Bild. (c-d) STED-Bilder des markierten Ausschnitts aus **b**: Mikrotubuli vor Zugabe von EDTA (c), Aktinfilamente nach Photozerstörung und Zugabe von EDTA (d). Der Vergleich des Profils entlang der jeweiligen weißen Linie zeigt den Unterschied zwischen dem beugungsbegrenzten Bild (schwarz) und dem STED-Bild (rot).

### Zusammenfassung der Ergebnisse

Die chemischen Schalter wurden zum aberrationsfreien Abbilden mehrerer Strukturen in der Mikroskopie angewandt. Neben der prinzipiellen Durchführbarkeit der Methode wurden ihre Grenzen analysiert, hier ist das Übersprechen der gelöschten Fluoreszenzmarker in den zweiten Kanal mit etwa 10 % tolerierbar, solange beide markierten Strukturen in etwa die gleiche Ausgangs-Helligkeit besitzen. Die Methode wurde erfolgreich auf zwei Farbkanäle mit insgesamt vier

detektierten Strukturen erweitert und ihre Anwendbarkeit für die Multiplexing-STED-Mikroskopie gezeigt. Damit wurde demonstriert, dass sich das chemische Multiplexing als „Add-On“ für bestehende Mikroskopiemethoden einsetzen lässt. Im Folgenden sollen nun die weiter entwickelten chemischen Schalter der zweiten Generation vorgestellt und charakterisiert werden.



## Kapitel 3.

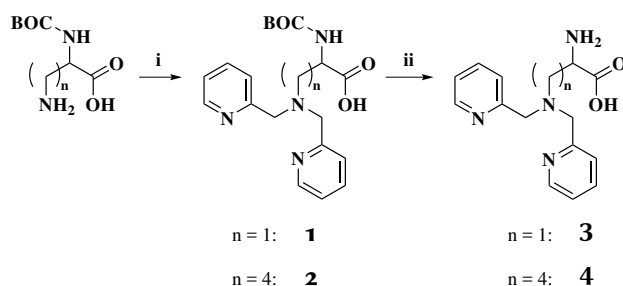
# Die chemischen Schalter der zweiten Generation

*Teile der Ergebnisse dieses Kapitels sind unter folgendem Patent geschützt: „Synthese und Struktur chemisch schaltbarer Fluoreszenzsonden auf der Basis von Aminosäuren“, 2016, zur Patentierung eingereicht.*

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen chemischen Schalter der ersten Generation basieren auf einem DNA-Doppelstrang, der Fluorophor und Komplexligand in räumliche Nähe bringt und gleichzeitig die Kopplungsfunktion trägt. Diese Konzept weist einige entscheidende Nachteile auf:

- die Größe des DNA-Doppelstranges, insgesamt etwa 8 nm, limitiert einerseits die Markierungsdichte – größere Labels füllen mehr Raum aus und können nicht so dicht um eine biologische Struktur gepackt werden – und liefert gleichzeitig Probleme im Hinblick auf hoch aufgelöste Mikroskopie – das Limit der erreichbaren Auflösung ist die Größe der verwendeten Marker.
- die Stabilität der DNA-Doppelhelix ist in wässrigen Lösungen limitiert.<sup>[164]</sup> Da die Kopplungsfunktion am farbstoffmarkierten Einzelstrang sitzt, verliert das immobilisierte Molekül bei Dissoziation seinen Liganden und damit seine Fähigkeit zum schalten.
- die Art und Weise der Markierung ist bisher auf das Streptavidin-Biotin-System beschränkt, was nochmals die Markierungsdichte begrenzt.
- die Verwendung von Antikörpern sowie das DNA-Grundgerüst schließen eine Anwendung in lebenden Zellen aus.

All diese Limitierungen sollten in dieser Arbeit durch Verwendung eines trifunktionalen organischen Grundgerüsts überwunden werden. Hier boten sich



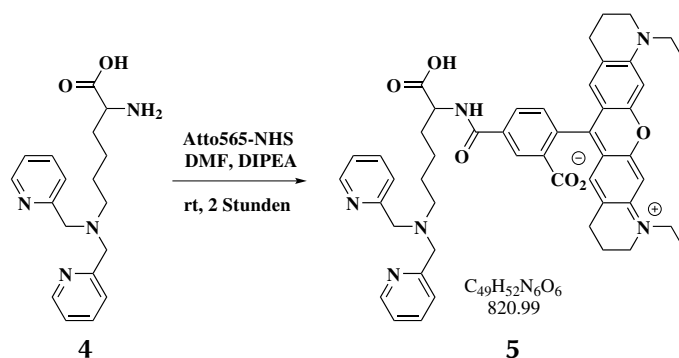
**Schema 3.1.:** Synthese-Sequenz zur Funktionalisierung kommerziell erhältlicher Aminosäuren zu chemischen Schaltern, ausgehend von 3-Amino- $N_\alpha$ -BOC-L-Alanin ( $n = 1$ ) und  $N_\alpha$ -BOC-L-Lysin ( $n = 4$ ): (i) Picolylbromid-hydrobromid, 5 M NaOH, rt, 12 Stunden; (ii)  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , rt, 5 Stunden.

Aminosäuren als Ausgangsmolekül an, da sich diese bei geeigneter Wahl der Seitenkette orthogonal funktionalisieren lassen. Es wurden zwei Aminosäuren ausgewählt, die kommerziell erhältlich und bereits mit einer Schutzgruppe versehen sind, zum einen  $N_\alpha$ -BOC-L-Lysin und zum anderen 3-Amino- $N_\alpha$ -BOC-L-Alanin. Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 2 wurde zudem Dipicolylamin als Ligand gewählt, da dieser am leichtesten synthetisch zugänglich ist. In den beiden gewählten Aminosäuren wurde der Ligand nach dem Schema 3.1 in der ersten Synthesestufe mit Picolylbromid in 5 M Natronlauge aufgebaut. Nach Reaktion über Nacht wurde das Rohprodukt mit Dichlormethan extrahiert und auf Kieselgel säulenchromatographisch aufgereinigt. So konnten BOC-Ala-DPA<sup>1</sup> **1** und BOC-Lys-DPA **2** mit Ausbeuten von 63 und 69 % als gelb-bräunliche Feststoffe isoliert werden. Nach fünfstündigem Rühren in Trifluoressigsäure und Extraktion mit Wasser konnten zudem die freien Aminosäuren **3** und **4** in fast quantitativen Ausbeuten von 97 und 98 % gewonnen werden.

Zum ersten Test der Tauglichkeit dieser Verbindungen als modulare chemische Schalter wurde **4** mit 1.2 Äquivalenten eines NHS-Aktivesters von Atto565 in DMF unter basischen Bedingungen bei Raumtemperatur umgesetzt, was in Schema 3.2 dargestellt ist. Das Produkt Atto565-Lys-DPA **5**<sup>2</sup> konnte mittels HPLC aufgereinigt und in einer Ausbeute von 65 %, basierend auf der Menge an eingesetzter Aminosäure, erhalten werden.

<sup>1</sup>Die Verbindungen in diesem Kapitel werden wie folgt benannt: die jeweilige Stamm-Aminosäure (Lys, Ala) mit dem Liganden (DPA) und eine Abkürzung von verwendetem Farbstoff (z. B. Atto565) oder Funktionalität (z. B. Biotin).

<sup>2</sup>Dargestellt ist das 4'-Isomer, bei dem die zur Konjugation verwendete Carboxylgruppe in para-Stellung zum Farbstoffgrundkörper liegt; der Farbstoff wird jedoch als Isomerengemisch mit dem 5'-Isomer geliefert, eine Isomerentrennung der Konjugate wurde nicht durchgeführt



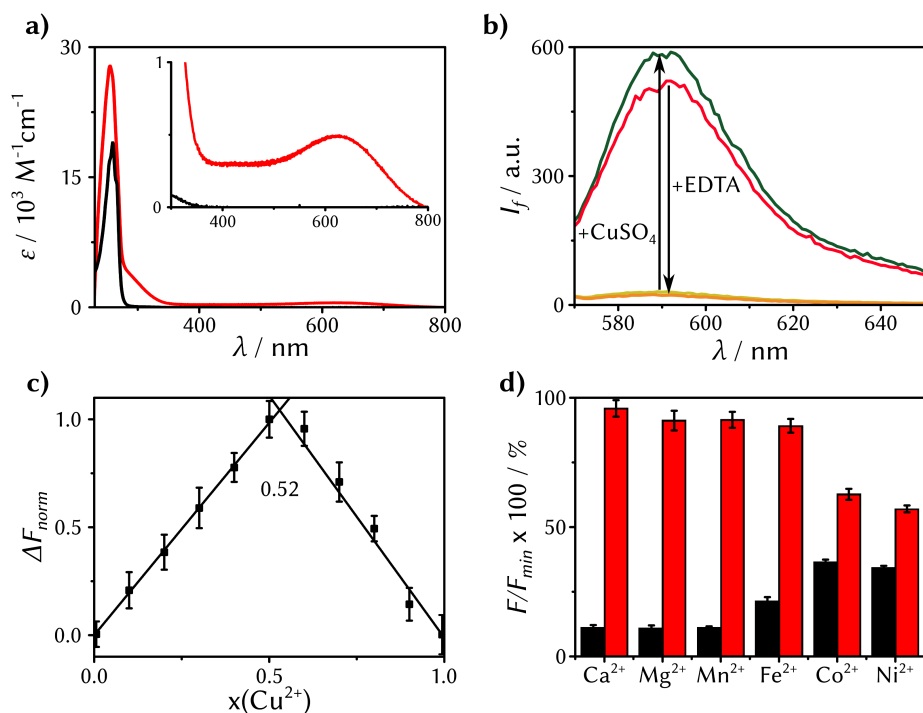
**Schema 3.2.:** Synthese der Farbstoff-markierten Verbindung Atto565-Lys-DPA **5**.

In Ensemble-Experimenten wurde zunächst die Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  durch **4** untersucht. In Abbildung 3.1a ist das Absorptionsspektrum einer  $100 \mu\text{M}$  Lösung von **4** in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $100 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ -Lösung dargestellt. Die freie Aminosäure absorbiert lediglich im UV-Bereich, mit einem Maximum bei  $259 \text{ nm}$  und einem Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon = (18\,028 \pm 514) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die komplexierte Form hingegen zeigt ein Maximum bei  $254 \text{ nm}$  mit  $\epsilon = (26\,312 \pm 631) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , eine weitere Bande bei  $300 \text{ nm}$  in Form einer Schulter sowie eine Bande bei  $609 \text{ nm}$  mit  $\epsilon = (489 \pm 97) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Die Farbstoff-markierte Verbindung **5** zeigt in PBS eine starke Fluoreszenz (Abbildung 3.1b, dunkelgrün), die bei Zugabe von  $20 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  um einen Faktor von etwa 12 gelöscht wird (hellgrün, orange), und bei Zugabe von  $20 \mu\text{M}$  EDTA wieder fast die Ausgangsfluoreszenz erreicht (rot).

Die Bindungsstöchiometrie wurde anhand eines Job-Plots bestimmt, wie in Abbildung 3.1c gezeigt. Hierbei wurde bei einer konstanten Gesamtkonzentration von  $2 \mu\text{M}$  der Molenbruch  $X(\text{Cu}^{2+})$  variiert und die Fluoreszenzabweichung der Lösung von der durch die Verdünnung von **5** erwarteten linearen Fluoreszenzabnahme gegen den jeweiligen Molenbruch aufgetragen. Diese Kurve weist bei  $X(\text{Cu}^{2+})=0.52$  einen Knick auf, was einer 1:1 Stöchiometrie entspricht.

Zur Untersuchung der Selektivität gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$  und weiteren zweiwertigen Ionen wurde die Fluoreszenz einer  $2 \mu\text{M}$  Lösung von **5** in PBS vor und nach Einstellen von  $20 \mu\text{M}$  der entsprechenden Ionen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  (aus Stammlösungen der jeweiligen Chloride oder Sulphate) gemessen, und schließlich nochmal nach Zugabe von  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Aus den gemessenen Werten wurde  $\frac{F}{F_{min}}$  bestimmt, die relative Fluoreszenzlöschung  $F$  geteilt durch die Fluoreszenzlöschung allein durch  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$   $F_{min}$ . Die Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  führt lediglich zu einer Fluoreszenzabnahme um 10 % des Maximalwertes,



**Abbildung 3.1.:** Ensemble-Experimente mit  $\text{NH}_2$ -Lys-DPA **4** und Atto565-Lys-DPA **5**: **(a)** Absorptionsspektrum einer  $100 \mu\text{M}$  Lösung von **4** in  $\text{H}_2\text{O}$  (schwarz) und in eine  $100 \mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$ -Lösung (rot). **(b)** Fluoreszenzintensität von **5** in PBS-Puffer (dunkelgrün), nach Zugabe von 10 bzw.  $20 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (orange, hellgrün) sowie nach Zugabe von  $20 \mu\text{M}$  EDTA (rot). **(c)** Job Plot zu Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von **5** mit  $\text{CuSO}_4$  in PBS. Hierzu wurde die Gesamtkonzentration an **5** und  $\text{CuSO}_4$  konstant gehalten, jedoch der Molenbruch der beiden Komponenten variiert. Aufgetragen ist die normierte Abweichung der gemessenen von der durch Verdünnung zu erwartenden Fluoreszenzintensität  $\Delta F_{\text{norm}}$ . **(d)** Bestimmung der Metallionenselektivität von **5** durch Zugabe von jeweils  $20 \mu\text{M}$  der entsprechenden  $\text{M}^{2+}$ -Ionen (schwarz), gefolgt von je  $20 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen (rot). Aufgetragen ist jeweils der Quotient der gemessenen Fluoreszenzintensität  $F$  durch die minimale, nur durch  $\text{Cu}^{2+}$ -Zugabe bestimmte Fluoreszenzintensität  $F_{\text{min}}$ .

nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  wird die Fluoreszenz um über 90 % des Maximalwertes gelöscht. In Anwesenheit dieser Ionen lässt sich  $\text{Cu}^{2+}$  also zuverlässig nachweisen. Bei Zugabe von  $\text{Fe}^{2+}$  erfolgt eine Fluoreszenzabnahme um etws 20 % des Maximalwertes. Auch hier nimmt die Fluoreszenz nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  um etwa

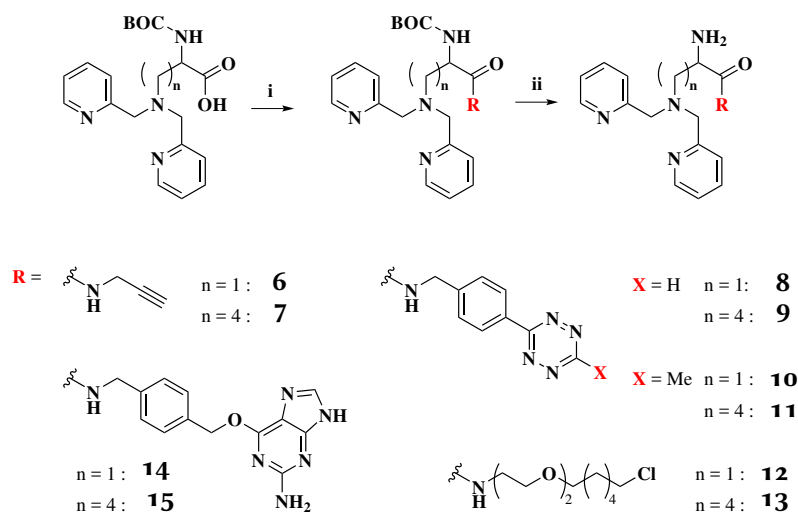
90 % des Maximums ab. Anders ist die Situation bei  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$ . Hier wird die Fluoreszenz initial zwar nur um etwa 42 bzw. 39 % gelöscht, allerdings scheinen diese Komplexe so stark zu sein, dass bei Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  lediglich 63 bzw. 58 % der maximalen Fluoreszenzlöschung auftreten. Diese beiden Ionen stören also die Komplexbildung von  $\text{Cu}^{2+}$  deutlich, führen aber selbst nur zu einer mäßigen Reduktion der Fluoreszenz. Die Anwesenheit dieser Ionen ist daher für die folgenden Experimente auszuschließen.

Insgesamt zeigt die Verbindung **5** gute Eigenschaften als chemischer Schalter. Die starke und reversible Fluoreszenzlöschung durch  $\text{Cu}^{2+}$  im mikromolaren Bereich, die definierte Bindungsstöchiometrie und die Selektivität gegenüber  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen machen die Ligand-funktionalisierten Aminosäuren zu guten Ausgangsverbindungen, um eine neue Generation effizienter chemischer Schalter aufzubauen. Die orthogonalen funktionellen Gruppen wurden nun genutzt, um eine Reihe unterschiedlich funktionalisierter Verbindungen herzustellen. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargelegt.

### 3.1. Funktionalisierungsstrategien

Zur weiteren Funktionalisierung wurde zuerst die Carboxylgruppe umgesetzt, bevor die Aminogruppe geschützt wurde. Hierzu wurden Amin-modifizierte funktionelle Gruppen durch in-situ Aktivierung der Carbonsäure mit HBTU in trockenem DMF mit DIPEA als Base umgesetzt, extrahiert und chromatographisch aufgereinigt. Die Funktionalisierung ist in Schema 3.3 dargestellt. Es wurde eine Propargylgruppe eingeführt, um mittels Kupfer-katalysierter Click-Chemie Farbstoffe in das System einzubringen (**6**, **7**). Des Weiteren wurden Tetrazin-Derivate synthetisiert, die eine Kupfer-freie Click-Chemie mit den chemischen Schaltern ermöglichen (**8**, **9**, **10**, **11**). Außerdem wurden noch zwei Substrate enzymatischer Fusionsprotein-Tags synthetisiert und in die chemischen Schalter eingebaut, ein Chloralkan als Substrat für das Halo-Tag sowie ein Benzylguanin für das Snap-Tag (**12**, **13**, **14**, **15**). Diese können zur effizienten Markierung in lebenden genetisch veränderten Zellen verwendet werden und erweitern damit die Anwendbarkeit der chemischen Schalter.

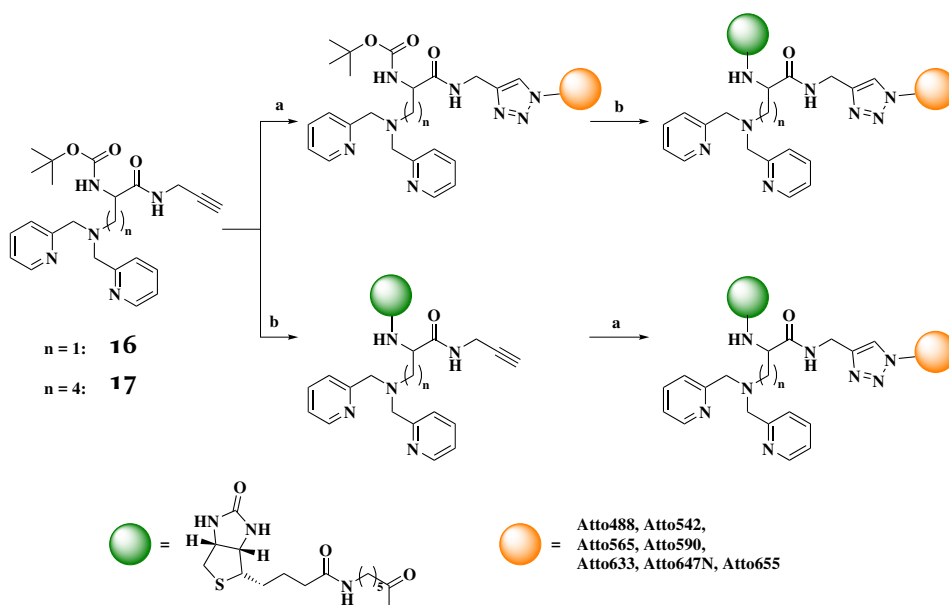
Im Weiteren werden die einzelnen Funktionalisierungen näher erläutert und die Experimente vorgestellt.



**Schema 3.3.:** Funktionalisierung der chemischen Schalter: (i) R-NH<sub>2</sub>, HBTU, DI-PEA, DMF, rt, 5 Stunden; (ii) CF<sub>3</sub>COOH, rt, 3 Stunden.

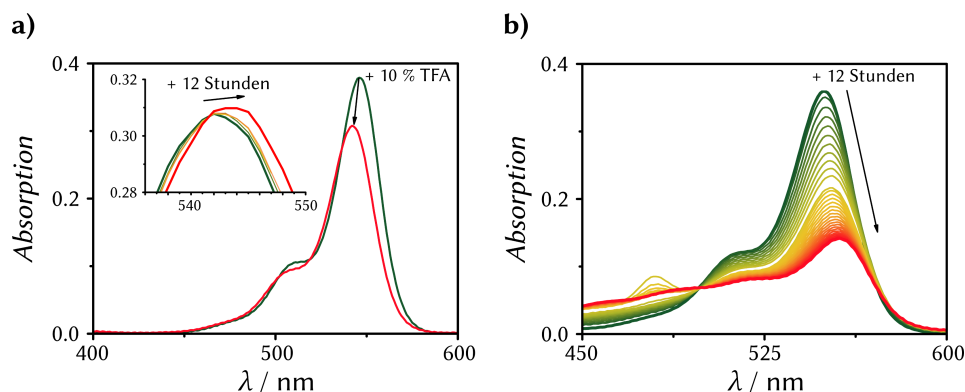
### 3.2. Propargylierung und Farbstoffmarkierung mittels Click-Chemie

Als erste Funktionalisierung der chemischen Schalter werden hier die Derivate Propargyl-Ala-DPA **6** und Propargyl-Lys-DPA **7** untersucht. Diese wurden ausgehend von den BOC-geschützten Aminosäuren durch in-situ Aktivierung der Carboxylgruppen mit HBTU unter basischen Bedingungen in DMF mit Propargylamin synthetisiert. So konnte **16** in einer Ausbeute von 82 % erhalten werden, **17** wurde mit 79 % Ausbeute gewonnen. Die Entschützung mit Trifluoressigsäure lieferte annähernd quantitative Ausbeuten von 97 % für **6** und 98 % für **7**. Die Funktionalisierung mit sowohl einem Farbstoff als auch einer Linkergruppe, hier ein Biotin-Rest, wurde entlang zweier unterschiedlicher Syntheserouten durchgeführt, diese sind in Schema 3.4 dargestellt. Zuerst wurde die obere Variante verfolgt. Hierzu wurde zuerst durch eine Kupfer-katalysierte Alkin-Azid Click-Reaktion mit käuflich erwerblichen Azid-Farbstoffen durchgeführt und die Konjugate mittels HPLC aufgereinigt. Die Konjugate konnten mit Hilfe des Absorptions- und Fluoreszenzdetektors der HPLC eindeutig identifiziert werden, da sie als Fluoreszenz-gelöschter Cu<sup>2+</sup>-Komplex von der Säule eluiert wurden. Anschließend wurde das Cu<sup>2+</sup> mit EDTA entfernt, die Konjugate mit Dichlormethan extrahiert, die Aminogruppe mit Trifluoressigsäure entschützt und mit einem Biotin-NHS-



**Schema 3.4.:** Schematische Darstellung der Synthesesequenz zur Herstellung von Farbstoff-Aminosäure-Konjugaten. Ausgehend von den BOC-geschützten DPA-Aminosäuren **16** und **17** wurden zwei alternative Reaktionspfade durchgeführt: Click-Reaktion gefolgt von Entschützung und Biotinylierung (oben), Entschützung und Biotinylierung gefolgt von der Click-Reaktion (unten). (a) Farbstoff-Azid (orange), 50 mM Natriumascorbat, 5 mM CuSO<sub>4</sub>, DMF:H<sub>2</sub>O 1:1, rt, 2 Stunden; (b) TFA, rt, 5 Stunden, Biotin-Amidohexansäure-NHS (grün), DIPEA, DMF, rt, 3 Stunden.

Aktivester umgesetzt. Nach erneuter HPLC-Aufreinigung konnten so die Konjugate von Atto565, Atto590, Atto633 und Atto647N gewonnen werden. Bei anderen, hydrophileren Farbstoffen wie Atto488, Atto542 und Atto655 scheiterte diese Methode, da keine Extraktion mit Dichlormethan möglich war. Zudem bestand bei Atto542-Azid ein Problem mit der nachfolgenden sauren Entschützung. Obwohl keine Struktur von Atto542 veröffentlicht ist, konnte vom Hersteller das Vorhandensein von mindestens zwei säure-lablen Sulfongruppen bestätigt werden. Diese werden in saurer Umgebung langsam abgespalten, was in Abbildung 3.2a+b dargestellt ist. Die Entschützung mit 10 % Trifluoressigsäure in Methanol führte zu einer leichten Verschiebung des Absorptionsmaximums um 2 nm (Abb. 3.2a), wohingegen bei Verwendung reiner Trifluoressigsäure über zwölf Stunden eine Verschiebung um 12 nm auftrat (Abb. 3.2b). Damit ist für diesen Farbstoff ein solcher Syntheseweg nicht empfehlenswert.

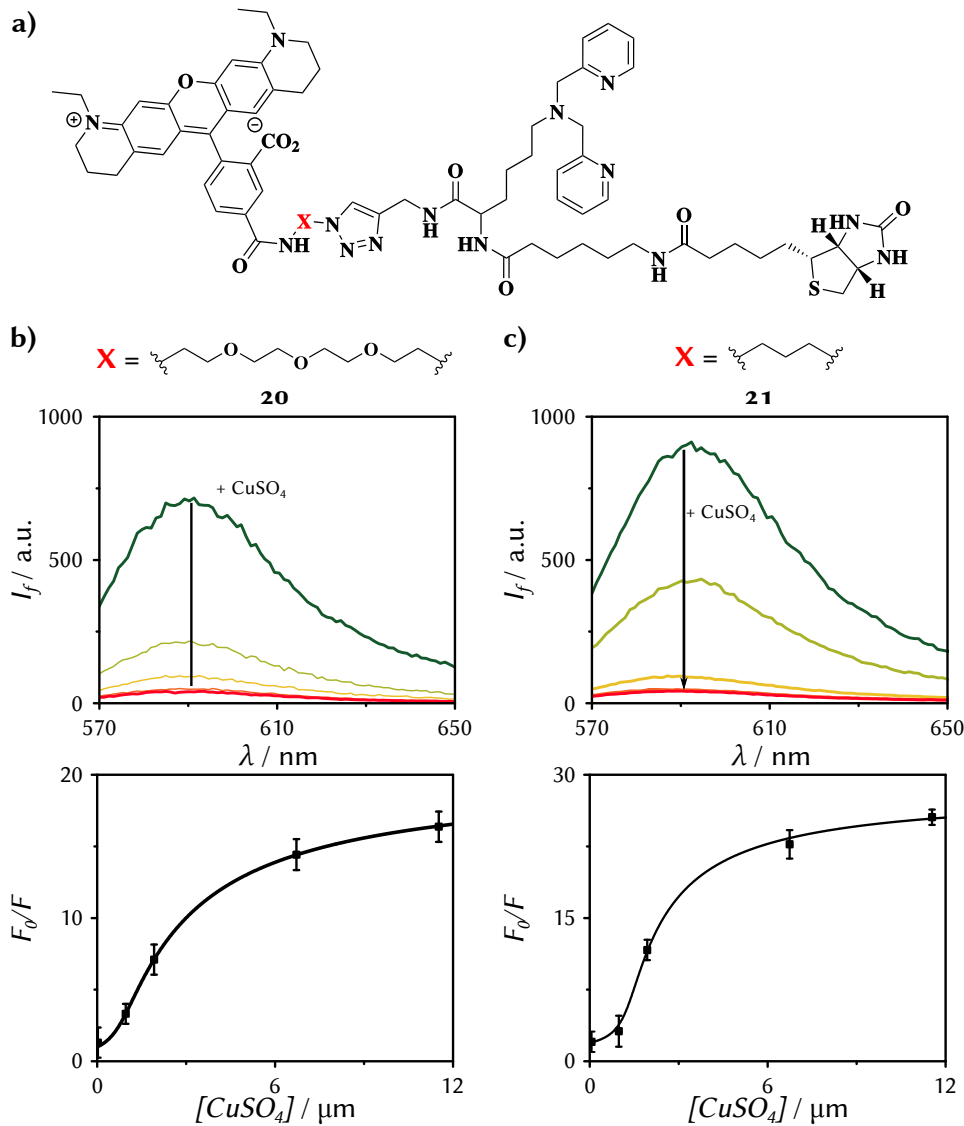


**Abbildung 3.2.:** Test zur Säurestabilität von Atto542-Azid. (a) Unter relativ milden Bedingungen mit 10 % Trifluoressigsäure in Methanol bleibt die Absorptionsbande über 12 Stunden relativ konstant, es ist lediglich eine Verschiebung um 2 nm zu verzeichnen. (b) In reiner Trifluoressigsäure werden über 12 Stunden zwei säure-labile Sulfongruppen abgespalten, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 12 nm zur Folge hat.

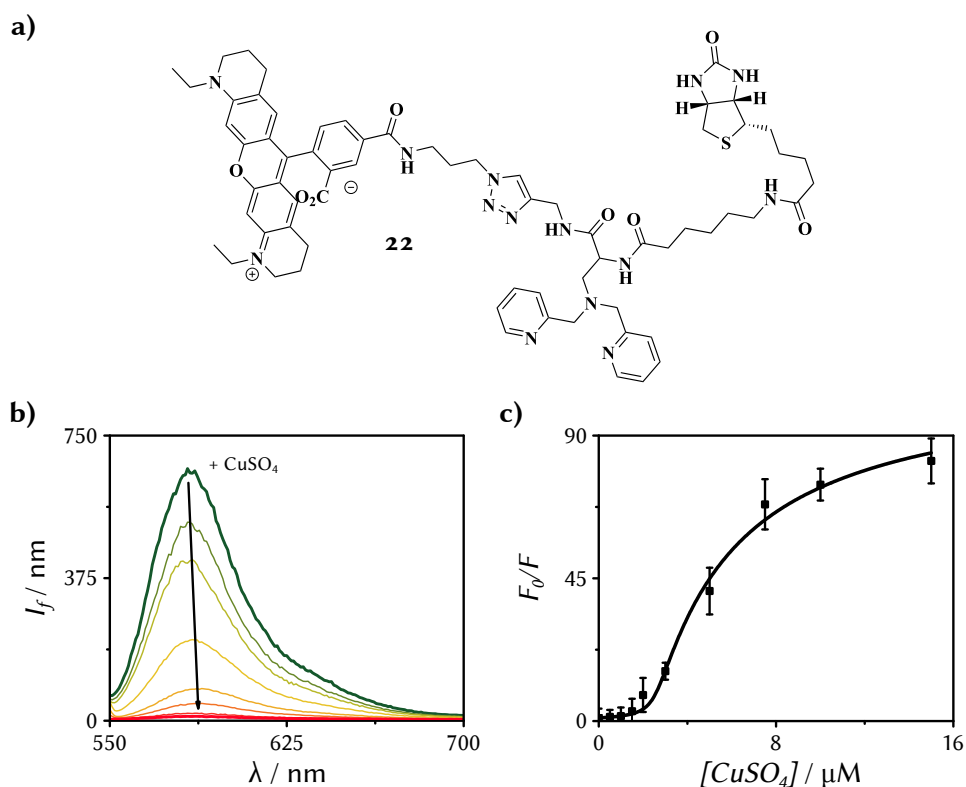
Die Probleme mit der Säurestabilität einiger Farbstoffe wurde schließlich durch Verwendung der zweiten Synthesevarianten in Schema 3.4 umgangen. Die Amine wurden zuerst mit Trifluoressigsäure entschützt und mit dem Biotin-NHS-Aktivester umgesetzt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung auf Kieselgel konnten so die beiden Verbindungen Propargyl-Ala-DPA-Biotin **18** und Propargyl-Lys-DPA-Biotin **19** in Ausbeuten von 78 bzw. 74 % erhalten werden. Anschließend wurde die Umsetzung mit den Farbstoff-Aziden, die Entfernung von  $\text{Cu}^{2+}$  mittels EDTA und die Aufreinigung auf der HPLC durchgeführt. Auf diese Weise konnten die Farbstoff-Konjugate von Atto488, Atto542, Atto565, Atto590, Atto633, Atto647N und Atto655 synthetisiert werden (siehe dazu auch Abbildung 4.2).

Eine besondere Rolle in der Reihe der Farbstoffe nimmt hier Atto565 ein, wie in Abbildung 3.3 dargelegt ist. Dieser Farbstoff wurde von der Firma *ATTO-TEC* in zwei Varianten bezogen: zum einen als Azid-Derivat mit dem standardmäßig verwendeten Ethylenglykol-Linker **20** (Abb. 3.3b), zum anderen mit einem kurzen Propyl-Linker **21** (Abb. 3.3c). In den Stern-Volmer-Plots ist deutlich ein S-förmiger Kurvenverlauf erkennbar, der sich durch Anpassung der verwendeten Näherung, wie in Kapitel 2, nicht beschreiben lässt. Daher wurde in diesem Kapitel die exakte Lösung des Modellansatzes angewandt (die genaue Herleitung ist in Kapitel A.1 im Anhang dargelegt und auch der Dissertation von Dr. MICHAEL SCHWERING zu entnehmen).<sup>[44]</sup> Die Stern-Volmer-Plots der beiden Verbindungen





**Abbildung 3.3.:** Einfluss der Linkerlänge auf die Löscheffizienz der chemischen Schalter: (a) Struktur des mit Atto565-X-Azid markierten chemischen Schalters: neben dem bei der Firma *ATTO-TEC* standardmäßig verwendeten Ethylenglykol-Linker wurde auch ein Propyl-Linker zur Verfügung gestellt. (b) Fluoreszenztitration und Stern-Volmer-Plot für die Verbindung mit dem Standard-Ethylenglykol-Linker **20**. (c) Fluoreszenztitration und Stern-Volmer-Plot für den Propyl-Linker **21**. Die Titrations wurden in PBS bei Konzentrationen von 500 nm durchgeführt. Zur Anpassung der Stern-Volmer-Plot kam hier die Gleichung A.15 zum Einsatz, deren Herleitung im Anhang in Kapitel A.1 dargelegt wird.



**Abbildung 3.4.:** Die stärkste Fluoreszenzlöschung trat bei (a) **22** auf. (b) Fluoreszenztitration einer 500 nm Lösung von **22** in PBS. (c) Der zugehörige Stern-Volmer-Plot wurde mit Gleichung A.15 angepasst und lieferte Werte für  $K = (3.02 \pm 0.61) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und  $\phi_{aus} = (9.2 \pm 0.8) 10^{-4}$ .

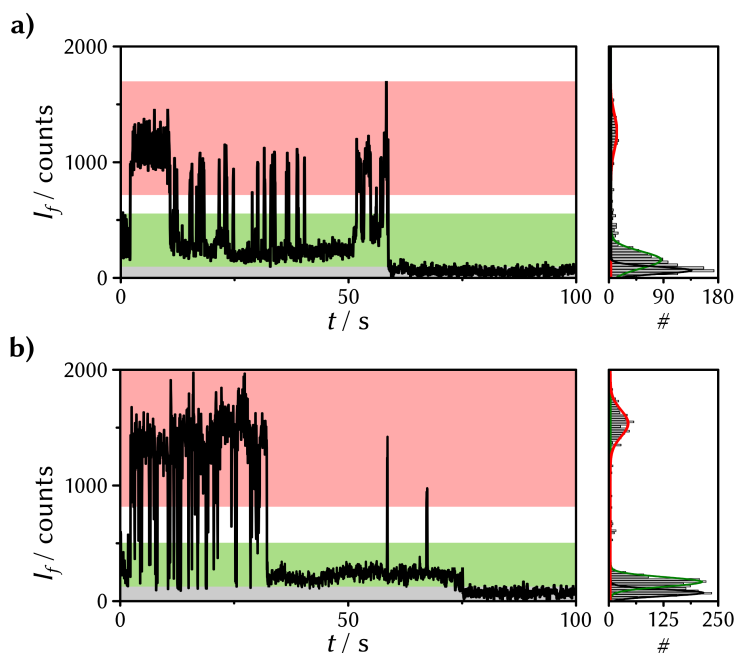
machen den Einfluss der Linkerlänge auf die Lösch-Effizienz deutlich. Während für **20** die Komplexbildungskonstante zu  $K = (1.79 \pm 0.51) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und die relative Quantenausbeute zu  $\phi_{aus} = (5.0 \pm 0.2) 10^{-3}$  bestimmt wurden, lieferte die Anpassung von Gleichung A.15 für **21** Werte von  $K = (2.03 \pm 0.68) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und  $\phi_{aus} = (3.8 \pm 0.2) 10^{-3}$ . Die relative Quantenausbeute und damit die Restfluoreszenz nimmt bei Verwendung des kürzeren Linkers um einen Faktor von 1.3 ab. Der Stern-Volmer-Plot geht bei einem Wert  $\frac{F_0}{F}$  von etwa 26 in Sättigung. Da eine möglichst geringe Restfluoreszenz für die weiteren Anwendungen der chemischen Schalter in der Mikroskopie von Nöten ist, wurde als Nächstes die Verbindung Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin **22** näher untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4 dargelegt. Hier wurde die Komplexbildungskonstante zu

**Tabelle 3.1.:** Ergebnisse der Anpassung von Gleichung A.15 an die in den Abbildungen 3.3 und 3.4 sowie in den Abbildungen C.2-C.8 im Anhang dargestellten Stern-Volmer-Plots mit dem zugehörigen korrigierten Bestimmtheitsmaß  $R_{\text{korrr.}}^2$ .

Verbindung	$K / 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$	$\phi_{\text{aus}} / \%$	$R_{\text{korrr.}}^2$
Atto565-Lys-DPA-Biotin <b>20</b>	$0.79 \pm 0.32$	$5.0 \pm 0.2$	0.9999
Atto565-Propyl-Lys-DPA-Biotin <b>21</b>	$2.04 \pm 0.68$	$3.8 \pm 0.2$	0.9991
Atto565-Ala-DPA-Biotin <b>25</b>	$0.58 \pm 0.37$	$3.8 \pm 0.2$	0.9982
Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin <b>22</b>	$3.03 \pm 0.61$	$0.9 \pm 0.1$	0.9959
Atto488-Ala-DPA-Biotin <b>26</b>	$0.93 \pm 0.14$	$7.2 \pm 0.2$	0.9992
Atto542-Ala-DPA-Biotin <b>27</b>	$0.84 \pm 0.07$	$6.3 \pm 0.2$	0.9997
Atto590-Ala-DPA-Biotin <b>28</b>	$1.40 \pm 0.22$	$3.7 \pm 0.2$	0.9971
Atto633-Ala-DPA-Biotin <b>23</b>	$1.31 \pm 0.26$	$5.7 \pm 0.2$	0.9983
Atto647N-Ala-DPA-Biotin <b>24</b>	$0.95 \pm 0.20$	$5.9 \pm 0.3$	0.9960
Atto655-Ala-DPA-Biotin <b>29</b>	$0.93 \pm 0.09$	$4.7 \pm 0.1$	0.9996

$K = (3.02 \pm 0.61) 10^7 \text{ M}^{-1}$  bestimmt, die relative Quantenausbeute des gelöschten Zustands beträgt  $\phi_{\text{aus}} = (9.2 \pm 0.8) 10^{-4}$ . Damit bleibt bei dieser Verbindung eine Restfluoreszenz von gut einem Prozent der Ausgangsfluoreszenz, was etwa eine Größenordnung besser ist als für die chemischen Schalter der ersten Generation. Die folgenden Experimente wurden daher mit **22** durchgeführt.

Die Fluoreszenztitrationen der anderen Farbstoff-Aminosäure-Derivate wurden äquivalent durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung C.2-C.8 dargestellt und in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Zudem wurde die Fluoreszenzlebensdauer der Sonden in PBS vor und nach Zugabe von Streptavidin und nach Zugabe von  $10 \mu\text{M CuSO}_4$  vermessen, die zugehörigen Daten sind in Tabelle C.1 im Anhang aufgeführt. Nach Kopplung an Streptavidin zeigten lediglich die mit Atto633 und Atto647N markierten Sonden **23** und **24** eine Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer um einen Faktor von 1.49 bzw. 1.54, alle anderen Ala-DPA-Biotin-Sonden zeigten keinerlei Veränderung in der Lebensdauer. Nach Zugabe von  $10 \mu\text{M Cu}^{2+}$  sank die Fluoreszenzlebensdauer bei den Farbstoffen Atto542 und Atto655 um einen Faktor von 1.54 bzw. 1.20, die restlichen Sonden zeigten keine signifikante Lebensdaueränderung. Dies bekräftigt auch für die chemischen Schalter der zweiten Generation einen statischen photoinduzierten Elektronentransfer als Lösmechanismus.

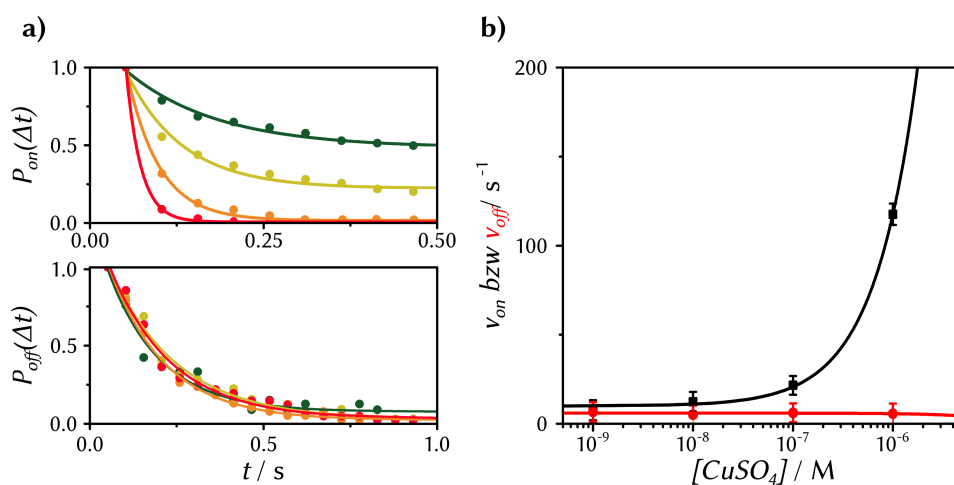


**Abbildung 3.5.:** Fluoreszenzspuren von einzelnen, immobilisierten **22** auf Biotin-Streptavidin-Oberflächen bei  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen von (a) 100 nM und (b) 10 nM in PBS. Die Spuren wurden jeweils in ein Histogramm überführt, das am rechten Rand dargestellt ist. Hier wurden je drei Zustände mit Gauß-Funktionen angepasst. Die jeweiligen Intensitätsbereiche sind farblich hinterlegt (rot: An-Zustand, grün: Aus-Zustand, grau: Hintergrund nach Photozerstörung).

### 3.2.1. Einzelmolekülcharakterisierung

Nach den guten Ergebnissen von **22** in Ensemble-Experimenten wurde diese Verbindung auch auf Einzelmolekül-Niveau untersucht. Hierzu kamen, wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, mit BSA und BSA-Biotin beschichtete Glasoberflächen zum Einsatz, **22** wurde mittels Streptavidin immobilisiert. Hierzu wurde **22** in Konzentrationen von  $10^{-10}$  M in PBS inkubiert und die Oberflächenbelegung am kommerziellen TIRF-Mikroskop verfolgt. Bei einer Punktdichte von maximal einem Teilchen pro Quadratmikrometer (was etwa 2000 Teilchen pro Bildfeld entspricht) wurden die Oberflächen mehrmals mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in PBS bei 4 °C gelagert.

Für die Messungen wurden  $\text{CuSO}_4$ -Lösungen der entsprechenden Konzentrationen (1–1000 nM) in PBS aus einer  $\text{CuSO}_4$ -Stammlösung verdünnt und für min-



**Abbildung 3.6.:** Einzelmoleküluntersuchung von **22**: **(a)** Histogramme der An- und Auszeiten von 114-135 immobilisierten **22**-Molekülen bei  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen von 1 nM (dunkelgrün), 10 nM (gelb), 100 nM (orange) und 1  $\mu\text{M}$  (rot). Belichtungszeit 50 ms, 1 mW Laserleistung bei 561 nm. Die Histogramme wurden mit den Gleichungen 2.7 und 2.8 angepasst. **(b)** Verteilung der aus **a** erhaltenen Assoziations- und Dissoziationsraten  $v_{on}$  (schwarz) und  $v_{off}$  (rot) gegen die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration.

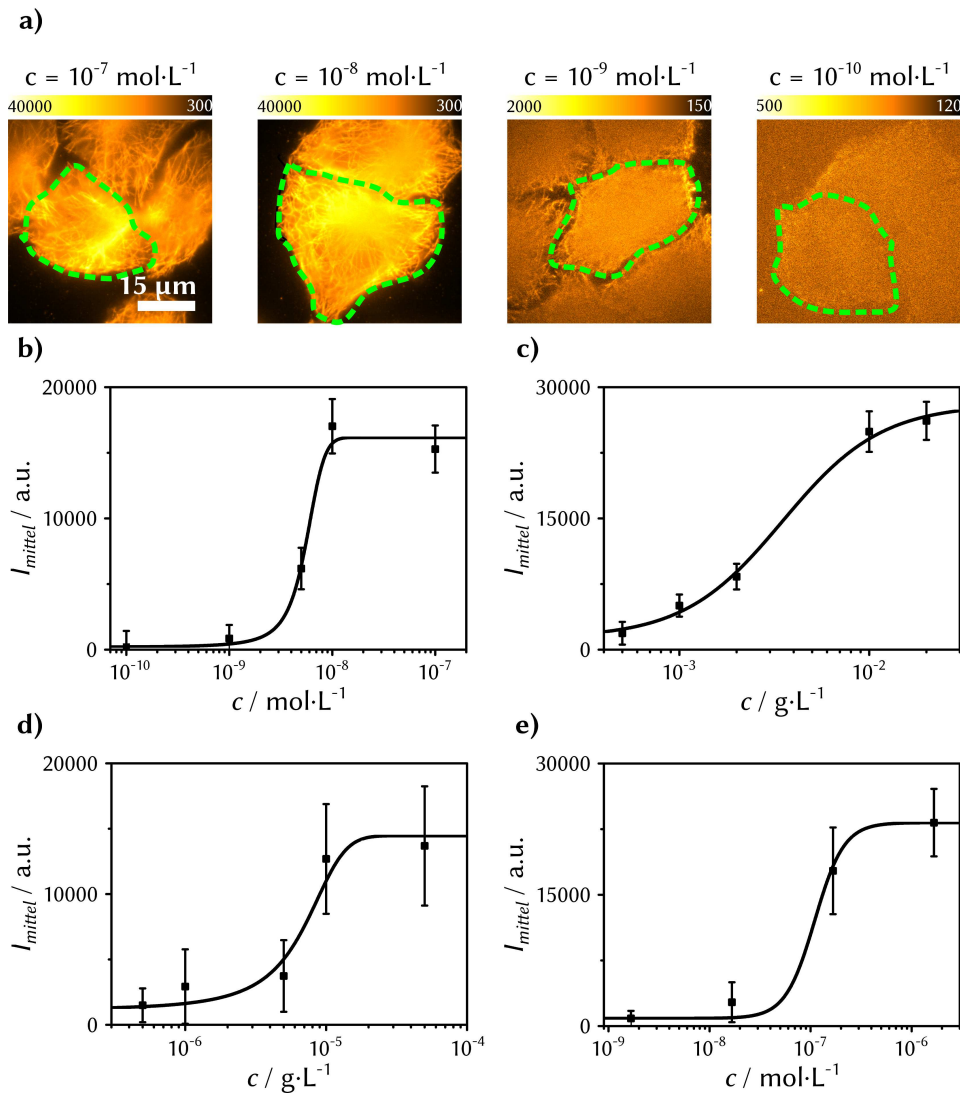
destens fünf Minuten inkubiert. Zu jeder  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration wurden mehrere Videos mit je 2000 Bildern am kommerziellen TIRF-Mikroskop aufgenommen. Dabei wurde jeweils nur der zentrale Bereich des Gesichtsfeldes der Kamera genutzt, um eine möglichst gleichmäßige Ausleuchtung der Probe zu gewährleisten. Es wurde mit einer Belichtungszeit von 20 ms und mit einer Wellenlänge von 561 nm bei einer Laserleistung von 1 mW gearbeitet. Die erhaltenen Videos wurden mit der schon in Abschnitt 2.4 erwähnten MATLAB-Software ausgewertet. Es wurden einzelne Fluorophore anhand eines Grenzwertes ausgewählt und deren Hintergrund-korrigierte Intensitätsspuren ausgegeben. In Abbildung 3.5 sind zwei repräsentative Intensitätsspuren dargestellt. In 3.5a waren 100 nM  $\text{Cu}^{2+}$  in Lösung vorhanden, das Molekül befand sich die meiste Zeit in einem dunklen Aus-Zustand (grün markiert). Von hier aus gab es kurze Fluktuationen in den An-Zustand (rot). Nach etwa 58 Sekunden erfolgte ein einstufiger Bleichschritt in einen dritten Zustand (grau), der nur aus Hintergrundfluktuationen besteht. Im rechten Teil der Abbildung ist ein Histogramm über die Spur dargestellt. Hier ließen sich alle drei Zustände durch Gauß-Funktionen anpassen, es ergaben sich Helligkeiten von  $(1389 \pm 342)$ ,  $(279 \pm 51)$  und  $(113 \pm 17)$  Counts.

In Abbildung 3.5b ist eine Spur in Anwesenheit von 10 nM  $\text{Cu}^{2+}$  gezeigt. Hier ist das Molekül zu Beginn hauptsächlich im An-Zustand und zeigt nur kurze Fluktuationen. Ab etwa 32 Sekunden ändert sich das, hier bleibt das Molekül bis auf zwei kurze Fluktuationen im Aus-Zustand. Von hier erfolgt dann auch der Bleichschritt bei 75 Sekunden. Auch hier ließen sich die Zustände durch Gauß-Funktionen im Histogramm auf der rechten Seite anpassen. Die Helligkeiten der Zustände waren hier  $(1571 \pm 358)$ ,  $(219 \pm 59)$  und  $(104 \pm 37)$  Counts.

In einem weiteren MATLAB-Programm wurden schließlich alle Spuren mittels eines Schwellwertes binarisiert und die jeweilige Länge der An- und Aus-Zustände ausgegeben. Diese sind in Abbildung 3.6a+b dargestellt. Während die An-Zustände auch hier wieder stark durch die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration beeinflusst werden (oben), bleiben die Aus-Zustände annähernd konstant (unten). Die Auftragung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten gegen die  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration ist in Abbildung 3.6b gezeigt. Aus der linearen Anpassung wurde die Assoziationsrate zu  $k_a = (1.08 \pm 0.30) 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt, durch Mittelung erhält man die Dissoziationsrate zu  $k_d = (5.99 \pm 1.46) \text{ s}^{-1}$ . Die Komplexbildungskonstante wurde daraus zu  $K = (1.80 \pm 0.44) 10^7 \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit den Werten, die in Ensemble-Experimenten erhalten wurden.

### 3.2.2. Optimierung der Immunfluoreszenz

Nach der Charakterisierung von **22** im Ensemble und auf Einzelmolekülniveau sollten Strukturen in Zellen markiert werden. Hierfür wurde zuerst eine Optimierung verschiedener Parameter der Markierung durchgeführt. Es kamen fixierte NIH 3T3 Zellen zum Einsatz in denen Mikrotubuli markiert wurden. Die mittlere Intensität von je fünf einzelnen Zellen wurde unter identischen Aufnahmebedingungen (561 nm Weitfeldanregung mit 5 mW, Belichtungszeit 50 ms, Gain 100) verglichen. In Abbildung 3.7a ist diese Herangehensweise dargestellt. Hier wurde die Konzentration von **22** im Bereich von  $10^{-7}$ – $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$  variiert, während die anderen zur Markierung verwendeten Komponenten (ein anti- $\alpha$ -Tubulin Primärantikörper, ein anti-Maus-Biotin Sekundärantikörper und Streptavidin) konstant gehalten wurden. Aus diesen Bildern wurde eine Titrationskurve erstellt, die in Abbildung 3.7b dargestellt ist. Die Anpassungskurve dient lediglich der Visualisierung. Die Sättigung mit **22** wird bei etwa  $10^{-8} \text{ M}$  erreicht, diese Konzentration wird im Folgenden für die Experimente verwendet. Genauso wurden die Konzentrationen von anti- $\alpha$ -Tubulin Primärantikörper (Abb. 3.7c), anti-Maus-IgG-Biotin Sekundärantikörper (Abb. 3.7d) und Streptavidin (Abb. 3.7e) variiert. Hier liegen die optimalen Konzentrationen bei  $10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  für den Primärantikörper,  $10^{-5} \text{ g L}^{-1}$  für den Sekundärantikörper und  $10^{-7} \text{ M}^{-1}$  für Streptavidin.



**Abbildung 3.7.:** Optimierung der Immunfluoreszenz an Mikrotubuli mit **22**. Es wurde jeweils ein Parameter (Konzentration von Primär- und Sekundär-Antikörper, Streptavidin und **22**) variiert, während die anderen Parameter konstant gehalten wurden. Aus mikroskopischen Aufnahmen von jeweils fünf Zellen wurde die mittlere Intensität und deren Standardabweichung bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die Sättigungskurven dienen lediglich der Visualisierung. (a) Bilder der Konzentrationsvariierung von **22**. Die jeweils ausgewertete Zelle ist grün markiert. (b) Titrationskurve der **22**-Konzentrationsoptimierung. Ab etwa  $10^{-8} \text{ M}^{-1}$  sind alle Bindungsstellen gesättigt. Titrationskurven (und jeweilige Sättigungskonzentration) für (c) Primärantikörper ( $10^{-2} \text{ g L}^{-1}$ ), (d) Sekundärantikörper ( $10^{-5} \text{ g L}^{-1}$ ), (e) Streptavidin ( $10^{-7} \text{ M}^{-1}$ ).

### 3.2.3. Hoch aufgelöste Mikroskopie - CHIRON

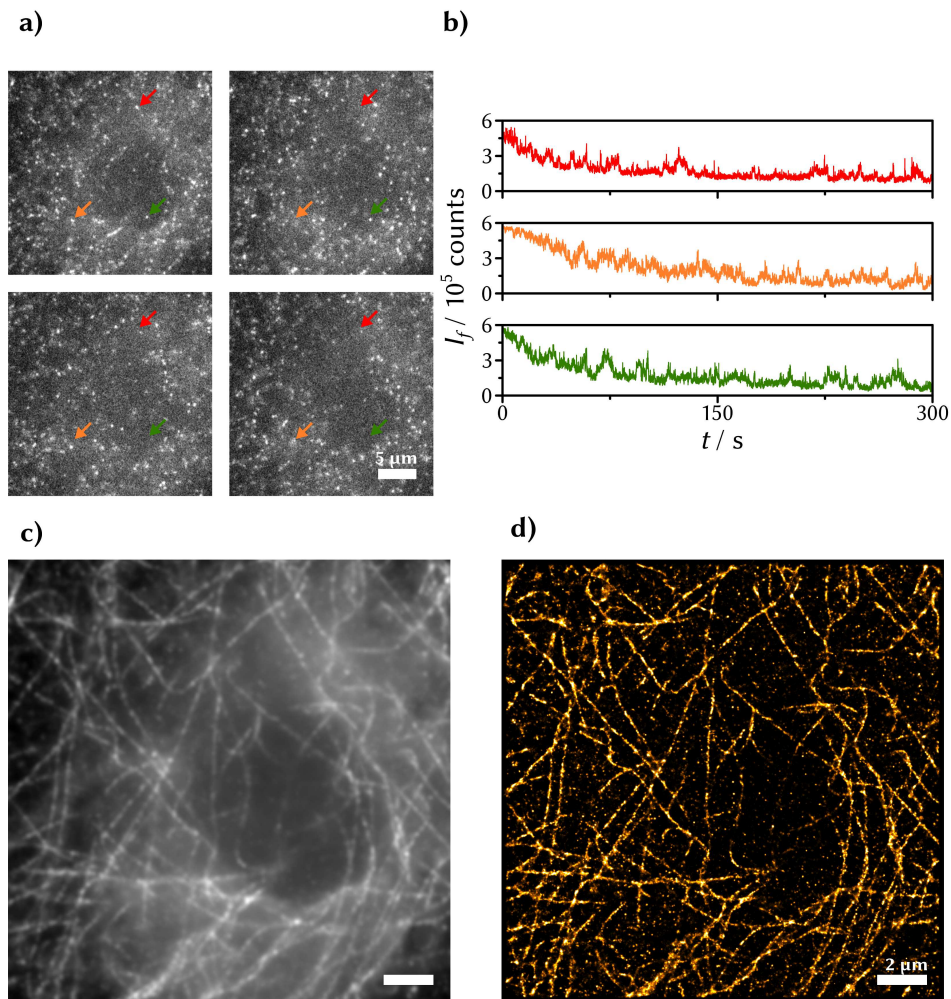
Auch die chemischen Schalter der zweiten Generation wurden zur hoch aufgelösten Lokalisationsmikroskopie eingesetzt. Hier wurden Mikrotubuli in fixierten NIH 3T3 Zellen mit anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-IgG-Biotin, Streptavidin und **22** möglichst dicht markiert. Die Zellen wurden vor der Messung mit einer verdünnten Suspension von fluoreszierenden Beads (100 nm Durchmesser,  $\lambda_{ex}$  505 nm,  $\lambda_{em}$  515 nm) für fünf Minuten inkubiert und danach mehrmals mit PBS gewaschen. Diese Beads wurden zur Korrektur eines eventuell vorhandenen Drifts durch mechanische Instabilität des Mikroskops während der Aufnahmedauer verwendet.

Nun wurde eine 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben und die Messung im kommerziellen TIRF-Mikroskop gestartet. Die Messung wurde mit einer Laserleistung von 5 mW bei 561 nm durchgeführt, es wurde ein Video von 15 000 Bildern bei einer Bildwiederholrate von 50 Hz aufgenommen. Es wurde eine Zelle ausgewählt, in deren Peripherie ein fluoreszierender Bead zum Liegen kam. Dazu wurde zuerst parallel bei 488 und 561 nm angeregt und eine geeignete Zelle ausgewählt. Zur Messung wurde schließlich mit 5 mW bei 561 nm angeregt und die Intensität des 488 nm Lasers so eingestellt, dass die Helligkeit der Beads in etwa der Helligkeit einzelner Atto565-Fluorophore entsprach (etwa 180  $\mu$ W). Diese Region wurde ausgewählt und damit das gesamte Video ausgerichtet.

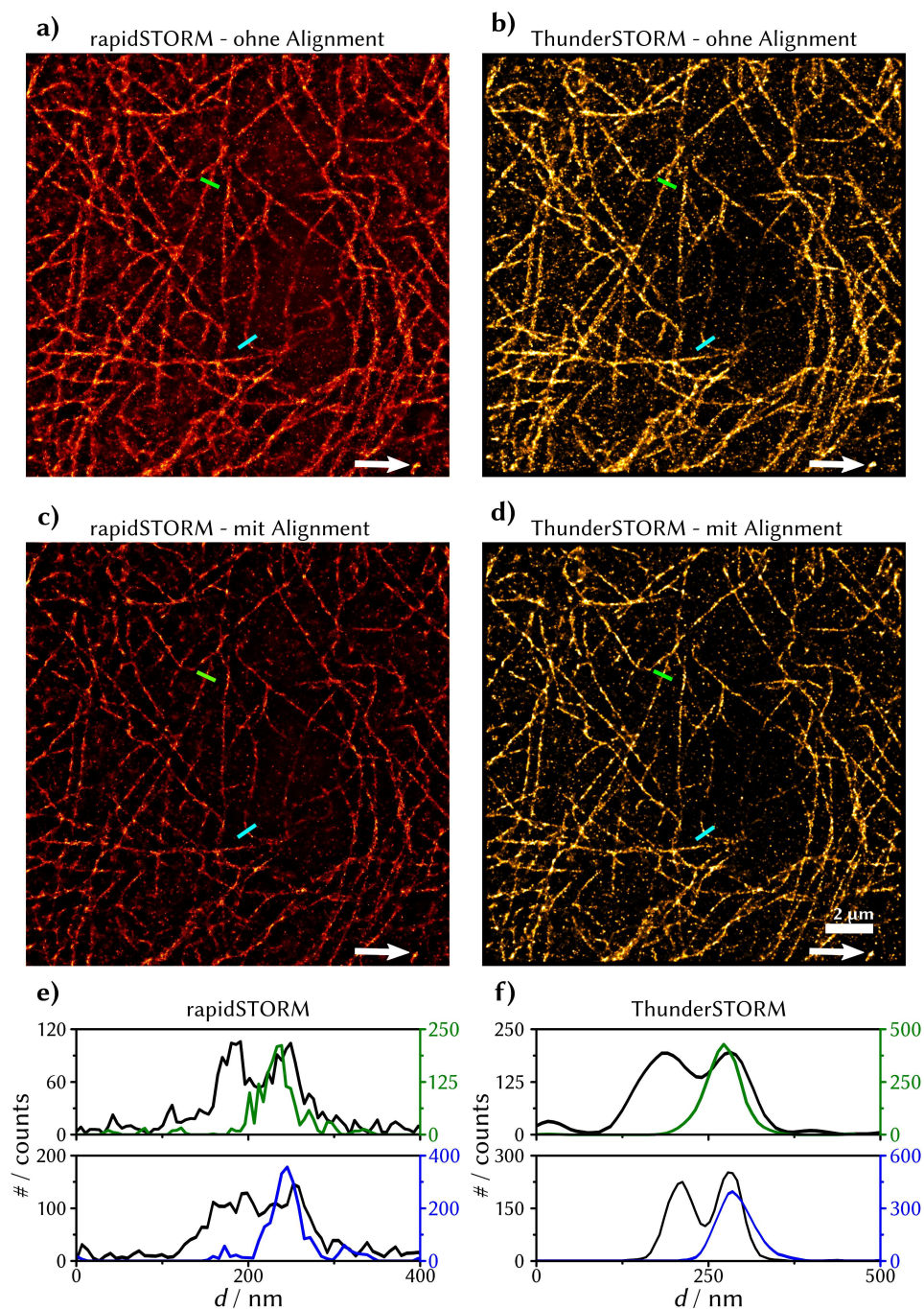
Abbildung 3.8 fasst die Lokalisationsexperimente zusammen. In 3.8a sind fünf Einzelbilder aus dem Video (Bild 2500, 5500, 8500 und 11500) dargestellt. Es kam während der Aufnahmedauer von 300 Sekunden nicht zu einem signifikanten Ausbleichen der Fluoreszenz, da die Photostabilität der chemischen Schalter in Anwesenheit von Cu<sup>2+</sup> im Vergleich zu den freien Farbstoffen deutlich erhöht ist (siehe auch Abb. D.5 im Anhang). Die Intensitätsspuren über das gesamte Video an den drei in 3.8a farblich markierten Stellen ist in Abbildung 3.8b dargestellt (ausgelesen aus einem Kreis mit Radius vier Pixel). Alle drei Spuren zeigen eine leichte Abnahme der Gesamtintensität über die Zeit. Zusätzlich sind schnelle Intensitätsfluktuationen erkennbar. Diese kommen von vielen blinkenden Molekülen, die im Auslesebereich liegen oder ihn berühren.

Das Video aus Abbildung 3.8 wurde vor der Lokalisationsanalyse mit Hilfe des ImageJ-Plugins „Template Matching and Slice Alignment“ ausgerichtet, um einen vorhandenen Drift durch mechanische Instabilität des Mikroskops während der 300 Sekunden Aufnahmedauer auszugleichen.<sup>[165]</sup> Aus dem ausgerichteten Video wurde ein Summenbild erstellt, welches in Abbildung 3.8c dargestellt ist. Hier summieren sich die vielen Fluktuationen vor allem am Rand der Zelle zu einem kontrastreichen Bild auf. Lediglich in der Mitte des Bildes um den leicht zu erkennenden Zellkern ist mehr Signal von Oberhalb der Fokusebene vorhanden.





**Abbildung 3.8.:** Lokalisationsexperiment in einer fixierten NIH 3T3 Zelle, in der Mikrotubuli mit anti-Tubulin, anti-Maus-IgG-Biotin, Streptavidin und **22** markiert wurden und in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS im Epifluoreszenzmikroskop abgebildet wurde ( $256 \times 256$  Pixel, 15 000 Bilder, 50 Hz Ausleserate, Anregung bei 561 nm mit 5 mW). (a) In den Einzelbildern 2500, 5500, 8500 und 11500 sind deutlich einzelne fluoreszierende Moleküle sichtbar. Die Fluoreszenzintensität an drei ausgewählten Punkten ist in (b) über das ganze Video verfolgt. Hier zeigen sich viele einzelne Fluktuationen, die nach Alignment (siehe Abb. 3.9 mit Hilfe des ImageJ-Plugins „Thunderstorm“ ausgewertet wurden). (c) Summenbild über die gesamten 15 000 Einzelbilder des Videos. Die Halbwertsbreite der abgebildeten Mikrotubuli wurde zu  $(314 \pm 22)$  nm bestimmt. (d) Zugehöriges Lokalisationsbild aus dem „ThunderSTORM“ Plugin. Der erhöhte Hintergrund im Zentrum der Zelle ist hier nicht mehr vorhanden. Die Halbwertsbreite der Mikrotubuli wurde zu  $(89 \pm 14)$  nm bestimmt.



**Abbildung 3.9.:** Die Ergebnisse der Lokalisationsanalyse des Videos aus Abbildung 3.8 ohne (**a+b**) und mit durchgeführtem Alignment (**c+d**). Die Analyse wurde mit rapidSTORM (**a+c**) und ThunderSTORM (**b+d**) durchgeführt. In (**e+f**) sind jeweils die Intensitätsprofile entlang der grünen und blauen Linien dargestellt (**e**: rapidSTORM, **f**: ThunderSTORM; jeweils schwarz: ohne Alignment, grün/blau: mit Alignment). Der weiße Pfeil markiert die zum Ausrichten des Bilderstapels verwendete Struktur.

Die Vermessung von insgesamt 35 Mikrotubuli in diesem Bild lieferte eine Halbwertsbreite von  $(314 \pm 22)$  nm.

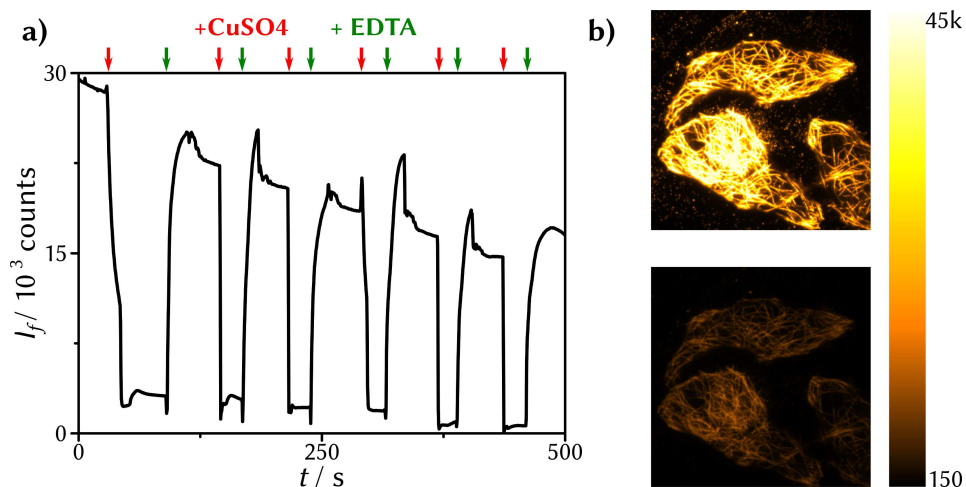
Nach Anwendung des Lokalisationsalgorithmus „ThunderSTORM“ wurde das Bild 3.8d erhalten. Hier ist der Kontrast über das gesamte Bild gleichmäßig gut. Die Filamentstruktur wird allerdings nicht überall durchgängig abgebildet, was an einer unzureichend langen Messdauer liegen kann. Typischerweise liegt sie bei Lokalisationsexperimenten im Bereich von 10 000–100 000 Bildern.<sup>[39, 166, 167]</sup> Bei unzureichend langer Aufnahmedauer werden eventuell nicht alle Farbstoffe abgebildet, was zu unvollständigen Lokalisationsbildern führt.

In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der Lokalisationsanalyse mit zwei frei verfügbaren Programmen („rapidSTORM“ und „ThunderSTORM“) vor dem Ausrichten (3.9a+b) und nach dem Ausrichten (3.9c+d) dargestellt. Bei beiden verwendeten Algorithmen ist das Ergebnis nach Ausrichtung des Videos deutlich besser. Die sichtbaren Filamente werden deutlich feiner abgebildet. Entlang der beiden grünen und blauen Linien sind zudem in Abbildung 3.9e+f jeweils die Profile vor (schwarz) und nach Ausrichten (grün bzw. blau) dargestellt. Hier wird deutlich, dass während der Aufnahme ein Drift von etwa 70–80 nm auftrat. Es ist in allen vier Schaubildern jeweils ein Doppelpack im unkorrigierten Zustand vorhanden, nach Korrektur tritt nur noch ein einziges Maximum auf.

Worauf genau die mechanische Instabilität zurückzuführen ist, bleibt unklar. In anderen Experimenten am selben Mikroskop trat kein erkennbarer Drift auf, möglicherweise wurde die Probe in dem hier vorgestellten Experiment nicht korrekt am Probenhalter fixiert. Da ein linearer Drift jedoch sehr gut korrigierbar ist, stellt das kein Hindernis für diese Art von Experiment dar.

### 3.2.4. Chemisches Multiplexing

Das makroskopische Schalten von markierten Zellen und die Reversibilität der Schaltung wurde an markierten NIH 3T3 Zellen demonstriert. Hierzu wurden mit 22 markierte Mikrotubuli verwendet. Die Fluoreszenz wurde bei 561 nm bei einer Laserleistung von 1 mW angeregt und ein Video mit 1000 Bildern (50 ms Belichtungszeit) aufgenommen. Es wurden jeweils 100  $\mu$ L  $\text{CuSO}_4$ -Lösung (50  $\mu$ M) und 100  $\mu$ L EDTA-Lösung (200  $\mu$ M) zugegeben und die Messkammer danach mit einer selbstgebauten Apparatur gewaschen: die Lösung wurde mit einer Spritze abgesaugt und mit einer weiteren Spritze wurde PBS zugegeben. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde erneut  $\text{CuSO}_4$  und EDTA zugegeben. Insgesamt konnten die chemischen Schalter sechsmal nacheinander an- und ausgeschaltet werden. In dieser Zeit nahm die Intensität im Kupfer-freien An-Zustand um etwa die Hälfte ab, was vornehmlich auf Photozerstörung zurückzuführen ist. Die Intensität des Dunkelzustands nahm hingegen nur geringfügig ab.

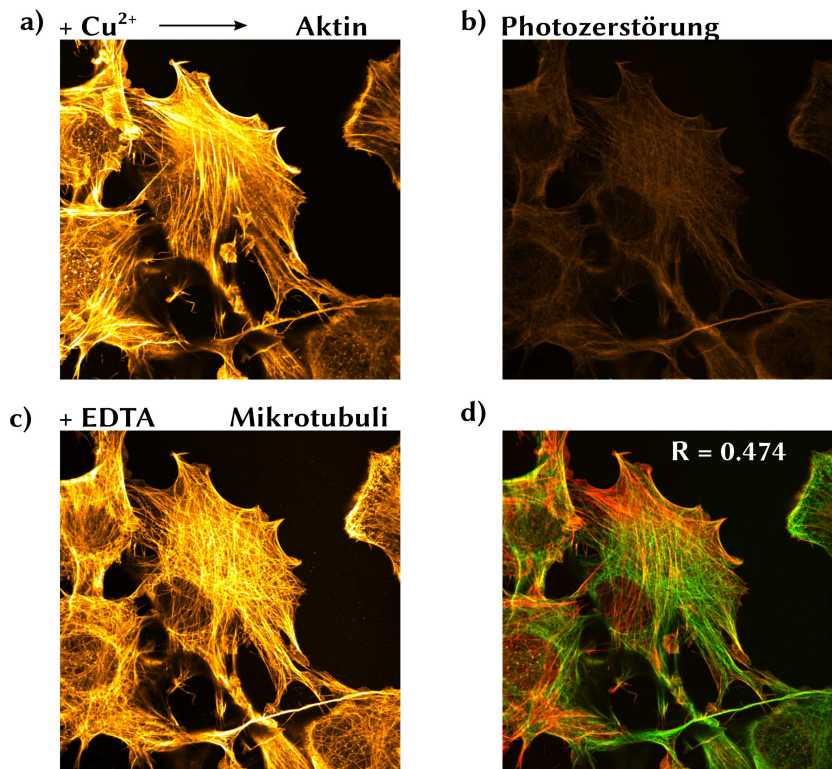


**Abbildung 3.10.:** Reversibilität der Fluoreszenzlöschung an markierten Mikrotubuli: (a) mittlere Intensität einer mit **22** gefärbten NIH-3T3-Zelle bei wiederholter Zugabe von  $50\ \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  (rote Pfeile) und  $200\ \mu\text{M}$  EDTA (grüne Pfeile). Nach jedem Zyklus wurde die Lösung einer Spritze abgesaugt und die Kammer mehrmals mit PBS gewaschen, wodurch es zu den leichten Intensitätsschwankungen im An-Zustand kam. (b) Fluoreszenzbilder der analysierten Zelle zu Beginn der Messung (oben) und nach der ersten Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  (unten).

Als nächstes wurde auch mit **22** das chemische Multiplexing demonstriert, hierfür kamen doppelt gefärbte NIH 3T3 Zellen zum Einsatz. Es wurden Mikrotubuli wie zuvor mit anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-IgG-Biotin, Streptavidin und **22** und Aktin-Filamente mit Atto565-Phalloidin markiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

Auch hier wurde das Experiment in Anwesenheit von  $50\ \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS gestartet. Es wurde eine Zelle im konfokalen Mikroskop ausgewählt und ein Bild ( $550\ \text{nm}$  bei  $300\ \mu\text{W}$ , PMT-Verstärkerspannung  $800\ \text{V}$ , Detektionsbereich  $560\text{--}620\ \text{nm}$ ) aufgenommen, was in 3.11a gezeigt ist. Dann wurde für drei Minuten mit fünf Laserlinien auf maximaler Intensität parallel beleuchtet, um die Photozerstörungszeit möglichst kurz zu halten. Es wurde zurück auf die eben beschriebenen Aufnahmeparameter gewechselt und erneut ein Bild aufgenommen (Abb. 3.11b). Schließlich wurde  $100\ \mu\text{M}$  EDTA zugegeben und nach kurzer Zeit erneut ein Bild aufgenommen (Abb. 3.11c). Aus den beiden Bildern in 3.11a+c wurde schließlich ein Falschfarbenbild erstellt, welches in Abbildung 3.11d gezeigt ist. Die beiden Strukturen Aktin und Mikrotubuli weisen mit  $R = 0.474$  einen Korrelationsko-





**Abbildung 3.11.:** Chemisches Multiplexing in markierten NIH 3T3 Zellen. Es wurden Mikrotubuli mit anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-IgG-Biotin, Streptavidin und Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin **30** markiert, zusätzlich wurde Aktin mit Phalloidin-Atto565 gefärbt. Die konfokalen Bilder wurde in PBS bei einer  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  aufgenommen: **(a)** Zu Beginn des Experiments löscht  $\text{Cu}^{2+}$  die Fluoreszenz von **30**, sodass nur Aktin abgebildet wird. **(b)** Nach 200 Sekunden kontinuierlicher Beleuchtung verbleibt lediglich die Fluoreszenz des gelöschten **30**. **(c)** Nach Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  EDTA wird die Fluoreszenz von **30** wieder hergestellt, die Intensität steigt im Vergleich zu **b** um den Faktor 17. **(d)** Falschfarbenbild aus **a+c** mit zugehörigem Pearson-Korrelationskoeffizienten  $R$ . Während die Bilder in **a+c** eine Korrelation von  $R = 0.474$  aufweisen, fällt dieser bei den beiden Bilder in **b+c** mit  $R = 0.876$  deutlich höher aus.

effizienten auf, wie er auch schon für zwei filamentöse Strukturen in Kapitel 2 erreicht wurde.

### 3.2.5. STED-Multiplexing

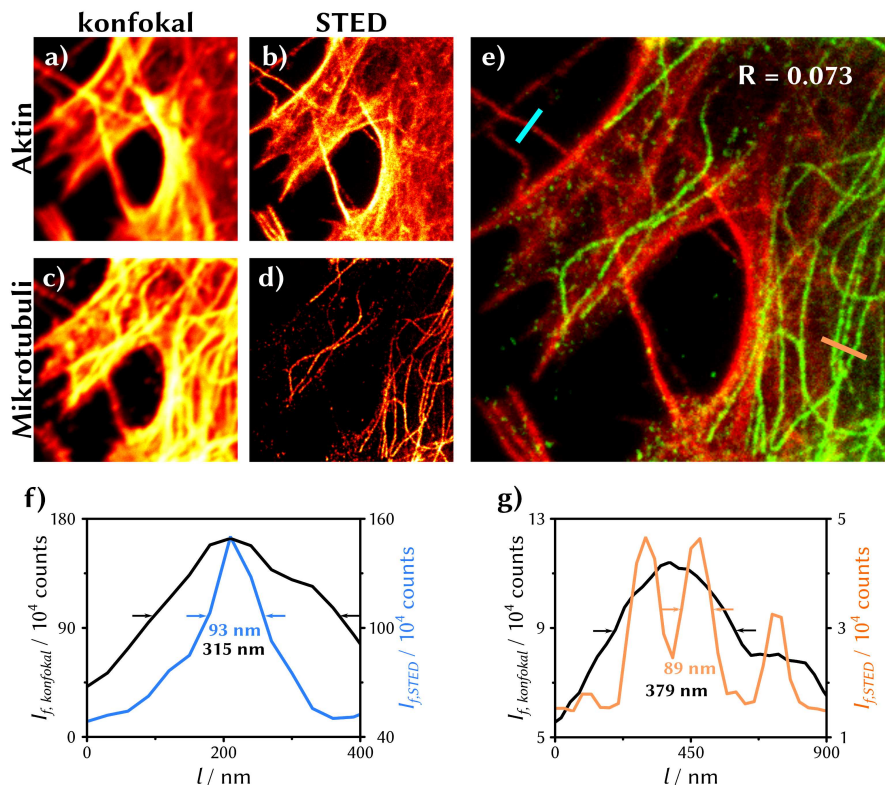
Auch die Multiplexing-STED-Mikroskopie wurden mit den chemischen Schaltern der zweiten Generation demonstriert. Hierzu kamen die Verbindungen Atto633-Ala-DPA-Biotin **23** sowie Atto647N-Ala-DPA-Biotin **24** zum Einsatz, da das verwendete STED-Mikroskop bei *PicoQuant* lediglich für den roten Spektralbereich (Anregung bei 640 nm, STED-Depletion bei 740 nm) ausgelegt war. Es wurden Mikrotubuli in fixierten NIH 3T3 Mausfibroblasten mit anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-Biotin, Streptavidin und **23** sowie **24** markiert. Als zweite Struktur wurde wieder Aktin gewählt, welches mit Atto647N-Phalloidin angefärbt wurde.

Zu Beginn des Experimentes wurden an einfach markierten Zellen Sättigungskurven der Anregungsleistung erstellt (siehe Abb. D.7f im Anhang). Dazu wurde von ein- und derselben Zelle ein Bild mit steigender Leistung aufgenommen und die integrierte Intensität dieser Zelle gegen die Anregungsleistung aufgetragen. Ab etwa 20  $\mu$ W weicht die Kurve von der Linearität ab, sodass die Farbstoffe unnötig in Sättigungsgeraten und die Photozerstörungsrate erhöht ist. Daher wurden die nachträglichen Experimente bei einer Anregungsleistung von 10  $\mu$ W durchgeführt. Als STED-Leistung wurden 100 mW eingestellt, was aus Vorexperimenten als optimale Leistung hervorging.

Die doppelt markierten Zellen wurden nun in 50  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  in PBS zuerst im konfokalen Modus, dann im STED-Modus vermessen, was in Abbildung 3.12a+b gezeigt ist. Es wurde jeweils ein Summenbild aus 100 Einzelbildern mit einer Größe von  $300 \times 300$  Pixeln bei einer Pixelverweildauer von 1.7  $\mu$ s aufgenommen. Nach Aufnahme des STED-Bildes war noch etwa 10 % der Anfangsintensität vorhanden, sodass 100  $\mu$ M EDTA zugegeben wurde und nochmals ein konfokales und ein STED-Bild aufgenommen wurde, was in 3.12c+d gezeigt ist.

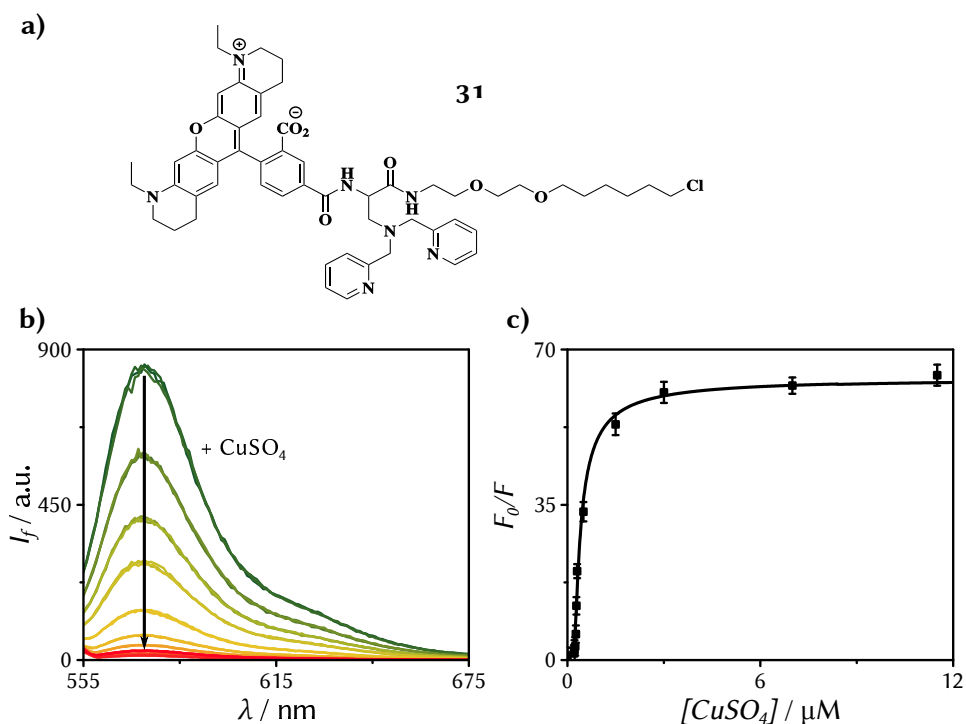
Aus den beiden STED-Bildern vor und nach Zugabe von EDTA wurde ebenfalls ein Falschfarbenbild angefertigt, was in Abbildung 3.12e dargestellt ist. Der Pearson-Korrelationskoeffizient für die beiden STED-Bilder beträgt  $R = 0.073$ . Vergleicht man die beiden konfokalen Bilder, erhält man hier einen Korrelationskoeffizienten von  $R = 0.624$ . Durch die beugungsbegrenzte, verschwommene Abbildung erscheinen die Strukturen deutlich stärker korreliert zu sein als sie in Wirklichkeit sind. Das selbe Phänomen trat auch bei einer weiteren STED-Multiplexing-Aufnahme auf (siehe Abbildung D.7 im Anhang).

In Abbildung 3.12f ist das Profil entlang der hellblauen Linie in 3.12e sowohl für das konfokale (schwarz) als auch für das STED-Bild (blau) dargestellt. Das Aktinfilament hat im konfokalen Bild eine Halbwertsbreite von  $(315 \pm 22)$  nm, im STED-Bild sind es lediglich  $(93 \pm 7)$  nm. Das liegt im Bereich der für diese Messungen erreichbaren Auflösung, da die STED-Leistung auf die Markierung der Mikrotubuli optimiert wurde. Eine Analyse von 15 Aktinfilamenten aus drei



**Abbildung 3.12.:** Chemisches Multiplexing kombiniert mit STED. Es kamen fixierte NIH 3T3 Zellen zum Einsatz. Mikrotubuli wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-Biotin, Streptavidin und **24** markiert, Aktinfilamente mit Atto647N-Phalloidin. In Anwesenheit von  $50 \mu\text{M Cu}^{2+}$  wurde lediglich Aktin abgebildet (**a+b**), nach Photobleichen und Zugabe von  $200 \mu\text{M EDTA}$  waren Mikrotubuli sichtbar (**c+d**). (**a+c**) Konfokale Bilder, (**b+d**) STED-Bilder mit Time-gating. (**e**) Falschfarbenbild aus **b+d**. Die Profile entlang der blauen bzw. orangenen Linien zeigen die Auflösungsverbesserung an einem Aktinfilament aus **a+b** in (**f**) und an den Mikrotubuli aus **c+d** in (**g**).

verschiedenen Messungen ergab für einzeln liegende Aktinfilamente einen Durchmesser von  $(92 \pm 17)$  nm. Das Profil entlang der orangenen Linie in 3.12e ist in Abbildung 3.12g abgebildet. Hier ist im konfokalen Bild (schwarz) lediglich eine breite Struktur mit einer Halbwertsbreite von  $(379 \pm 9)$  nm sowie eine angelagerte Schulter mit einer Halbwertsbreite von  $(176 \pm 13)$  nm. Im STED-Bild werden hier jedoch drei einzeln verlaufende Mikrotubuli sichtbar, mit Halbwertsbreiten von  $(84 \pm 3)$ ,  $(89 \pm 4)$  und  $(69 \pm 5)$  nm, was gut mit der maximal erwarteten Halb-



**Abbildung 3.13.:** Ensemble-Experimente mit den Halo-Tag-Aminosäure-Konstrukten: (a) Struktur von Atto565-Halo-Ala-DPA **31**. (b) Fluoreszenztitration einer 500 nM Lösung von **31** in PBS; (c) Zugehöriger Stern-Volmer-Plot.

wertsbreite auf Grund der Markierungsstrategie zusammenpasst. Nach Analyse von 19 Mikrotubuli aus drei verschiedenen Experimenten ergab für Mikrotubuli eine Halbwertsbreite von  $(83 \pm 11)$  nm.

### 3.3. Synthese von Halo-Tag-Derivaten

Alternativ zu der bisher benutzten Streptavidin-Biotin Markierung wurden als weitere Funktionalisierungen Halogenalkan-Derivate synthetisiert, die eine Markierung mittels des von Los *et al.* im Jahre 2008 eingeführten enzymatischen Halo-Tags ermöglicht.<sup>[108]</sup> Dieses Protein, eine Halogenalkan Dehalogenase, wird als Fusionsprotein mit dem Zielprotein in die zu untersuchende Zelle eingebracht. Hier geht es mit einem Halogenalkan eine kovalente Bindung ein und markiert damit das Zielprotein mit dem Rest, der am Halogenalkan hängt.

Zuerst wurde der Halo-Tag-Linker **32** in einer Zweistufenreaktion mit einer

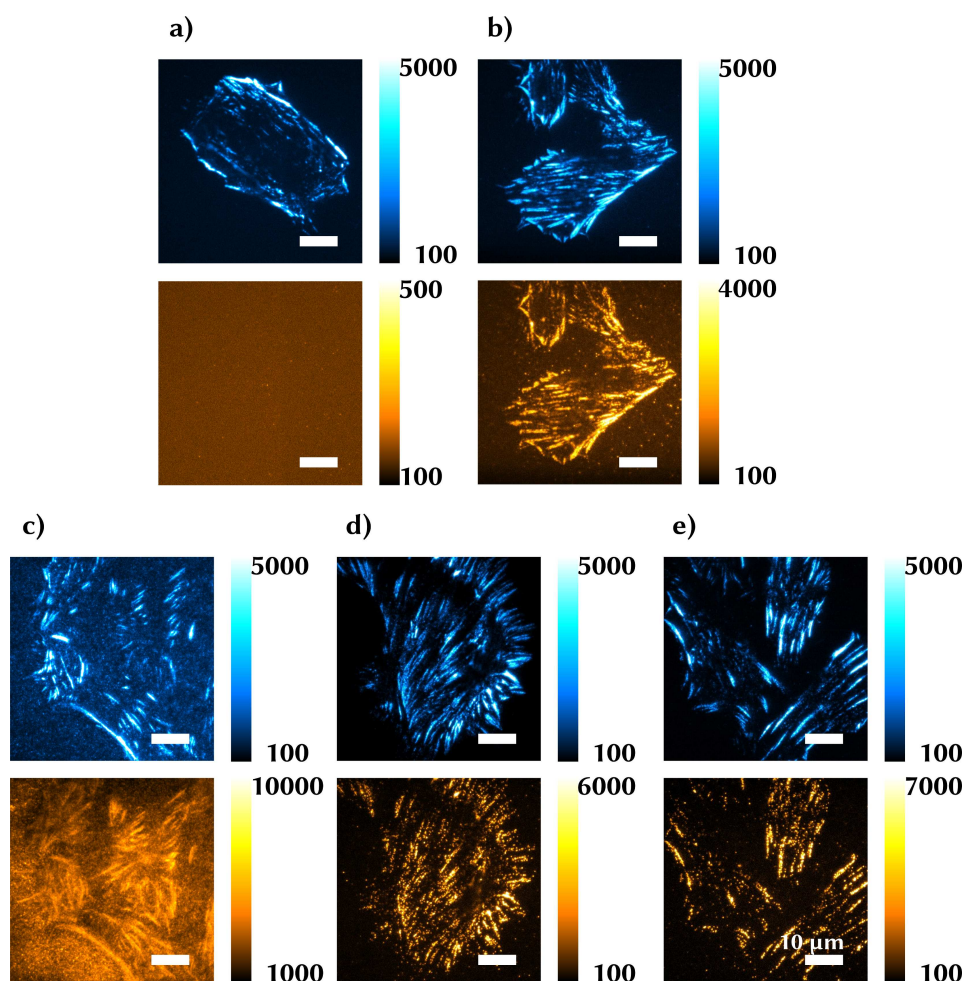


Gesamtausbeute von 44 % synthetisiert. Im zweiten Schritt wurden dann die beiden chemischen Schalter Halo-Ala-DPA **12** und Halo-Lys-DPA **13** durch in-situ Aktivierung der Carbonsäuren mit HBTU in trockenem DMF mit DIPEA als Base aus **1** bzw. **2** und **32** nach anschließender Entschützung mit Trifluoressigsäure in Ausbeuten von 70 % bzw. 72 % erhalten.

Als nächstes wurden Farbstoffderivate durch Reaktion mit Atto565-NHS in trockenem DMF mit DIPEA als Base hergestellt und mittels HPLC aufgereinigt. So konnte Atto565-Halo-Ala-DPA **31** gewonnen werden. In Abbildung 3.13 ist die Struktur von **31** dargestellt (auch hier ist wieder nur das 4'-Isomer des Farbstoffes abgebildet). Diese Verbindung wurde in PBS bei einer Konzentration von 500 nM titriert, die zugehörigen Fluoreszenzspektren sind in Abbildung 3.13b gezeigt. Der daraus erstellte Stern-Volmer-Plot in Abbildung 3.13c geht bei einem Wert von  $\frac{F_0}{F} \approx 62$  in Sättigung. Aus der Anpassung von Gleichung A.15 an die Daten wurde für die Komplexbildungskonstante ein Wert von  $K = (3.28 \pm 0.83) 10^7 \text{ M}^{-1}$  bestimmt, die relative Quantenausbeute beträgt hier  $\phi_{aus} = (1.5 \pm 0.5) 10^{-3}$ . Die Halo-Tag-Derivate verhalten sich also ähnlich die Biotin-Konjugate, sodass auch hier eine Optimierung der Markierungsbedingungen in biologischen Proben durchgeführt wurde, was im nächsten Abschnitt beschrieben wird. Die Ensemble-Experimente mit **33** sind in Abbildung D.9 im Anhang gezeigt.

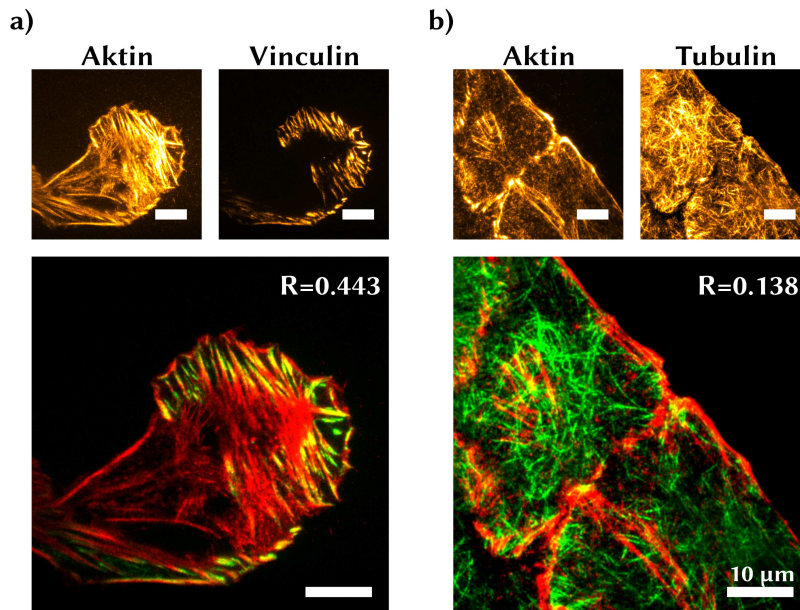
### 3.3.1. Markierungsoptimierung

Die Markierung des enzymatischen Halo-Tags erfolgt im nanomolaren Bereich. Die optimalen Bedingungen um eine spezifische Markierung ohne unspezifisches Hintergrundsignal zu erreichen müssen jedoch für jedes Substrat extra bestimmt werden. Daher wurden fixierte MEF-Zellen, die das Halo-Vinculin-GFP-Konstrukt exprimieren, unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Da das Fusionskonstrukt durch das GFP selbst fluoreszent ist, konnte es bei 488 nm bei etwa 1 mW Laserleistung angeregt und im Bereich von 500–550 nm detektiert werden. Die mit Atto565 markierten Halo-Proteine wurden bei 561 nm mit 1 mW angeregt und deren Fluoreszenz im Bereich von 570–640 nm detektiert. In Abbildung 3.14a sind die Bilder der beiden spektralen Kanäle (blau und orange) einer ungefärbten Zelle dargestellt. Diese wurden sequentiell aufgenommen, dazu wurden Bandpassfilter und Laserquelle nach der ersten Aufnahme gewechselt. Hier sind die mit den GFP-Vinculin-Halo Fusionskonstrukten markierten fokalen Adhäsionspunkte deutlich im blauen Kanal zu erkennen, während der orangene Kanal lediglich Hintergrundfluktuationen abbildet. Nach Färbung mit der Testverbindung Atto565-Halo **34** (diese wurde aus **32** mit Atto565-NHS in DMF/DIPEA hergestellt und mittels HPLC aufgereinigt) sind auch im orangenen Kanal die fokalen Adhäsionspunkte erkennbar, was in Abbildung 3.14b gut zu erkennen ist. Diese Färbung



**Abbildung 3.14.:** Markierungsoptimierung der Halo-Tag-Färbung in fixierten, Halo-GFP-Vinculin exprimierenden MEF Zellen. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzbilder im GFP-Kanal (500–550 nm, oben) und im Atto565-Kanal (570–640 nm, unten). Die Bilder wurden jeweils sequentiell aufgenommen, es kamen ein Laserlinien von 488 und 561 nm bei einer Leistung von 500  $\mu$ W zum Einsatz. Belichtungszeit 50 ms, Gain 500: (a) ungefärbt, (b) 10 nM Atto565-Halo, (c) 100 nM und (d) 10 nM Atto565-Halo-Lys-DPA **33**, (e) 10 nM Atto565-Halo-Ala-DPA **31**. Maßstab je 10  $\mu$ m.

wurde, in Anlehnung an Erkenntnisse von Kollegen, bei einer Substratkonzentration von 10 nM in Inkubationspuffer für 20 min durchgeführt.<sup>[168]</sup> Eine Erhöhung der Konzentration auf 100 nM führt zu deutlich erhöhtem unspezifischem



**Abbildung 3.15.:** Chemisches Multiplexing mit Halo-Derivaten. Das Multiplexing wurde mit  $25\ \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  und  $50\ \mu\text{M}$  EDTA durchgeführt: (a) Multiplexing in MEF Halo-Vinculin-GFP Zellen. Aktin wurde mit Atto565-Phalloidin markiert, Halo-Vinculin mit **31**. (b) Multiplexing in fixierten HeLa Halo-Tubulin Zellen. Aktin wurde mit Atto565-Phalloidin markiert, Halo-Tubulin mit **31**. Maßstab je  $10\ \mu\text{m}$ .

Hintergrund (Abb. 3.14c), der sich auch nach mehrmaligem Waschen nicht reduziert. Deshalb wurden die weiteren Färbungen bei einer Konzentration von  $10\ \text{nM}$  durchgeführt.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine Färbung mit Atto565-Halo-Ala-DPA **31** und Atto565-Halo-Lys-DPA **33** ebenfalls bei einer Konzentration von  $10\ \text{nM}$  durchgeführt. In Abbildung 3.14d ist die Markierung mit **33** gezeigt, in 3.14e die mit **31**.

### 3.3.2. Multiplexing-Experimente in fixierten Zellen

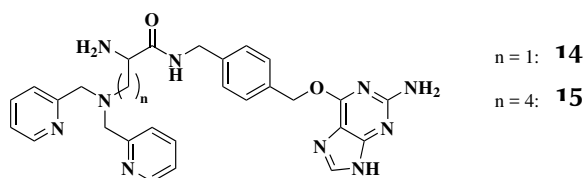
Wie in Abbildung 3.14e dargestellt ist Lokalisation des GFP sehr definiert auf die fokalen Adhäsionspunkte beschränkt. Im Atto565-Kanal ist in der Zelle nur sehr wenig unspezifische Fluoreszenz erkennbar, außerhalb der Zelle bleibt das Bild dunkel. Der Korrelationskoeffizient der beiden Bilder beträgt  $R = (0.755)$ , und nimmt damit einen ähnlichen Wert an wie in den Experimenten aus Kapitel 2.6,

in denen eine Struktur doppelt markiert wurde.

Unter den ermittelten, optimalen Färbebedingungen wurden nun in zwei genetisch veränderten Zelllinien Experimente zum chemischen Multiplexing durchgeführt, um die Anwendbarkeit der Halo-Tag-Derivate zu demonstrieren. In Abbildung 3.15b ist ein Experiment in fixierten MEF Zellen gezeigt, die stabil ein Halo-Vinculin-GFP Konstrukt exprimieren. Dieses Konstrukt wurde mit 10 nM **31** in Inkubationspuffer für 20 Minuten markiert, danach wurde gründlich dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen. Parallel dazu wurde Aktin mit Atto565-Phalloidin angefärbt. Am kommerziellen TIRF-Mikroskop (50 ms Belichtungszeit, 5 mW Anregungsleistung bei 561 nm) wurde dann in Anwesenheit von 25  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  in PBS die Aktinstruktur abgebildet. Über zwei Minuten wurde diese dann durch Photozerstörung ausgebleicht und nach Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  EDTA die markierten Vinculine sichtbar gemacht und abgebildet. Im Falschfarbenbild sieht man deutlich, dass Halo-Vinculin an den Enden von langen Aktin-Fasern lokalisiert war. Das macht sich auch im Pearson-Korrelationskoeffizienten bemerkbar, welcher einen Wert von  $R = 0.443$  annimmt.

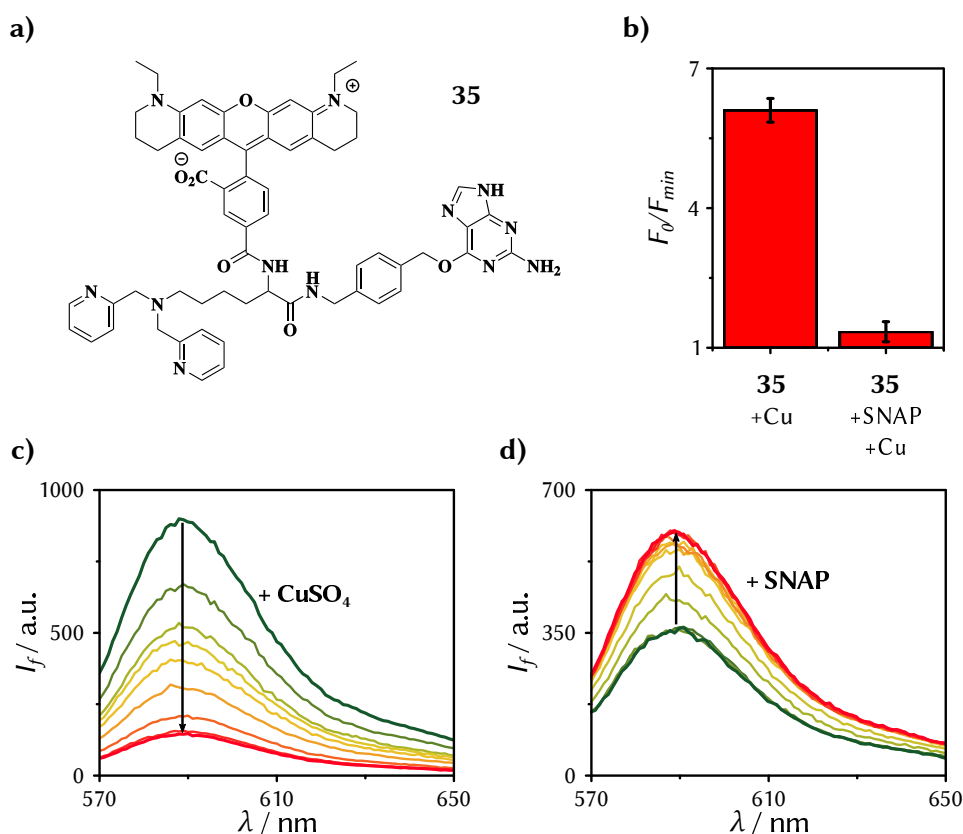
In einem zweiten Experiment wurden fixierte HeLa Zellen verwendet, die transient mit Halo-Tubulin transfiziert wurden. Diese Zellen wurden von KLAUS YSERENTANT präpariert und zwei Tage nach Transfektion fixiert. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben mit **31** und Atto565-Phalloidin markiert, gewaschen und unter den oben genannten Bedingungen mikroskopiert. Die Mikrotubuli konzentrieren sich hier auf den Raum im inneren der Zelle, die Aktinfilamente umspannen das Zelläußere. Hier ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0.138$ .

### 3.4. Synthese von Benzylguanin-Derivaten



**Schema 3.5.:** Strukturen der synthetisierten Benzylguanin-Derivate der chemischen Schalter BG-Ala-DPA **14** und BG-Lys-DPA **15**.

Als weiteres enzymatisches Markierungssystem hat sich das SNAP-Tag etabliert.<sup>[111, 114, 169]</sup> Sein Substrat, ein zur Markierung mit einem Amino-Benzylrest



**Abbildung 3.16.:** (a) Chemische Struktur von Atto565-BG-Lys-DPA **35**. (b) Gemessene maximale Fluoreszenzlöschung von **35** (links) und von **35** nach Reaktion mit einem Äquivalent SNAP-Protein (rechts), jeweils nach Zugabe von  $10 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS. (c) Fluoreszenztitration einer  $500 \text{ nM}$  Lösung **35** in PBS mit  $\text{CuSO}_4$  ( $0$ – $10 \mu\text{M}$ ). (d) Fluoreszenzanstieg über einen Zeitraum von 20 Minuten nach Zugabe von  $500 \text{ nM}$  SNAP-Protein zu einer  $500 \text{ nM}$  Lösung von **35** in PBS.

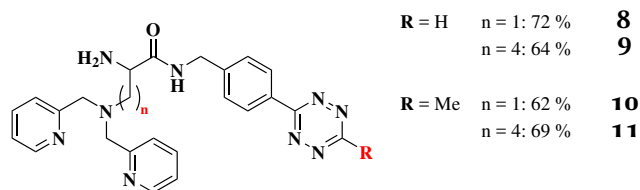
ausgestattetes Guanin, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach einer Publikation von KAI JOHANSSON *et al.* durchgeführt.<sup>[109]</sup> Die fünfstufige Synthese lieferte  $O^6$ -(4-Aminomethyl-benzyl)guanin **36** in einer Gesamtausbeute von 33 %. Mit **36** konnten nun durch in-situ Aktivierung der Aminosäuren **1** und **2** mittels HBTU in trockenem DMF und DIPEA als Base die Verbindungen BG-Ala-DPA **14** und BG-Lys-DPA **15** in Ausbeuten von 60 bzw. 61 % erhalten werden (siehe Schema 3.5).

Von **15** wurde auch ein Konjugat mit Atto565-NHS synthetisiert und per HPLC aufgereinigt. **35**, in Abbildung 3.16a dargestellt, konnte so mit einer Gesamtausbeute von 94 % erhalten werden. Diese Verbindung zeigt in PBS bei Zugabe von

10  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  eine Fluoreszenzlöschung um den Faktor 6.1, nach erfolgter Reaktion mit aufgereinigtem SNAP-Protein geht dieser Faktor auf einen Wert von 1.4 zurück, wie in Abbildung 3.16b dargestellt. Der chemische Schalter ist also nach Konjugation an sein Zielprotein entweder nicht mehr frei zugänglich für  $\text{Cu}^{2+}$  oder es erfolgt eine Destabilisierung des  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes durch in der Nähe befindliche Aminosäurereste auf der Proteinoberfläche.

Abbildung 3.16c zeigt die Fluoreszenztitration der freien Verbindung **35** in PBS. Gibt man zu **35** in PBS ein Äquivalent des aufgereinigten SNAP-Proteins, wie in Abbildung 3.16d gezeigt, so erfolgt innerhalb von etwa 20 Minuten ein Fluoreszenzanstieg um einen Faktor von etwa 1.7. Dies ist nicht ungewöhnlich, da das Guanin selbst als Fluoreszenzlöcher bekannt ist und Benzylguanin-Farbstoff-Konjugate teils beträchtliche Fluorogenität aufweisen.<sup>[114, 170-172]</sup> Da jedoch nach Reaktion mit dem SNAP-Protein die Fähigkeit zur chemischen Schaltung verloren geht (Abb. 3.16b, rechts), ist diese Art von Schaltern nicht geeignet für die weitere Nutzung. Ein möglicher Ausweg wäre eine Einführung eines längeren Linkers zwischen Benzylguanin und der Aminosäure, was jedoch wieder die Fluorogenität reduzieren würde. Auf weitere Experimente mit den Benzylguanin-Derivaten wurde daher verzichtet.

### 3.5. Synthese von Tetrazin-Derivaten



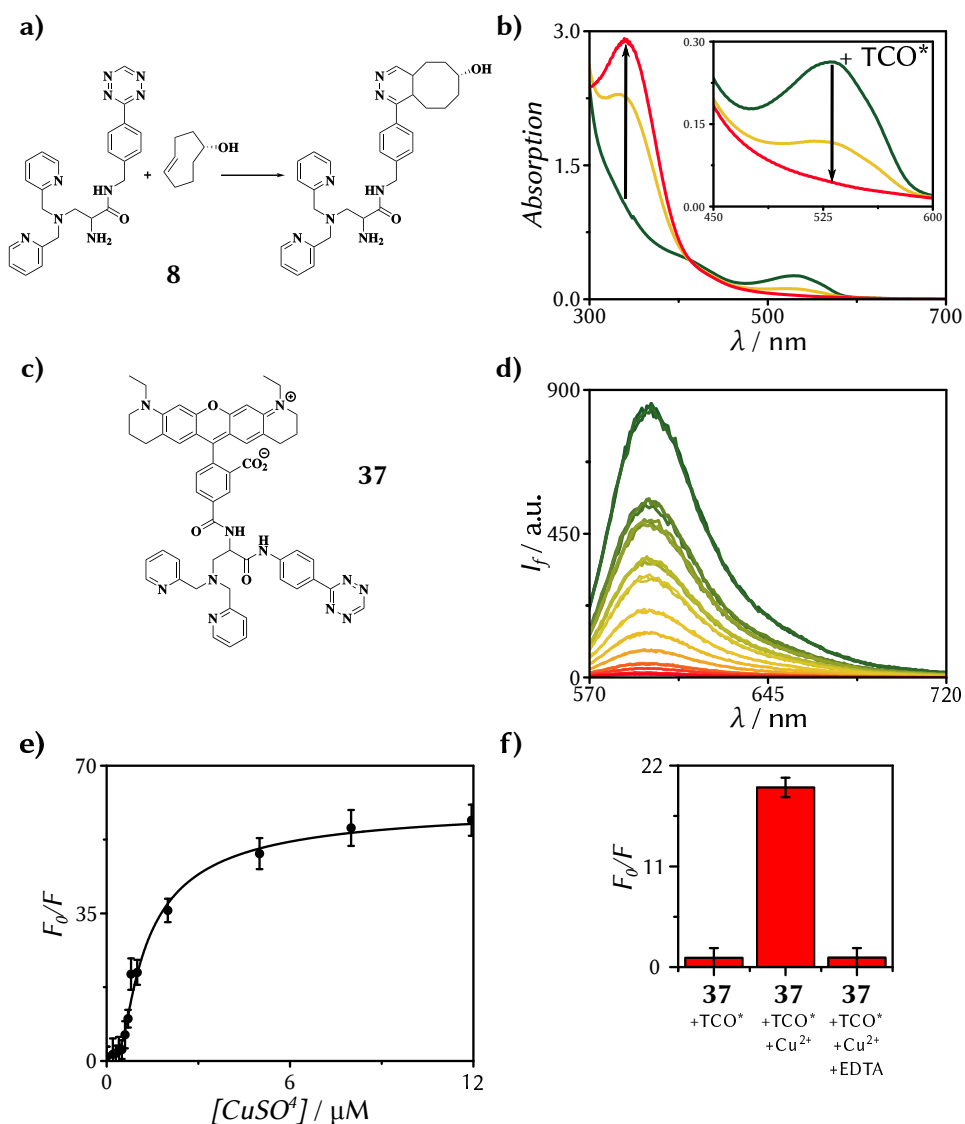
**Schema 3.6.:** Chemische Struktur der synthetisierten Tetrazin-Derivate HTet-Ala-DPA **8**, HTet-Lys-DPA **9**, MeTet-Ala-DPA **10** und MeTet-Lys-DPA **11** mit den Gesamtausbeuten nach Aufreinigung und Entschützung des Amins.

Zur effizienten, bio-orthogonalen Markierung eignen sich sogenannte Click-Reaktionen, hier insbesondere die Tetrazin-Ligation (SPIEDAC - engl. *strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition*).<sup>[127, 133]</sup> Konjugate von Tetrazinen mit Fluoreszenzfarbstoffen sind dafür bekannt, dass sie bei geeigneter Konjugation stark fluorogen sind und daher erst nach erfolgter Ligation die volle Fluoreszenz aufweisen.<sup>[130-132]</sup> Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Derivate der chemischen Schalter synthetisiert, die ein Tetrazin-Funktionalität tra-

gen. Ausgangspunkt waren Amin-modifizierte Tetrazine und Methyl-Tetrazine, die von der Firma *SICHEM* bezogen wurden. Es wurden, wie schon vorher beschrieben, durch in-situ Aktivierung der Carbonsäure mit HBTU in trockenem DMF mit DIPEA als Base die Konjugate **8-11** erhalten, wie in Schema 3.6 dargestellt.

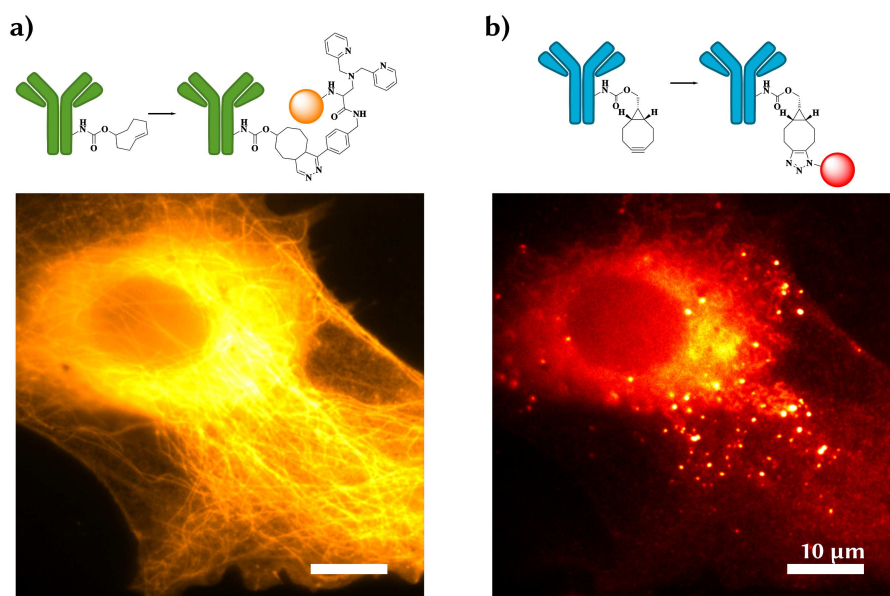
Diese Konjugate wurden sodann in Ensemble-Experimenten untersucht (Abbildung 3.17). In 3.17a ist die Reaktion von **8** mit *trans*-Cyclooct-4-enol (*a*-TCO\*) skizziert. Die Reaktion wurde in PBS/DMSO 20:1 durchgeführt, um eine vollständige Löslichkeit zu garantieren. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 3.17b im Absorptionsspektrometer verfolgt worden. Hier zeigt sich die charakteristische, für die rote Farbe verantwortliche Absorptionsbande der Tetrazine bei 530 nm, die nach Zugabe von einem Äquivalent *a*-TCO\* nach nur einer Minute vollständig verschwunden ist. Stattdessen taucht bei 340 nm eine neue Absorptionsbande auf.

Da diese Reaktion wie zu erwarten gut und schnell ablief, wurde das Farbstoffderivat Atto565-HTet-Ala-DPA **37** aus dem Atto565-NHS-Aktivester und **8** in trockenem DMF mit DIPEA als Base synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt (Abb. 3.17c). Diese Verbindung wurde sodann in PBS einer Fluoreszenztitration mit CuSO<sub>4</sub> unterzogen. Die zugehörigen Fluoreszenzspektren in Abbildung 3.17d zeigen auch hier eine starke Fluoreszenzlöschung. Aus dem zugehörigen Stern-Volmer-Plot in Abbildung 3.17e wurde, durch Anpassung von Gleichung A.15, für die Komplexbildungskonstante ein Wert von  $K = (6.52 \pm 1.04) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und für die relative Quantenausbeute des gelöschten Zustands  $\phi_{aus} = (1.6 \pm 0.6) 10^{-3}$  erhalten. Damit sind die Eigenschaften der Tetrazin-modifizierten chemischen Schalter vergleichbar gut wie die der anderen bisher getesteten Derivate. Zusätzlich wurde die Fluoreszenzlöschung auch noch nach Reaktion mit *a*-TCO\* untersucht, was in Abbildung 3.17f gezeigt ist. Hier ist die relative Fluoreszenzänderung einer 500 nm Lösung von **37** nach Zugabe von einem Äquivalent *a*-TCO\* sowie zusätzlicher Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Cu<sup>2+</sup> und 10  $\mu\text{M}$  EDTA gezeigt. Die Reaktion mit *a*-TCO\* hat keinen Einfluss auf die Fluoreszenz der Verbindung, wohingegen die Zugabe von Cu<sup>2+</sup> zu einer deutlichen Fluoreszenzlöschung führt, die nach Zugabe von EDTA wieder aufgehoben wird. Diese Ergebnisse sind zum einen vielversprechend, da dies die Eignung von **37** für Zellexperimente demonstriert. Zum anderen ist eine mögliche Fluorogenität von **37** damit widerlegt, was die Anwendbarkeit in Lebendzell-Experimenten noch deutlich gesteigert hätte. Dennoch eignen sich die Tetrazin-Derivate zur Markierung in biologischen Proben, was im Folgenden demonstriert werden soll.



**Abbildung 3.17.:** Ensemble-Experimente mit HTet-Ala-DPA **8**: (a) Reaktion von **8** mit *trans*-Cyclooct-4-enol (*a*-TCO\*). (b) Absorptionsspektrum von **8** in PBS/DMSO 20:1 vor (grün) und nach Zugabe von einem Äquivalent *a*-TCO\*, gemessen nach 30 (gelb) und 60 Sekunden (rot). (c) Mit Atto565 markierter chemischer Schalter **37**. (d) Fluoreszenztitration von **37** in PBS sowie (e) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, der mittels Gleichung A.15 angepasst wurde. (f) Fluoreszenzänderung von **37** nach subsequenter Zugabe von einem Äquivalent *a*-TCO\*,  $1 \mu M$   $Cu^{2+}$  sowie  $10 \mu M$  EDTA zeigt die Reversibilität der Fluoreszenzlöschung von **37** auch nach Reaktion mit *a*-TCO\*.





**Abbildung 3.18.:** Markierung via Kupfer-freie Click-Chemie in fixierten NIH 3T3 Zellen. Die Zellen wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin-*a*-TCO\* und mit anti-Clathrin-endo-BCN in Inkubationspuffer markiert und dann dreimal gründliche gewaschen. Nun wurde mit je 1  $\mu\text{M}$  Atto647N-Azid und **37** für 15 Minuten in Inkubationspuffer inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und im Epifluoreszenzmikroskop mikroskopiert (je 1 mW bei 561 nm und 640 nm, Belichtungszeit 50 ms). Markierungsschema und zugehöriges Fluoreszenzbild von (a) **37** an Mikrotubuli und (b) Atto647N-Azid an Clathrin.

### 3.5.1. Click-Markierung in fixierten Zellen

Um in biologischen Proben eine Markierung mittels Kupfer-freier Click-Chemie zu erreichen, wurde neben der SPIEDAC Tetrazin-Ligation die dazu orthogonale SPAAC (strain-promoted alkyne-azide cycloaddition) in fixierten NIH 3T3 Zellen durchgeführt, um so zwei Strukturen gleichzeitig und selektiv zu markieren.<sup>[127,173]</sup> Hierzu wurden, wie in Abbildung 3.18 dargestellt, mit den gespannten C–C-Doppel- und Dreifachbindungen markierte Antikörper eingesetzt. Diese wurden vorab aus den monoklonalen Antikörpern anti- $\alpha$ -Tubulin und anti-Clathrin hergestellt. Dazu wurden diese mit je fünf Äquivalenten der Aktivester von *a*-TCO\* und endo-BCN in PBS unter Zugabe von 10 Vol.%  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung bei Raumtemperatur für eine Stunde zur Reaktion gebracht und anschließend mittels Gel-Permeations-Chromatographie aufgereinigt. Nach Identifizierung der

Antikörper-Fractionen im Absorptionsspektrometer (siehe auch Abbildung D.11 im Anhang) wurden damit fixierte NIH 3T3 Zellen markiert. Da die beiden Koppelungsfunktionen orthogonal zueinander sind, konnten sie beide zeitgleich mit Atto565-HTet-Ala-DPA **37** und Atto647N-Azid markiert. Hierzu kamen jeweils 1  $\mu\text{M}$  Lösungen in Inkubationspuffer zum Einsatz, nach 10 Minuten wurde dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen. In 3.18a ist das Markierungsschema sowie das zugehörige Fluoreszenzbild der Markierung von Mikrotubuli mit anti- $\alpha$ -Tubulin-*a*-TCO\* und **37** (Detektionsbereich 570–640 nm) gezeigt. Die selbe Zelle im roten Detektionskanal oberhalb 640 nm zeigt in 3.18b die markierten Endozytose-Vesikel, die mit anti-Clathrin-ENDO-BCN und Atto647N-Azid markiert wurden. Die beiden Farbkanäle zeigen eine Korrelation von  $R = 0.749$ , da beide Strukturen den gleichen Raum beanspruchen. Zusätzlich ist der Korrelationskoeffizient erhöht, da in beiden Kanälen deutlich mehr unspezifische Markierung vorliegt als bei Verwendung der enzymatischen Tags oder der Streptavidin-Biotin-Technik. Ob das auf unzureichendes Waschen vor dem Mikroskopieren zurückzuführen ist oder an der geringeren Selektivität der selbst markierten Antikörper liegt, kann hier nicht mit Sicherheit gesagt werden.

**Teil III.**

## **Diskussion und Ausblick**



## Kapitel 4.

# Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit sollten modulare chemische Schalter weiterentwickelt und ihre Anwendbarkeit für neue mikroskopische und nanoskopische Methoden ausgetestet werden. In Kapitel 2 wurden die Schalter der ersten Generation, basierend auf einer doppelsträngigen DNA, systematisch variiert, im Ensemble und auf Einzelmolekülebene untersucht und schließlich für Methoden wie CHIRON und das chemische Multiplexing eingesetzt. Kapitel 3 widmete sich der Weiterentwicklung des Konzeptes modularer chemischer Schalter und stellte zwei neue Konstrukte samt zahlreicher Funktionalisierungsstrategien vor. Diese wurden charakterisiert und auf ihre Anwendbarkeit für die Mikro- und Nanoskopie hin untersucht.

### 4.1. Charakterisierung des bestehenden Sondenkonzepts und Anwendung in Mikro- und Nanoskopie

In Anlehnung an Vorexperimente im Arbeitskreis wurden die chemischen Schalter der ersten Generation modifiziert, charakterisiert und neue Methoden der Multiplexing-Mikroskopie entwickelt. Das DNA-Grundgerüst, welches Liganden und Fluoreszenzfarbstoff in räumliche Nähe bringt sowie einen Biotin-Linker als Kopplungsfunktion trägt, wurde beibehalten und die Sonden durch Variation des Liganden und des Farbstoffes weiter verfeinert. So erwies sich neben dem etablierten bidentaten Bipyridin ein tridentater Dipicolylamin-Ligand als vielversprechend. Zudem wurden von *Atto-Tec* speziell auf die Bedürfnisse der Einzelmolekülspektroskopie und hochauflösenden Mikroskopie zugeschnittene Farbstoffe in das Konstrukt eingebaut, von denen sich Atto565 und Atto647N als sehr gute Alternativen zum etablierten TMR erwiesen. In Ensemble-Experimenten lieferten diese beiden Farbstoffe zu vorherigen Ergebnissen konsistente Werte für die Komplexbildungskonstante,<sup>[44, 148]</sup> die aus Fluoreszenztitrationen durch Anpassung von Gleichung 2.1 ermittelt wurden und in Tabelle 4.1 nochmals zusam-

mengefasst sind.

**Tabelle 4.1.:** Zusammenfassung der Ensemble-Ergebnisse, die mit TMR, Atto565 und Atto647N und den Liganden Bipyridin und Dipicolylamin erzielt wurden.

Sonde	$K / 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$	$\phi_{aus} / \%$	$R_{kor.}^2$
TMR-Bipy	$4.26 \pm 0.48$	$16.4 \pm 0.3$	0.9869
Atto565-Bipy	$4.58 \pm 0.54$	$12.2 \pm 0.3$	0.9600
Atto647N-Bipy	$1.36 \pm 0.15$	$4.5 \pm 0.3$	0.9700
TMR-DPA	$5.12 \pm 0.44$	$11.3 \pm 0.2$	0.9916
Atto565-DPA	$5.46 \pm 0.29$	$8.9 \pm 0.2$	0.9846
Atto647N-DPA	$12.42 \pm 2.42$	$4.9 \pm 0.2$	0.9660

Im Vergleich zu Literaturwerten von  $\log(K) = 9.31$  für den Dipicolylamin- $\text{Cu}^{2+}$ -Komplex fallen die hier gemessenen Werte um zwei Größenordnungen geringer aus,<sup>[158]</sup> was jedoch auf unterschiedliche Substitution des DPA-Liganden und der Verwendung von hoch geladenen DNA-Doppelsträngen sowie einem zusätzlichen, möglicherweise destabilisierenden Einfluss geladener Farbstoffmoleküle zurückzuführen ist.

Als Löschmechanismus konnte Förster Resonanzenergietransfers FRET ausgeschlossen werden, da bei dem aus MD-Simulationen erhaltenen möglichen Abstand zwischen Ligand und Farbstoff bei FRET durch alle 3d-Kationen eine fast vollständige Löschung erreicht werden sollte, die im Experiment jedoch nicht zu sehen war. Weil die  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexe von Bipyridin und Dipicolylamin bekannt dafür sind, als PET-Fluoreszenzlöcher zu agieren, scheint dies der wahrscheinlichste Löschmechanismus zu sein.<sup>[146]</sup> Zur weiteren Untersuchung nach der Markus-Theorie werden die Redoxpotentiale der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe benötigt.<sup>[13]</sup> Da diese jedoch nicht in Mengen erhältlich sind, die für eine Messung vonnöten wären, wurde auf solch eine theoretische Betrachtung hier verzichtet.

Basierend auf Vorarbeiten wurde die Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  durch Atto565-Bipy und Atto565-DPA auf Einzelmolekülebene untersucht. Die immobilisierten Schalter stellten ein System mit drei Intensitäts-Zuständen dar, ein heller An-Zustand, ein dunkler Aus-Zustand und der gebleichte Zustand. Der Übergang zwischen den An- und Aus-Zuständen erfolgte sprunghaft. Eine statistische Analyse der Verweildauern im jeweiligen Zustand in Abhängigkeit von der  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration lieferte im thermodynamischen Gleichgewicht Werte für die Übergangsraten und somit auch für die Gleichgewichtskonstante. Diese Werte sind nochmal ins Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die so bestimmten Gleichgewichtskon-

**Tabelle 4.2.:** Zusammenfassung der Übergangsraten und der Komplexbildungskonstanten für Atto565-Bipy und Atto565-DPA.

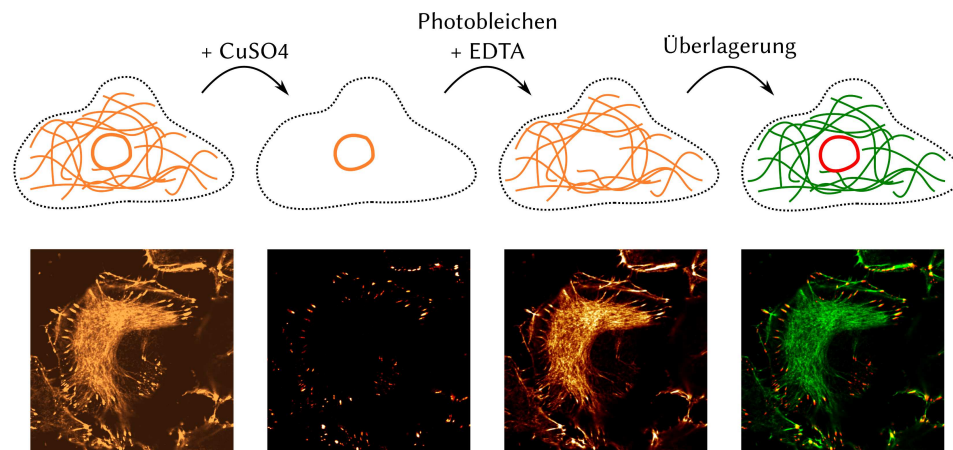
Sonde	$k_a/\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_d/\text{s}^{-1}$	$K/\text{M}^{-1}$
Atto565-Bipy	$(6.33 \pm 0.94) \cdot 10^6$	$(6.20 \pm 0.91)$	$(1.20 \pm 0.21) \cdot 10^6$
Atto565-DPA	$(3.07 \pm 1.64) \cdot 10^7$	$(2.44 \pm 0.61)$	$(1.26 \pm 0.74) \cdot 10^7$

stanten unterscheiden sich dabei um eine Größenordnung. Der Unterschied beider Liganden fiel in den Ensemble-Experimenten deutlich geringer aus, da hier nicht zwischen funktionalen Sonden, nicht funktionalen Sonden und eventuell vorhandenem freiem Farbstoff unterschieden werden kann. Die Einzelmolekülexperimente werden jedoch auf Oberflächen durchgeführt, wo freier Farbstoff ausgewaschen werden kann und nicht funktionale Sonden schnell ausbleichen. Dies könnte die leichte Diskrepanz der beiden Messmethoden erklären.

Die chemische Hochauflösung CHIRON in fixierten HeLa-Zellen wurde mit der Sonde Atto565-DPA durchgeführt. Es wurden Mikrotubuli als Zielstruktur ausgewählt, da diese eine reproduzierbare, wohl definierte Struktur liefern, deren Dimensionen aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen genau bekannt sind.<sup>[174]</sup> Nach Anwendung der frei erhältlichen Software „rapidSTORM“ konnten Mikrotubuli mit einer Halbwertsbreiten von 78 nm abgebildet werden. An einem Kreuzungspunkt konnten zudem zwei Filamente im Abstand von 178 nm voneinander getrennt werden. Das Lokalisationsergebnis weist jedoch deutliche Artefakte in Form von unterbrochenen Filamenten auf. Dass die Filamente tatsächlich bei der Probenpräparation gebrochen sind, ist sehr unwahrscheinlich. Eher handelt es sich um unvollständige Markierung oder um Artefakte, die entweder durch dissoziierte, nicht funktionale Sonden verursacht werden oder durch die Restfluoreszenz der gelöschten Sonden zustande kommen.

Die aberrationsfreie Abbildung mehrerer Strukturen im selben Farbkanal wurde durch Verwendung der chemischen Schalter etabliert und deren Grenzen ausgelotet. Die im Ensemble erreichte etwa zehnfache Löschung konnte auch in markierten Zellen gefunden werden. Durch Ausnutzung der Reversibilität der Fluoreszenzlöschung konnte das chemische Multiplexing als Methode ausgearbeitet und charakterisiert werden. Das Prinzip ist nochmals in Abbildung 4.1 zusammengefasst.

Zur Quantifizierung der Aufnahmen wurde die Ähnlichkeit zweier Bilder anhand des Pearson-Korrelationskoeffizient  $R$  (Gl. 2.10) beurteilt. Die Multiplexing-Aufnahmen von einer doppelt markierten Struktur lieferten eine gute Kolo-kalisation der beiden Bilder, während unterschiedliche Strukturen je nach beanspruch-

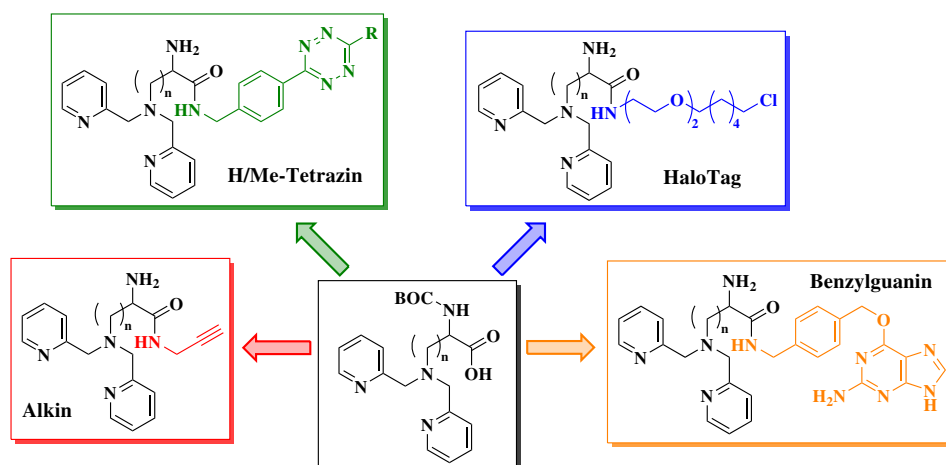


**Abbildung 4.1.:** Chemisches Multiplexing: eine doppelt markierte Zelle wird mit CuSO<sub>4</sub> behandelt, das schaltet die chemischen Schalter aus, es verbleibt nur die Fluoreszenz der nicht schaltbaren Marker. Nach Photozerstörung und Zugabe von EDTA werden die chemischen Schalter sichtbar, so lässt sich schließlich ein Falschfarbenbild der beiden in einer Farbe markierten Strukturen erstellen.

tem Raum eine deutlich geringere Kolo-kalisation aufwiesen. Die Methode wurde auch auf ein Zwei-Farben-Experiment erweitert, wo mit Hilfe von TMR-Bipy und Atto647N-Bipy insgesamt vier Strukturen in einer Zelle abgebildet werden konnten. Darüber hinaus eignet sich das chemische Multiplexing auch für komplexere Mikroskopietechniken wie z. B. STED, was mit Ato565-Bipy demonstriert werden konnte. So konnten zwei Strukturen an einem STED-Mikroskop mit nur einem spektralen Kanal in hoher Auflösung abgebildet werden. Die Restfluoreszenz der gelöschten Struktur stellt auch hier die größte Limitierung dar. Je geringer diese ausfällt, desto besser lassen sich verschiedene Strukturen voneinander trennen. Bei entsprechend geringer Restfluoreszenz lassen sich auch noch kleine, schwach markierte Strukturen in CHEMPLEXING Experimenten untersuchen.

Insgesamt konnte das auf dem DNA-Doppelstrang basierende Sondenkonzept durch Verwendung neuer Liganden und Farbstoffe deutlich erweitert werden. Neben der chemischen Hochauflösung CHIRON wurde zudem das chemische Multiplexing als vielseitige und zu vielen Mikroskopietechniken wie Weitfeld, TIRF, konfokale und STED-Mikroskopie kompatible Methode etabliert. Einzig die verbleibende Restfluoreszenz im gelöschten Zustand sowie die nicht-kovalente Natur der Sonde stellen Limitierungen dar.





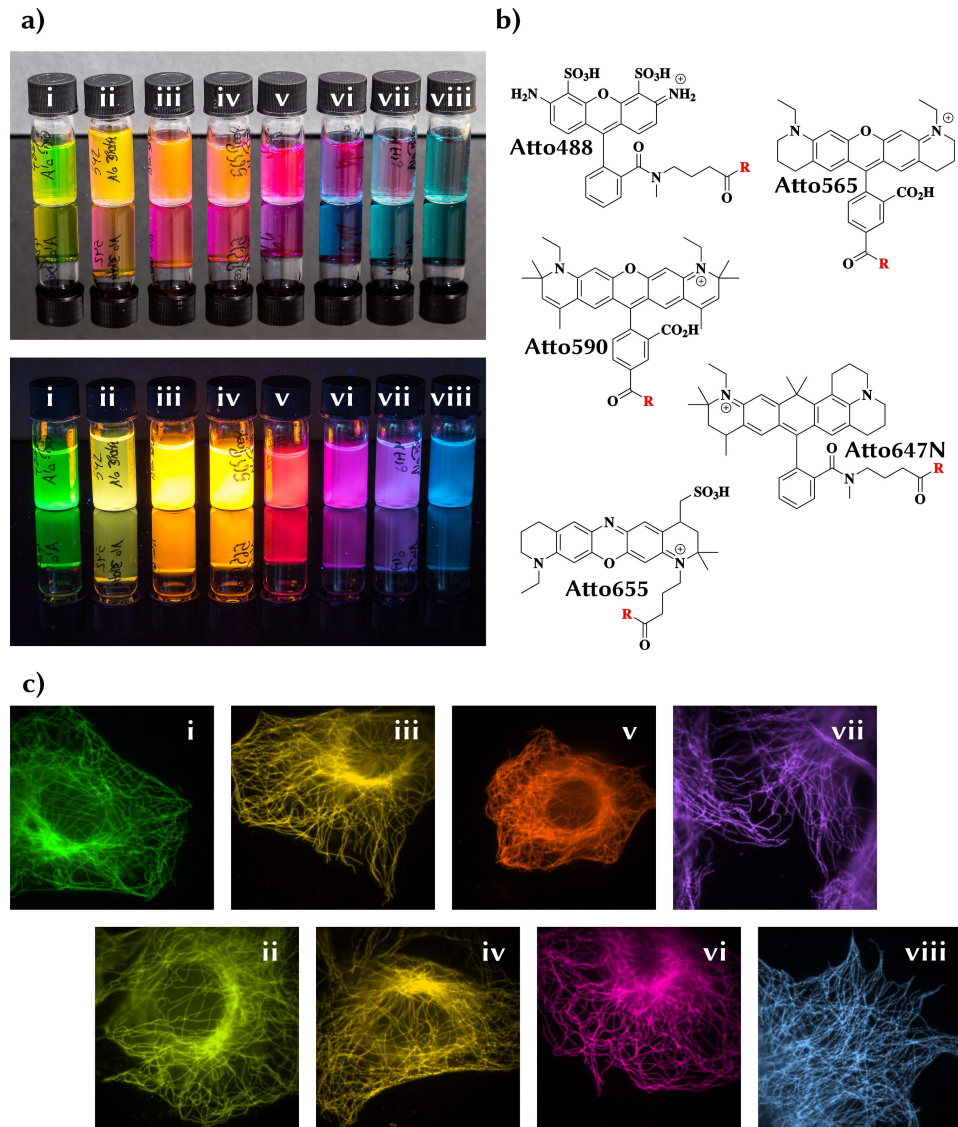
**Schema 4.1.:** Schema der verschiedenen in dieser Arbeit synthetisierten Funktionalisierungen.

## 4.2. Weiterentwicklung der chemischen Schalter

Eine neue Generation der chemischen Schalter wurde basierend auf käuflichen Aminosäuren entwickelt. So konnten zwei neue chemische Schalter synthetisiert und charakterisiert werden. Zudem wurden neben dem etablierten Biotin-Linker weitere Kopplungsfunktionen in das modulare System eingebaut und erprobt. Das Schema 4.1 gibt nochmal einen Überblick über alle dargestellten Funktionalisierungen.

Die bei weitem wichtigsten Funktionalitäten, die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden, sind die Propargyl-Derivate **6** und **7**. Sie konnten in Ausbeuten um die 80 % erhalten werden. Die weitere Umsetzung mit einem Biotin-NHS-Linker lieferte **18** und **19**, welche mit Farbstoff-Aziden von *Atto-Tec* zu den Verbindungen **22-29** umgesetzt wurden. Eine Übersicht über die dargestellten Farbstoff-Ala-DPA-Biotin Konjugaten ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Im Vergleich zu den Lysin-Derivaten lieferten die Verbindungen basierend auf Alanin bessere Ergebnisse was die Restfluoreszenz im gelöschten Zustand angeht. Eine kürzere Anbindung des Farbstoffes an die Aminosäuren, wie es bei Verwendung von Atto565-Propylazid der Fall war, führte nochmals zu einer deutlichen Reduzierung der Restfluoreszenz. So stellte sich Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin **22** als beste Verbindung heraus. Hier lag die bestimmte Komplexbildungskonstante bei  $K = (3.03 \pm 0.61) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und eine Quantenausbeute im gelöschten Zustand von  $R = (0.9 \pm 0.1) \%$ . Damit liegt die Restfluoreszenz von etwa einem



**Abbildung 4.2.:** Farbstoffmarkierte Aminosäuren i-viii: (a) methanolische Lösungen von Farbstoff-Ala-DPA, oben bei Tageslicht, unten unter UV-Bestrahlung (366 nm); (b) bekannte Strukturen der verwendeten ATTO-Farbstoffe; (c) NIH 3T3 Mäusefibroblasten, in denen Mikrotubuli mit i-viii markiert sind. (i) Atto488-Ala-DPA-Biotin **26**, (ii) Atto542-Ala-DPA-Biotin **27**, (iii) Atto565-Ala-DPA-Biotin **25**, (iv) Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin **22**, (v) Atto590-Ala-DPA-Biotin **28**, (vi) Atto633-Ala-DPA-Biotin **23**, (vii) Atto647N-Ala-DPA-Biotin **24**, (viii) Atto655-Ala-DPA-Biotin **29**.

Prozent um einen Faktor von zehn unter den besten Resultaten der Verbindungen aus Kapitel 2. Die Anpassung der Stern-Volmer-Plots in diesem Kapitel wurde mit Gleichung A.15 durchgeführt, die eine exakte Lösung des Zwei-Zustands-Problems darstellt. Die Stern-Volmer-Plots der Aminosäure-basierten chemischen Schalter konnte nicht mit der Näherungslösung (Gleichung 2.1) angepasst werden, da sie ausnahmslos einem S-Kurvenverlauf besaßen und dieser nur von der exakten Lösung modelliert wird.

Eine Untersuchung von **22** auf Einzelmolekülebene ergab zudem einen Wert für die Komplexbildungskonstante von  $K = (1.80 \pm 0.44) 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Dieser ist etwas geringer als im Ensemble bestimmt, was auf Wechselwirkungen mit der Oberfläche oder den zur Immobilisierung verwendeten Proteinen beruhen kann. Die Sonde hat immobilisiert direkten Kontakt zu Streptavidin, dessen Oberfläche einen destabilisierenden Einfluss auf den Komplex haben kann. Einen weiteren Einfluss kann die Statistik haben, es wurden je  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration 114–135 Spuren ausgewertet.

Ein genauerer Blick auf einzelne immobilisierte Moleküle zeigte zudem, dass bei genügend langer Betrachtung drei isoliert Zustände erkennbar sind. Hier handelt es sich um einen hellen,  $\text{Cu}^{2+}$ -freien An-Zustand, einen dunklen Aus-Zustand und zudem einen weiteren Zustand nach Photozerstörung. Aus diesen Helligkeiten konnte ein An/Aus-Verhältnis von etwa 8–15 errechnet werden. Dies weicht deutlich von dem im Ensemble bestimmten Wert ab, ein möglicher Grund hierfür kann ebenfalls in der Interaktion mit der Oberfläche oder den Proteinen zur Immobilisierung liegen.

Zur Markierung von Zielstrukturen (Mikrotubuli) in fixierten Zellen mit **22** kamen Primärantikörper, biotinylierte Sekundärantikörper und Streptavidin zum Einsatz. Jede Komponenten wurde in Titrationsexperimenten auf die für eine optimale Markierung benötigte Konzentration hin untersucht. Unter diesen optimalen Bedingungen wurden dann Experimente zur chemischen Hochauflösung (CHIRON) durchgeführt. Nach Ausrichtung der Videos mithilfe von fluoreszierenden Beads konnten Mikrotubuli mit einer Halbwertsbreite von  $(89 \pm 14) \text{ nm}$  abgebildet werden. Die Analyse von Mikrotubuli-Kreuzungspunkten ergab zudem einen minimal auflösbaren Abstand zweier Mikrotubuli von 114 nm, was jedoch nur an einem Beispiel gezeigt und somit nicht statistisch untermauert werden konnte. Die erreichte Auflösung mit **22** liegt somit im Bereich von 89 bis 114 nm und damit deutlich unterhalb der optischen Auflösungsgrenze von etwa der halben Beobachtungswellenlänge.

Neben dem stochastischen Schalten konnte das komplette Ausschalten durch großen  $\text{Cu}^{2+}$ -Überschuss auch zur aberrationsfreien Abbildung zweier markierter Strukturen in einem Farbkanal genutzt werden. Dies wurde an Aktin und Mikrotubuli demonstriert, die mit Atto565 und Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin **22**

markiert waren. In Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  war die schaltbare Struktur auf etwa 6 % Restfluoreszenz gelöscht, sodass dieses Übersprechen keinen signifikanten Beitrag zum ersten Bild lieferte.

In Multiplexing-STED-Experimenten wurde Atto647N-Ala-DPA-Biotin **24** erfolgreich für die Aufnahme von zwei Strukturen in einer Messung angewendet, es wurde eine Auflösung von  $(92 \pm 17)$  nm für Aktinfilamente und  $(83 \pm 11)$  nm für Mikrotubuli. Außerdem wurde an Kreuzungspunkten mehrerer Filamente ein minimal auflösbarer Abstand von gut 130 nm, was einer Auflösungsverbesserung um den Faktor 2.3 entspricht (bezogen auf rotes Licht der Wellenlänge 664 nm nach Gleichung 1.17).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die auf Alanin und Lysin basierenden chemischen Schalter sowohl im Ensemble als auch in der Mikroskopie gute Ergebnisse erzielt haben. Im Vergleich zu DNA-basierten Schaltern sind sowohl die verringerte Restfluoreszenz im gelöschten Zustand als auch die definiertere Zusammensetzung der Schalter an sich ein deutlicher Entwicklungsschritt. Da die Schalter rein kovalente Bindungen enthalten, verschwinden die Probleme der unvollständigen Hybridisierung und damit der Verlust der Funktionalität bei Dissoziation. Zudem sind neben der Streptavidin-Biotin-Technik nun auch weitere, bio-orthogonale Markierungstechniken möglich.

#### 4.2.1. Einführung von enzymatischen Kopplungsfunktionen und Tetrazinen

Durch Einführung der Liganden von SNAP-Tag und Halo-Tag konnten die chemischen Schalter nun auch ohne Antikörpermarkierung in genetisch veränderten Zelllinien eingesetzt werden. Erste Ergebnisse mit den Halo-Tag-Derivaten **12** und **13** zeigen eine gute Funktionalität im Ensemble wie auch nach Markierung in fixierten Zellen. Atto565-Halo-Ala-DPA **31** lieferte in Titrationsexperimenten eine Komplexbildungskonstante  $K = (3.28 \pm 0.83) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und eine Quantenausbeute im gelöschten Zustand von  $\phi_{aus} = (1.5 \pm 0.5) 10^{-3}$ . Damit sind die Ergebnisse vergleichbar mit denen des Propargyl-Biotin-Derivats Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin **22**, wo die Art der Verknüpfung und der Abstand zwischen Farbstoff und Ligand ähnlich ist.

An fixierten Zellen, die ein Halo-Vinculin exprimieren, wurde die Markierung mit **31** optimiert und lieferte zu Atto565-Halo vergleichbare Ergebnisse. In Multiplexing-Experimenten wurden zudem neben Vinculin und Aktin auch Tubulin und Aktin in einer anderen Zelllinie, die Halo-Tubulin exprimiert, abgebildet. Die Bildkorrelation lieferte hier zu den Experimenten aus Kapitel 2 konsistente Werte.

Die Inkorporation des Benzylguanin-Motivs erzielte hingegen nicht den gewünschten Erfolg. Während Atto565-BG-Lys-DPA **35** in Lösung noch auf die Zu-

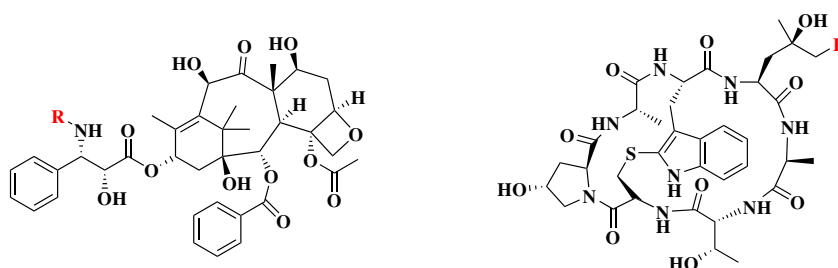
gabe von  $\text{Cu}^{2+}$  reagiert, wenn auch bei weitem nicht so stark wie die vorhergehend beschriebenen Verbindungen, zeigt sich nach Zugabe von aufgereinigtem SNAP-Protein keine signifikante Fluoreszenzlöschung mehr. Der genaue Grund bleibt unklar, vermutlich bestehen Interaktionen mit Aminosäureresten auf der SNAP-Oberfläche. Durch Veränderung des BG-Substrats, beispielsweise durch die Einführung eines längeren Linkers, könnte dieses Problem behoben werden.

Eine positive Eigenschaft von **35** ist hingegen die schwach ausgeprägte Fluorogenität. Nach Zugabe von SNAP steigt die Fluoreszenzintensität der Verbindung um einen Faktor von etwa 1.8 an. Dies ließe sich durch Veränderung des Farbstoffes vielleicht noch optimieren. Eine Verlängerung des Linkers, wie oben vorgeschlagen, wäre jedoch wieder hinderlich für die Fluorogenität, da hier ein möglichst geringer Abstand zwischen dem fluoreszenzlöschenden Guanin und dem Farbstoff herrschen sollte. Somit sind die Benzylguanin-Derivate in ihrer hier dargestellten Form nicht konkurrenzfähig gegenüber z. B. den Halo-Derivaten.

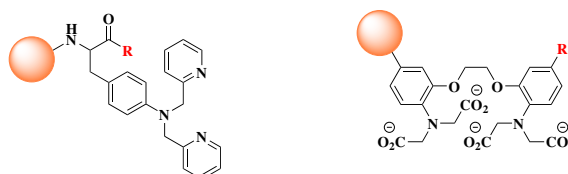
Neben den enzymatischen Markierungsmethoden konnte auch eine bio-orthogonale Click-Reaktion zur Markierung eingeführt werden. Hierzu wurden Tetrazin und Methyl-Tetrazin-Derivate der Aminosäuren synthetisiert und charakterisiert. Alle Verbindungen zeigen die für Tetrazine typische Absorptionsbande bei 530 nm, die nach Zugabe von *trans*-Cyclooct-4-enol innerhalb einer Minute verschwand. Das Farbstoff-markierte Derivat Atto565-HTet-Ala-DPA **37** lieferte in Titrationsexperimenten für die Komplexbildungskonstante einen Wert von  $K = (6.52 \pm 1.04) 10^7 \text{ M}^{-1}$  und eine relative Quantenausbeute im gelöschten Zustand von  $\phi_{aus} = (1.6 \pm 0.6) 10^{-3}$ . Damit sind auch diese Ergebnisse konsistent mit den Ergebnissen der anderen Atto565-Derivate. Es zeigte sich zudem auch eine Funktionalität nach Zugabe von *trans*-Cyclooct-4-enol. Nicht zu beobachten war hingegen eine Fluorogenität der Verbindung, was aufgrund der guten sonstigen Ergebnisse jedoch vernachlässigt werden kann. Ob bei geänderter Verknüpfung durch Austausch des Linkers zwischen Aminosäure und Tetrazin eine Fluorogenität erreichbar ist, bleibt fraglich.

Unter Verwendung von Antikörpern, die mit den Substraten *trans*-Cyclooct-4-enol und ENDO-Bicyclo[6.1.0]nonin markiert wurden, konnte mit den Tetrazin-Aminosäuren in fixierten Zellen zwei Strukturen angefärbt werden. Dabei wurden Mikrotubuli mit anti- $\alpha$ -Tubulin-*a*-TCO\* und **37**, Endozytose-Vesikel mit anti-Clathrin-ENDO-BCN und Atto647N-Azid markiert. Die Markierung verlief innerhalb von 10 Minuten und beide Strukturen wurden spezifisch markiert. Es verblieb jedoch ein erhöhter Hintergrund in den Zellen. Ob dies durch unspezifische Adsorption der Tetrazine und Azide zustande kam oder an den selbst markierten Antikörpern liegt, die eventuell eine geringere Selektivität aufweisen, kann nicht abschließend geklärt werden.

Von diesem Punkt aus könnten noch weitere Funktionalisierungen zur effek-



**Schema 4.2.:** Weitere mögliche Funktionalisierungen, die in die chemischen Schalter eingebaut werden könnten: Docetaxel (links), welches an Mikrotubuli bindet, und Phalloidin (rechts) das filamentöse Aktin bindet.



**Schema 4.3.:** Alternative chemische Schalter, die nach dem „Turn-On“ Mechanismus funktionieren: chemischer Schalter mit Dipicolylamin-Ligand, basierend auf einem Amino-Phenylalanin (links) und BAPTA-basierte Fluoreszenzsonde (rechts).

tiven Markierung in biologischen Proben erdacht werden. Das in dieser Arbeit schon verwendete zyklischen Peptid Phalloidin zur Markierung von Aktinfilamenten ist auch als direkte Funktionalisierung der chemischen Schalter denkbar, ebenso wie Docetaxel als Mikrotubuli-bindendes zyklisches Peptid. Beide Verbindungen sind als Bausteine käuflich erwerblich zum Einbau in das modulare Sondenkonzept.<sup>[175, 176]</sup> Dadurch ließe sich die Markierung deutlich dichter gestalten und die Sonden wären zudem deutlich näher am eigentlichen Zielprotein, was eine bessere Auflösung sowohl in Lokalisations- als auch in STED-Aufnahmen erreichen würde.

### 4.3. Alternative chemische Schalter

Die in dieser Arbeit vorgestellten chemischen Schalter arbeiten alle nach dem „Turn-Off“ Prinzip, das heißt dass die Fluoreszenzsonde im freien Zustand stark fluoresziert und erst die Interaktion mit dem Metallkation zur Fluoreszenzlöschung führt. Ein alternatives Konzept, welches auch schon in Kapitel 1.5 vorge-

stellt wurde, sind Verbindungen, die im freien Zustand fluoreszenzgelöscht sind und erst durch den Schaltprozess aktiviert werden. Solche „Turn-On“ Sonden haben den Vorteil, dass bei Ihrer Verwendung die Markierungsdichte kein limitierender Faktor für die hoch aufgelöste Mikroskopie darstellt. Zwei dieser Konzepte sind in Schema 4.3 dargestellt. Beide tragen ein oder mehrere Anilin-Gruppen, die als potente Fluoreszenzlöcher fungieren können.<sup>[5, 146]</sup> Der Mechanismus der zugrunde liegt ist ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET), der durch Koordination eines Metallions unterbrochen wird (siehe auch Kapitel 1.5). Beide Verbindungen wurden im Rahmen dieser Arbeit als potentielle neue chemische Schalter dargestellt und untersucht (siehe dazu Abbildung F.1 im Anhang), und stellen eine gute Ausgangsposition für die weitere Entwicklung solcher „Turn-On“ Schalter dar.

In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung, die im Arbeitskreis HERTEN in Zusammenarbeit mit Dr. RICHARD WOMBACHER und FELIX BRAUN durchgeführt wurde, wurde jedoch ein ähnliches, auf dem BAPTA-Liganden basierendes Konzept verwendet, dies stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Entwicklung neuer chemischer Schalter dar.<sup>[177]</sup> Der Einsatz von „Turn-On“ Schaltern für die chemische Lokalisationsmikroskopie CHIRON bildet den nächsten Schritt zur festen Etablierung der Methode.





## **Teil IV.**

# **Materialien, Methoden und Synthsevorschriften**



# Kapitel 5.

## Materialien und Methoden

### 5.1. Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, wie vom Hersteller bezogen verwendet. Die zur Synthese verwendeten Chemikalien wurden in einer Reinheit von mindestens 98 % erworben. Für die spektroskopische Charakterisierung sowie für die Mikroskopie wurden die Chemikalien in einer Reinheit von  $\geq 99\%$ , die verwendeten Lösungsmittel mindestens mit „HPLC grade“ eingesetzt. Das eingesetzte Wasser entstammt einer Reinstwasseranlage „TKA GenPure“ der Firma *Thermo Scientific*.

Alle eingesetzten Aktivester- und Azid-Farbstoffe wurden von der Firma *Atto-Tec* bezogen, in trockenem DMF zu einer Konzentration von  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  gelöst und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Tabelle 5.1.: Chemikalienliste

Chemikalie (Bestellnummer)	Hersteller
1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (54802)	Sigma-Aldrich
1-Methylpyrrolidin (69110)	Sigma-Aldrich
2-(Bromomethyl)pyridin-HCl (491047)	Sigma-Aldrich
2-(2-Aminoethoxy)ethanol (A54059)	Sigma-Aldrich
6-Chloroguanin (C4003)	Sigma-Aldrich
Acetonitril, für die HPLC (34998)	Sigma-Aldrich
Acetonitril (68271), Rotisolv HPLC	Carl Roth
Biotin (B4501)	Sigma-Aldrich

<b>Chemikalie (Bestellnummer)</b>	<b>Hersteller</b>
Biotin-Amidohexansäure-NHS (B2643)	Sigma-Aldrich
BSA, Einzelmolekülexperimente (A5611)	Sigma-Aldrich
BSA, Immunofluoreszenz (05471)	Fluka
BSA-Biotin (A8549)	Sigma-Aldrich
BOC-Lysine-OH (15456)	Sigma-Aldrich
Chloroform-d (426771000)	Acros Organics
CuSO <sub>4</sub> Lösung 0.1 M (35185)	Sigma-Aldrich
(S)(E)-Cyclooct-4-enol (764396)	Sigma-Aldrich
(S)(E)-Cyclooct-4-enol-pNPC Aktivester (SC-8019)	SICHEM
Deuteriumoxid (191701)	Sigma-Aldrich
Dichlormethan (25631)	VWR Chemicals
Diisopropylethylamin (115221000)	Acros Organics
Dimethylformamid, extra trocken (648435000)	Acros Organics
Dimethylsulfoxid-d <sub>6</sub> (AE56.2)	Carl Roth
ENDO-BCN-pNPC Aktivester (SC-8009)	SICHEM
Essigsäure (A6283)	Sigma-Aldrich
Ethylacetat (27227)	Sigma-Aldrich
Ethyl-trifluoroacetat (E50000)	Sigma-Aldrich
Flusssäure, 48 % (30107)	Sigma-Aldrich
HBTU (29943)	Acros Organics
HCl (320331)	Sigma-Aldrich
HCl, 1 M in Diethylether (294837)	Sigma-Aldrich
Kalium- <i>tert</i> -butanolat (156671)	Sigma-Aldrich
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (P5833)	Sigma-Aldrich
Kieselgel 60 Å, 40–63 µm (60737)	Sigma-Aldrich
LiAlH <sub>4</sub> , 1 M in THF (212776)	Sigma-Aldrich
Methanol (32213)	Sigma-Aldrich
Methanol-d <sub>4</sub> (AE57.5)	Carl Roth
Methyl-Tetrazine-Amin, HCO <sub>2</sub> H-Salz (SC-1191)	SICHEM
MgSO <sub>4</sub> (M2643)	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (223484)	Sigma-Aldrich

Chemikalie (Bestellnummer)	Hersteller
NaCl (S7653)	Sigma-Aldrich
NaH (223441)	Sigma-Aldrich
NaOH (221465)	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (239313)	Sigma-Aldrich
(N-BOC-β-amino)-Alanin-OH (662836)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (158127)	Sigma-Aldrich
PBS ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> , steril (D8537)	Sigma-Aldrich
Petrolether (24587)	Sigma-Aldrich
Propargylamin (P50900)	Sigma-Aldrich
Streptavidin (So677), rekombinant	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran (401757)	Sigma-Aldrich
Tetrazine-Amin, HCO <sub>2</sub> H-Salz (SC-1190)	SICHEM
Triethylamin (To886)	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (Po88.1)	Carl Roth
Triton X-100 (93426)	Fluka

### 5.1.1. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Biomers* bezogen, in Reinstwasser zu einer Konzentration von 100 μM gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Markierung mit den Liganden wurde das Oligonukleotid auf CPG-Festphase gekoppelt bestellt. Außerdem wurde ein mit TMR markiertes Oligonukleotid von der Firma *Sigma-Aldrich* bestellt, sowie von *Eurogentec* ein mit Dipicolylamin markiertes Oligonukleotid.<sup>[178]</sup>

Im Folgenden sind die verwendeten Sequenzen dargestellt:



Die Farbstoffmarkierung erfolgte in trockenem DMF unter Zugabe von DIPEA als Base. Das Amin-modifizierte Oligonukleotid wurde vorgelegt und mit einem etwa fünffachen Überschuss an Farbstoff-NHS-Ester bei Raumtemperatur für drei Stunden reagiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC, die Identifizierung der Produktfraktionen mit Hilfe der eingebauten Spektrometer. Zur Qualitätskontrol-

le wurde aus den Absorptionsspektren der Markierungsgrad DOL nach Gleichung 5.1 berechnet.

$$DOL = \frac{A_{FS} \cdot \epsilon_{DNA}}{(A_{260} - A_{FS} \cdot c_{260}) \cdot \epsilon_{FS}} \quad (5.1)$$

Hier ist  $A_{FS}$  die Absorption am Farbstoffmaximum und  $A_{260}$  die Absorption bei 260 nm,  $\epsilon_{DNA}$  und  $\epsilon_{FS}$  die Extinktionskoeffizienten von DNA und Farbstoff und  $c_{260}$  der Korrekturfaktor bei 260 nm für den entsprechenden Farbstoff. Für die Farbstoff-Oligonukleotide erwartet man einen DOL von etwa eins.

Die fertigen DNA-Sonden wurden schließlich aus einer äquimolaren Mischung von Farbstoff- und Liganden-Oligo bei einer Endkonzentration von etwa  $50 \mu\text{M}$  hybridisiert. Dazu kam ein „PTC-100 Thermal Cycler“ der Firma *Bio-Rad Laboratories* zum Einsatz. Die Lösungen wurden hier für fünf Minuten auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und dann mit  $0.5^\circ\text{C min}^{-1}$  auf  $4^\circ\text{C}$  abgekühlt, um vollständige Hybridisierung zu gewährleisten. Die so hybridisierten Proben wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 5.2. Aufreinigung und Analytik

### 5.2.1. Aufreinigung mittels HPLC

Zur Aufreinigung kleiner Mengen, wie nach Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an chemische Schalter, kam eine „HP Series 1100“ HPLC-Anlage der Firma *Varian/Agilent* zum Einsatz, welche mit einem Absorptions- und einem Fluoreszenzdetektor ausgestattet ist und somit die einfache Identifizierung der Produktfraktionen ermöglicht.

Als stationäre Phase wurde eine C<sub>18</sub> Umkehrphasensäule „Hypersil ODS“ von *Säulentchnik Knauer* mit einer Korngröße von  $5 \mu\text{m}$  verwendet. Als mobile Phasen kam Laufmittel A (Reinstwasser mit 10 mM Triethylammoniumacetat) und Laufmittel B (75 % Acetonitril, 25 % Reinstwasser mit 10 mM Triethylammoniumacetat) zum Einsatz. Die Durchflussrate betrug  $3 \text{ mL min}^{-1}$ , der Lösungsmittelgradient wurde über 30 Minuten von 100 % A nach 100 % B verändert.

Die Aufreinigung der markierten Oligonukleotide erfolgte mittels einer speziell für Oligonukleotide geeigneten „Clarity 3 $\mu$  Oligo-RP“ Säule, ebenfalls mit einem 30-minütigen Gradienten von Laufmittel A nach Laufmittel B.

Die aufgesammelten Fraktionen wurden in einer „SpeedVac“ Vakuumzentrifuge von *Eppendorf* eingedampft und in Reinstwasser oder DMSO angelöst.

### 5.2.2. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden in der NMR-Abteilung des Anorganisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg gemessen. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden an den Geräten „Avance II 400“ (400 MHz) und „Avance III 600“ (600 MHz) der Firma *Bruker* bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Angaben der chemischen Verschiebung  $\delta$  sind in parts per million (ppm), die entsprechenden Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Spektren wurden auf das entsprechende Lösungsmittelsignal kalibriert ( $^1\text{H}$ : 2.50 ppm für  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 3.31 ppm für  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 4.79 ppm für  $\text{D}_2\text{O}$ , 7.26 ppm für  $\text{CDCl}_3$ ;  $^{13}\text{C}$ : 39.5 ppm für  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ , 49.0 ppm für  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 77.2 ppm für  $\text{CDCl}_3$ ).<sup>[179]</sup> Bedeutung der Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, qi = Quintett, sx = Sextett, m = Multipllett, bs = breites Singulett. Zur Auswertung der NMR-Spektren kam die Software „Topspin“ (Version 3.5 pl 2) der Firma *Bruker* zum Einsatz.

### 5.2.3. Massenspektrometrie

Massenspektren und hoch aufgelöste Massenspektren wurden von der Analytikabteilung für Massenspektrometrie am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg erstellt. Messungen wurden an den Geräten „ApexQe hybrid 9.4 T FT-ICR“ der Firma *Bruker* durchgeführt. Als Matrix wurde bei MALDI-MS-Messungen die Substanz DCTB verwendet.

## 5.3. Probenvorbereitung

### 5.3.1. Einzelmolekül-Charakterisierung

Die Einzelmolekülcharakterisierung erfolgte in LabTek™ 8-Kammer-Deckgläsern der Firma *Nunc/ThermoScientific*. Diese wurden zuerst zweimal mit 0.1 M Flusssäure für je 30 Sekunden gereinigt und danach fünfmal mit gründlich mit PBS gewaschen. Danach wurde eine Mischung aus BSA und BSA-Biotin ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , das Mischungsverhältnis beträgt 8:1 und ist experimentell in der Gruppe optimiert worden) für 30 Minuten inkubiert und danach gründlich viermal mit PBS gewaschen (ab diesem Zeitpunkt darf die Oberfläche nicht mehr austrocknen, da sonst die spezifische Bindung beeinträchtigt werden kann). Nun wurde eine Lösung von Streptavidin in PBS ( $100 \mu\text{g/mL}$ ) für 20 Minuten inkubiert und dann ebenfalls viermal mit PBS gewaschen. Die so präparierten Oberflächen wurden am TIRF-Mikroskop auf Reinheit überprüft und dann mit den entsprechenden biotinylierten Sonden inkubiert. Hier wurden Lösungen von etwa  $10^{-10} \text{ M}$  für einige Minuten inkubiert und dabei die Bedeckung der Oberfläche am Mikroskop überprüft. Bei ausreichender Moleküldichte wurden die Oberflächen viermal mit

PBS gewaschen und wieder mit PBS bedeckt. So präparierte Proben sind bei 4 °C für mehrere Tage lagerbar.

Zur Charakterisierung der Komplexbildungskinetik am Mikroskop wurden die präparierten Oberflächen mit entsprechendem Puffer bedeckt und für mehrere Minuten die Gleichgewichtseinstellung abgewartet. Dann wurden Videos mit 500–5000 Bildern bei einer Belichtungszeit von 10–50 ms, einem EM-Gain von 200–500 und einer Laserleistung von 1–2 mW aufgenommen. Um eine gleichmäßige Ausleuchtung des Gesichtsfeldes zu gewährleisten, wurde jeweils nur der mittlere Bereich der emCCD-Kamera ausgelesen, meistens ein Bereich von 256 · 256 Pixeln.

### 5.3.2. Markierung von Antikörpern

Beim chemischen Multiplexing und für die Experimente mit den Tetrazinen kamen zum Teil selbst markierte Antikörper zum Einsatz. Dazu wurden geeignete Antikörper vom Hersteller unstabilisiert, also ohne Zusatz von BSA, anderen Proteinen oder Glycerin, bestellt. Diese wurden nach Herstellerangaben gelöst und gelagert.

Zur Markierung wurde der jeweilige Farbstoff oder Click-Reaktionspartner als Aktiv-NHS-Ester in trockenem DMF zu einer Konzentration von 2 mg mL<sup>-1</sup> gelöst und bei –20 °C gelagert. Zur Kopplung wurden 100 µL der Antikörper-Stocklösung mit 10 µL 1 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung versetzt. Dann wurden 5–10 Äquivalente des Aktivesters in DMF zugegeben und das Ganze bei Raumtemperatur für eine Stunde geschüttelt.

Die Aufreinigung erfolgte mit „illustra™ NAP-5 Columns Sephadex G-25 DNA Grade“ der Firma *GE Healthcare*. Diese wurden zuvor mit mindestens 10 mL PBS äquilibriert. Dann wurde die Reaktionsmischung vorsichtig in die Säule pipettiert. Nach Einziehen in das Polymerbett wurde mit PBS eluiert, wobei Fraktionen von je 5 Tropfen aufgefangen wurden.

Die Produktfraktionen wurden dann am Absorptionsspektrometer vermessen und Produktfraktionen durch die Absorption bei 280 nm sowie die Absorption am Farbstoff-Maximum identifiziert. Eine Konzentrationsbestimmung wurde entweder anhand der Farbstoff-Absorptionsbande mit dem vom Hersteller gegebenen Extinktionskoeffizienten oder anhand der Proteinbande mit einem in der Literatur benutzten Extinktionskoeffizienten von 210 000 M<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup> für IgG-Antikörper durchgeführt.<sup>[180]</sup>



**Tabelle 5.2.:** Zellkulturmaterialien

Artikel (Bestellnummer)	Hersteller
DMEM ohne Phenolrot (31053-028)	ThermoFisher
DMEM mit Phenolrot (41965-039)	ThermoFisher
FBS (S0115)	Biochrom AG
Formaldehyd 38 % (F8775)	Sigma-Aldrich
GlutaMAX (35050-061)	ThermoFisher
Natriumpyruvat (11360-039)	ThermoFisher
TrypLE (12604-021)	ThermoFisher

### 5.3.3. Zellkultur

Für die Experimente in fixierten Zellen kamen verschiedene Zelllinien zum Einsatz, die bereits alle in der Arbeitsgruppe verfügbar waren. Die Experimente in Kapitel 2 wurden mit HeLa-Zellen - menschlichen Epithelzellen aus einem Zervixkarzinom, die von 1951 HENRIETTA LACKS entnommen wurden - durchgeführt. Für die Experimente in Kapitel 3 kamen sowohl HeLa-Zellen als auch NIH 3T3 - embryonale Mausfibroblasten - zum Einsatz. Die Zellen waren bereits im Arbeitskreis vorhanden.

Für die Experimente mit den Halo-Substraten wurden zwei unterschiedliche Zelllinien verwendet. Zum einen wurden stabil transfizierte MEF-Zellen (mouse embryonic fibroblasts) benutzt, die von MARTINE HAAN in der Gruppe von RICHARD WOMBACHER erstellt wurden und Halo-GFP-Vinculin exprimieren. Hier können folglich fokale Adhäsionskontakte mit dem Halo-Substrat angefärbt werden. Zum anderen wurden von KLAUS YSERENTANT transient transfizierte HeLa-Zellen verwendet, die ein Halo-Tubulin exprimieren, wodurch Mikrotubuli mit dem Halo-Substrat gefärbt werden können.

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 Vol.% CO<sub>2</sub> in der Atmosphäre kultiviert. Als Medium kam Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) zum Einsatz, dem noch 10 % fötales Kälberserum (FBS) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden ungefähr alle drei Tage vereinzelt. Dazu wurde das Medium entfernt, einmal für fünf Minuten mit 3 mL PBS gewaschen und die Zellen schließlich mit 1 mL TrypLE Express™ für fünf Minuten inkubiert, wobei sich die Zellen von der Oberfläche ablösten. Nach Zugabe von 2 mL DMEM zur Neutralisation des TrypLE™ wurde die Zellsuspension gut durchmischt und die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden 2-5 Tropfen der Zellsuspension mit 3 mL DMEM gemischt und in einer Zellkulturschale bei 37 °C kultiviert.

Für die Experimente wurden die Zellen in LabTek™ Kammerdeckgläsern der Firma *Nunc*, die zuvor zweimal mit 0.1 M Flusssäure für eine Minute gereinigt und fünfmal mit PBS gewaschen wurden, zu etwa je 15 000 Zellen pro Kammer in DMEM gesetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach dem nachfolgenden Protokoll fixiert.

#### 5.3.4. Immunfluoreszenz

##### Markierung mit den chemischen Schalter der 1. Generation

Für die Experimente mit den chemischen Schaltern der ersten Generation in Kapitel 2 wurden die HeLa-Zellen vom Medium befreit, einmal mit je 200 µL PBS gewaschen und mit je 200 µL vorgewärmtem 3.7 % PFA in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Zum Permeabilisieren der Zellwände wurde eine Lösung aus 0.5 Vol.% Triton-X100 und 5 % FBS in PBS zugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen zum Blockieren mit 2 % BSA in PBS für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für die verschiedenen Experimente gefärbt.

##### Lokalisations-CHIRON-Experimente

Nach dem Waschen mit PBS wurde eine Lösung des Primärantikörpers anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin (10 µg/mL) in PBS mit 2 % BSA für 60 Minuten inkubiert, danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und Streptavidin (10 µg/mL in PBS mit 2 % BSA) zugegeben. Nach 30 Minuten wurde erneut dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und eine Lösung des entsprechenden chemischen Schalters in PBS mit 2 % BSA (etwa 500 nM) für 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde noch dreimal mit PBS gewaschen.

Die Lokalisationsexperimente wurden in 10 mM MOPS-Puffer durchgeführt, in dem eine  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentration von etwa 15 µM eingestellt wurde. Von den so präparierten Zellen wurden dann mit dem TIRF-Mikroskop Aufnahmen angefertigt, aus denen mit der Software „rapidSTORM“<sup>1</sup> von STEVE WOLTER (Universität Bielefeld) die hochaufgelösten Bilder generiert wurden.

##### Chemisches Multiplexing

Beim chemischen Multiplexing wurden mehrere Strukturen gleichzeitig markiert. Dies erfolgte nach folgendem Protokoll: Es wurde eine Lösung von biotinyliertem Antikörper oder biotinyliertem Phalloidin (10 µg/mL in PBS mit 2 % BSA) für

<sup>1</sup> „rapidSTORM“<sup>[181]</sup> Version 1.4.10, erhältlich als open source Software unter <http://www.super-resolution.biozentrum.uni-wuerzburg.de/home/rapidstorm/>.

60 Minuten inkubiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und 10 µg/mL Streptavidin in PBS mit 2 % BSA zugegeben. Nach 30 Minuten wurde dreimal mit PBS gewaschen und die chemischen Schalter (500 nm in PBS mit 2 % BSA) für 30 Minuten inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der farbstoffmarkierte Primär- oder Sekundärantikörper (10 µg/mL in PBS mit 2 % BSA) für 1 Stunde inkubiert, mehrmals mit PBS gewaschen und die Zellen in Messpuffer (50 µM CuSO<sub>4</sub>-Lösung in 10 mM MOPS-Puffer) am konfokalen Mikroskop „SP5X“ mikroskopiert. Zur Fluoreszenzanregung kam eine Laserlinie bei 550 nm (200 µW) zum Einsatz. Zum Photobleichen wurden fünf Laserlinien parallel bei maximaler Intensität verwendet, um die Zeit zur Photozerstörung zu minimieren (518 nm, 526 nm, 534 nm, 542 nm und 550 nm). Nach etwa 2–3 min wurde unter den normalen Bedingungen (550 nm, 200 µW) ein Bild der Restfluoreszenz gemacht, dann 50 µM EDTA zugegeben und erneut ein Bild der wiederhergestellten Struktur aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden mit einer PMT bei einer Verstärkerspannung von 800 V im Bereich von 560–620 nm gemacht. Die Bilder wurden mit Hilfe von ImageJ (Ver. 4.50g, NIH) verarbeitet.

Für die Zweifarben-Multiplexingexperimente (siehe dazu Abbildung 2.17) wurde nach oben beschriebenem Protokoll **Aktin** mit Phalloidin-Biotin markiert. Nach Inkubation des chemischen Schalters und Waschen mit PBS wurde ein Waschschritt mit 1 mM (3aS,4S,6aR)-Biotin zur vollständigen Sättigung aller Bindungsstellen für Biotin eingeführt, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS. Danach wurden **Mikrotubuli** mit anti-α-Tubulin-Biotin und einem zweiten chemischen Schalter nach obigem Protokoll gefärbt. Anschließend wurden beide farbstoffmarkierten Primärantikörper (anti-Vinculin-TMR und anti-Lamin-Atto647N) in PBS (je 10 µg/mL) für 1 Stunde inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, mit Messpuffer bedeckt und am konfokalen „SP5X“ mikroskopiert. Zur Anregung kam hier neben dem oben erwähnten Laser noch eine Laserlinie bei 644 nm zur Fluoreszenzanregung und Laserlinien bei 620 nm, 628 nm, 636 nm, 644 nm und 652 nm zur Photozerstörung zur Anwendung. Auch hier wurden die Aufnahmen alle mit PMTs bei einer Verstärkerspannung von 800 V aufgenommen, die Detektionsbereiche lagen bei 560–620 nm für TMR und 660–720 nm für Atto647N. Die Bilder wurden dann im ImageJ (Ver. 4.50g, NIH) weiterverarbeitet.

### Markierung mit den chemischen Schaltern der 2. Generation

Die Probenvorbereitung für die Experimente in Kapitel 3 wurde in Anlehnung an ein in der Arbeitsgruppe erarbeitetes Markierungsprotokoll von KLAUS YSERRENTANT durchgeführt.<sup>[182]</sup> Hierbei werden die adhären Zellen zuerst mit je 200 µL vorgewärmtem MTSB-Puffer (microtubuli stabilizing buffer) zweimal vorsichtig gewaschen und anschließend mit je 200 µL vorgewärmter Fixierlösung

bei Raumtemperatur für 20 Minuten fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Dann werden die Zellen dreimal gründlich für 5 Minuten mit PBS gewaschen und schließlich mit Blockierlösung für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht blockiert. Nun können die entsprechenden Antikörper, verdünnt in Inkubationspuffer (die entsprechende Verdünnung wurde experimentell bestimmt und ist in Tabelle 5.4 aufgeführt), für jeweils 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach jedem Antikörper-Inkubationsschritt wird dreimal gründlich für 5 Minuten mit Inkubationspuffer gewaschen. Nach der Inkubation von biotinylierten Antikörpern wurde dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen und dann Streptavidin verdünnt in Inkubationspuffer (10 µg/mL) für 20 Minuten inkubiert. Nach dem letzten Inkubationsschritt wird die Probe mit Nachfixierlösung für 15 Minuten nochmals fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Dieser Schritt stellt sich als sehr wichtig heraus, da unter den Messbedingungen die Antikörper sonst dissoziieren können und damit ein Lokalisationsergebnis verfälscht werden kann. So präparierte Proben können bei 4 °C für mehrere Tage gelagert werden.

## Lokalisationsexperimente

Für die Lokalisationsexperimente kamen NIH-3T3-Zellen zum Einsatz, die nach dem obigen Protokoll mit anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-IgG-Biotin, Streptavidin, **22** und Atto565-Phalloidin markiert wurden. Diese wurden nach der Markierung mit einer verdünnten Suspension fluoreszierender Latex-Beads (FluoroSpheres<sup>®</sup> Carboxyl-modifiziert, 100 nm Durchmesser,  $\lambda_{ex/em}$  505/515) inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und mit 5 µM CuSO<sub>4</sub> in PBS bedeckt. Für die Messung am kommerziellen TIRF-Mikroskop wurde eine Zelle ausgewählt, in deren Peripherie ein fluoreszierender Bead zum liegen kam. Die Messung wurde bei 1 mW Laserleistung bei 561 nm durchgeführt, zusätzlich wurde bei 488 nm mit einer Leistung von etwa 80 µW angeregt, was die Beads in etwa der selben Helligkeit wie einzelne Atto565-Farbstoffe abbildete. Zur Detektion wurde auf einen Bandpassfilter verzichtet, um sowohl die Fluoreszenz der Beads als auch die der chemischen Schalter abbilden zu können.

Es wurde unter diesen Bedingungen ein Video von 15000 Bildern bei einer Belichtungszeit von 20 ms aufgenommen. Dieses wurde nach der Aufnahme mit dem frei erhältlichen ImageJ-Plugin „Template Matching and Slice Alignment“ ausgerichtet und dann mit den frei verfügbaren ImageJ-Plugins „ThunderSTORM“ und „QuickPALM“ sowie mit der frei erhältlichen Software „rapidSTORM“ ausgewertet (siehe auch Kapitel 5.6).

**Tabelle 5.3.:** Reagenzien für die Immunfluoreszenz

Reagenz	Zusammensetzung
MTSB-Puffer	100 mM PIPES, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM EGTA, gelöst in H <sub>2</sub> O, pH6.8.
Fixierlösung	3.7 % PFA gelöst in MTSB-Puffer (bei 90 °C unter rühren lösen), 0.2 % Triton X-100.
Blockierlösung	3 % BSA in PBS.
Inkubationspuffer	0.05 % Triton X-100, 1 % BSA in PBS.
Nachfixierlösung	2 % PFA gelöst in PBS.

### Chemisches Multiplexing

Für die Experimente zum chemischen Multiplexing wurden die Zellen unter den in Kapitel 3.2.2 experimentell erarbeiteten, optimalen Markierungsbedingungen präpariert, um eine möglichst dichte Markierung zu erreichen. Es wurden Mikrotubuli mit den chemischen Schaltern via anti- $\alpha$ -Tubulin, anti-Maus-IgG-Biotin und Streptavidin markiert. Als zweite Struktur wurde Aktin mit Atto565-Phalloidin markiert. Die Experimente wurden bei einer Cu<sup>2+</sup>-Konzentration von 50  $\mu$ M in PBS am konfokalen Mikroskop „SP5X“ von *Leica* durchgeführt. Auch hier kam eine Laserlinie bei 550 nm und 200  $\mu$ W zur Aufnahme der Fluoreszenz zum Einsatz, die Detektion erfolgte auf einer PMT bei einer Verstärkerspannung von 800 V im Bereich von 560–620 nm. Die Bilder der kommerziellen Software wurden in ImageJ (Ver. 4.50g, NIH) importiert und weiter verarbeitet.

#### 5.3.5. Markierung des Halo-Tag

Die Markierung mit den Halo-Derivaten der chemischen Schalter erfolgte an fixierten Zellen in PBS. Dazu wurden die chemischen Schalter auf 10–100 nM in Inkubationspuffer verdünnt und für 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal gründlich mit Inkubationspuffer gewaschen, mit PBS bedeckt und am kommerziellen TIRF-Mikroskop untersucht. Für die Multiplexing-Experimente wurde anschließend noch mit Atto565-Phalloidin in Inkubationspuffer für 30 Minuten inkubiert und danach gründlich dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen. Die Messungen wurden in 25  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> in PBS durchgeführt, zur Wiederherstellung der ausgeschalteten Struktur wurde 50  $\mu$ M EDTA-Lösung zugegeben.

**Tabelle 5.4.:** Für diese Arbeit verwendete Antikörper

<b>Antikörper (Bestellnummer)</b>	<b>Wirt</b>	<b>Hersteller</b>
Anti- $\alpha$ -Tubulin, monoclonal (T8203)	Maus	Sigma-Aldrich
Anti- $\alpha$ -Tubulin-Biotin, monoclonal (23610501)	Maus	ThermoFisher
Anti-Clathrin, monoclonal (MA1065)	Maus	ThermoFisher
Anti-Lamin-Atto647N, polyclonal (L3544)	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-Maus, polyclonal (M7023)	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti-Maus, polyclonal (M8642)	Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Maus-Biotin, polyclonal (B7264)	Ziege	Sigma-Aldrich
Anti-Vimentin, monoclonal (180052)	Maus	ThermoFisher
Anti-Vinculin, monoclonal (V9264)	Maus	Sigma-Aldrich
Phalloidin-Atto565		ATTO-TEC
Phalloidin-Atto633		ATTO-TEC
Phalloidin-Biotin (B7474)		ThermoFisher

### 5.3.6. Markierung mit Tetrazinen

Für die Experimente mit den Tetrazin-Derivaten wurden zuerst Antikörper mit *a*-TCO\*-pNPC (*p*-Nitrophenyl-Carbonat) oder ENDO-BCN-pNPC wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben markiert und aufgereinigt. Nach Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen wurden die Antikörper auf 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Inkubationspuffer verdünnt und die fixierten Zellen damit für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer wurden die Tetrazin-Derivate in Inkubationspuffer auf 1  $\mu\text{M}$  verdünnt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS am kommerziellen TIRF-Mikroskop untersucht.

## 5.4. Ensemble-Techniken

Die Ensemble-Messungen wurden in Quarzglas-Küvetten der Firma *Hellma Analytics* durchgeführt. Für die Messung sehr kleiner Probenvolumina kamen Ultra-Mikro-Fluoreszenzküvetten (105.251-QS) mit einem minimalen Füllvolumen von 45  $\mu\text{m}$  zum Einsatz. Größere Volumina wurden in Makro-Fluoreszenzküvetten (111-QS) mit einem Volumen von 3.5 mL vermessen.

### 5.4.1. Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionmessungen wurden an einem „Cary 500 Scan“ der Firma *Varian/Agilent Technologies* durchgeführt. Die Spektren wurden gegen Luft vermessen und um die Absorption der Küvette mit dem reinen Lösungsmittel korrigiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$A_{\lambda_{max}} = \epsilon_{\lambda_{max}} \cdot d \cdot c \quad (5.2)$$

verwendet. Es wurde die Absorption  $A_{\lambda_{max}}$  am Maximum, der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{\lambda_{max}}$  und die Schichtdicke  $d$  verwendet. Die Extinktionskoeffizienten wurden jeweils vom Farbstoffhersteller bereitgestellt.

### 5.4.2. Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer „Cary Eclipse“ der Firma *Varian/Agilent Technologies* durchgeführt. Typischerweise wurden Lösungen bei einer Konzentration von etwa  $10^{-7}$  M vermessen. Die Fluorophore wurden jeweils knapp unterhalb ihres Absorptionsmaximums angeregt.

Die Titrationen zur Quantifizierung der Fluoreszenzlöschung wurden durch schrittweise Zugabe von  $M^{2+}$ -Stammlösungen durchgeführt. Hier wurde jeweils 1  $\mu$ L der Stammlösung in die Küvette gegeben und die Lösung danach durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Eppendorf-Pipette vermischt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte dann nach Abwarten der Gleichgewichtseinstellung. Die gemessenen Intensitäten und die Konzentrationen an zugegebenen  $M^{2+}$ -Ionen ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) wurde auf die Verdünnung angepasst.

Die Komplexbildungskinetik wurde durch zeitabhängige Messung der Intensität am Fluoreszenzmaximum verfolgt. Hier wurde während der Messung ein Äquivalent einer  $CuSO_4$ -Lösung zugegeben und sofort gründlich vermischt. Die Zugabe von EDTA-Lösung (ebenfalls ein Äquivalent) wurde genauso durchgeführt.

### 5.4.3. Fluoreszenzlebensdauermessung

Die Fluoreszenzlebensdauern der chemischen Schalter wurden an einem „Fluotime 100“ Spektrometer mit zeitkorrelierter Einzelphotonenzählkarte „TCSPC TimeHarp 200“ der Firma *PicoQuant* bestimmt. Als Anregungsquelle wurden entweder die gepulsten Dioden „PLS 500“ (500 nm, 40 MHz) oder „PLS 600“ (600 nm, 40 MHz) der Firma *PicoQuant* mit einer Pulsbreite von 300 ps oder ein durchstimmbarer fasergekoppelter Laser „iChrome TVIS“ der Firma *TOPTICA* mit einer Pulsweite von 3.5 ps eingesetzt. Die Instrumentenantwort (IRF) wurde mit kolloidalen  $SiO_2$ -Nanopartikeln (LUDOX<sup>®</sup> HS-40 (420816), *Sigma-Aldrich*) bestimmt.

Während der eigentlichen Messung wurde das Anregungslicht mit geeigneten Hochpass-Filtern entfernt, die Daten wurden dann mit dem Programm „FluoFit“ der Firma *PicoQuant* ausgewertet.

## 5.5. Mikroskopie

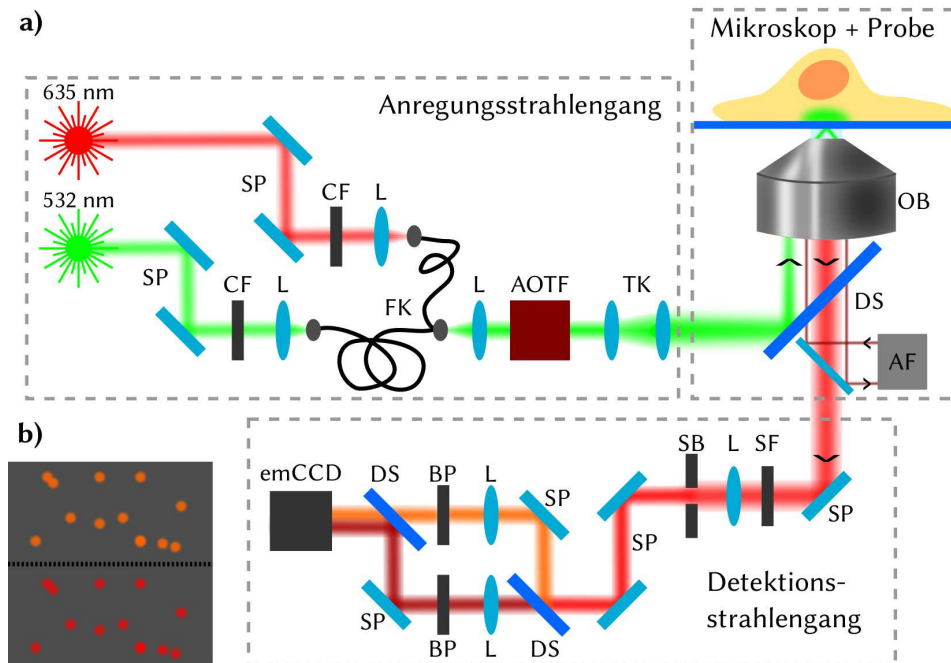
### 5.5.1. Epifluoreszenz- und TIRF-Mikroskopie

Die Experimente in dieser Arbeit wurden an zwei unterschiedlichen Mikroskopen durchgeführt. Zum einen kam ein selbstgebautes TIRF-Mikroskop zum Einsatz, zum anderen wurde an einem kommerziellen „TiE“ TIRF-Mikroskop der Firma *Nikon* gearbeitet. Beide Mikroskope werden im Folgenden kurz beschrieben.

#### Selbstbau-TIRF-Mikroskop

Das selbstgebaute TIRF-Mikroskop ist in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt. Zentrales Element des selbstgebauten TIRF-Mikroskops ist ein „Axiovert 200M“ Mikroskop-Body der Firma *Zeiss*. Zur Fluoreszenzanregung kamen zwei Dauerstrichlaser der Firma *World Star Tech*, zum einen der 532 nm Laser „TECGL-30“ mit 30 mW Leistung, zum anderen der „TECRL-25G-635“, ein 635 nm Laser mit 25 mW Leistung. Die beiden Laser passieren schmalbandige Cleanup-Filter werden über je zwei Spiegel und eine Linse in eine Faserkopplungs-Einheit eingekoppelt. Hier werden bis zu drei Laserlinien vereint und aus einer einzigen Faser wieder ausgekoppelt. Nach Kollimierung durch eine weitere Linse passiert der Strahlengang einen akusto-optischen Filter „AOTF.nCVIS“ der Firma *AA Optoelectronics*. Hierdurch können die Laserlinien unabhängig voneinander über ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes LABVIEW-Programm in ihrer Intensität moduliert werden. Nach einer Aufweitung mit Hilfe zweier Linsen wird das Anregungslicht über einen dichroitischen Spiegel „Dual Line BeamSplitter z 532/633“ der Firma *AHF Analystechnik* in das Mikroskop eingekoppelt und durch ein 100x Öl-Immersionsobjektiv „Apo TIRF 100x 1.49 Oil“ der Firma *Nikon* (NA 1.49, verwendetes Immersionsöl: *Nikon*,  $n = 1.515$ ) auf die Probe fixiert. Das Fluoreszenzlicht wird wieder vom Objektiv gesammelt, passiert den Dichroiten und wird durch einen Sperrfilter „Triple-Notch Filter 488/532/631-640 nm“ der Firma *AHF Analystechnik* von verbleibendem Anregungslicht befreit. Eine Schlitzblende engt das Gesichtsfeld ein, und ein dichroitischer Spiegel „Strahlteiler 640DCXR“ der Firma *AHF Analystechnik* trennt das Emissionslicht in zwei spektrale Kanäle auf. Diese werden durch die Bandpassfilter „HQ 585/60“ und „HQ 685/70“ (beide von *AHF Analystechnik*) weiter definiert. Ein weiterer Dichroit „Q650SPXR“ (*AHF Analystechnik*) vereint beide Strahlen wieder und bildet sie versetzt auf





**Abbildung 5.1.:** (a) Schematische Darstellung des selbstgebauten TIRF-Mikroskops mit zwei Anregungslinien (532 nm und 635 nm sowie zwei spektral getrennten Detektionskanälen, die mittels Rechteckblende und dichroitischen Spiegeln auf die beiden Hälften der eMCCD-Kamera projiziert werden. Abkürzungen: SP - Spiegel, CF - Cleanup-Filter, L - Linse, FK - Faserkopplung, AOTF - Akusto-optischer Filter, TK - Teleskop, DS - dichroitischer Spiegel, OB - Objektiv, AF - Autofokussystem, SF - Sperrfilter, SB - Schlitzblende, BP - Bandpassfilter, emCCD - *electron multiplying Charge Coupled Device* Kamera. (b) Schema des Abbildes der Probe auf der Kamera. Es wird auf der oberen und unteren Hälfte jeweils der gleiche Bildausschnitt abgebildet, allerdings in unterschiedlichen Farben. Der obere Kanal bildet Licht unterhalb 640 nm ab, der untere Kanal Licht oberhalb 640 nm. Die spektralen Kanäle können durch Bandpassfilter weiter eingeschränkt werden.

die beiden Hälften einer emCCD-Kamera „iXonEM+897“ der Firma *Andor* ab.

Die Datenaufnahme erfolgte mit der vom Hersteller *Andor* zur Verfügung gestellten Software „Solis for imaging“ (Version 1.12.3). Die Stabilität des Fokus während der Aufnahmen wurde durch das „CRISP autofocus system“ der Firma *App-*

**Tabelle 5.5.:** Am *Nikon* TIRF-Mikroskop verwendete Dichroiten und Filter (alle von *AHF Analystechnik*).

Bezeichnung	Typ	Bestellnummer
Laser-Dichroit	R405/488/561/635	F73-866
Laser-Sperrfilter	ZET405/488/561/640	F57-405
Laser-Strahlenteiler	HC BS R561	F38-561
Laser-Strahlenteiler	H 643 LPXR superflat	F48-644
Bandpassfilter	605/70 ET	F47-605
Bandpassfilter	525/50 ET	F47-525
Langpassfilter	647 LP Edge Basic	F76-649

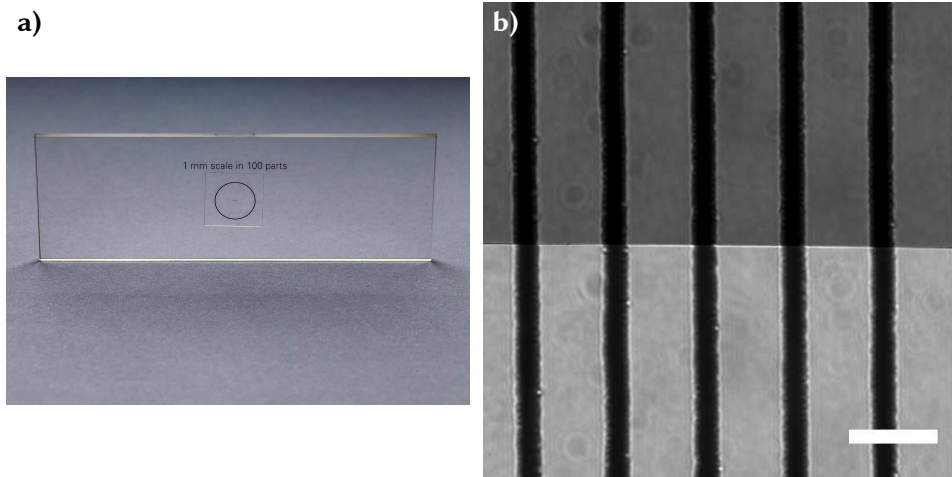
lied *Scientific Instrumentation* gewährleistet.

### Nikon TiE TIRF-Mikroskop

Das kommerzielle TIRF-Mikroskop ist um einen „TiE“ Mikroskopstativ von *Nikon* konstruiert, das mit dem Autofokussystem „PFS 2“ ausgestattet ist. Als Anregungsquelle kommt eine Vier-Farben-Laserquelle „iChrome MLE-LFA“ der Firma *TOPTICA Photonics* zum Einsatz (405 nm @ 50 mW, 488 nm @ 40 mW, 561 nm @ 30 mW, 640 nm @ 50 mW), die fasergekoppelt am „TIRF-Illuminator“ von *Nikon* hängt. Als Objektiv kommt auch hier ein „Apo TIRF 100x 1.49 Oil“ von *Nikon* (NA 1.49, verwendetes Immersionsöl: *Nikon*,  $n = 1.515$ ) zum Einsatz. Zur Detektion besitzt das Mikroskop einen „OptoSplit III“ Bildfeldteiler der Firma *Cairn Research*, der bis zu drei spektrale Kanäle erzeugt. Als Kamera kommt hier eine „iXon+ 897 Ultra“ der Firma *Andor* zum Einsatz. Die verwendeten Filter und Dichroiten (alle von *AHF Analystechnik*) sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst.

### Bestimmung der Pixelgröße

Die Größe des abgebildeten Gesichtsfelds der Mikroskope wird mit einem Mikrometerlineal bestimmt. Es ist in Abbildung 5.2 a vergrößert dargestellt und besteht aus einer mit Linien im Abstand von 10  $\mu\text{m}$  bedruckten Folie auf einem Deckglas. Das Abbild dieser Linien im Durchlicht (Abb. 5.2b) auf dem CCD-Sensor wird in *ImageJ* binarisiert und dann der Abstand jeweils benachbarter Linien gemessen und daraus dann für jeden Farbkanal an jedem Mikroskop der Mittelwert mit Fehler für die Pixelgröße bestimmt. Für das Selbstbau-TIRF ergibt sich so ein Wert von  $(89.0 \pm 0.8)$  nm/Pixel in beiden Kanälen. Das kommerzielle TIRF von *Nikon* hat in beiden spektralen Kanälen eine Pixelgröße von  $(104.0 \pm 0.4)$  nm/Pixel.



**Abbildung 5.2.:** Bestimmung der Pixelgröße mit einem Mikrometerlineal: a) Foto des Lineals auf einem Objektträger; b) Abbild des Lineals auf dem CCD-Sensor (oben grüner Kanal, unten roter Kanal).

### 5.5.2. Konfokale Mikroskopie

Die konfokalen Fluoreszenzbilder wurden an einem kommerziellen Mikroskop „TCS SP5 X“ mit Strahlscanner der Firma *Leica Microsystems* mithilfe der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software „LAS AF light“ (Version 2.4.1 build 6356) aufgenommen. Als Anregungsquelle kam hier ein Weißlichtlaser (470–670 nm) „SuperK EXTREME supercontinuum“ der Firma *Koheras/NKT Photonics* zum Einsatz. Die Fluoreszenz wurde auf zwei Photomultipliern (PMT) detektiert, deren Spektralbereich in der Software frei wählbar ist. Die Verstärkerspannung wurde auf 800 V gesetzt, die Laserleistung der jeweiligen Anregungslinie (550 nm für TMR und Atto565, 640 nm für Atto647N) wurde in der Software auf 40–60 % gesetzt. Die aufgenommenen Bilder wurden in ImageJ (Ver. 4.50g, NIH) weiterverarbeitet.

### 5.5.3. STED-Mikroskopie

Die STED-Messungen in Kapitel 2.6 wurden an einem selbstgebauten STED-Mikroskop in der Arbeitsgruppe von Prof. STEFAN HELL von Dr. JOHANN ENGELHARDT durchgeführt. Es kam ein gepulster 532 nm Laser „PicoTA“ der Firma *PicoQuant* zur Anregung sowie ein gepulster 654 nm „Rainbow Faserlaser“ der Firma *Mobius Photonics* zur stimulierten Emission zum Einsatz. Der Anregungsla-

ser wurde durch den STED-Laser über eine Photodiode der Firma *Alphas* getriggert. Die synchronisierten Laserpulse wurden mittels eines AOTF der Firma „Crystal Technologies“ kombiniert und in das Mikroskop „DMI 4000B“ von *Leica Microsystems* eingekoppelt. Das Mikroskop war mit einem Drei-Achsen-Stage-Scanner von PI ausgestattet. Das „ACS APO, 63x/1.30NA oil“ Immersionsobjektiv von *Leica Microsystems* sammelt auch das Fluoreszenzlicht, das einen Bandpassfilter „580/40“ von *AHF Analysentechnik* passiert und durch ein Pinhole auf ein „SPCM-AQR-13-FC“ Photonenzählmodul von *PerkinElmer* fokussiert wird. Der STED-Laser erhielt durch eine Glas-Phasenplatte von *RPC Photonics* (helikale Phasenrampe von  $0-2\pi$ ) sein Donut-Profil. Die Steuerung und Datenaufnahme wurde mit einer von Dr. JOHANN ENGELHARDT entwickelten in „LabView“ von *National Instruments* geschriebenen Software durchgeführt. Die exportierten Bilder wurden in ImageJ (Ver. 4.50g, NIH) verarbeitet.

Die STED-Messungen in Kapitel 3.2.5 wurden bei der Firma *PicoQuant* in Berlin durchgeführt. Hier kam ein „Microtime 200 STED“ von *PicoQuant* zum Einsatz, das mit einem Strahlscanner ausgestattet war. Zur Anregung wurde ein gepulster 640 nm Laser „LDH-D-C-640“ (20 MHz,  $1.3 \mu\text{W}$  konfokal,  $10 \mu\text{W}$  STED) von *PicoQuant* eingesetzt, die stimulierte Emission wurde bei 765 nm mit einem „VisIR-765 STED“ (20 MHz, 100 mW) von *PicoQuant* erzielt. Die Laser wurden in einer einzigen Single-Mode-Faser vereint, der STED-Laser wurde zudem durch eine Phasenplatte „EASYDONut 640/765 nm“ von *Abberior* vor dem Objektiv in seine Donut-Form gebracht. Als Objektiv kam ein „UPlanSAPO 100X/1.4 oil“ von Olympus zum Einsatz. Das Fluoreszenzlicht wurde mittels eines dichroitischen Spiegels „zt640/752rpc“ von *AHF Analysentechnik* vom Anregungslicht getrennt und auf einen Detektionsfilter „HQ690/70“, ebenfalls von *AHF Analysentechnik*, aufgereinigt, auf ein Pinhole mit 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser fokussiert und mit einer „SPCM-SPAD“ von *Excelitas* detektiert. Das Detektorsignal wurde mit einem „HydraHarp 400 TCSPC System“ von *PicoQuant* verarbeitet und in der Software „SymPhoTime 64“, ebenfalls von *PicoQuant*, verarbeitet.

Zur Aufnahme wurde ein Bereich von  $300 \times 300$  Pixeln mit einer Pixelgröße von 30 nm abgescannt. Die Pixel-Verweilzeit betrug 1.7  $\mu\text{s}$ , und es wurde mit einer Linienfrequenz von 980 Hz gemessen und über 100 Bilder aufsummiert, was einer Gesamt-Aufnahmedauer von etwa 31 s entspricht.

Es wurden sequentielle Aufnahmen von fixierten Zellen gemacht: zuerst wurde, in Anwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$ , ein konfokales Bild aufgenommen, danach ein STED-Bild. Ein weiteres STED-Bild wurde zum Photobleichen aufgenommen. Danach wurde wieder ein konfokales Bild angefertigt, EDTA zugegeben und erneut ein konfokales und ein STED-Bild aufgenommen. Für die STED-Bilder wurden in der Aufnahmesoftware ein „Time-Gating“ eingestellt, sodass die Photonen der ersten 2.24  $\mu\text{s}$  nach jedem Laserpuls nicht mit verarbeitet wurden. Die Bilder wurden

aus der Aufnahmesoftware als 32-bit TIFF exportiert und in ImageJ (Ver. 4.50g, NIH) weiter verarbeitet.

## 5.6. Datenauswertung

### Einzelmolekülcharakterisierung

Die gewonnenen Einzelmolekülkosten wurden mit einem in der Arbeitsgruppe vorhandenen, von KRISTIN GRUSSMAYER und ANTON KURZ geschriebenen *MATLAB*-Programm ausgewertet. Hier wird zuerst eine Summen- oder Maximumintensitätsprojektion über die ersten 100 Bilder berechnet, welche dann zur Bestimmung von lokalen Maxima herangezogen wird, die anhand eines Grenzwertes ausgewählt werden. Diese Maxima müssen rund sein und dürfen nicht überlappen. Von allen Maxima die diese Kriterien erfüllen werden dann über die Zeit die Intensitätsspuren ausgelesen (aus einem Kreis mit Radius von 3 Pixeln) und jeweils um deren lokalen Hintergrund (eine Scheibe mit Radius 2 Pixeln, beginnend mit einem Pixel Abstand zum inneren Kreis) korrigiert. Befindet sich ein weiteres Maximum im Hintergrund, werden diese Pixel nicht mit in die Berechnung des Hintergrundes einbezogen. Die Daten werden als txt-Datei ausgegeben.

Die so ausgegebenen Intensitätsspuren wurden dann in *Origin* zur Visualisierung eingelesen. Die Bestimmung der An- und Auszeiten erfolgte mit einem von MICHAEL SCHWERING und ANTON KURZ geschriebenen *MATLAB*-Programm, welches die Spuren anhand eines selbst zu wählenden Grenzwertes binarisiert und dann die jeweilige Länge von An- und Auszuständen histogrammiert. Dieses Histogramm sowie ein flächennormiertes Histogramm werden als cvs-Datei ausgegeben.

### Lokalisationsexperimente

Zur Auswertung der CHIRON-Lokalisationsdaten wurden verschiedene Programme herangezogen und gegeneinander verglichen. Zum einen kam die Software „rapidSTORM“ von STEVE WOLTER in der Version 1.4 und 3.3 zum Einsatz. In Version 1.4 wurde ein globaler Grenzwert zur Detektion von Maxima gewählt werden, der je nach Datensatz angepasst werden muss. Version 3.3 unterstützt auch einen lokalen Grenzwert in Form eines Signal-zu-Hintergrund-Quotienten, der auf einen Wert von 10 gesetzt wurde. Desweiteren kamen noch die ImageJ-Plugins „ThunderSTORM“ sowie „QuickPALM“ zum Einsatz.<sup>[183,184]</sup> Diese sind jeweils frei erhältlich (ImageJ Ver. 4.50g, NIH).

Um die Bewegung der Probe durch mechanische Instabilität des Mikroskops während der vergleichsweise langen Aufnahme zu korrigieren, wurden mit dem

ImageJ-Plugin „Template Matching and Slice Alignment“ von QINGZONG TSENG anhand von Bezugsmarken jedes einzelne Bild des Videos analysiert und zurecht geschoben.<sup>[165]</sup> Die Bezugsmarken wurden für jedes Video von Hand markiert und das Video dann analysiert und bearbeitet.

## Kapitel 6.

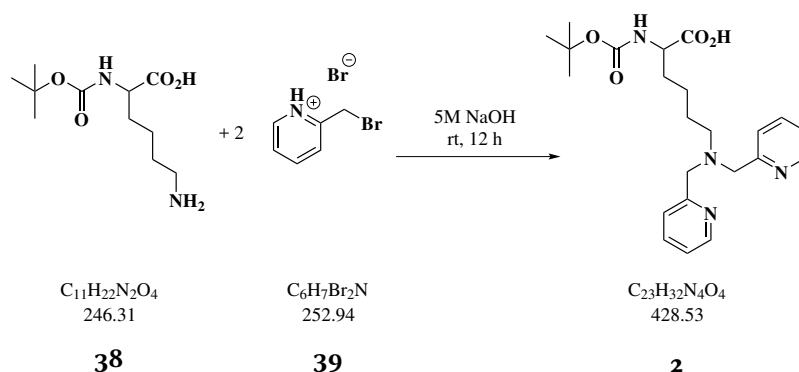
### Synthesevorschriften

Alle chemischen Synthesen wurden, wenn nicht anderweitig erwähnt, ohne Ausschluss von Sauerstoff und Wasser unter normaler Atmosphäre durchgeführt. Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden wie vom Hersteller bezogen eingesetzt (siehe auch Kapitel 5.1).

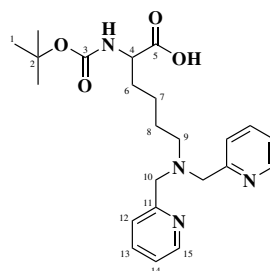
Die Analytik (NMR und MS) wurde im chemischen Institut der Universität Heidelberg durchgeführt (siehe Kapitel 5.2).

#### 6.1. Funktionalisierung von Lysin

##### *N*<sup>2</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysin (**2**)



Eine Lösung von (*tert*-Butoxycarbonyl)lysin (**38**, 987 mg, 4.01 mmol) in 50 mL 5 M NaOH-Lösung wird mit 2.5 Äquivalenten 2-(Bromomethyl)pyridin (**39**, 2.53 g, 10.03 mmol) versetzt. Die tief rote Reaktionsmischung wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und dann dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der bräunliche Rückstand wird säulenchromatographisch auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol, 10:1) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird **2** als gelber Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 1180 mg, 2.8 mmol, 69 %.

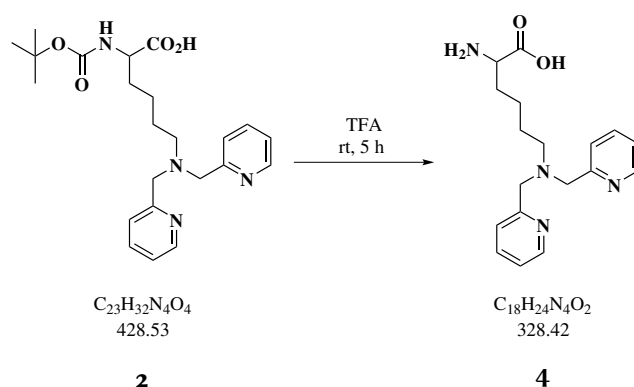
**MS (ESI+)** = 429 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI+):** für C<sub>23</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> ber. 429.25096, gef. 429.24963.

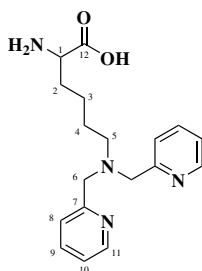
**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.36 (m, 2 H, H<sub>7</sub>), 1.45 (s, 9 H, H<sub>1</sub>), 1.56 (m, 2 H, H<sub>8</sub>), 1.69 (m, 1 H, H<sub>6a</sub>), 1.83 (m, 1 H, H<sub>6b</sub>), 2.57 (m, 2 H, H<sub>9</sub>), 3.81 (s, 4 H, H<sub>10</sub>), 4.21 (m, 1 H, H<sub>4</sub>), 5.36 (d, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 1 H, -NH), 7.14 (m, 2 H, H<sub>14</sub>), 7.47 (d, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>12</sub>), 7.63 (td, <sup>1</sup>J(H) = 8, 2 Hz, 2 H, H<sub>13</sub>), 8.51 (d, <sup>1</sup>J(H) = 4 Hz, 2 H, H<sub>15</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 22.7 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>7</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>8</sub>), 28.5 (CH<sub>3</sub>, 3 C, C<sub>1</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>6</sub>), 54.3 (CH, 1 C, C<sub>4</sub>), 54.5 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>9</sub>), 60.0 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>10</sub>), 122.3 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>14</sub>), 123.4 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>12</sub>), 137.0 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>13</sub>), 148.5 (CH, 2 C, C<sub>15</sub>), 159.1 (C<sub>q</sub>, 2 C, C<sub>11</sub>).



***N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-Bis(pyridin-2-ylmethyl)lysine (4)**

In 5 mL Trifluoressigsäure wird *N*<sup>2</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysine (**2**, 500 mg, 1.17 mmol) vorsichtig gelöst und für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbliche Lösung wird danach am Vakuum eingedunstet und der bräunliche Rückstand in 5 mL Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wird dreimal mit Wasser extrahiert, die wässrigen Phasen vereint und das Lösungsmittel entfernt. **4** wird als gelblicher Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 376 mg, 1.15 mmol, 98 %.

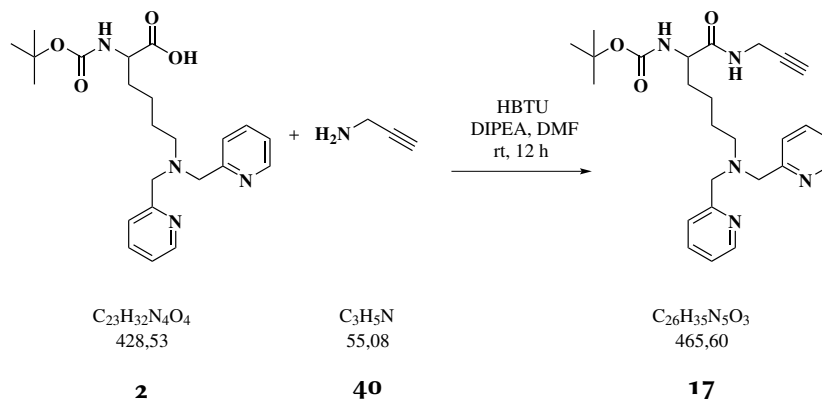
**MS (ESI+)** = 329 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_2$  ber. 329.19720, gef. 329.19766.

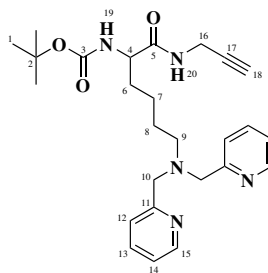
**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 1.33 (m, 2 H, H<sub>3</sub>), 1.69 (m, 2 H, H<sub>4</sub>), 1.80 (m, 2 H, H<sub>2</sub>), 2.88 (m, 2 H, H<sub>5</sub>), 3.66 (t, <sup>1</sup>*J*(H) = 6.0 Hz, 1 H, H<sub>1</sub>), 4.10 (s, 4 H, H<sub>6</sub>), 7.35 (m, 2 H, H<sub>10</sub>), 7.40 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>8</sub>), 7.79 (t, <sup>1</sup>*J*(H) = 8, 2 Hz, 2 H, H<sub>9</sub>), 8.45 (m, 2 H, H<sub>11</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  (ppm) = 21.9 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>3</sub>), 24.1 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>4</sub>), 30.0 (CH<sub>3</sub>, 1 C, C<sub>2</sub>), 54.1 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>1</sub>), 54.5 (CH, 1 C, C<sub>5</sub>), 58.6 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>6</sub>), 123.8 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>10</sub>), 124.9 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>8</sub>), 138.2 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>9</sub>), 148.5 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C C<sub>11</sub>), 174.6 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>12</sub>).

***tert*-Butyl-(6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)hexan-2-yl)carbamate  
(17)**



Einer Lösung von  $N^2$ -(*tert*-Butoxycarbonyl)- $N^6,N^6$ -bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysin (**2**, 20.0 mg, 46.7  $\mu$ mol) in 3 mL trockenem DMF wird mit 1.5 Äquivalenten Propargylamin (**40**, 3.8 mg, 70.1  $\mu$ mol, 4.5  $\mu$ L) und 1 mL DIPEA versetzt und für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die braune Lösung im Vakuum eingedampft, der braune ölige Rückstand in 10 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung und einmal mit Wasser gewaschen, mit  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol, 10:1) wird **17** als bräunliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 17.6 mg, 37.9  $\mu$ mol, 79 %.

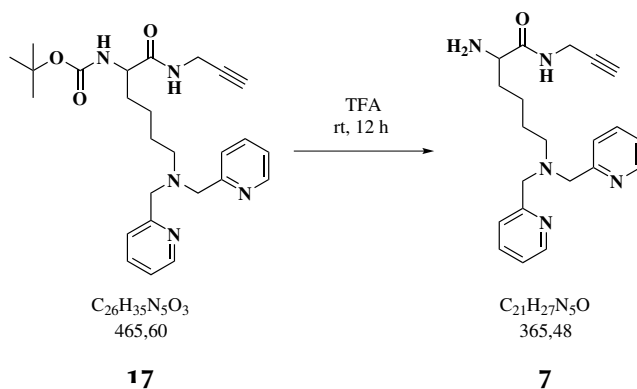
**MS (ESI+):**  $m/z$  466  $[M+H]^+$ , 488  $[M+Na]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{26}H_{36}N_5O_3$  ber. 466.2813, gef. 466.2815, für  $C_{26}H_{35}N_5NaO_3$  ber. 488.2632, gef. 488.2633.

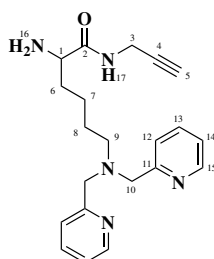
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.34 (m, 2 H,  $\text{H}_7$ ), 1.42 (s, 9 H,  $\text{H}_1$ ), 1.54 (m, 1 H,  $\text{H}_{6a}$ ), 1.61 (m, 2 H,  $\text{H}_8$ ), 1.75 (m, 1 H,  $\text{H}_{6b}$ ), 2.19 (t,  $^1J(\text{H}) = 2.8$  Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 2.60 (m, 2 H,  $\text{H}_9$ ), 3.86 (s, 4 H,  $\text{H}_{10}$ ), 4.03 (d,  $^1J(\text{H}) = 2.8$  Hz, 1 H,  $\text{H}_{18}$ ), 4.07 (m, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 5.20 (d,  $^1J(\text{H}) = 6.5$  Hz, 1 H,  $\text{H}_{19}$ ,  $-\text{NH}$ ), 6.88 (bs, 1 H,  $\text{H}_{20}$ ,  $-\text{NH}$ ), 7.16 (dd,  $^1J(\text{H}) = 6.5, 5.4$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{14}$ ), 7.52 (d,  $^1J(\text{H}) = 7.7$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{12}$ ), 7.66 (td,  $^1J(\text{H}) = 7.7, 1.7$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{13}$ ), 8.53 (d,  $^1J(\text{H}) = 4.4$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{15}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 23.1 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 26.1 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_8$ ), 28.4 ( $\text{CH}_3$ , 3 C,  $\text{C}_1$ ), 29.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{16}$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_6$ ), 53.8 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_9$ ), 54.3 (CH, 1 C,  $\text{C}_4$ ), 60.1 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_{10}$ ), 71.7 (CH, 1 C,  $\text{C}_{18}$ ), 79.5 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_2$ ), 80.2 ( $\text{C}_{\text{alkin}}$ , 1 C,  $\text{C}_{17}$ ), 122.4 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{14}$ ), 123.6 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ), 136.7 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{13}$ ), 149.2 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{15}$ ), 155.9 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_{11}$ ), 172.1 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_3$ ).

***tert*-Butyl-(6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)hexan-2-yl)carbamate  
(7)**



In 2 mL Trifluoressigsäure wird *tert*-Butyl-(6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)hexan-2-yl)carbamate (**17**, 17.6 mg, 37.9  $\mu\text{mol}$ ) gelöst und bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird **7** als braunes Öl erhalten.



**Ausbeute:** 13.6 mg, 37.1  $\mu\text{mol}$ , 98 %.

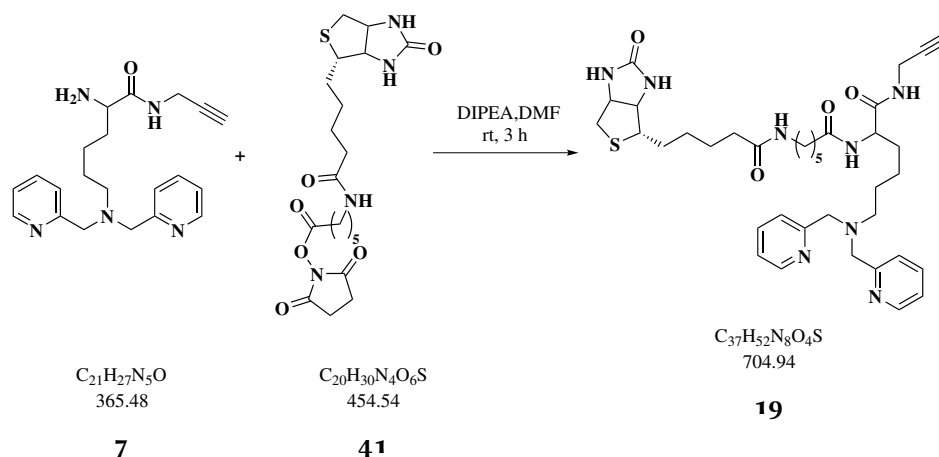
**MS (ESI+):**  $m/z$  366  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 388  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$  ber. 366.2288, gef. 366.2288.

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.43 (q,  $^1J(\text{H}) = 8$  Hz, 2 H,  $\text{H}_7$ ), 1.82–1.91 (m, 4 H,  $\text{H}_{6;8}$ ), 2.65 (t,  $^1J(\text{H}) = 3$  Hz, 1 H,  $\text{H}_5$ ), 3.26 (m, 2 H,  $\text{H}_9$ ), 3.84 (t,  $^1J(\text{H}) = 7$  Hz, 1 H,  $\text{H}_1$ ), 4.02 (qd,  $^1J(\text{H}) = 8$ , 3 Hz, 2 H,  $\text{H}_3$ ), 4.58 (s, 4 H,  $\text{H}_{10}$ ), 7.49 (ddd,  $^1J(\text{H}) = 8$ , 5, 1 Hz, 2 H,  $\text{H}_{14}$ ), 7.54 (d,  $^1J(\text{H}) = 8$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{12}$ ), 7.94 (td,  $^1J(\text{H}) = 8$ , 2 Hz, 2 H,  $\text{H}_{13}$ ), 8.67 (dq,  $^1J(\text{H}) = 5$ , 1 Hz, 2 H,  $\text{H}_{15}$ ).

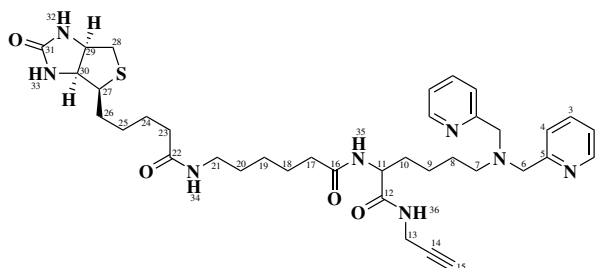
**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 22.9 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 25.1 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_8$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_3$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_6$ ), 54.0 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_1$ ), 55.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_9$ ), 58.4 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_{10}$ ), 72.9 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_5$ ), 80.0 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_4$ ), 125.6 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{14}$ ), 125.7 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ), 140.1 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{13}$ ), 149.9 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{15}$ ), 152.1 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_{11}$ ), 169.6 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_2$ ).

**6-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-(6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamido)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)hexanamid (42)**



In 2 mL trockenem DMF wird *tert*-Butyl-(6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)hexan-2-yl)carbammat (**7**, 10 mg, 27.4  $\mu\text{mol}$ ) unter Argonatmosphäre gelöst. Nach Zugabe von zwei Äquivalenten 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-6-(5-((4*S*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanoat (**41**, 24.9 mg, 54.7  $\mu\text{mol}$ ) sowie 500  $\mu\text{L}$  DIPEA zugegeben. Die Lösung wird bei Raumtemperatur für 3 Stunden gerührt. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der ölige braune Rückstand in 5 mL Chloroform aufgenommen,

mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und dann zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) liefert **42** als bräunliches Öl.



**Ausbeute:** 14.1 mg, 20.0  $\mu\text{mol}$ , 74 %.

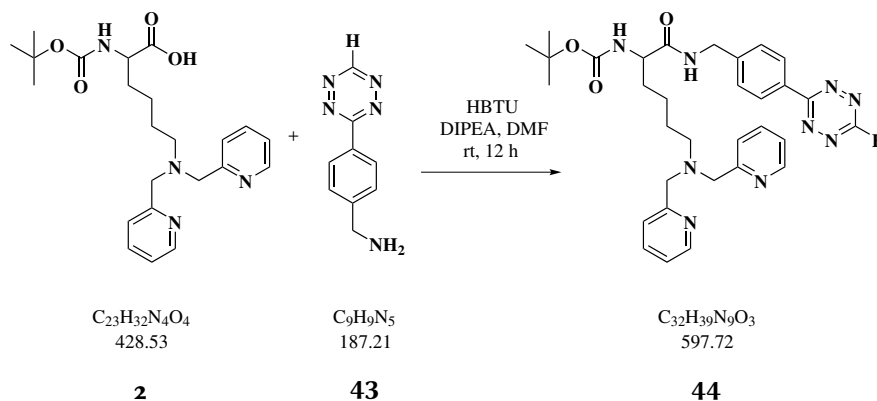
**MS (ESI+)** = 705  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{37}\text{H}_{53}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}$  ber. 705.39050, gef. 705.39072.

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.24 (s, 1 H,  $\text{H}_{25}\text{a}$ ), 1.34 (m, 2 H,  $\text{H}_{18}$ ), 1.36 (m, 2 H,  $\text{H}_{19}$ ), 1.40 (m, 2 H,  $\text{H}_9$ ), 1.43 (m, 1 H,  $\text{H}_{25}\text{b}$ ), 1.50 (m, 2 H,  $\text{H}_{20}$ ), 1.56 (m, 1 H,  $\text{H}_{10}\text{a}$ ), 1.57 (m, 2 H,  $\text{H}_{24}$ ), 1.60 (m, 1 H,  $\text{H}_{26}\text{a}$ ), 1.65 (m, 1 H,  $\text{H}_{10}\text{b}$ ), 1.67 (m, 2 H,  $\text{H}_8$ ), 1.73 (m, 1 H,  $\text{H}_{26}\text{b}$ ), 2.20 (m, 2 H,  $\text{H}_{17}$ ), 2.23 (m, 2 H,  $\text{H}_{23}$ ), 2.53 (t,  $^1J(\text{H}) = 7 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_7$ ), 2.58 (t,  $^1J(\text{H}) = 3 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{15}$ ), 2.70 (d,  $^1J(\text{H}) = 13 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{28}\text{a}$ ), 2.92 (dd,  $^1J(\text{H}) = 13, 5 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{28}\text{b}$ ), 3.15 (sx,  $^1J(\text{H}) = 6 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_{21}$ ), 3.20 (m, 1 H,  $\text{H}_{27}$ ), 3.79 (s, 4 H,  $\text{H}_6$ ), 3.94 (qd,  $^1J(\text{H}) = 40, 3 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_{13}$ ), 4.25 (dd,  $^1J(\text{H}) = 9, 6 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{11}$ ), 4.29 (dd,  $^1J(\text{H}) = 8, 4 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{30}$ ), 4.48 (dd,  $^1J(\text{H}) = 8, 4 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{29}$ ), 7.20 (ddd,  $^1J(\text{H}) = 7, 5, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_2$ ), 7.63 (d,  $^1J(\text{H}) = 7 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_4$ ), 7.81 (td,  $^1J(\text{H}) = 7, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_3$ ), 8.44 (m, 2 H,  $\text{H}_1$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 23.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{18}$ ), 24.6 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{19}$ ), 26.9 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_8$ ), 27.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{24}$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{13}$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{26}$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{25}$ ), 30.1 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{20}$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_9$ ), 32.9 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 36.6 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{17}$ ), 36.8 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{23}$ ), 41.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{28}$ ), 54.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 54.5 (CH, 1 C,  $\text{C}_{11}$ ), 57.0 (CH, 1 C,  $\text{C}_{27}$ ), 61.0 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 61.6 (CH, 1 C,  $\text{C}_{29}$ ), 63.4 (CH, 1 C,  $\text{C}_{30}$ ), 72.3 ( $\text{CH}_{\text{alkin}}$ , 1 C,  $\text{C}_{15}$ ), 123.8 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_2$ ), 124.9 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 138.8 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_3$ ), 149.4 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_1$ ), 160.5 ( $\text{CH}_q$ , 2 C,  $\text{C}_5$ ), 166.1 ( $\text{CH}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{31}$ ), 174.2 ( $\text{CH}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{12}$ ), 176.0 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_{16}$ ,  $\text{C}_{22}$ ).

***tert*-Butyl (1-((4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamat (44)**



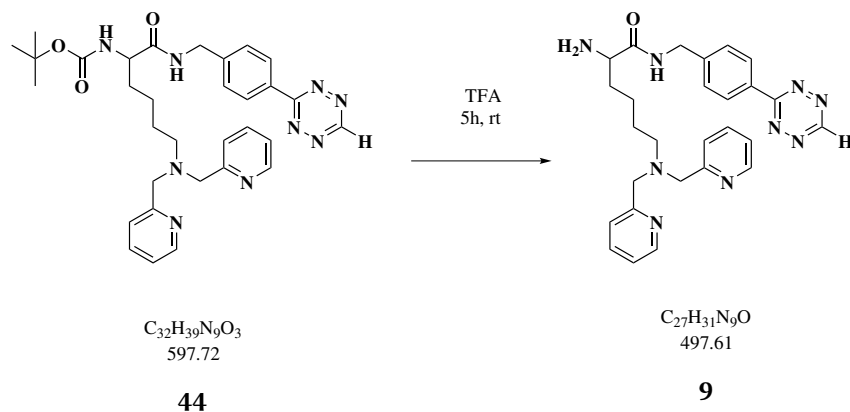
Eine Lösung von *N*<sup>2</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysin (**2** 50 mg, 117  $\mu$ mol) in 3 mL trockenem DMF wird mit einem Äquivalent (4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methanamin (**43**, 27 mg, 117  $\mu$ mol) sowie 1.5 Äquivalente HBTU (67 mg, 176  $\mu$ mol) sowie 1 mL DIPEA versetzt und die rötliche Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der rötliche Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $MgSO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch auf Kieselgel aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol 10:1). **45** wird als rötliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 48 mg, 80  $\mu$ mol, 68 %.

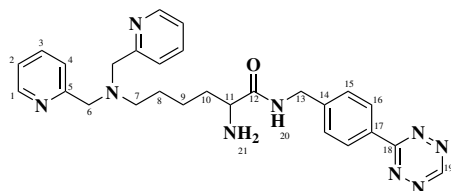
**MS (ESI+)** = 598  $[M+H]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{32}H_{40}N_9O_3$  ber. 598.32486, gef. 598.32550.

***N*-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-2-amino-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexanamid  
(9)**



In 3 mL TFA wird *tert*-Butyl (1-((4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamate (**44**, 40 mg, 67  $\mu\text{mol}$ ) gelöst und bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen und viermal mit wenig Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen werden im Vakuum eingedampft. **9** wird als rotes Öl erhalten.



**Ausbeute:** 31 mg, 63  $\mu\text{mol}$ , 94 %.

**MS (ESI+)** = 498 [M+H]<sup>+</sup>.

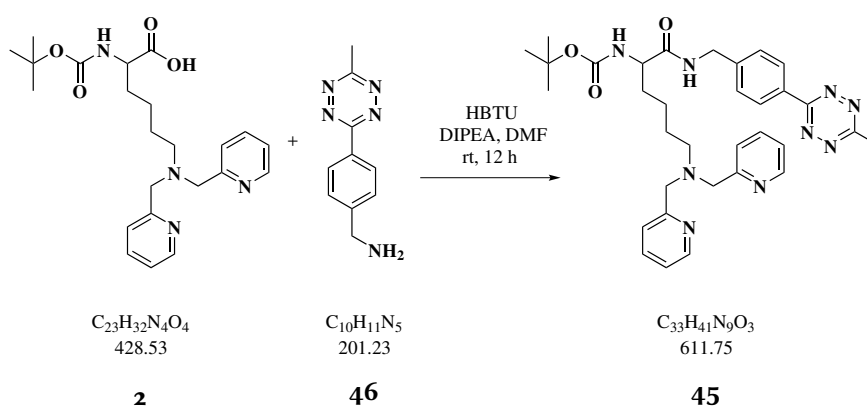
**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_9\text{O}$  ber. 498.27243, gef. 498.27352.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 1.41 (m, 2 H, H<sub>9</sub>), 1.84 (m, 2 H, H<sub>8</sub>), 1.91 (m, 2 H, H<sub>10</sub>), 3.51 (m, 2 H, H<sub>7</sub>), 3.94 (t, <sup>1</sup>*J*(H) = 7 Hz, 2 H, H<sub>11</sub>), 4.50–4.60 (m, 2 H, H<sub>13</sub>), 4.52 (s, 4 H, H<sub>6</sub>), 7.54 (m, 2 H, H<sub>2</sub>), 7.58 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>15</sub>), 7.61 (m, 2 H, H<sub>4</sub>), 8.01 (m, 2 H, H<sub>3</sub>), 8.52 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>16</sub>), 8.68 (m, 2 H, H<sub>1</sub>), 10.34 (s, 1 H, H<sub>19</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 23.1 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>9</sub>), 25.3 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>8</sub>), 32.2 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>10</sub>), 43.9 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>13</sub>), 54.2 (CH, 1 C, C<sub>11</sub>), 55.7 (CH<sub>2</sub>, 1 C,

C<sub>7</sub>), 58.1 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>6</sub>), 125.9 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>2</sub>), 126.2 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>4</sub>), 129.4 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>16</sub>), 129.6 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>15</sub>), 132.6 (C<sub>q</sub>, 2 C, C<sub>17</sub>), 141.1 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>3</sub>), 144.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>14</sub>), 149.0 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>1</sub>), 152.4 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>5</sub>), 159.3 (CH<sub>arom.</sub>, 1 C, C<sub>19</sub>), 167.5 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>18</sub>), 170.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>12</sub>).

***tert*-Butyl(6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-((4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamate (45)**



Eine Lösung von *N*<sup>2</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysin (**2**, 86 mg, 202 μmol) in 2 mL DMF und 500 μL DIPEA wird mit einem Äquivalent (4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanamin (**46**, 50 mg, 202 μmol) versetzt. Nach Zugabe von 1.5 Äquivalenten HBTU (303 μmol, 115 mg) wird die rötliche Lösung für 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt säulenchromatographisch auf Kieselgel (Dichlormethan: Methanol 10:1) aufgereinigt. **45** wird als rötliches Öl erhalten.

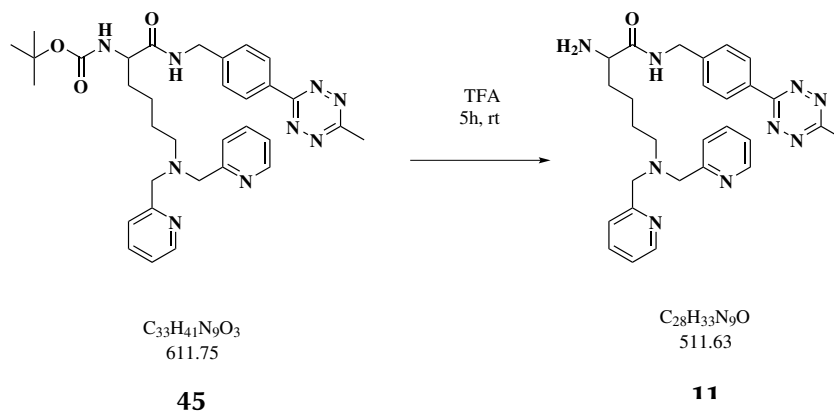
**Ausbeute:** 89 mg, 145 μmol, 72 %.

**MS (ESI+)** = 612 [M+H]<sup>+</sup>, 634 [M+Na]<sup>+</sup>.

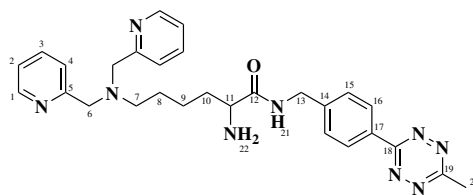
**HR-MS (ESI+):** für C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>N<sub>9</sub>O<sub>3</sub> ber. 612.34051, gef. 612.34055, für C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>9</sub>NaO<sub>3</sub> ber. 634.32246, gef. 634.32271.



**2-Amino-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-N-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)hexanamid  
(11)**



Bei Raumtemperatur wird *tert*-Butyl(6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-((4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamat (**45**, 89 mg, 145  $\mu$ mol) in 3 mL Trifluoressigsäure gelöst und für 5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird **11** als rötliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 71 mg, 139  $\mu$ mol, 96 %.

**MS (ESI+)** = 512 [M+H]<sup>+</sup>.

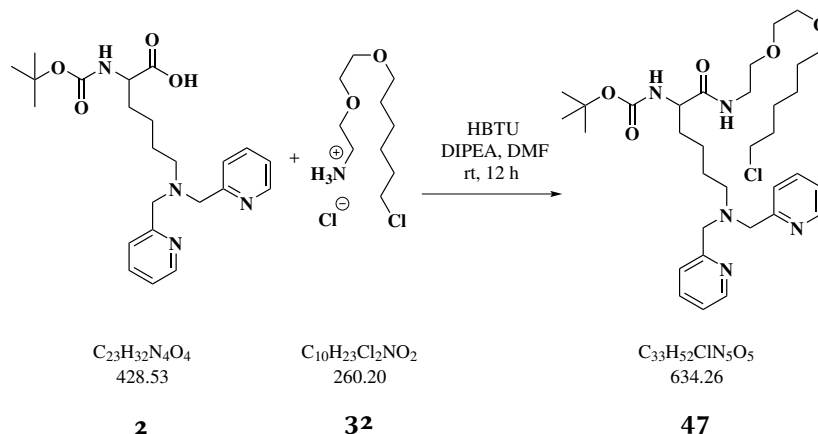
**HR-MS (ESI+):** für  $C_{28}H_{34}N_9O$  ber. 512.28808, gef. 512.28870.

**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.43 (m, 2 H, H<sub>9</sub>), 1.88 (m, 2 H, H<sub>8</sub>), 1.92 (m, 2 H, H<sub>10</sub>), 3.04 (s, 3 H, H<sub>20</sub>), 3.22 (m, 2 H, H<sub>7</sub>), 3.94 (t, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 1 H, H<sub>11</sub>), 4.51 (d, <sup>1</sup>J(H) = 15 Hz, 1 H, H<sub>13a</sub>), 4.54 (s, 4 H, H<sub>6</sub>), 4.59 (d, <sup>1</sup>J(H) = 15 Hz, 1 H, H<sub>13b</sub>), 7.43 (ddd, <sup>1</sup>J(H) = 8, 5, 1 Hz, 2 H, H<sub>2</sub>), 7.50 (d, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>4</sub>), 7.57 (d, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>15</sub>), 7.88 (td, <sup>1</sup>J(H) = 8, 2 Hz, 2 H, H<sub>3</sub>), 8.48 (d, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>16</sub>), 8.62 (m, 2 H, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 21.1 (CH<sub>3</sub>, 1 C, C<sub>20</sub>), 23.0 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>9</sub>), 25.0 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>8</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>10</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>13</sub>), 54.2 (CH, 1 C, C<sub>11</sub>), 55.8 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>7</sub>), 58.5 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>6</sub>), 125.4 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>2</sub>), 125.5 (CH<sub>arom.</sub>,

2 C, C<sub>4</sub>), 129.0 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>16</sub>), 129.6 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>15</sub>), 132.6 (CH<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>17</sub>), 139.5 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>3</sub>), 144.4 (CH<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>16</sub>), 150.2 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>1</sub>), 152.3 (CH<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>5</sub>), 165.1 (CH<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>18</sub>), 168.8 (CH<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>19</sub>), 170.1 (CH<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>12</sub>).

***tert*-Butyl(2(1-chloro-8-oxo-1-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylmethyl)-12,15-dioxa-2,9-diazahenicosan-7-yl)carbammat (47)**



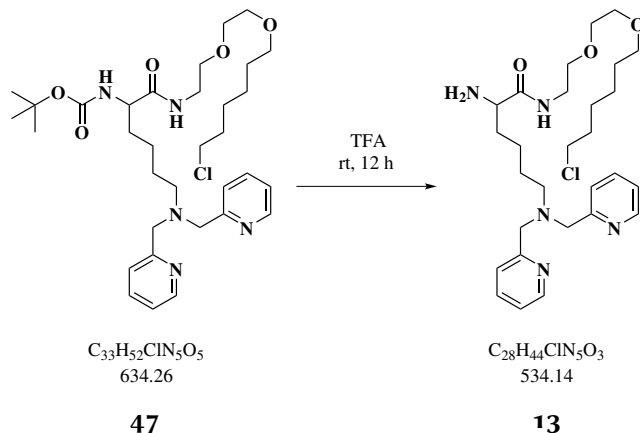
Unter Argonatmosphäre wird *N*<sup>2</sup>-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*<sup>6</sup>,*N*<sup>6</sup>-bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysin (**2**, 100 mg, 234 μmol) zusammen mit 1.2 Äquivalenten 2-(2-((6-Chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethan-1-ammoniumchlorid (**32**, 73 mg, 280 μmol) und 1.5 Äquivalente HBTU (133 mg, 351 μmol) in trockenem DMF (3 mL) gelöst. Dazu wird 1 mL DIPEA gegeben und die bräunliche Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der braune Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird **47** als bräunliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 110 mg, 173 μmol, 74 %.

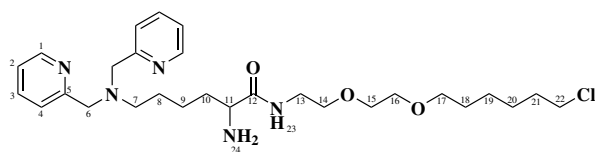
**MS (ESI+)** = 634 [M+H]<sup>+</sup>, 656 [M+Na]<sup>+</sup>, 672 [M+K]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI+):** für C<sub>33</sub>H<sub>53</sub><sup>35</sup>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> ber. 634.37297, gef. 634.37386,  
für C<sub>33</sub>H<sub>52</sub><sup>35</sup>ClN<sub>5</sub>NaO<sub>5</sub> ber. 656.35492, gef. 656.35583, für C<sub>33</sub>H<sub>42</sub><sup>35</sup>ClKN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> ber. 672.32886, gef. 672.33001.

**2-Amino-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)hexanamid  
(13)**



*tert*-Butyl(21-chloro-8-oxo-1-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylmethyl)-12,15-dioxo-2,9-diazahenicosan-7-yl)carbamate (**47**, 80 mg, 126  $\mu\text{mol}$ ) wird in 2 mL Trifluoressigsäure gelöst und für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und **13** als bräunliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 65 mg, 122  $\mu\text{mol}$ , 97 %.

**MS (ESI+)** = 534 [M+H]<sup>+</sup>, 556 [M+Na]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{28}\text{H}_{45}^{35}\text{ClN}_5\text{O}_3$  ber. 534.32054, gef. 534.32161,

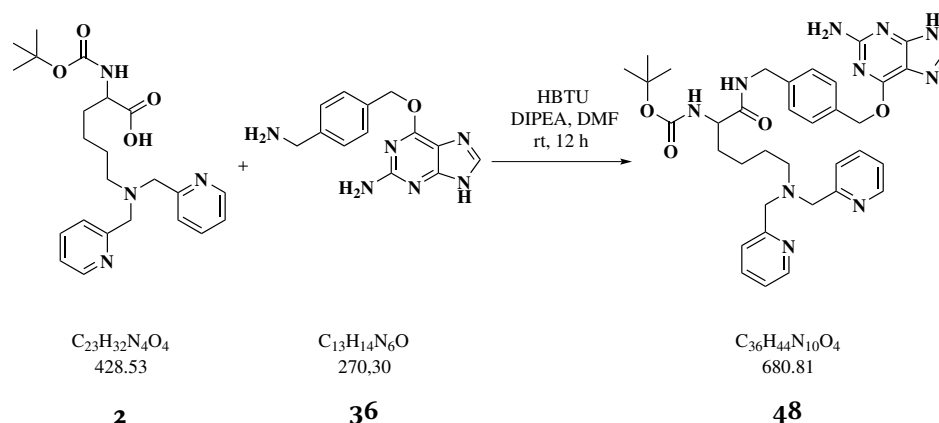
für  $\text{C}_{28}\text{H}_{45}^{37}\text{ClN}_5\text{O}_3$  ber. 536.31759, gef. 534.31883, für  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}^{35}\text{ClN}_5\text{NaO}_3$  ber.

556.30304, gef. 556.30395, für  $\text{C}_{33}\text{H}_{42}^{35}\text{ClKN}_5\text{O}_5$  ber. 672.32886, gef. 672.33001.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 1.37 (m, 2 H, H<sub>19</sub>), 1.43 (m, 2 H, H<sub>9</sub>), 1.47 (m, 2 H, H<sub>20</sub>), 1.58 (dt, <sup>1</sup>J(H) = 14, 7 Hz, 2 H, H<sub>18</sub>), 1.75 (dt, <sup>1</sup>J(H) = 14, 7 Hz, 2 H, H<sub>21</sub>), 1.83 (m, 2 H, H<sub>10</sub>), 1.89 (m, 2 H, H<sub>8</sub>), 3.28 (m, 2 H, H<sub>7</sub>), 3.42 (m, 2 H, H<sub>13</sub>), 3.47 (t, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 2 H, H<sub>17</sub>), 3.55 (m, 2 H, H<sub>22</sub>), 3.57 (m, 2 H, H<sub>14</sub>), 3.58 (m, 4 H, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>), 3.83 (t, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 1 H, H<sub>11</sub>), 4.59 (s, 4 H, H<sub>6</sub>), 8.66 (ddd, <sup>1</sup>J(H) = 8, 5, 1 Hz, 2 H, H<sub>2</sub>), 7.51 (d, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>4</sub>), 7.91 (td, <sup>1</sup>J(H) = 8, 2 Hz, 2 H, H<sub>3</sub>), 8.66 (m, 2 H, H<sub>1</sub>).

$^{13}\text{C}$ -NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 23.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_9$ ), 25.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_8$ ), 26.4 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{19}$ ), 27.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{20}$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{18}$ ), 32.1 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{21}$ ), 40.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{13}$ ), 45.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{22}$ ), 54.2 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_{11}$ ), 55.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 58.5 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{14}$ ), 71.2 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_{15}$ ,  $\text{C}_{16}$ ), 72.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{17}$ ), 125.5 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 125.6 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_2$ ), 139.7 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_3$ ), 150.2 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_1$ ), 152.0 ( $\text{CH}_q$ , 2 C,  $\text{C}_5$ ), 170.0 ( $\text{CH}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{12}$ ).

***tert*-Butyl(1-((4-(((2-amino-9*H*-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)-amino)-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)-carbamate  
(48)**



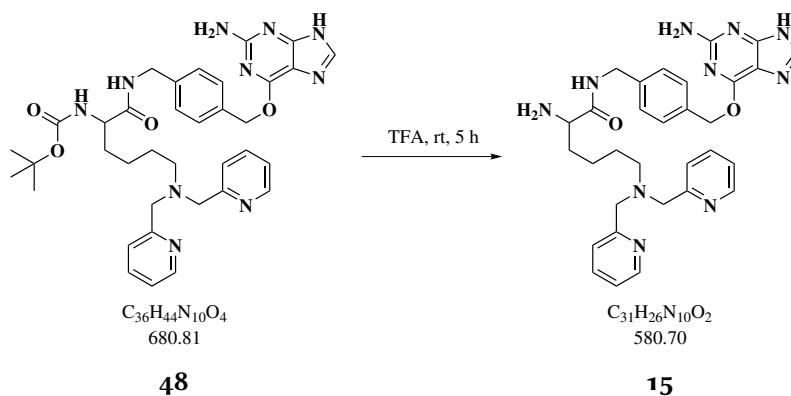
Unter Argonatmosphäre wird  $N^2$ -(*tert*-Butoxycarbonyl)- $N^6,N^6$ -bis-(pyridin-2-ylmethyl)-lysin (**2**, 50 mg, 117  $\mu\text{mol}$ ) zusammen mit 1.2 Äquivalenten  $O^6$ -(4-Aminomethylbenzyl)guanin (**36**, 38 mg, 140  $\mu\text{mol}$ ) in trockenem DMF (3 mL) gelöst. Dazu werden 1.5 Äquivalente HBTU (67 mg, 176  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (1 mL) gegeben und die bräunliche Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der braune Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) aufgereinigt, wonach **48** als braunes Öl erhalten wird.

**Ausbeute:** 51 mg, 75  $\mu\text{mol}$ , 64 %.

**MS (ESI+)** = 681  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 703  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{36}H_{45}N_{10}O_4$  ber. 681.36198, gef. 681.36321,  
für  $C_{36}N_{44}NaN_{10}O_4$  ber. 703.34392, gef. 703.34570.

**2-Amino-N-(4-(((2-amino-9H-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)amino)-6-(bis-(pyridin-2-ylmethyl)amino)hexanamid  
(15)**



Trifluoressigsäure (2 mL) wird unter Argonatmosphäre vorgelegt, dazu wird *tert*-Butyl(1-((4-(((2-amino-9H-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)amino)-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxohexan-2-yl)carbamate (40 mg, 59  $\mu$ mol) gegeben und die Lösung bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit wenig Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen werden im Vakuum eingedunstet. **15** wird als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 32 mg, 56  $\mu$ mol, 95 %.

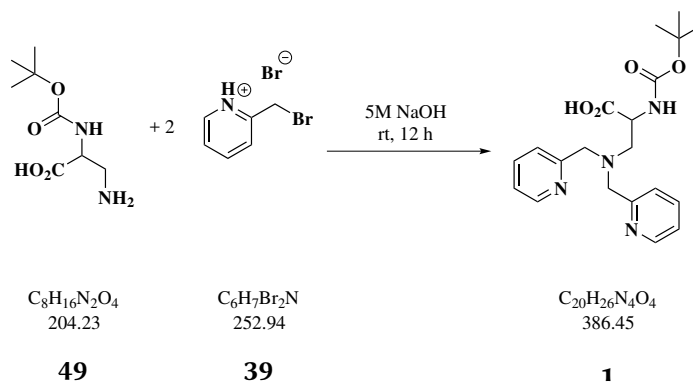
**MS (ESI+)** = 565  $[M-NH]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{26}H_{34}N_5O_2$  ber. 448.27070, gef. 448.27159, für  $C_{31}H_{35}N_9O_2$  ber. 565.29137, gef. 565.30455.

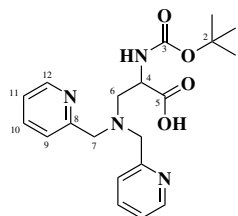
## 6.2. Funktionalisierung von Alanin

### 3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-propansäure

(1)



Zu einer Lösung von 3-Amino-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (**1**, 1.02 g, 5.00 mmol) in 50 mL 5 M NaOH-Lösung werden 2.5 Äquivalenten 2-(Bromomethyl)pyridin (**39**, 3.16 g, 12.50 mmol) gegeben. Die tiefrot gefärbte Lösung wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der rotbraune Rückstand wird säulenchromatographisch auf Kieselgel (Dichlormethan: Methanol, 20:1) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Trocknen im Vakuum wird **1** als bräunlicher Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 1217 mg, 3.15 mmol, 63 %.

**MS (ESI-)** = 385 [M-H]<sup>-</sup>.

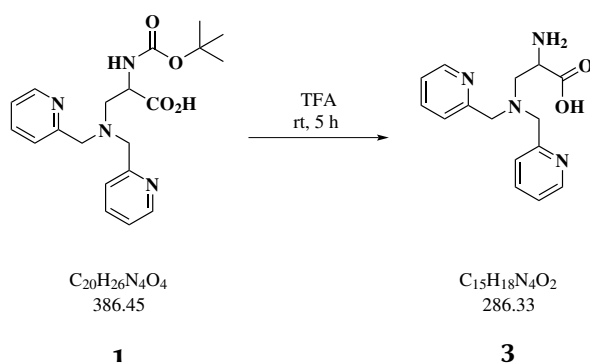
**HR-MS (ESI-):** für  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_4$  ber. 385.18813, gef. 385.18773.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.42 (s, 9 H,  $\text{H}_1$ ), 2.96 (dd,  $^1J(\text{H}) = 12, 10$  Hz, 1 H,  $\text{H}_6\text{a}$ ), 3.19 (dd,  $^1J(\text{H}) = 12, 5$  Hz, 1 H,  $\text{H}_6\text{b}$ ), 4.01 (s,  $^1J(\text{H}) = 15$  Hz, 2 H,  $\text{H}_7\text{a}$ ), 4.06 (d,  $^1J(\text{H}) = 15$  Hz, 2 H,  $\text{H}_7\text{b}$ ), 4.31 (qi,  $^1J(\text{H}) = 5$  Hz, 1 H,  $\text{H}_4$ ), 5.64

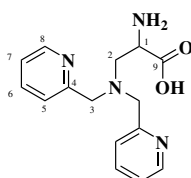
(d,  $^1J(\text{H}) = 6 \text{ Hz}$ , 1 H,  $-\text{NH}$ ), 7.13 (ddd,  $^1J(\text{H}) = 7, 5, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_{11}$ ), 7.32 (d,  $^1J(\text{H}) = 8 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_9$ ), 7.57 (td,  $^1J(\text{H}) = 8, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_{10}$ ), 8.46 (d,  $^1J(\text{H}) = 5 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_{12}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.5 ( $\text{CH}_3$ , 3 C,  $\text{C}_1$ ), 52.8 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_4$ ), 59.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_6$ ), 60.4 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_7$ ), 79.7 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_2$ ), 122.6 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{11}$ ), 123.5 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_9$ ), 137.2 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{10}$ ), 148.5 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ), 155.5 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_3$ ), 158.5 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_8$ ), 174.1 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_5$ ).

### 2-Amino-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)propansäure (3)



3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (**1**, 500 mg, 1.29 mmol) wird vorsichtig in 5 mL Trifluoressigsäure gelöst und für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbliche Lösung wird danach am Vakuum eingedunstet und der rot-braune Rückstand in 5 mL Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird dreimal mit Wasser extrahiert, die wässrigen Phasen vereint und das Lösungsmittel entfernt. **3** wird als beiger Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 359 mg, 1.25 mmol, 97 %.

**MS (ESI+)** = 287  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

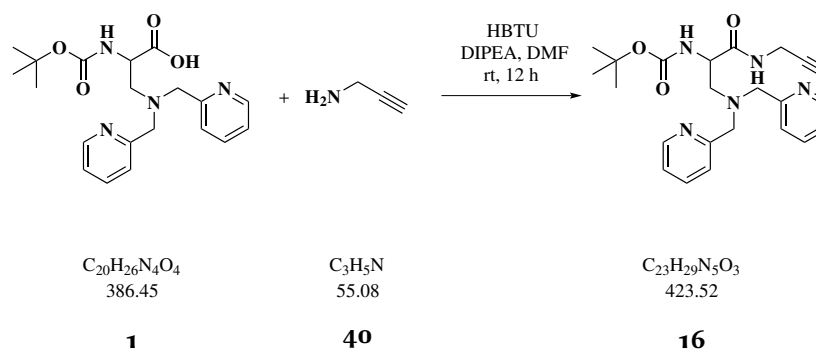
**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2$  ber. 287.15025, gef. 287.15025.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.18 (dd,  $^1J(\text{H}) = 15, 9 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{2a}$ ), 3.38 (dd,  $^1J(\text{H}) = 15, 5 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{2b}$ ), 3.94 (d,  $^1J(\text{H}) = 15 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_{3a}$ ), 4.03 (d,

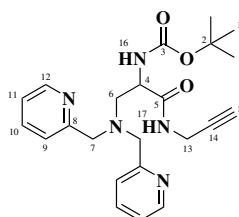
$^1J(\text{H}) = 15 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_3\text{b}$ ), 4.10 (dd,  $^1J(\text{H}) = 9, 5 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_1$ ), 7.32 (m, 4 H,  $\text{H}_5$ ,  $\text{H}_7$ ), 7.76 (dd,  $^1J(\text{H}) = 8, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_6$ ), 8.51 (dd,  $^1J(\text{H}) = 5, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_8$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 53.7 (CH, 1 C,  $\text{C}_1$ ), 57.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_2$ ), 60.4 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_3$ ), 124.3 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_7$ ), 125.4 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_5$ ), 139.7 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 148.9 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_8$ ), 158.9 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 171.7 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_9$ ).

***tert*-Butyl (3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)carbamate (16)**



Zu einer Lösung von 3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (**1**, 20.0 mg, 51.8  $\mu\text{mol}$ ) in 3 mL trockenem DMF werden 1.5 Äquivalenten Propargylamin (**40**, 4.3 mg, 77.6  $\mu\text{mol}$ , 5.0  $\mu\text{L}$ ) und 1 mL DIPEA zugegeben und die Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der braune ölige Rückstand in 10 mL Wasser aufgenommen und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Dann werde die vereinigten organischen Phasen zweimal mit wässriger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und einmal mit Wasser gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol, 10:1) ergibt **16** als bräunliches Öl.



**Ausbeute:** 18.0 mg, 42.5  $\mu\text{mol}$ , 82 %.



**MS (ESI+)** = 424 [M+H]<sup>+</sup>, 446 [M+Na]<sup>+</sup>, 869 [2M+Na]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI+)**: für C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> ber. 424.23432, gef. 424.23407,

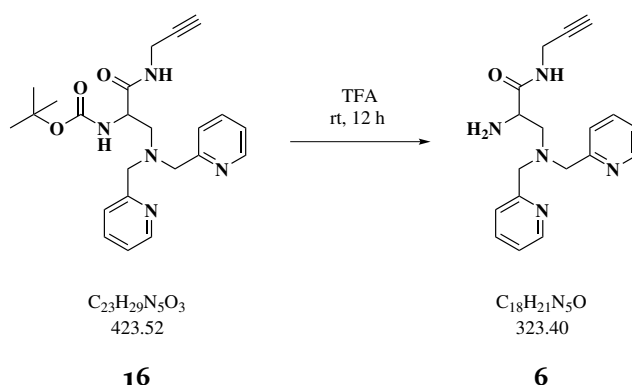
für C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> ber. 446.21626, gef. 446.21593, für C<sub>46</sub>H<sub>58</sub>N<sub>10</sub>NaO<sub>6</sub> ber.

896.44330, gef. 896.44223.

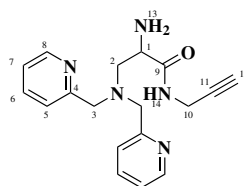
**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ (ppm) = 1.43 (s, 9 H, H<sub>1</sub>), 2.23 (m, 1 H, H<sub>15</sub>), 2.79 (t, <sup>1</sup>J(H) = 12 Hz, 1 H, H<sub>6a</sub>), 3.07 (dd, <sup>1</sup>J(H) = 12, 3 Hz, 1 H, H<sub>6b</sub>), 3.81 (d, <sup>1</sup>J(H) = 14 Hz, 2 H, H<sub>7a</sub>), 3.96 (ddd, <sup>1</sup>J(H) = 17, 4, 2 Hz, 1 H, H<sub>13a</sub>), 4.05 (d, <sup>1</sup>J(H) = 14 Hz, 2 H, H<sub>7b</sub>), 4.18 (m, 1 H, H<sub>13b</sub>), 4.27 (m, 1 H, H<sub>4</sub>), 6.05 (bs, 1 H, -N<sub>16</sub>), 7.12 (m, 2 H, H<sub>11</sub>), 7.17 (d, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 2 H, H<sub>9</sub>), 7.53 (t, <sup>1</sup>J(H) = 12 Hz, 2 H, H<sub>10</sub>), 8.56 (d, <sup>1</sup>J(H) = 4 Hz, 2 H, H<sub>12</sub>), 9.51 (bs, 1 H, -N<sub>17</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**: δ (ppm) = 28.5 (CH<sub>3</sub>, 2 C, C<sub>1</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>13</sub>), 52.2 (CH, 1 C, C<sub>4</sub>), 57.7 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>6</sub>), 60.4 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>7</sub>), 71.2 (C<sub>alkin</sub>, 1 C, C<sub>15</sub>), 122.3 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>11</sub>), 123.5 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>9</sub>), 136.5 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>10</sub>), 149.2 (CH<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>12</sub>), 155.7 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>3</sub>), 158.9 (C<sub>q</sub>, 2 C, C<sub>8</sub>), 170.9 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>5</sub>).

**2-Amino-3-(4-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-N-(prop-2-yn-1-yl)propanamid  
(6)**



In 2 mL Trifluoressigsäure wird *tert*-Butyl (3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)carbamat (**16**, 18.0 mg, 42.5 μmol) gelöst und für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und **6** als bräunliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 13.3 mg, 41.2  $\mu\text{mol}$ , 97 %.

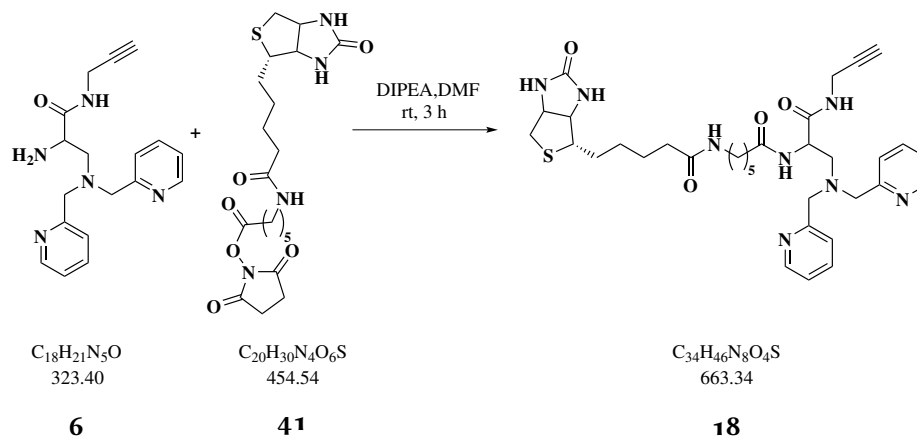
**MS (ESI+)** = 324 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI-):** für C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>5</sub>O ber. 324.18189, gef. 324.18222.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):  $\delta$  (ppm) = 2.95 (dd, <sup>1</sup>J(H) = 12, 6 Hz, 1 H, H<sub>2a</sub>), 3.09 (dd, <sup>1</sup>J(H) = 12, 6 Hz, 1 H, H<sub>2b</sub>), 3.24 (t, <sup>1</sup>J(H) = 3 Hz, 1 H, H<sub>12</sub>), 3.97 (m, 2 H, H<sub>10</sub>), 3.98 (s, 4 H, H<sub>3</sub>), 4.06 (m, 1 H, H<sub>1</sub>), 7.49 (m, 2 H, H<sub>7</sub>), 7.56 (d, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>5</sub>), 7.97 (t, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>6</sub>), 8.39 (bs, 2 H, H<sub>13</sub>), 8.63 (d, <sup>1</sup>J(H) = 5 Hz, 2 H, H<sub>8</sub>), 9.11 (t, <sup>1</sup>J(H) = 5 Hz, 1 H, H<sub>4</sub>).

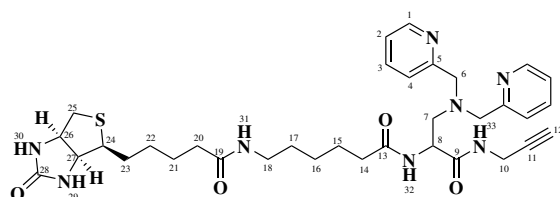
**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO):  $\delta$  (ppm) = 28.4 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>10</sub>), 51.1 (CH, 1 C, C<sub>1</sub>), 55.3 (CH<sub>2</sub>, 1 C, C<sub>2</sub>), 57.6 (CH<sub>2</sub>, 2 C, C<sub>3</sub>), 73.9 (C<sub>alkin</sub>, 1 C, C<sub>12</sub>), 80.2 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>11</sub>), 123.5 (CH<sub>arom.</sub>, C<sub>7</sub>), 124.4 (CH<sub>arom.</sub>, C<sub>5</sub>), 139.7 (CH<sub>arom.</sub>, C<sub>6</sub>), 146.7 (CH<sub>arom.</sub>, C<sub>8</sub>), 156.7 (C<sub>q</sub>, 2 C, C<sub>4</sub>), 167.2 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>9</sub>).

***N*-(3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxo-1-(prop-2-yn-1-ylamino)propan-2-yl)-6-(5-((3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanamid (18)**



Zu einer Lösung von 2-Amino-3-(4-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-*N*-(prop-2-yn-1-yl)propanamid (**6**, 10 mg, 30.9  $\mu\text{mol}$ ) in 2 mL trockenem DMF werden unter Argonatmosphäre 2 Äquivalente 2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 6-(5-((4*S*)-2-

oxohexahydro-1H-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)pentanamido)hexanoat (**41**, 28.1 mg, 61.8  $\mu\text{mol}$ ) sowie 500  $\mu\text{L}$  DIPEA zugegeben und bei Raumtemperatur für 3 Stunden gerührt. Danach wird mit 2 mL Wasser gequenched und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige braune Rückstand wird in 5 mL Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Das braune Rohprodukt wird säulenchromatographisch auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) aufgereinigt. **18** wird als braunes Öl erhalten.



**Ausbeute:** 15.6 mg, 24.1  $\mu\text{mol}$ , 78 %.

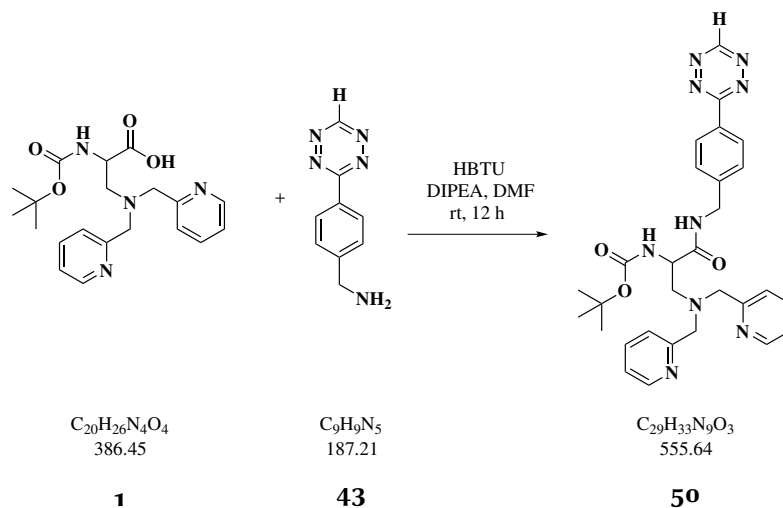
**MS (ESI+)** = 663  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_8\text{O}_4\text{S}$  ber. 663.34355, gef. 663.34457.

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.35 (m, 2 H,  $\text{H}_{16}$ ), 1.42 (m, 2 H,  $\text{H}_{22}$ ), 1.58 (m, 1 H,  $\text{H}_{23\text{a}}$ ), 1.62 (m, 2 H,  $\text{H}_{21}$ ), 1.64 (m, 2 H,  $\text{H}_{15}$ ), 1.73 (m, 1 H,  $\text{H}_{23\text{b}}$ ), 2.20 (m, 2 H,  $\text{H}_{14}$ ), 2.27 (m, 2 H,  $\text{H}_{20}$ ), 2.64 (t,  $^1J(\text{H}) = 3 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_{12}$ ), 2.70 (m, 1 H,  $\text{H}_{25\text{a}}$ ), 2.84 (m, 1 H,  $\text{H}_{7\text{a}}$ ), 2.92 (m, 1 H,  $\text{H}_{25\text{b}}$ ), 2.98 (m, 1 H,  $\text{H}_{7\text{b}}$ ), 3.16 (m, 2 H,  $\text{H}_{17}$ ), 3.20 (m, 1 H,  $\text{H}_{24}$ ), 3.80 (d,  $^1J(\text{H}) = 14 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_6\text{b}$ ), 3.96 (d,  $^1J(\text{H}) = 14 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_6\text{a}$ ), 3.98 (m, 2 H,  $\text{H}_{10}$ ), 4.30 (m, 1 H,  $\text{H}_{27}$ ), 4.49 (m, 1 H,  $\text{H}_{26}$ ), 4.56 (dd,  $^1J(\text{H}) = 6, 7 \text{ Hz}$ , 1 H,  $\text{H}_8$ ), 7.30 (m, 2 H,  $\text{H}_2$ ), 7.48 (d,  $^1J(\text{H}) = 8 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_4$ ), 7.77 (td,  $^1J(\text{H}) = 8, 2 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_3$ ), 8.51 (d,  $^1J(\text{H}) = 4 \text{ Hz}$ , 2 H,  $\text{H}_1$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 26.4 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{21}$ ), 26.9 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{15}$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{16}$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{23}$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{22}$ ), 36.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{20}$ ), 36.8 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{14}$ ), 40.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{17}$ ), 41.0 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{25}$ ), 53.0 (CH, 1 C,  $\text{C}_8$ ), 57.0 (CH, 1 C,  $\text{C}_{24}$ ), 57.8 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 61.1 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 61.6 (CH, 1 C,  $\text{C}_{26}$ ), 63.4 (CH, 1 C,  $\text{C}_{27}$ ), 72.6 ( $\text{CH}_{\text{alkin}}$ , 1 C,  $\text{C}_{12}$ ), 124.0 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_2$ ), 125.2 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 138.8 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_3$ ), 149.7 ( $\text{CH}_{\text{arom}}$ , 2 C,  $\text{C}_1$ ).

***tert*-Butyl (1-((4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamat (50)**



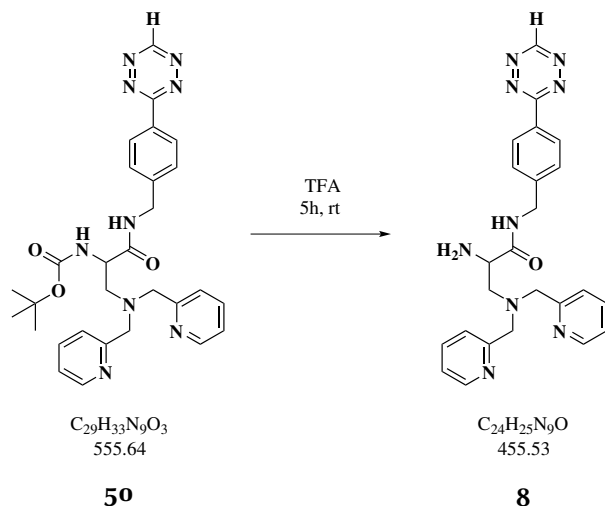
Zu einer Lösung von 3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)-amino)propansäure (**1**, 50 mg, 129  $\mu\text{mol}$ ) in 3 mL trockenem DMF werden ein Äquivalent (4-(1,2,4,5-Tetrazin-3-yl)phenyl)methanamin (**43**, 24 mg, 129  $\mu\text{mol}$ ) sowie 1.5 Äquivalente HBTU (108 mg, 194  $\mu\text{mol}$ ) sowie 1 mL DIPEA zugegeben und die rötliche Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der rote ölige Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) aufgereinigt. **50** wird als rotes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 53 mg, 95  $\mu\text{mol}$ , 74 %.

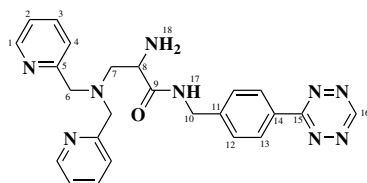
**MS (ESI+)** = 556  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_9\text{O}_3$  ber. 556.27791, gef. 556.27862, für  $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{NaO}_3$  ber. 578.25986, gef. 578.26038.

***N*-(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)-2-amino-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)propanamid  
(8)**



*tert*-Butyl (1-((4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamat (**44**, 40 mg, 72  $\mu\text{mol}$ ) werden in 3 mL TFA gelöst und bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen und viermal mit wenig Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen werden im Vakuum eingedampft. **9** wird als rotes Öl erhalten.



**Ausbeute:** 30 mg, 66  $\mu\text{mol}$ , 97 %.

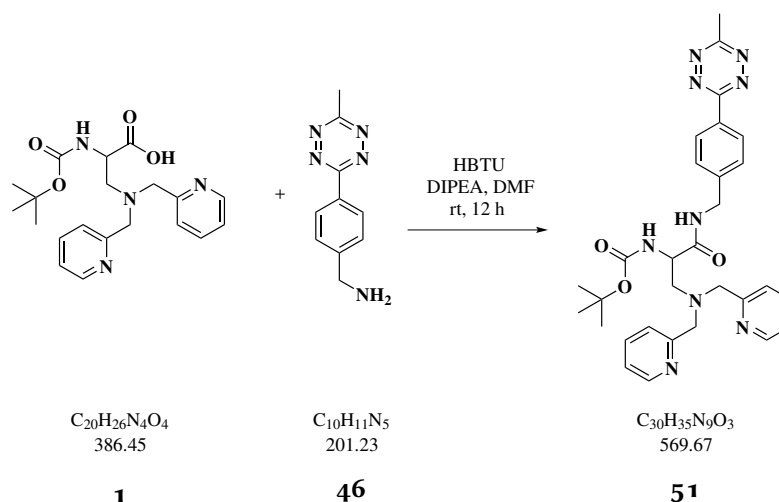
**MS (ESI+)** = 456 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_9\text{O}$  ber. 456.22548, gef. 456.22644.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  (ppm) = 3.20 (dd, <sup>1</sup>*J*(H) = 14, 8 Hz, 1 H, H<sub>7a</sub>), 3.38 (dd, <sup>1</sup>*J*(H) = 14, 5 Hz, 1 H, H<sub>7b</sub>), 4.02 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 16 Hz, 2 H, H<sub>6a</sub>), 4.20 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 16 Hz, 2 H, H<sub>6b</sub>), 4.29 (dd, <sup>1</sup>*J*(H) = 5, 2 Hz, 1 H, H<sub>8</sub>), 4.52 (m, 2 H, H<sub>10</sub>), 7.60 (m, 4 H, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>), 7.59 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>12</sub>), 8.09 (m, 2 H, H<sub>3</sub>), 8.51 (d, <sup>1</sup>*J*(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>13</sub>), 8.67 (m, 2 H, H<sub>1</sub>), 10.35 (s, 1 H, H<sub>16</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  (ppm) = 44.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 53.4 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_8$ ), 57.8 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 58.9 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 125.8 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_2$ ), 126.9 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 129.4 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{13}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ), 132.7 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{14}$ ), 143.4 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_3$ ), 144.5 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{11}$ ), 146.4 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_1$ ), 156.4 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_5$ ), 159.4 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 1 C,  $\text{C}_{16}$ ), 168.8 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{15}$ ).

***tert*-Butyl(3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-((4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamat (51)**



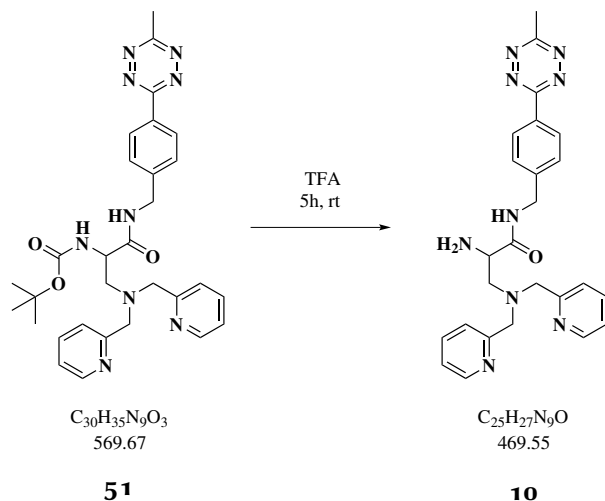
In 3 mL trockenem DMF werden 3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (**1**, 78 mg, 202  $\mu\text{mol}$ ) und ein Äquivalent (4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)methanamin (**46**, 50 mg, 202  $\mu\text{mol}$ ) und zwei Äquivalente HBTU (115 mg, 303  $\mu\text{mol}$ ) gelöst. Nach Zugabe von 1 mL DIPEA wird die rötliche Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das rötliche Öl säulenchromatographisch auf Kieselgel (Dichlormethan: Methanol 10:1) aufgereinigt. **51** wird als rötliches Öl erhalten.

**Ausbeute:** 75 mg, 131  $\mu\text{mol}$ , 65 %.

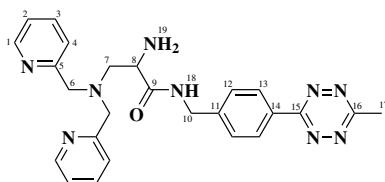
**MS (ESI+)** = 570  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 592  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_9\text{O}_3$  ber. 570.29356, gef. 570.29370, für  $\text{C}_{30}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{NaO}_3$  ber. 592.27551, gef. 592.27569.

**2-Amino-6-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-N-(4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)hexanamid  
(10)**



In 3 mL Trifluoressigsäure wird *tert*-Butyl(3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-((4-(6-methyl-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)benzyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (**51**, 70 mg, 123  $\mu\text{mol}$ ) gelöst und für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird **10** als rotes Öl erhalten.



**Ausbeute:** 55 mg, 117  $\mu\text{mol}$ , 95 %.

**MS (ESI+)** = 470  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

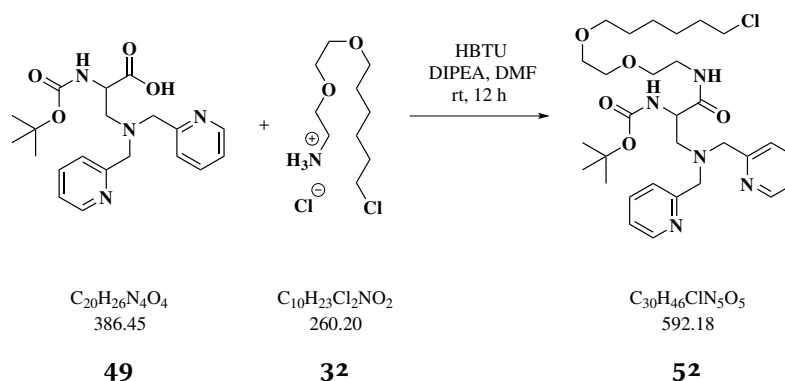
**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_9\text{O}$  ber. 470.24133, gef. 470.24169.

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 3.04 (s, 3 H,  $\text{H}_{17}$ ), 3.15 (m, 1 H,  $\text{H}_{7a}$ ), 3.38 (m, 1 H,  $\text{H}_{7b}$ ), 4.02 (d,  $^1J(\text{H}) = 15$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{6a}$ ), 4.18 (d,  $^1J(\text{H}) = 15$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{6b}$ ), 4.28 (m, 1 H,  $\text{H}_8$ ), 4.55 (s, 2 H,  $\text{H}_{10}$ ), 7.58 (m, 6 H,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_4$ ,  $\text{H}_{12}$ ), 8.06 (t,  $^1J(\text{H}) = 8$  Hz, 2 H,  $\text{H}_3$ ), 8.46 (d,  $^1J(\text{H}) = 8$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{13}$ ), 8.65 (m, 2 H,  $\text{H}_1$ ).

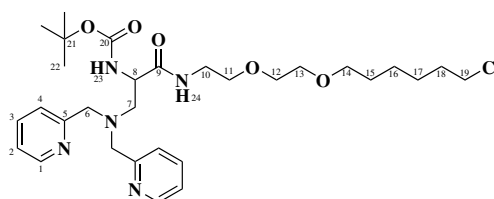
**$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 21.1 ( $\text{CH}_3$ , 1 C,  $\text{C}_{17}$ ), 44.1 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 53.3 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_8$ ), 57.8 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 59.0 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 125.7 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_2$ ), 126.8 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 129.0 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{13}$ ), 129.7 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ), 132.7

(C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>14</sub>), 143.1 (C<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>3</sub>), 144.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>11</sub>), 146.6 (C<sub>arom.</sub>, 2 C, C<sub>1</sub>), 156.6 (C<sub>q</sub>, 2 C, C<sub>5</sub>), 165.1 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>15</sub>), 168.8 (C<sub>q</sub>, 1 C, C<sub>16</sub>).

***tert*-Butyl(18-chloro-5-oxo-1-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylmethyl)-9,12-dioxa-2,6-diazaoctadecan-4-yl)carbamat (52)**



Eine Lösung von 3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoäure (**1**, 60 mg, 155  $\mu$ mol) und 1.2 Äquivalenten 2-((6-Chlorohexyl)oxy)ethan-1-ammoniumchlorid (**32**, 48 mg, 186  $\mu$ mol) in trockenem DMF (3 mL) wird mit 1.5 Äquivalenten HBTU (88 mg, 233  $\mu$ mol) und DIPEA (1 mL) versetzt. Die bräunliche Lösung wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der braune Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird **52** als bräunliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 65 mg, 110  $\mu$ mol, 71 %.

**MS (ESI+)** = 592 [M+H]<sup>+</sup>, 614 [M+Na]<sup>+</sup>, 630 [M+K]<sup>+</sup>.

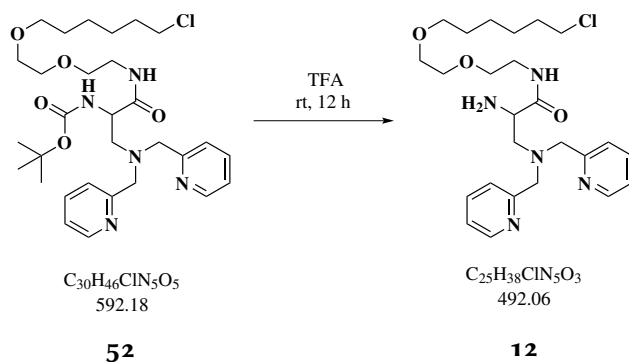


**HR-MS (ESI+):** für  $C_{30}H_{47}^{35}ClN_5O_5$  ber. 592.32602, gef. 592.32678,  
für  $C_{30}H_{46}^{35}ClN_5NaO_5$  ber. 614.30797, gef. 614.30876, für  $C_{30}H_{46}^{35}ClKN_5O_5$  ber.  
630.28191, gef. 630.28274.

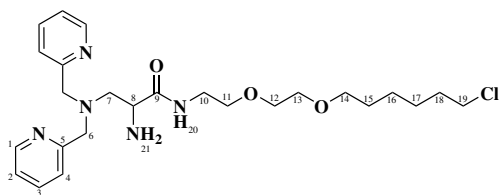
**$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.34 (m, 2 H,  $H_{16}$ ), 1.41 (m, 2 H,  $H_{17}$ ), 1.43 (s, 9 H,  $H_{22}$ ), 1.57 (m, 2 H,  $H_{15}$ ), 1.75 (m, 2 H,  $H_{18}$ ), 3.05 (dd,  $^1J(H) = 12, 6$  Hz, 1 H,  $H_{7a}$ ), 3.16 (m, 1 H,  $H_{7b}$ ), 3.37 (m, 1 H,  $H_{10a}$ ), 3.42 (t,  $^1J(H) = 7$  Hz, 2 H,  $H_{14}$ ), 3.48 (m, 1 H,  $H_{10a}$ ), 3.52 (m, 2 H,  $H_{19}$ ), 3.53 (m, 4 H,  $H_{11}, H_{12}$ ), 3.58 (m, 2 H,  $H_{13}$ ), 4.07 (d,  $^1J(H) = 15$  Hz, 2 H,  $H_{6a}$ ), 4.17 (d,  $^1J(H) = 15$  Hz, 2 H,  $H_{6b}$ ), 4.36 (m, 1 H,  $H_8$ ), 6.61 (bs, 1 H, -NH), 7.32 (t,  $^1J(H) = 12$  Hz, 2 H,  $H_2$ ), 7.47 (d,  $^1J(H) = 7$  Hz, 2 H,  $H_4$ ), 7.79 (td,  $^1J(H) = 7, 2$  Hz, 2 H,  $H_3$ ), 8.17 (bs, 1 H, -NH), 8.69 (s,  $^1J(H) = 4$  Hz, 2 H,  $H_1$ ).

**$^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ ):**  $\delta$  (ppm) = 25.5 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{16}$ ), 26.8 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{17}$ ), 28.5 ( $CH_3$ , 3 C,  $C_{22}$ ), 29.6 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{15}$ ), 32.6 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{18}$ ), 39.5 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{10}$ ), 45.2 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{19}$ ), 53.6 (CH, 1 C,  $C_8$ ), 57.4 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_7$ ), 58.8 ( $CH_2$ , 2 C,  $C_6$ ), 69.9 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{11}$ ), 70.1 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{12}$ ), 70.4 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{13}$ ), 71.4 ( $CH_2$ , 1 C,  $C_{14}$ ), 79.9 ( $C_q$ , 1 C,  $C_{21}$ ), 123.5 ( $C_{arom.}$ , 2 C,  $C_2$ ), 125.0 ( $C_{arom.}$ , 2 C,  $C_4$ ), 139.4 ( $C_{arom.}$ , 2 C,  $C_3$ ), 147.1 ( $C_{arom.}$ , 2 C,  $C_1$ ), 156.4 ( $C_q$ , 1 C,  $C_{20}$ ), 162.7 ( $C_q$ , 2 C,  $C_5$ ), 171.1 ( $C_q$ , 1 C,  $C_9$ ).

**2-Amino-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-N-(2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethyl)propanamid  
(12)**



Eine Lösung von *tert*-Butyl(18-chloro-5-oxo-1-(pyridin-2-yl)-2-(pyridin-2-ylmethyl)-9,12-dioxa-2,6-diazaoctadecan-4-yl)carbamat (**52**, 60 mg, 101  $\mu$ mol) in 2 mL Trifluoressigsäure wird für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und **12** als bräunliches Öl erhalten.



**Ausbeute:** 49 mg, 99  $\mu\text{mol}$ , 98 %.

**MS (ESI+)** = 492  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

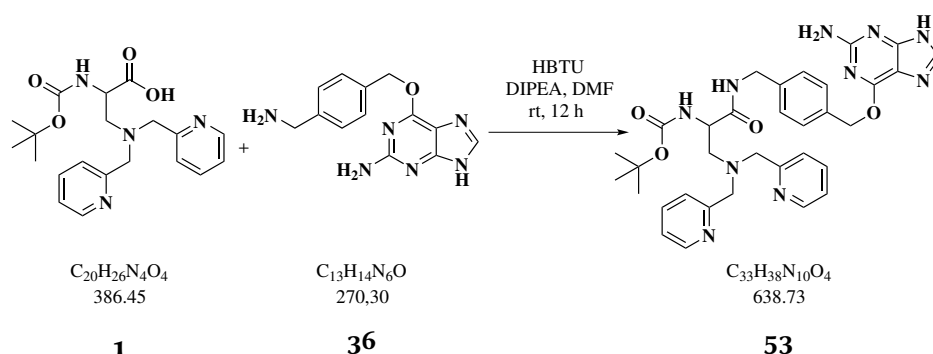
**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}^{35}\text{ClN}_5\text{O}_3$  ber. 492.27359, gef. 492.27464,

für  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}^{37}\text{ClN}_5\text{O}_3$  ber. 494.27064, gef. 494.27180.

**$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 1.37 (m, 2 H,  $\text{H}_{16}$ ), 1.45 (m, 2 H,  $\text{H}_{17}$ ), 1.57 (m, 2 H,  $\text{H}_{15}$ ), 1.75 (m, 2 H,  $\text{H}_{18}$ ), 3.15 (dd,  $^1J(\text{H}) = 14, 8$  Hz, 1 H,  $\text{H}_{7a}$ ), 3.31 (m, 1 H,  $\text{H}_{7b}$ ), 3.43 (t,  $^1J(\text{H}) = 5$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{10}$ ), 3.46 (t,  $^1J(\text{H}) = 7$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{14}$ ), 3.54 (t,  $^1J(\text{H}) = 7$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{19}$ ), 3.57 (m, 2 H,  $\text{H}_{11}$ ), 3.59 (m, 4 H,  $\text{H}_{12}$ ,  $\text{H}_{13}$ ), 4.08 (d,  $^1J(\text{H}) = 15$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{6a}$ ), 4.16 (dd,  $^1J(\text{H}) = 8, 5$  Hz, 2 H,  $\text{H}_8$ ), 4.19 (d,  $^1J(\text{H}) = 15$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{6b}$ ), 7.57 (d,  $^1J(\text{H}) = 5$  Hz, 2 H,  $\text{H}_2$ ), 7.58 (d,  $^1J(\text{H}) = 8$  Hz, 2 H,  $\text{H}_4$ ), 8.06 (td,  $^1J(\text{H}) = 8, 2$  Hz, 2 H,  $\text{H}_3$ ), 8.68 (d,  $^1J(\text{H}) = 5$  Hz, 2 H,  $\text{H}_1$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):**  $\delta$  (ppm) = 26.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{16}$ ), 27.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{17}$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{15}$ ), 33.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{18}$ ), 40.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 45.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{19}$ ), 53.2 (CH, 1 C,  $\text{C}_8$ ), 57.7 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 59.2 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 70.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{11}$ ), 71.2 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ,  $\text{C}_{13}$ ), 72.2 ( $\text{CH}_2$ , 1 C,  $\text{C}_{14}$ ), 125.6 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_2$ ), 126.6 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_4$ ), 142.8 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_3$ ), 147.0 ( $\text{C}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_1$ ), 157.0 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_5$ ), 168.8 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_9$ ).

***tert*-Butyl(1-((4-(((2-amino-9*H*-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)-amino)-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-carbammat (53)**



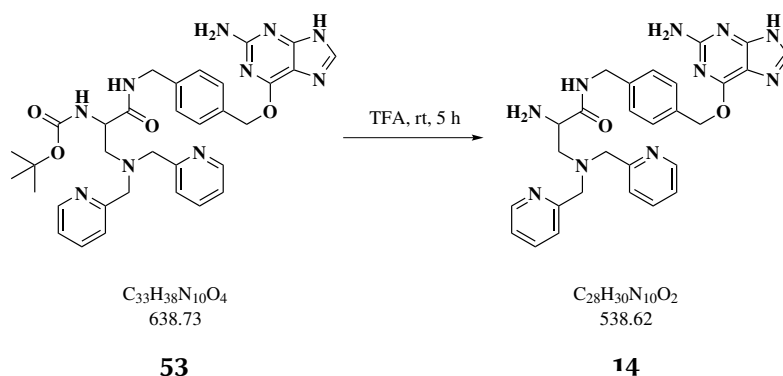
3-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-propansäure (**1**, 50 mg, 129  $\mu\text{mol}$ ) wird in 3 mL trockenem DMF gelöst. Dazu werden 1.2 Äquivalente *O*<sup>6</sup>-(4-Aminomethyl-benzyl)guanin (**36**, 42 mg, 155  $\mu\text{mol}$ ), 1.5 Äquivalente HBTU (73 mg, 194  $\mu\text{mol}$ ) und DIPEA (1 mL) gegeben und die bräunliche Lösung für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der braune Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wird auf Kieselgel (Dichlormethan:Methanol 10:1) aufgereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird **53** als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 51 mg, 80  $\mu\text{mol}$ , 62 %.

**MS (ESI+)** = 639  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 661  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_{10}\text{O}_4$  ber. 639.31503, gef. 639.31649,  
für  $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{NaN}_{10}\text{O}_4$  ber. 661.29697, gef. 661.29864.

**2-Amino-N-(4-(((2-amino-9H-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)propanamid  
(14)**



In 2 mL Trifluoressigsäure wird *tert*-Butyl(1-((4-(((2-amino-9H-purin-6-yl)oxy)methyl)benzyl)amino)-3-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbammat (40 mg, 63  $\mu\text{mol}$ ) gelöst und bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand in wenig Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit wenig Wasser extrahiert. Die vereinten wässrigen Phasen werden im Vakuum eingedunstet. **14** wird als braunes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 33 mg, 61  $\mu\text{mol}$ , 97 %.

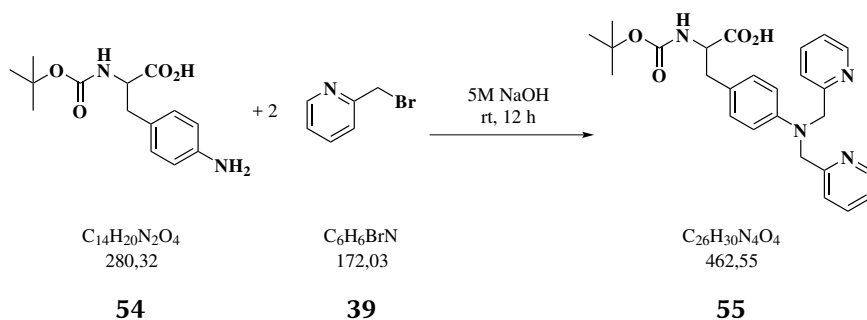
**MS (ESI+)** = 523  $[\text{M}-\text{NH}]^+$ .

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{23}H_{28}N_5O_2$  ber. 406.22375, gef. 406.22459, für  $C_{28}H_{29}N_9O_2$  ber. 523.24442, gef. 523.25749.

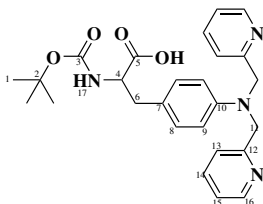
### 6.3. Funktionalisierung von *p*-Amino-Phenylalanin

#### 3-(4-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-2-((*tert*-butoxy-carbonyl)amino)propansäure

(55)



Eine Lösung von 3-(4-Aminophenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propansäure (**54**, 500 mg, 1.78 mmol) in 10 mL 5 M NaOH-Lösung wird langsam mit 2.5 Äquivalente 2-(Bromomethyl)pyridin (**39**, 1.13 g) versetzt. Die Reaktionsmischung färbt sich tief rot und wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der rot-bräunliche Rückstand wird säulenchromatographisch auf Kieselgel aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol, 10:1). Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. **55** wird als brauner Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 582 mg, 1.3 mmol, 71 %.

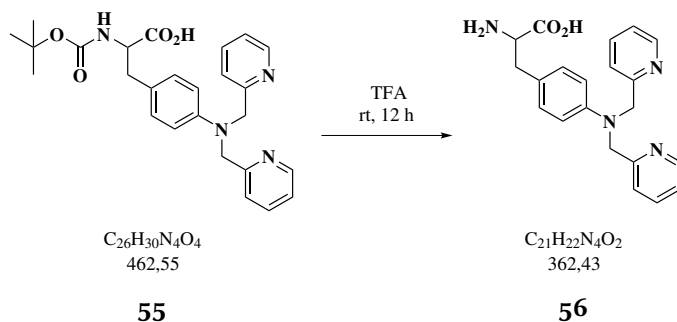
**MS (DART+)** = 463 [M+H]<sup>+</sup>.

**HR-MS (DART+):** für  $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_4$  ber. 463.23398, gef. 463.23398.

**<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) = 1.42 (s, 9 H, H<sub>1</sub>), 3.06 (m, 2 H, H<sub>6</sub>), 4.51 (m, 1 H, H<sub>4</sub>), 4.77 (s, 4 H, H<sub>11</sub>), 5.11 (d, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 1 H, H<sub>17</sub>), 6.54 (d, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 2 H, H<sub>9</sub>), 6.99 (d, <sup>1</sup>J(H) = 7 Hz, 2 H, H<sub>8</sub>), 7.20 (m, 2 H, H<sub>15</sub>), 7.25 (m, 2 H, H<sub>13</sub>), 7.64 (t, <sup>1</sup>J(H) = 8 Hz, 2 H, H<sub>14</sub>), 8.57 (d, <sup>1</sup>J(H) = 5 Hz, 2 H, H<sub>16</sub>).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 28.50 ( $\text{CH}_3$ , 3 C,  $\text{C}_1$ ), 37.06 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_6$ ), 54.61 ( $\text{CH}$ , 1 C,  $\text{C}_4$ ), 56.56 ( $\text{CH}_2$ , 2 C,  $\text{C}_{11}$ ), 79.70 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_2$ ), 112.58 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_9$ ), 121.60 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{15}$ ), 122.67 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{13}$ ), 125.56 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_7$ ), 130.80 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_8$ ), 138.18 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{14}$ ), 146.76 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_{10}$ ), 148.60 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , 2 C,  $\text{C}_{16}$ ), 155.45 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_3$ ), 158.37 ( $\text{C}_q$ , 2 C,  $\text{C}_{12}$ ), 174.27 ( $\text{C}_q$ , 1 C,  $\text{C}_5$ ).

### 2-Amino-3-(4-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)propansäure (56)



In 3 mL Trifluoressigsäure wird 3-(4-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-2-((*tert*-butoxy-carbonyl)amino)propansäure (**55**, 325 mg, 703  $\mu\text{mol}$ ) für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbliche Lösung wird danach am Vakuum eingengt und der Rückstand in 5 mL Dichlormethan gelöst. Die Lösung wird dreimal mit Wasser extrahiert, die wässrigen Phasen vereint und das Lösungsmittel entfernt. **56** wird als gelblicher Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 247 mg, 682  $\mu\text{mol}$ , 97 %.

**MS (ESI+)** = 363  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

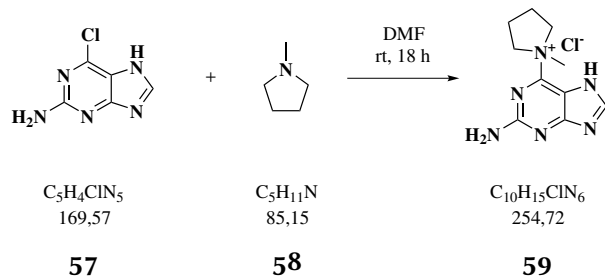
**HR-MS (ESI-):** für  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_2$  ber. 361.16700, gef. 361.16698.

## 6.4. Synthese von Linkern

### 6.4.1. Synthese von *O*<sup>6</sup>-(4-Aminomethyl-benzyl)guanin

Die Synthese von *O*<sup>6</sup>-(4-Aminomethyl-benzyl)guanin wurde nach der Literaturvorschrift von KAI JOHANSSON *et al.* durchgeführt.<sup>[109]</sup>

#### 1-(2-Amino-7*H*-purin6yl)-1-methyl-pyrrolidiniumchlorid (59)



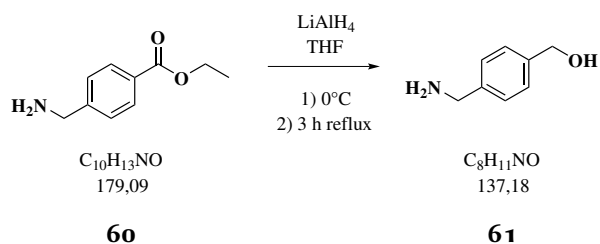
6-Chloro-guanin (**57**, 1.0 g, 5.9 mmol) und 2,3 Äquivalente 1-Methyl-pyrrolidin (**58**, 1.4 mL, 13.2 mmol) werden in 40 mL DMF bei 40 °C gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Lösung für 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei fällt ein weißes Pulver aus, was durch Zugabe von 5 mL Aceton vervollständigt wird. Der Feststoff wird abfiltriert, zweimal mit je 5 mL Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. **59** wird als weißes Pulver erhalten.

**Ausbeute:** 850 mg, 3.4 mmol, 57 %.

**MS (ESI+)** = 255 [M+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, **D<sub>2</sub>O**): δ (ppm) = 2.07 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>,Pyrrolidin), 2.22 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>,Pyrrolidin), 3.55 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 3.85 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>), 4.70 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>), 8.12 (s, 1 H).

#### 4-(Aminomethyl)-benzylalkohol (61)



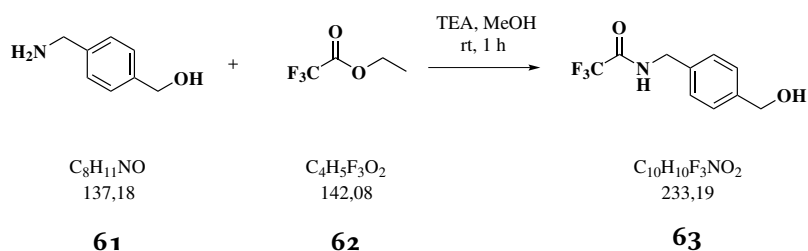
Es werden 2.5 Äquivalente in wasserfreiem THF gelöstes  $\text{LiAlH}_4$  (1 M, 28 mL, 76.3 mmol) vorgelegt und auf  $0^\circ\text{C}$  gekühlt. Dazu gibt man langsam eine Lösung von einem Äquivalent Ethyl-4-(aminomethyl)-benzoate-hydrochlorid (**60**, 2.0 g, 11.2 mmol) in 10 mL THF. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur gebracht und dann für drei Stunden unter Rückfluss gerührt. Nach vorsichtiger Zugabe von 3 mL Wasser, 5 mL einer 5 M wässrigen NaOH-Lösung und weiteren 3 mL Wasser wird die organische Phase dekantiert und die wässrige Phase mit THF und Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden mit  $\text{NaSO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **61** wird als beiger, wachsartiger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.38 g, 10.8 mmol, 90 %.

**MS (ESI+)** = 138  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.65 (s, 3 H,  $\text{NH}_2$ , OH), 3.86 (s, 2 H,  $\text{N-CH}_2$ ), 4.67 (s, 2 H,  $\text{O-CH}_2$ ), 7.32 (m, 4 H,  $\text{HC}_{\text{Arom.}}$ ).

### 2,2,2-Trifluoro-*N*-(4-hydroxymethyl-benzyl)-acetamid (**63**)



Zur Lösung von 4-Amino-benzylalkohol (**61**, 1.0 g, 7.3 mmol) und 1.01 mL Triethylamin in 15 mL wasserfreiem Methanol werden 1.3 Äquivalente Ethyl-trifluoroacetat (**62**, 1.13 mL, 9.5 mmol) langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und schließlich mit 10 mL Ethylacetat und 10 mL Wasser versetzt. Die wässrige Phase wird dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit  $\text{NaSO}_4$  getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wird der Rückstand säulenchromatographisch aufgetrennt (Petrolether, dann Petrolether:Ethylacetat 3:1), danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. **63** wird als weißes Pulver erhalten.

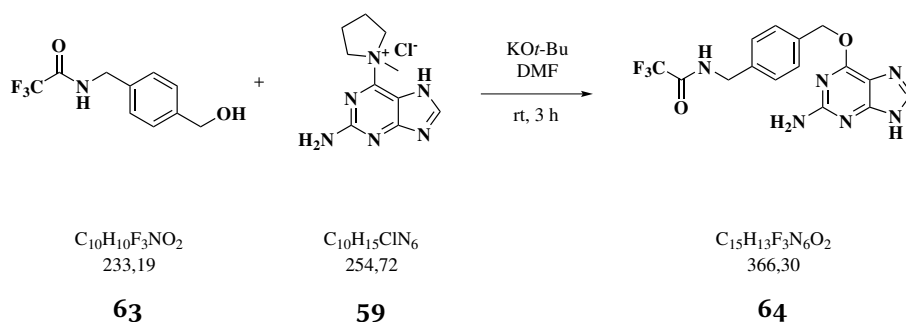
**Ausbeute:** 1.53 g, 6.6 mmol, 91 %.

**MS (ESI+)** = 234  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.66 (s, 1 H, OH), 4.57 (d, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.74 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 6.54 (s, 1 H,  $\text{NH-CO}$ ), 7.34 (dd, 4 H,  $\text{H}_{\text{Arom.}}$ ).

***N*-[4-(2-Amino-9*H*-purin-6-yloxymethyl)-benzyl]-2,2,2-tri-fluoro-acetamid  
(64)**



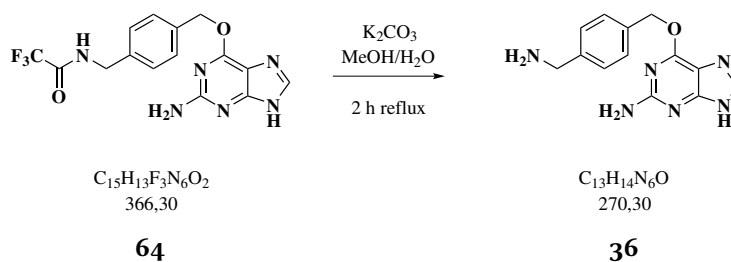
In 20 mL trockenem DMF werden 2.15 Äquivalente 2,2,2-Trifluoro-*N*-(4-hydroxymethyl-benzyl)-acetamid (**63**, 1.51 g, 6.5 mmol) sowie 4.5 Äquivalente Kalium-*tert*-Butanolat (1.52 g, 13.5 mmol) unter Argonatmosphäre gelöst. Dazu gibt man vorsichtig ein Äquivalent 1-(2-Amino-7*H*-purin-6-yl)-1-methyl-pyrrolidiniumchlorid (**59**, 770 mg, 3.0 mmol) und rührt unter Argon für 3 Stunden. Dann wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgetrennt (Methanol:Dichlormethan 1:50, dann 1:10). **64** wird als weißer, wachsartiger Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 945 mg, 2.6 mmol, 86 %.

**MS (ESI+):** 367  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 4.38 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 5.45 (s, 2 H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 6.28 (s, 2 H,  $\text{NH}_2$ ), 7.23 (d,  $J = 8.1$  Hz, 3 H,  $\text{H}_{\text{Arom.}}$ ), 7.43 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{\text{Arom.}}$ ), 7.81 (s, 1 H), 10.02 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1 H,  $\text{NH-CO}$ ) 12.42 (s, 1 H).

$^{19}\text{F-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) =  $-77.28$  ( $\text{CF}_3\text{-CO}_2$ ).

***O*<sup>6</sup>-(4-Aminomethyl-benzyl)guanin (36)**

*N*[4-(2-Amino-9*H*-purin-6-yloxymethyl)-benzyl]-2,2,2-tri-fluoro-acetamid (**64**, 800 mg, 2.2 mmol) wird in 34 mL Methanol und 2 mL Wasser suspendiert. Nach Zugabe von  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.5 g) wird die Mischung für 2 Stunden unter Rückfluss gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan:Methanol:Triethylamin 5:1:0.5). **36** wird als weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 487 mg, 1.8 mmol, 82 %.

**MS (ESI+):** 271  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**HR-MS (ESI+)** = für  $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) ber. 271.13019, gef. 271.13042,

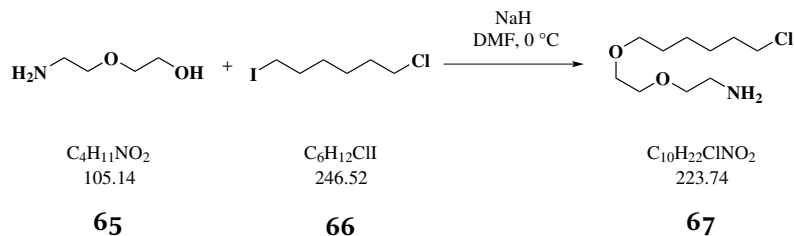
für  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_{12}\text{O}_2$  ( $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ) ber. 541.25309, gef. 541.25337.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 3.86 (s, 2 H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ), 5.48 (s, 2 H,  $\text{CH}_2-\text{O}$ ), 6.29 (s, 2 H,  $\text{NH}_{2,\text{Guanin}}$ ), 7.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{\text{Arom.}}$ ), 7.49 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H,  $\text{H}_{\text{Arom.}}$ ), 7.83 (s, 1 H).

### 6.4.2. Synthese des Halo-Tag® Liganden

Die Synthese des Liganden für das Halo-Tag® wurde in Anlehnung an die Literaturvorschrift von GREGORYI LOS *et al.* durchgeführt.<sup>[108]</sup>

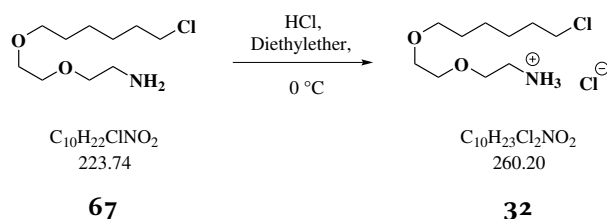
#### 2-(2-((6-chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethan-1-amin (67)



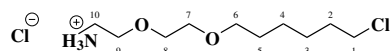
Eine Suspension von 1.2 Äquivalenten NaH (1.77 g, 44.2 mmol) in 30 mL trockenem DMF wird unter Argonatmosphäre im Eisbad gerührt. Dazu wird ein Äquivalent 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (**65**, 3.7 mL, 36.8 mmol) vorsichtig zuge tropft und die Lösung für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Dann werden 1.1 Äquivalente 1-Chloro-6-Iodohexan (**66**, 10.0 g, 40.5 mmol) in 30 mL trockenem DMF langsam zuge tropft und die Reaktionsmischung für 4 Stunden im Eisbad gerührt. Danach wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und mit 50 mL gesättigter Natriumcarbonat-Lösung sowie mit 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. **67** wird als gelbliches Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung weiter verarbeitet.

**Ausbeute:** 4.88 g, 21.83 mmol, 49 %.

**2-(2-((6-Chlorohexyl)oxy)ethoxy)ethan-1-ammoniumchlorid  
(32)**



**67** wird ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Das gelbliche Öl wird in Dichlormethan (30 mL) gelöst und im Eisbad gekühlt. Dazu wird HCl (1 M in Diethylether, 30 mL) langsam zugetropft und die Lösung für 45 Minuten aus Eis gerührt. Nach entfernen des Lösungsmittels wird das entstandene gelbliche Öl säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM:MeOH:HCl·Ether 94:5:1). **32** wird als weißer, wachsartiger Feststoff erhalten.



**Ausbeute:** 5.05 g, 19.42 mmol, 89 %.

**MS (ESI+)** = 224 [ $\text{M}_{35}\text{Cl}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 226 [ $\text{M}_{37}\text{Cl}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>.

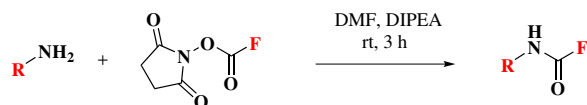
**HR-MS (ESI+)** = für  $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{NO}_2^{35}\text{Cl}$  ber. 224.14118, gef. 224.14142.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.36 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_4$ ), 1.45 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_3$ ), 1.60 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_5$ ), 1.78 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_2$ ), 3.25 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_{10}$ ), 3.48 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_6$ ), 3.53 (t, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_1$ ), 3.62 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_{7,8}$ ), 3.69 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_{7,8}$ ), 3.85 (bs, 2 H,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{H}_9$ ), 8.31 (bs, 3 H,  $\text{NH}_3^+$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 25.52 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_4$ ), 26.82 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_3$ ), 29.52 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_5$ ), 32.65 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_2$ ), 40.23 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{10}$ ), 45.27 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_1$ ), 67.03 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_9$ ), 70.16 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{7,8}$ ), 70.65 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_{7,8}$ ), 71.51 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_6$ ).

## 6.5. Markierungsmethoden

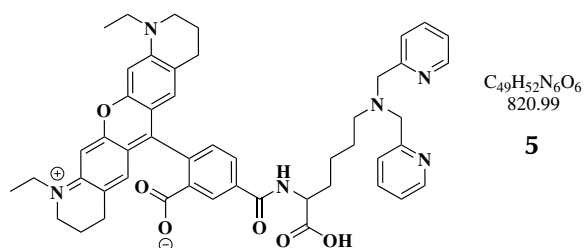
### 6.5.1. Farbstoffmarkierung via Aktivester



Die Markierung der Amin-funktionalisierten Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt über deren entsprechenden *N*-Hydroxysuccinimid-Ester, die käuflich erwerblich sind. Die jeweiligen Stammlösungen der Farbstoffe (**F**-NHS) in trockenem DMF ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) werden bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Sonden (**R**- $\text{NH}_2$ ) werden ebenfalls in DMF gelöst (etwa  $10 \text{ mM}$ ) und bis zur Verwendung ebenfalls bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Zu  $20 \mu\text{L}$  der Sonden-Stammlösung werden  $20 \mu\text{L}$  der Farbstoff-Stammlösung,  $10 \mu\text{L}$  DIPEA und  $100 \mu\text{L}$  DMF gegeben. Die Reaktionsansätze werden für drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend auf der HPLC aufgereinigt.

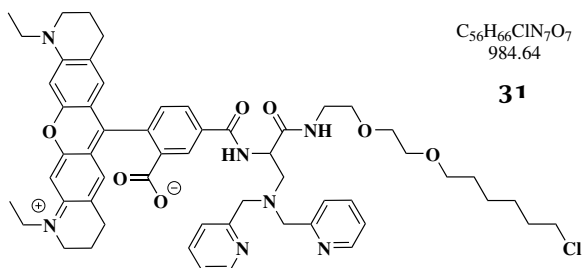
#### Reaktion von **4** mit Atto565-NHS (**5**)



**Ausbeute(HPLC):** 92 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{CuN}_6\text{O}_6$  ber. 882.3161, gef. 882.3179.

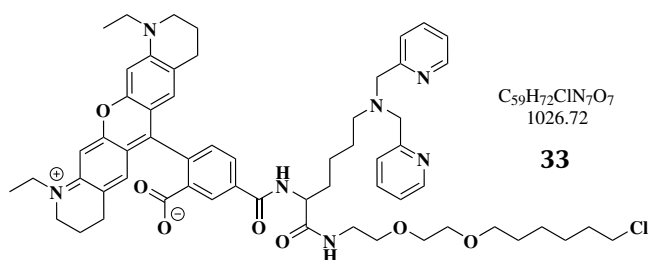
#### Reaktion von **12** mit Atto565-NHS (**31**)



**Ausbeute(HPLC):** 94 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{56}H_{67}^{35}ClN_7O_7$  ber. 984.47850, gef. 984.48019.

### Reaktion von 13 mit Atto565-NHS (33)

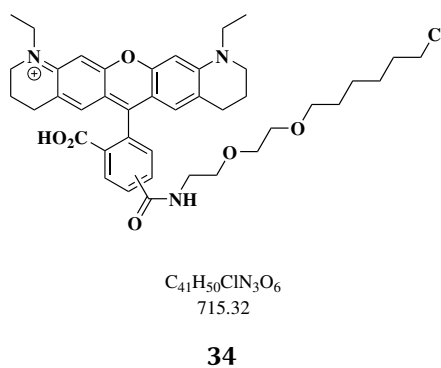


**Ausbeute(HPLC):** 93 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{59}H_{73}^{35}ClN_7O_7$  ber. 1026.52545, gef. 1026.52817.

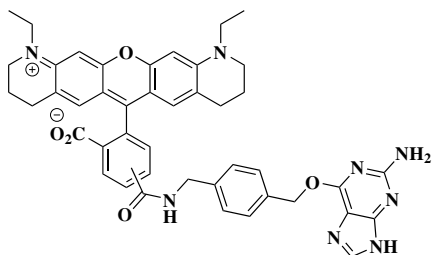
## 6.5.2. Synthese von Testsubstraten

### Synthese von Atto565-Halo (34)



**Ausbeute(HPLC):** 99 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{41}H_{51}^{35}ClN_3O_6$  ber. 716.34609, gef. 716.34663.

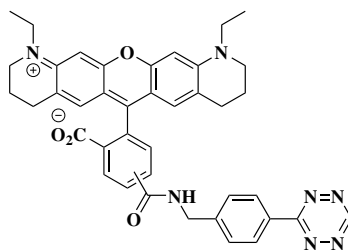
**Synthese von Atto565-Benzylguanin (68)**

$C_{44}H_{42}N_8O_5$   
762.87

**68**

**Ausbeute(HPLC):** 99 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{44}H_{43}N_8O_5$  ber. 763.33509, gef. 763.33613,  
für  $C_{44}H_{42}NaN_8O_5$  ber. 785.31704, gef. 785.31872.

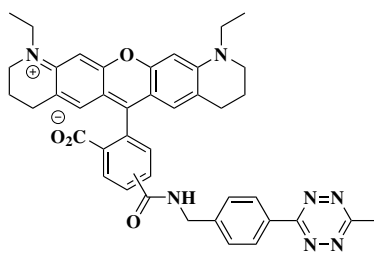
**Synthese von Atto565-Tetrazin (69)**

$C_{40}H_{37}N_7O_4$   
679.78

**69**

**Ausbeute(HPLC):** 94 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{40}H_{38}N_7O_4$  ber. 680.2980, gef. 680.2990.

**Synthese von Atto565-Methyl-Tetrazin (70)**

$C_{41}H_{39}N_7O_4$   
693.81

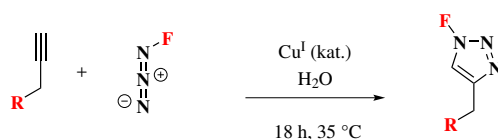
**70**

**Ausbeute(HPLC):** 93 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{41}H_{40}N_7O_4$  ber. 694.3136, gef. 694.3140.



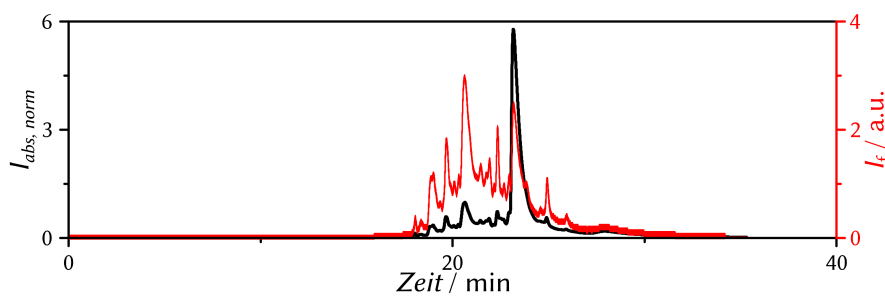
### 6.5.3. Farbstoffmarkierung durch Click-Reaktion



Die Alkin-funktionalisierten Sonden werden durch  $\text{Cu}^{\text{I}}$  katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition („Click-Reaktion“) mit den Azid-modifizierten Farbstoffen markiert. Die alkylierten Aminosäuren (**R**-Alkin) werden in DMF gelöst (10 mM). Die Azid-Farbstoffe werden in DMF gelöst ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Reaktion werden  $20 \mu\text{L}$  der Aminosäuren-Stammlösung mit  $20 \mu\text{L}$  der Farbstoff-Stammlösung versetzt (daraus ergibt sich ein Überschuss an Aminosäure von etwa 5:1). Nach Zugabe von  $2 \mu\text{L}$  einer  $\text{CuSO}_4$  Lösung (160 mM) sowie  $10 \mu\text{L}$  einer Natriumascorbat-Lösung (10 mM) wird die Reaktionsmischung für 3 Stunden bei  $40^\circ\text{C}$  geschüttelt und anschließend auf der HPLC aufgereinigt.

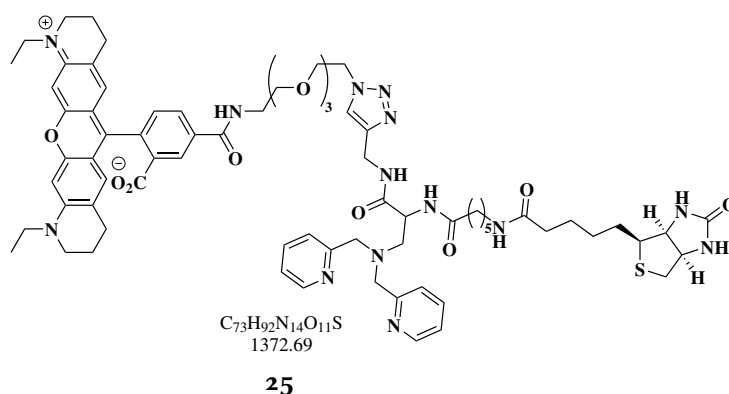
Die Chromatogramme weisen neben dem nicht reagierten Farbstoff auch einen Produkt-Peak auf, der durch Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$  fluoreszenzgelöscht ist und daher am relativen Verhältnis von Absorptions- zu Emissionsbande erkannt werden kann (siehe Abbildung 6.1). Diese Fraktion wird gesammelt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Um die kupfer-freie Verbindung zu erhalten, wird der Rückstand in wässriger EDTA-Lösung (100 mM) gelöst, für einige Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und dann mit Dichlormethan extrahiert. Das Extrakt wird im Vakuum getrocknet. Dieser Vorgang wird zwei mal wiederholt. Die Bestimmung der Ausbeuten der Click-Reaktion erfolgt über das relative Verhältnis der Fläche unter dem integrierten Absorptionsspektrum des HPLC-Detektors.



**Abbildung 6.1.:** HPLC-Aufreinigung von Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin: Absorptionsspektrum (schwarz) und Fluoreszenzspektrum (rot) der eluierten Lösung über die Zeit. Die große Fraktion bei 23 Minuten zeigt im Vergleich zu den umliegenden Fraktionen eine reduzierte Fluoreszenz.

Alternativ dazu werden die propargylierten und biotinylierten Aminosäuren **18** und **19** zu 10 mM in DMF gelöst und mit etwa 5 Äquivalenten Azid-Farbstoff,  $\text{CuSO}_4$  und Natriumascorbat wie oben beschrieben zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsmischung wird schließlich mit EDTA-Lösung versetzt und entweder mit Dichlormethan extrahiert (für Atto565, Atto590, Atto633, Atto647N) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, oder (für Atto488, Atto542, Atto655) das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels HPLC aufgereinigt.

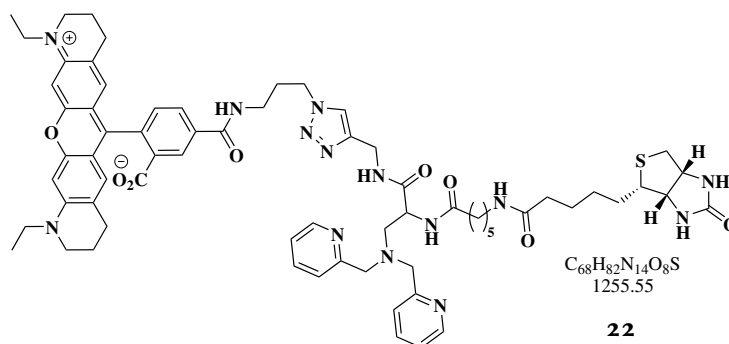
### Reaktion von **18** mit Atto565-Azid (**25**)



**Ausbeute(HPLC):** 96 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $\text{C}_{73}\text{H}_{93}\text{CuN}_{14}\text{O}_{11}\text{S}^{2+}$  ber. 718.3077, gef. 718.3067, ber. 718.8094, gef. 718.8081.

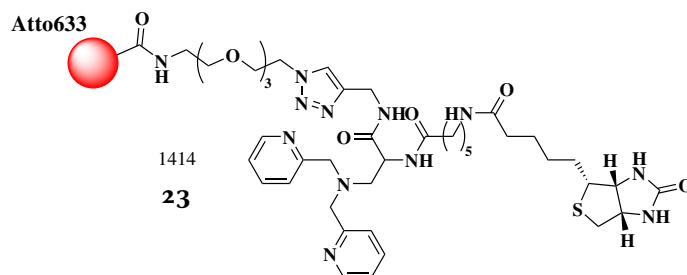
### Reaktion von **18** mit Atto565-Propyl-Azid (**22**)



**Ausbeute(HPLC):** 94 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{68}H_{83}CuN_{14}O_8S^{2+}$  ber. 659.2762, gef. 659.2737, ber. 659.7779, gef. 659.7755.

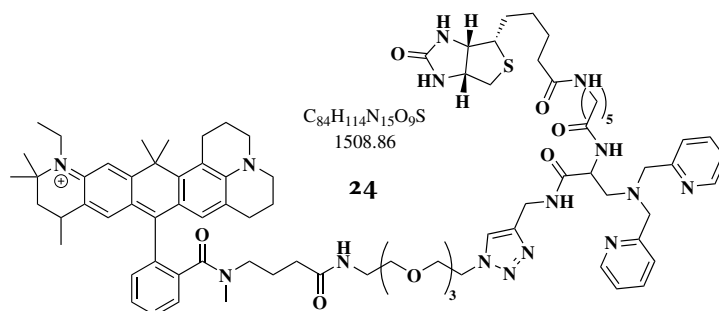
### Reaktion von 18 mit Atto633-Azid (23)



**Ausbeute(HPLC):** 94 %.

**HR-MS (ESI+):** gef. 1414.7885.

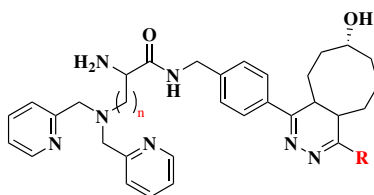
### Reaktion von 18 mit Atto647N-Azid (24)



**Ausbeute(HPLC):** 97 %.

**HR-MS (ESI+):** für  $C_{84}H_{115}N_{15}O_9S$  ber. 1509.87174, gef. 1509.88112,  
für  $C_{84}H_{114}NaN_{15}O_9S$  ber. 765.92657, gef. 765.92916.

## 6.5.4. Tetrazin-Click-Reaktionen



R = H	n = 1:	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	<b>71</b>
	n = 4:	C <sub>35</sub> H <sub>45</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	<b>72</b>
R = Me	n = 1:	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	<b>73</b>
	n = 4:	C <sub>36</sub> H <sub>47</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	<b>74</b>

Reaktion von **8** mit *trans*-Cyclooct-4-enol (TCO\*): **71**  
**HR-MS (ESI-)**: für C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ber. 552.308150, gef. 552.309041.

Reaktion von **9** mit *trans*-Cyclooct-4-enol (TCO\*): **72**  
**HR-MS (ESI-)**: für C<sub>35</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ber. 594.355100, gef. 594.356198.

Reaktion von **10** mit *trans*-Cyclooct-4-enol (TCO\*): **73**  
**HR-MS (ESI+)**: für C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ber. 567.331625, gef. 567.330836.

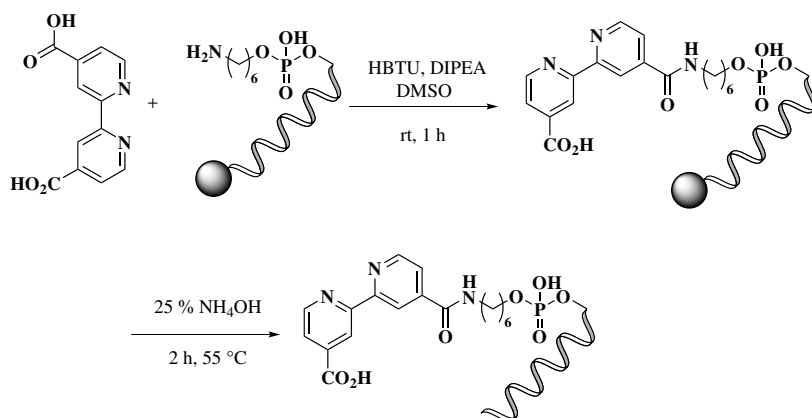
Reaktion von **11** mit *trans*-Cyclooct-4-enol (TCO\*): **74**  
**HR-MS (ESI+)**: für C<sub>36</sub>H<sub>48</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub> ber. 610.386400, gef. 610.386661.

## 6.6. Funktionalisierung von DNA

Für die Reaktion werden die Oligonukleotide auf cpg-Festphase von Biomers bezogen (siehe Kapitel 5.1). Typischerweise wird 1  $\mu\text{mol}$  des Amin-modifizierten Oligonukleotids mit 20 Äquivalenten des jeweiligen Liganden sowie 100 Äquivalenten HBTU (100  $\mu\text{mol}$ , 39 mg) in 1 mL DMSO und 200  $\mu\text{L}$  DIPEA gelöst und für 1 Stunde bei 1000 rpm geschüttelt. Danach wird 3-mal mit DMF sowie 2-mal mit MeCN gewaschen und getrocknet. Zur Entschützung der Basen und zum Abspaltung des Oligonukleotids von der Festphase wird 600  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{OH}$  hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 2 Stunden bei 55  $^\circ\text{C}$  und geschüttelt. Nach der Entschützung und Abspaltung von der Festphase wird das Rohprodukt im Vakuum getrocknet, das farblose Pellet in Wasser gelöst und mittels HPLC aufgereinigt. Die Identität des Produkts wird im Arbeitskreis von Prof. KRÄMER am ACI der Universität Heidelberg mittels MALDI-TOF-MS bestimmt.

### BiPy-Oligo

Zum Reaktionsansatz werden 20 Äquivalente 2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure (100  $\mu\text{mol}$ , 4.9 mg) gegeben.

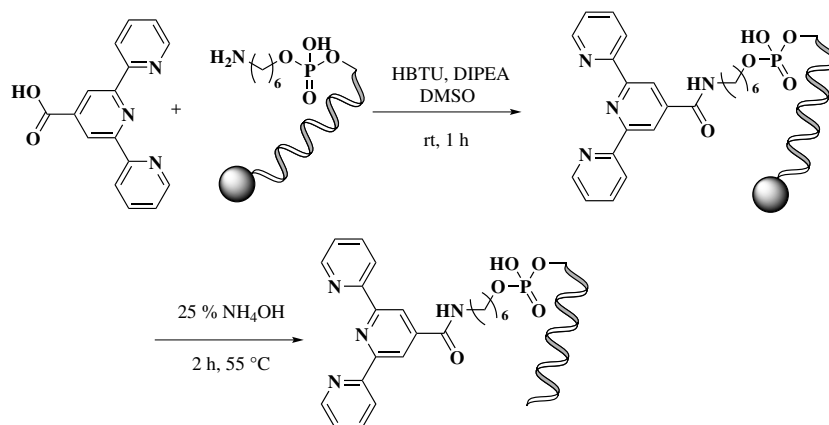


**Ausbeute (HPLC):** 38 %.

**MS (MALDI-TOF):** ber. 7226, gef. 7220.

### TerPy-Oligo

Zum Reaktionsansatz werden 20 Äquivalente [2,2':6',2''-Terpyridin]-4'-carbonsäure (100  $\mu\text{mol}$ , 5.5 mg) gegeben.



**Ausbeute (HPLC):** 29 %.

**MS (MALDI-TOF):** ber. 7258, gef. 7251.

**Teil V.**  
**Anhang**





# Anhang A.

## Herleitung der verwendeten Formeln

### A.1. Herleitung der in Kapitel 2.1 verwendeten Anpassungsfunktionen

Für die Anpassung der Stern-Volmer-Kurven wurde von Dr. ALEXANDER KIEL ein Zwei-Zustandsmodell vorgeschlagen, welches neben dem freien Zustand der Sonde auch eine gelöschte Spezies –den Kupferkomplex– mit einer reduzierten, von Null verschiedenen Quantenausbeute  $\phi_{ML}$ , beinhaltet. Für dieses Modell lassen sich zwei Gleichungen herleiten, eine Näherungslösung und eine exakte Lösung. Die Näherungslösung wurde von Dr. ALEXANDER KIEL in seiner Dissertation beschrieben und in BROX *et al.*, *PLoS ONE* **2013** veröffentlicht.<sup>[149]</sup> Die exakte Lösung des Problems ist identisch mit einer Beschreibung von RYAN *et al.*, *Anal.Chem.* **1982** und PATONAY *et al.* *J.Phys.Chem.* **1986**.<sup>[185, 186]</sup> Hier wurde das Modell auf die Fluoreszenzlöschung von Huminsäuren durch Übergangsmetallionen und die Fluoreszenzlöschung von Pyren durch Cyclodextrine angewendet. Im Folgenden wird die Herleitung der modifizierten Stern-Volmer-Gleichung beschrieben, wie sie auch schon in der Dissertation von Dr. MICHAEL SCHWERING dargelegt wurde.<sup>[44]</sup>

Wie im Stern-Volmer-Modell zur Fluoreszenzlöschung wird als Näherung angenommen, dass sich die Konzentration an Löschmolekülen durch den Löschvorgang –hier die Komplexierung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen an einen Liganden– nicht ändert, also konstant bleibt.<sup>[13]</sup>

$$[M] = [M]_0 - [ML] \approx [M]_0 \quad (\text{A.1})$$

Es ist  $[M]$  die Metallionenkonzentration nach Gleichgewichtseinstellung,  $[M]_0$  die eingesetzte Metallionenkonzentration und  $[ML]$  die Konzentration des Komplexes. Für die Konzentration an der Fluoreszenzsonde  $[L]$  gilt weiter

$$[L] = [L]_0 - [ML] \quad (\text{A.2})$$

wobei  $[L]_0$  die Anfangskonzentration der Fluoreszenzsonde ist.

Die Gleichgewichtskonstante  $K$  ist für die hier betrachtete Reaktion nach Einsetzen von Gleichung A.2 gegeben durch

$$K = \frac{[ML]}{[L][M]} = \frac{[ML]}{([L]_0 - [ML])[M]} \quad (\text{A.3})$$

Durch Umstellen und Auflösen nach  $[ML]$  erhält man Gleichung A.4, welche nach Einsetzen in Gleichung A.2 zu Gleichung A.5 führt.

$$[ML] = \frac{K[M][L]_0}{K[M] + 1} \quad (\text{A.4})$$

$$[L] = [L]_0 - [ML] = \frac{[L]_0}{K[M] + 1} \quad (\text{A.5})$$

Wenn man nun den  $\text{Cu}^{2+}$ -freien Zustand betrachtet, folgt für die Anfangsfluoreszenz  $F_0$

$$F_0 = \phi_L[L] \quad (\text{A.6})$$

Hier ist  $\phi_L$  die Quantenausbeute des Fluoreszenzfarbstoffes in Abwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$ . Nach Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen erhält man die Fluoreszenzintensität  $F$  nach Gleichung A.7:

$$F = \phi_L[L] + \phi_{ML}[ML] \quad (\text{A.7})$$

Setzt man die Gleichungen A.4 und A.5 in Gleichung A.7 ein folgt daraus

$$F = \frac{\phi_L[L]_0}{K[M] + 1} + \frac{\phi_{ML}K[M][L]_0}{K[M] + 1} = \phi_L[L]_0 \left[ \frac{1 + K[M]\frac{\phi_{ML}}{\phi_L}}{K[M] + 1} \right] \quad (\text{A.8})$$

Bildet man nun den Quotienten  $\frac{F_0}{F}$  analog zur Stern-Volmer-Theorie, erhält man den folgenden Ausdruck:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\phi_L[L]_0}{\phi_L[L]_0 \left[ \frac{1 + K[M]\frac{\phi_{ML}}{\phi_L}}{K[M] + 1} \right]} = \frac{1 + K[M]}{1 + K[M]\phi_{aus}} \quad (\text{A.9})$$

Hier wurde die Quantenausbeute der freien Sonde  $\phi_L = 1$  gesetzt, somit wird aus dem Quotienten  $\frac{\phi_{ML}}{\phi_L}$  die relative Quantenausbeute des gelöschten Zustands  $\phi_{aus}$ .

Dieser Ausdruck stellt die Näherungslösung des Problems dar, hiermit lassen

sich die Stern-Volmer-Plots für die chemischen Schalter der ersten Generation in Kapitel 2 gut beschreiben. Um zur exakten Lösung des Problems zu kommen, darf man die Änderung der Löschmolekülkonzentration durch die Komplexbildung nicht mehr vernachlässigen. Dies ist zum Beispiel bei sehr niedrigen  $\text{Cu}^{2+}$ -Konzentrationen oder für hohe Sondenkonzentrationen wichtig. Es folgt für  $[M]$  also

$$[M] = [M]_0 - [ML] \quad (\text{A.10})$$

Für die Komplexbildungskonstante  $K$  folgt hiermit

$$K = \frac{[ML]}{([M]_0 - [ML])([L]_0 - [ML])} \quad (\text{A.11})$$

Auflösen der Gleichung liefert den quadratischen Ausdruck

$$K[ML]^2 - (1 + K([M]_0 + [L]_0))[ML] + K[M]_0[L]_0 = 0 \quad (\text{A.12})$$

Hierfür folgt für die Komplekonzentration  $[ML]$  schließlich

$$[ML]_{1,2} = \frac{1 + K([M]_0 + [L]_0) \pm \sqrt{(1 + K([M]_0 + [L]_0))^2 - 4K^2[M]_0[L]_0}}{2K} \quad (\text{A.13})$$

und für die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Metallkonzentration

$$F = \phi_L([L]_0 - [ML]) + \phi_{ML}[ML] \quad (\text{A.14})$$

Einsetzen von Gleichung A.13 in A.14 und das Bilden des Quotienten  $\frac{F_0}{F}$  liefert nun folgenden Ausdruck

$$\frac{F_0}{F} = \frac{2K[L]_0}{2K[L]_0 + (\phi_{aus} - 1)} \dots \dots \frac{\dots}{(1 + K([M]_0[L]_0)) - \sqrt{(1 + K([M]_0[L]_0))^2 - 4K^2[M]_0[L]_0}} \quad (\text{A.15})$$

Diese Gleichung stellt schließlich die exakte Lösung des Ansatzes dar und liefert eine gute Beschreibung der Fluoreszenzlöschung der chemischen Schalter der zweiten Generation in Kapitel 3.

## A.2. Herleitung der in Kapitel 2.4 verwendeten Formeln zur Anpassung der Histogramme aus Einzelmolekülspuren

Für das Zwei-Zustandssystem gilt:



Es lassen sich für den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen von freier und komplexierter Sonde folgende Differentialgleichungen aufstellen:

$$\frac{d[L]}{dt} = -k_a[M][L] + k_d[ML] \quad (\text{A.17})$$

$$\frac{d[ML]}{dt} = \frac{-d[L]}{dt} = -k_d[ML] + k_a[M][L] \quad (\text{A.18})$$

Betrachtet man einzelne Moleküle werden die diskreten Konzentrationen [L] und [ML] durch die Wahrscheinlichkeiten, die Sonde im jeweiligen Zustand anzutreffen,  $P_{an}$  und  $P_{aus}$ , ersetzt.

$$\frac{dP_{an}(t)}{dt} = -k_a[M]P_{an}(t) + k_dP_{aus}(t) \quad (\text{A.19})$$

$$\frac{dP_{aus}(t)}{dt} = -k_dP_{aus}(t) + k_a[M]P_{an}(t) \quad (\text{A.20})$$

Betrachtet man nun isoliert entweder die An- oder die Auszustände, vereinfachen sich die Gleichungen nochmals, da dann die jeweilige andere Wahrscheinlichkeit einen Wert von null annimmt. Weiter betrachtet man nun nur noch die Länge der einzelnen Zustände,  $\Delta t$ .

$$\frac{dP_{an}(\Delta t)}{d\Delta t} = -k_a[M]P_{an}(\Delta t) \quad (\text{A.21})$$

$$\frac{dP_{aus}(\Delta t)}{d\Delta t} = -k_dP_{aus}(\Delta t) \quad (\text{A.22})$$

Nach Integration dieser beiden Gleichungen erhält man Ausdrücke zur Beschreibung der Assoziations- und Dissoziationswahrscheinlichkeiten:

$$P_{an}(\Delta t) = \exp(-k_a[M]\Delta t) = \exp(-v_{an}[M]\Delta t) \quad (\text{A.23})$$

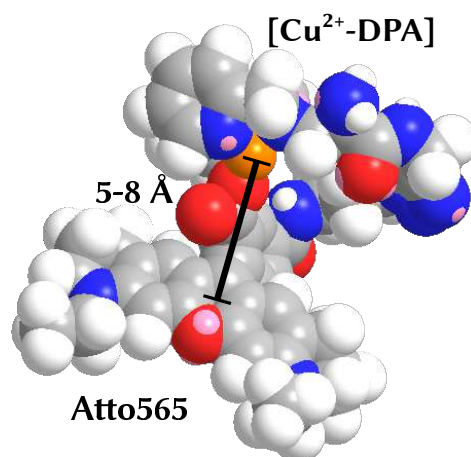
$$P_{aus}(\Delta t) = \exp(-k - d\Delta t) = \exp(-v_{aus}\Delta t) \quad (\text{A.24})$$

Diese beiden Formeln wurden nun verwendet, um aus den Histogrammen über die Verteilung der An- und Auszeiten die Übergangsraten  $v_{an}$  und  $v_{aus}$  zu bestimmen.



## Anhang B.

### Löschmechanismus



**Abbildung B.1.:** In Chem3D modellierte Struktur von Atto565-Lys-DPA **5** mit einem komplexierten Cu<sup>2+</sup>-Ion. Der Farbstoff-Cu<sup>2+</sup>-Abstand liegt bei etwa 5–8 Å. Damit kommt auch hier ein photoinduzierter Elektronentransfer als Löschmechanismus in Frage.

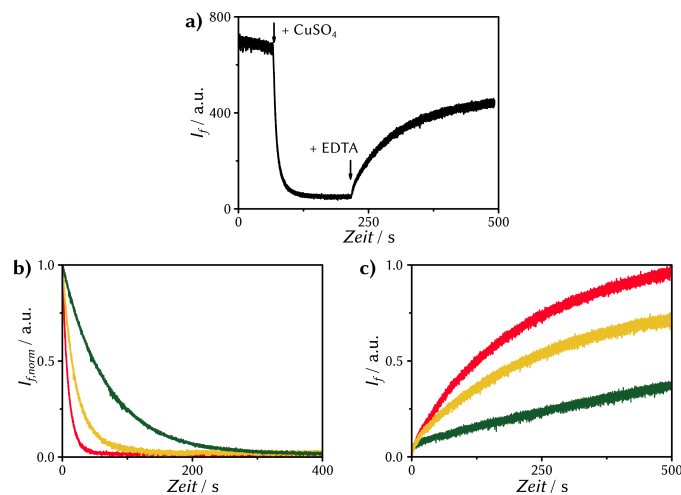




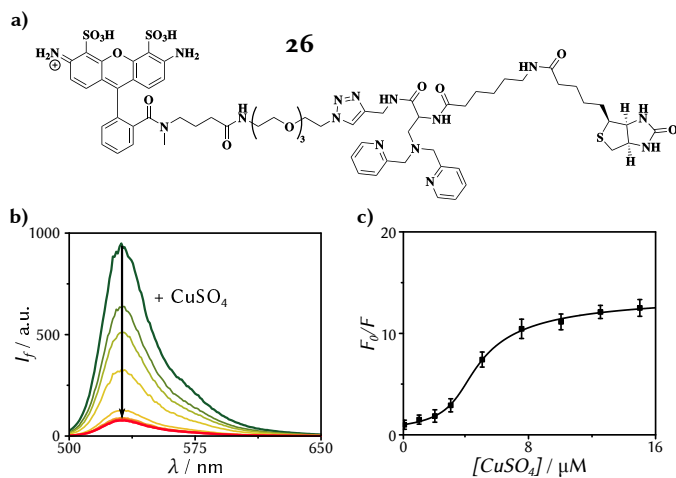
# Anhang C.

## Ensemble-Daten

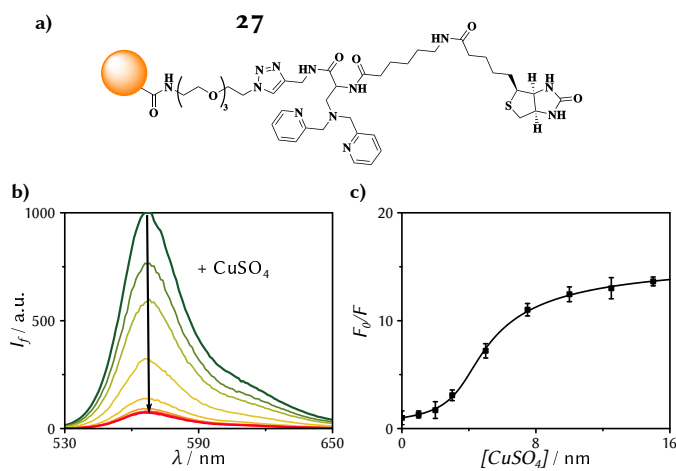
### C.1. Fluoreszenztitrationen



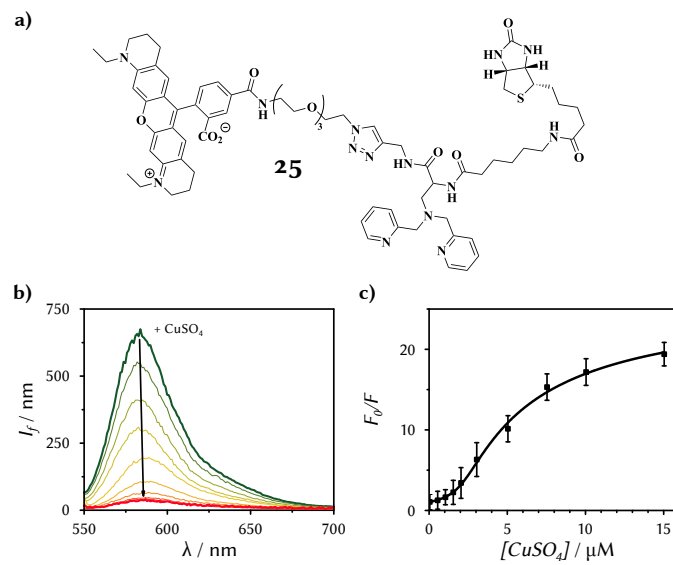
**Abbildung C.1.:** Ensemble-Kinetikmessungen mit Atto647N-DPA und TMR-DPA: **(a)** Zeitaufgelöste Messung der Fluoreszenzintensität einer 500 nm Lösung von Atto647N-DPA in 10 mM MOPS-Puffer nach Zugabe von 2 Äquivalenten  $\text{CuSO}_4$  und 5 Äquivalenten EDTA-Lösung. **(b)** Ausschnitt aus Kinetikmessungen wie in **a** von TMR-DPA nach Zugabe von 1 Äquivalent  $\text{CuSO}_4$ , durchgeführt bei Temperaturen von 10 °C (grün), 20 °C (gelb) und 30 °C (rot). **(c)** Regeneration der gelöschten Fluoreszenz nach Zugabe von 5 Äquivalenten EDTA bei Temperaturen von 10 °C (grün), 20 °C (gelb) und 30 °C (rot).



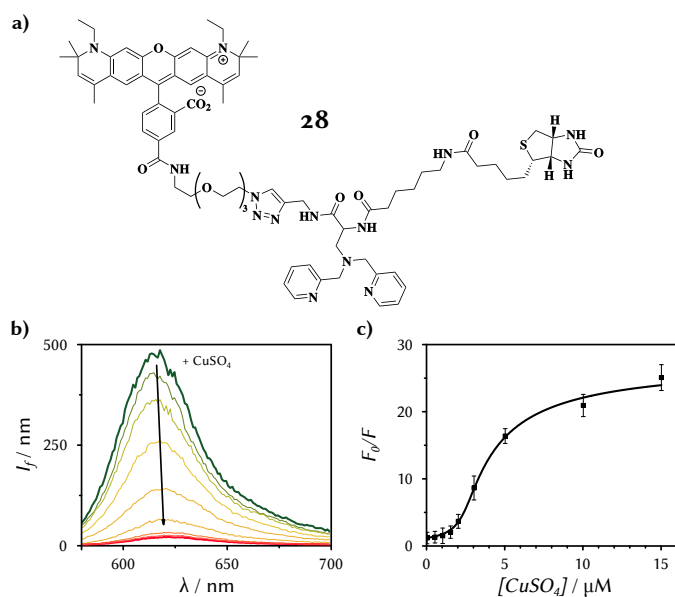
**Abbildung C.2.:** (a) Struktur von Atto488-Ala-DPA-Biotin **26**. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.



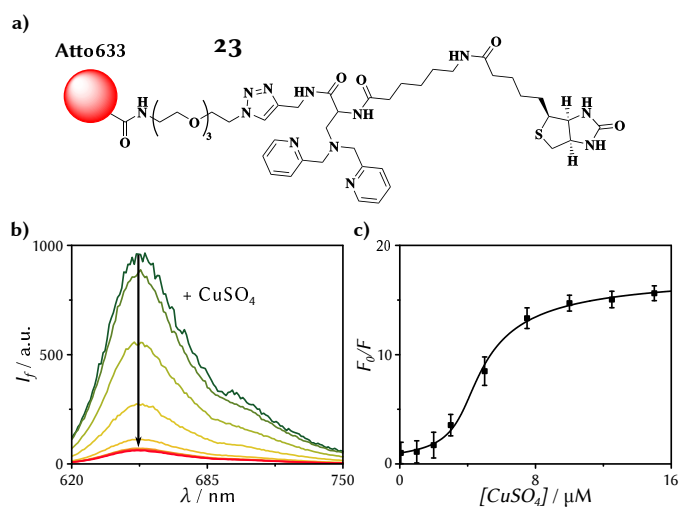
**Abbildung C.3.:** (a) Struktur von Atto542-Ala-DPA-Biotin **27**. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.



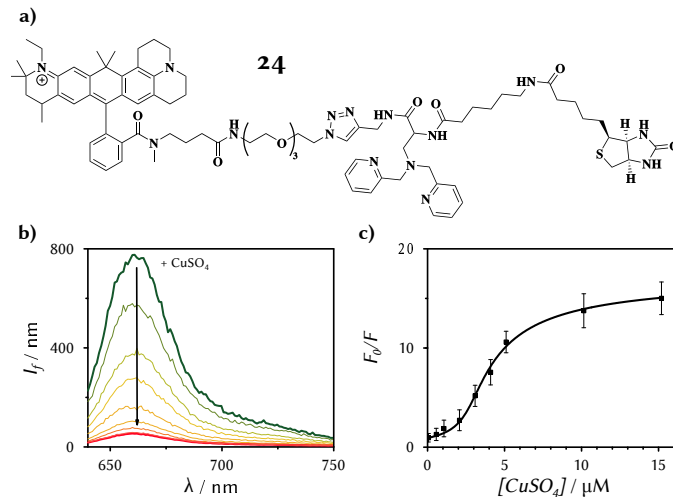
**Abbildung C.4.:** (a) Struktur von Atto565-Ala-DPA-Biotin **25**. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.



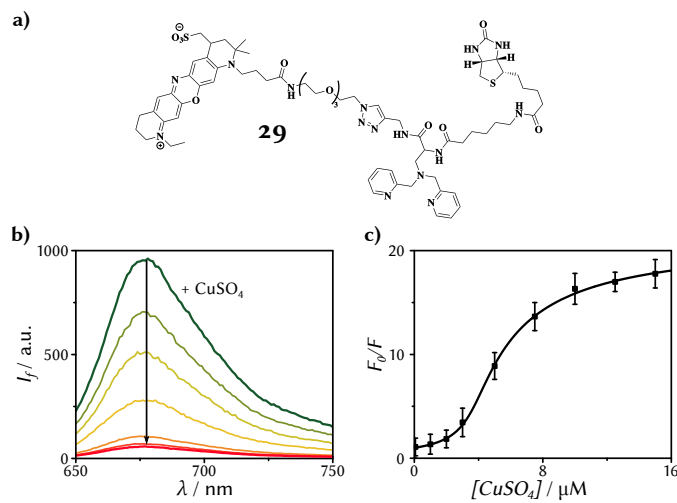
**Abbildung C.5.:** (a) Struktur von Atto590-Ala-DPA-Biotin **28**. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.



**Abbildung C.6.:** (a) Struktur von Atto633-Ala-DPA-Biotin **23**, die genaue Struktur des Farbstoffs ist nicht veröffentlicht. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.

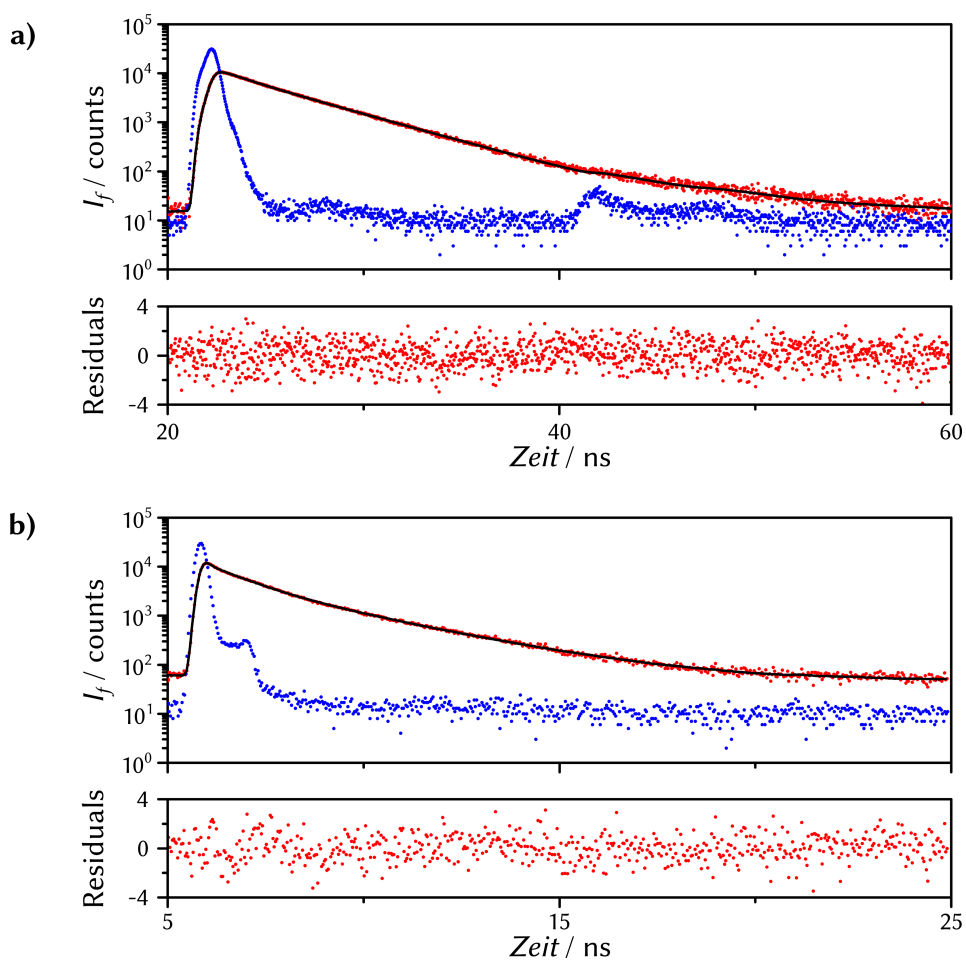


**Abbildung C.7.:** (a) Struktur von Atto647N-Ala-DPA-Biotin **24**. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.



**Abbildung C.8.:** (a) Struktur von Atto655Ala-DPA-Biotin **29**. (b) Fluoreszenztitration mit  $\text{CuSO}_4$  und (c) zugehöriger Stern-Volmer-Plot, welcher mit Gleichung A.15 angepasst wurde.

## C.2. Fluoreszenzlebensdauermessungen



**Abbildung C.9.:** Messung der Fluoreszenzlebensdauer: Instrumentenantwort (blau), Fluoreszenz-Abklingkurve (rot) und angepasste Funktion (schwarz) sowie die zugehörigen Residuen. (a) Atto488-Ala-DPA-Biotin, angeregt mit der gepulsten Diode „PLS 500“ von *PicoQuant*, (b) Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin, angeregt mit dem durchstimmbaren Laser „iChrome TVIS“ von *TOPTICA*.

**Tabelle C.1.:** Aus der Anpassung der Fitfunktion erhaltene amplitudengemittelte Fluoreszenzlebensdauern  $\bar{\tau}_{Amp}$ , die Einzelkomponenten  $\tau_n$  mit ihrer jeweiligen Amplitude sowie die Güte  $\chi^2$  der jeweiligen Anpassung für die chemischen Schalter **Farbstoff**-Ala-DPA-Biotin in PBS zu 100 nM.

Verbindung	$\bar{\tau}_{Amp}/$ ns	$\tau_n$ (Amplitude) / ns (%)	$\chi^2$
Atto488 <b>26</b>	3.87	4.13 $\pm$ 0.02(85) 2.37 $\pm$ 0.19(15)	0.987
Atto542 <b>27</b>	3.79	3.79 $\pm$ 0.02(100)	0.975
Atto565 <b>25</b>	4.19	4.32 $\pm$ 0.02(92) 2.65 $\pm$ 0.28(8)	1.044
Atto565 <b>22</b>	4.05	4.20 $\pm$ 0.02(89) 2.88 $\pm$ 0.19(11)	1.086
Atto590 <b>28</b>	3.68	4.11 $\pm$ 0.03(72) 2.59 $\pm$ 0.08(28)	1.030
Atto633 <b>23</b>	3.49	3.49 $\pm$ 0.02(100)	1.026
Atto647N <b>24</b>	3.74	3.74 $\pm$ 0.02(100)	1.009
Atto655 <b>29</b>	2.14	4.13 $\pm$ 0.01(100)	1.004

**Tabelle C.2.:** Veränderung der Fluoreszenzlebensdauern der biotinylierten chemischen Schalter **Farbstoff**-Ala-DPA-Biotin zu 100 nM nach Zugabe von 300 nM (20  $\mu$ g/mL) Streptavidin sowie 10  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> in PBS.

Farbstoff	$\bar{\tau}_{Amp}/$ ns		
	PBS	+Streptavidin	+CuSO <sub>4</sub>
Atto488 <b>26</b>	3.87	3.85	3.39
Atto542 <b>27</b>	3.79	3.78	2.46
Atto565 <b>25</b>	4.19	4.06	3.64
Atto565 <b>22</b>	4.05	3.83	3.62
Atto590 <b>28</b>	3.68	3.59	3.21
Atto633 <b>23</b>	3.49	2.35	2.24
Atto647N <b>24</b>	3.74	2.42	2.34
Atto655 <b>29</b>	2.14	2.14	1.78

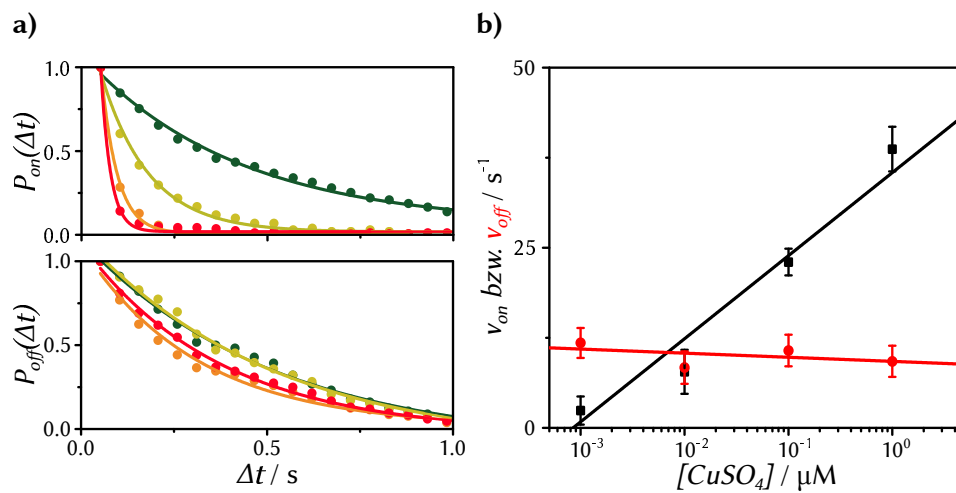




# Anhang D.

## Mikroskopie-Daten

### D.1. Einzelmolekül-Experimente



**Abbildung D.1.:** Einzelmoleküluntersuchung von Atto565-DPA: (a) Histogramme der An-Zeiten (oben) und Aus-Zeiten (unten) für  $Cu^{2+}$ -Konzentrationen von 1 nM (grün), 10 nM (gelb), 100 nM (orange) und 1  $\mu M$  (rot). (b) Aus der Anpassung der Histogramme mit Gleichung 2.7 und 2.8 erhaltene An- (schwarz) und Aus-Raten (rot), Aufgetragen gegen die  $Cu^{2+}$ -Konzentration. Die An-Raten steigen linear mit der  $Cu^{2+}$ -Konzentration, die Aus-Raten bleiben dagegen unverändert.

## D.2. Lokalisierungsgenauigkeit

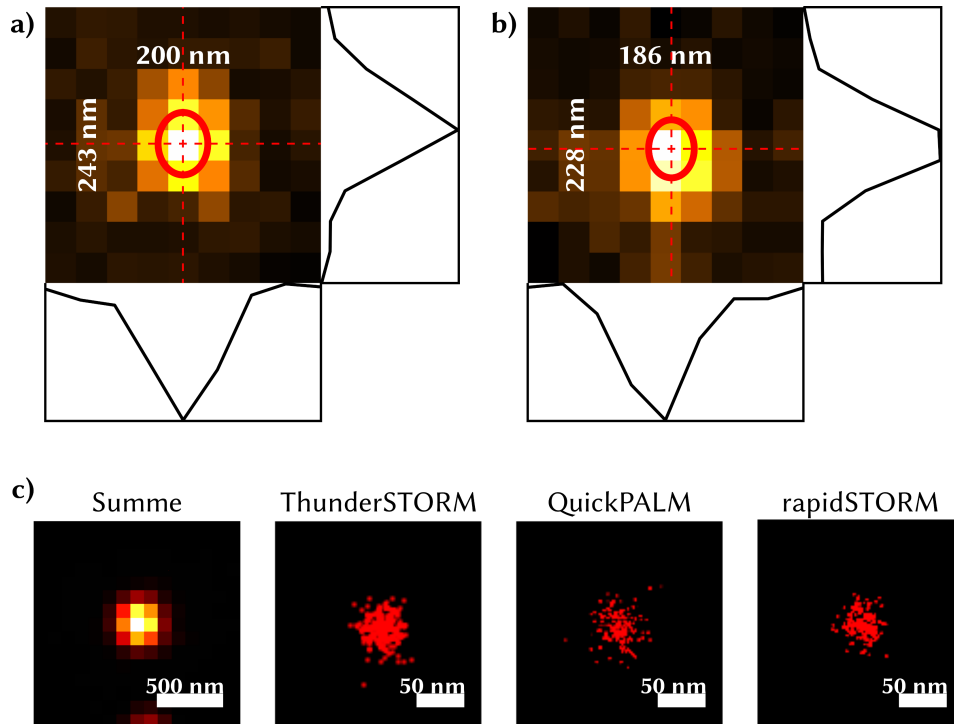
Die mit der emCCD-Kamera gemessenen Grauwerte lassen sich in tatsächlich detektierte Photonen umrechnen. Dazu benötigt man folgende Formel:

$$\#(\text{Photonen}) = \frac{(\text{Counts} - \text{Bias}) \cdot \text{PreAmpGain}}{\text{EMGain} \cdot \text{QE}(\lambda)} \quad (\text{D.1})$$

Die Photonenanzahl berechnet sich aus der Differenz des Messsignals und des aufaddierten Bias (hier 100 Counts), multipliziert mit dem PreAmpGain (5.12 Elektronen pro Count), das Ganze geteilt durch den EMGain (er wurde meist auf 500 gesetzt) und der Quantenausbeute des Chips bei der Detektionswellenlänge. Diese liegt für Atto565 bei etwa 0.9.

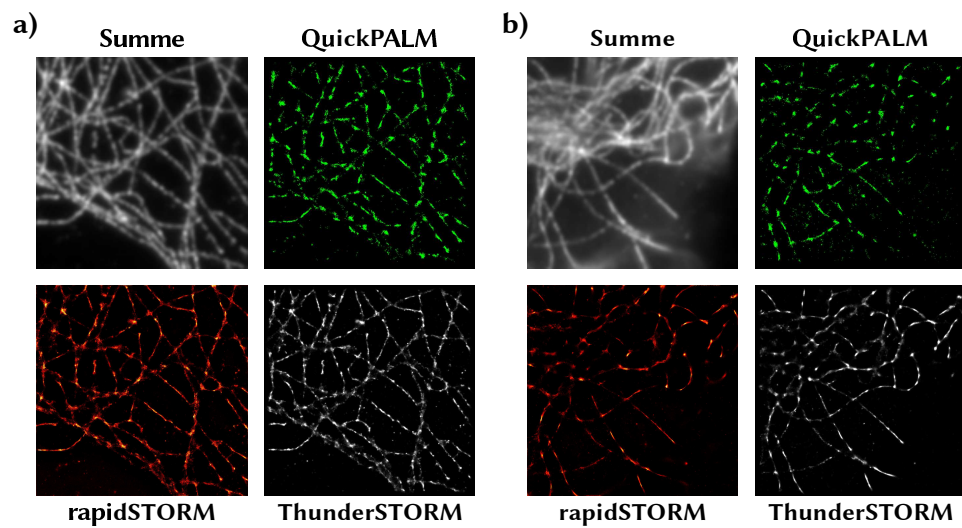
**Tabelle D.1.:** Berechnung der Lokalisationspräzision zu den beiden in Abbildung D.2 dargestellten **22** Molekülen. Die Anzahl der Photonen wurde mit Gleichung D.1 bestimmt, die Standardabweichung der Gauß-Fits  $s_{x,y}$  wurde in Origin berechnet. Die Lokalisationspräzision wurde schließlich mit Gleichung 1.21 berechnet.

		# Photonen	$s_{x/y}$ / nm	$\sigma_{x/y}$ / nm
Molekül 1	1 Bild	370	159 / 192	8.2 / 10.0
	10 Bilder	3731	200 / 243	3.3 / 4.0
Molekül 2	1 Bild	468	208 / 154	9.6 / 7.1
	10 Bilder	3987	186 / 228	2.9 / 3.6

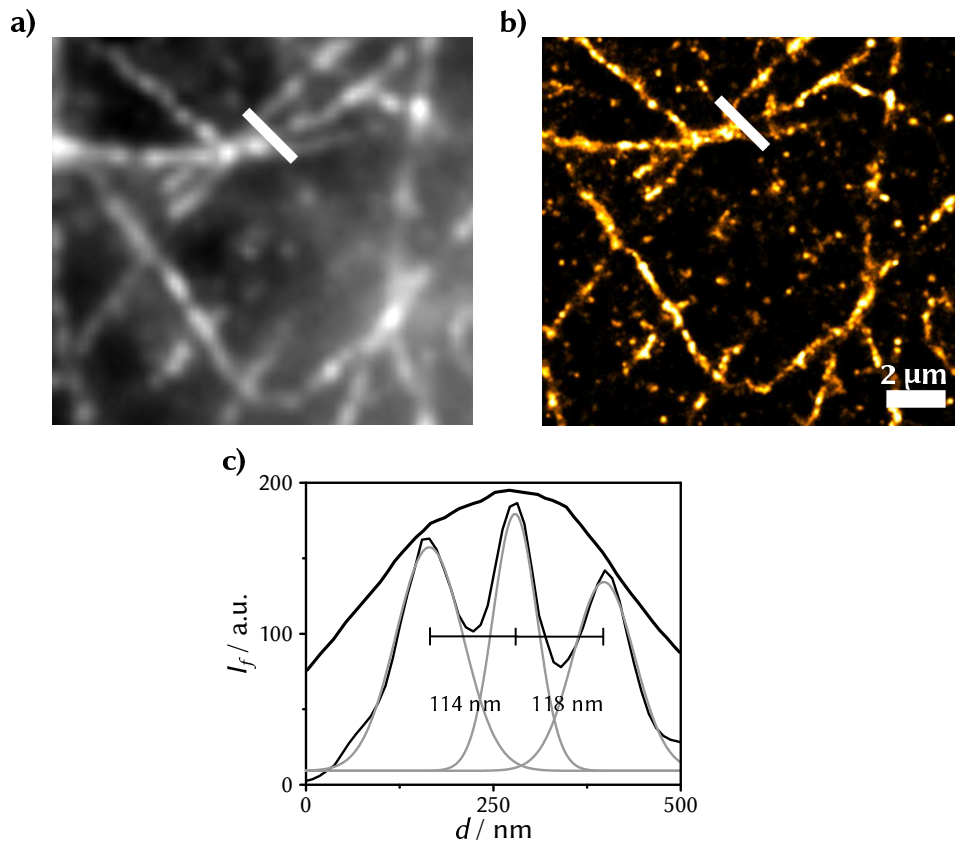


**Abbildung D.2.:** Untersuchungen zur Lokalisationspräzision: (a+b) Zwei immobilisierte einzelne Atto565-Propyl-Ala-DPA-Biotin-Moleküle **22** in PBS. Summe über je 10 Bilder, aufgenommen bei 50 ms Belichtungszeit, bei 2 mW Laserleistung (561 nm) und einem EMGain von 500. Die berechnete Photonenzahl über die gesamte PSF beträgt 3731 bzw. 3987. Die damit berechnete Lokalisationspräzision nach Gleichung 1.21 beträgt 4.40 bzw. 5.37 nm. (c) Immobilisierter chemischer Schalter (**22**), aufgenommen für 200 Bilder in PBS. Summenbild und Lokalisationsanalyse (Pixelgröße im Lokalisationsbild je 2 nm) mit „ThunderSTORM“, „QuickPALM“ und „rapidSTORM“. Die drei Algorithmen weisen eine ähnliche Streuung der Lokalisationen auf.

### D.3. Lokalisationsexperimente

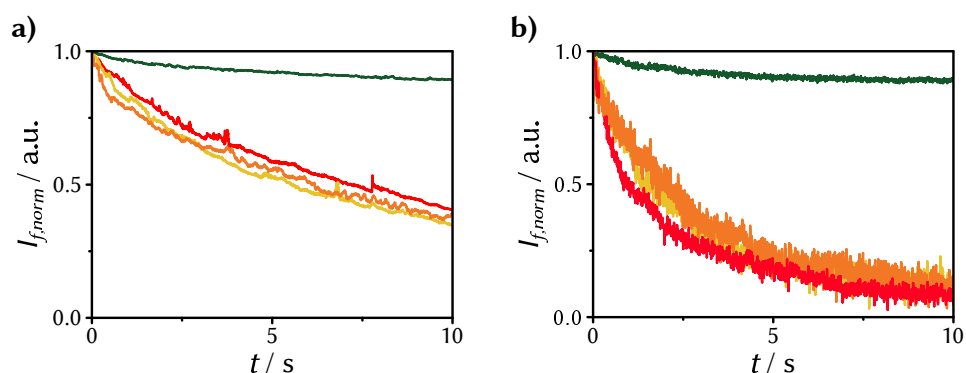


**Abbildung D.3.:** Vergleich dreier frei verfügbarer Lokalisationsalgorithmen. Es ist jeweils das Summenbild über 15000 Einzelbilder und das Lokalisierungsergebnis der ImageJ-Plugins QuickPALM und ThunderSTORM sowie der rapidSTORM-Software gezeigt. Die durchgängigsten Filamente werden mit rapidSTORM und ThunderSTORM erhalten.

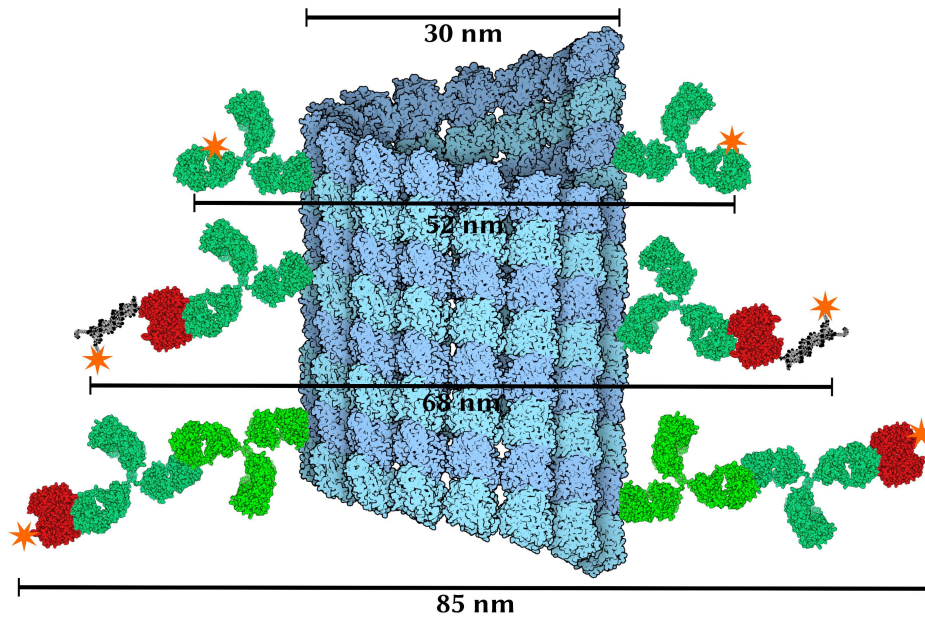


**Abbildung D.4.:** Bestimmung der Auflösung der Lokalisationsbilder. Ausschnitte aus Abbildung 3.8c (a) und 3.8d (b) mit einem markierten Kreuzungspunkt. Hier laufen drei Mikrotubuli zusammen. Im beugungsbegrenzten Bild wird es als ein Filament mit einer Halbwertsbreite von  $(379 \pm 3)$  nm abgebildet. Im Lokalisationsbild wurde die Stelle so gewählt, dass gerade noch alle drei Filamente sichtbar sind. Hier treten Halbwertsbreiten von  $(89 \pm 3)$ ,  $(68 \pm 2)$  und  $(82 \pm 3)$  nm auf. Wichtiger ist jedoch der Filamentabstand, der hier 114 bzw. 118 nm beträgt. Dies ist eine eher konservative Abschätzung der erreichten Auflösung. Es wurden keine weiteren nutzbaren Kreuzungspunkte gefunden, so dass keine Statistik über die erreichte Auflösung gebildet werden konnte.

## D.4. Chemisches Multiplexing

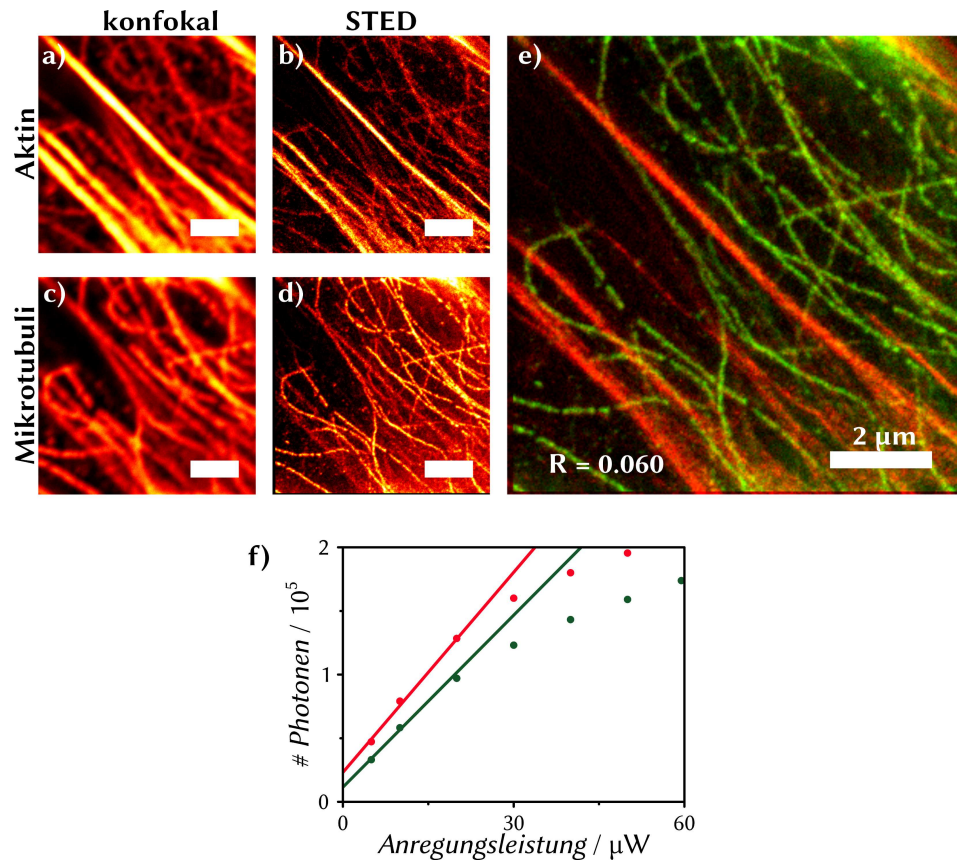


**Abbildung D.5.:** Photostabilität der verwendeten Farbstoffe und chemischen Schalter. Dargestellt ist jeweils die mittlere Intensität einer markierten HeLa-Zelle über die Zeit. Die Experimente wurden jeweils mit gleicher Laserleistung durchgeführt: (a) Photostabilität der in Kapitel 2 verwendeten Farbstoffmarkierten Antikörper und der chemischen Schalter. Markiert sind TMR-Bipy in PBS (rot) und 25  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS (grün), sowie Anti-Vimentin-TMR (gelb) und Anti-Maus-TMR (orange). Die Farbstoffe wurden am selbstgebaute TIRF-Mikroskop mit 532 nm bei 1 mW angeregt. (b) Photostabilität des in Kapitel 3 verwendeten chemischen Schalters **22** in PBS (rot) und 25  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS (grün), sowie Atto565-Phalloidin in PBS (gelb) und 25  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS (orange). Die Anregung erfolgte am kommerziellen TIRF-Mikroskop bei 561 nm mit 10 mW. Die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$  führt nur bei den chemischen Schaltern zu einer Verlängerung der Photostabilität.



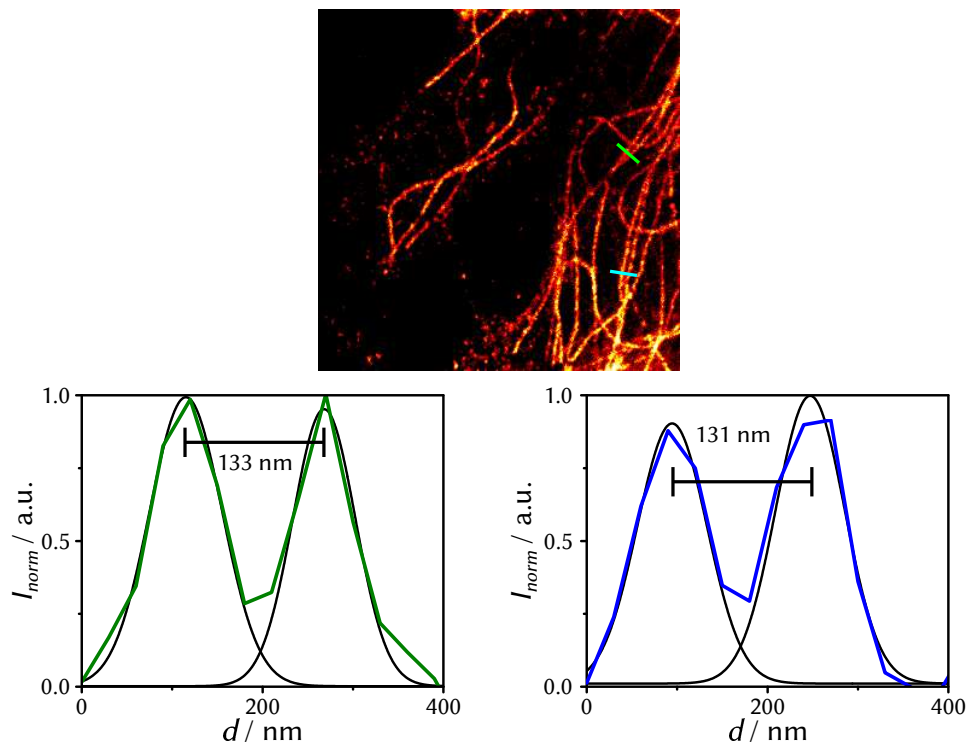
**Abbildung D.6.:** Schematische Darstellung der realen Größe eines Mikrotubuli (blau, zusammengesetzt aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, hell- und dunkelblau) mit einem Farbstoff-markierten Primärantikörper (oben) im Vergleich zu den beiden in dieser Arbeit verwendeten Markierungsstrategien mit biotinylierten Primärantikörpern (mitte) und einem Primärantikörper und biotinyliertem Sekundärantikörper (unten). Die Abmessungen entsprechen dem jeweilig zu erwartenden Maximalabstand von zwei gegenüberliegenden Farbstoffen. Immunglobulin-G (grün), Streptavidin (rot). Die Proteinstrukturen stammen aus der Proteindatenbank <http://www.rcsb.org/pdb>: 1GT, 3J2U, 4YVB.

## D.5. STED-Experimente



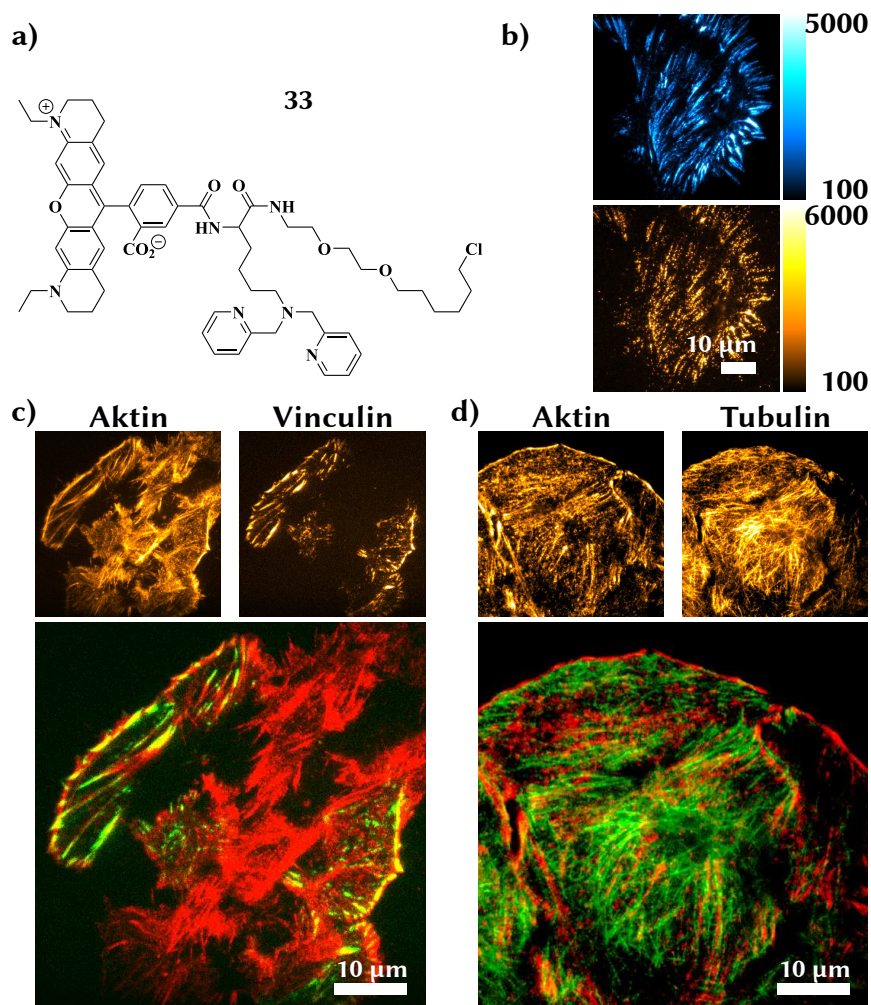
**Abbildung D.7.:** STED-Multiplexing-Experiment mit  $\mathbf{24}$  und Atto647N-Phalloidin (siehe auch Kapitel 3.2.5): (a) Konfokales und (b) STED-Bild von Aktin-Filamenten, aufgenommen in Anwesenheit von  $25 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  in PBS. (c) Konfokales und (d) STED-Bild von Mikrotubuli in der gleichen Zelle nach Photozerstörung und Zugabe von  $50 \mu\text{M}$  EDTA. (e) Falschfarbenbild aus den beiden STED-Aufnahmen. Pearson-Kolokalisationskoeffizient  $R = 0.060$ . Für die beiden konfokalen Bilder in a+c ergibt sich  $R = 0.420$ . (f) Sättigungsexperiment im Rahmen der STED-Multiplexing-Experimente aus Kapitel 3.2.5: die integrierte Intensität ein- und derselben Zelle wurde gegen die schrittweise erhöhte Anregungsleistung aufgetragen. Ab etwa  $20 \mu\text{W}$  geht weicht die Kurve von der Linearität ab. Um Photobleichen zu minimieren wurde deshalb eine Anregungsleistung von  $10 \mu\text{W}$  gewählt





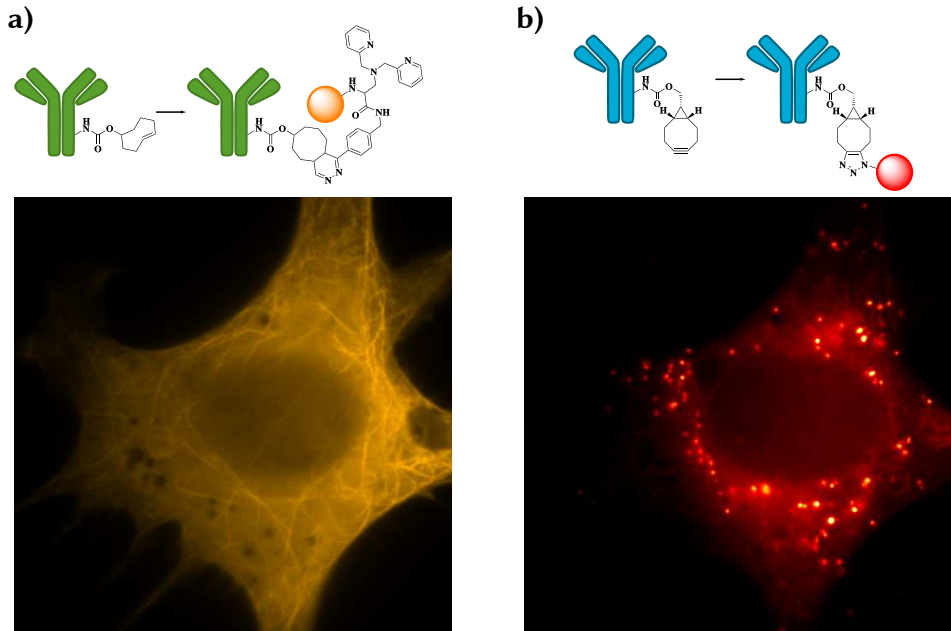
**Abbildung D.8.:** Abstand von Mikrotubuli aus dem STED-Multiplexing-Experiment: der minimale messbare Filamentabstand beträgt bei den beiden ausgewählten  $(133 \pm 5)$  bzw.  $(131 \pm 4)$  nm. Die Halbwertsbreite der einzelnen Filamente beträgt  $(76 \pm 3)$ - $(83 \pm 4)$  nm.

## D.6. Markierung mit Halo-Derivaten

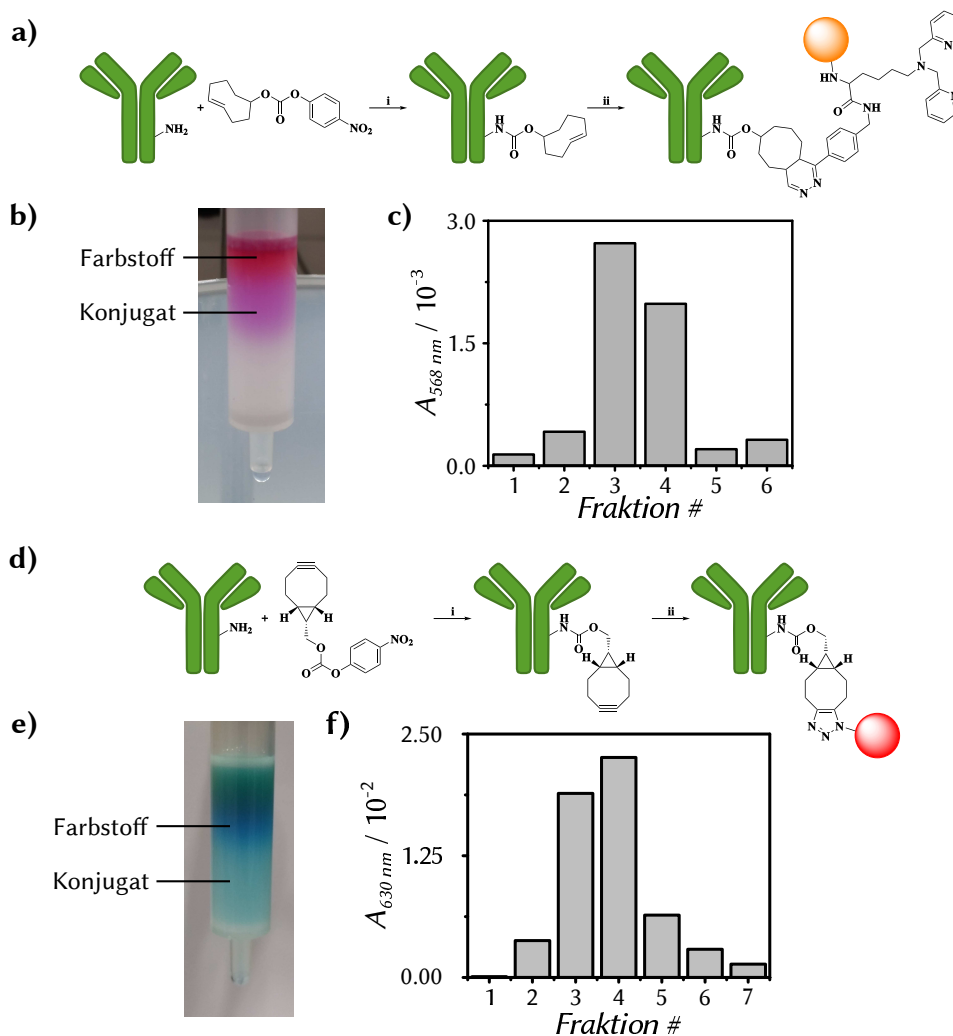


**Abbildung D.9.:** Chemisches Multiplexing mit Halo-Derivaten: (a) Struktur von Atto565-Halo-Lys-DPA **33**. (b) Optimierte Markierung in fixierten MEF Halo-Vinculin-GFP Zellen. GFP-Bild (oben) und Atto565-Bild (unten). (c) Multiplexing in MEF Halo-Vinculin-GFP Zellen. Aktin (Atto565-Phalloidin), Halo-Vinculin (**33**). (d) Multiplexing in fixierten HeLa Halo-Tubulin Zellen. Aktin (Atto565-Phalloidin), Halo-Tubulin (**33**). Für Markierungsbedingungen siehe Abbildung 3.15.

## D.7. Markierung mittels Kupfer-freier Click-Reaktion



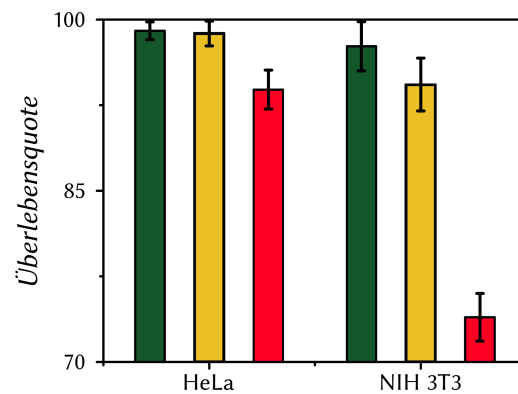
**Abbildung D.10.:** Markierung via Kupfer-freie Click-Chemie in fixierten NIH 3T3 Zellen. Die Zellen wurden mit anti- $\alpha$ -Tubulin-*a*-TCO\* und mit anti-Clathrin-ENDO-BCN in Inkubationspuffer markiert und dann dreimal gründliche gewaschen. Nun wurde mit je  $1\ \mu\text{M}$  Atto647N-Azid und **75** für 15 Minuten in Inkubationspuffer inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und im Epifluoreszenzmikroskop mikroskopiert (je 1 mW bei 561 nm und 640 nm, Belichtungszeit 50 ms). Markierungsschema und zugehöriges Fluoreszenzbild von **(a)** **75** an Mikrotubuli und **(b)** Atto647N-Azid an Clathrin. Pearson-Korrelationskoeffizient  $R = 0.728$ .



**Abbildung D.11.:** Markierung von Antikörpern für die Kupfer-freie Click-Reaktion: **(a)** Schema der Markierung von Antikörpern mit *a*-TCO\*-NHS und anschließende Click-Reaktion mit Tetrazin-funktionalisierten chemischen Schaltern; (i) Antikörper in PBS, 5 Äquivalente *a*-TCO\*-NHS, 10 Vol.% NaHCO<sub>3</sub>-Lösung, Raumtemperatur, 1 Stunde, (ii) Tetrazin-modifizierter chemischer Schalter, *a*-TCO\*-Antikörper, PBS, 5 Minuten. **(b)** Test der Markierung und Click-Reaktion an BSA-*a*-TCO\* mit **69**. Das Reaktionsmischung der Markierung von BSA wurde direkt mit **69** versetzt. Nach 10 Minuten Reaktionszeit wurde mittels eines Größenausschluss-Chromatographiesäule aufgetrennt, das Konjugat läuft schneller über die Säule als das freie Farbstoff. Es wurden Fraktionen von 500 µL aufgefangen und die Absorption am Farbstoffmaximum untersucht. **(c)** Fraktionen drei und vier enthalten das Konjugat. **(d)** Markierung von Antikörpern mit ENDO-BCN-NHS und anschließende Click-Reaktion mit Farbstoff-Aziden. **(e)** Testmarkierung von BSA mit ENDO-BCN-NHS und Click-Reaktion mit Atto647N-Azid. **(f)** Die Fraktionen drei und vier (je 500 µL) enthalten hauptsächlich das Konjugat.

## Anhang E.

### Cytotoxizität von $\text{CuSO}_4$

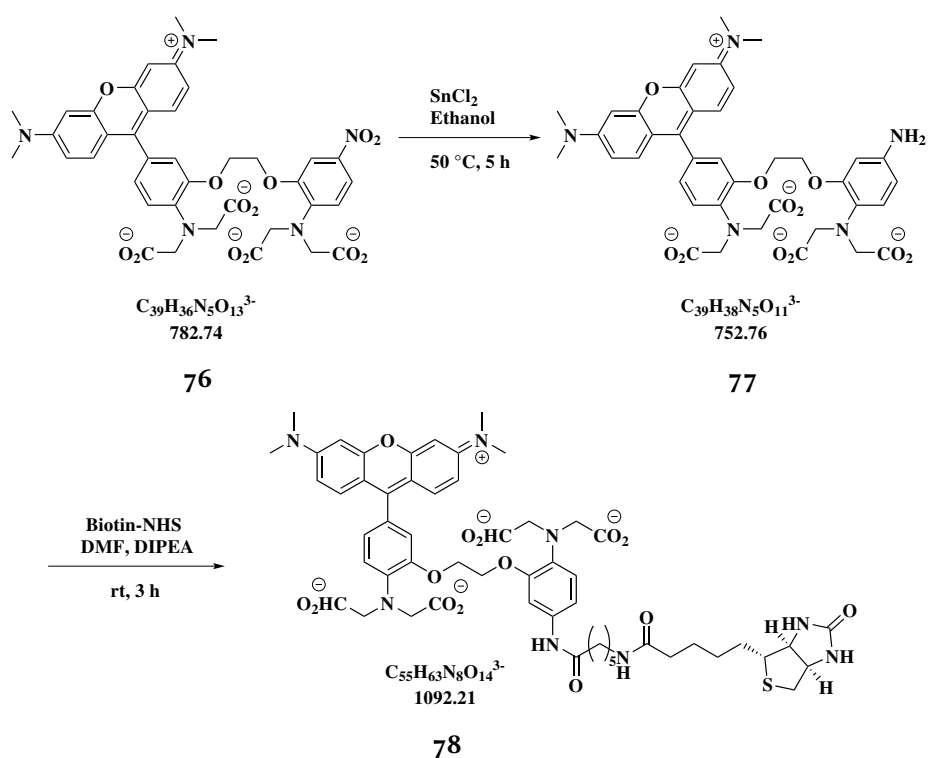


**Abbildung E.1.:** Überlebensrate von HeLa und NIH 3T3 Zellen in reinem Medium (grün) sowie in Anwesenheit von  $50 \mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  in Medium (gelb) und PBS (rot). Es wurden jeweils etwa 1 000 000 Zellen am Vorabend gesetzt und dann für das Experiment mit der jeweiligen Lösung für eine Stunde inkubiert. Dann wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, mit einer 4 % Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 versetzt und nach einer Minute Inkubationszeit in einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl gefärbter (toter) und ungefärbter (lebender) Zellen registriert. Zu jeder Bedingung wurden drei Stichproben ausgezählt. Jede Stichprobe enthielt etwa 100 Zellen, so wurden pro Bedingung und Zelllinie insgesamt etwa 300 Zellen ausgewertet.

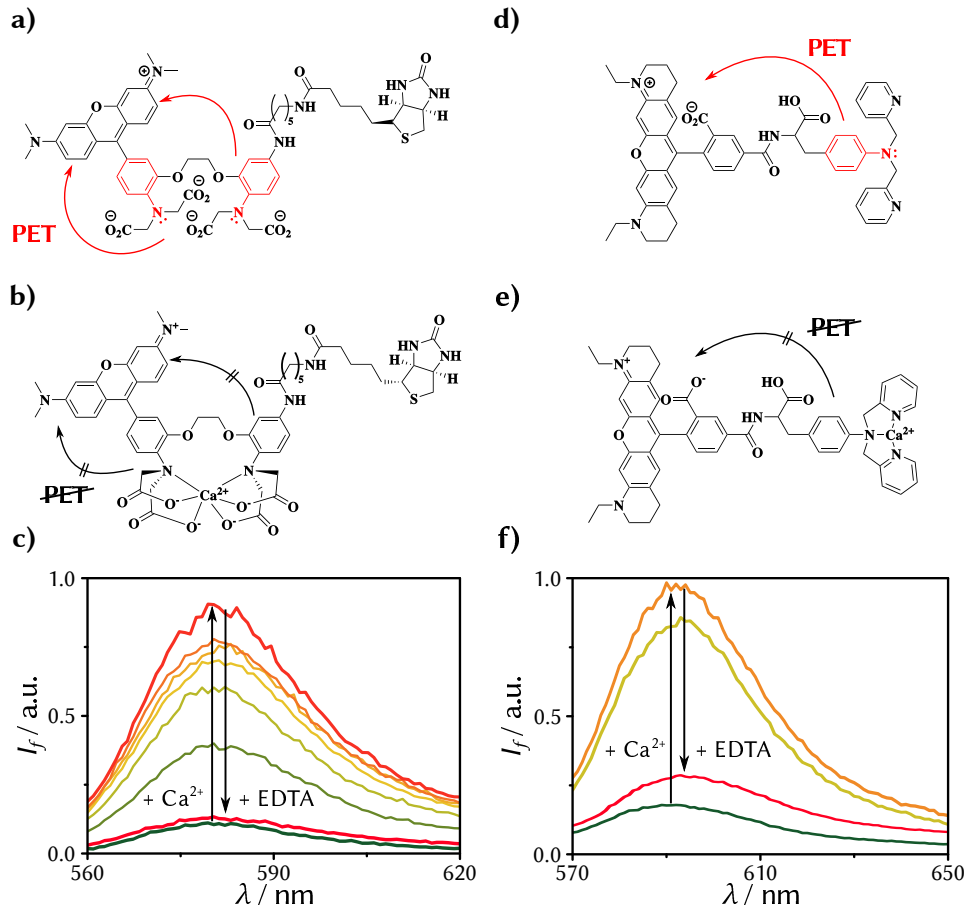


## Anhang F.

### Alternative chemische Schalter



**Schema F.1.:** Synthesesequenz von Rhod-5NH-Biotin **78**: Reduktion der aromatischen Nitrogruppe mit  $SnCl_2$  in Ethanol, Aufreinigung mittels HPLC, danach Umsetzung mit Biotin-NHS und Aufreinigung mittels HPLC.

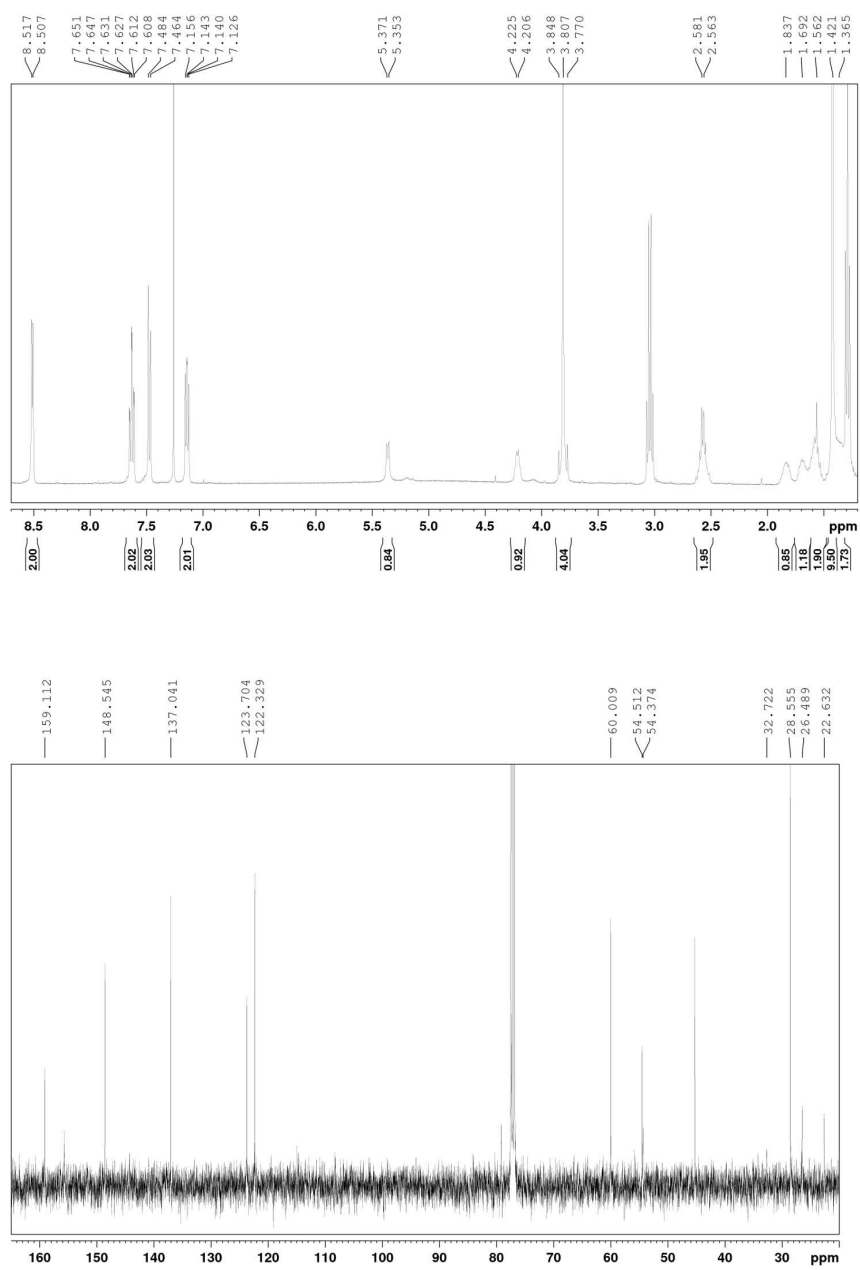


**Abbildung F.1.:** Alternative Ansätze für chemische „Turn-On“ Schalter: (a) Struktur von Rhod-5NH-Biotin **78**, das aus dem kommerziell erhältlichen Rhod-5N durch Reduktion mit SnCl<sub>2</sub> in Ethanol und anschließender Umsetzung mit Biotin-NHS gewonnen wurde. (b) Nach Komplexierung von Ca<sup>2+</sup> wird das fluoreszenzlöschende Anilin-Motiv unterbrochen und die Quantenausbeute der Verbindung steigt deutlich an. (c) Die Fluoreszenztitration mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung zeigte einen Anstieg der Fluoreszenz, der nach EDTA-Zugabe wieder zurück ging. Die Restfluoreszenz der freien Verbindung betrug hier noch etwa 15%. (d) Struktur von Atto565-Phe-DPA, welches aus **56** und Atto565-NHS gewonnen und mittels HPLC aufgereinigt wurde. (e) Komplexierung von Ca<sup>2+</sup> hat den gleichen Effekt wie für **b** beschrieben. (f) Die Verbindung zeigte einen etwa fünffachen Fluoreszenzanstieg bei Zugabe von CaCl<sub>2</sub>, der sich durch Zugabe von EDTA rückgängig machen ließ. Hier betrug die Restfluoreszenz der freien Verbindung etwa 20%.



# **Anhang G.**

## **NMR-Spektren**



**Abbildung G.1.:** <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) von **2** in CDCl<sub>3</sub> (oben), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) von **2** in CDCl<sub>3</sub> (unten).

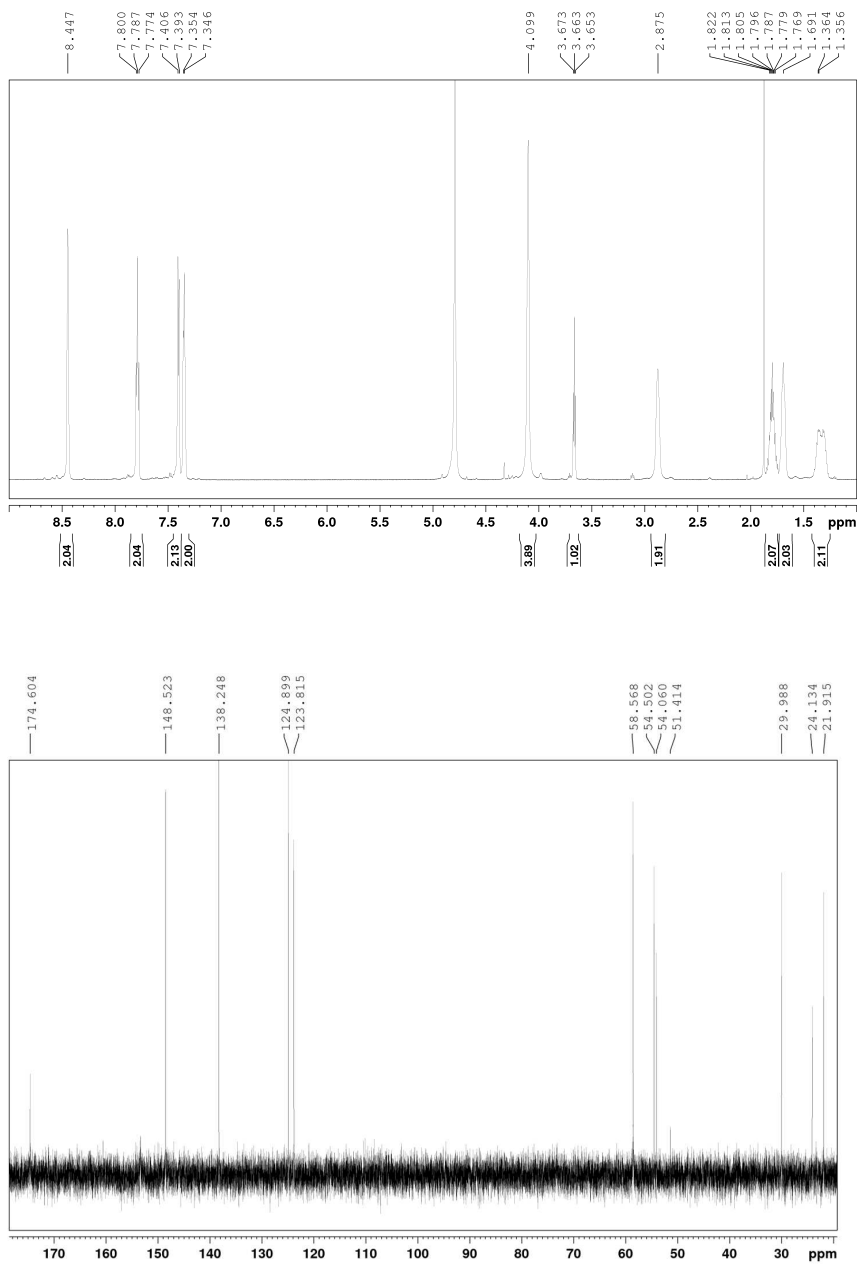


Abbildung G.2.:  $^1\text{H-NMR}$  von **4** (600 MHz) in  $\text{D}_2\text{O}$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) von **4** in  $\text{D}_2\text{O}$  (unten).

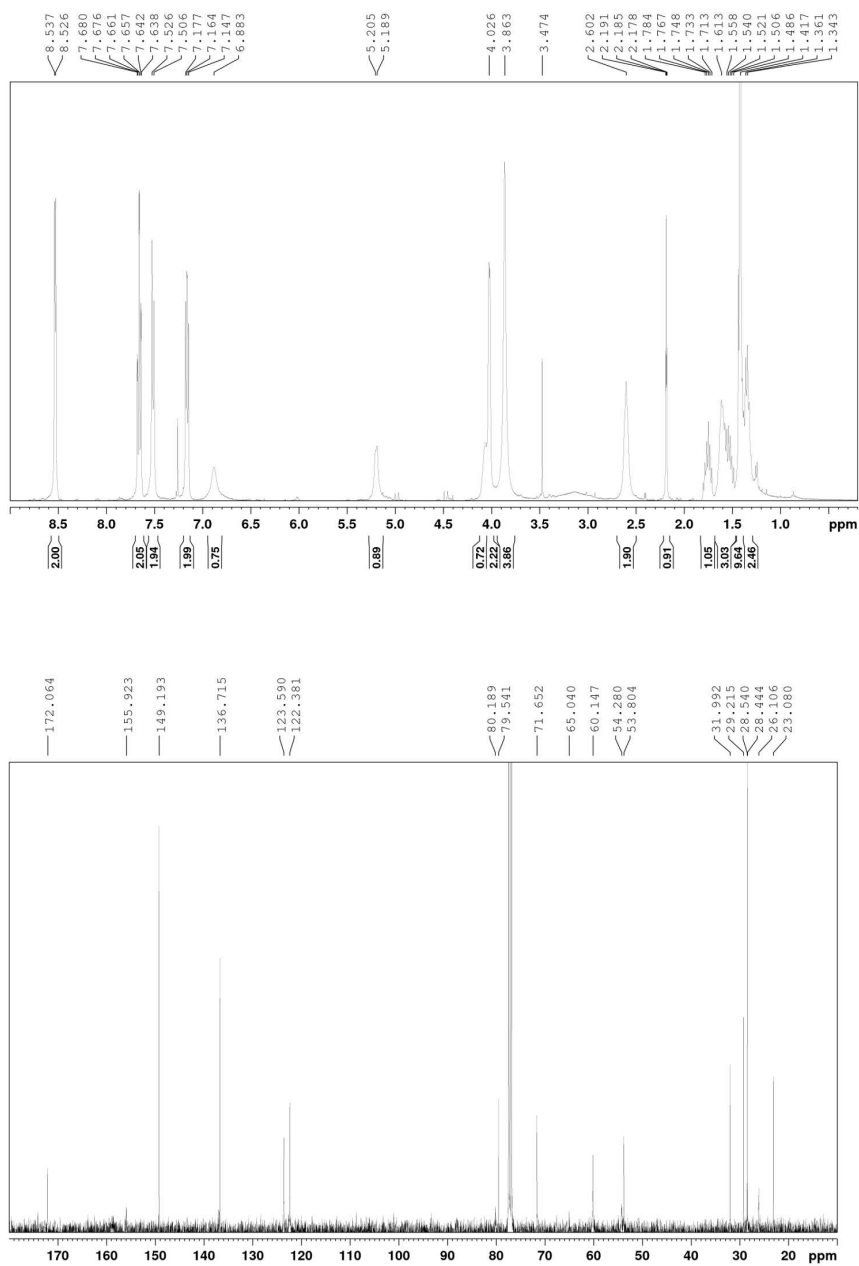


Abbildung G.3.:  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) von **17** in  $\text{CDCl}_3$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) von **17** in  $\text{CDCl}_3$  (unten).

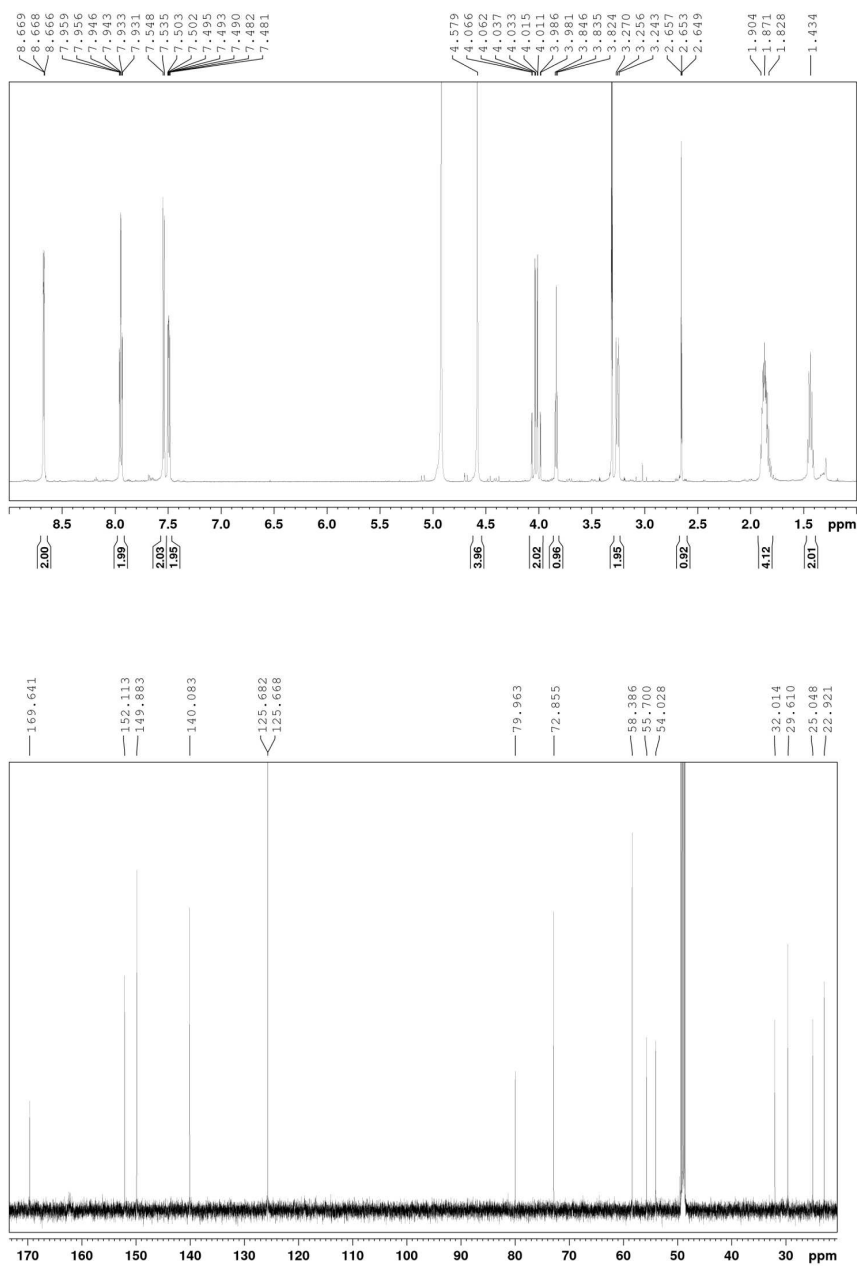


Abbildung G.4.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von 7 in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von 7 in CD<sub>3</sub>OD (unten).

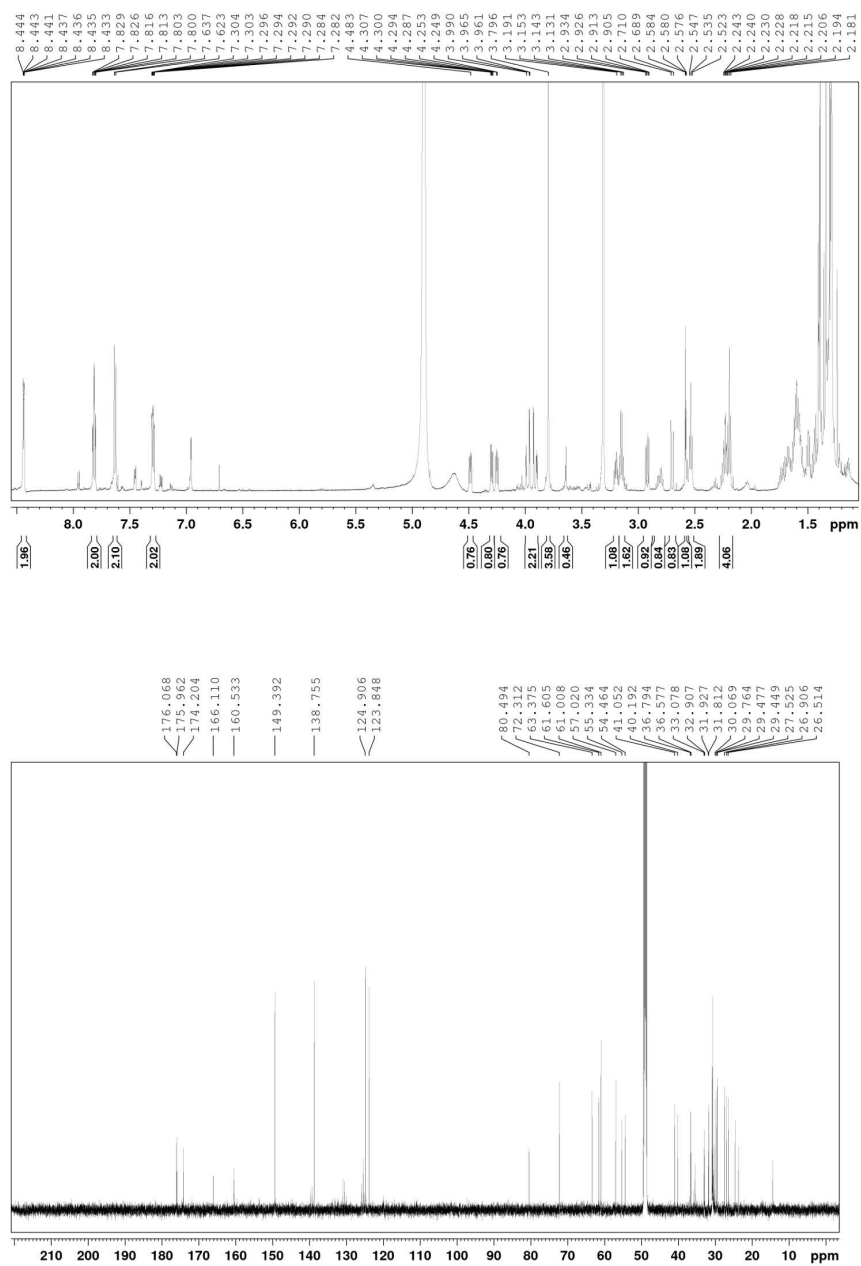


Abbildung G.5.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von **19** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von **19** in CD<sub>3</sub>OD (unten).

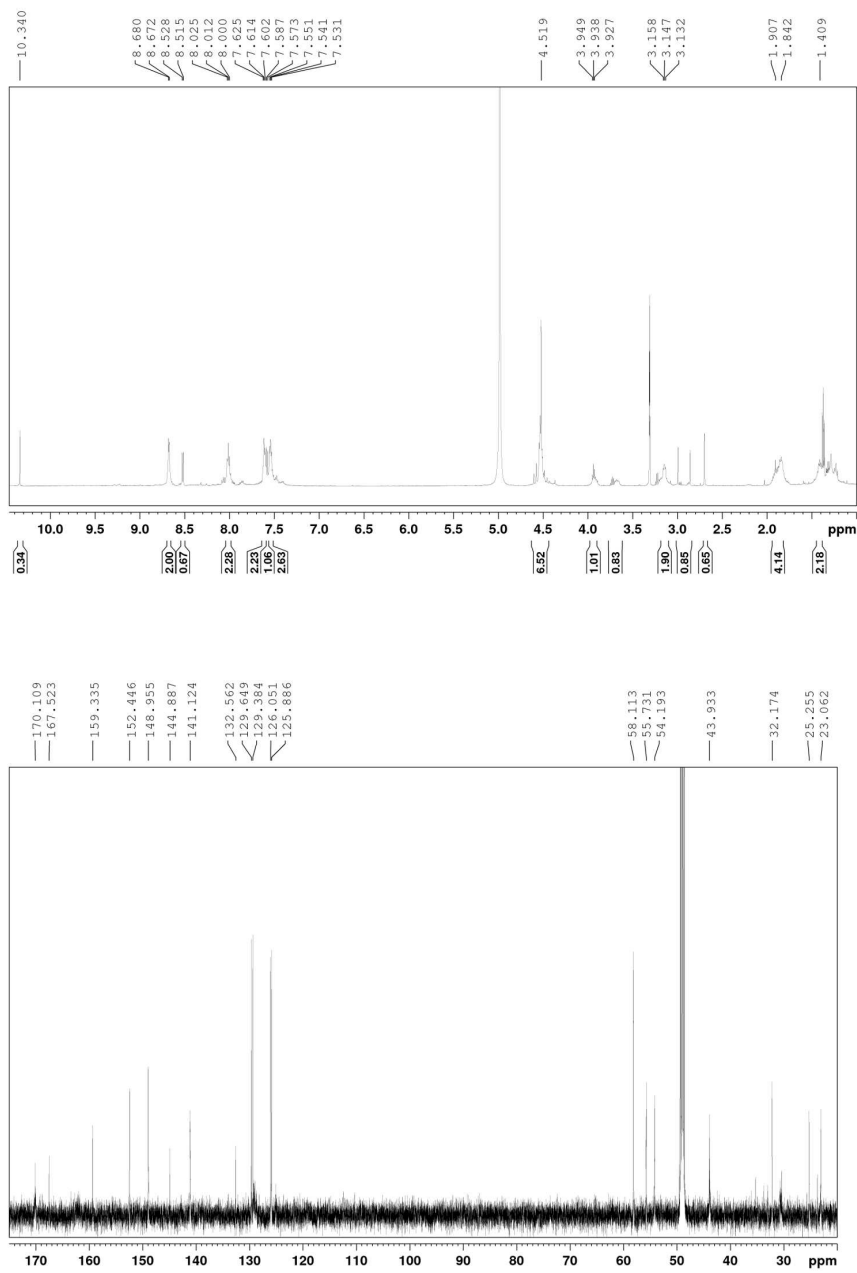


Abbildung G.6.: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) von **9** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) von **9** in CD<sub>3</sub>OD (unten).

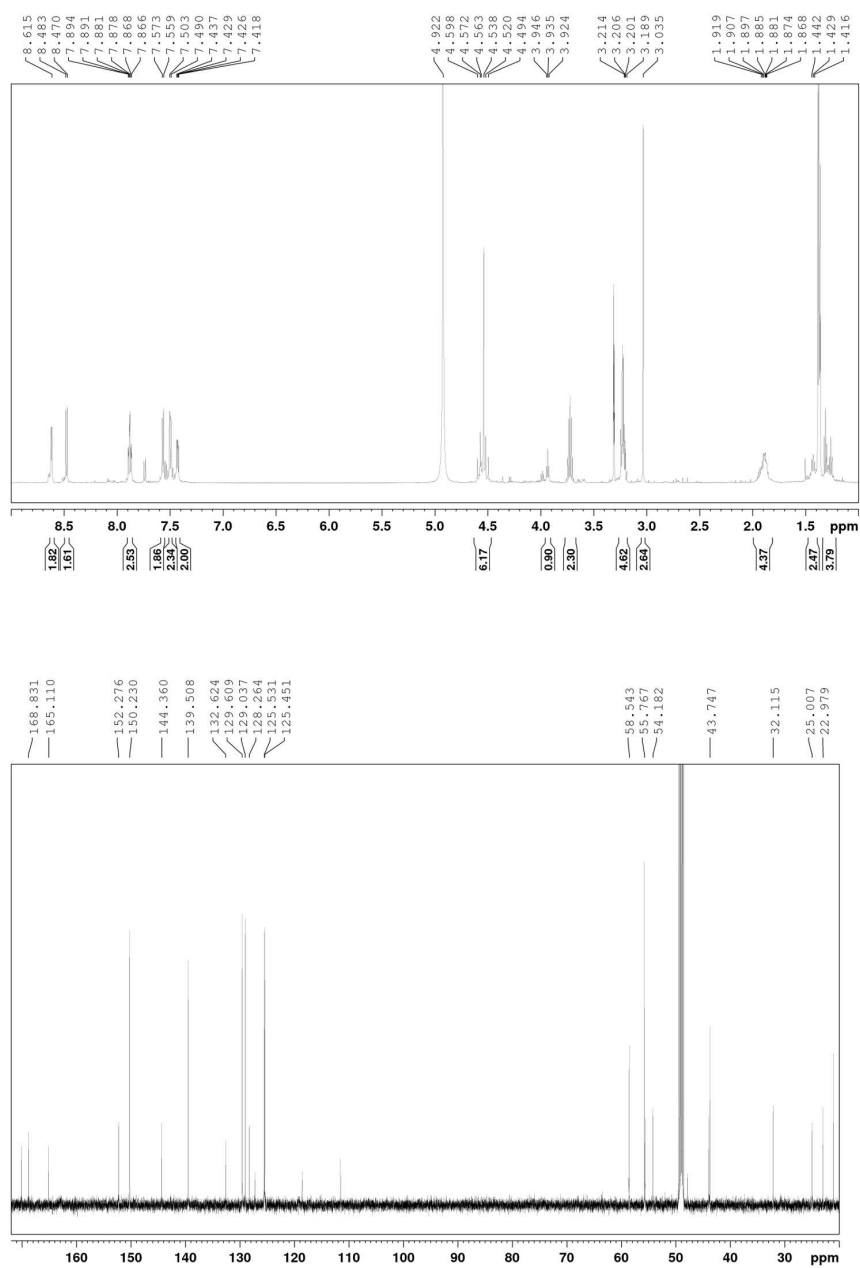


Abbildung G.7.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von **11** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von **11** in CD<sub>3</sub>OD (unten).



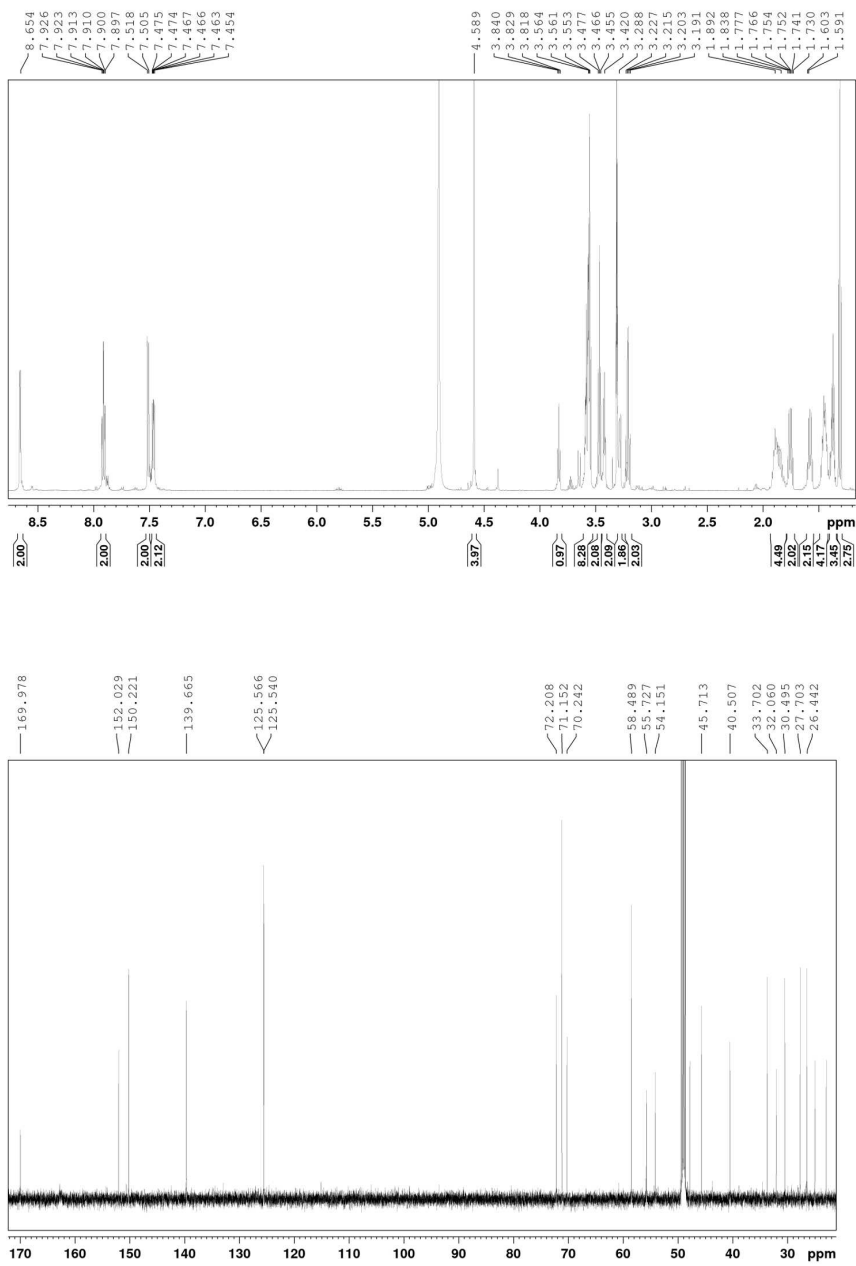


Abbildung G.8.: <sup>1</sup>H-NMR von (600 MHz) **13** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von **13** in CD<sub>3</sub>OD (unten).

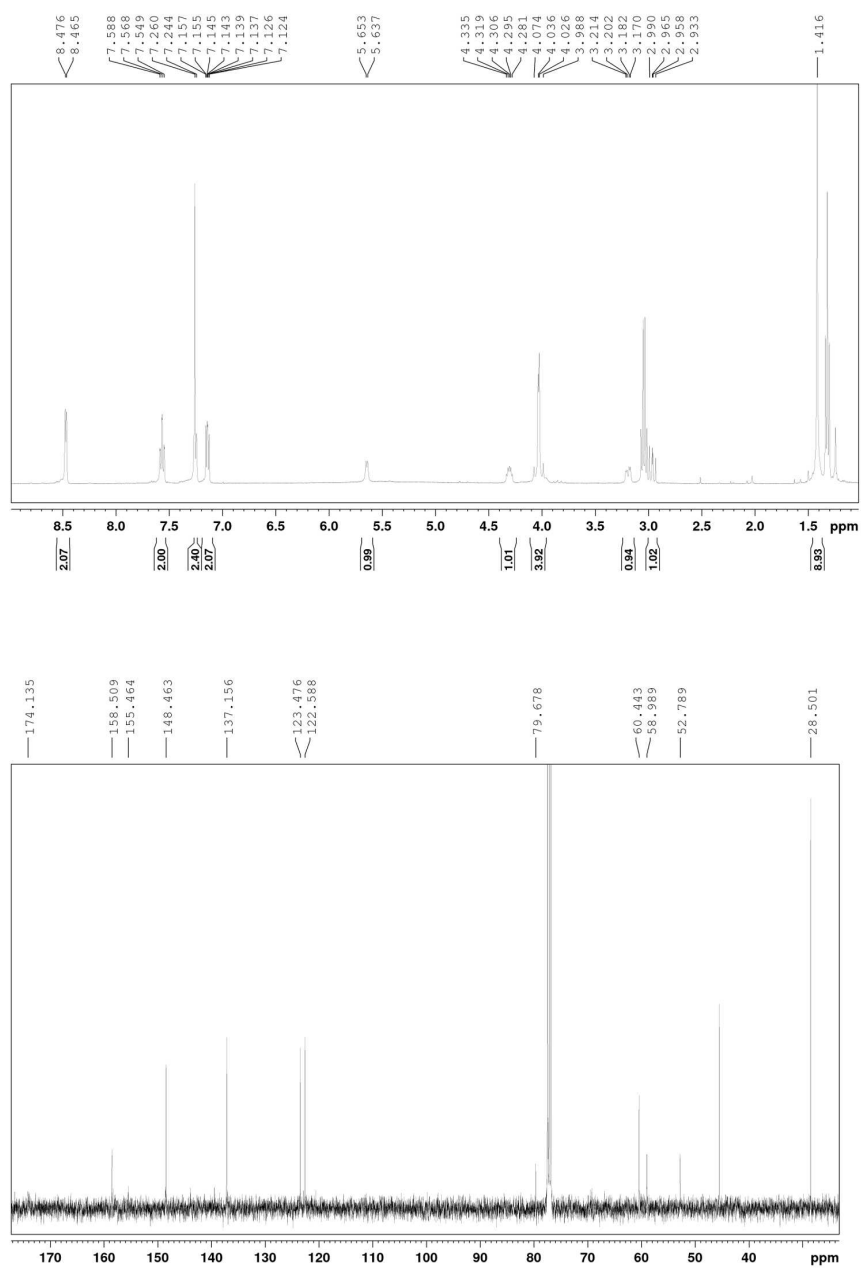


Abbildung G.9.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von **1** in CDCl<sub>3</sub> (oben), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) von **1** in CDCl<sub>3</sub> (unten).

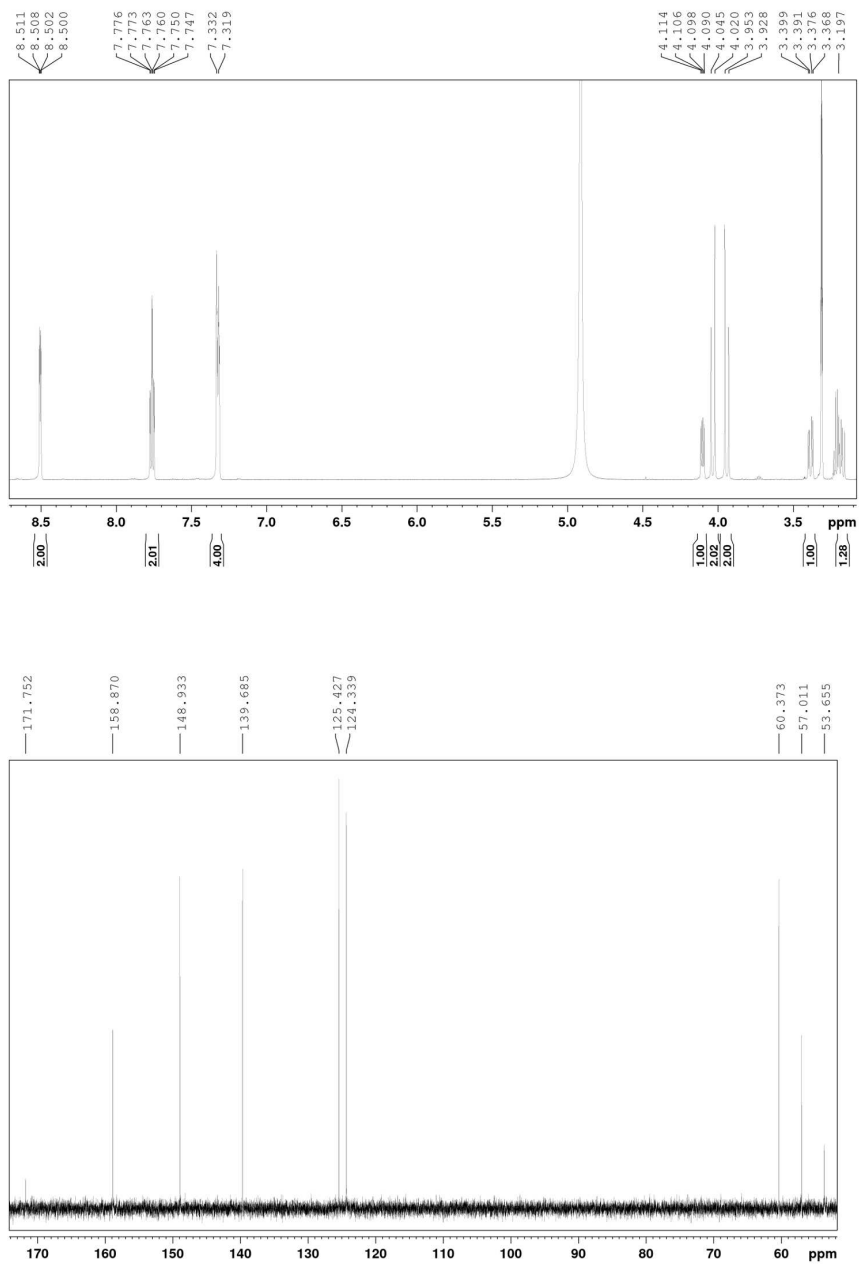


Abbildung G.10.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von 3 in D<sub>2</sub>O (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von 3 in D<sub>2</sub>O (unten).

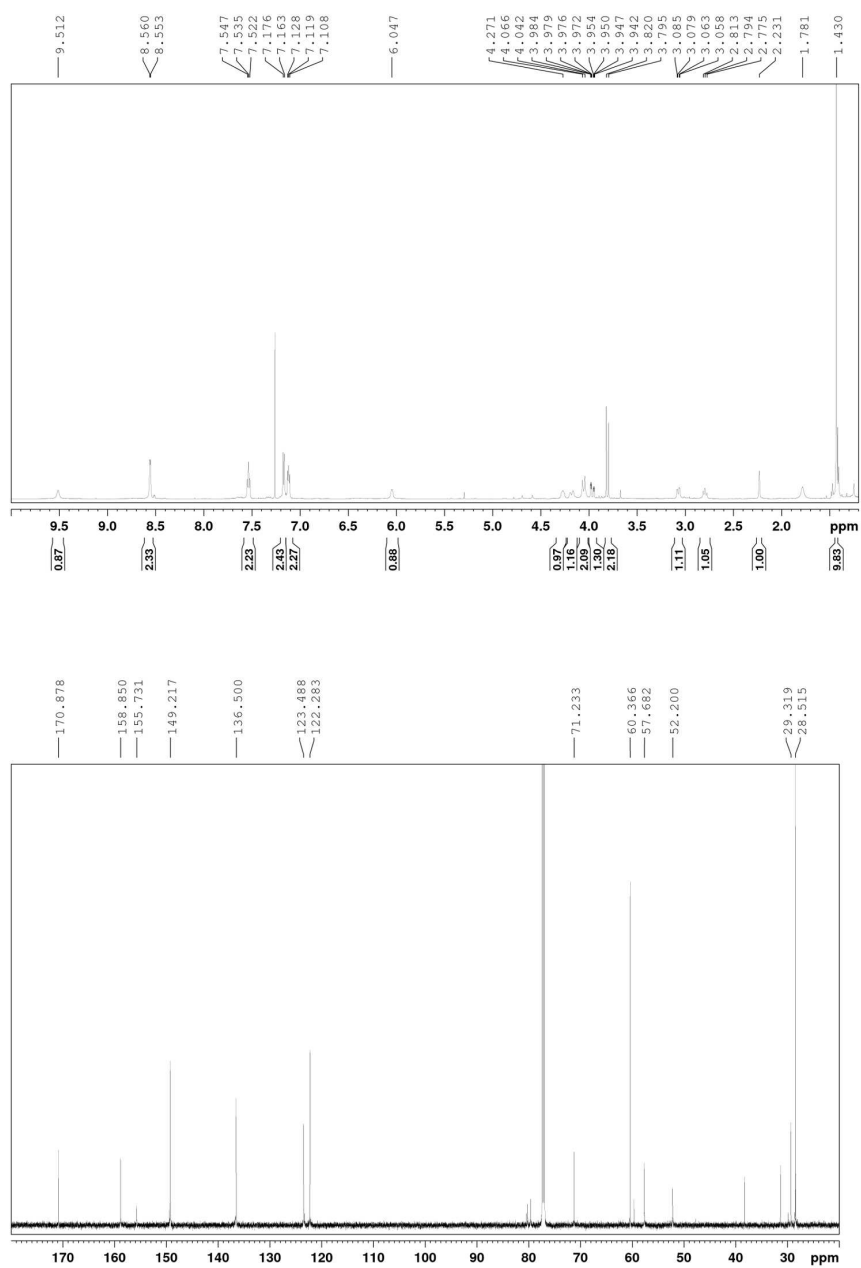


Abbildung G.11.:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) von **16** in  $\text{CDCl}_3$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) von **16** in  $\text{CDCl}_3$  (unten).

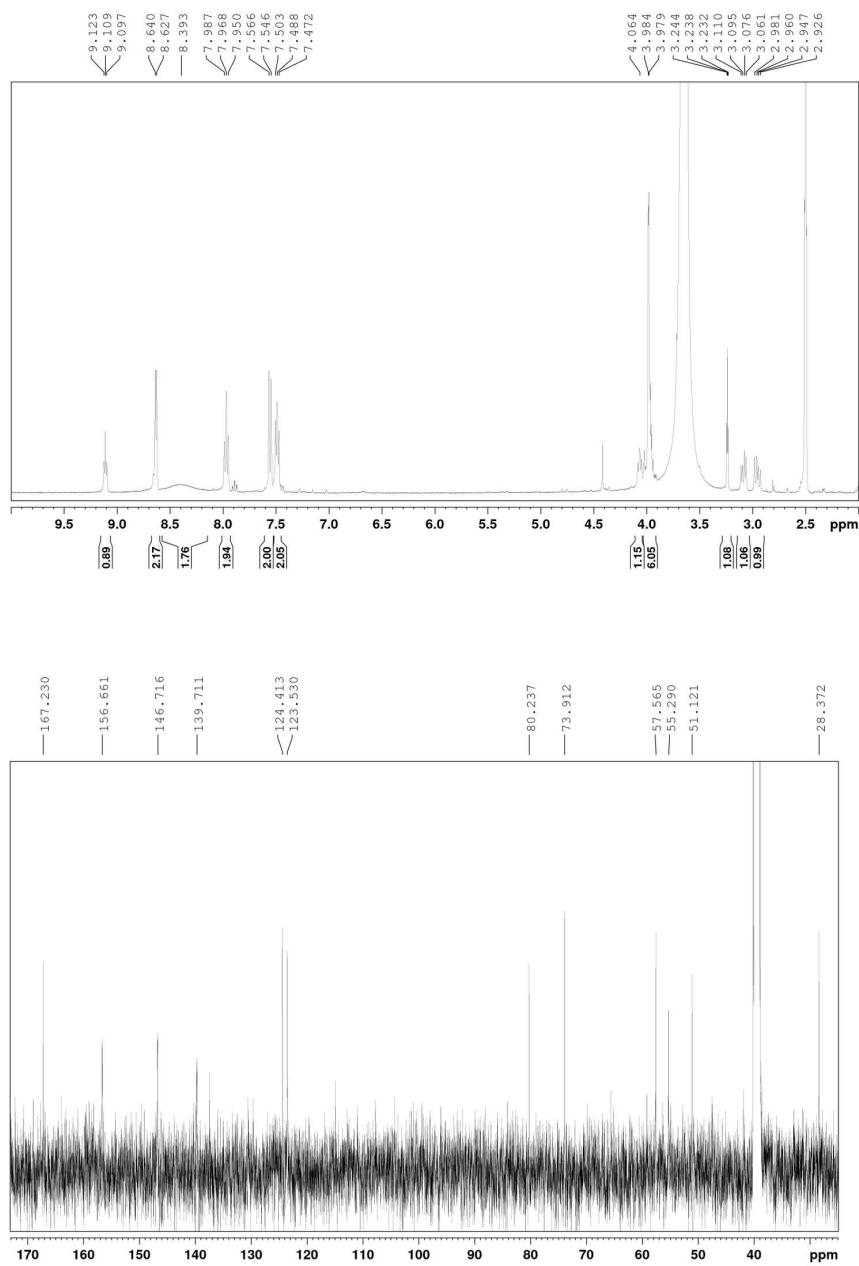
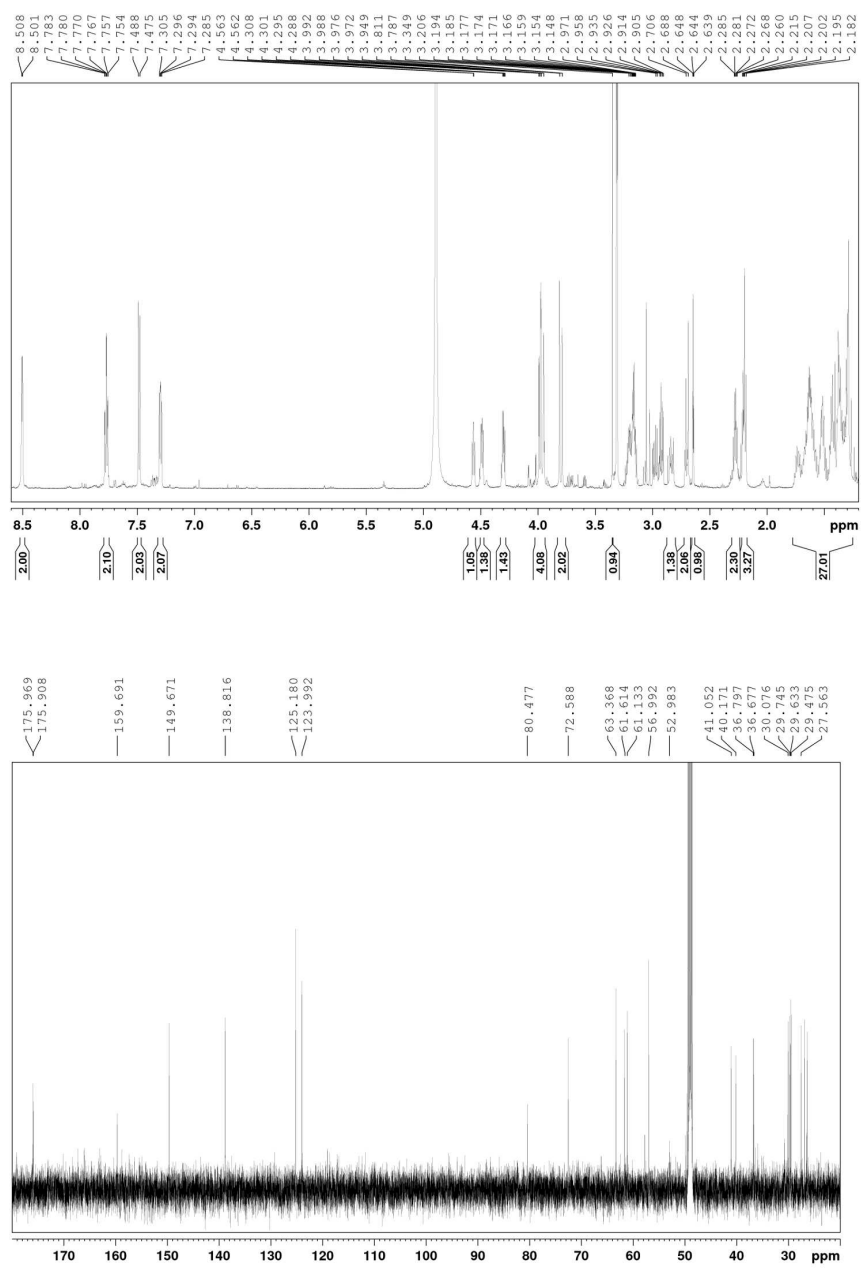


Abbildung G.12.:  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) von **6** in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (oben),  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) von **6** in  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (unten).



**Abbildung G.13.:**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) von **18** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) von **18** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (unten).

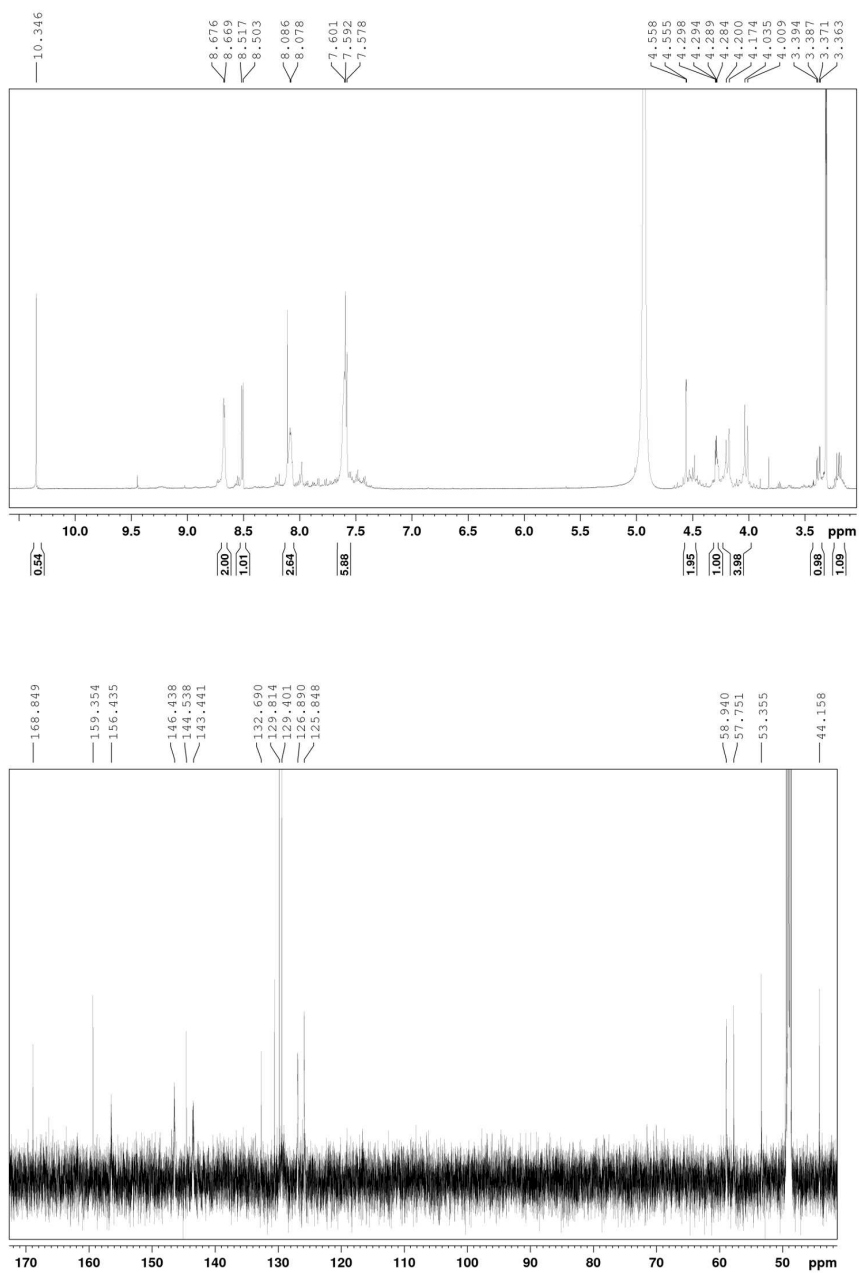


Abbildung G.14.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von **8** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von **8** in CD<sub>3</sub>OD (unten).

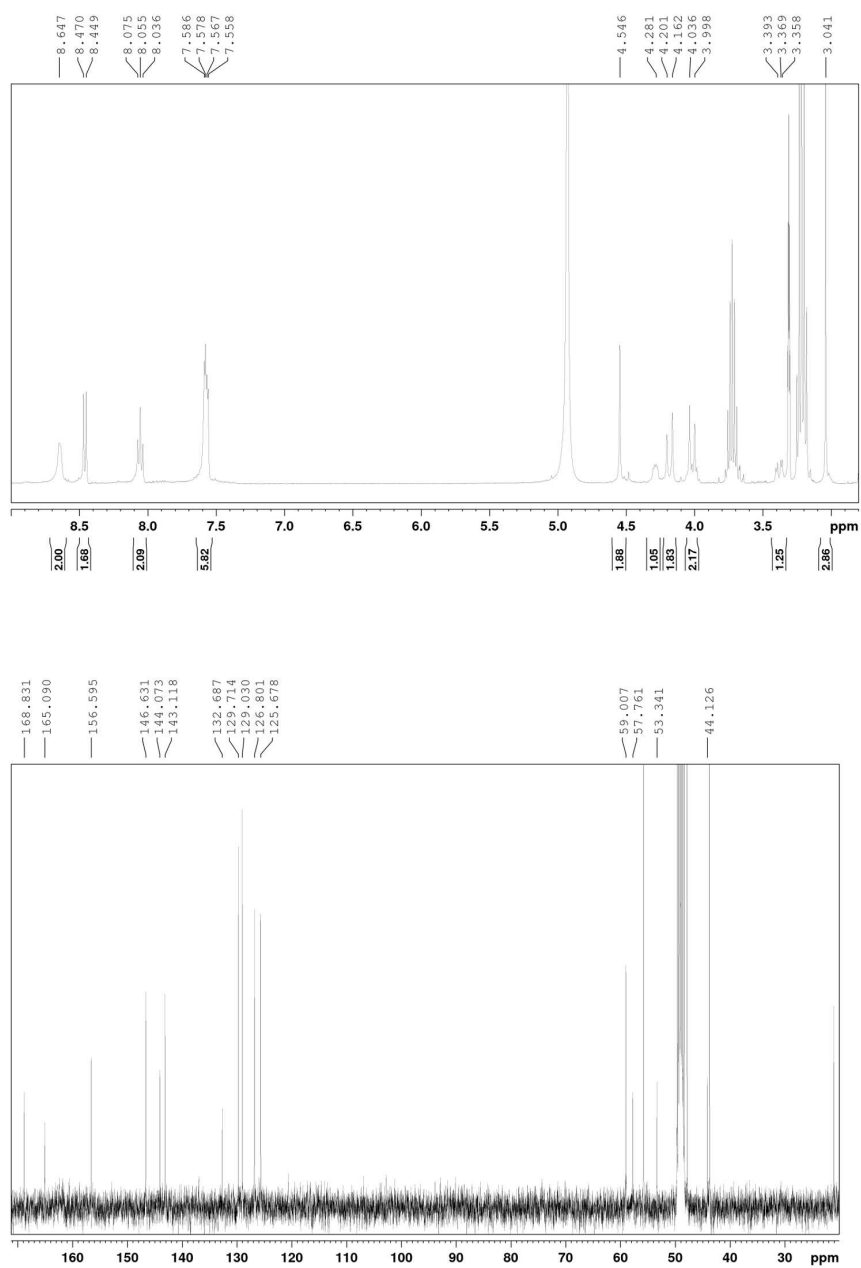


Abbildung G.15.: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) von **10** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) von **10** in CD<sub>3</sub>OD (unten).



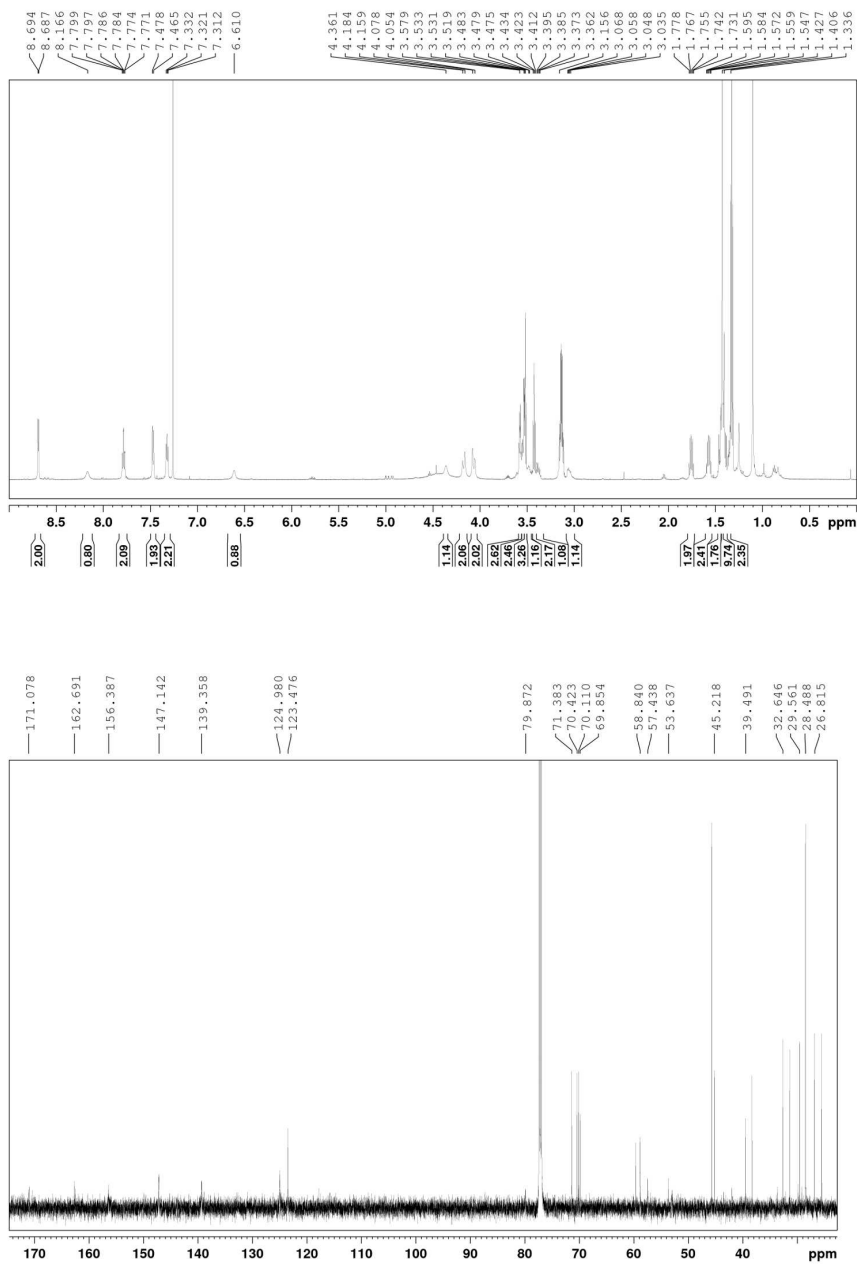


Abbildung G.16.:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) von **52** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) von **52** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (unten).

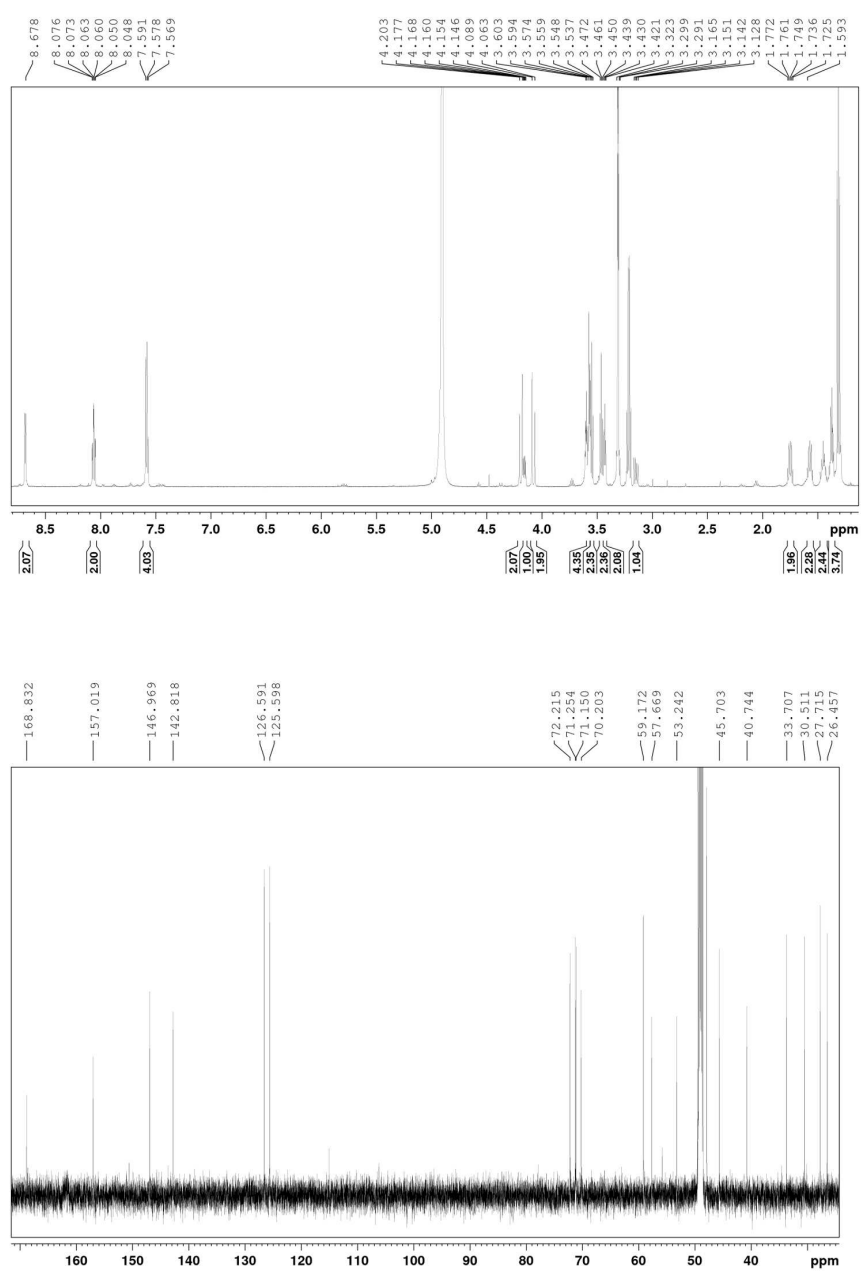


Abbildung G.17.: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) von **12** in CD<sub>3</sub>OD (oben), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) von **12** in CD<sub>3</sub>OD (unten).

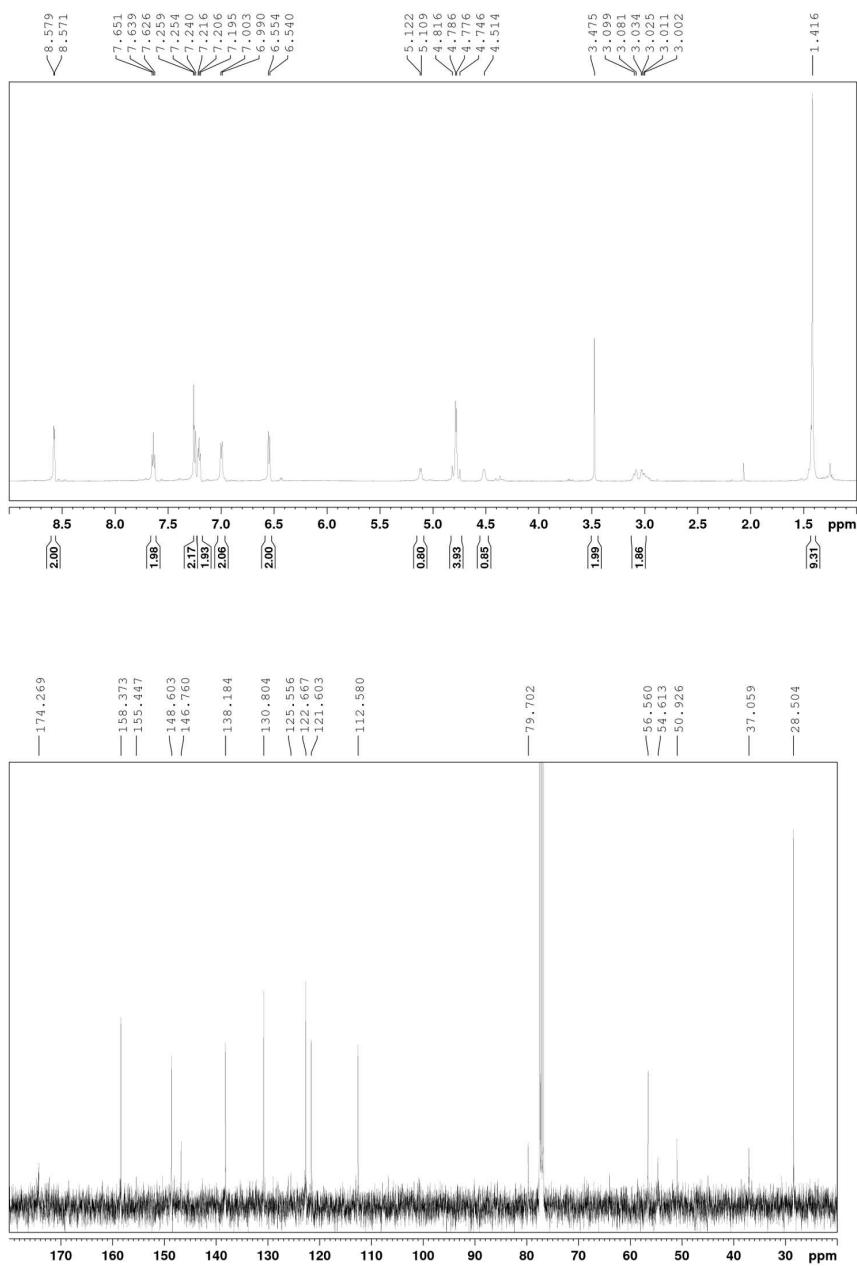
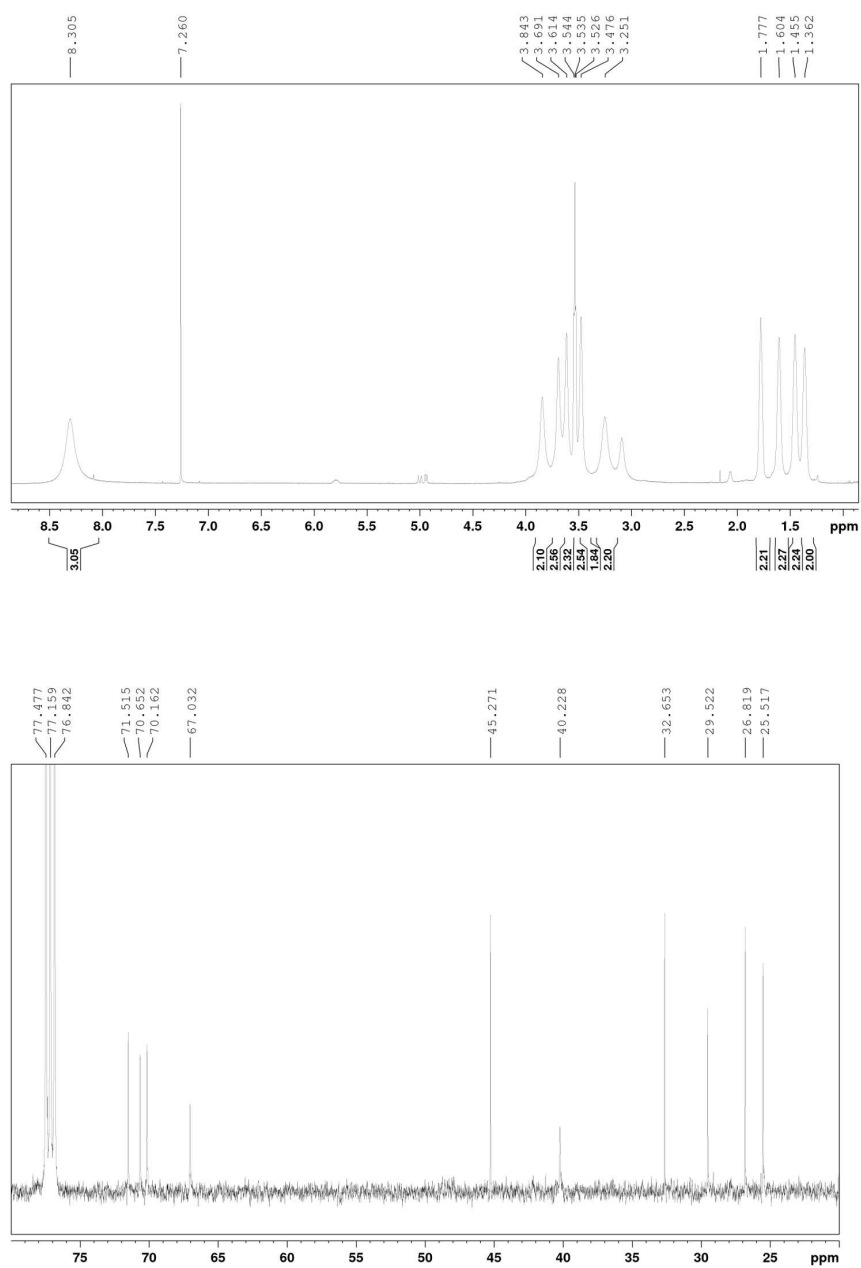


Abbildung G.18.:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) von **55** in  $\text{CDCl}_3$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) von **55** in  $\text{CDCl}_3$  (unten).



**Abbildung G.19.:**  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) von **32** in  $\text{CDCl}_3$  (oben),  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) von **32** in  $\text{CDCl}_3$  (unten).

## Literaturverzeichnis

- [1] Leewenhoek, M.; de Graaf, R. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1673**, *8*, 6037–6038.
- [2] van Leewenhoek, A. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1677**, *12*, 821–831.
- [3] Abbe, E. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1873**, *9*, 418–440.
- [4] van Noorden, R. *Nature* **2014**, *514*, 286.
- [5] Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular fluorescence: Principles and applications*; Wiley-VCH: Weinheim, 2. ed. ed.; 2012.
- [6] Jaffe, H. H.; Miller, A. L. *Journal of Chemical Education* **1966**, *43*, 469.
- [7] Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463–562.
- [8] Shimomura, O.; Johnson, F. H.; Saiga, Y. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **1962**, *59*, 223–239.
- [9] Cranfill, P. J.; Sell, B. R.; Baird, M. A.; Allen, J. R.; Lavagnino, Z.; de Gruiter, H. M.; Kremers, G.-J.; Davidson, M. W.; Ustione, A.; Piston, D. W. *Nature methods* **2016**, .
- [10] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.; Prasher, D. *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [11] Tsien, R. Y. *Annual review of biochemistry* **1998**, *67*, 509–544.
- [12] Albin, A.; Fagnoni, M. *Handbook of Synthetic Photochemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2009.
- [13] Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*; Springer Science+Business Media, LLC: Boston, MA, 3. ed ed.; 2006.
- [14] Dexter, D. L. *The Journal of Chemical Physics* **1953**, *21*, 836.

- [15] Förster, T. *Annalen der Physik* **1948**, *437*, 55–75.
- [16] Roy, R.; Hohng, S.; Ha, T. *Nature methods* **2008**, *5*, 507–516.
- [17] Truong, K.; Ikura, M. *Current Opinion in Structural Biology* **2001**, *11*, 573–578.
- [18] Kajihara, D.; Abe, R.; Iijima, I.; Komiyama, C.; Sisido, M.; Hohsaka, T. *Nature methods* **2006**, *3*, 923–929.
- [19] Kenworthy, A. K. *Methods (San Diego, Calif.)* **2001**, *24*, 289–296.
- [20] Lleres, D.; Swift, S.; Lamond, A. I. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]* **2007**, *Chapter 12*, Unit12.10.
- [21] Li, I. T.; Pham, E.; Truong, K. *Biotechnology letters* **2006**, *28*, 1971–1982.
- [22] Lukinavicius, G. *et al. Nature chemistry* **2013**, *5*, 132–139.
- [23] Kolmakov, K.; Hebisch, E.; Wolfram, T.; Nordwig, L. A.; Wurm, C. A.; Ta, H.; Westphal, V.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*, 13344–13356.
- [24] Grimm, J. B.; Klein, T.; Kopek, B. G.; Shtengel, G.; Hess, H. F.; Sauer, M.; Lavis, L. D. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *128*, 1755–1759.
- [25] Koide, Y.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Piao, W.; Kusakabe, M.; Saito, N.; Terai, T.; Okabe, T.; Nagano, T. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 5029–5031.
- [26] Grimm, J. B.; English, B. P.; Chen, J.; Slaughter, J. P.; Zhang, Z.; Revyakin, A.; Patel, R.; Macklin, J. J.; Normanno, D.; Singer, R. H.; Lionnet, T.; Lavis, L. D. *Nature Methods* **2015**, *12*, 244–250.
- [27] Carlson, J. C. T.; Meimetis, L. G.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 6917–6920.
- [28] Uno, S.-N.; Kamiya, M.; Yoshihara, T.; Sugawara, K.; Okabe, K.; Tarhan, M. C.; Fujita, H.; Funatsu, T.; Okada, Y.; Tobita, S.; Urano, Y. *Nature Chemistry* **2014**, *6*, 681–689.
- [29] Kolmakov, K.; Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Harke, B.; Leutenegger, M.; Eggeling, C.; Hell, S. W. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010*, 3593–3610.

- [30] Wurm, C. A.; Kolmakov, K.; Göttfert, F.; Ta, H.; Bossi, M.; Schill, H.; Berning, S.; Jakobs, S.; Donnert, G.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Optical Nanoscopy* **2012**, *1*, 7.
- [31] Park, Y. I.; Lee, K. T.; Suh, Y. D.; Hyeon, T. *Chemical Society reviews* **2015**, *44*, 1302–1317.
- [32] Shin, D.; Vigneswaran, N.; Gillenwater, A.; Richards-Kortum, R. *Future oncology (London, England)* **2010**, *6*, 1143–1154.
- [33] Fortin, P.-Y.; Genevois, C.; Koenig, A.; Heinrich, E.; Texier, I.; Couillaud, F. *Journal of biomedical optics* **2012**, *17*, 126004.
- [34] Judy, R. P.; Keating, J. J.; DeJesus, E. M.; Jiang, J. X.; Okusanya, O. T.; Nie, S.; Holt, D. E.; Arlauckas, S. P.; Low, P. S.; Delikatny, E. J.; Singhal, S. *Scientific reports* **2015**, *5*, 16208.
- [35] Rayleigh, *Philosophical Magazine Series 5* **1879**, *8*, 261–274.
- [36] Hecht, E. *Optik*; Oldenbourg: München, 5. Aufl. ed.; 2009.
- [37] Capoulade, J.; Wachsmuth, M.; Hufnagel, L.; Knop, M. *Nature biotechnology* **2011**, *29*, 835–839.
- [38] Cella Zanacchi, F.; Lavagnino, Z.; Perrone Donnorso, M.; Del Bue, A.; Furia, L.; Faretta, M.; Diaspro, A. *Nature methods* **2011**, *8*, 1047–1049.
- [39] Xu, K.; Babcock, H. P.; Zhuang, X. *Nature Methods* **2012**, *9*, 185–188.
- [40] Juette, M. F.; Gould, T. J.; Lessard, M. D.; Mlodzianoski, M. J.; Nagpure, B. S.; Bennett, B. T.; Hess, S. T.; Bewersdorf, J. *Nature methods* **2008**, *5*, 527–529.
- [41] Heilemann, M.; van de Linde, Sebastian.; Schuttpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P.; Sauer, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 6172–6176.
- [42] Grimm, J. B.; Klein, T.; Kopek, B. G.; Shtengel, G.; Hess, H. F.; Sauer, M.; Lavis, L. D. *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 1723–1727.
- [43] Schwering, M.; Kiel, A.; Kurz, A.; Lympelopoulos, K.; Sprödefeld, A.; Krämer, R.; Herten, D.-P. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 2940–2945.

- [44] Michael Schwering, "Die Entwicklung neuer Methoden in der Fluoreszenzmikroskopie auf Basis reversibler chemischer Reaktionen, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg", **2012**.
- [45] Legant, W. R.; Shao, L.; Grimm, J. B.; Brown, T. A.; Milkie, D. E.; Avants, B. B.; Lavis, L. D.; Betzig, E. *Nature Methods* **2016**, .
- [46] Osseforth, C.; Moffitt, J. R.; Schermelleh, L.; Michaelis, J. *Optics express* **2014**, *22*, 7028–7039.
- [47] Hell, S. W. *Nature biotechnology* **2003**, *21*, 1347–1355.
- [48] Hell, S. W. *Nature methods* **2009**, *6*, 24–32.
- [49] Schermelleh, L.; Heintzmann, R.; Leonhardt, H. *The Journal of cell biology* **2010**, *190*, 165–175.
- [50] Hell, S. W. *et al. Journal of Physics D: Applied Physics* **2015**, *48*, 443001.
- [51] Lippincott-Schwartz, J.; Manley, S. *Nature methods* **2009**, *6*, 21–23.
- [52] Gustafsson, M. G. L.; Shao, L.; Carlton, P. M.; Wang, C. J. R.; Golubovskaya, I. N.; Cande, W. Z.; Agard, D. A.; Sedat, J. W. *Biophysical Journal* **2008**, *94*, 4957–4970.
- [53] Heintzmann, R.; Gustafsson, M. G. L. *Nature Photonics* **2009**, *3*, 362–364.
- [54] Dertinger, T.; Colyer, R.; Iyer, G.; Weiss, S.; Enderlein, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 22287–22292.
- [55] Dertinger, T.; Colyer, R.; Vogel, R.; Enderlein, J.; Weiss, S. *Optics express* **2010**, *18*, 18875–18885.
- [56] Geissbuehler, S.; Dellagiacoma, C.; Lasser, T. *Biomedical optics express* **2011**, *2*, 408–420.
- [57] Müller, T.; Schumann, C.; Kraegeloh, A. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1986–2000.
- [58] Gottfert, F.; Wurm, C. A.; Mueller, V.; Berning, S.; Cordes, V. C.; Honigmann, A.; Hell, S. W. *Biophysical Journal* **2013**, *105*, L01-3.
- [59] Donnert, G.; Keller, J.; Wurm, C. A.; Rizzoli, S. O.; Westphal, V.; Schönlle, A.; Jahn, R.; Jakobs, S.; Eggeling, C.; Hell, S. W. *Biophysical Journal* **2007**, *92*, L67-9.



- [60] Vicidomini, G.; Moneron, G.; Han, K. Y.; Westphal, V.; Ta, H.; Reuss, M.; Engelhardt, J.; Eggeling, C.; Hell, S. W. *Nature methods* **2011**, *8*, 571–573.
- [61] Moffitt, J. R.; Osseforth, C.; Michaelis, J. *Optics express* **2011**, *19*, 4242–4254.
- [62] Willig, K. I.; Harke, B.; Medda, R.; Hell, S. W. *Nature methods* **2007**, *4*, 915–918.
- [63] Hell, S. W.; Schmidt, R.; Egner, A. *Nature Photonics* **2009**, *3*, 381–387.
- [64] Bingen, P.; Reuss, M.; Engelhardt, J.; Hell, S. W. *Optics express* **2011**, *19*, 23716–23726.
- [65] Yang, B.; Przybilla, F.; Mestre, M.; Trebbia, J.-B.; Lounis, B. *Optics express* **2014**, *22*, 5581–5589.
- [66] Wildanger, D.; Patton, B. R.; Schill, H.; Marseglia, L.; Hadden, J. P.; Knauer, S.; Schonle, A.; Rarity, J. G.; O'Brien, J. L.; Hell, S. W.; Smith, J. M. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* **2012**, *24*, OP309–13.
- [67] van de Linde, Sebastian.; Sauer, M. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 1076.
- [68] Rust, M. J.; Bates, M.; Zhuang, X. *Nature methods* **2006**, *3*, 793–795.
- [69] Betzig, E.; Patterson, G. H.; Sougrat, R.; Lindwasser, O. W.; Olenych, S.; Bonifacino, J. S.; Davidson, M. W.; Lippincott-Schwartz, J.; Hess, H. F. *Science (New York, N.Y.)* **2006**, *313*, 1642–1645.
- [70] Hess, S. T.; Girirajan, T. P. K.; Mason, M. D. *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 4258–4272.
- [71] Zhuang, X. *Nature photonics* **2009**, *3*, 365–367.
- [72] Viswanathan, S. *et al. Nature methods* **2015**, *12*, 568–576.
- [73] Kim, D.; Deerinck, T. J.; Sigal, Y. M.; Babcock, H. P.; Ellisman, M. H.; Zhuang, X. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124581.
- [74] Sigal, Y. M.; Speer, C. M.; Babcock, H. P.; Zhuang, X. *Cell* **2015**, *163*, 493–505.
- [75] Zhang, Z.; Kenny, S. J.; Hauser, M.; Li, W.; Xu, K. *Nature Methods* **2015**, *12*, 935–938.
- [76] Izeddin, I.; Specht, C. G.; Lelek, M.; Darzacq, X.; Triller, A.; Zimmer, C.; Dahan, M. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15611.

- [77] Whelan, D. R.; Holm, T.; Sauer, M.; Bell, T. D. M. *Australian Journal of Chemistry* **2013**, .
- [78] Ehmann, N.; van de Linde, Sebastian.; Alon, A.; Ljaschenko, D.; Keung, X. Z.; Holm, T.; Rings, A.; DiAntonio, A.; Hallermann, S.; Ashery, U.; Heckmann, M.; Sauer, M.; Kittel, R. J. *Nature communications* **2014**, *5*, 4650.
- [79] Löscherger, A.; Franke, C.; Krohne, G.; van de Linde, Sebastian.; Sauer, M. *Journal of cell science* **2014**, *127*, 4351–4355.
- [80] Paul, M. M.; Pauli, M.; Ehmann, N.; Hallermann, S.; Sauer, M.; Kittel, R. J.; Heckmann, M. *Frontiers in cellular neuroscience* **2015**, *9*, 29.
- [81] Hennig, S.; van de Linde, Sebastian.; Bergmann, S.; Huser, T.; Sauer, M. *ACS nano* **2015**, *9*, 8122–8130.
- [82] Molle, J.; Raab, M.; Holzmeister, S.; Schmitt-Monreal, D.; Grohmann, D.; He, Z.; Tinnefeld, P. *Current opinion in biotechnology* **2016**, *39*, 8–16.
- [83] Galland, R.; Greci, G.; Aravind, A.; Viasnoff, V.; Studer, V.; Sibarita, J.-B. *Nature Methods* **2015**, *12*, 641–644.
- [84] Huang, F. *et al. Cell* **2016**, .
- [85] Deschout, H.; Cella Zancchi, F.; Mlodzianoski, M.; Diaspro, A.; Bewersdorf, J.; Hess, S. T.; Braeckmans, K. *Nature methods* **2014**, *11*, 253–266.
- [86] Mortensen, K. I.; Churchman, L. S.; Spudich, J. A.; Flyvbjerg, H. *Nature methods* **2010**, *7*, 377–381.
- [87] Abrahamsson, S. *et al. Nature methods* **2013**, *10*, 60–63.
- [88] Pavani, S. R. P.; Thompson, M. A.; Biteen, J. S.; Lord, S. J.; Liu, N.; Twieg, R. J.; Piestun, R.; Moerner, W. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 2995–2999.
- [89] Huang, B.; Jones, S. A.; Brandenburg, B.; Zhuang, X. *Nature methods* **2008**, *5*, 1047–1052.
- [90] Levenson, R. M.; Lynch, D. T.; Kobayashi, H.; Backer, J. M.; Backer, M. V. *ILAR Journal* **2008**, *49*, 78–88.
- [91] Niino, Y.; Hotta, K.; Oka, K.; Koch, K.-W. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6036.

- [92] Li, Y.; Tsien, R. W. *Nature Neuroscience* **2012**, *15*, 1047–1053.
- [93] Klein, T.; van de Linde, Sebastian.; Sauer, M. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2012**, *13*, 1861–1863.
- [94] Depry, C.; Mehta, S.; Zhang, J. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **2013**, *465*, 373–381.
- [95] Cognet, L.; Harms, G. S.; Blab, G. A.; Lommerse, Piet H. M.; Schmidt, T. *Applied Physics Letters* **2000**, *77*, 4052.
- [96] Kho, K. W.; Stoddart, P. R.; Harris, M.; Mazzolini, A. P. *Micron* **2009**, *40*, 212–217.
- [97] Hafi, N.; Grunwald, M.; van den Heuvel, Laura S.; Aspelmeier, T.; Chen, J.-H.; Zagrebelsky, M.; Schütte, O. M.; Steinem, C.; Korte, M.; Munk, A.; Walla, P. J. *Nature methods* **2014**, *11*, 579–584.
- [98] Raspe, M.; Kedziora, K. M.; van den Broek, B.; Zhao, Q.; de Jong, S.; Herz, J.; Mastop, M.; Goedhart, J.; Gadella, T. W. J.; Young, I. T.; Jalink, K. *Nature methods* **2016**, *13*, 501–504.
- [99] Buckers, J.; Wildanger, D.; Vicidomini, G.; Kastrup, L.; Hell, S. W. *Optics express* **2011**, *19*, 3130–3143.
- [100] Niehörster, T.; Löschberger, A.; Gregor, I.; Krämer, B.; Rahn, H.-J.; Patting, M.; Koberling, F.; Enderlein, J.; Sauer, M. *Nature Methods* **2016**, *13*, 257–262.
- [101] Belov, V. N.; Wurm, C. A.; Boyarskiy, V. P.; Jakobs, S.; Hell, S. W. *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 3598–3602.
- [102] Fernandez-Suarez, M.; Ting, A. Y. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**, *9*, 929–943.
- [103] Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J. *Nature reviews. Cancer* **2012**, *12*, 278–287.
- [104] Weiner, G. J. *Nature reviews. Cancer* **2015**, *15*, 361–370.
- [105] Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J.; Weis-Garcia, F. *ILAR Journal* **2005**, *46*, 258–268.
- [106] Grussmayer, K. S.; Kurz, A.; Herten, D.-P. *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 734–742.

- [107] Reverberi, R.; Reverberi, L. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* **2007**, *5*, 227–240.
- [108] Los, G. V. *et al.* *ACS chemical biology* **2008**, *3*, 373–382.
- [109] Keppler, A.; Gendreizig, S.; Gronemeyer, T.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnson, K. *Nature Biotechnology* **2002**, *21*, 86–89.
- [110] Kindermann, M.; George, N.; Johnsson, N.; Johnsson, K. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 7810–7811.
- [111] Keppler, A.; Kindermann, M.; Gendreizig, S.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnson, K. *Methods (San Diego, Calif.)* **2004**, *32*, 437–444.
- [112] Gautier, A.; Juillerat, A.; Heinis, C.; Correa, JR, I. R.; Kindermann, M.; Beaufils, F.; Johnsson, K. *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 128–136.
- [113] Mollwitz, B.; Brunk, E.; Schmitt, S.; Pojer, F.; Bannwarth, M.; Schiltz, M.; Rothlisberger, U.; Johnsson, K. *Biochemistry* **2012**, *51*, 986–994.
- [114] Stöhr, K.; Siegberg, D.; Ehrhard, T.; Lymperopoulos, K.; Oz, S.; Schulmeister, S.; Pfeifer, A. C.; Bachmann, J.; Klingmuller, U.; Sourjik, V.; Herten, D.-P. *Analytical chemistry* **2010**, *82*, 8186–8193.
- [115] Mizukami, S.; Watanabe, S.; Hori, Y.; Kikuchi, K. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 5016–5017.
- [116] Wombacher, R.; Heidbreder, M.; van de Linde, Sebastian,; Sheetz, M. P.; Heilemann, M.; Cornish, V. W.; Sauer, M. *Nature methods* **2010**, *7*, 717–719.
- [117] Chen, Z.; Jing, C.; Gallagher, S. S.; Sheetz, M. P.; Cornish, V. W. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 13692–13699.
- [118] Griffin, B. A. *Science* **1998**, *281*, 269–272.
- [119] Gaietta, G.; Deerinck, T. J.; Adams, S. R.; Bouwer, J.; Tour, O.; Laird, D. W.; Sosinsky, G. E.; Tsien, R. Y.; Ellisman, M. H. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *296*, 503–507.
- [120] Estévez, J.; Somerville, C. *BioTechniques* **2006**, *41*, 569–574.
- [121] Schutz, V.; Mootz, H. D. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 4113–4117.
- [122] Mootz, H. D. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2579–2589.

- [123] Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [124] Herner, A.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2013**, *11*, 3297.
- [125] Raulf, A.; Spahn, C. K.; Zessin, Patrick J M.; Finan, K.; Bernhardt, S.; Heckel, A.; Heilemann, M. *RSC advances* **2014**, *4*, 30462–30466.
- [126] Alamudi, S. H.; Satapathy, R.; Kim, J.; Su, D.; Ren, H.; Das, R.; Hu, L.; Alvarado-Martínez, E.; Lee, J. Y.; Hoppmann, C.; Peña-Cabrera, E.; Ha, H.-H.; Park, H.-S.; Wang, L.; Chang, Y.-T. *Nature Communications* **2016**, *7*, 11964.
- [127] Devaraj, N. K.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate chemistry* **2008**, *19*, 2297–2299.
- [128] Plass, T.; Milles, S.; Koehler, C.; Schultz, C.; Lemke, E. A. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 3878–3881.
- [129] Karver, M. R.; Weissleder, R.; Hilderbrand, S. A. *Bioconjugate Chemistry* **2011**, *22*, 2263–2270.
- [130] Yang, J.; Seckute, J.; Cole, C. M.; Devaraj, N. K. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2012**, *51*, 7476–7479.
- [131] Seckute, J.; Yang, J.; Devaraj, N. K. *Nucleic acids research* **2013**, *41*, e148.
- [132] Wieczorek, A.; Buckup, T.; Wombacher, R. *Organic & biomolecular chemistry* **2014**, *12*, 4177–4185.
- [133] Nikic, I.; Plass, T.; Schraidt, O.; Szymanski, J.; Briggs, J. A. G.; Schultz, C.; Lemke, E. A. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 2245–2249.
- [134] Nikić, I.; Kang, J. H.; Girona, G. E.; Aramburu, I. V.; Lemke, E. A. *Nature Protocols* **2015**, *10*, 780–791.
- [135] Wals, K.; Ovaa, H. *Frontiers in chemistry* **2014**, *2*, 15.
- [136] Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chemical reviews* **2010**, *110*, 2620–2640.
- [137] Cheng, J.; Zhou, X.; Xiang, H. *The Analyst* **2015**, *140*, 7082–7115.
- [138] Wong, B. A.; Friedle, S.; Lippard, S. J. *Inorganic chemistry* **2009**, *48*, 7009–7011.

- [139] Jeong, Y.; Yoon, J. *Inorganica Chimica Acta* **2012**, *381*, 2–14.
- [140] Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. *Chemical reviews* **2014**, *114*, 4564–4601.
- [141] Formica, M.; Fusi, V.; Giorgi, L.; Micheloni, M. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 170–192.
- [142] Chen, X.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chemical reviews* **2012**, *112*, 1910–1956.
- [143] Kim, H. N.; Lee, M. H.; Kim, H. J.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chemical Society reviews* **2008**, *37*, 1465–1472.
- [144] Grienberger, C.; Konnerth, A. *Neuron* **2012**, *73*, 862–885.
- [145] Oheim, M.; van 't Hoff, M.; Feltz, A.; Zamaleeva, A.; Mallet, J.-M.; Collet, M. *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1843*, 2284–2306.
- [146] Geddes, C. D.; Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Small Molecule Sensing*; Topics in Fluorescence Spectroscopy S., v. 9 Springer Science + Business Media: s.l., 1. Aufl. ed.; 2005.
- [147] Kiel, A.; Kovacs, J.; Mokhir, A.; Krämer, R.; Herten, D.-P. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 3363–3366.
- [148] Alexander Kiel, “Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von Metallkomplex-Reaktionen im thermodynamischen Gleichgewicht, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg”, **2008**.
- [149] Brox, D.; Kiel, A.; Wörner, S. J.; Pernpointner, M.; Comba, P.; Martin, B.; Herten, D.-P.; Sauer, M. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58049.
- [150] Brox, D.; Schwering, M.; Engelhardt, J.; Herten, D.-P. *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 2331–2336.
- [151] Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 11998–12013.
- [152] Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H. *Journal of the American Chemical Society* **1949**, *71*, 2703–2707.
- [153] Svenja Johanna Wörner, Unpublished data.
- [154] Massey, M.; Algar, W. R.; Krull, U. J. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *568*, 181–189.

- [155] Koerner, M. M.; Palacio, L. A.; Wright, J. W.; Schweitzer, K. S.; Ray, B. D.; Petrache, H. I. *Biophysical Journal* **2011**, *101*, 362–369.
- [156] Axelsson, I. *Journal of Chromatography A* **1978**, *152*, 21–32.
- [157] Green, N. M., Ed.; *Advances in Protein Chemistry Volume 29 - Avidin*; volume 29 of *Advances in Protein Chemistry* Elsevier: Amsterdam, Niederlande, 1975.
- [158] Romary, J. K.; Barger, J. D.; Bunds, J. E. *Inorganic Chemistry* **1968**, *7*, 1142–1145.
- [159] Burgert, A.; Letschert, S.; Doose, S.; Sauer, M. *Histochemistry and cell biology* **2015**, *144*, 123–131.
- [160] Sun, Y. S.; Landry, J. P.; Fei, Y. Y.; Zhu, X. D.; Luo, J. T.; Wang, X. B.; Lam, K. S. *Langmuir* **2008**, *24*, 13399–13405.
- [161] Goldman, R. D. *Genes & Development* **2002**, *16*, 533–547.
- [162] Katsumoto, T.; Mitsushima, A.; Kurimura, T. *Biology of the Cell* **1990**, *68*, 139–146.
- [163] Ziegler, W. H.; Liddington, R. C.; Critchley, D. R. *Trends in Cell Biology* **2006**, *16*, 453–460.
- [164] Dupuis, N. F.; Holmstrom, E. D.; Nesbitt, D. J. *Biophysical Journal* **2013**, *105*, 756–766.
- [165] Tseng, Q. “Template Matching and Slice Alignment for ImageJ”, zuletzt abgerufen am 24.07.2016.
- [166] Heilemann, M.; van de Linde, S.; Mukherjee, A.; Sauer, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6903–6908.
- [167] Letschert, S.; Göhler, A.; Franke, C.; Bertleff-Zieschang, N.; Memmel, E.; Doose, S.; Seibel, J.; Sauer, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 10921–10924.
- [168] Siegfried Hänselmann, “Markierung mit Halo-Substraten, interne Kommunikation”, **2015**.
- [169] Juillerat, A.; Heinis, C.; Sielaff, I.; Barnikow, J.; Jaccard, H.; Kunz, B.; Terskikh, A.; Johnsson, K. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1263–1269.

- [170] Seidel, Claus A. M.,; Schulz, A.; Sauer, M. H. M. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 5541–5553.
- [171] Steenken, S.; Jovanovic, S. V. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 617–618.
- [172] Kelley, S. O. *Science* **1999**, *283*, 375–381.
- [173] Mbua, N. E.; Guo, J.; Wolfert, M. A.; Steet, R.; Boons, G.-J. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1912–1921.
- [174] Nogales, E. *Annual review of biochemistry* **2000**, *69*, 277–302.
- [175] Lukinavičius, G. *et al. Nature Methods* **2014**, *11*, 731–733.
- [176] Stefan Pitsch, I. K. “A Bright Dye for Live-Cell STED Microscopy, New SiR-Fluorophores Specifically Stain Living Cells”, 19.01.2015.
- [177] Best, M.; Porth, I.; Hauke, S.; Braun, F.; Herten, D.-P.; Wombacher, R. *Organic & biomolecular chemistry* **2016**, 1–6.
- [178] Dominik Brox, “Optische Nanoskopie mit chemisch schaltbaren Fluoreszenzsonden, Masterarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg”, **2011**.
- [179] Fulmer, G. R.; Miller, Alexander J. M.,; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179.
- [180] Thermo Scientific, “Extinction Coefficients, A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration”, 2013.
- [181] Wolter, S.; Löschberger, A.; Holm, T.; Aufmkolk, S.; Dabauvalle, M.-C.; van de Linde, Sebastian,; Sauer, M. *Nature Methods* **2012**, *9*, 1040–1041.
- [182] Klaus Yserentant, “Microtubule immunofluorescence in Hela cells, Internes Protokoll”, **2014**.
- [183] Ovesny, M.; Krizek, P.; Borkovec, J.; Svindrych, Z.; Hagen, G. M. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2389–2390.
- [184] Henriques, R.; Lelek, M.; Fornasiero, E. F.; Valtorta, F.; Zimmer, C.; Mhlanga, M. M. *Nature Methods* **2010**, *7*, 339–340.
- [185] Ryan, D. K.; Weber, J. H. *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 986–990.



- 
- [186] Patonay, G.; Shapira, A.; Diamond, P.; Warner, I. M. *The Journal of Physical Chemistry* **1986**, *90*, 1963–1966.



# Anhang H.

## Abkürzungen

---

A	Absorption oder Akzeptor
Ala	Alanin
APD	engl. <i>avalanche photo diode</i>
BAPTA	(1,2-Bis( <i>ortho</i> -aminophenoxy)ethan- <i>NNN'</i> N'-tetraacetat
ENDO-BCN	ENDO-Bicyclo[6.1.0]nonin
BG	<i>O</i> <sup>6</sup> -(4-Aminomethyl-benzyl)guanin
Bipy	2,2'-Bipyridin-4,4'-dicarbonsäure
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BODIPY	engl. <i>boron-dipyrrromethene</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	engl. <i>charge coupled device</i>
Chiron	engl. <i>chemically improved resolution for optical nanoscopy</i>
D	Donor
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOL	Markierungsgrad
DPA	Dipicolylamin
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
ESI	Massenspektrometriemethode, engl. <i>electron spray ionization</i>
F	Fluoreszenz oder Fluorophor
FLIM	engl. <i>fluorescence lifetime imaging</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FWHM	engl. <i>full width at half maximum</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
IC	innere Konversion
<i>I</i> <sub>f</sub>	Fluoreszenzintensität
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot

---

ISC	Spinumkehr, engl. <i>intersystem crossing</i>
$J$	Überlappungsintegral
$K_{SV}$	Stern-Volmer-Konstante
Lys	Lysin
MALDI-TOF	Massenspektrometrie-Methode, engl. <i>matrix assisted laser desorption ionazation - time of flight</i>
MOPS	<i>N</i> -Morpholinopropansulfonsäure
NA	numerische Apertur
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
P	Phosphoreszenz
PAINT	engl.
PALM	engl. <i>photoactivation localization microscopy</i>
PET	engl. <i>photo-induced electron transfer</i>
PFS	engl. <i>point spread function</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
$Q$	Quencher, Fluoreszenzlöschler
$R$	vibronische Relaxation oder Pearson-Korrelationskoeffizient
$R_0$	Förster-Radius
$S_0$	elektronischer Grundzustand
$S_1$	erster elektronisch angeregter Zustand
SOFI	engl. <i>super-resolution optical fluctuation imaging</i>
SPAAC	engl. <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>
SPEDAC	engl. <i>strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder cycloaddition</i>
SPIM	engl. <i>selective plane illumination microscopy</i>
STB	engl. <i>superresolution by transient binding</i>
STED	engl. <i>stimulated emission depletion</i>
STORM	engl. <i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>
$T_1$	erster Triplettzustand
TCO	<i>trans</i> -Cyclooct-4-enol
TCSPC	engl. <i>time correlated single-photon counting</i>
Terpy	[2,2':6',2''-Terpyridin]-4'-carbonsäure
TIRF	engl. <i>total internal reflection fluorescence</i>
TMR	Tetramethylrhodamin

---

# Publikationen und Poster

## Publikationen

1. Dominik Brox, Alexander Kiel, Svenja Johanna Wörner, Markus Pernpointner, Peter Comba, Bodo Martin, Dirk-Peter Herten, „*Ensemble and Single-Molecule Studies on Fluorescence Quenching in Transition Metal Bipyridine-Complexes*“ *PLoS ONE* **2013**, *8*(3): e58049. doi:10.1371/journal.pone.0058049.
2. Dominik Brox, Michael Schwering, Johann Engelhardt, Dirk-Peter Herten, „*Reversible Chemical Reactions for Single-Color Multiplexing Microscopy*“, *ChemPhysChem* **2014**, *15*, 2331-2336. doi: 10.1002/cphc.201402012.
3. Arina Rybina, Marcel Wirtz, Dominik Brox, Roland Krämer, Gregor Jung, Dirk-Peter Herten, „*Toward Single-Molecule Catalysis*“ in „*Molecular Catalysts - Structure and Functional Design*“, Eds. L. Gade, P. Hofmann, Wiley, **2014**, 53-79. ISBN: 978-3-527-33521-3.
4. Elvira Bindewald, Roxana Lorenz, Olaf Hübner, Dominik Brox, Dirk-Peter Herten, Elisabeth Kaifer, Hans-Jörg Himmel, „*Tetraguanidino Functionalized Phenazine and Fluorene Dyes: Synthesis, Optical Properties and Metal Coordination*“, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 3467-3485. doi: 10.1039/c4dt03572k.
5. Dominik Brox, Peter Comba, Dirk-Peter Herten, Esther Kimmle, Michael Morgen, Carmen Rühl, Arina Rybina, Holger Stephan, Golo Storch, Hubert Wadepohl, „*CuII-selective bispidine-dye conjugates*“, *J.Inorg.Biochem.* **2015**, *148*, 78-83. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2015.05.009.

## Patente

1. Dominik Brox, Andreas Haderspeck, Thorben Cordes, Dirk-Peter Herten, „*Synthese und Struktur chemisch schaltbarer Fluoreszenzsonden auf der Basis von Aminosäuren*“, **2016**, zur Patentierung eingereicht.

## Posterpräsentationen

1. *PicoQuant 18th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra-sensitive Analysis in the Life Sciences“*, Berlin **2012**, Poster: „Chemical reactions for high resolution microscopy and single-color multiplexing.“
2. *Heidelberg Forum for Molecular Catalysis*, Heidelberg, **2013**, Poster: „Single-molecule studies of transition metal bipyridine complexes.“
3. *Abschluss-symposium SFB 623*, Heidelberg **2013**, Poster: „Single-Molecule Studies of Transition Metal Bipyridine Complexes.“
4. *PicoQuant 19th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra-sensitive Analysis in the Life Sciences“*, Berlin **2013**, Poster: „Chemically-Driven Single-Color-Multiplexing Microscopy.“
5. *PicoQuant 20th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra-sensitive Analysis in the Life Sciences“*, Berlin **2014**, Poster: „Chemically switchable Fluorescent Probes based on modular system.“
6. *Focus on Microscopy*, Göttingen **2015**, Poster: „Chemical Reactions for Super-Resolution and Single-Color Multiplexing Microscopy.“
7. *PicoQuant 21st International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Super-resolution Microscopy in the Life Sciences“*, Berlin **2015**, Poster: „Chemical Reactions for Super-Resolution and Single-Color Multiplexing Microscopy.“

## Vorträge

1. *Bioquant Internal Seminar: „Chemical Switches for Super-Resolution Microscopy“*, Heidelberg **2016**.

# Danksagung

Zuerst möchte ich mich hier bei meinem Doktorvater Dirk-Peter Hertens für die Überlassung dieses Themas und die Unterstützung meiner Promotion bedanken. Er ließ mir während der letzten viereinhalb Jahre viele Freiheiten, um mich auf dem Thema auszuprobieren. Zudem konnte ich während meiner Promotion neben dem typischen Wissen eines Chemikers auch viele weitere Kenntnisse mitnehmen. Er hat mir den Besuch von zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen ermöglicht, wo ich meine Arbeit präsentieren durfte. Auch das Schreiben von Veröffentlichungen und Projektanträgen sowie das Ausfüllen von AZAP-Formularen lernt man als Chemiker normalerweise nicht im Studium. Und einen sechsstelligen Investitionsbetrag ausgeben zu dürfen ist sicher auch nicht alltäglich in der Promotion. Vielen Dank für die spannende Zeit.

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Hertens. Andreas Haderspeck für das ständige Austauschen über die kleinen Probleme im Labor und für die vielen Frühstücks- und Kaffeepausen. Zusammen an Switch-Click zu arbeiten war eine schöne Erfahrung. Und natürlich auch Danke für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit. Auch Kristin Großmayer, Daniel Barzan, Klaus Yserentant und Siegfried Hänselmann gebührt Dank für die ständige Hilfsbereitschaft, für (wissenschaftliche) Diskussionen und für die schöne und interessante Zeit, die wir zusammen im (Dunkel-)Labor oder der Kaffee-Ecke verbracht haben. Ohne euch alle hätte ich es bestimmt nicht viereinhalb Jahre im Bioquant ausgehalten. Dr. Michael Schwering möchte ich für seine große Hilfe bei der Einarbeitung auf dem Gebiet der chemischen Schalter danken, zudem für alles was er mir über Mikroskopie beigebracht hat.

Auch Dr. Johann Engelhardt aus der Hell-Gruppe im Bioquant möchte ich für seine Hilfe und sein Engagement bezüglich der STED-Messungen danken. Bei Jenny Blechinger und Sandra König möchte ich mich für die Hilfe bei den MALDI-Messungen im Arbeitskreis Mokhir/Krämer danken.

Dem gesamten Konsortium „Switch-Click-Microscopy“ möchte ich für das spannende Projekt, die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung mit Know-How und Materialien danken. Vor allem danke ich Dr. Jutta Arden-Jacob und Dr. Alexander Zilles von *Atto-Tec* für die Bereitstellung zahlreicher Fluoreszenzfarbstoffe und für wichtige Hintergrundinformationen und Dr. Miriam Rittner von *Sichem* für das Bereitstellen der Tetrazine und Kopplungsreagenzien. An Paja Reisch von der Firma *PicoQuant* geht besonderer Dank für die Durchführung der STED-Messungen aus Kapitel 3. Auch bei Felix Koberling von *PicoQuant* möchte ich mich für die Ermöglichung der Messungen bedanken.

Dem Rest der Hertens-Gruppe, Felix Braun, Wioleta Chmielewicz, Sebastian Bierbaum, Lucas Korn und Martin Seefeld gilt mein Dank für eine entspannte und fröhliche Arbeitsatmosphäre.

Allen ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe, die ich kennenlernen durfte, möchte ich für die schöne Zeit danken, vor allem aber Anne Unger (ehem. Seefeld), Tanja Ehr-

hard, Christina Spassova, Anton Kurz, Jessica Balbo, Arina Rybina, Ilse Valtierra, Johannes Menges, Roman Spilger und Martine Haan. Und natürlich auch denen, die ich hier vergessen habe.

Zudem danke ich meinen Forschungspraktikanten Johannes Menges, Fabian Muttach, Lukas Merz, Marcel Schädler, Vanessa Müller, Christine Hussong, Patrick Federmann für ihre motivierte Unterstützung und ihren Beitrag zu einem guten Arbeitsklima. Besonders Christine Hussong möchte ich danken, da sie meine Arbeit fortführte, als ich mit gebrochener Schulter ausfiel. Auch meinem Bachelor Jan Lüttgens möchte ich herzlich für seine engagierte Arbeit und die schöne Zeit im Labor danken.

Auch bei meinen Kommilitonen Nataliya Frenkel, Skrollan Stockinger, Jenny Blechinger, Christiane Antoni, Benjamin Eberle und Tobias Lauterbach möchte ich mich für die schöne Zeit, die ich seit 2006 an der Uni Heidelberg hatte, bedanken. Auch den hier nicht namentlich erwähnten Kommilitonen gilt mein Dank für all das, was wir zusammen erlebt haben.

Natürlich danke ich auch allen Mitarbeitern des Bioquants für die Bereitstellung des Arbeitsumfeldes. Danke vor allem an die Mitarbeiter der Spülküchen für die sauberen Arbeitsgeräte.

Auch allen Mitarbeitern der Massenspektrometrie-Abteilung des OCI, der NMR-Abteilung des ACI und der Werkstätten des PCI möchte ich Danken. Besonders Danke geht an Herrn Schmitt aus der PCI Werkstatt und Herrn Schodt von der Elektronik-Werkstatt des PCI.

Zuletzt geht natürlich auch ein riesiges Dankeschön an meine Familie für die großartige Unterstützung während meines gesamten Studiums. Meine Eltern Wolfgang und Christine sind stets als Unterstützung da und haben mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht.

Der größte Dank gebührt natürlich meiner Freundin Christiane Antoni, der ich für ihre ständige Unterstützung, für die Hilfe und Aufmunterung während der Entstehung dieser Arbeit und natürlich auch für stundenlanges Korrekturlesen danken möchte. Ich bin sehr glücklich, dass ich Dich habe!



# Eidesstattliche Versicherung

gemäß § 8 der Promotionsordnung der  
Naturwissenschaftlich- Mathematischen Gesamtfakultät der  
Universität Heidelberg

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „**Synthese modularer chemischer Schalter für die optische Mikro- und Nanoskopie**“ 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. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, den 27. Juli 2016

Dominik Brox