

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin Katharina Anna Stöhr  
aus  
Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 14. März 2008



**Fluoreszenzgelöschte Sonden**  
**für**  
**diagnostische und analytische**  
**Anwendungen**

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Prof. Dr. Philip Tinnefeld



# Zusammenfassung

Die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie und die damit einhergehende Synthese neuer, effizienter Fluoreszenzfarbstoffe eröffnete ein neues Feld in der biologischen Forschung und der molekularen Diagnostik. Durch effiziente chemische Kopplungsmechanismen können neue Fluoreszenzfarbstoffe als fluoreszierende Sonden eingesetzt werden und bieten attraktive Möglichkeiten, Biomoleküle selektiv zu markieren und mit einer vorher nicht gekannten Spezifität und Sensitivität zu charakterisieren. Auf diese Weise werden spektroskopische und mikroskopische Visualisierungen der zellulären Untereinheiten bis hin zum Einzelmolekül möglich. Untersuchungsmethoden, welche die photophysikalischen Eigenschaften der Fluoreszenz nutzen, bieten Möglichkeiten zum besseren Verständnis von biologischen Prozessen und Mechanismen sowohl *in vitro*, als auch in lebenden Zellen. Dies ist nicht nur für die Grundlagenforschung der Naturwissenschaften von höchstem Interesse, sondern auch von großer Bedeutung für die medizinische Diagnostik und die klinische Therapie. Die Ansprüche der Molekularbiologie und Biochemie gehen hin zu immer präziserer Diagnostik mit erhöhter Sensitivität. Um fluoreszierende Sonden in der medizinischen Routinediagnostik und der molekularbiologischen Analytik zu etablieren, werden selektive Methoden benötigt, welche schnell verfügbar und kostengünstig sind. Das vorrangige Ziel neuer Entwicklungsarbeiten liegt daher auf der Verbesserung bereits etablierter Methoden, welche sich durch gesteigerte Sensitivität und Selektivität auszeichnen.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung fluoreszenzgelöschter Sonden, welche auf der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer basieren. Es wurden zwei molekulare Sonden weiterentwickelt, die durch Guanin gelöscht werden. Einerseits wurden (i) SMART PROBES zur schnellen und spezifischen Identifizierung verschiedener Mykobakterienspezies eingesetzt. Darüber hinaus konnten (ii) SNAP-TAGS zur selektiven Markierung von Proteinen in Säugerzellen und Bakterien angewendet werden. Die der Arbeit zugrunde liegende Idee war es, eine gesteigerte Sensitivität dieser Methoden durch gezielte Fluoreszenzlöschung und damit einhergehend eine Reduzierung von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz zu erreichen.

Die spezies-spezifische, sensitive, zuverlässige und kostengünstige Identifizierung bestimmter DNA-Sequenzen als Instrument der Diagnostik bakterieller Erreger ist aufgrund unterschiedlicher Behandlungsstrategien sowie des stetigen Auftretens neuartiger Erreger von großer Bedeutung für die Routinediagnostik.

Eine besondere Herausforderung stellt hierbei das Genus *Mycobacterium* mit seinen aktuell mehr als 100 valide beschriebenen Arten dar. Die Identifizierung sowie die exakte Differenzierung dieser Erreger sind vor allem aufgrund des zumeist sehr langsamen Wachstums der

Mykobakterien von zwölf bis 20 Stunden erschwert. Ein schnelles und kostengünstiges Verfahren ist daher dringend erforderlich. Traditionelle, auf biochemischen Merkmalen gründende Identifikationssysteme werden dabei in den letzten Jahren immer mehr von molekularbiologischen Verfahren abgelöst.

Eines dieser neuen Verfahren basiert auf dem Einsatz von SMART PROBES. Sie können in einem neuen, hochempfindlichen DNA-Nachweisverfahren zur Früherkennung antibiotikaresistenter Erreger eingesetzt werden. SMART PROBES sind DNA-Haarnadelsonden, welche durch konformative Änderung der Struktur entweder im fluoreszenzgelöschten oder im fluoreszierenden Zustand vorliegen. Diese Sonden wurden am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg entwickelt. Die räumliche Nähe des Farbstoffs zu mehreren Guanodinukleobasen in der Stamm-Schleife-Struktur führt zu einer Löschung des Fluorophors. Bei Zugabe von Gegensequenz öffnet sich die SMART PROBE, was eine lokale Trennung von Farbstoff und Guanodin bewirkt, woraus ein messbarer Fluoreszenzanstieg resultiert.

In dieser Arbeit wurde zuerst das bereits bestehende Prinzip verbessert. Hierzu wurde eine Modellierung der Molekularen Struktur der DNA-Sonden mit dem Programm *mfold* vorgenommen. Unter Betrachtung der freien Gibbsschen Energie  $\Delta G$ , der relativen Quantenausbeuten und mit Hilfe von Dot Plot Darstellungen konnte so eine Vorauswahl an möglichen SMART PROBES getroffen werden. Hierbei diente als Modellsystem die mykobakterielle 16S rDNA von 16 an der Uniklinik Heidelberg am häufigsten isolierten Mykobakterien. Zunächst wurden sechs Sonden für die Mykobakterienspezies *M.xenopi* entworfen. Diese unterschieden sich nach der Modellierung in der Stabilität, was zu einem unterschiedlichen Fluoreszenzanstieg führen sollte. Um die Ergebnisse der Modellierung im Experiment zu validieren, wurden die sechs *M.xenopi* spezifischen Sonden in homogenen Umgebungen mit künstlichen Sequenzen umgesetzt. Hierbei erzielten sie einen Fluoreszenzanstieg bei Zugabe eines zehnfachen Überschusses an künstlicher Zielsequenz um den Faktor 2,04 bis 3,45.

Nachdem die sechs Sonden ihre Funktionalität bewiesen hatten, gelang es, mit ihnen ebenfalls PCR-Amplifikate der Spezies *M.xenopi* nachzuweisen. Hierbei spielte vor allem die Anpassung der Temperatur, welche maßgeblichen Einfluß auf die Sekundärstruktur einer Oligonukleotidsequenz hat, eine entscheidende Rolle. Unter Berücksichtigung der Sekundärstruktur von Gegensequenz und SMART PROBE, sowie der besten Hybridisierungstemperatur, gelang es, PCR-Produkte in homogener Lösung bis zu einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-8}$  M nachzuweisen. Anhand der für das Modellsystem *M.xenopi* gewonnenen Erkenntnisse wurden drei weitere Sonden für die Spezies *M.tuberculosis*, *M.avium* und *M.fortuitum* modelliert, welche sich, genauso wie die Sonde von *M.xenopi*, in Reaktionen mit den 16 häufigsten an der Uniklinik Heidelberg isolierten Spezies als selektiv für ihre Spezies erwiesen. So konnten alle vier Sonden spezifisch ihre Spezies von den 15 anderen selektieren.

In weiteren Schritten wurde versucht, Punktmutationen in DNA-Sequenzen nachzuweisen. Diese sind beim *Mycobacterium tuberculosis* dafür verantwortlich, dass Antibiotikaresistenzen entstehen. Die weltweit am häufigsten vorkommende Punktmutation am Codon 456 (TCG → TTG) des *rpoB* Gens von *M.tuberculosis* wurde hierzu als Modellsystem verwendet. Diese bewirkt eine Rifampicin-Resistenz von *M.tuberculosis*.

Hierbei war vor allem eine sorgfältig gewählte Balance zwischen freier Gibbsscher Energie  $\Delta G$  der Sonde und der Hybridisierungsenergie, die von der Länge der Schleife und des Stammes abhängt, für die SNP-Sensitivität (Single Nucleotide Polymorphism) notwendig. Insgesamt wurden elf unterschiedliche SMART PROBES entwickelt, die sich in ihrer Stamm-Schleifen Struktur unterschieden. Diese Sonden wurden im künstlichen System mit einzelsträngigen, kurzen Oligonukleotiden, die als Zielsequenzen dienten, hybridisiert. Dabei konnte mit zwei Sonden eine Diskriminierung zwischen Wildtyp- und mutationstragender Zielsequenz erreicht werden. Beide Sonden waren aus einem fünf Basenpaare umfassenden Stamm, sowie einer Schleifen-Sequenz aus sieben Nukleotiden aufgebaut. Die künstliche Gegensequenz lag in 100 fachem Überschuss zur Sonde vor. Zwischen Wildtyp und Zielsequenz konnte eine Diskriminierung von 2,5 beziehungsweise 4,5 erzielt werden. Diese Ergebnisse wurden auf PCR-Amplifikate unterschiedlicher Länge (157 bp und 751 bp) übertragen. Lediglich eine der beiden Sonden konnte hier eine Diskriminierung ermöglichen. Das kurze PCR-Fragment erwies sich dabei als geeigneter und erbrachte einen 4,5 fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Durch gezieltes Sondendesign gelang es, die Punktmutation am Codon 456 spezifisch, sensitiv und zuverlässig nachzuweisen.

Zur Steigerung der Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens mit SMART PROBES wurde ein fluoreszenzmikroskopischer Ansatz entwickelt. Diese neue Technik beruht auf einer Aufkonzentrierung des Fluoreszenzsignals an den Oberflächen von Silicakügelchen. Damit kann eine Verbesserung der Nachweisgrenze erreicht werden. Durch Optimierung der Versuchsparameter wie Belegungsdichte und Konzentrationsverhältnisse der Sequenzen wurden zwei Ansätze entwickelt, welche beide eine SMART PROBE als fluoreszierende Sonde verwenden. In ersten Optimierungsversuchen konnten mit dem konventionellen System, bestehend aus einem die nachzuweisende Sequenz tragenden Oligonukleotid und der Sonde Konzentrationen bis  $10^{-12}$  M nachgewiesen werden. Das Sandwich-System, welches aus insgesamt drei DNA-Sequenzen besteht, erbrachte positive Nachweise bis  $10^{-11}$  M Zielsequenz. Die computergestützte Analyse der digitalen Bilder wurde mit der für diesen Zweck geschriebenen Software *Analyze Bead* durchgeführt. Hiermit konnten Konzentrationen bis  $10^{-10}$  M sicher identifiziert werden.

Ebenso konnten mit dem mikrosphärenbasierenden Nachweis PCR-Amplifikate nachgewiesen werden. So wurden sieben SMART PROBES auf die Spezies *M.avium*, *M.fortuitum*,

*M.xenopi*, *M.abscessus*, *M.tuberculosis*, *M.intracellulare* und *M.kansasii* synthetisiert, welche alle in der Lage waren, die passende Mykobakterienspezies bis  $10^{-9}$  M selektiv nachzuweisen. Damit konnte die Eignung der SMART PROBES-Technologie für eine spezifische und hochempfindliche Identifizierung bakterieller DNA-Sequenzen anhand von Mitgliedern des Genus *Mycobacterium* gezeigt werden. Diese neuartige Technologie bietet neue Perspektiven für eine zukünftige Methodik, welche schnell, kostengünstig und zuverlässig in der Routinediagnostik Verwendung finden kann.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit SNAP-TAGS. Diese stellen eine neue Methode zum kovalenten Markieren von Fusionsproteinen mit synthetischen Farbstoffen sowohl für *in vitro* wie auch für Anwendungen in lebenden Zellen dar. Herkömmliche Methoden zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen greifen auf reaktive Farbstoffe oder autofluoreszierende Proteine zurück. Diese Methoden sind jedoch beschränkt durch die fehlende Selektivität beziehungsweise durch die Größe (Green Fluorescent Protein (GFP) ~ 27 kDa) der fluoreszierenden Proteine, welche oftmals der Größe des zu untersuchenden Proteins entsprechen. Des Weiteren weisen autofluoreszierende Proteine oft eine komplizierte Photophysik sowie eine geringe Photostabilität auf. Invasive Methoden, welche organische Fluorophore durch Elektroporation, Mikroinjektion oder Endozytose in die Zelle schleusen, schädigen die Zelle, wodurch ihre Funktionalität oft nicht mehr gewährleistet ist.

Die SNAP-TAG Markierung bietet hier eine nicht invasive Alternative. Sie basiert auf dem irreversiblen Transfer der Benzylgruppe von  $O^6$ -Benzylguanin ( $O^6$ -BG) auf das DNA-Reparaturprotein  $O^6$ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT). Dieses Protein besitzt spezifische Aktivität für  $O^6$ -BG-Derivate, die zum kovalenten Markieren von AGT-Fusionsproteinen *in vitro* und in lebenden Zellen eingesetzt werden.

Um das Potenzial der AGT-Markierung zu testen, wurden in dieser Arbeit 30 BG-Farbstoffsubstrate synthetisiert, welche den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich abdecken. Die BG-Substrate wurden zunächst hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften, Lebensdauer und relativen Quantenausbeute untersucht. Hierbei konnten neun fluoreszenzgelöschte Substrate ermittelt werden, welche den Wellenlängenbereich von 425 nm bis 700 nm abdecken. Um den Fluoreszenzanstieg nach der Markierung von AGT zu ermitteln, wurden die Substrate mit isoliertem hAGT in *in vitro* Experimenten eingesetzt. Hierbei zeigten nicht nur die neuen gelöschten Substrate Fluoreszenzanstiege, sondern auch einige ungelöschte BG-Substrate. Des Weiteren zeigten einige gelöschte Substrate nicht den erwünschten Fluoreszenzanstieg.

Da ein Farbstoff, der an ein Biomolekül gebunden ist, veränderte Umgebungsbedingungen im Vergleich zum freien Zustand erfährt, wurden sowohl allgemeine und spezifische Lö-

sungsmittleffekte, als auch Viskositätseffekte untersucht. Hierbei ergab sich ein äußerst komplexes Bild aller Umgebungseinflüsse. Durch deren Gesamtheit konnte das Verhalten der Substrate hinreichend gut erklärt werden. Jedoch bleibt anzumerken, dass das äußerst vielseitige Verhalten von Farbstoffen bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen nicht einfach vorhersagbar ist. Daher muss für jedes BG-Farbstoffsubstrat der Fluoreszenzanstieg nach Markierung von AGT separat ermittelt werden und kann nicht vorhergesagt werden.

Für die Anwendung der AGT-Markierung in lebenden Zellen wurden zum einen AGT-Fusionsprotein exprimierende *Escheria coli* eingesetzt, zum anderen AGT-defiziente CHO-Zellen (Chinesische Hamster Ovarien), welche mit Expressionsvektoren transfiziert waren, die das Gen eines AGT-Fusionsproteins enthielten. Bei letzteren war das Fusionsprotein im Nukleus lokalisiert.

Zum Markieren der *E. coli* wurden 11 BG-Substrate eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass alle 11 Substrate in der Lage waren, die AGT-exprimierenden Zellen selektiv anzufärben. Hierbei ergab sich, dass ein gelöschttes BG-Substrat nicht unbedingt notwendig ist, da Waschschritte bei *E. coli* schnell und ohne großen Aufwand durchführbar sind. Somit ist der Vorteil des AGT-Markierens darin zu sehen, dass jede Wellenlänge des sichtbaren Wellenlängenbereichs zugänglich wird.

Anders verhält es sich bei der Markierung des Zellkerns von CHO-Zellen. Hier werden zellgängige Fluoreszenzderivate benötigt, welche durch die Fluoreszenzlöschung im Ausgangszustand des BG-Substrats zu einer Markierung mit erhöhter Empfindlichkeit führen. Waschschritte stellen bei diesen Zellen einen großen Arbeits- und Zeitaufwand dar. Leider erwiesen sich nur die Substrate BG-Rhodamine Green und BG-FAM als zellpermeabel. Diese Substrate stellen nicht gelöschte Sonden dar.

Bei Untersuchungen bezüglich der Zellpermeabilität der BG-Substrate konnte in dieser Arbeit die Größe der Farbstoffe als Ausschlusskriterium nachgewiesen werden. So zeigten nur Substrate mit kleineren Farbstoffe eine Zellpermeabilität.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das AGT-Markieren eine wichtige Methode zur Analyse von Prozessen in der Zelle darstellen kann. Durch den Einsatz fluoreszenzgelöschter Substrate kann die Sensitivität des Verfahrens nochmals verbessert werden. Durch den geringen Fluoreszenzhintergrund eignet sich diese Markierungsmethode deshalb besonders gut für Anwendungen in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Vielseitigkeit der verwendeten O<sup>6</sup>-BG Derivate, die Effizienz der Fluoreszenzlöschung und die Spezifität der kovalenten Bindung sind die wichtigsten Vorteile dieser neuen Markierungsmethode.

## Summary

The development of the fluorescence microscopy accompanied by the synthesis of new, efficient fluorescent dyes is opening a new field in biological research and molecular diagnostics. Because of efficient chemical coupling mechanisms new fluorescent dyes can be used as fluorescent probes and offer attractive possibilities for the selective labeling of biomolecules and for their characterization with a specificity and sensitivity not known before. In this way spectroscopic and microscopic visualizations of cellular subunits up to single molecules become possible. Research methods using the photo-physical characteristics of fluorescence offer possibilities to assist the understanding of biological processes and mechanisms both *in vitro*, and in living cells. Not only is this of highest interest for the basic research of the natural sciences. It is also of great importance for medical diagnostics and clinical therapy. The requirements of molecular biology and biochemistry are shifting towards more precise diagnostics with increased sensitivity. In order to establish fluorescent probes in medical routine diagnostics and in molecular-biological analytics there is a need for selective methods which are easily available as well as economical. Therefore the highest goal of new development is the improvement of methods already established, increasing their sensitivity and selectivity.

This goal of the thesis was the development of fluorescent quenched probes based on fluorescent quenching using photo-induced electron transfer. Two molecular probes quenched by guanine were further developed. On the one hand (i) SMART PROBES were used for the fast and specific identification of different mycobacterial species. Beyond that (ii) SNAP-TAGS could be used for the selective labeling of proteins in mammalian cells and bacteria. It was the initial intention of this work to achieve an increased sensitivity of these methods by purposeful fluorescence quenching accompanied by a reduction of nonspecific background fluorescence.

Due to different treatment strategies as well as the constant occurrence of new pathogenes the species-specific, sensitive, reliable and economical identification of certain DNA sequences as instrument of the diagnostics of bacterial pathogenes is of great importance in routine diagnostics.

Here a special challenge to the researcher is posed by the genus *mycobacterium* with currently more than 100 recognized forms. Due to the in most instances very slow growth of the mycobacterias from twelve up to 20 hours the identification as well as the exact differentiation of these pathogenes are particularly difficult. Therefore, a fast and economical procedure

is urgently needed. This is why recently traditional identificational systems based on biochemical characteristics are increasingly being replaced by molecular-biological procedures.

One of these new procedures is based on the application of SMART PROBES. They can be used in a new, highly sensitive DNA-assay for the early recognition of antibiotic-resistant pathogenes. SMART PROBES are hairpin shaped probes, which can change the fluorescence from quenched to not quenched due to conformational change of structure. These probes were developed at the Institute of Physical Chemistry of the University of Heidelberg. The dye's spatial proximity to several guanosine nucleobases in the stem-loop structure leads to a quenching of the fluorophore. After the addition of target sequence the SMART PROBE opens the structure, which causes a local separation from dye and guanosine, resulting in a measurable rise in fluorescence intensity.

The first steps in this thesis was improving the already existing principle. To this end a modeling of the molecular structure of the DNA probes with the program *mfold* was made. Considering the free Gibbs energy  $\Delta G$  as well as the relative quantum yield and with the help of Dot Plots a preselection of possible SMART PROBES could be made. Here the mycobacterial 16S rDNA of 16 of the most frequent isolated mycobacterias at the University Hospital Heidelberg served as model system. At first six probes for the mycobacterial species *M.xenopi* were designed. After modeling these differed in stability, which in turn should lead to a different increase in fluorescence. In order to validate the results of the modeling in the experiment, the six *M.xenopi* specific probes were tested in homogeneous environments with artificial sequences. Here they obtained a fluorescence increase after addition of a tenfold excess of artificial sequence of the factor 2.04 to 3.45.

After the six probes had thus proven their functionality, they also were shown to be successful in the detection of PCR amplicates of the species *M.xenopi*. Therein the adjustment of temperature, which has a relevant influence on the secondary structure of an oligonucleotide played a crucial role. Taking into consideration the secondary structure of target sequence and SMART PROBE, as well as the best hybridizing temperature, it was possible to prove PCR products in homogeneous solution up to a concentration of  $2 \cdot 10^{-8}$  M. On the basis of the results for the model system *M.xenopi* three further probes for the species *M.tuberculosis*, *M.avium* and *M.fortuitum* were modeled. These proved to be selectively responsive to their respective species in reactions with the 16 most frequent species isolated at the University Hospital of Heidelberg, as did the probe of *M.xenopi*. So all four probes could specifically select their species out of the 15 others.

In further steps proof of single point mutations in DNA sequences was sought. In the case of *Mycobacterium tuberculosis* these are responsible for the fact that antibiotic resistances develop. As a model system for this the world-wide most frequently occurring point mutation

at the Codon 456 (TCG → TTG) of the *rpoB* gene of *M.tuberculosis* was used. This point mutation causes a Rifampicin resistance of *M.tuberculosis*.

Here above all a carefully selected balance between the probe's free Gibbs energy  $\Delta G$  and the hybridizing energy, which depends on the length of the loop and the stem, was necessary for the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sensitivity. Altogether eleven different SMART PROBES were developed, which differed in their stem-loop structure. These probes were hybridized in the artificial system with single stranded, short oligonucleotides, which served as target sequences. A discrimination could be achieved between wildtype and mutation sequence. Both probes were composed of five basepairs containing stem as well as of a loop sequence of seven nucleotides. The artificial target sequence was present in a 100 fold surplus to the probe. Between wildtype and target sequence a discrimination could be obtained of 2.5 and 4.5, respectively. These results were transferred to PCR amplicates of different lengths (157 bp and 751 bp). Here only one of the two probes could make a discrimination possible. Thereby the short PCR fragment proved more suitable and produced a 4.5 fold increase in fluorescence intensity. By purposeful probe design it was possible to specifically, sensitively and reliably detect the point mutation at the Codon 456.

To increase the sensitivity of the assay with SMART PROBES a fluorescence microscopic based approach was developed. This new technology is based on a concentration of the fluorescence signal at the surfaces of silicabeads. Thus an improvement of the detection limit can be achieved. By optimization of the test parameters such as the density of the sequence and the concentration conditions of the sequences two approaches were developed, both using a SMART PROBE as fluorescent probe. In first optimization attempts concentrations up to  $10^{-12}$  M could be detected with the conventional system, consisting of an oligonucleotide carrying the target sequence and the SMART PROBE. The Sandwich-System, which consists of a total of three DNA sequences, yielded positive proofs up to  $10^{-11}$  M target sequence. The computer-assisted analysis of the digital pictures was accomplished with the software Analyze Bead written for this purpose. Hereby concentrations to  $10^{-10}$  M could be identified reliably.

With the microsphere based proof, it was also possible to detect PCR amplicates. Thus seven SMART PROBES were synthesized for the species *M.avium*, *M.fortuitum*, *M.xenopi*, *M.abscessus*, *M.tuberculosis*, *M.intracellulare* and *M.kansasii*, which were all able to prove the suitable mycobacterial species selectively until  $10^{-9}$  M. Thus the suitability of the SMART PROBES technology for a specific and high sensitive identification of bacterial DNA sequences could be shown on the basis of members of the genus mycobacteria. This new technology offers new perspectives for a future methodology, which can find fast, economical and reliable use in routine diagnostics.

The second part of the work dealt with SNAP-TAGS. These represent a new method for covalent labeling of fusion proteins with synthetic dyes both for *in vitro* as well as for applications in living cells. Conventional methods for the fluorescent labeling of proteins fall back to reactive dyes or autofluorescent proteins. These methods are, however, limited by the missing selectivity and by the size of the fluorescent proteins (green fluorescent protein (GFP) ~ 27 kDa), which often correspond to the size of the protein that can be examined. Furthermore autofluorescent proteins often show a complicated photophysics as well as a small photostability. Invasive methods, which channel organic fluorophores through electroporation, microinjection or endocytoses into the cell, damage the cell, whereby its functionality often is no longer ensured.

Here SNAP-TAG labeling offers a non invasive alternative. It is based on the irreversible transfer of the benzyle group of O<sup>6</sup>-Benzylguanine (O<sup>6</sup>-BG) on the DNA repair protein O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase (AGT). This protein possesses specific activity for O<sup>6</sup>-BG-derivates, which are inserted for covalent labeling of AGT fusion proteins *in vitro* as well as into living cells.

In order to test the potential of the AGT labeling in this study, 30 BG-dye-substrates were synthesized covering the entire visible spectra. First the BG-substrates were examined regarding their photophysical characteristics, their lifetime and their relative quantum yield. Here nine fluorescence quenched substrates could be determined, which cover the wavelength from 425 nm to 700 nm. In order to determine the fluorescence increase after the labeling of AGT, the substrates were used with isolated hAGT in *in vitro* experiments. Here not only the new fluorescence quenched substrates showed an increase in fluorescence, but also some not quenched BG-substrates. Furthermore some quenched substrates did not show the desired fluorescence increase.

Since a dye bound to a biomolecule experiences changed site conditions in the comparison to it's free condition, both general and specific solvent effects, and viscosity effects were examined. Here an extremely complex picture of all enviromental influences were the result. The behavior of the substrates could be sufficiently well explained by the sum of these influences. However it must be noted, that the extremely versatile behavior of dyes is not easily predictable under different site conditions. Therefore the fluorescence increase after labeling of AGT must be determined separately and cannot not be predicted for each BG-dye substrate.

For the AGT labeling in living cells, *Escheria coli* were used to express AGT fusion protein, however, AGT-deficient Chinese Hamsters Ovary Cells transfected with expression vectors containing the gene of an AGT fusion protein were also employed. In the latter the fusion protein was located in the nucleus.

## Summary

---

For labeling the *E. coli* 11 BG-substrates were used. It could be shown that all 11 substrates were able to stain AGT expressing cells selectively. Here it was shown that a quenched BG-substrate is not necessary, since washing steps are feasible without large expenditure with *E. coli*. Thus the advantage of AGT labeling is to be seen in the fact that each wavelength in the array of visible wavelengths becomes accessible.

The labeling of the nucleus of CHO-cells requires another treatment. Here cell permeable fluorescent derivatives are needed, which by the fluorescence quenching in the starting situation of the BG substrate lead to a labeling with increased sensitivity. Washing steps represent a large amount of work and expenditure of time with these cells. Unfortunately only the substrates BG-Rhodamine Green and BG-FAM showed cell permeability. These substrates are not quenched probes.

In this work, when investigating the cell permeability of the BG-substrates the size of dyes could be proven to be exclusion criteria. Thus only substrates with smaller dyes showed cell permeability.

Altogether it could be shown that AGT labeling can represent an important method for the analysis of processes in the cell. The sensitivity of the procedure can again be improved by the employment of fluorescence quenched substrates. By the small fluorescence background this labeling method is therefore particularly well suited for applications in the fluorescence microscopy. The versatility of the used O<sup>6</sup>-BG derivatives, the efficiency of the fluorescence quenching and the specificity of the covalent coupling are the most important advantages of this new labeling method.

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie .....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Absorption .....	11
2.1.2. Emission.....	15
2.1.3. Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute.....	17
2.1.4. Molekulare Wechselwirkungen und deren Einfluss auf die Fluoreszenz .....	21
<b>2.2. Mykobakterien .....</b>	<b>33</b>
2.2.1. <i>M.tuberculosis</i> -Komplex .....	34
2.2.2. Atypische Mykobakterien .....	34
<b>2.3. Diagnostik von Mykobakterien .....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Mikroskopischer Erregernachweis .....	35
2.3.2. Nachweis über Bakterienkulturen.....	35
2.3.3. Chromatographische Verfahren .....	36
2.3.4. Restriktionsverdau.....	36
2.3.5. Sondenbasierte Identifizierungsmethoden .....	36
<b>2.4. PCR .....</b>	<b>39</b>
<b>2.5. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen <i>in vivo</i> .....</b>	<b>41</b>
2.5.1. Autofluoreszente Proteine .....	41
2.5.2. Neue Ansätze für das Markieren in lebenden Zellen .....	43
<b>2.6. SNAP-TAGS .....</b>	<b>47</b>
2.6.1. Fluoreszenzmarkierung von hAGT.....	47
2.6.2. Die O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase .....	49
2.6.3. Die Struktur des hAGT .....	49
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. Chemikalien .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2. Farbstoffe .....</b>	<b>52</b>
<b>3.3. Oligonukleotide und SMART PROBES.....</b>	<b>53</b>
3.3.1. Kopplung von aminreaktiven Farbstoffen an Oligonukleotide .....	57
3.3.2. Hybridisierungsexperimente mit SMART PROBES.....	57

3.3.3. Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotide .....	58
3.3.4. Reaktionen mit Silicabeads .....	58
<b>3.4. O<sup>6</sup>-BENZYLGUANIN-SUBSTRATE .....</b>	<b>59</b>
3.4.1. Herstellung der O <sup>6</sup> -BG-Substrate .....	59
3.4.2. Reaktionen der O <sup>6</sup> -BG-Substrate .....	60
<b>3.5. Berechnung der Quantenausbeuten .....</b>	<b>60</b>
<b>3.6. PCR .....</b>	<b>61</b>
<b>3.7. Mykobakterienstämme .....</b>	<b>61</b>
<b>3.8. Zellkultur .....</b>	<b>62</b>
3.8.1. Chinesische Hamsterovarien (CHO-Zellen) .....	62
3.8.2. Expression des SNAP26b in <i>E. coli</i> .....	62
3.8.3. Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>in vivo</i> AGT-Markierung .....	63
<b>3.9. Geräte .....</b>	<b>63</b>
3.9.1. HPLC .....	63
3.9.2. Absorptionsspektrometer .....	64
3.9.3. Fluoreszenzspektrometer .....	64
3.9.4. Thermocycler .....	65
3.9.5. Fluoreszenzlebensdauerspektrometer .....	65
<b>3.10. Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>66</b>
3.10.1. Silicabeads .....	66
3.10.2. SNAP-TAG .....	67
<b>3.11. Software .....</b>	<b>67</b>
3.11.1. <i>mfold</i> & RNAstructure .....	67
3.11.2. Analyze Bead .....	68
<b>4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE .....</b>	<b>70</b>
<b>SMART PROBES .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Auswahl der Zielsequenz .....</b>	<b>71</b>
<b>4.2. Auswahlkriterien spezies-spezifischer SMART PROBES .....</b>	<b>74</b>
<b>4.3. Berechnung der optimalen Versuchsparameter .....</b>	<b>75</b>
<b>4.4. Charakterisierung der M.xenopi-spezifischen SMART PROBES und</b>	
<b>Optimierung des homogenen Versuchsaufbaus .....</b>	<b>82</b>
4.4.1. Schmelzkurven und Schmelzpunkte .....	82

4.4.2. Freie Gibbssche Energie und Fluoreszenzquantenausbeute .....	85
4.4.3. Reaktionen mit künstlicher Gegensequenz.....	86
4.4.4. Fluoreszenzlebensdauern .....	88
<b>4.5. Reaktionen mit natürlichen Sequenzen .....</b>	<b>90</b>
4.5.1. PCR-Fragmentlänge .....	90
4.5.2. Hybridisierungstemperatur .....	91
4.5.3. Hybridisierungseffizienz .....	92
4.5.4. Nachweisgrenze.....	94
<b>4.6. Spezies-spezifische Identifizierung verschiedener Mykobakterien mittels SMART PROBES .....</b>	<b>95</b>
<b>4.7. Detektion der Rifampicin Resistenz vermittelnden Mutation S<sup>456</sup>L.....</b>	<b>98</b>
<b>4.8. Anwendung der SMART PROBES auf Mikrosphären .....</b>	<b>103</b>
4.8.1. Die zwei verwendeten Systeme .....	104
4.8.2. Reaktionen mit künstlichen Sequenzen zur Optimierung des Verfahrens ....	106
4.8.3. Reaktionen mit natürlichen Sequenzen.....	118
<b>SNAP-TAGS.....</b>	<b>125</b>
<b>4.9. Farbstoffwahl .....</b>	<b>126</b>
<b>4.10. Lebensdauern und relative Fluoreszenzquantenausbeuten.....</b>	<b>131</b>
<b>4.11. In vitro Assay .....</b>	<b>139</b>
<b>4.12. Allgemeine und Spezifische Lösungsmittelleffekte .....</b>	<b>147</b>
4.12.1. Allgemeine Lösungsmittelleffekte.....	147
4.12.2. Spezifische Lösungsmittelleffekte .....	152
4.12.3. Einfluss der Viskosität .....	155
<b>4.13. Experimente in lebenden Zellen .....</b>	<b>160</b>
4.13.1. hAGT Markierung in <i>Escheria coli</i> .....	160
4.13.2. hAGT Markierung in Säugierzellen .....	168
<b>5. DISKUSSION UND AUSBLICK.....</b>	<b>178</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>191</b>
<b>7. ANHANG.....</b>	<b>203</b>



# 1. Einleitung

Die molekulare Diagnostik stellt ein stetig wachsendes und immer wichtiger werdendes Arbeitsgebiet dar. Zu ihren größten Anwendungsbereichen gehören die klinische Diagnostik sowie die molekularbiologische Grundlagenforschung und Zellbiologie.

Viele Methoden der molekularen Diagnostik nutzen die Eigenschaften von organischen Fluoreszenzfarbstoffen aus. Diese sind eine gute Photostabilität, hohe Fluoreszenzquantenausbeuten, große Extinktionskoeffizienten und die Eigenschaft einer gut von der Anregungswellenlänge zu separierenden Emission. Solche Merkmale und die Tatsache, dass die Fluoreszenz synthetischer Fluorophore durch spezifische Löschmolekülen unterdrückt werden kann, trägt zur Entwicklung und dem Einsatz von neuen fluoreszierenden Sonden bei, welche mit ihrer Sensitivität und Selektivität herkömmliche Nachweisverfahren der molekularen Diagnostik um ein Vielfaches übertreffen.

Fluoreszierende Sonden eröffnen Wissenschaftlern neuartige optische Zugänge zu Reaktionspfaden innerhalb von Zellen und sogar in lebenden Organismen. So ermöglicht die Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen eine Lokalisierung bestimmter Komponenten in komplexen biomolekularen Strukturen, einschließlich lebender Zellen.

Die ersten Anwendungen von Fluoreszenzsonden fanden Ende der 1980iger Jahre statt. Seit dieser Zeit wurden verstärkt Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung von DNA-Fragmenten für die DNA-Sequenzierung eingesetzt [Ansorge 1986, Brumbaugh 1988, Prober 1989, Smith 1986, Ansorge 1990]. Die eingesetzten Verfahren benutzen einen oder mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, die durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt werden können. Die Nutzung der zwei Emissionswellenlängen bei 488 nm und 514 nm durch die Verfügbarkeit des Argon-Ionen-Lasers führte zur Entwicklung und dem daraus resultierenden, vermehrten Einsatz verschiedener Fluorescein- und Rhodaminfarbstoffe in kommerziell erhältlichen Sequenziermaschinen.

Inzwischen werden neuartige Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, welche durch bestimmte äußere Einflüsse in der Lage sind, spezifisch die Fluoreszenz zu schalten. Dies kann durch Veränderung des pH-Wertes geschehen. Seminaphthorhodafluorfarbstoffe (SNARF) zeigen unter sauren Bedingungen eine Emission von gelb-orange, in basischen Medien wechseln sie die Emission zu tiefrot [Whitaker 1991]. Eine weitere Möglichkeit, selektiv die Fluoreszenz zu beeinflussen, liegt in der Anwendung des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET). Hierbei wird Energie über einen Dipol-Dipol-Mechanismus ausgetauscht. Anregungsenergie von einem Farbstoffmolekül wird strahlungslos auf ein zweites Farbstoffmolekül übertragen. Damit ein Energietransfer stattfinden kann, muss das Fluoreszenzspektrum

des angeregten Farbstoffs mit dem Absorptionsspektrum des FRET-Partners überlappen. Dieses Prinzip machen sich Molecular Beacons (Molekulare Leuchtfeuer) zu nutze [Tyagi 1996]. Dies sind DNA-Oligonukleotide, die eine Haarnadelschleife bilden. In dieser Konformation findet FRET von einem Löschmolekül am einen Ende des Oligonukleotids auf einen Fluoreszenzfarbstoff am anderen Ende der Haarnadelstruktur statt. Ändert sich die Konformation, wird das Löschmolekül räumlich vom Farbstoff entfernt und er leuchtet wieder. Diese Konformationsänderung kann durch Hybridisierung an komplementäre DNA-Sequenzen erzeugt werden, was zur Detektion dieser verwendet werden kann.

Ebenfalls kann die Eigenschaft von Metallen, mit organischen Farbstoffen in Wechselwirkung zu treten, die spektroskopischen Eigenschaften der Fluorophore verändern. Dieses Prinzip kann ausgenutzt werden, um fluoreszenzgelöschte Sonden herzustellen. So findet durch Cu(II)-Ionen eine effizient Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen statt [Krämer 1998]. Dieser Effekt wurde ausgenutzt für die Herstellung spezieller Molecular Beacons, welche am 3'-Ende Fluorescein tragen, das im geschlossenen Zustand des Hairpins durch Komplexbildung mit Cu(II)-Ionen gelöscht vorliegt [Brunner 2004]. Basierend auf dieser Sondenstruktur gelang es in jüngster Zeit, Assoziations- und Dissoziationsprozesse von Cu(II)-bipyridin mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu studieren [Kiel 2007].

Fluoreszierende Farbstoffe werden auch immer häufiger verwendet, um medizinische Methoden zu verbessern und neue Anwendungsfelder in der Molekularbiologie zu erschließen. Mit Hilfe solcher Farbstoffe können in der molekularen Diagnostik immer sensitivere und kostengünstigere Verfahren entwickelt werden.

Das Ziel der modernen Methoden der molekularen Diagnostik ist hierbei zum einen, Viren und Bakterien schneller identifizieren zu können, zum anderen soll die Nachweisgrenze verringert werden und eine genauere Diagnostik zur Subtypisierungen von Erkrankungen möglich werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Ausnutzung der spezifischen Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen durch Photoinduzierten Elektronentransfer. Einerseits zur Entwicklung von DNA-Hairpinsonden, andererseits zur Realisierung neuer Fluoreszenzsonden für die Markierung von Proteinen *in vitro* und in lebenden Zellen. Es war das Ziel, eine verringerte unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu erreichen, was zu einer verbesserten Nachweisgrenze der Methoden führen soll.

### **SMART PROBES zur Tuberkulosedagnostik**

Die Molekulare Diagnostik birgt vor allem im Gesundheitswesen ein großes Potenzial, da sie Krankheiten entdecken kann bevor erste Symptome auftreten. Frühzeitiges Erkennen der

Krankheiten und Wahl der richtigen Therapien verbessern die Heilungschancen deutlich und ermöglichen eine exaktere Wahl eines geeigneten Wirkstoffes.

Tuberkulose und die in neuerer Zeit auftretenden antibiotikaresistenten Tuberkuloseformen stellen ein großes Problem dar. Knapp drei Millionen Menschen sterben jährlich weltweit an Tuberkulose. Zur Bekämpfung der Krankheit werden Antibiotika eingesetzt, wobei jedoch das Problem besteht, dass die Keime resistent gegen diese Medikamente werden. Diese Resistenz beobachtet man vor allem in osteuropäischen Ländern. In finanziell schlechter gestellten Ländern wie der Ukraine oder Russland wird

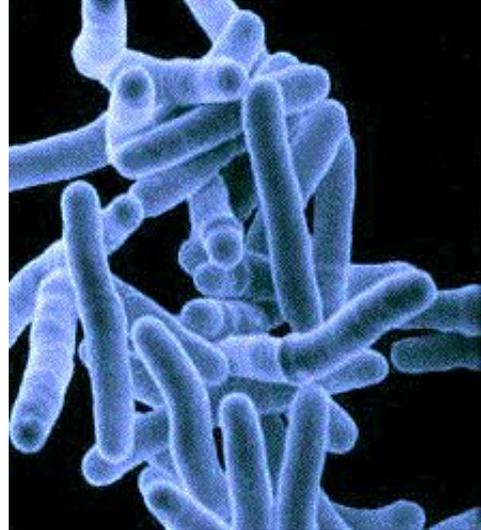


Abbildung 1-1: *M.tuberculosis* [www1].

die Krankheit heute noch unzureichend behandelt. Oft kann, entgegen der Empfehlung der WHO, nur ein Antibiotikum verabreicht werden, wodurch solche Medikamentenresistenzen entstehen können. Um dies zu vermeiden, sollten mehrere Antibiotika parallel eingenommen werden. In Deutschland werden bei einer Tuberkuloseerkrankung die vier Antibiotika Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol verabreicht. Nur das frühzeitige Erkennen des erregenden Mykobakteriums ermöglicht die Wahl des richtigen Wirkstoffes.

Um die Gegenwart einer spezifischen DNA-Sequenz eines solchen Erregers nachzuweisen, werden im Allgemeinen fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet, welche auf der Oberfläche immobilisierte Erregersequenzen nachweisen. Nach der Hybridisierung mit der Zielsequenz wird das überschüssige fluoreszierende Oligonukleotid durch einfache Waschschriffe entfernt. Die auf der Oberfläche verbleibende Fluoreszenz kann dann gemessen werden. Da bei diesen Methoden das Entfernen der überschüssigen fluoreszierenden Proben unumgänglich ist, kann kein sofortiger Nachweis durchgeführt werden. Außerdem kommt es zu unspezifischer Hybridisierung der Sonden an der Oberfläche und somit zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz.

Homogene Nachweisverfahren für DNA-Sequenzen können diese Probleme umgehen. In den vergangenen Jahren wurden einige homogene Messansätze entwickelt, welche auf fluoreszierenden Sonden basieren:

- Doppelsträngige Sondenpaare [Morrison 1989]: Ein Strang der doppelsträngigen DNA-Sonde ist mit Fluorescein markiert, der andere mit einem Löschmolekül. Bei Hybridisierung mit komplementärer Zielsequenz steigt die Fluoreszenz aufgrund des fehlenden Löschmoleküls an der Ziel-DNA an. Durch Verschiebung des Gleichge-

wichts zu Gunsten des fluoreszierenden Produkts kann die Fluoreszenzintensität erhöht werden.

- Einzelsträngige Sonden [Wittwer 1997]: Beim LIGHTCYCLER-Verfahren wird der Anstieg der Akzeptorfluoreszenz aufgrund von FRET zwischen zwei fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Oligonukleotiden gemessen. Diese sind nach Hybridisierung an denselben amplifizierten Strang benachbart, wodurch die FRET-Effizienz ansteigt. Die emittierte Fluoreszenz ist proportional zur Menge an spezifischen Zielsequenzen im Reaktionsgemisch.
- TAQMAN Sonden [Lee 1993]: TAQMAN Sonden besitzen an einem Ende eines DNA Oligonukleotids ein Löschmolekül, am anderen einen Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird durch FRET gelöscht. Die Taq-Polymerase, welche zusätzlich eine Exonuclease-Aktivität besitzt, baut die Sonde während der PCR-Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende ab. Dadurch werden Löschmolekül und Fluorophor voneinander entfernt und der Farbstoff leuchtet wieder.

All diese Sonden weisen nicht direkt die Gegenwart von Zielsequenz nach, sondern sind auf die Vervielfältigung mittels PCR angewiesen. Diese Methoden werden somit durch die Amplifikationsraten der PCR limitiert. Außerdem sind sie nur wenig spezifisch und nicht hinreichend sensitiv.

Eine höhere Nachweisgrenze kann durch die Anwendung von neu entwickelten Techniken, welche auf der Grundlage der Detektion einzelner Moleküle basieren, verbessert werden [Weiss 1999]. Beispielsweise hat die schon 1972 entwickelte Methode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) [Magde 1972] seit 1992 durch die Möglichkeit, damit geringe Mengen an Proteinen und DNA nachzuweisen, eine Renaissance erlebt [Schwille 1996].

Das Problem bei solchen Nachweisverfahren liegt darin, dass, um eine vollständige Hybridisierung mit der Erreger DNA zu erhalten, ein Überschuss an fluoreszierender Sonde eingesetzt wird. Dies wiederum führt zu einem unspezifischen Fluoreszenzhintergrund, welcher nicht entfernt werden kann. Hierdurch wird die Nachweisgrenze erheblich verschlechtert.

Eine Methode, dies zu umgehen, ist die Zweifarben Fluoreszenz Kreuzkorrelations-Spektroskopie (two-color fluorescence cross-correlation, FCCS). Diese Methode ist in der Lage, zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand zu unterscheiden, indem gleichzeitig zwei unterschiedliche Farbstoffmoleküle zur Markierung verwendet werden. Nur die Detektion von beiden Fluorophoren deutet daher auf eine erkannte Sequenz hin. Die Hintergrundfluoreszenz unterscheidet sich von dem gebundenen Zustand durch die Fluoreszenzemission nur eines Farbstoffs [Jahnz 2005].

Obwohl gezeigt wurde, dass sich diese Methoden in den Biowissenschaften anwenden lassen [Castro 1997], empfiehlt sie sich nicht für die Anwendung in der Praxis. Der experimentelle und apparative Aufwand - und damit verbunden die Kosten - bei diesen Methoden sind viel zu hoch. Für die Diagnostik von aggressiven Erregern direkt aus Patientenmaterial ist nach wie vor die Entwicklung sicherer, schneller und billiger Methoden vonnöten.

Um solche neuen diagnostischen Möglichkeiten zu eröffnen, müssen Probendesign und Durchführung des Nachweises vereinfacht werden.

Einen Erfolg versprechenden neuen diagnostischen Ansatz stellt hier der Einsatz fluoreszenzgelöschter Hairpinsonden dar. Diese Nachweismethoden basieren auf dem Nachweis kleinster Veränderungen im Erbgut. Da sich resistente und nicht-resistente Bakterien in ihrem Erbgut unterscheiden, lassen sie sich mittels Hairpinsonden identifizieren. Mutationen in der DNA von Bakterien können durch diese neuen Methoden aufgespürt werden.

Die Grundlage zu solchen Sonden bilden Molecular Beacons, welche erstmalig von Tyagi und Kramer [Tyagi 1996] synthetisiert wurden. Molecular Beacons sind Oligonukleotide, welche sowohl am 3'-Ende als auch am 5'-Ende der Sequenz markiert sind. Am 5'-Ende befindet sich ein synthetisches Fluorophor, am 3'-Ende des Stammes befindet sich ein Molekül, welches die Fluoreszenz des Fluorophors löscht. Dieses Löschmolekül ist in der Regel ein DABCYL-Derivat [Tyagi 1996] oder ein Goldorganyl [Dubertret 2001]. In Abwesenheit von komplementärer Sequenz bildet das Oligonukleotid eine Stamm-Schleife Struktur aus, einen so genannten Hairpin. Die Sonde wird so modelliert, dass die Schleifensequenz spezies-spezifisch für eine bestimmte, komplementäre DNA Sequenz ist. Das Fluorophor befindet sich bei dieser Struktur in nächster Nähe zu dem Löschmolekül, wodurch die Fluoreszenz effizient unterdrückt wird. In Gegenwart von Zielsequenz hybridisiert die Schleife mit den ihr komplementären Basen, und das Molekül entfaltet sich (Abbildung 1-2).

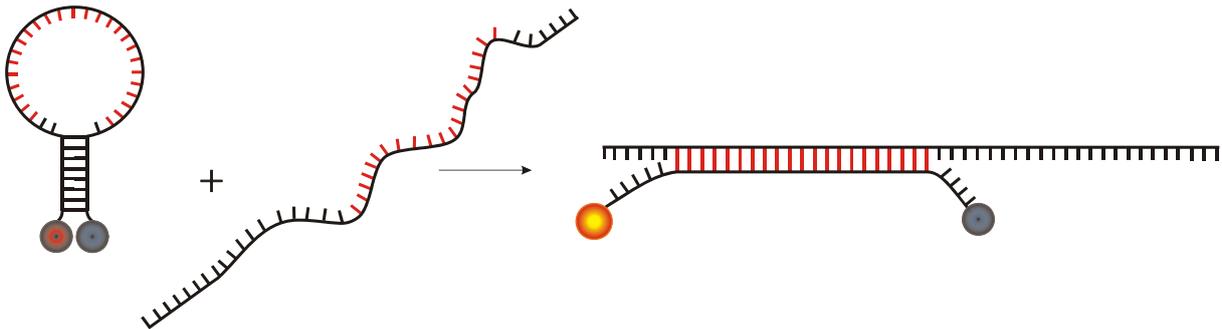


Abbildung 1-2: Reaktion eines fluoreszenzgelöschten Molecular Beacon mit DNA-Zielsequenz. Nach der Reaktion mit komplementärer Gegensequenz ist der Farbstoff wieder in der Lage zu leuchten.

Nach der Hybridisierung befindet sich das Fluorophor nicht länger in nächster Nähe zum Löschmolekül und ein Fluoreszenzanstieg kann detektiert werden.

Im Gegensatz zu diesem System kommen SMART PROBES mit dem Einsatz einer funktionellen Gruppe am Oligonukleotid aus.

SMART PROBES wurden an der Universität Heidelberg in der Gruppe von Markus Sauer entwickelt [Knemeyer 2000]. Diese Hairpinsonden nutzen die Löschung von Rhodaminfarbstoffen oder Oxazinfarbstoffen durch die DNA Base Guanosin aus. Die Löschung erfolgt über Photoinduzierten Elektronentransfer, wodurch der Einsatz eines Löschmoleküls überflüssig wird.

SMART PROBES reagieren, genauso wie Molecular Beacons, spezifisch auf die zu ihrer Nukleotidabfolge komplementäre DNA-Sequenz, wodurch, aufgrund der Einzigartigkeit der DNA der Organismen, Krankheitserreger spezifisch nachgewiesen werden können.

Anhand von Bakterien des *M.tuberculosis*-Komplexes (MTBC) sollte der Einsatz von SMART PROBES in der molekularen Diagnostik gezeigt und etabliert werden.

Da die Detektion der Gegensequenz über den Anstieg des Fluoreszenzsignals der Sonden erfolgt, ist die minimale zum Nachweis nötige Konzentration in erster Linie von den physikalischen Detektionsmöglichkeiten für das emittierte Licht abhängig. Fluoreszenzspektrometer arbeiten bei einem Probenvolumen im Mikroliterbereich bei Konzentrationen um  $10^{-8}$  M noch ausreichend empfindlich. Um weitaus sensitiver zu werden, ohne auf arbeitsaufwändige experimentelle Aufbauten, wie beispielsweise in der Einzelmolekülspektroskopie, zurückgreifen zu müssen, sollte in dieser Arbeit ebenfalls ein einfaches, heterogenes Nachweisverfahren für Tuberkuloseerreger entwickelt werden. Durch Aufkonzentrierung des Fluoreszenzsignals auf der Oberfläche von Silicakügelchen sollte eine gesteigerte Sensitivität bis in den picomolaren Bereich ermöglicht werden. Durch die Anwendungsmöglichkeit von SMART PROBES auf Mikrosphären könnten diese auch in Biochips eingesetzt werden. Biochips stellen einen entscheidenden Vorteil in der Diagnostik dar, da sie neben der Möglichkeit, maschinell auswert-

bar zu sein auch einen hohen Umsatz an Probenmaterial sowie eine Parallelisierung erlauben.

Die in den Arbeiten mit den SMART PROBES gewonnenen Erkenntnisse über das Löschen von Fluoreszenzfarbstoffen durch Guanosin konnten in die Entwicklung eines Hintergrundreduziertes Markierungsverfahrens für Proteine einfließen.

### **Kovalente Proteinmarkierung mit SNAP-TAGS**

Ein weiteres breites Einsatzgebiet von Fluoreszenzfarbstoffen stellt die Markierung von Proteinen dar.

Um Kompartimente in Zellen anzufärben, werden häufig reaktive Farbstoffe eingesetzt. Solche Farbstoffe sind unter anderem die Zellmembran durchdringenden Bisbenzimidin Farbstoffe von Hoechst (Hoechst Dyes). Hoechst Farbstoffe binden in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA und zeigen diese Bindung durch eine blaue Fluoreszenz an. Diese Interkallatoren finden Einsatz in vielen zellulären Untersuchungen, beispielsweise über den Zellzyklus oder in Apoptosestudien.

Einen ebenfalls häufig angewendeter Interkallationsfarbstoff ist DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol). Auch dieser zeigt nach Bindung in die kleine Furche der DNA eine blaue Fluoreszenz. DAPI zeichnet sich im Gegensatz zu Hoechst Farbstoffen durch eine höhere Photostabilität aus.

Andere Methoden zur Markierung innerhalb von lebenden Zellen verwenden Quantum Dots. Diese Halbleiternanokristalle finden neuerdings immer häufiger Anwendung in biologischen Applikationen [Michalet 2005]. Quantum Dots haben vergleichbare Quantenausbeuten wie organische Fluorophore, weisen jedoch eine hohe Photostabilität über lange Zeit auf sowie Extinktionskoeffizienten von bis zu mehreren Millionen [Alivisatos 1996]. All diese Eigenschaften machen eine Aufnahme von kontrastreichen und klaren Bildern möglich. So konnten erfolgreich Immunofluoreszenzaufnahmen von fixierten Zellen [Sukhanova 2004] und Gewebe [Wu 2003], sowie von Membranproteinen [Akerman 2002] durchgeführt werden.

Die spezifische Markierung von Proteinen innerhalb der Zelle stellt jedoch weiterhin eine Herausforderung dar. Quantum Dots sind durch ihre Größe von 650 kDa auf die Internalisierung mittels einer invasiven Methode angewiesen. Genauso wie Techniken, welche die Proteine *ex vivo* markieren und anschließend in die Zelle transferieren.

Etablierte Methoden greifen daher unter anderem auf autofluoreszierende Proteine zurück. Das erste Protein dieser Art stellt das Green Fluorescent Protein (grün fluoreszierendes Protein, GFP) dar. GFP wurde bereits 1961 zum ersten Mal von Osamu Shimomura beschrie-

ben [Shimomura 1962]. Erst 1992 gelang es jedoch dem Wissenschaftler Douglas Prasher [Prasher 1992], GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* zu klonieren. GFP gelangte danach schnell zu Ruhm als Fusionsprotein und Marker zur Untersuchung von Synthesen, Lokalisierungen und dem Abbau von Proteinen. Bis heute wurde eine Vielzahl von fluoreszierenden Proteinen aus anderen Meeresorganismen entdeckt und kloniert. Neuste Entwicklungen, basierend auf der Struktur von GFP, heißen PSCFP2, mCerulean blue, eGFP, Dronpa-green, EYFP, mOrange, mCherry oder mPlum und erweitern den spektralen Bereich von fluoreszierenden Proteinen [Shaner 2004].



Abbildung 1-3: Fluoreszente Proteine aus *A. victoria* [www2].

Manchmal ist es jedoch nicht möglich, ein Zielprotein als GFP-Fusionsprotein zu exprimieren. Neben der nicht vernachlässigbaren Masse von 27 kDa werden Fusionen oft durch verzögerte Reifung und ein gesteigertes Risiko von Fehlfaltungen oder Aggregatbildungen der Proteine begrenzt. Daher wurden jüngst alternative Strategien für das Markieren in lebenden Zellen entwickelt. Diese Methoden arbeiten mit genetisch kodierten *Fusion-Tags*, welche selber nicht in der Lage sind zu fluoreszieren. Sie dienen jedoch als Ziel für die Markierung mit chemischen Proben, die fluoreszierende Farbstoffe tragen.

Das erste System dieser Art wurde 1998 in der Gruppe von Roger Tsien entwickelt. Die Methode der TETRACYSSTEIN-BIARSENICAL TAGS [Adams 2002, Gaietta 2002] gründet auf der Reaktion eines fluoreszierenden Biarsen-Farbstoffs mit einer kurzen Peptidsequenz, die als *Tag* fungiert. Das Peptid trägt vier Cysteinreste, das so genannte Tetracysteinmotiv. Diese Farbstoffe, genannt FIAsH (Fluorescein Arsenical Hairpin Binder) oder ReAsH (Resorufin Arsenical Helix Binder), sind membrangängig und erlauben es, intrazelluläre Ziele zu markieren.

Eines der Hauptprobleme dieser Methode stellt die überhöhte Hintergrundfluoreszenz dar. Zwar zeichnen sich neuere Generationen dieser Moleküle, wie FIAsH II und ReAsH II, durch eine verringerte Hintergrundfluoreszenz aus, dennoch sind Sonden, welche nur dann fluoreszieren, wenn sie sich an ihrem Zielprotein befinden, von höchstem Interesse für die molekulare Diagnostik.

Um das Problem der Hintergrundfluoreszenz zu umgehen, war das Ziel dieser Arbeit, eine hintergrundreduzierte, spezifische Markierungsmethode zu entwickeln. Die Grundlage hierfür bildete die, in der Arbeitsgruppe von Kai Johnsson entwickelte, SNAP-TAG Technologie [Keppler 2003]. SNAP-TAGS leiten sich ab von dem Enzym Alkylguanintransferase (AGT),

welches in Zellen als DNA Reparaturprotein fungiert. Der zugrunde liegende Reparaturmechanismus wird ausgenutzt, indem unter Ausbildung einer kovalenten Bindung hAGT mit Benzylguaninkonjugaten umgesetzt wird. Somit wird eine schnelle und irreversible Markierung von AGT-Fusionsproteinen erzielt. Im Vergleich mit anderen *Tag*-Systemen sticht diese Methode durch seine geringe Größe von nur 21 kDa und die Möglichkeit, ein breites Spektrum an organischen Fluorophoren einzusetzen, hervor.

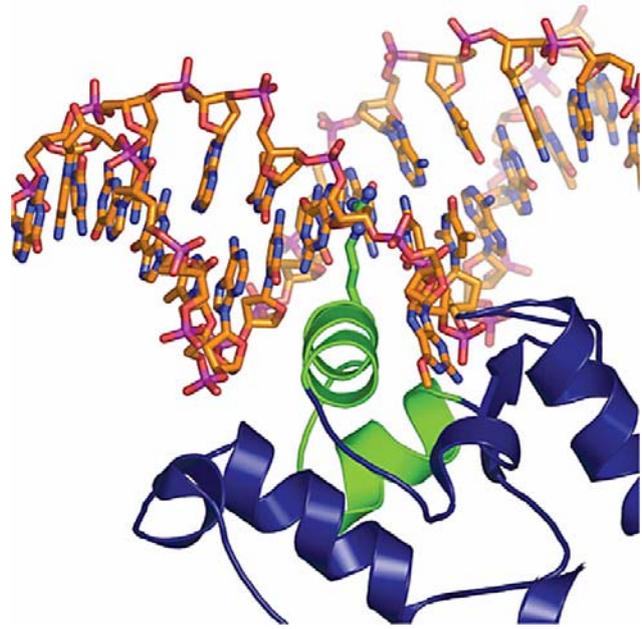


Abbildung 1-4: Bindung des Arginin-Fingers des hAGT in die kleine Furche der DNA [Daniels 2004].

Basierend auf vorangegangenen Arbeiten zur Fluoreszenzlöschung durch Guanosin [Sauer 1995] und die Erkenntnisse der

Fluoreszenzlöschung in SMART PROBES wurde das System gezielt für einen fluoreszenzgelöschten Markierungsansatz gewählt, da es als einziges mit einem Guaninderivat arbeitet. Dadurch kann eine Löschung von organischen Farbstoffen erreicht werden.

In dieser Arbeit sollte diese Methode gezielt dahingehend weiterentwickelt werden, dass spezifische Farbstoffe gefunden werden sollten, welche nur leuchten, wenn das Protein markiert wird. Somit könnten Proteine *in vivo* und *in vitro* selektiv mit organischen Farbstoffen angefärbt werden, wobei durch eine Verringerung unspezifischer Fluoreszenz eine gesteigerte Sensitivität erreicht werden sollte.

Das Augenmerk lag einerseits auf der Untersuchung von Farbstoffen verschiedener Klassen, welche sich in ihren spektroskopischen Eigenschaften und der emittierten Wellenlänge unterscheiden. Dadurch sollten die am effizientesten gelöschten Farbstoffe identifiziert werden.

Andererseits sollten die synthetisierten fluoreszenzgelöschten Sonden in Versuchen mit lebenden Zellen zum Einsatz gebracht werden. Dabei sollte getestet werden, ob sie in der Lage sind, die Membranen von Zellen zu durchdringen und gezielt Proteine innerhalb der Zellen anzufärben. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die unspezifische Hintergrundfluoreszenz durch den Einsatz dieser neuen Substrate verringert werden kann. Dies würde verglichen mit kommerziell erhältlichen *Tags* zu einer gesteigerten Sensitivität führen.

Die Schwerpunkte der Arbeit liegen auf der Fluoreszenzlöschung organischer Fluorophore durch photoinduzierten Elektronentransfer. Im ersten Teil werden SMART PROBES behandelt, die auf der Löschung des Oxazinfarbstoffs MR 121 durch das Nukleotid Guanosin beruhen.

Der Einsatz dieser Sonden wurde hinsichtlich der Detektion von Tuberkuloseerregern untersucht. Der zweite Teil beschäftigt sich mit der Synthese und Anwendung von gelöschten SNAP-TAG Substraten. Hierbei wurden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die durch die Base Guanin gelöscht werden. Diese Sonden werden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Proteine *in vitro* und in lebenden Zellen zu markieren.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Aus der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Atomen kann man wertvolle Hinweise über den Atomaufbau gewinnen. Diese ermöglichen es, die energetischen Verhältnisse der Elektronenhülle eines einzelnen Atoms zu verstehen. Bei der Wechselwirkung mit Molekülen kommen weitere Parameter, wie der Abstand der Atome im Molekül und die zwischen ihnen wirkenden Kräfte hinzu.

#### 2.1.1. ABSORPTION

Bei der Absorption von Licht der Wellenlänge  $\lambda$  wird ein Elektron aus dem elektronischen Singulettgrundzustand  $S_0$  unter Aufnahme der Energiedifferenz  $\Delta E$  in einen energetisch höheren elektronischen Singulettzustand  $S_n$  angeregt. Dabei besteht nach der Frequenzbedingung von Nils Bohr folgender Zusammenhang zwischen der Frequenz  $\nu$  des eingestrahlichten Lichts und der Übergangsenergie  $\Delta E$ :

$$h\nu = \Delta E = S_1 - S_0$$

wobei  $h$  das Plancksche Wirkungsquantum ist. Nur wenn diese Resonanzbedingung erfüllt ist, kann Licht absorbiert werden.

Trifft elektromagnetische Strahlung mit der Frequenz  $\nu$  auf ein Molekül im Grundzustand 0, welches durch die Wellenfunktion  $\psi_0$  beschrieben wird, tritt diese in Wechselwirkung mit dem Molekül. Durch die Absorption der elektromagnetischen Welle wird das Molekül in den Zustand 1 angeregt, welcher durch die neue Wellenfunktion  $\psi_1$  beschrieben wird. Daher gilt für die Übergangsenergie  $\Delta E$ :

$$\Delta E = E_1(\psi_1) - E_0(\psi_0) = \Delta E_{vib} + \Delta E_{rot} + \Delta E_{el}$$

Bei einem Elektronenübergang werden auch Schwingungen  $\Delta E_{vib}$  und Rotationen  $\Delta E_{rot}$  angeregt. Dadurch ist, im Gegensatz zu den Linienspektren bei Atomen, nur noch eine breite

Absorptionsbande zu beobachten. Dies kommt vor allem bei großen Molekülen vor, bei denen eine Vielzahl von Übergängen eng beieinander liegt.

Die Energiedifferenz der elektronischen Übergänge  $\Delta E_{el}$  ist im Allgemeinen so groß, dass sie bei Raumtemperatur thermisch nicht aufgebracht werden kann. Für Rhodaminfarbstoffe mit einer Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  und dem ersten angeregten Zustand  $S_1$  von zirka 2,2 eV (212,3 kJ/mol) liegt das Verhältnis von Molekülen im angeregten Zustand zu Molekülen im Grundzustand bei Raumtemperatur nach dem Boltzmannschen Verteilungssatz bei zirka  $10^{-37}$ . Im Gegensatz dazu wird diese Energiedifferenz leicht von elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge zwischen 400 und 800 nm (1,5 – 3,0 eV) aufgebracht.

Ein Maß für die Übergangswahrscheinlichkeit eines Elektrons aus dem elektronischen Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand liefert die dimensionslose Oszillatorstärke  $f$ . In der klassischen Betrachtungsweise gibt sie den Anteil an Elektronen wieder, die einen Übergang vollziehen. Der quantenmechanische Ausdruck für die Oszillatorstärke  $f_{01}$  eines Übergangs aus dem Grundzustand  $S_0$  in den elektronisch angeregten Zustand  $S_1$  lautet:

$$f_{01} = \text{const.} \cdot \Delta E \cdot |\vec{\mu}_{01}|^2$$

wobei  $\Delta E$  die Anregungsenergie des elektronischen Übergangs ist und  $\mu_{01}$  das Übergangsdipolmoment. Dieses ist definiert durch:

$$\vec{\mu}_{01} = \int \psi_0 \cdot \vec{\mu} \cdot \psi_1 dx dy dz$$

Die Oszillatorstärke und somit die Wahrscheinlichkeit des Übergangs ist also direkt proportional zum Quadrat des Übergangsdipolmoments  $\mu$ . Ist das Übergangsdipolmoment 0, ist der Übergang verboten und es findet keine Absorption statt.

Experimentell kann die Oszillatorstärke durch den integralen Absorptionskoeffizienten  $A$  bestimmt werden, welcher sich aus folgender Gleichung ergibt:

$$A = \int \varepsilon_{\nu} d\nu$$

wobei  $\varepsilon_\nu$  der molare Extinktionskoeffizient bei der Frequenz  $\nu$  ist. Bei isolierten Absorptionsbanden kann der integrale Absorptionskoeffizient  $A$ , welcher der Fläche unter der Absorptionsbande entspricht, näherungsweise als Produkt von  $\varepsilon_\nu$  und der Halbwertsbreite  $\Delta\nu_{1/2}$  abgeschätzt werden.

Die Oszillatorstärke  $f$  erhält man dann aus dem Integral über die Spektrallinien nach folgender Gleichung:

$$f = \frac{4m_e c \varepsilon_0}{N_A e^2} A$$

mit  $m_e$  als Masse des Elektrons,  $c$  = Lichtgeschwindigkeit,  $\varepsilon_0$  als elektrische Feldkonstante,  $e$  als Elektronenladung.

Die Größenordnung der Oszillatorstärke für erlaubte Elektronenübergänge ist in den meisten Farbstoffmolekülen etwa 1.

Die Abhängigkeit der Lichtabsorption von der Konzentration eines Stoffes beim Durchstrahlen einer Lösung wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$A$  ist die Absorption,  $I_0$  und  $I$  sind die Intensitäten des eintretenden bzw. austretenden Strahls,  $c$  ist die Konzentration,  $d$  die durchstrahlte Schichtdicke der Lösung und  $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient. Dieser ist ein Maß für die Stärke der Absorption eines Farbstoffs. Das Lambert-Beersche Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht und verdünnte Lösungen ( $c < 10^{-2}$  mol/l), bei denen ausschließlich der gelöste Stoff absorbiert.

Die Übergangszeit bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung liegt bei  $10^{-15}$  s. So kann für theoretische Berechnungen die Born-Oppenheimer Näherung angenommen werden. Eine dynamische Kopplung zwischen Kern- und Elektronenbewegung wird hierbei vernachlässigt. Der Elektronenübergang ist so schnell, dass die Kerne keine Zeit haben, darauf zu reagieren. Die schnellen Elektronenbewegungen passen sich den langsamen Gerüstschwingungen flexibel an. Das bedeutet, dass elektronische Übergänge in einem Potenzialdiagramm stets vertikal verlaufen und sich die Molekülstruktur während eines solchen Übergangs nicht ändert. Dies kann durch das Franck-Condon Prinzip beschrieben werden (Abbildung 2-1) [Condon 1928].

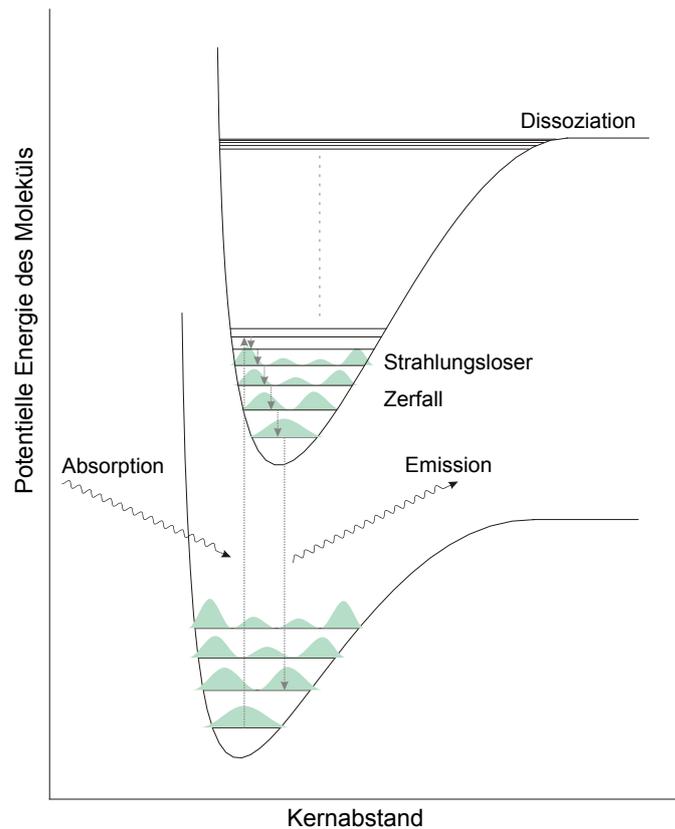


Abbildung 2-1: Franck-Condon Prinzip: Mechanismus der Fluoreszenz.

Dieses besagt, dass ein elektronischer Übergang aus dem, bei Raumtemperatur am stärksten besetzten, Grundzustandsniveau  $S_0$  eines Moleküls, in ein höheres angeregtes Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes  $S_1$  vertikal verläuft.

Der Übergang erfolgt in ein schwingungsangeregtes Niveau des elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$ . Nach diesem Übergang relaxiert das angeregte Elektron schnell in das niedrigste Schwingungsniveau des ersten elektronisch angeregten Zustand  $S_1$ . Diese Schwingungsrelaxation erfolgt innerhalb von  $10^{-12}$  s. Der spontane Übergang in den Grundzustand unter Emission eines Photons erfolgt wiederum nach dem Franck-Condon Prinzip vertikal in ein schwingungsangeregtes Niveau des Grundzustands  $S_0$ .

## 2.1.2. EMISSION

Die Emission von Photonen aus elektronisch angeregten Zuständen lässt sich in zwei Prozesse einteilen: Fluoreszenz und Phosphoreszenz.

Die verschiedenen strahlenden und strahlungslosen Prozesse, die in Molekülen vorkommen können, werden in nachfolgendes Jablonski-Diagramm (Abbildung 2-2) zusammengefasst. Es stellt die Möglichkeiten zur Desaktivierung eines Moleküls nach elektronischer Anregung in den ersten Singulettzustand dar.

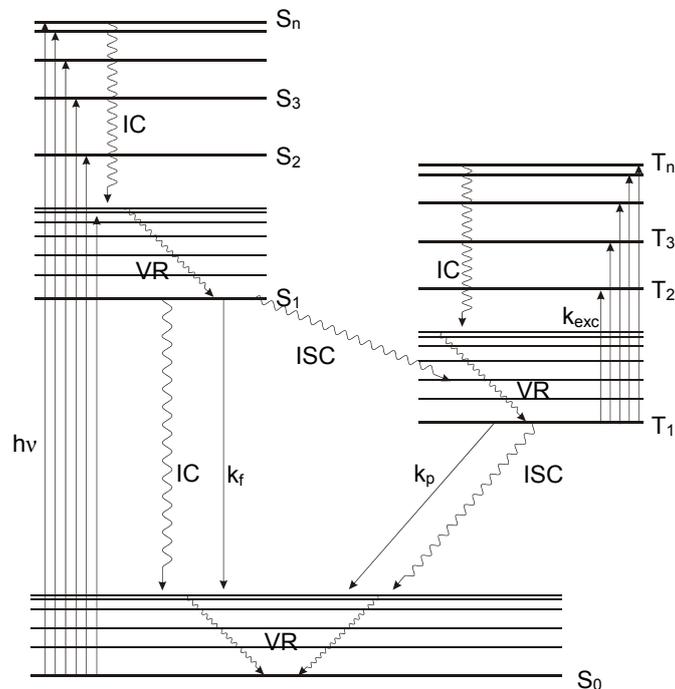


Abbildung 2-2: Energieniveauschema für organische Farbstoffmoleküle (Jablonski-Diagramm). IC: innere Umwandlung, ISC: intersystem crossing, VR: vibrational relaxation (Schwingungsrelaxation).

Durch Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge befindet sich das Farbstoffmolekül entweder in den höheren Schwingungsniveaus des ersten angeregten Zustandes  $S_1$ , oder aber in den höher gelegenen Singulettzuständen  $S_2$ ,  $S_3$  usw. Die Anregung erfolgt bei Raumtemperatur sehr schnell in zirka  $10^{-15}$  s. Dabei verändert sich der Spin nicht (Spinverbot-Auswahlregel).

Im elektronisch angeregten Zustand gibt es unter Vernachlässigung chemischer Reaktionen verschiedene photophysikalische Wege für die Depopulation. Diese sind in Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Übergang	Beschreibung	Rate	Zeit [s]
$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	Fluoreszenz	$k_F$	$10^{-9} - 10^{-7}$
$S_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$	Strahlungslose Relaxation, Löschung	$k_{IC}$	$10^{-7} - 10^{-6}$
$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	Phosphoreszenz	$k_P$	$10^{-3} - 100$
$T_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$	Strahlungslose Relaxation, Löschung	$k_{ISC}$	$10^{-3} - 100$
$S_n \rightarrow S_1$	Strahlungslose Relaxation	$k_{IC}$	$10^{-14} - 10^{-10}$
$S_1 \rightarrow T_1$	Intersystem Crossing	$k_{ISC}$	$10^{-10} - 10^{-8}$
$S_1 \rightarrow S_1$	Schwingungs Relaxation	$k_{VR}$	$10^{-12} - 10^{-10}$

Tabelle 2-1: Übersicht über die Relaxationsprozesse eines Farbstoffmoleküls aus dem elektronisch angeregten Zustand.

Die Elektronen in den höheren Singulettzuständen  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_n$  gelangen in Farbstofflösungen schnell ( $k_{IC} = 10^{11} - 10^{13} \text{ s}^{-1}$ ) strahlungslos in den  $S_1$  Zustand (Kashas Regel). Die Elektronen, die sich in höheren Schwingungsniveaus des  $S_1$  Zustandes befinden, relaxieren im Subpikosekundenzeitraum in die Boltzmann-Verteilung der Schwingungszustände (VR) des  $S_1$  Zustandes. Die Energie wird hierbei durch Stöße an Nachbaratome abgegeben.

Aus dem untersten Niveau des  $S_1$  Zustandes haben die Elektronen die Möglichkeit, ihre Energie als Fluoreszenz ( $k_F = 10^9 - 10^6 \text{ s}^{-1}$ ) oder durch strahlungslose Desaktivierung ( $k_{IC}$ ) abzugeben, und so in den  $S_0$  Zustand überzugehen. Eine andere Form der strahlungslosen Desaktivierung ist der Übergang in den Triplettzustand  $T_1$ . Dies ist verbunden mit einer Spinumkehr. Der  $T_1$  Zustand wird nicht durch Lichtabsorption aus dem  $S_0$  Zustand erreicht, da dieser Übergang verboten ist. Ein Übergang aus dem  $T_1$  Zustand in den Grundzustand braucht, da es sich ebenfalls um einen spinverbotenen Übergang handelt, sehr viel länger ( $10^{-3} - 100 \text{ s}$ ). Der Übergang erfolgt als Phosphoreszenz in Festkörpern oder strahlungslos in Lösungen.

Die Emission von Fluoreszenzphotonen kommt zustande, wenn ein Elektron aus einem Schwingungsgrundzustand eines elektronisch angeregten Zustandes  $S_1$  in einen höheren Schwingungszustand des elektronischen Grundniveaus  $S_0$  übergeht. Nach der Kasha Regel erfolgt dies normalerweise aus dem Schwingungsgrundzustand des  $S_1$  Niveaus in das

Grundniveau  $S_0$ , da strahlungslose Desaktivierungsprozesse höher angeregter Zustände wesentlich schneller verlaufen. Eine Ausnahme stellt hier beispielsweise das Azulen dar, welches aus dem  $S_2$  Zustand fluoresziert [Kasha 1952]. Dies kommt zustande, da in Azulen der Energieunterschied zwischen  $S_2$  und  $S_1$  sehr groß ist. Dadurch ist die Geschwindigkeit der strahlungslosen Relaxationen (*internal conversation*) von  $S_2$  zu  $S_1$  verlangsamt.

Der Übergang in höher angeregte Schwingungsniveaus erfolgt, wie schon beschrieben, nach dem Franck-Condon Prinzip unter Beibehaltung des Kernabstandes. Unterscheiden sich die Geometrien des  $S_0$  und des  $S_1$  Zustandes nicht wesentlich voneinander, verhalten sich Absorptions- und Fluoreszenzspektrum einer Substanz wie Bild und Spiegelbild. Dabei ist das Fluoreszenzspektrum bathochrom verschoben.

Das Auftreten von Fluoreszenz wird durch verschiedene Faktoren begünstigt:

- Starre Struktur des Moleküls, so dass keine strahlungslosen Desaktivierungen stattfinden können.
- Intersystem Crossing wird verhindert durch geringe Spin-Bahn-Kopplung, weshalb die Substitution mit schwereren Atomen vermieden wird.
- Starker Elektronendonator und Elektronenakzeptor in konjugationsfähigen Positionen, wodurch das Molekül hauptsächlich über *charge-transfer* angeregt wird.

### 2.1.3. FLUORESZENZLEBENSDAUER UND FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE

Fluoreszenzlebensdauer und Fluoreszenzquantenausbeute hängen von der Emissionsrate des Fluorophors und der Anzahl der strahlungslosen Übergänge vom untersten Schwingungsniveau  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$  ab. Desaktivierungsprozesse aus höheren angeregten Zuständen sind so schnell, dass die Fluoreszenzemission bei den meisten Molekülen aus dem ersten angeregten Schwingungsniveau erfolgt.

Nach der Born-Oppenheimer Näherung kann ein angeregtes Molekül nur unter Aussendung eines Lichtquants in den elektronischen Grundzustand relaxieren. Man beobachtet jedoch bei den meisten organischen Molekülen kleinere Fluoreszenzquantenausbeuten als die mit dieser Annahme erwarteten. Dies liegt an dem Vorhandensein von strahlungslosen Desaktivierungen. Der Anteil der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse wird um so größer, je komplexer und größer die Moleküle werden. Um strahlungslose Prozesse theoretisch zu erklären, muss die Abhängigkeit der elektronischen Wellenfunktion von den Differentialoperatoren der Kernbewegung berücksichtigt werden. Die Gleichungen hierfür sind zwar formuliert, jedoch sind sie so komplex, dass sie quasi nicht gelöst werden können [DiBartolo 1980].

Hohe Fluoreszenzquantenausbeuten sind vor allem bei Farbstoffen zu erwarten, die eine starre Molekülstruktur besitzen. Dadurch ist die Relaxation aufgrund von Schwingungen und Rotationen von Molekülgruppen erschwert, und es kommt seltener zu strahlungslosen Prozessen.

### Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  berechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl der emittierten Photonen  $N_{em}$  zur Zahl der absorbierten Photonen  $N_{abs}$  [Becker 1983]:

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}}$$

Sie setzt sich zusammen aus der strahlungslosen Relaxation und der Fluoreszenz. Die Fluoreszenzquantenausbeute wird durch den Anteil der absorbierten Photonen bestimmt, die zu einer Emission führen. Mit den Geschwindigkeitskonstanten aller konkurrierender Prozesse berechnet sie sich nach folgender Gleichung:

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + \sum k_i}$$

mit  $k_f$  als Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und  $k_i$  als Geschwindigkeitskonstante der konkurrierenden desaktivierenden Prozesse.

### Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  ist definiert als die mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verweilt, bevor es in den Grundzustand zurückfällt. Normalerweise liegen Fluoreszenzlebensdauern im Bereich unter 10 ns.

Sie berechnen sich aus der Geschwindigkeit aller Desaktivierungsprozesse nach folgender Gleichung:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}}$$

Nur einige Moleküle emittieren ihr Photon zum Zeitpunkt  $t = \tau$ . Die Lebensdauer ist also ein Mittelwert der Zeit, die ein Photon im angeregten Zustand zubringt.

Die natürliche Lebensdauer  $\tau_n$  ist die Lebensdauer in Abwesenheit von strahlungslosen Desaktivierungsprozessen. Sie berechnet sich demzufolge nach folgender Gleichung:

$$\tau_n = \frac{1}{k_f}$$

Die Geschwindigkeit der strahlenden Relaxation berechnet sich näherungsweise aus der Strickler-Berg-Beziehung [Strickler 1962]:

$$k_f = 2,88 \cdot 10^{-9} \nu_0^{-2} n^2 \frac{g_g}{g_e} \int \varepsilon d\nu$$

wobei  $n$  der Brechungsindex ist,  $g_g$  und  $g_e$  die Entartung des Grundzustandes und des angeregten Zustandes.  $\varepsilon$  ist der Extinktionskoeffizient und  $\nu_0$  die Wellenzahl des Absorptionsmaximums. Die Integration wird über die gesamte Absorptionsbande durchgeführt.

Die experimentell beobachtete Lebensdauer ist aufgrund der strahlungslosen Prozesse immer kleiner als die natürliche Lebensdauer.

Die natürliche Lebensdauer kann auch aus der Quantenausbeute  $\Phi$  berechnet werden:

$$\tau_n = \frac{\tau}{\Phi}$$

Dieser Zusammenhang gilt jedoch nur bei rein dynamischen Löschprozessen.

Über die Abnahme der Anzahl angeregter Farbstoffmoleküle  $[F_0^*]$  mit der Zeit kann ebenfalls die Fluoreszenzlebensdauer berechnet werden. Das Geschwindigkeitsgesetz für die Abnahme der Konzentration der angeregten Fluoreszenzmoleküle mit der Zeit  $t$  kann folgendermaßen beschrieben werden:

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

$k_{IC}$  und  $k_{ISC}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse und  $k_f$  ist die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz.

Integriert man diese Gleichung zwischen  $t = 0$  und  $t$  unter Beachtung der Geschwindigkeit aller Desaktivierungsprozesse ergibt sich:

$$[F(t)^*] = [F_0^*]e^{-t/\tau}$$

Da die Zahl der angeregten Moleküle zur Zeit  $t$   $[F(t)^*]$  proportional zur beobachtbaren Fluoreszenzintensität  $I(t)$  ist, ergibt sich:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer ist also die Zeit, in der die Fluoreszenzintensität auf  $1/e$  ihres Anfangswertes abgesunken ist. Diese Annahme ist jedoch nur für monoexponentielle Abnahmen der Fluoreszenzintensität zu erwarten. Gerade aber in biologisch relevanten Systemen findet man häufig ein Fluoreszenzabklingverhalten, welches nicht mehr mit einer einzigen Exponentialfunktion beschrieben werden kann. In diesen Fällen müssen die erhaltenen Kurven mit einer Summe aus mehreren Exponentialfunktionen angepasst werden:

$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i}; \quad \sum_i a_i = 1$$

wobei  $a_i$  die Amplitude der Komponente  $i$  im angeregten Zustand und  $\tau_i$  die Lebensdauer der Komponente  $i$  ist.

So erhaltene Lebensdauern müssen nicht unbedingt eine physikalische Bedeutung besitzen. Vielmehr stellen sie das Ergebnis einer mathematischen Anpassung der Lebensdauerverteilung dar.

Für den Fall mehrerer verschiedener Fluorophore, oder für Fluorophore in unterschiedlichen Umgebungen, die nicht miteinander wechselwirken, besitzen die berechneten Amplitudenanteile und Fluoreszenzlebensdauern eine physikalische Bedeutung. Die Werte  $\tau_i$  stellen die Fluoreszenzlebensdauern der einzelnen Spezies dar. Die fluorezenzgewichteten Anteile  $f_i$  jeder Spezies können nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$f_i = \frac{a_i \tau_i}{\sum_i a_i \tau_i}$$

Die mittlere Fluoreszenzlebensdauer aller Prozesse berechnet sich dann folgendermaßen:

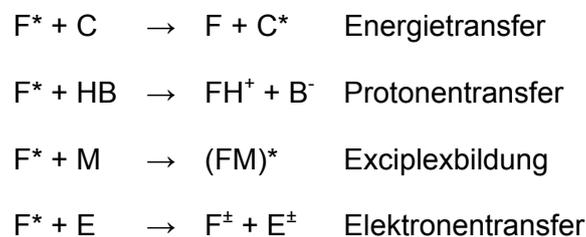
$$\tau_{AV} = \sum_i f_i \cdot \tau_i$$

## 2.1.4. MOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN UND DEREN EINFLUSS AUF DIE FLUORESZENZ

### Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebensdauer können durch eine Vielzahl von Prozessen verringert beziehungsweise verkürzt werden. Während sich der Farbstoff im ersten angeregten Zustand befindet ( $F^*$ ), finden aufgrund veränderter elektronischer Eigenschaften Reaktionen mit Fremdmolekülen statt, die im Grundzustand nicht möglich sind.

Folgende Prozesse können hierfür verantwortlich sein [Lakowicz 1999]:



Damit eine intramolekulare Löschung stattfinden kann, müssen sich Löschmolekül und Farbstoff während der Verweilzeit im angeregten Zustand auf einen für die Reaktion notwendigen Abstand nahe kommen. Die zeitliche Abnahme der Fluoreszenzintensität  $I(t)$  bei Anwesenheit eines Löschmoleküls  $Q$  ist durch folgende Gleichung gegeben:

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

wobei  $k$  die Summe aus  $k_f$ ,  $k_{IC}$  und  $k_{ISC}$  ist,  $k_q$  stellt die bimolekulare Löschkonstante dar.

Die Fluoreszenzlebensdauer berechnet sich nach:

$$\tau = \frac{1}{k + k_q[Q]}$$

Bei der Analyse der Kinetik einer bimolekularen Löschreaktion wird die Konzentration des Löschmoleküls [Q] als sehr viel größer als die Konzentration des angeregten Fluorophors [F\*] angenommen ( $[Q] \gg [F^*]$ ). Somit kann die Konzentration der Löschmoleküle als zeitlich konstant angenommen werden. Damit geht die Kinetik zweiter Ordnung in eine Kinetik pseudo-erster Ordnung über.

Beim ENERGIETRANSFER, auch Försterscher Energietransfer, wird die Energie weder über Stoßkontakt noch über eine komplexe Reaktion ausgetauscht [Förster 1948, Stryer 1978]. Es handelt sich um einen Dipol-Dipol-Mechanismus, bei dem die Anregungsenergie vom Farbstoffmolekül F\* strahlungslos auf ein geeignetes Löschmolekül C übertragen wird. Damit ein Energietransfer stattfinden kann, muss das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffmoleküls mit dem Absorptionsspektrum des Löschmoleküls überlappen.

Beim ELEKTRONENTRANSFER ist ebenfalls kein Stoß der beiden Partner erforderlich. Hier handelt es sich um eine Redoxreaktion im angeregten Zustand. Die Geschwindigkeit wird durch die Redoxpotenziale, den Abstand und die Wechselwirkungsgeometrie bestimmt.

Die ECIPLEXBILDUNG ist eine chemische Bildungsreaktion einer Molekülverbindung (FM)\* im angeregten Zustand. Sie stellt einen Spezialfall der Elektronentransferreaktion dar.

PROTONENTRANSFER stellt eine Säure-Base Reaktion dar. Hierfür müssen acide Protonen vorhanden sein und veränderte pK<sub>a</sub> Werte im angeregten Zustand.

### **Dynamische und statische Fluoreszenzlöschung**

Bei der Löschung durch Fremdmoleküle wird im Allgemeinen zwischen zwei Arten unterschieden:

#### (a) Dynamische Löschung

Bei der Dynamischen Löschung findet im angeregten Zustand des Fluorophors eine Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Löschmolekül statt. Es bildet sich ein Begegnungskomplex. Nach erfolgter Stoßlöschung geht das Fluorophor strahlungslos in den elektronischen Grundzustand über. Hierdurch wird sowohl die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt als auch die Fluoreszenzintensität erniedrigt (Abbildung 2-3).

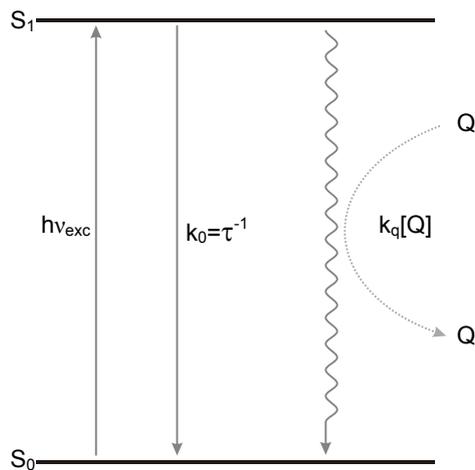


Abbildung 2-3: Dynamische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffs im ersten angeregten Zustand  $S_1$  durch Löschmoleküle Q.

Die dynamische Fluoreszenzlöschung wird durch die klassische Stern-Volmer Gleichung beschrieben:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q]$$

wobei  $I_0$  die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Löschmolekülen ist,  $I$  die Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit von Löschmolekülen,  $[Q]$  stellt die Konzentration des Löschmoleküls dar,  $k_q$  ist der bimolekulare Geschwindigkeitskoeffizient der Löschung und  $\tau_0$  beziehungsweise  $\tau$  sind die Lebensdauern des Fluorophors in An- und Abwesenheit des Löschmoleküls.

Bei rein dynamischen Löschungen erhält man beim Auftragen von  $\tau_0/\tau$  gegen die Löschmolekülkonzentration eine Gerade. Die Steigung der Geraden entspricht der Stern-Volmer Konstante  $K_D = k_q \cdot \tau_0$ .

#### (b) Statische Löschung

Bei der statischen Löschung bildet sich im Grundzustand des Fluorophors ein Komplex (FQ) mit dem Löschmolekül aus, welcher nicht in der Lage ist zu fluoreszieren, oder nur noch sehr schwach fluoresziert. Im angeregten Zustand befindet sich der Komplex wieder im Gleichgewicht mit der freien Form des Farbstoffs. Somit wird durch die Komplexierung des freien Farbstoffs die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzquantenausbeute verringert, jedoch nicht die Fluoreszenzlebensdauer (Abbildung 2-4).

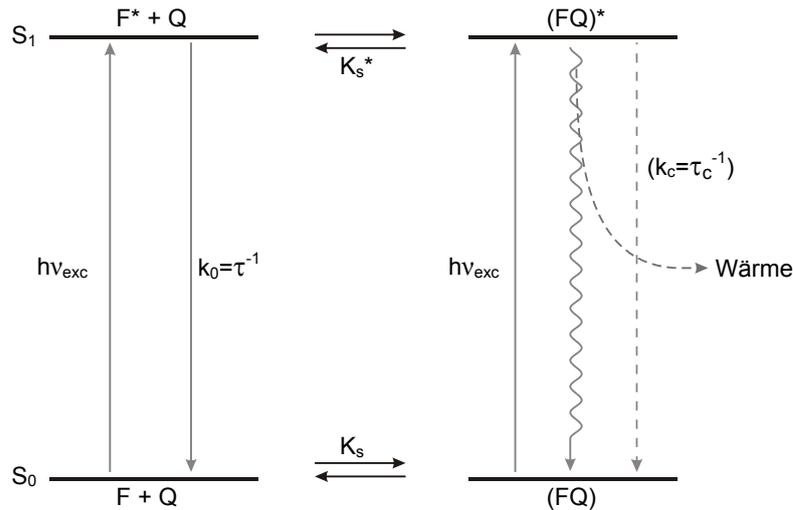


Abbildung 2-4: Statische Löschung eines Fluoreszenzfarbstoffs F durch Bildung eines Grundzustandkomplexes mit dem Löschmolekül Q.

Für den Fall rein statischer Löschung mit Bildung eines nicht fluoreszierenden Grundzustandkomplexes entspricht die statische Stern-Volmer Konstante der thermodynamischen Gleichgewichtskonstante  $K_S$  für die Komplexbildung:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S \cdot [Q]$$

Der Anteil der nicht komplexierten und daher nicht fluoreszierenden Farbstoffmoleküle kann dann nach folgender Gleichung berechnet werden:

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

Für das Verhältnis der Lebensdauern gilt  $\tau_0/\tau = 1$ . Trägt man  $I_0/I$  gegen die Konzentration des Löschmoleküls auf, so erhält man eine Gerade mit der Komplexbildungskonstante  $K_S$  als Steigung.

In vielen Fällen findet jedoch sowohl eine dynamische Löschung durch Bildung eines Stoßkomplexes im ersten angeregten Zustand statt, als auch eine statische durch Bildung eines Grundzustandkomplexes.

Für diesen Fall gilt eine modifizierte Stern-Volmer Gleichung:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = \frac{\tau_0}{\tau} \cdot (1 + K_S \cdot [Q])$$

Diese Gleichung ist bezüglich der Löschmittelkonzentration [Q] zweiter Ordnung.

### Photoinduzierter Elektronentransfer

Durch Absorption von Licht werden die Redoxeigenschaften eines Farbstoffmoleküls verändert.

Wird ein Photon absorbiert, so geht ein Elektron vom HOMO (höchstes besetztes Molekülorbital, highest occupied molecular orbital) in das LUMO (niedrigstes besetztes Molekülorbital, lowest unoccupied molecular orbital) über. Im angeregten Zustand  $S_1$  ist daher ein Elektronenloch im HOMO, im LUMO befindet sich hingegen ein um den Energiebetrag der Übergangsenergie  $E_{0,0}$  reicheres Elektron. Daher wird das Molekül um diesen Energiebetrag leichter reduziert oder oxidiert als ein Molekül im Grundzustand. Die Übergangsenergie entspricht dem elektronischen Übergang vom  $S_0$  in das  $S_1$  Niveau und zwar jeweils in den untersten Schwingungszustand  $v_0=0$  und  $v_1=0$ . Sie wird als Mittelwert aus den Energien der Absorptions- und Emissionsmaxima bestimmt [Marcus 1956, Grabowski 1976]. Abbildung 2-5 verdeutlicht die Oxidations- und Reduktionsmöglichkeiten im Grundzustand  $S_0$  und im ersten angeregten Zustand  $S_1$ .

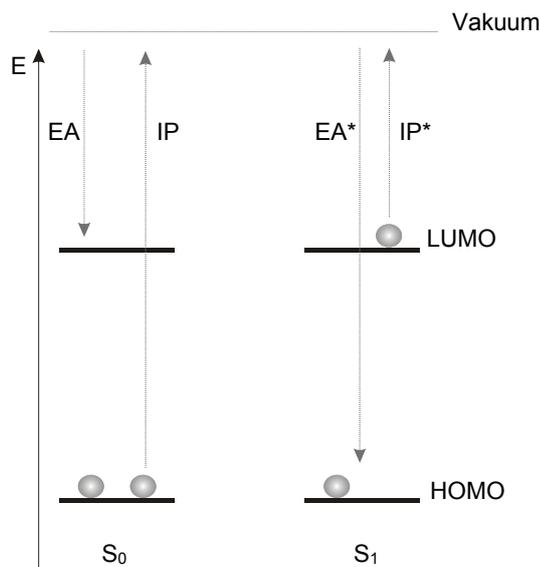


Abbildung 2-5: Übersicht über die Oxidations- und Reduktionsmöglichkeiten eines Moleküls im Grundzustand  $S_0$  und im angeregten Zustand  $S_1$ .

Wird ein Elektron aus einem bindenden Orbital entfernt, muss die Ionisierungsenergie (IP) aufgebracht werden. Im Grundzustand ist diese sehr viel größer als im angeregten Zustand (IP<sup>\*</sup>). Bei der Anlagerung eines Elektrons wird im angeregten Zustand (EA<sup>\*</sup>) mehr Energie frei als im Grundzustand (EA).

Für die Oxidation eines Moleküls im angeregten Zustand gilt:

$$E_0(M^+ / M^*) = E_0(M^+ / M) - \Delta E_{0,0}$$

Für die Reduktion eines angeregten Moleküls gilt:

$$E_0(M^* / M^-) = E_0(M / M^-) + \Delta E_{0,0}$$

$E_0(M^+ / M^*)$  und  $E_0(M^+ / M)$  sind die Oxidationsenergien des Moleküls im angeregten Zustand.  $E_0(M^* / M)$  und  $E_0(M / M^-)$  sind die entsprechenden Reduktionsenergien.

Je nach elektronischen Eigenschaften kann ein Farbstoffmolekül also von einem Elektronendonator reduziert oder von einem Elektronenakzeptor oxidiert werden. Im angeregten Zustand wird ein Molekül um den Betrag der Übergangsenergie  $\Delta E_{0,0}$  leichter oxidiert beziehungsweise reduziert als im Grundzustand (Abbildung 2-6).

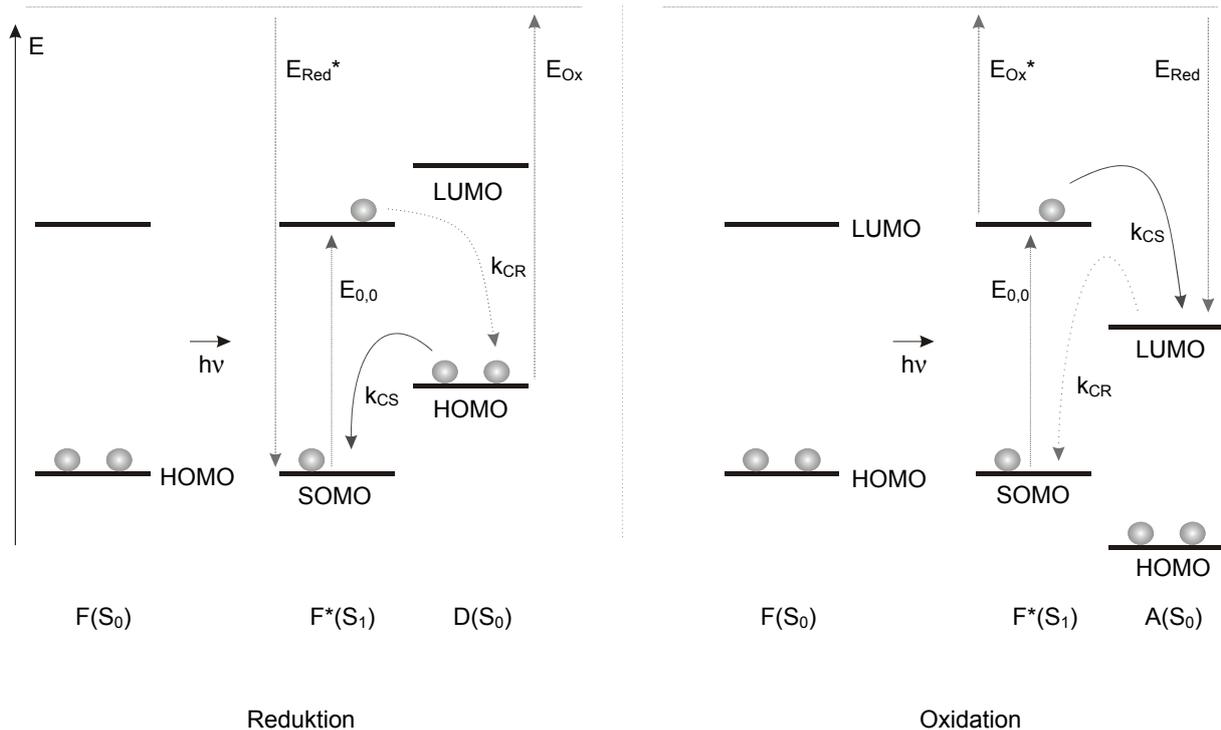


Abbildung 2-6: Vereinfachtes Energiebilanzschema für den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregten Farbstoff  $F^*$  und einem Akzeptor A bzw. Donor D.

Der Elektronentransfer findet entweder inter- oder intramolekular statt. Intermolekular findet der Austausch über den Raum statt (through-space), intramolekular über Molekülbindungen (through-bond). Häufiger ist jedoch der Elektronenaustausch über den Raum.

Die Standardreaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  legt fest ob eine Reaktion stattfindet. Für einen bimolekularen Elektronenübergang im Grundzustand berechnet sich diese nach:

$$\Delta G^\circ = IP_D - EA_A$$

$IP_D$  ist hier das Ionisierungspotenzial des Donors.  $EA_A$  ist die Elektronenaffinität des Akzeptors.

Durch Absorption von Licht ändert sich das Ionisierungspotenzial beziehungsweise die Elektronenaffinität zu:

$$IP_{D^*} = IP_D - \Delta E_{0,0} \text{ und } EA_{A^*} = EA_A + \Delta E_{0,0}$$

Dadurch ergibt sich für die Standardreaktionsenthalpie des Elektronentransfers:

$$\Delta G^\circ = IP_D - EA_A - \Delta E_{0,0}$$

Ionisierungspotenzial und Elektronenaffinität sind Größen, welche nur für die Gasphase definiert sind. Daher müssen für Reaktionen in Lösung IP und EA durch die elektrochemischen Reduktions- und Oxidationspotenziale  $E_{\text{Red}}$  und  $E_{\text{Ox}}$  ersetzt werden.

Da es sich um einen endlichen Abstand handelt muss noch die Anziehung zwischen den entstehenden Radikationen durch einen Coulombterm  $\Delta G^\circ_{\text{Coul}}$  berücksichtigt werden:

$$\Delta G^\circ_{\text{Coul}} = -\frac{e^2}{\epsilon_S \cdot R_c}$$

$R_c$  stellt den Abstand zwischen den Zentren der Radikationen dar und  $\epsilon_S$  die statische Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels.

Die freie Standardreaktionsenthalpie ist nach der Rehm-Weller-Gleichung [Rehm 1969, Weller 1982] somit:

$$\Delta G^\circ = E_{\text{Ox}} - E_{\text{Red}} - \Delta E_{0,0} + \Delta G^\circ_{\text{Coul}}$$

Die Gleichung ist gültig, wenn die Experimente im gleichen Medium durchgeführt wurden wie die Bestimmung der Redoxpotenziale. Werden die Experimente in anderen Lösungsmitteln durchgeführt, so muss noch die Solvatationsenthalpie  $\Delta G^\circ_{\text{Solv}}$  des Radikationenpaars berücksichtigt werden. Diese kann mit Hilfe der Bornschen Gleichung aus den effektiven Radikationenradien des Kations und des Anions berechnet werden [Oevering 1987].

Die Reaktionsmöglichkeiten des durch intramolekularen Elektronentransfer gebildeten Ionenpaars sind in Abbildung 2-7 dargestellt.

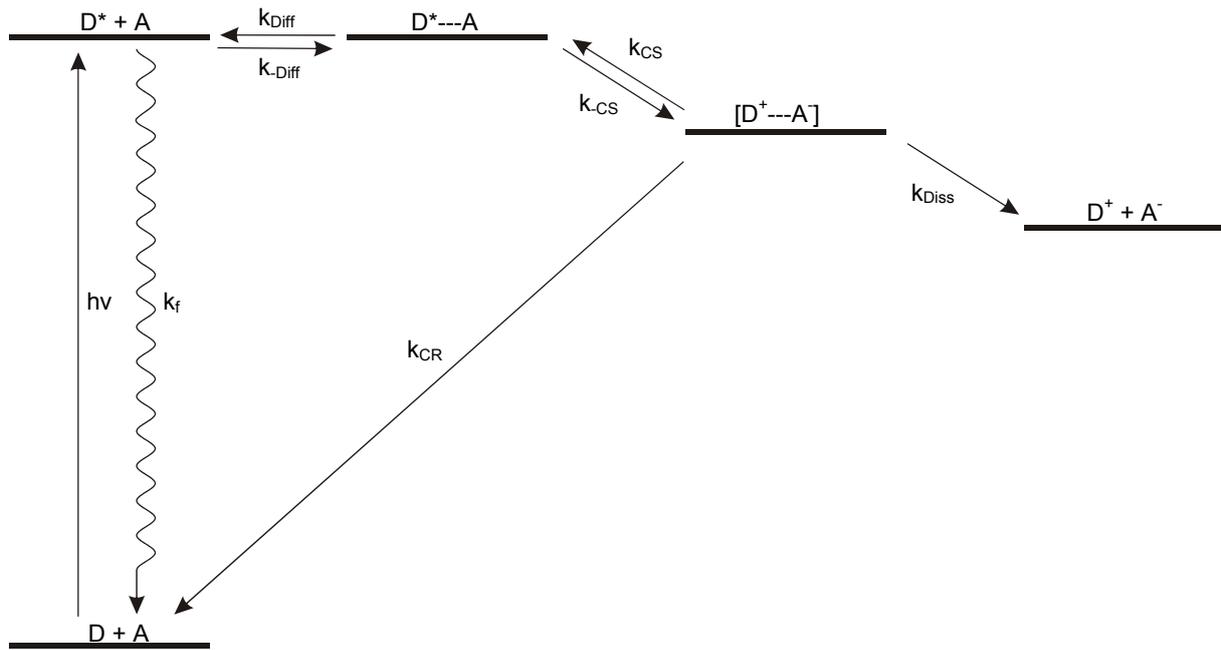


Abbildung 2-7: Energieniveauschema einer intramolekularen photoinduzierten Elektronen-transferreaktion vom angeregten Donor D auf den Akzeptor A.

Bei geringer Standardreaktionsenthalpie kann das gebildete Radikationenpaar mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{CS}$  wieder zurückreagieren. Findet eine Stabilisierung des Ionenpaars durch polare Lösungsmittel statt, so wird die Standardreaktionsenthalpie stärker negativ und eine Rückreaktion wird erschwert. Ebenso kann das Ionenpaar durch strahlungslose Ladungsrekombination mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_{CR}$  in den Grundzustand zurückgelangen.

Aus der freien Standardreaktionsenthalpie  $\Delta G^\circ$  erhält man einen Ausdruck für die Gleichgewichtskonstante K:

$$\Delta G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K = -R \cdot T \cdot \ln \frac{k_{CS}}{k_{CR}}$$

Wobei  $k_{CS}$  und  $k_{CR}$  die Geschwindigkeitskonstanten der Elektronen-transferreaktion darstellen.

## Lösungsmittelleffekte

Die Polarität eines Lösungsmittels kann entscheidende Einflüsse auf das Emissions- und Absorptionsverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen haben. Werden Absorptions- und Emissionsspektren in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität aufgenommen, so können sich Lage, Gestalt und Intensität von Absorptions- und Emissionsbanden verändern. Dieser allgemeine Lösungsmittelleffekt wird als Solvatochromie bezeichnet. Spezifische Lösungsmittelleffekte treten als Resultat spezieller chemischer Eigenschaften einiger umgebender Moleküle des Farbstoffs auf.

### ALLGEMEINE LÖSUNGSMITTELEFFEKTE/SOLVATOCHROMIE

Allgemeine Lösungsmittelleffekte beruhen auf der Tatsache, dass ein Fluorophor in einem Lösungsmittel einen Dipol darstellt, welcher sich in einem dielektrischen Medium befindet. Durch Interaktion von Lösungsmittel und Farbstoff wird die Energiedifferenz zwischen angeregtem Zustand und Grundzustand beeinflusst. Bei diesem als Solvatochromie bezeichneten Effekt unterscheidet man zwischen positiver und negativer Solvatochromie. Bei der positiven Solvatochromie werden die Absorptionsbanden bei steigender Lösungsmittelpolarität bathochrom, also zu größeren Wellenlängen verschoben. Dies kommt durch stärkere Lokalisation von Teilladungen nach der Anregung zustande, was zu einer Vergrößerung des Dipolmoments führt. Dies findet beispielsweise bei Coumarinen statt. Bei der negativen Solvatochromie wird die Absorptionsbande hypsochrom, also zu kürzeren Wellenlängen, verschoben. Dies rührt aus der Abnahme des Dipolmoments bei Anregung her. Diesen Effekt beobachtet man unter anderem bei Pyridiniophenolaten. Farbstoffe mit einer vernachlässigbaren Dipolmomentsänderung im angeregten Zustand, wie Rhodamine, zeigen keine Solvatochromie.

Die Lösungsmittelpolarität wirkt sich auf die  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergänge und auf die  $n \rightarrow \pi^*$  Übergänge aus. Der Zustand mit dem größten Dipolmoment wird stabilisiert. Daher wird der  $\pi^*$ -Zustand in polaren Medien stärker abgesenkt als der  $\pi$ -Zustand. Somit besitzt der  $\pi \rightarrow \pi^*$  Übergang einen geringeren Energieunterschied, was zu einer bathochromen Verschiebung führt. Da die Lösungsmittel ein permanentes Dipolmoment besitzen, gehen Elektronen aus nicht bindenden Orbitalen eine starke Wechselwirkung mit polaren Lösungsmittelmolekülen ein. Somit wird die energetische Absenkung des n-Zustandes stärker als sie des  $\pi^*$ -Zustandes. Der Energieunterschied zwischen n und  $\pi^*$  ist im polaren Medium daher größer (hypsochrome Verschiebung) (Abbildung 2-8).

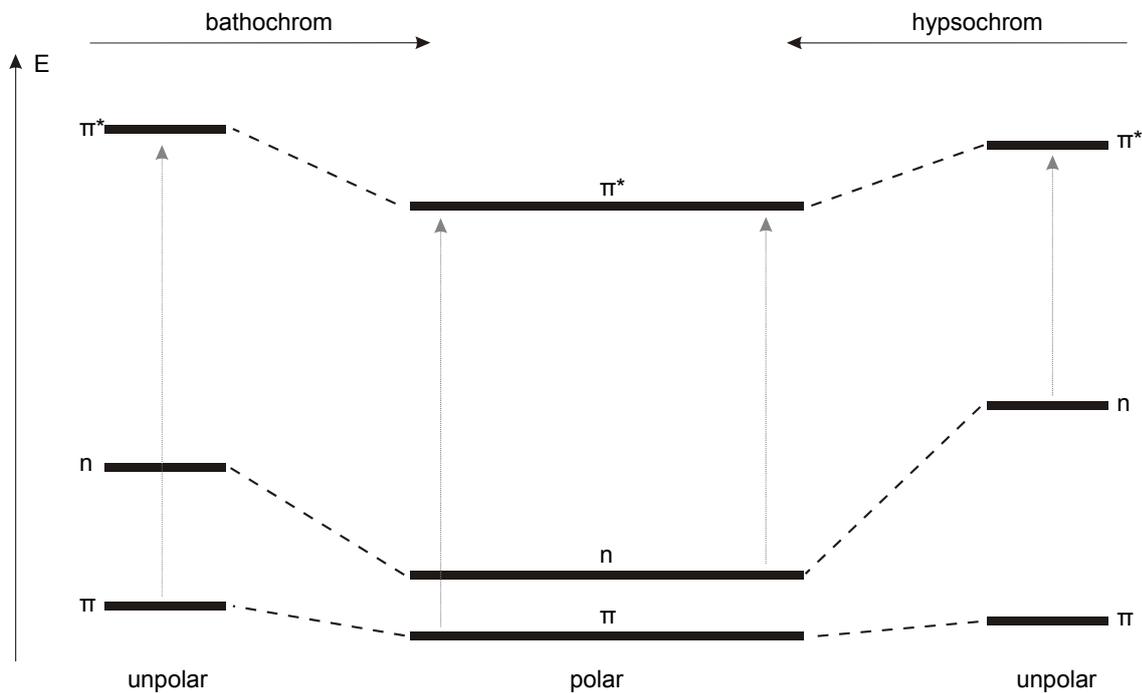


Abbildung 2-8: Einfluß der Lösungsmittelpolarität auf  $\pi \rightarrow \pi^*$  und auf  $n \rightarrow \pi^*$  Übergänge.

Die Fluoreszenzemission erfolgt häufig aus einem Zustand, der von dem Franck-Condon Zustand  $S_1$  energetisch abweicht. Dies ist neben der Schwingungsrelaxation auf die Lösungsmittelrelaxation zurückzuführen.

Nach dem Franck-Condon Prinzip erfolgt, wie oben besprochen, die Absorption eines Photons mit  $\sim 10^{-15}$  s sehr viel schneller als die Bewegung des Kerns, welche sich in  $\sim 10^{-10}$  s vollzieht. Durch eine Umorientierung von Elektronen nach der Absorption von Licht kommt es zu einer Änderung des Dipolmoments, so dass  $\mu_e$  im angeregten Zustand größer ist als das Dipolmoment des Grundzustandes  $\mu_g$ . Dadurch kommt es zu einer Reorientierung der Solvathülle, der so genannten Lösungsmittelrelaxation, was zu einem geringeren Zustand der Energie von  $S_1'$  führt. Beim Übergang in den Grundzustand  $S_0'$  bleibt die Orientierung der

Solvathülle gleich. Das Molekül gelangt anschließend durch Schwingungsrelaxation und erneute Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle in den ursprünglichen Grundzustand  $S_0$  (Abbildung 2-9).

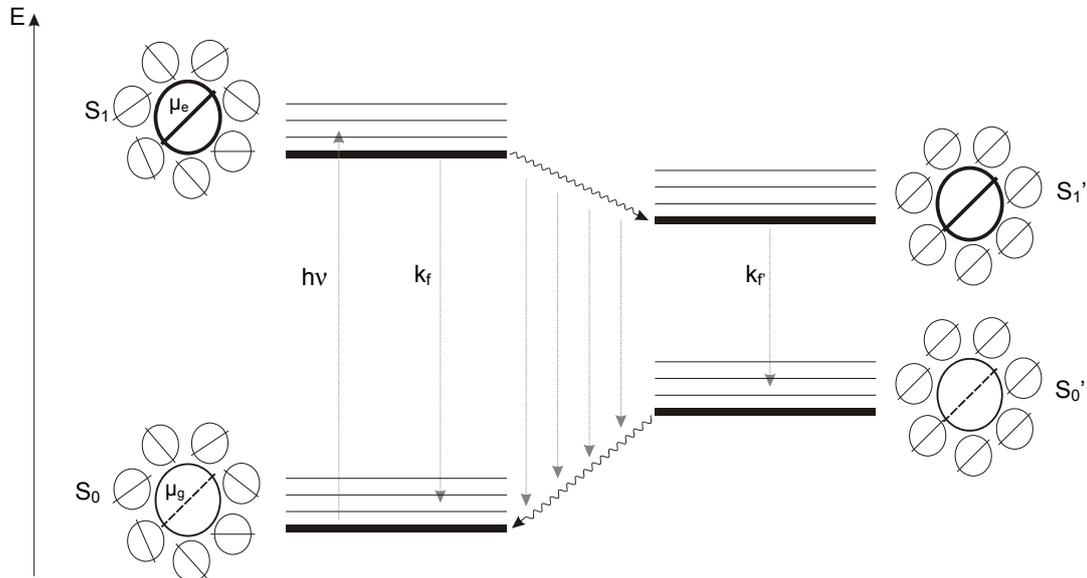


Abbildung 2-9: Darstellung des Effekts der Lösungsmittelrelaxation.

Anhand dieser Lösungsmittelabhängigkeit der Stokes-Verschiebung  $\Delta\nu_{\text{stokes}}$  kann die Differenz der Dipolmomente im Grund- und angeregten Zustand  $\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$  mit der Lippert-Gleichung beschrieben werden [Lippert 1957, Suppan 1990]. Die Stokes-Verschiebung wird hier als Funktion der Lösungsmiteleigenschaften und der Dipolmomente des Farbstoffs im Grund- und angeregten Zustand beschrieben.

In erster Näherung ist diese Energiedifferenz abhängig vom Brechungsindex  $n$  und der Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  des Lösungsmittels.

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{konst.}$$

Hierin sind  $\nu_A$  und  $\nu_F$  die Wellenzahlen der Absorption und Emission.  $a$  ist der Radius der Kavität (Onsager-Hohlraumradius, ca. 60% der Längsachse), in dem sich der Farbstoff befindet. Es ist leicht zu erkennen, dass die Effekte von  $n$  und  $\epsilon$  gegenläufig sind. Eine Vergrößerung von  $n$  verkleinert den Energieunterschied, während eine Zunahme von  $\epsilon$  zu einer größeren Differenz von  $\nu_A$  und  $\nu_F$  führt.

### SPEZIFISCHE LÖSUNGSMITTELEFFEKTE

Obwohl die Verschiebung von Emissionsspektren durch allgemeine Lösungsmittelleffekte beschrieben werden kann, reicht diese Theorie oft nicht aus um das detaillierte Verhalten eines Fluorophors in verschiedenen Lösungsmitteln zu erklären. Dies kommt daher, dass Fluorophore mit Ihren Umgebungsmolekülen wechselwirken, wodurch ebenso große Verschiebungen des Spektrums auftreten können wie bei allgemeinen Lösungsmittelleffekten.

Spezifische Lösungsmittelleffekte werden hervorgerufen durch wenige Moleküle, die den Fluorophor umgeben. Sie hängen von den chemischen Eigenschaften des Fluorophors und des umgebenden Moleküls ab [Perov 1980, Neporent 1960]. Diese Effekte ergeben sich beispielsweise durch Wasserstoffbrückenbildung, Säure-Base Chemie oder *charge-transfer* Wechselwirkungen.

Aufgrund der diversen Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel kann keine einzelne Theorie das Verhalten von Farbstoffen in Lösungsmitteln erklären. Zusätzlich zu allgemeinen und spezifischen Lösungsmittelleffekten müssen auch noch interne *charge-transfer* (ICT) Zustände berücksichtigt werden.

## 2.2. Mykobakterien

Seit der Entdeckung des *Mycobacterium tuberculosis* durch Robert Koch im Jahr 1882 [Lehmann 1896] sind mehr als 100 Spezies beschrieben worden. Mykobakterien (*Mycobacterien*) sind Bakterien der Familie *Mycobacteriaceae*. Dieser Genus umfaßt den MTBC (*M.tuberculosis* – Komplex) (*M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*, *M.microti* und *M.canetti*), *M.leprae*, den Erreger der Lepra, sowie alle weiteren Mykobakterien, die unter den Begriffen MOTT (*Mycobacteria other than tuberculosis*), NTM (*Nontuberculous mycobacteria*) oder atypische Mykobakterien zusammengefasst wird. Im Gegensatz zu den für den Menschen pathogenen *M.tuberculosis* und *M.leprae* sind MOTT nicht notwendigerweise krankheitserregend. Sie kommen im Erdreich und im Wasser vor.

Die säurefesten, leicht gekrümmten und unbeweglichen sporenlosen Stäbchen haben eine Länge von 3 µm bis 4 µm und einem Durchmesser von 0,2 µm bis 0,6 µm. Sie wachsen bevorzugt bei 37°C in weißen, cremefarbenen oder gelb-orangen Kolonien. Ihre genomische DNA zeichnet sich durch einen sehr hohen Gehalt an G-C Basenpaarungen von 59 bis 66% aus [Harmsen 2003]. Bedingt durch einen einzigartigen Zellwandaufbau aus Mykolsäuren (langkettige, verzweigte Fettsäuren) weisen sie ein sehr langsames Wachstum auf (Generationszeit von zwölf bis 20 Stunden) sowie eine hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen

und Antibiotika [Lambert 2002]. Abbildung 2-10 zeigt ein typisches mikroskopisches Bild von *M.tuberculosis*.

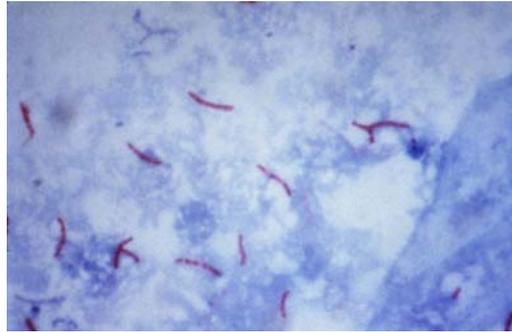


Abbildung 2-10: Ziehl-Neelsen Färbung von *M.tuberculosis* (Public Health Image Library, Centers for Disease Control and Prevention)

### 2.2.1. M.TUBERCULOSIS-KOMPLEX

Die Hauptursache für Tuberkuloseerkrankungen beim Menschen ist der Erreger *M.tuberculosis* [Dostal 2003, RKI 2005]. Daneben kommen in geringerer Häufigkeit *M.africanum* (vor allem in Afrika) [Desmond 2004], *M.bovis* (in Rindern) [Dostal 2003], *M.microti* (bei Nagern und in seltenen Fällen bei Menschen) [Cavanagh 2002, Geiss 2005] und *M.canetti* (vor allem in Ostafrika) [Miltgen 2002] vor.

Tuberkulose ist eine selten akut, meist chronisch verlaufende, Infektionskrankheit, wobei in 85% der Fälle die Lunge betroffen ist. In den meisten Fällen wird der Erreger über Tröpfcheninfektion übertragen. Die erste Infektion zeigt sich häufig symptomarm in Form von Unwohlsein, Gewichtsverlust und Fieber [Brändli 2003]. Daraufhin breitet sich der Erreger im Körper über die Lymphwege oder über den Blutweg aus und kann in abgekapselten Herden jahrelang im Körper überleben. Bei immungeschwächten Personen oder Kleinkindern kommt es häufig innerhalb von wenigen Monaten zu einem Progress der Primärtuberkulose. Bei anderen Personen kann es erst nach Jahren oder Jahrzehnten zu einer Reaktivierung der Infektion kommen. Symptome sind dann oft chronischer Husten, Gewichtsverlust und ein genereller Kräfteverfall. Werden die Erreger über das Bronchialsystem durch das Sputum ausgeschieden, spricht man von einer offenen Tuberkulose.

Behandelt wird die Tuberkulose in der Regel mit Antibiotika durch eine kombinierte Einnahme von Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol.

### 2.2.2. ATYPISCHE MYKOBAKTERIEN

Atypische Mykobakterien kommen überall in der Umwelt vor. Die Übertragung erfolgt daher üblicherweise durch Inhalation, Nahrungsaufnahme oder direkten Kontakt mit Umweltkeimen [Chesney 2002, Wagner 2004]. Die Erkrankungen können sich klinisch recht unterschiedlich

manifestieren. Es handelt sich vor allem um pulmonale (die Lunge betreffende) und kutane (die Haut betreffende) Erkrankungen, sowie Lymphadenitis (reaktive Lymphknotenschwellungen) und disseminierte (Befall von mehreren Organen, einschließlich des Gehirns) Tuberkulose. Die Behandlung erfolgt über einen längeren Zeitraum, ähnlich wie bei *M.tuberculosis* beschrieben. Hierbei spielt die Speziesidentifizierung in Hinblick auf eine erfolgreichen Therapie eine entscheidende Rolle.

### **2.3. Diagnostik von Mykobakterien**

Im Hinblick auf die hohe Zahl von Resistenzentwicklungen ist ein schneller Nachweis und eine sichere Identifizierung der krankheitserregenden Mykobakterienspezies außerordentlich wichtig. Die gängigsten Methoden zur Speziesidentifizierung werden im Folgenden erläutert. Keine dieser Methoden ist allein in der Lage, alle bisher beschriebenen Spezies voneinander zu differenzieren [Tortoli 2003].

#### **2.3.1. MIKROSKOPISCHER ERREGERNACHWEIS**

Einen ersten wichtigen Hinweis auf das Vorhandensein von Mykobakterien liefert der mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen. Hierbei wird meist die Methode nach Ziehl-Neelsen mit Phenolfuchsin oder die Auramin-Rhodamin-Färbung verwendet [ATS 2000]. Der Nachteil dieser Methoden liegt in der benötigten Anzahl von  $10^4$  Bakterien pro ml Probenmaterial [Hobby 1973]. Da nur 50 bis 80% der Sputumproben von Patienten bei dieser Methode einen positiven Nachweis liefern, schließt ein negatives Ergebnis eine Erkrankung nicht aus. Des Weiteren ist mit dieser Schnellmethode keine Speziesidentifizierung möglich, da andere Bakteriengattungen ebenfalls säurefeste Eigenschaften zeigen (*Nocardia*, *Rhodococcus*).

#### **2.3.2. NACHWEIS ÜBER BAKTERIENKULTUREN**

Der Nachweis von Mykobakterien in Bakterienkulturen erfolgt in einem kombinierten Ansatz auf unterschiedlichen Nährmedien. Die Spezieszuordnung erfolgt hier über allgemeine Merkmale wie Wachstumsgeschwindigkeit, Temperaturverhalten, Pigmentbildung oder Kolonienmorphologie.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Mikroskopie besteht in der niedrigeren Nachweisgrenze, welche in kulturbasierten Nachweisen bei zehn Bakterien pro Milliliter liegt [Yeager 1967]. Nach wie vor wird in der Routinediagnostik von Mykobakterien die Speziesidentifizierung über phänotypische Merkmale bestimmt. Jedoch wurden in den letzten beiden Jahr-

zehnten immer mehr molekulare Identifizierungsmethoden eingesetzt [Soini 2001, Dostal 2003, Tortoli 2003].

### 2.3.3. CHROMATOGRAPHISCHE VERFAHREN

Die in der Zellwand enthaltenen unterschiedlichen Mykolsäuren jeder Spezies können ebenfalls zur Differenzierung mittels Dünnschichtchromatographie (DC), Gaschromatographie (GC) oder HPLC (High Performance Liquid Chromatography) herangezogen werden [Hinrikson 1994]. Die DC stellt hierbei ein einfaches und billiges Verfahren dar, jedoch mit nicht allzu großer Spezifität. HPLC und GC werden vor allem zur taxonomischen Einordnung neuer Spezies eingesetzt.

### 2.3.4. RESTRIKTIONSVERDAU

Eine molekulare Methode zur Differenzierung verschiedener Spezies stellt der Restriktionsverdau dar. Hierzu wird der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) eines 441 bp PCR-Fragments des Heat Shock Proteins 65 (hsp65)-Gens der verschiedenen Mykobakterienarten verwendet. Anhand des Bandenmusters des enzymatischen Verdaus werden die Spezies identifiziert [Devallois 1997, Brunello 2001, Häfner 2004]. Als Nachteil dieser Methode ist die fehlende Standardisierung sowie das Vorhandensein mehrerer unterschiedlicher Schnittmuster für eine Spezies zu nennen [Häfner 2004].

### 2.3.5. SONDENBASIERTE IDENTIFIZIERUNGSMETHODEN

Unter anderem werden zur Identifizierung und Differenzierung von Mykobakterien Sonden-systeme verwendet, die auf der Hybridisierung an erregerspezifische DNA- oder RNA-Sequenzen beruhen. Neben kommerziell erhältlichen Testsystemen gibt es auch so genannte „in-house Verfahren“. Hierzu gehören DNA-ELISA Verfahren [Rossi 2000], Dot-Blot Tests [Sanguinetti 1998] sowie Systeme im Microarray-Verfahren [Fukushima 2003].

Kommerzielle Hybridisierungsassays lassen die sichere Identifizierung von *M.tuberculosis* sowie weiterer häufiger atypischer Mykobakterien zu. Eine sichere Identifizierung eng verwandter Spezies ist jedoch mit den kommerziellen Systemen schwierig. Oft sind diese Systeme auch instrumentell aufwendig und kostenintensiv.

### DNA-ELISA Verfahren

Die Speziesidentifizierung im DNA-ELISA Verfahren erfolgt mit spezifischen DNA-Sonden. In der Literatur sind mehrere Methoden beschrieben, welche sich in der Anzahl der zu detektierenden Spezies unterscheiden [De Beenhouwer 1995, Patel 2000, Rossi 2000].

In den Methoden wird entweder das PCR-Produkt direkt mit Didoxigenin modifizierten Basen markiert [De Beenhouwer 1995, Rossi 2000] oder das Fragment wird mit modifizierten Primern markiert [Patel 1997].

DNA-ELISA Verfahren sind vor allem wegen der einfachen Durchführbarkeit und aufgrund der Schnelligkeit ein gut geeignetes Testverfahren zur Identifizierung häufig vorkommender Mykobakterien.

### **Molecular Beacon**

Molecular Beacons sind DNA-Hairpinsonden, die am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende ein Löschmolekül tragen. Das Löschmolekül ist in der Regel ein DABCYL-Rest [Tyagi 1996] oder ein Goldorganyl [Dubertret 2001]. Die Probe enthält eine Schleife, welche die Sequenz des spezies-spezifischen Bereichs enthält. Diese wird von zwei kurzen, zueinander komplementären Sequenzbereichen eingeschlossen. Diese bilden durch gegenseitige Hybridisierung einen Stamm aus. In Abwesenheit einer Zielsequenz hybridisieren die komplementären Bereiche des Oligonukleotids und bilden eine Stamm-Schleife Struktur. Diese wird als Hairpin (Haarnadel) bezeichnet. Der Fluorophor befindet sich bei dieser Struktur in nächster Nähe zu dem Löschmolekül, wodurch eine effiziente Unterdrückung der Fluoreszenz erfolgt. In Gegenwart der Zielsequenz hybridisiert die Schleife mit den komplementären Basen und das Molekül entfaltet sich. Die Löschung des Farbstoffs wird aufgehoben und führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Für die direkte Identifizierung und Differenzierung verschiedener Mykobakterienspezies wurden Molecular Beacons bisher nur in geringem Maße eingesetzt. In einem Real-Time PCR-Verfahren konnte beispielsweise die Spezies *M. avium* identifiziert werden [Rodriguez-Lazaro 2004]. Andere Systeme verwenden Molecular Beacons zur Erkennung von Punktmutationen bestimmter Genabschnitte von *M. tuberculosis* [Piatek 1998, ElHajj 2001]

### **SMART PROBES**

SMART PROBES stellen eine neue Technologie dar, welche sich von dem Funktionsprinzip der Molecular Beacons ableitet.

Sie können Infektionskrankheiten wesentlich schneller erkennen als herkömmliche Methoden. Neben ihrer Schnelligkeit zeichnen sie sich durch ihre hohe Verlässlichkeit und durch ihre niedrigen Kosten aus. Somit stellen sie eine Methode zur Diagnose der Tuberkulose und anderer Infektionskrankheiten dar.

SMART PROBES sind farbstoffmarkierte DNA-Oligonukleotide, die eine Haarnadel-Struktur ausbilden [Knemeyer 2000]. Ein Fluoreszenzfarbstoff wird am 5'-Ende über einen C6-Amino-Linker an das Oligonukleotid gebunden. Aufgrund der räumlichen Nähe des Farbstoffes zu

mehreren Guanosinmolekülen am 3'-Ende des DNA-Strangs wird der Farbstoff in seiner Fluoreszenz gelöscht. Die Fluoreszenzlöschung erfolgt über photoinduzierten Elektronentransfer (Abbildung 2-11).

In Gegenwart der Ziel-DNA öffnen sich die SMART PROBE, wodurch die räumliche Nähe des Farbstoffs zu den Guanosinresten verloren geht und woraus ein Fluoreszenzanstieg des Farbstoffs resultiert.

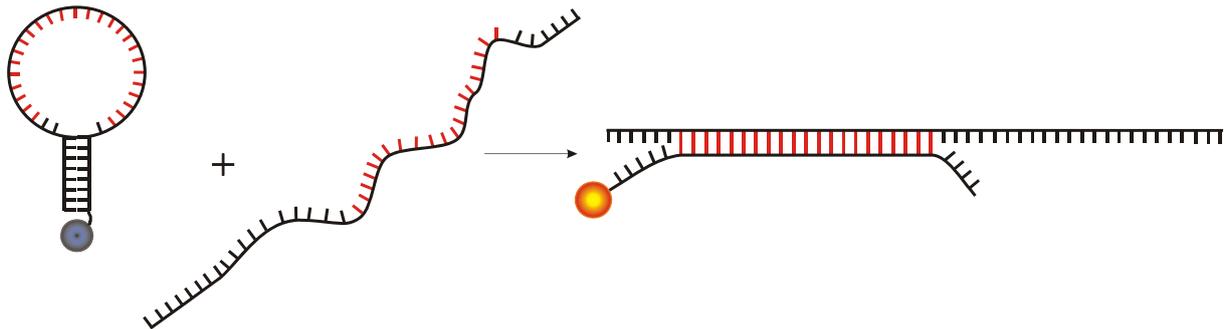


Abbildung 2-11: Hybridisierung der SMART PROBE an die Zielsequenz

In vorangegangenen Arbeiten [Stöhr 2004, Stöhr 2005] konnte dieses Prinzip soweit verbessert werden, dass künstliche Gegensequenzen bis zu Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-8}$  M nachgewiesen werden konnten.

## 2.4. PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode zur selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Sie wurde 1983 von Kary Mullis erfunden, dem 1993 dafür der Nobelpreis in Chemie verliehen wurde [Saiki 1985]. DNA wird hierbei mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase, ein aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) stammendes Enzym, künstlich vervielfältigt. Die PCR nutzt die Vorteile der Mechanismen der DNA-Amplifikation in lebenden Bakterienzellen aus. Lebende Zellen benötigen für die Vervielfältigung von DNA einen Startpunkt. Dieser Startpunkt wird von dem Enzym Primase gegeben, welches Nukleotide an die teilweise geöffnete, doppelsträngige DNA bindet. Diese Nukleotide haben eine freie Hydroxygruppen, ohne die eine DNA Polymerase nicht arbeiten kann.

Im Labor wird chromosomale DNA, viral oder bakteriell, als Vorlage für die Vervielfältigung genutzt. Um den Startpunkt für die DNA-Polymerase vorzugeben, werden zwei kurze Oligonukleotide (~18 bis 20 Basen) zugegeben. Diese so genannten Primer geben ebenfalls den Endpunkt für die Polymerase vor und legen so das zu amplifizierende Produkt fest. Die PCR ist sowohl spezifisch für bestimmte Mikroorganismen als auch spezifisch für eine bestimmte Region dieser Mikroorganismen. Die Vervielfältigung findet statt, indem man ein zyklisches Temperaturprofil fährt (Abbildung 2-12).

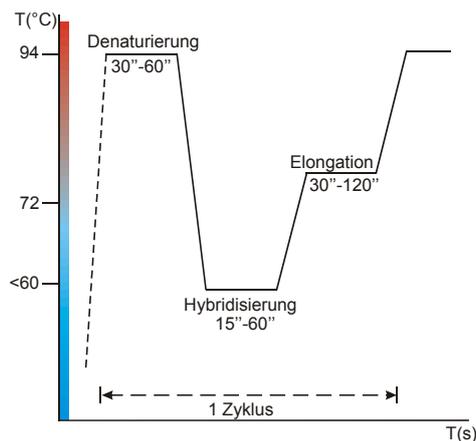


Abbildung 2-12: Temperaturprofil einer PCR-Reaktion.

Die doppelsträngige DNA wird durch Hitzedenaturierung geöffnet. Ist der Doppelstrang einmal geöffnet, sind die Primer in der Lage an den jeweiligen DNA-Einzelstrang zu hybridisieren (*annealing*) (Abbildung 2-13). Die Güte dieses Vorgangs hängt von der Schmelztempera-

tur der Primer ab. Typischerweise liegt diese Temperatur zwischen 40°C und 60°C. Nach der Hybridisierung der Primer wird die Temperatur auf 70°C bis 72°C gebracht. Bei dieser Temperatur arbeitet die hitzestabile Polymerase am besten. Die Zeit, die benötigt wird, um das DNA-Fragment zu kopieren, welches von den beiden Primern flankiert wird, hängt von der Länge des zu vervielfältigenden Fragments und von der verwendeten Polymerase ab. Bei einer typischen PCR liegt die Elongationszeit (*extension*) zwischen einer halben Minute und zwei Minuten. Die Länge des PCR-Produkts variiert zwischen 100 bp (Basenpaaren) und 10000 bp.

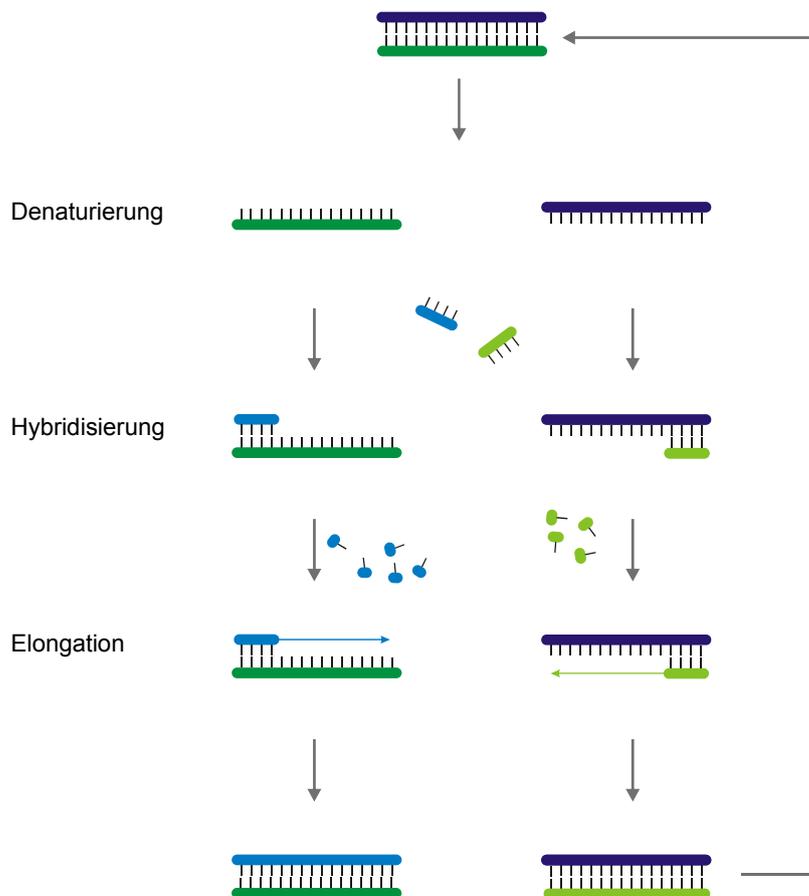


Abbildung 2-13: Mechanismus der Polymerase-Kettenreaktion.

Aus dem Temperaturprofil resultieren zwei neue DNA-Doppelstränge. In den beiden Doppelsträngen ist jeweils ein Strang der Originalstrang des Ausgangsprodukts, während der andere den neu synthetisierten darstellt und daher mit dem Primer beginnt. Wird das Temperaturprofil nochmals gefahren, so erhält man vier Doppelstränge. Der PCR-Kopiervorgang wird 30 bis 40 mal wiederholt, wobei jedes Mal etwa eine Verdopplung der vorhandenen DNA Menge stattfindet, was einen exponentiellen Anstieg des Produktes zur Folge hat.

Der theoretische Amplifikationsfaktor ( $A_{th}$ ) berechnet sich nach der Formel:

$$A_{th} = 2^{(n+1)} - 2(n + 1)$$

Wobei  $n$  für die Anzahl der PCR-Zyklen steht.

Rein theoretisch beträgt der Amplifikationsfaktor nach 20 PCR-Zyklen zirka  $10^6$ . Aus ursprünglich einem doppelsträngigen DNA-Molekül könnten also eine Million DNA-Doppelstrangmoleküle entstehen. Die tatsächlichen Amplifikationsraten sind allerdings niedriger, weil die Reaktionsausbeute der einzelnen Zyklen nicht 100% beträgt. Zwischen der mittleren Reaktionseffizienz pro Zyklus und dem Amplifikationsfaktor  $A_n$  der gesamten PCR-Reaktion besteht folgender Zusammenhang:

$$A_n = \left(1 + \frac{x}{100}\right)^n$$

Wobei  $x$  die mittlere Effizienz pro Zyklus ist und  $n$  die Anzahl der PCR-Zyklen.

In der Praxis werden mittlere Reaktionsausbeuten von näherungsweise 85% pro Zyklus erreicht, was für 20 PCR-Zyklen einen Amplifikationsfaktor von 220 000 ergibt.

## **2.5. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in vivo**

Die gängigsten Markierungstechniken von Proteinen nutzen die Detektion von Fluoreszenz aus [Chamberlain 2000, Miyawaki 2003]. Das zu untersuchende Protein wird mit einem sogenannten *Tag* markiert, welcher bei Anregung mit Licht einer speziellen Wellenlänge fluoresziert. Mit dieser Methode können Moleküle und Strukturen in Zellen individuell sichtbar gemacht werden. Ferner können beispielsweise Prozesse des Zellzyklus in lebenden Zellen beobachtet werden [Easwaran 2005].

### **2.5.1. AUTOFLUORESZENTE PROTEINE**

Der Beginn der Nutzung von genetisch kodierten Fluoreszenzproteinen lag in der Expression des rekombinanten, grün fluoreszierenden Proteins (GFP, Green Fluorescent Protein) in Wirtsorganismen [Tsien 1998]. Der Einsatz von fluoreszierenden Proteinen auf der Basis des grün fluoreszierenden Proteins hat in den letzten Jahren einen rasanten Einzug in die moderne biologische Forschung gehalten und sich als Standardtechnik etabliert. Diese Proteine werden genetisch an das zu untersuchende Protein fusioniert, ohne die Zelle oder deren Membran zu zerstören. Durch die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen ist es möglich

geworden, nicht-invasive Markierung von Proteinen in lebenden Zellen durchzuführen, und somit Genexpression und Proteintransport zu beobachten. Das Klonen und Transfizieren autofluoreszierender Proteine bietet Zugang zu Proteinen, welche nicht einfach isoliert werden können. Ein Beispiel hierfür sind Proteine zellulärer Untereinheiten [Lippincott-Schwartz 1999, 2003].

Die Nachteile der ersten autofluoreszierenden Proteine liegt in der pH-Sensitivität, der geringen Quantenausbeute im Vergleich zu künstlichen Farbstoffen und der photophysikalischen Instabilität. Um diese Probleme zu umgehen und Zugang zu weiteren Anregungs- und Emissionswellenlängen zu bekommen, wurde in der letzten Zeit eine Fülle von GFP Mutanten entwickelt [Zhang 2002]. Zwei neuere Beispiele hierfür sind beispielsweise die YFP Mutanten *Citrine* und *Venus* [Griesbeck 2001, Nagai 2002]. Bei diesen neueren Mutanten wurde die pH-Abhängigkeit reduziert und die Photostabilität erheblich verbessert. Die bekanntesten autofluoreszierenden Proteine, welche im roten Wellenlängenbereich fluoreszieren, sind DsRed (drFP583) und dessen Derivat mRFP1 [Campbell 2002]. Zusammen mit GFP und seinen gelben, blauen und cyanfarbenen Mutanten werden sie beispielsweise für das Vielfarben-Tracking von Fusionsproteinen verwendet und erschließen neue FRET Donor-Akzeptorpaare.

Eine interessante Mutante von DsRed ist das so genannten *Fluorescent Timer Protein* [Terskikh 2000]. Dieses Protein ändert linear die Farbe von grün zu rot innerhalb der ersten 14 Stunden. Somit kann die Zeit gemessen werden die seit der Initiation des Proteins in die Zelle vergangen ist. Da die Geschwindigkeit, mit dem es die Farbe verändert, unabhängig von der Konzentration des Proteins ist, kann es beispielsweise dafür verwendet werden, zeitabhängig die Expression eines Proteins zu beobachten.

Eine andere Entwicklung, mit deren Hilfe intrazelluläre Proteindynamik untersucht werden kann stellen die photoaktivierbaren autofluoreszierenden Proteine PA-GFP, Kaede und KFP1 dar [Patterson 2002]. Diese zeigen einen Anstieg der Fluoreszenz oder eine Verschiebung ihres Spektrums zu einer charakteristischen Wellenlänge nach einer kurzen Laserbestrahlung. Nach der Photoaktivierung können die angeregten Proteine einfach von den nicht aktivierten unterschieden werden. So können spezifisch Organellen oder Proteine zeitlich und örtlich aufgelöst werden. Das Korallenprotein Dronpa [Ando 2004] hingegen lässt sich reversibel durch Bestrahlung mit Licht an- und ausschalten.

Der Vorteil autofluoreszierender Proteine als molekulare Marker liegt in der genetisch basierten Fusion mit den Zielproteinen. Dadurch kann die aufwendige Prozedur des Markierens der Proteine und des Aufreinigens *in vitro* mit anschließender Rückgabe in die Zelle, beispielsweise durch Mikroinjektion, vermieden werden.

Die Nachteile der Verwendung von fluoreszierenden Proteinen sind, neben den schon genannten, die Größe und die Masse des Markerproteins selbst. GFP beispielsweise ist mit einer Länge von etwa 230 Aminosäuren und einer Masse von zirka 27 kDa oftmals genauso groß wie das zu untersuchende Zielprotein selbst. Hieraus ergeben sich Probleme bezüglich der Unversehrtheit des markierten Proteins. Die Funktion des Proteins kann durch die Fusion zerstört werden, die Lage verändert oder die Proteinexpression selbst kann blockiert werden.

Die Verwendung von Hybridsystemen, bestehend aus einer kurzen, genetisch kodierten Peptidsequenz und einem kleinen organischen Fluorophor ist in der Lage, gut charakterisierte Fluoreszenzfarbstoffe an Proteine in der Zelle zu koppeln.

### **2.5.2. NEUE ANSÄTZE FÜR DAS MARKIEREN IN LEBENDEN ZELLEN**

Viele Ansätze zur Markierung von Proteinen beruhen auf der Rückgabe chemisch modifizierter Proteine in die Zelle durch invasive Methoden, wie beispielsweise Mikroinjektion und Elektroporation. Der Vorteil dieser Methoden liegt in der Vielzahl von synthetischen Molekülen, die an die Proteine gebunden werden können. Beispielsweise können Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden, welche exakt auf die geforderten Ansprüche zugeschnitten sind, seien dies spektrale Eigenschaften, Helligkeit oder Photostabilität. Die Vielfalt an zugänglichen Wellenlängen erlaubt die Separation der Fluoreszenz von bis zu fünf Farbstoffen in einer Zelle [Debiasio 1987]. Unter anderem können solche Sonden auch für die Immunochemie oder die Elektronenmikroskopie eingesetzt werden [Myers 1989, Deerinck 1994]. Eine gezielte Rückgabe des markierten Proteins erlaubt zusätzlich die Kontrolle über die Menge des zu untersuchenden Proteins, was beispielsweise für FCS oder FRET Anwendungen interessant ist. Jedoch wird durch diese Methoden die Zelle beschädigt und der Rückgabevorgang ist sehr komplex, weshalb man gezwungen ist, alternative Ansätze zu finden.

In den neuen Ansätzen werden die klassischen Methoden, welche autofluoreszente Proteine verwenden mit den neuen Ansätzen des spezifischen Markierens von Proteinen mit kleinen organischen Molekülen in der lebenden Zelle verknüpft.

### **TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAG Methode**

Die TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAG Methode ist ein Hybridsystem zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen, welche im Labor von Roger Tsien entwickelt wurde [Gaietta 2002]. Diese Methode nutzt die Kombination einer kurzen Peptidsequenz mit einem kleinen, löslichen und zellpermeablen Fluorophor auf Fluoresceinbasis aus. Das zu untersuchende Protein wird an ein Tetracystein (TC) Motiv fusioniert. Das beste Motiv hierfür ist bis jetzt *Cys-CysProGlyCysCys*. Diese Aminosäuresequenz kann spezifisch mit membrangängigen Fluorophoren, welche FIAsH (Fluorescein Arsenical Hairpin Binder), ReAsH oder CHoXAsH ge-

nannt werden, markiert werden. Die Farbstoffe bilden einen Komplex mit den vier Cysteinen aus (Abbildung 2-14). Um zu vermeiden, dass die Farbstoffe an endogene Cysteine binden und um zu gewährleisten, dass die Farbstoffe nicht fluoreszieren, so lange sie nicht spezifisch an das Protein gebunden sind, werden die Zellen gleichzeitig mit einem Überschuss an 1,2-Dithiol, beispielsweise Ethandithiol, inkubiert. Überschüssiges Reagenz kann nach der Inkubation ausgewaschen werden.

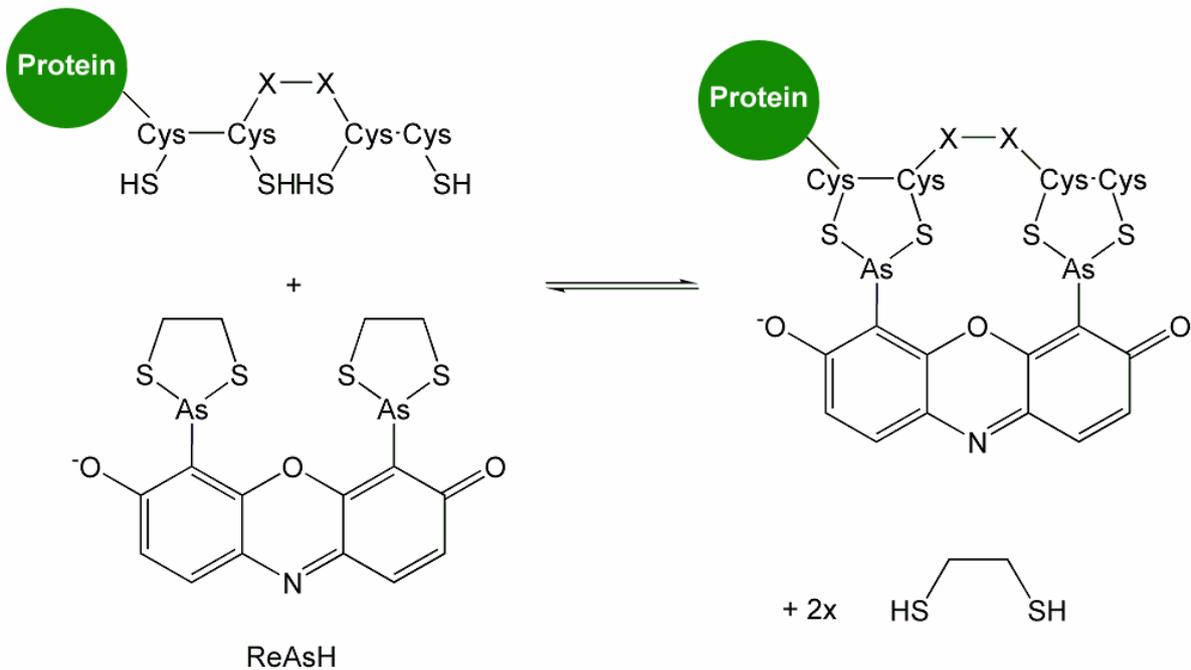
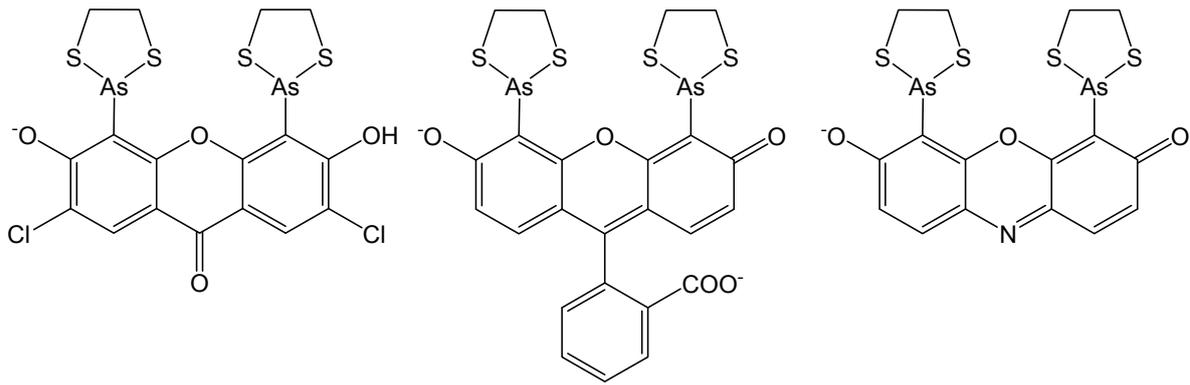


Abbildung 2-14: Reaktionsmechanismus des TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAG Systems am Beispiel des ReAsH-Tags.

Die drei bis jetzt veröffentlichten TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAGS decken den sichtbaren Wellenlängenbereich von 430 nm bis 608 nm ab (Abbildung 2-15).



CHoXAsH

FIAsh

ReAsH

Anregung 380 nm  
Emission 430 nm

508 nm  
528 nm

593 nm  
608 nm

Abbildung 2-15: Die drei TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAGS.

Mit minimal sechs Aminosäuren Länge und zirka 700 Da Masse liegt die Größe bei nur etwa 1/40 der Größe und Masse von GFP. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Größe eines Tags, welcher für die Markierung von Proteinen verwendet wird, die Funktionalität eines Proteins beeinflussen kann. Hierbei wurde die Funktionalität von fluoreszenzmarkiertem  $\beta$ -Tubulin in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Der Größe der Markierungssequenz kam dabei eine entscheidende Bedeutung für das Überleben der Hefe zu. Während die Expression von GFP-markiertem  $\beta$ -Tubulin zu nicht überlebensfähigen haploiden Hefezellen führte, waren Zellen, die mit einem TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAG modifizierten  $\beta$ -Tubulin transfiziert wurden, normal überlebensfähig [Andresen 2004].

Zusätzlich zu der geringen Größe der TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAGS liegt der große Vorteil in dem Potenzial der Mehrfarbenanalysen [Adams 2002, Gaietta 2002]. Der Nachteil dieser Methode liegt in der unspezifischen Markierung endogener, cysteinhaltiger Proteine, was zu einem erheblichen Hintergrundsignal führen kann [Stroffekova 2001]. Außerdem sind arsenhaltige Präparate für verschiedene Zelllinien giftig.

## HALOTAG

Die HALOTAG Technologie von Promega bietet eine weitere Möglichkeit, schnell, sequenzspezifische und irreversible Proteine in lebenden Zellen und *in vitro* zu markieren. Die Technologie basiert auf der kovalenten Bindung eines speziell konzipierten prokaryotischen Enzyms (Halogenase) mit spezifisch konstruierten chloralkan Liganden (Abbildung 2-16). Der dafür entwickelte Klonierungsvektor kodiert eine genetisch modifizierte Dehydrolase des *Rhodococcus rhodochrous*, die als HALOTAG-Protein bezeichnet wird. Je nach Wunsch können Fusionsproteine am N- oder C-Terminus vom HALOTAG-Protein exprimiert werden. Der

Fluorophor der Wahl wird hierbei an eine aliphatische, halogenierte Kette gebunden. Der Wildtyp der Dehalogenase (293 Aminosäuren) reagiert mit dem halogenierten Farbstoff in einem Zweistufenmechanismus: Das Enzym unterliegt zuerst einer nukleophilen Substitution indem ein Ester zwischen aliphatischem Substrat und dem Aspartat der Halogenase ausgebildet wird. Der Ester wird dann nachträglich hydrolysiert, was zu dem Alkohol als Produkt führt. Indem man eine Mutation in die Dehalogenase einbaut verhindert man die Hydrolyse des Esters. Verschiedene Moleküle können an das Substrat gebunden werden, ohne die Effizienz der Reaktion signifikant zu verändern.

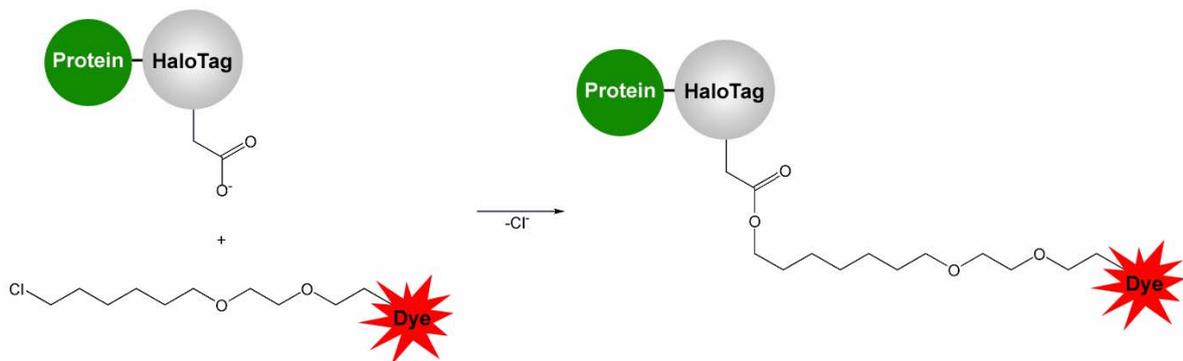


Abbildung 2-16: Funktionsprinzip des HALOTAG.

Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Größe des *Tags* von 33 kDa.

Auch dieses System erfährt hinsichtlich der Farbstoffwahl, ebenso wie die in der Arbeit untersuchten SNAP-TAGS, eine Begrenzung. Auf die Farbstoffwahl für das SNAP-TAG System wird in Kapitel 4.13.2. explizit eingegangen. Es sei jedoch gesagt, dass bei beiden Systemen die gleichen Farbstoffe Verwendung finden. So sind für die Anfärbung mit HALOTAG folgende Substrate erhältlich: HALOTAG-TMR Ligand, HALOTAG-diAcFAM Ligand, HALOTAG-Coumarin Ligand und HALOTAG-Oregon Green Ligand. Diese Liganden können die Zellmembran durchdringen und innerhalb der Zelle anfärben. Ein weiterer Ligand, der HALOTAG-Alexa Fluor 488 Ligand ist nur geeignet, um Membranen anzufärben.

Neben diesen Systemen gibt es noch weitere chemische Ansätze, um Proteine *in vivo* zu markieren. Zu nennen sind an dieser Stelle beispielsweise das *in vivo* Markieren mit Intein [Giriat 2003, 2001], die künstliche Aminosäurenmutagenese [Mendel 1995, Anthonycahill 1989, Chin 2003], das spezifische Markieren von Proteinen, welche N-terminal ein Cystein tragen [Dawn 2002] oder eine Avidin-Biotin Markierung [Wu 2000, 2000].

Ein weiterer Ansatz wurde in dieser Arbeit verwendet und soll in folgendem Abschnitt näher erläutert werden.

## 2.6. SNAP-TAGS

### 2.6.1. FLUORESCENZMARKIERUNG VON HAGT

Das Markieren von Fusionsproteinen in der lebenden Zelle mit Fluorophoren kombiniert die Vorteile künstlicher Farbstoffe mit den Annehmlichkeiten der Expression von genetisch markierten Proteinen. Eine wichtige Voraussetzung dieses Ansatzes ist die Spezifität der Markierungsreaktion. Das heißt, der Farbstoff sollte nur an die Gruppe binden, welche an das Protein gebunden wird, ohne wesentliche Reaktivität gegenüber anderen Molekülen innerhalb der Zelle zu zeigen. Die oben genannten Methoden weisen zahlreiche Möglichkeiten auf, Proteine spezifisch in der lebenden Zelle zu markieren. Alle mit verschiedenen Vor- und Nachteilen. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der hAGT-Markierung ist eine ergänzende Methode zu den bereits etablierten Methoden.

Die spezifische Bindung des Fusionsproteins gründet auf dem ungewöhnlichen Reparaturmechanismus des humanen DNA Reparaturproteins O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT). Dieser führt einen irreversiblen Transfer einer Alkylgruppe von dem Substrat O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA auf ein Cystein des humanen DNA Reparaturproteins AGT (hAGT) durch, resultierend in einer Thioetherbindung (Abbildung 2-17).

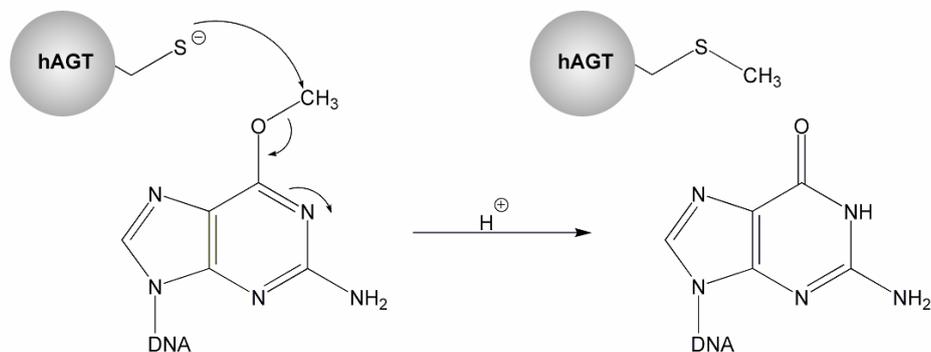


Abbildung 2-17: Mechanismus der DNA-Reparatur beim hAGT.

Da die Spezifität hinsichtlich des Substrats relativ gering ist, findet die Reaktion ebenfalls mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG) statt, welches ein analoges Molekül darstellt.

Die AGT-Markierung beruht auf zellpermeablen O<sup>6</sup>-BG-Substraten, welche an der *para*-Position des Benzylrings ein Fluorophor tragen. Statt Fluorophoren können auch andere Moleküle, wie beispielsweise Biotin oder andere Proteine substituiert werden [Keppler 2004].

Durch die Reaktion kann ein Farbstoff kovalent an das hAGT Fusionsprotein in lebenden Zellen wie *E. coli* oder Säugerzellen gebunden werden.

Auf diesem Mechanismus beruht das SNAP-TAG System. Dieses besteht aus zwei Schritten. Einerseits aus dem Klonen und der Expression des zu markierenden Proteins, andererseits aus der Markierung des fusionierten Proteins mit dem O<sup>6</sup>-Benzylguaninsubstrat in Lösung oder der lebenden Zelle.

Nach Inkubation mit O<sup>6</sup>-Benzylguaninsubstrat müssen die Zellen nochmals gewaschen werden. Dies ist bei *E. coli* durch Abzentrifugieren leicht möglich. Säugerzellen hingegen müssen nochmals mit Medium inkubiert werden, um überschüssiges Substrat zu entfernen. Dies ist sehr zeitaufwendig und entfernt nicht alle Spuren überflüssigen Fluorophors. Von großem Vorteil ist es daher, wenn das Substrat selber nicht fluoresziert und somit keine unspezifische Hintergrundfluoreszenz auftreten kann. Der Waschschrift und die damit verbundene Wartezeit sind somit überflüssig.

Dies kann verwirklicht werden, indem man die spezifische Löschung von Farbstoffen durch Guanin ausnutzt. Das BG-Farbstoffsubstrat ist im Ausgangszustand fluoreszenzgelöscht und erst nach kovalenter Bindung des substituierten Benzylrings fluoresziert der Farbstoff wieder (Abbildung 2-18).

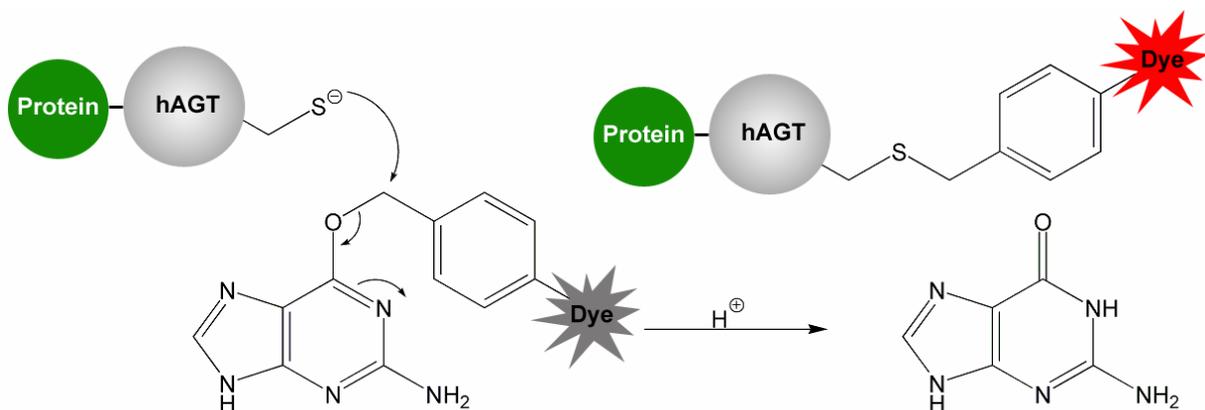


Abbildung 2-18: Kovalente Markierung eines Protein-hAGT Fusionsproteins mit einem O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstrat. Nach der Reaktion kann der Farbstoff wieder fluoreszieren.

Neben der Tatsache, dass in diesem System die Löschung des Farbstoffs durch Guanin ausgenutzt werden kann, ist es auch durch seine geringe Größe von 182 Aminosäuren, was einer Masse von 21 kDa entspricht, sehr vorteilhaft.

### 2.6.2. DIE O<sup>6</sup>-ALKYLGUANIN-DNA ALKYLTRANSFERASE

Die O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT) spielt eine wesentliche Rolle bei der Minimierung mutagener Effekte von alkylierenden Reagenzien und Umgebungsgiften, indem es die Mutation von G-C zu A-T unterbindet [Kyrtopoulos 1997]. Während des ungewöhnlichen Reparaturmechanismus wird ein Alkyl-Substituent irreversibel und stöchiometrisch von der O<sup>6</sup>-Position des Guanins auf ein reaktives Cystein übertragen, wodurch eine stabile Thioetherbindung gebildet wird.

In Chemotherapien, welche auf alkylierenden Reagenzien wie Dacarbazin, Procarbazin und Temozolomide beruhen, kann eine erhöhte Expression von humanem AGT (hAGT) dafür verantwortlich sein, dass der Tumor eine Resistenz entwickelt. Dies beruht darauf, dass hAGT die O<sup>6</sup>-Alkylguaninbasen, welche von antineoplastischen Reagenzien generiert werden, repariert. Antineoplastische Reagenzien sind Stoffe, die die Reifung und Proliferation von Neoplasma hemmen. Eine Hemmung der hAGT Aktivität durch eine kovalente Reaktion mit Substratanaloga, wie beispielsweise das O<sup>6</sup>-Benzylguanin, können so die Effizienz von Chemotherapien erhöhen [Chen 1993, Dolan 1990, Friedman 2000, 2002].

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass hAGT mit Derivaten des O<sup>6</sup>-Benzylguanin, welche einen Substituenten am Benzylring tragen, reagieren kann [Damoiseaux 2001, Ciocco 1995]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass zellpermeable O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstrate erfolgreich für die *in vivo* Markierung eingesetzt werden können [Keppler 2004].

### 2.6.3. DIE STRUKTUR DES HAGT

Bis jetzt sind mehr als 100 Alkyltransferasen sowohl in eukaryotischen als auch in prokaryotischen Organismen gefunden worden. Drei von ihnen wurden bis jetzt kristallisiert: die humane Alkyltransferase, die Alkyltransferase aus *E. coli* und die Alkyltransferase aus der Archäe *Pyrococcus kodakaraensis*.

Obwohl die Primärstrukturen sich sehr wenig ähneln, sind die Gesamtstrukturen miteinander verwandt. Als aktives Zentrum tragen die Sequenzen die Aminosäurefolge Val(Ile)ProCysHisArgVal(Ile), welche den reaktiven Rest Cys145 (gelb) beinhaltet. Die Kristallstrukturen bestehen aus zwei Domänen (Abbildung 2-19), welche in den drei Familienmitgliedern höchst konserviert sind. Das N-terminale Ende des humanen Enzyms ist charakterisiert durch eine konservierte  $\alpha/\beta$  Schleife (Aminosäure 4-85): Einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt folgen zwei  $\alpha$ -Helices. Ein Zinkion (eisblau) ist über tetrahedrale Liganden (Cys5 (gelb), Cys24 (gelb), His29 (orange) und His85 (orange)) zwischen drei Strängen des N-terminalen  $\beta$ -Faltblatts (grün) gebunden und das Knäuel steht vor der domänenbe-

grenzenden Helix (lila). Man nimmt an, dass dadurch dem Protein Stabilität verliehen wird [Rasimas 2003].

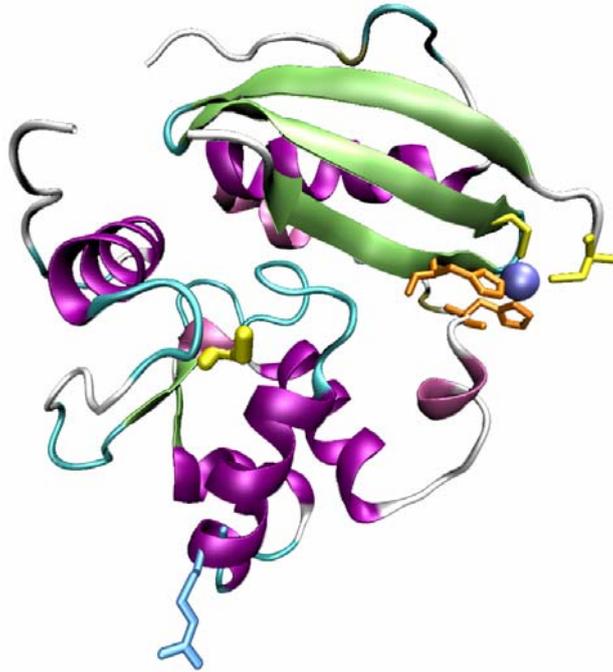


Abbildung 2-19: Kristallstruktur der humanen Alkylguanintransferase (PDB-Nr. 1T38).

Die C-terminale Domäne (Aminosäure 92-176) ist zusammengesetzt aus einem kurzen, zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt und fünf Helices. Diese Domäne beinhaltet das aktive Zentrum Cys145 (gelb), die Bindungstasche und das *helix-turn-helix* (HTH, Aminosäure 115-135) Bindungsmotiv der DNA. Diese Domäne ist in den drei Kristallstrukturen der AGTs vollständig konserviert.

Das reaktive Cystein ist am Boden der potentiellen Bindungstasche des Enzyms vergraben. Durch Kristallstrukturen von an hAGT gebundener DNA konnte der Bindungsmechanismus aufgeklärt werden [Daniels 2004]. Nachdem die Helix des HTH-Motivs die DNA erkannt hat, wird diese über die kleine Furche der DNA gebunden. Der so genannten Arginin-Finger (hellblau, Arg128) wird dabei in die Doppelhelix geschoben, wo er die Furche aufweitet. Er trägt dadurch dazu bei, DNA Basen aus der Helixstruktur herauszudrehen (*base flipping*) und zu der aktiven Stelle des AGT zu bringen, an der die Reparatur stattfindet.

Weitere Belege für diesen *base-flipping* Mechanismus liefern biochemische Studien, in denen Arg128 durch andere Aminosäuren ersetzt wurde. Dadurch gehen die Reparatureigenschaften des hAGT für die DNA verloren. Hierdurch wird eine Schlüsselrolle des Arg128 im Reparaturprozess bestätigt. Interessanterweise hat diese Mutation keinen Einfluß auf die Reaktion von hAGT mit O<sup>6</sup>-BG [Daniels 2000]. Die DNA Bindungskonstante erhöht sich um das 20 bis 30 fache für die verschiedenen Mutanten. Daher scheint Arg128 nicht an der Ü-

bertragung des Alkylrests beteiligt zu sein. Es spielt jedoch eine wesentliche Rolle in der DNA Reparatur und damit im *base-flipping* Mechanismus.

Die Alkylierung des hAGT bewirkt eine konformative Änderung des Proteins. Diese Änderung scheint für den Abbau des hAGT in der Zelle verantwortlich zu sein. Die Helix des *HTH*-Bindungsmotivs (Met137 bis Pro144), welche die DNA erkennt, wird ersetzt. Weiterhin wird das Netzwerk aus Wasserstoffbrücken des Asn137 aufgrund sterischer Hinderung einer Seitenkette des Asn137 mit dem alkylierten Addukt zerstört [Daniels 2000]. Dieses Netzwerk spielt eine entscheidende Rolle für die Stabilität des Proteins. Die Verschiebung der Erkennungshelix resultiert in einer Zerstörung der Bindungsregion der DNA. Somit kann die reparierte DNA vom Protein dissoziieren. Das alkylierte Protein ist anfälliger für die Anbindung von Ubiquitin (ubiquitinylation), was zu Abbau des Proteins durch das Proteasom führt.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1. Chemikalien

Sämtliche gängigen Chemikalien für Kopplungsreaktionen, Puffer und HPLC wurden, sofern nicht gesondert angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen. Es wurden nur Chemikalien in p.a. Qualität verwendet und alle Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt

### 3.2. Farbstoffe

Die zur Herstellung der SMART PROBES und SNAP-TAGS verwendeten Farbstoffe sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Bei allen Farbstoffen handelt es sich um synthetische, organische Fluorophore.

Hersteller	Farbstoff
ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland	ATTO 425, ATTO 488, ATTO 495, ATTO 520, ATTO 532, ATTO 550, ATTO 565, ATTO 590, ATTO 620, ATTO 633, ATTO 635, ATTO 647N, DY 113, ATTO 655, ATTO 680, ATTO 700
Molecular Probes, Eugene, USA	Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Rhodamine Green, 2',4',5',7'-tetrabromofluorescein
Amersham Biosciences, Piscataway, USA	Cy 3b, Cy 5
AnaSpec, San Jose, USA	TAMRA, TET
Dyomics, Jena, Deutschland	DY 505, DY 630
Amresco, Ohio, USA	Rhodamine B
TefLabs, Austin, USA	FAM

Tabelle 3-1: Verwendete Farbstoffe.

Der Farbstoff MR 121 wurde von Prof. K. H. Drexhage, Universität Siegen, zur Verfügung gestellt. Für die Kopplung wurden die aminreaktiven Formen der Farbstoffe, Isothiocyanate oder N-Hydroxysuccinimid ((NHS) - Ester), verwendet. Die Strukturen der Farbstoffe sind,

soweit veröffentlicht, im Anhang dargestellt. Alle Farbstoffe wurden als Feststoffe gekauft, in DMF gelöst (2 mg/ml) und bei -20°C gelagert.

### **3.3. Oligonukleotide und SMART PROBES**

Die in dieser Arbeit zur Herstellung von SMART PROBES verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) synthetisiert. Zur Modifikation mit Farbstoffen wurden sie am 5'-Ende mit einem C<sub>6</sub>-Amino-Linker versehen.

Tabelle 3-2 zeigt die Sequenzen der Oligonukleotide für die SMART PROBES, deren Spezifität und die Bindungsbereiche im Gesamtgen der mykobakteriellen 16S rDNA (VR2: *E. coli* Position 180 – 220, VR3: *E. coli* Position 440 - 495).

SMART PROBE	DNA-Sequenz 5' → 3'	Spezifität	Bindungsbereich
SPxenopi1	CCC CCG TTT TCT CGT GGT GAC GGT AGG GGG GGG	M. xenopi	VR3
SPxenopi2	CCC CCG TTT TCT CGT GGT GAC GGT AGG GGG TTT	M. xenopi	VR3
SPxenopi3	CCC CGT TTT CTC GTG GTG ACG GTA GCG GGG GGG	M. xenopi	VR3
SPxenopi4	CCC CCT AGG ACC ATT CTG CGC ATG TGG GGG GGG	M. xenopi	VR2
SPxenopi5	CCC CTA GGA CCA TTC TGC GCA TGT GGG GTT T	M. xenopi	VR2
SPxenopi6	CCC AGT AGG ACC ATT CTG CGC ATG TGG GGG G	M. xenopi	VR2
SPavium	CCC CCT AGG ACC TCA AGA CGC ATG TG GGG GGG G	M. avium	VR2
SPfortuitum	CCC CCT ATG ACC ACG CGC TTC ATG GTG GGG GGG G	M. fortuitum	VR2

## Materialien und Methoden

SPtuberculosis	CCC CCG TGG TGG AAA GCG CTT TAG GGG GGG G	M. tuberculosis	VR2
SPabscessus	CCC CCT AGG ACC ACA CAC TTC ATG GGG GGG GG	M. abscessus	VR2
SPintracellulare	CCC CCT AGG ACC TTT AGG CGC ATG GGG GGG GG	M. intracellulare	VR2
SPkansasii	CCC CCT AGG ACC ACT TGG CGC ATG GGG GGG GG	M. kansasii	VR2

Tabelle 3-2: Die Sequenzen der in der Arbeit verwendeten SMART PROBES, ihre Spezifität und der Bindungsbereich im Gesamtgen der mykobakteriellen 16S rDNA.

Die für die Reaktionen von SPxenopi1-6 eingesetzten künstlichen Gegensequenzen sind in Tabelle 3-3 aufgeführt.

Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'	Spezifität
Oligo_xenopi1	ACC ACC CCA CAT GCG CAG AAT GGT CCT ATC CGG TA	M. xenopi
Oligo_xenopi2	GCC CCT ACC GTC ACC ACG AGA AAA CCC GCA GCT TC	M. xenopi

Tabelle 3-3. Die verwendeten, künstlichen Gegensequenzen für Reaktionen der SPxenopi Hairpins.

## Materialien und Methoden

Für die Reaktionen an Mikrosphären wurden Oligonukleotide benötigt, welche ein endständiges Biotin zur Anbindung an die streptavidinbeschichteten Mikrosphären besitzen. Diese wurden ebenfalls von der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzen sind, ebenso wie die für den Sandwich-Nachweis nötigen Gegensequenzen, in Tabelle 3-4 wiedergegeben.

Bezeichnung	DNA-Sequenz 5' → 3'	Biotin	Spezifität
Bioligo_xenopi	CAC CAA CAA GCT GAT AGG CCG CGG	5'	M. xenopi
	GCC CAT CCC ACA CCG CTA CCA AAC		
	GCT TTC CAC CAC CCC ACA TGC GCA		
	GAA TGG TCC TAT CCG GTA TTA GAC		
	CCA G		
Bioligo_sand_xen	TGG TGG AAA GCG TTT GGT AGC GGT	3'	M. xenopi
	GTG GGA TGG GCC CGC		M. tuberculosis
Gegen_xenopi	GCG GGC CCA TCC CAC ACC GCT ACC	-	M. xenopi
	AAA CGC TTT CCA CCA CCC CAC ATG		
	CGC AGA ATG GTC CTA		
Bioligo_sand_tub	GGA AAC TGG GTC TAA TAC CGG ATA	5'	M. tuberculosis
	GGA CCA CGG GAT GCA TGT CTT		
Gegen_tuberculosis	CCG CTA AAG CGC TTT CCA CCA CAA	-	M. tuberculosis
	GAC ATG CAT CCC GTG GTC CTA TCC		
	GGT ATT AGA CCC AGT TTC C		
Bioligo_PCR	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG ACG	5'	M. tuberculosis
	AAC GCT GGC GGC GTG CTT AAC ACA		M. xenopi
	TGC AAG TCG AA		M. avium
			M. fortuitum
			M. kansasii
			M. abscessus
			M. intracellulare

Tabelle 3-4: Oligonukleotide für die Reaktionen mit Silicakügelchen.

## Materialien und Methoden

---

Für den Nachweis der Rifampicin-Resistenz vermittelnden Mutation S<sup>456</sup>L wurden zehn weitere SMART PROBES modelliert und von der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) bezogen. Die Sequenzabfolgen dieser Sonden sind in Tabelle 3-5 dargestellt.

---

SMART PROBE	DNA-Sequenz 5' → 3'
S456L_a_10L5S	CCG ACA GCG CCA ACA GTC GGT TT
S456L_b_9L5S	CCG ACG CGC CAA CAG TCG GTT T
S456L_d_7L5S	CCG ACG CCA ACA GTC GGT TT
S456L_d_7L4S	CCC CGC CAA CAG GGG TTT
S456L_f_6L5S	CCG ACC CAA CAG TCG GTT T
S456L_f_6L4S	CCC CCC AAC AGG GGT TT
S456L_g_5L5S	CCG ACC AAC AGT CGG TTT
S456L_g_5L4S	CCC CCA ACA GGG GTT T
S456L_h_4L5S	CCG ACA ACA GTC GGT TT
S456L_h_4L4S	CCC CAA CAG GGG TTT
S456L_d <sub>2</sub> _7L5S	CCC CAT TGG CGC TGG GGT TT

---

Tabelle 3-5: SMART PROBES für den Nachweis der Mutation S<sup>456</sup>L.

### 3.3.1. KOPPLUNG VON AMINREAKTIVEN FARBSTOFFEN AN OLIGONUKLEOTIDE

Für die Farbstoffmarkierung der am 5'-Ende aminomodifizierten Oligonukleotide wurden aminreaktive Farbstoffe eingesetzt. Hierbei wurden entweder Succinimidyl-Ester (NHS-ester) oder Isothiocyanate verwendet. Aminreaktive Farbstoffe wurden direkt vom Hersteller bezogen. Die zugrunde liegende nukleophile Substitution ist in Abbildung 3-1 am Beispiel des NHS-Esters dargestellt.

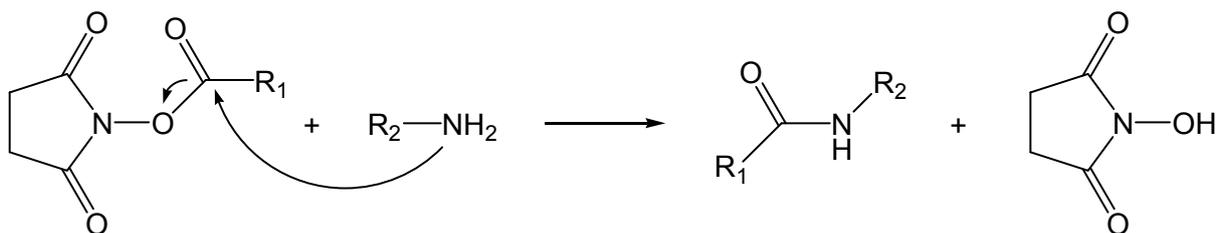


Abbildung 3-1: Reaktionsschema zur Markierung von aminofunktionalisierten Molekülen mit Succinimidyl-Estern.

Der Farbstoff ( $R_1$ ), der als reaktive Gruppe einen NHS-Ester trägt, reagiert mit der Aminofunktion von  $R_2$ .  $R_2$  stellt ein Oligonukleotid oder eine SMART PROBE dar. Als Reaktionsprodukte erhält man eine farbstoffmarkiertes Oligonukleotid sowie ein N-Succinimid.

Die nukleophile Substitution von NHS-Estern oder Isothiocyanaten wird durch leicht alkalische Bedingungen katalysiert. Daher wurde die Reaktionen zur Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide in 200 mM Carbonatpuffer bei pH 9.0 durchgeführt. Hierbei wurden zu einem Moläquivalent Oligonukleotid zwei Moläquivalente des NHS-Esters bzw. des Isothiocyanats, gelöst in DMF (2 mg/ml), gegeben. Die Edukte wurden nach dem Zusammengeben mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss geschüttelt.

Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung über eine Reversed-Phase HPLC Säule gereinigt.

### 3.3.2. HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE MIT SMART PROBES

Sämtliche homogenen und heterogenen Hybridisierungsreaktionen sowie die Schmelzpunktbestimmungen wurden in 10 mM Tris-HCl (1mM EDTA, 300 mM  $\text{Na}^+$ , pH 7,5) durchgeführt.

Bei Reaktionen mit künstlichen Sequenzen wurden die SMART PROBES und die Gegensequenzen bei der im jeweiligen Experiment angegebenen Temperatur in der Küvette ge-

mischt. Die Reaktionskinetik wurde aus der zeitlichen Veränderung der Fluoreszenzspektren bestimmt.

Für die Reaktionen mit PCR-Produkten wurden die PCR-Amplifikate zuerst 10 Minuten bei 99°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Das erkaltete Amplifikat wurde sofort zu der Probe gegeben und vermessen.

### 3.3.3. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER OLIGONUKLEOTIDE

Die Konzentration der farbstoffmarkierten Oligonukleotide wurde über die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{Oligo}$  wurde gemäß Gleichung 3-1 berechnet. Er setzt sich aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen  $\epsilon_{x,260}$  zusammen, wobei  $n_x$  die Anzahl der Basen einer Sequenz ist.

Die Gleichung setzt sich additiv aus den Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide zusammen.

$$\epsilon_{Oligo,260} = \sum_{x=A,T,G,C} n_x \cdot \epsilon_{x,260} \quad \text{(Gleichung 3-1)}$$

$$\epsilon_{A,260} = 15400 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{T,260} = 8800 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{G,260} = 11700 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{C,260} = 7300 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Tabelle 3-6: Molare Extinktionskoeffizienten der vier Nukleotide.

Da Farbstoffe ebenfalls eine Absorption bei 260 nm zeigen, muss diese bei der Konzentrationsbestimmung berücksichtigt werden. Sie unterscheidet sich für verschiedene Farbstoffe und beträgt zwischen 5% und 50% des Wertes im Absorptionsmaximum des Farbstoffs.

### 3.3.4. REAKTIONEN MIT SILICABEADS

Die Reaktionen in heterogener Phase wurden auf Silicabeads (ProActive<sup>®</sup> Microspheres, Bangs Laboratories, Inc.) durchgeführt. Diese Microsphären aus Glas sind mit Streptavidin als Biotinbindungsprotein beschichtet. ProActive<sup>®</sup> Microspheres besitzen einen Durchmesser von 5,06  $\mu\text{m}$  und eine Dichte von 1.96  $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ . Die Stocklösung enthält  $7,558 \cdot 10^7$  Mikrosphären pro Milliliter in einem 100 mM Boratpuffer (pH=8,5) mit 0.1% BSA, 0,05% Tween 20 und 10 mM EDTA.

Um das Oligonukleotid an die Mikrosphären zu binden, wurden diese zuerst in 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (PBS mit 2% BSA und 0,1%ig Pluronic 10300 (BASF, Ludwigshafen, Deutschland)) aufgenommen. Die Lösung wurde abzentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde, und die Kügelchen als Pellet verbleiben. 50  $\mu\text{l}$  5'-biotinmarkiertes Oligonukleotid (verschiedene Konzentrationen in PBS) wurden zum Rückstand gegeben. Zur Immobilisierung auf den Kügelchen wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer die in PBS gelöste SMART PROBE zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann für eine Stunde bei 50°C inkubiert und nochmals zentrifugiert. Die Kügelchen wurden als Rückstand in 10  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und am Fluoreszenzmikroskop in einer Mikrotiterplatte (Mikrotiterplatte 386 Well Optical Plate CBG, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) untersucht.

Für Reaktionen im Sandwich-System wurde mit der SMART PROBE auch die künstliche Gegensequenz, beziehungsweise für Reaktionen mit natürlichen DNA-Sequenzen, das hitzedenaturierte PCR-Produkt (99°C/10 min) hinzugegeben. Ansonsten wurde die Reaktionsfolge beibehalten.

### 3.4. O<sup>6</sup>-BENZYLGUANIN-SUBSTRATE

#### 3.4.1. HERSTELLUNG DER O<sup>6</sup>-BG-SUBSTRATE

Für die Herstellung der BG-Farbstoffsubstrate wurde O<sup>6</sup>-Benzylguanin (Covalys, Witterswill, Schweiz) (Abbildung 3-2) mit aminreaktiven Farbstoffen umgesetzt. Hierbei reagierte die freie Aminogruppe des Benzylguanins mit dem N-Hydroxysuccinimidylester oder Isothiocyanat des Farbstoffs (Abbildung 3-1, wobei R<sub>2</sub> hier BG entspricht).

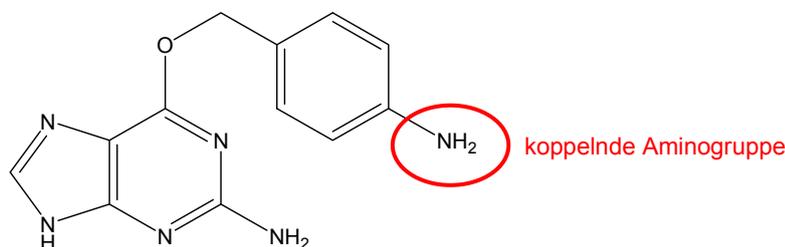


Abbildung 3-2: BG-NH<sub>2</sub>

Die Kopplungen wurden in DMF unter Zugabe von 0,1  $\mu\text{l}$  der katalytisch wirkenden Hilfsbase Diisopropylethylamin (DIPEA) durchgeführt. Bei 25°C wurden 100  $\mu\text{l}$  einer Lösung von BG-NH<sub>2</sub> (0,5 mg/ml in DMF) in DMF mit 10  $\mu\text{l}$  aminreaktivem Farbstoff (2 mg/ml in DMF) um-

gesetzt. Die Reaktion erfolgte unter Schütteln bei Lichtausschluss. Die Reaktionszeit betrug ungefähr 4 Stunden.

Die Aufarbeitung erfolgte wiederum über eine Reversed-Phase HPLC Säule.

Die erhaltenen Ausbeuten bewegten sich, in Abhängigkeit vom verwendeten Farbstoff, zwischen 50 und 90%.

### 3.4.2. REAKTIONEN DER O<sup>6</sup>-BG-SUBSTRATE

Die Reaktionen der O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstrate mit hAGT *in vitro* wurden in 10 mM Tris-HCl, 154 mM Na<sup>+</sup>, pH 7, durchgeführt. Temperaturen und Konzentrationsverhältnisse der Reaktionen sind in den entsprechenden Kapiteln gesondert erwähnt.

### 3.5. Berechnung der Quantenausbeuten

Die Quantenausbeuten der SMART PROBES wurden in Tris-HCl bestimmt. Für die SMART PROBES war die Referenz ein lineares, mit MR 121 markiertes, Oligonukleotid. Die Quantenausbeute der BG-Substrate wurde in PBS, DMF und DMSO gemessen. Als Referenzwert wurden hierbei die jeweiligen freien Farbstoff verwendet, deren Quantenausbeuten auf 1,0 gesetzt wurde.

Die zu untersuchenden Lösungen wurden an der Anregungswellenlänge auf gleiche optische Dichte wie die Referenzlösung eingestellt. Die Anregung erfolgte bei gleicher Wellenlänge.

Die relative Quantenausbeute wurde nach Gleichung 3-2 berechnet:

$$\Phi_{fl} = \frac{\Phi_{f,Pr}}{\Phi_{f,Re}} = \frac{A_{Re}}{A_{Pr}} \cdot \frac{I_{Pr}}{I_{Re}} \cdot \frac{OD_{Re}}{OD_{Pr}} \cdot \frac{n_{Pr}^2}{n_{Re}^2} \quad (\text{Gleichung 3-2})$$

Hierbei ist OD<sub>Re</sub> die optische Dichte der Referenz und OD<sub>Pr</sub> die optischen Dichten der Probe bei der Anregungswellenlänge. Die Emissionsintensitäten I<sub>Pr</sub> und I<sub>Re</sub> wurden aus der Fläche der Emissionsspektren bestimmt. Die Intensitäten der Absorption A<sub>Pr</sub> und A<sub>Re</sub> wurden aus dem Integral der Absorptionsspektren bestimmt. Werden die Probe und die Referenz in unterschiedlichen Lösungsmitteln gemessen, muss zusätzlich eine Korrektur der Brechungsindices der Lösungsmittel erfolgen (n<sub>Pr</sub> und n<sub>Re</sub>).

### **3.6. PCR**

Die Auswahl der Primer wurde von Dr. Bernhard Fellenberg, geb. Häfner und Dr. Matthias Müller am Hygieneinstitut des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt [Häfner 2006, Müller 2007].

Primer-Stocklösungen wurden in autoklaviertem TE-Puffer (0,61 g Tris-EDTA, 500 ml bidestilliertem H<sub>2</sub>O, pH 8,0) hergestellt und bei –20°C gelagert. Primer-Gebrauchslösungen wurden in bidestilliertem H<sub>2</sub>O gelöst und bei +4°C gelagert. Für sämtliche PCR-Ansätze wurden Reagenzien der Firma Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) verwendet. Soweit nicht anders angegeben, betrug der PCR-Gesamtansatz jeweils 50 µl. Für die Amplifikation wurden 25 ng genomische DNA eingesetzt.

Die Lagerung der Amplifikate erfolgte bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen bei +4°C.

### **3.7. Mykobakterienstämme**

Für die Arbeit wurden Bakterien des Genus *Mycobacterium* verwendet. Dabei handelt es sich sowohl um *M.tuberculosis* als auch um atypische Mykobakterien. Die verwendeten Mykobakterienisolate entstammten der Stammsammlung des Hygiene-Instituts, Universitätsklinikum Heidelberg. Es handelte es sich um Mykobakterien, welche aus Patientenmaterial unterschiedlicher Kliniken (Raum Heidelberg) im Rahmen der Routinediagnostik isoliert und identifiziert wurden. Weiterhin wurden in geringer Zahl Mykobakterienstämme aus bundesweit stattfindenden Ringversuchen, an denen das Hygiene-Institut zweimal jährlich teilnimmt, verwendet.

Die verwendeten Bakterienstämme wurden von Dr. Bernhard Fellenberg, geb. Häfner und Dr. Matthias Müller (beide Hygiene-Institut, Universitätsklinikum Heidelberg) zur Verfügung gestellt [Häfner 2006, Müller 2007].

## 3.8. Zellkultur

### 3.8.1. CHINESISCHE HAMSTEROVARIEN (CHO-ZELLEN)

Für die *in vivo* Experimente mit dem SNAP-TAG System wurden Zellen der Linie CHO-H2B (Zelltyp: Chinese-Hamster-Ovary) (Covalys, Witterswill, Schweiz) verwendet. Diese Zelllinie exprimiert stabil AGT-histone 2B (H2B) und wurde von der Firma Covalys zur Verfügung gestellt.

Für die sterile Kultivierung der Zelllinie war es notwendig, alle Arbeitsschritte unter der Sterilbank (laminar flow) durchzuführen. Einer eventuellen Kontamination durch Bakterien und Pilze wurde durch Reinigen der Arbeitsfläche und der Werkzeuge mit 70% Ethanol vorgebeugt. Des Weiteren wurden nur sterilisierte beziehungsweise autoklavierte Glaswaren, Pipettenspitzen und Lösungen verwendet.

Die Zelllinie wuchs in Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma-Aldriche, München, Deutschland) mit 10% dekomplementiertem fötalem Kälberserum (Invitrogen, Deutschland), 50 U/ml Penicillin G, 50 mg/ml Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 2mM L-Glutamin (Biochrom A) bei 5% CO<sub>2</sub> gesättigter Wasserdampfatmosphäre und einer Temperatur von 37°C. Die Kultivierung der Zellen fand in T-25 Gewebekulturflaschen statt.

Zum Vermehren der Zellen wurden die konfluenten Zellen mit PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin LE Express (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) proteolysiert. Die Zellen wurden anschließend mit Vollmedium vom Untergrund gewaschen und suspendiert. Im Normalfall erfolgte alle drei Tage eine 1:5 Aufteilung.

Für die Reaktionen mit BG-Substraten wurden die Zellen in  $\mu$ -Slides, 8 well, ibidi treat (ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) gesetzt, so dass sie am nächsten Tag halbkonfluent angewachsen waren. Pro Transfektion wurden 200  $\mu$ l F-12 Medium, gemeinsam mit 5  $\mu$ M BG-Substrat, in eine Kammer gegeben. Anschließend wurden die Zellen in Medium 30 Minuten inkubiert und anschließend nochmals das Medium gewechselt. Nach weiteren 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank wurde nochmals das Medium gewechselt und die Zellen vermessen.

### 3.8.2. EXPRESSION DES SNAP26B IN *E. COLI*

Die Herstellung des Fusionsproteins SNAP26b wurde von Tanja Erhard und Dipl. Biol. Sonja Schulmeister in der Arbeitsgruppe von Dr. Victor Sourjik (Zentrum für molekulare Biologie,

Heidelberg) durchgeführt. Die Expression wurde in *E. coli* (HCB33) vorgenommen, indem SNAP26b aus pSS26b (Covalys, Witterswill, Schweiz) geschnitten wurde und in pQE60 (Qiagen, Hilden, Deutschland) fusioniert wurde.

### 3.8.3. KULTIVIERUNG VON *E. COLI* UND *in vivo* AGT-MARKIERUNG

Zur Anzucht der *E. coli* Bakterienzellen (HCB33, mit und ohne Expressionsvektor SNAP26b) wurden diese in LB-Medium (Lysogeny Broth-Medium) mit Kanamycin und Ampicillin (1:1000) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln mit 150 U/min inkubiert. Als Anzuchtgefäße dienten sterile 15 ml Reagenzgläser. Am nächsten Morgen wurden 10 µl der Übernachtskultur in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 10 ml LB-Medium/Ampicillin/Kanamycin überführt. Die Expression des SNAP26b wurde mit 60 µM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Kultur wurde bei 275 rpm und 34 °C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,5 geschüttelt. Anschließend wurde sie mit 5 µM BG-Farbstoffsubstrat angefärbt. Nach zwei-stündiger Inkubationsphase mit Benzylguanin-Farbstoffsubstrat wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit PBS gewaschen. Zum Ankleben auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen wurden sie in PBS aufgenommen und 15 Minuten auf der Oberfläche inkubiert.

### Herstellung von Poly-L-Lysin Oberflächen

100 µl Poly-L-Lysin (0,1% w/v) werden auf ein Deckgläschen geben. Nach 15 Minuten einwirken werden sie mit bidestilliertem Wasser abgespült und getrocknet.

Die Auswertung der Fluoreszenzbilder der *E. coli* erfolgte mit ImageJ (W.Rasband, NIH, Bethesda, USA).

## 3.9. Geräte

### 3.9.1. HPLC

Zur Auftrennung der Reaktionsgemische wurde eine HPLC-Anlage 1100 series (Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet, die für analytische Stoffmengen bis etwa 5 nmol geeignet ist. Die Trennung erfolgte auf einer Reverse-Phase-Säule der Länge 250 mm mit Innendurchmesser 4,6 mm (Phenomenex, Aachen, Deutschland). Als Säulenmaterial diente Oktadecylsilan-Hypersil C18 der Korngröße 5 µm, 120 Å Porengröße.

Sowohl die gekoppelten Oligonukleotide als auch die BG-Substrate wurden mit folgendem Programm aufgereinigt.

Zeit	Fluss	Eluent
0 min	1 ml/min	100% Laufmittel A
30 min	1 ml/min	0% Laufmittel A

Tabelle 3-7: Laufmittelzusammensetzung bei der HPLC.

Als Laufmittel A wurden für hydrophobe Produkte 0,1 M Lösungen von Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA, pH 7,4) in Wasser verwendet. Als Laufmittel B kam eine 0,1 M Lösung von TEAA in einem Gemisch von 25% Wasser und 75% Acetonitril zum Einsatz. Bei hydrophilen Produkten wurde als Laufmittel A eine Lösung von 100% Wasser mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA), als Laufmittel B 75% Acetonitril, 25% Wasser und 0,1% TFA verwendet. Es wurde ein linearer Gradient gefahren.

Die Absorptionsmessung während der Aufreinigung der farbstoffmarkierten Oligonukleotide erfolgte bei 260 nm sowie bei dem Maximum der Absorptionswellenlänge der eingesetzten Farbstoffe. Die Fluoreszenz wurde etwas unterhalb des Absorptionsmaximums des Farbstoffs angeregt, um eine Überlappung des eingestrahnten und emittierten Lichts zu vermeiden. Die Detektion erfolgte am Emissionsmaximum.

### 3.9.2. ABSORPTIONSSPEKTROMETER

Alle UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 500 Scan Spektrometer (Varian, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Die Proben wurden in Suprasil-Quarzglas-Halbmikroküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) gemessen.

### 3.9.3. FLUORESZENZSPEKTROMETER

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer mit Cary Temperature Controller (beides Varian) durchgeführt.

Mit Hilfe der Temperaturkontrolle durch das angeschlossene Peltierelement konnten die Fluoreszenz der farbstoffmarkierten Oligonukleotide in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden und damit die Schmelzpunkte der SMART PROBES bestimmt werden. Die Proben wurden in Suprasil-Quarzglas-Mikroküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) gemessen.

Um intermolekulare Wechselwirkungen und Reabsorptionseffekte zu vermeiden, wurde die Konzentration der Proben kleiner als  $10^{-6}$  M gehalten.

### 3.9.4. THERMOCYCLER

Die Denaturierung der PCR-Produkte wurde in einem Thermocycler PTC-10 (MJ Research Inc., Watertown, USA) durchgeführt. Hierzu wurde 10 min auf 99 °C erhitzt.

Für die Reaktionen der BG-Substrate mit dem Fusionsprotein Snap26b wurde der Thermocycler auf 8°C, 25°C und 37°C temperiert.

### 3.9.5. FLUORESZENZLEBENSDAUERSPEKTROMETER

Fluoreszenzlebensdauern wurden mit der Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (TCSPC: Time-Correlated Single-Photon Counting) an einem Fluoreszenzlebensdauerspektrometer FluoTime 100 Compact (Picoquant, Berlin, Deutschland) bestimmt.

Als Anregungslichtquellen dienten LEDs (Light Emitting Diode) verschiedener Anregungswellenlängen (PLS-370, PLS-450, PLS-500, und PLS-600). Die Detektion erfolgt über einen Photomultiplier.

Die Methode beruht auf der Messung der Zeit zwischen der Fluoreszenzantwort des ersten detektierten Photons und der Anregung der Probe mit idealer Weise einem  $\delta$ -Puls (real 200 ps Halbwertsbreite). Durch vielfache Wiederholung dieser Messung erhält man eine statistische Verteilung der Zeiten zwischen Anregungspuls und Ankunft des ersten Photons. Diese Zeiten entsprechen der Verweilzeit der Moleküle im angeregten Zustand. Werden sie als Histogramm aufgetragen, erhält man Fluoreszenzabklingkurven.

In idealisierter Weise wird hierbei davon ausgegangen, dass bei jedem Anregungspuls höchstens ein Fluoreszenzphoton am Detektor ankommt. Da jedoch bei jedem Puls mehrere Moleküle angeregt werden, kommen oft mehrere Photonen am Detektor an. Einen Stoppuls löst jedoch immer nur dasjenige Photon aus, welches als erstes den Detektor erreicht. Somit wird eine kürzere Lebensdauer vorgetäuscht („Pile up“ Effekt) [Lakowicz 1999]. Um diese Effekte zu vermeiden, muss die Konzentration der Probe und die Anregungsleistung so eingestellt sein, dass nur bei jedem zwanzigsten Puls ein Fluoreszenzphoton gemessen wird [O'Connor 1986]. Ebenso können hohe Farbstoffkonzentrationen durch Reabsorptions- und Reemissionsprozesse dazu führen, dass zu lange Fluoreszenzlebensdauern gemessen werden [Hammond 1979]. Um diese Prozesse zu umgehen, muss die Konzentration der Probe kleiner als  $10^{-6}$  M sein.

Eine Fluoreszenzabklingkurve eines farbstoffmarkierten Benzylguanins und das Profil der Anregungslichtquelle sind in Abbildung 3-3 dargestellt. Die Fluoreszenzlebenszeiten liegen typischerweise im Bereich von Nanosekunden.

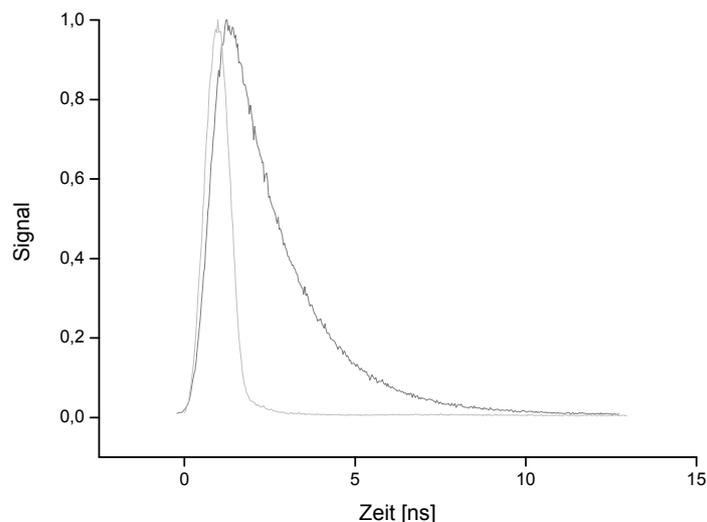


Abbildung 3-3: Fluoreszenzabklingkurve von O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Cy5 (grau) und Puls der 600 nm LED (hellgrau).

Da der Anregungspuls nicht unendlich kurz ist, ist die Funktion der Lebensdauer mit dem Profil des Anregungspulses gefaltet. Zum Erhalten der exakten Fluoreszenzlebensdauer müssen die beiden Abklingkurven entfaltet werden. Dies wird mit der vom Hersteller mitgelieferten Software FluoFit v4.0 (Picoquant, Berlin, Deutschland) automatisch vorgenommen. Hierbei wird zum Abschätzen der Güte der Kurvenanpassung von der Software ein  $\chi^2$  angegeben, welches bei einer optimalen Kurvenanpassung einen Wert von  $\sim 1$  ergibt.

### **3.10. Fluoreszenzmikroskopie**

#### **3.10.1. SILICABEADS**

Die Aufnahmen der Silicabeads wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon TE300 Eclipse; Nikon, Japan) vorgenommen. Hierbei wurde das Detektionsvolumen durch die Mikrotiterplatte (386 Well, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) auf 50  $\mu\text{l}$  beschränkt. Als Anregungslichtquelle diente eine 100 W Quecksilberdampf Lampe, deren Lichtstrahl über einen Anregungsfilter (622 DF 34; AHF-Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) auf einen Strahlteiler (646 DRLP; AHF-Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) trifft, welcher den Lichtstrahl auf ein Öl-Immersions-Objektiv (60 $\times$ /NA 1.4; Olympus, Tokio, Japan) lenkt. Das Fluoreszenzlicht der fokalen Ebene wird mit demselben Objektiv gesammelt und über einen Emissionsfilter (675 DF 50; AHF-Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) auf eine

CCD (*Charged Coupled Device*)-Kamera (Imager 3, Picostar, LaVision, Göttingen) gelenkt. Die Aufzeichnung der Bilder erfolgte mit *DaVis 5.4.4*.

### **3.10.2. SNAP-TAG**

Die Aufnahmen der Säugerzellen und der *E. coli* Zellen wurden ebenfalls an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100TV, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Als Anregungslichtquelle diente eine Quecksilberdampfampe HBO 50 Short Arc Lamp (Osram, München, Deutschland). Zur Detektion wurde eine EMCCD Kamera (Ixon, Andor, Belfast, Nordirland) verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Andor Solis (Andor, Belfast, Irland) aufgenommen. Tabelle 3-8 zeigt die für die unterschiedlichen Farbstoffe verwendeten Strahlteiler und Filter (AHF-Analysentechnik, Tübingen, Deutschland).

Filter Absorption	Filter Emission	Strahlteiler	Angeregter Farbstoff
370 clean up	480 DF 40	365-15	ATTO 425
480 DF 40	535 DF 50	470 DRLP	ATTO 488, ATTO 495, ATTO 520, ATTO 532, Rhodamine Green, 2',4',5',7'-tetrabromofluorescein, TAMRA, Rhodamine B, TET, DY 505, FAM
535 DF 30	625 DF 34	585 DRLP	ATTO 565, ATTO 590
625 DF 34	675 DF 50	646 DRLP	ATTO 620, ATTO 633, ATTO 635, ATTO 647N, MR 121, DY 113, ATTO 655, ATTO 680, ATTO 700, Cy 5

Tabelle 3-8: Die für die Versuche mit SNAP-TAGS verwendeten Strahlteiler und Filter.

## **3.11. Software**

### **3.11.1. MFOLD & RNASTRUCTURE**

Die Programme *mfold* und *RNAstructure* wurden von MICHAEL ZUKER am *Institute for Biomedical Computing* an der Washington University School of Medicine entwickelt [Zuker 1999]. *mfold* berechnet für gegebene RNA- oder DNA-Sequenzen die freien Energien der

optimalen und suboptimalen Sekundärstrukturen. Dabei wird die freie Energie durch Summation der *Base Pairing Energies*, der *Base Stacking Energies* sowie empirischer Werte für in der Struktur vorhandene Schleifen berechnet. Es werden *Hairpin Loops*, *Interior Loops*, *Bulge Loops* und *Multiloops* berücksichtigt, jedoch keine Pseudoknoten, da diese mit dem Algorithmus des Programms nicht zu vereinbaren sind. Weiterhin können die Natrium- und die Magnesiumkonzentrationen sowie die Temperatur gewählt werden. Die Ergebnisse der Berechnungen können graphisch dargestellt werden und bieten damit die Möglichkeit, die Faltung von DNA-Hairpins vorherzusagen und graphisch ansprechend darzustellen.

*RNAstructure* bietet weiterhin die Möglichkeit, zwei einzelsträngige DNA-Sequenzen virtuell zu hybridisieren. Allerdings fehlt im Gegensatz zu *mfold* die Möglichkeit, Salzkonzentrationen und Temperatur zu verändern.

*mfold* wurde in dieser Arbeit benutzt, um die optimalen und suboptimalen Sekundärstrukturen der Hairpin-Oligonukleotide und der DNA-Sequenzen der Mykobakterien und deren freie Energien zu berechnen. Ebenfalls wurden damit die Dot Plots erstellt. Mit *RNAstructure* wurde die Hybridisierung der SMART PROBES an die Zielsequenz simuliert.

Es wurden die Version 3.1.2 von *mfold* und *RNAstructure* in der Version 3.71 verwendet.

### 3.11.2. ANALYZE BEAD

Die Auswertung der digitalen Bilder der Silicabeads erfolgte über ein halbautomatisches Verfahren. Hierzu wurde das Programm *Analyze Bead* verwendet, welches von DIRK-PETER HERTEN am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg entwickelt wurde. Diese mit *LabVIEW* in der Version 6.1 erstellte Software dient zur Erkennung einzelner *Dynabeads*<sup>®</sup>, wobei die Fluoreszenzintensität der Punkte zu ihrer Häufigkeit in Beziehung gesetzt wird.

Zur Generierung mathematischer Daten aus den digitalen Bildern wird zuerst ein *Prewitt Kantenfilter (EdgeDetection)* mit einem 3x3-Filterkern angewendet. Dieser lineare Filter findet, durch diskrete Approximation an den Gradienten der Grauwerte, starke Veränderungen in der Helligkeit innerhalb des Bildes auf. Aus den Konturen der einzelnen Objekte werden so feine Linien erzeugt. Über einen manuell wählbaren unteren Grenzwert (*Threshold*) wird eine Detektionsgrenze für die leuchtenden Kügelchen festgelegt. Dieser Grenzwert variiert stark mit der Intensität der Fluoreszenz und wird, je nach Konzentration, auf Werte zwischen 5 und 120 eingestellt. Die erkannten Objekte werden anschließend mit einem Pixelwert von 1 gefüllt (*FillHole*) und viermal durch einen 3x3-Erosionsfilter berechnet. Dieser *Morphologische Filter* legt über die Umgebung des Bildpunktes eine vordefinierte Maske mit Grauwerten und errechnet durch eine definierte mathematische Vorschrift das neue Bild, was zu einem

Entfernen aller kleinen Objekte führt (*RemoveParticle*). Durch Beseitigen aller auf dem Rand liegender Punkte (*RejectBorder*) und anschließendes Öffnen (*opening*), was einer Erosion mit einem 7x7 Filterkern und anschließender Dilatation über eine 5x5 Umgebung entspricht, werden die Objekte auf ihre Ausgangsgröße ausgedehnt. Durch erneutes, viermaliges Anwenden eines 3x3 Erosionsfilters werden nochmals alle kleinen Partikel entfernt (*RemoveParticle*). Mittels manueller Eingabe kann nun ein Partikelfilter eingestellt werden (*Heywood Zirkularität*), welcher es erlaubt nur runde Fragmente zu erkennen. Je nach Qualität des Bildes werden Werte zwischen 1.05 und 1.15 eingestellt, wobei 1.0 einer exakten Kugelgestalt entspricht.

Die erhaltenen Daten werden in *Origin 6.0* exportiert und graphisch dargestellt.

## 4. Experimente und Ergebnisse

Fluoreszierende Proben sind heutzutage in vielen Gebieten der biologischen und biomedizinischen Forschung so wie in der molekularen Diagnostik verbreitet, wie zum Beispiel in der molekularen Pathologie. Sie eröffnen attraktive Möglichkeiten, Biomoleküle mit einer vorher nicht gekannten Spezifität und Sensitivität *in vivo* und *in vitro* zu markieren. Auf diese Weise werden spektroskopische und mikroskopische Visualisierungen der zellulären Untereinheiten bis hin zur Einzelmolekülsensitivität möglich. Die Untersuchung und das Verständnis von biologischen Prozessen und Mechanismen, sowohl *in vitro* also auch *in vivo*, ist nicht nur für die Grundlagenforschung der Naturwissenschaften von höchstem Interesse, sondern auch für die medizinische Diagnostik und die klinische Therapie von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden fluoreszierende Proben, welche anhand der Fluoreszenzlöschung von Farbstoffen durch Guanosin geschaltet werden können, entwickelt. Einerseits wurden sie zur schnellen und spezifischen Identifizierung von verschiedenen Mykobakterienspezies und Punktmutationen eingesetzt. Darüber hinaus konnten sie zur Markierung von Proteinen in Säugerzellen und Bakterien angewendet werden.

### SMART PROBES

Der Nachweis von Mykobakterienspezies ist auf Grund der ständig neu beschriebenen Arten (Stand Februar 2006: 118 Spezies innerhalb des Genus *Mycobacterium*) [Euzéby 2006] sowie der steigenden Fallzahlen von großer Bedeutung [Kim 1999; Devulder 2005]. In dieser Arbeit wurden hierfür erstmalig einfach farbstoffmarkierte DNA-Sonden in Hairpin-Struktur, so genannte SMART PROBES, verwendet [Stöhr 2005]. Die Optimierung der Versuchsparameter erfolgte in einem modellhaften, homogenen Messansatz unter Verwendung mehrerer, für die Spezies *M.xenopi* spezifischer SMART PROBES. Anschließend erfolgte der *proof-of-principle* des Testverfahrens durch spezifische Identifizierung von *M.avium*, *M.fortuitum*, *M.xenopi* und *M.tuberculosis* gegen jeweils 15 Mykobakterienspezies. In einem heterogenen Testverfahren, welches die Funktionsweise der SMART PROBES auf Glaskügelchen zeigt, konnte die Empfindlichkeit der Methode deutlich erhöht werden. Außerdem gelang es in dieser Arbeit auch, eine sichere und gezielte Nachweismethode von Rifampicin-resistenten *M.tuberculosis* Isolaten mit Hilfe von SMART PROBES zu etablieren.

### 4.1. Auswahl der Zielsequenz

Die Differenzierung verschiedener Mykobakterienspezies mit SMART PROBES erfolgte unter Verwendung von PCR-Produkten des mykobakteriellen 16S rDNA Gens, welches für die bakterielle 16S rRNA kodiert. Auf Grund der genetisch wichtigen Funktion der 16S rRNA als Bestandteil der kleinen Untereinheit bakterieller Ribosomen ist dieser Genabschnitt hoch konserviert [Clarridge 2004]. Das gesamte, ca. 1550 bp lange Gen, kommt in allen Bakterien vor und spielt bei deren Identifizierung mit molekularbiologischen Methoden eine entscheidende Rolle [Gillman 2001]. Durch das Vorhandensein von konservierten Regionen der 16S rDNA erlaubt es dieses Gen einerseits die Auswahl von Primerbindungsstellen für PCR-Fragmente von allen Mykobakterienspezies, andererseits besitzt es variable Sequenzbereiche, welche im gesamten Genabschnitt verteilt sind und so zur Identifizierung der Spezifität der einzelnen Arten verwendet werden können (Abbildung 4-1):

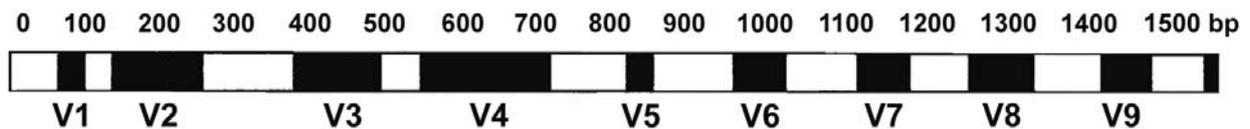


Abbildung 4-1: Regionen des Gesamtgens der mykobakteriellen 16S rDNA (aus Gillman 2001). Schwarz: Variable Bereiche, weiß: konservierte Bereiche.

Geeignete Zielsequenzen für den Nachweis spezifischer Mykobakterienspezies durch SMART PROBES wurden innerhalb der variablen Regionen 2 (*E. coli* Pos. ca. 180-220) und 3 (*E. coli* Pos. ca. 440-495) gefunden.

Als Modellsystem für den Nachweis mittels SMART PROBES wurden sieben Mykobakterienspezies mit stark unterschiedlicher klinischer Relevanz ausgewählt (Tabelle 4-1).

## Experimente und Ergebnisse

Spezies	Wachstum	Klinische Relevanz	Klinische Manifestation	Literatur
<i>M.avium</i>	schnell	hoch	Disseminierte Infektionen bei HIV-Patienten; bei Immunkompetenten vor allem pulmonal (ähnlich TB)	Chemlal 2003; Dostal 2003
<i>M.fortuitum</i>	schnell	mittel	Postoperative Wundinfektionen, Bindegewebsabszesse, Kutaninfektionen	Wagner 2004; Brown-Elliott 2002
<i>M.xenopi</i>	langsam	gering	extrapulmonale Infektionen bei Immunkomprimierten, selten Lungentuberkulose	Falkinham 1996; Harmsen 2003
<i>M.tuberculosis</i>	langsam	hoch	Erreger der Tuberkulose, ca. 2 Millionen Todesfälle/Jahr	RKI 2004; WHO 2005
<i>M.abscessus</i>	schnell	mittel	Bronchopulmonale Infektionen bei Patienten mit Mukoviszidose	Griffith 2003; Brown-Elliott 2002
<i>M.kansasii</i>	langsam	hoch	Chronische Lungenentzündung ähnlich Lungentuberkulose (bei HIV-Patienten), Kutaninfektionen	Roonay 1996; Alcaide 1999
<i>M.intracellulare</i>	schnell	hoch	Pulmonale Infektionen, disseminierte Infektionen	Runyon 1965; Maesaki 1993

Tabelle 4-1: Relevanz und Bedeutung der für den SMART PROBE Nachweis ausgewählten Mykobakterienspezies.

Die Auswahl der ungefähren Bindungsregionen für die Sonden erfolgte zunächst auf Grundlage eines Alignments mykobakterieller 16S rDNA-Sequenzen von insgesamt 37 verschiedenen Spezies. Dabei wurde insbesondere auf die Spezifität der Spezies in der gewählten Zielsequenz geachtet. Um mögliche Kreuzreaktionen mit weiteren, selten isolierten Mykobakterienspezies, für die keine eigenen Sequenzen zur Verfügung standen, zu minimieren, erfolgte ein Abgleich der gewählten Zielbereiche gegen öffentliche Sequenzdatenbanken mit dem Programm BlastN2.

Die beiden gewählten variablen Regionen VR2 und VR3 zeigten sich als ausreichend variabel, um für alle sieben zu identifizierenden Spezies (*M.avium*, *M.fortuitum*, *M.xenopi*, *M.tuberculosis*, *M.kansasii*, *M.absceccus* und *M.intracellulare*) spezifische Sequenzabschnitte definieren zu können.

## Experimente und Ergebnisse

Abbildung 4-2 zeigt das Alignment der variablen Regionen zwei und drei der 16 am häufigsten am Hygiene-Institut des Universitätsklinikums Heidelberg isolierten Mykobakterienspezies.

Mykobakterien-  
spezies

16S rDNA Sequenz 5' → 3'

		<b>VR2</b>									
<b>M. AB</b>	TAATACCGGA	<u>TAGGACCACA</u>	<u>CACTTCATGG</u>	<u>TGAGTGGTGC</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<b>M. AV</b>	TAATACCGGA	<u>TAGGACCTCA</u>	<u>AGACGCATGT</u>	<u>CTTCTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. CE</i>	TAATACCGGA	TAGGACCATG	<u>GGATGCATGT</u>	<u>CTTGTGGTGG</u>	AAAGC <u>TTT</u> ..	<u>. . TGC</u> GGTGT	GGGATG				
<i>M. CH</i>	TAATACCGGA	TAGGACCACA	<u>CACTTCATGG</u>	<u>TGAGTGGTGC</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<b>M. FO</b>	TAATACCGAA	<u>TATGACCACG</u>	<u>CGCTTCATGG</u>	<u>TGTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. GA</i>	TAATACCGGA	TAGGACCACT	<u>TGGCGCATGC</u>	<u>CTTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. GO</i>	TAATACCGAA	TAGGACCACA	<u>GGACACATGT</u>	<u>CCTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. INTE</i>	TAATACCGGA	TAGGACCTCG	<u>AGGCGCATGC</u>	<u>CTTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<b>M. INTR</b>	TAATACCGGA	<u>TAGGACCTTT</u>	<u>AGGCGCATGT</u>	<u>CTTTAGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<b>M. KA</b>	TAATACCGGA	<u>TAGGACCACT</u>	<u>TGGCGCATGC</u>	<u>CTTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. MAL</i>	TAATACCGAA	TAGGACCCCG	<u>AGGCGCATGC</u>	<u>CTTGGGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. MAR</i>	TAATACCGGA	TAGGACCACG	<u>GGATTTCATGT</u>	<u>CCTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. PE</i>	TAATACCGAA	TATGACCGCG	<u>CACTTCCTGG</u>	<u>TGTGTGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<i>M. SZ</i>	TAATACCGGA	TAGGACCCCG	<u>AGGCGCATGC</u>	<u>CTTGGGGTGG</u>	AAAGC--T..	<u>TTTGCGGTGT</u>	GGGATG				
<b>M. XE</b>	TAATACCGGA	<u>TAGGACCATT</u>	<u>CTGCGCATGT</u>	<u>GGGGTGGTGG</u>	AAAGC <u>GTTTG</u>	<u>G</u> TAGCGGTGT	GGGATG				
<b>M. TU</b>	TAATACCGGA	TAGGACCACG	<u>GGATGCATGT</u>	<u>CTTGTGGTGG</u>	<u>AAAGCGCT..</u>	<u>TTAG</u> CGGTGT	GGGATG				
<i>E. coli</i>	170							230			
		<b>VR3</b>									
<b>M. AB</b>	AAACCTCTTT	<u>CAGTAGGGAC</u>	GAAG--C---	-----GAA	<u>AGTGACGGTA</u>	<u>CCTACAGAAG</u>	AAG				
<b>M. AV</b>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTTTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. CE</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGCTGCCG	<u>GTTTTCCCGT</u>	<u>GGTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. CH</i>	AAACCTCTTT	<u>CAGTAGGGAC</u>	GAAG--C---	-----GAA	<u>AGTGACGGTA</u>	<u>CCTACAGAAG</u>	AAG				
<b>M. FO</b>	AAACCTCTTT	<u>CAATAGGGAC</u>	GAAG--C---	-----GCA	<u>AGTGACGGTA</u>	<u>CCTATAGAAG</u>	AAG				
<i>M. GA</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTCTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. GO</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTTTCTCGG</u>	<u>GCTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. INTE</i>	AAACCTCTTT	<u>CAGCAGGGAC</u>	GAAG--C---	-----GCA	<u>AGTGACGGTA</u>	<u>CCTGCAGAAG</u>	AAG				
<b>M. INTR</b>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTTTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<b>M. KA</b>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTCTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. MAL</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTTTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. MAR</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTTTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>M. PE</i>	AAACCTCTTT	<u>CAATAGGGAC</u>	GAAG--C---	-----GCA	<u>AGTGACGGTA</u>	<u>CCTATAGAAG</u>	AAG				
<i>M. SZ</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTTTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>CGTGGAGAAG</u>	AAG				
<b>M. XE</b>	AAACCTCTTT	<u>CAGCCTCGAC</u>	GAAGCTGCCG	<u>GTTTTCTCGT</u>	<u>GGTGACGGTA</u>	<u>GGGGCAGAAG</u>	AAG				
<i>M. TU</i>	AAACCTCTTT	<u>CACCATCGAC</u>	GAAGGTCCGG	<u>GTTCTCTCGG</u>	<u>ATTGACGGTA</u>	<u>GGTGGAGAAG</u>	AAG				
<i>E. coli</i>	430							500			

Abbildung 4-2: Alignment der hypervariablen Regionen der 16S rDNA.

*M.AB*=*M. abscessus*, *M.AV*=*M. avium*, *M.CE*=*M. celatum*, *M.CH*=*M. chelonae*, *M.FO*=*M. fortuitum*, *M.GA*=*M. gastris*, *M.GO*=*M. gordonae*, *M.INTE*=*M. interjectum*, *M.INTR*=*M. intracellulare*, *M.KA*=*M. kansasii*, *M.MAL*=*M. malmoense*, *M.MAR*=*M. marinum*, *M.PE*=*M. pergrinum*, *M.SZ*=*M. szulgai*, *M.XE*=*M. xenopi*, *M.TU*=*M. tuberculosis*.

War für eine Spezies mehr als ein Sequenar beschrieben, wurde das am häufigsten isolierte verwendet. Die angegebenen Positionen beziehen sich auf die *E. coli*-Referenz der gewähl-

ten Oligonukleotidsequenzen, welche bei der späteren Synthese der SMART PROBES Verwendung fanden.

Als Referenz diente die Sequenz von *M.tuberculosis*. Sequenzbereiche, in denen sich die verschiedenen Arten unterscheiden, sind grau unterlegt. Sequenzen, für die SMART PROBES synthetisiert wurden, sind unterstrichen. Dabei entsprechen die Sequenzen der SMART PROBES dem kodierenden Strang der 16S rDNA (5'→3', wie abgebildet) und binden an den dazu komplementären Strang (3'→5'). Die Nummerierung orientiert sich an der *E. coli* 16S rDNA Sequenz.

### **4.2. Auswahlkriterien spezies-spezifischer SMART PROBES**

Nachdem die Zielsequenzen innerhalb des Alignments der hypervariablen Region der 16S rRNA bestimmt waren, wurden SMART PROBES mit Spezifität für sieben unterschiedliche Mykobakterienarten hergestellt.

Um einen möglichst hohen Fluoreszenzanstieg in möglichst kurzer Zeit zu erreichen, müssen folgende Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

- Effektive Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs im geschlossenen Zustand der SMART PROBE.
- Keine Fluoreszenzlöschung des Farbstoffs nach Hybridisierung der SMART PROBE an die Gegensequenz.
- Hairpinstruktur energetisch nicht zu stabil, da sie ansonsten schwer hybridisiert, energetisch nicht zu instabil, da die Sonde sonst zu unselektiv reagiert.
- Maximaler Energiegewinn durch eine Hybridisierung an die Zielsequenz, welche möglichst viele Basen der SMART PROBE mit einbezieht.
- Frei zugängliche Zielsequenz, damit bei der Hybridisierung keine energetisch aufwendige Umstrukturierung der Ziel-DNA nötig ist.

In ersten Versuchen wurden für die Spezies *M.xenopi* sechs SMART PROBES entworfen. Diese bestanden aus einer Schleife von ca. 20 Basen und Stämmen von 4 oder 5 Basen. Die SMART PROBES mit unterschiedlichen Stammlängen sollten eine unterschiedliche Reaktivität zeigen. Ferner sollten sie verschieden starke Löschungen des Farbstoffs aufweisen, da man durch Variation der Stammlänge einen erheblichen Einfluss auf die Stabilität im Grundzustand erwartet. Zur Verstärkung der Löschung im Grundzustand der SMART PROBE wurden die 3'-Enden mit drei überhängenden Thyminen oder Guanosinen versehen [Heinlein 2003].

Erste Versuche zeigten, dass nicht alle SMART PROBES zu dem gewünschten Fluoreszenzanstieg führen. Dies wird einerseits durch unvollständige Löschung des Farbstoffs im geschlossenen Zustand der SMART PROBE hervorgerufen, andererseits sind einige Nukleotide der Haarnadelschleife der Sonde sowie der Zielsequenz nicht frei zugänglich. Dies kommt durch Basenpaarbildungen innerhalb der Sequenzen zustande, wodurch Reaktionen mit anderen DNA-Strängen erschwert werden. Sowohl die Struktur des Hairpins als auch die Struktur der Zielsequenz haben also einen erheblichen Einfluss auf die Reaktivität des Systems und bedürfen gesonderter Betrachtung.

Zur Verbesserung der Selektivität von SMART PROBES müssen daher neben experimentellen Beobachtungen auch theoretische Berechnungen einfließen.

Um über die Reaktivität von SMART PROBES eine Vorhersage machen zu können, wurde das Programm *mfold* von MICHAEL ZUKER (Institute for Biomedical Computing, Washington University School of Medicine) für die Modellierung der DNA herangezogen [Zuker 1999].

### **4.3. Berechnung der optimalen Versuchsparmeter**

Als Modellsystem zur Optimierung der Versuchsparmeter diene die Sequenz von *M.xenopi* und die sechs SP<sub>xenopi</sub> (1-6) Hairpins. Mit Hilfe des Programms wurden einerseits Salzkonzentrationen und Hybridisierungstemperaturen mit in die Berechnung eingeschlossen und optimiert, andererseits wurden Sekundärstrukturen von PCR-Fragmenten verschiedener Länge berechnet. Da eine Hybridisierung nur zügig ablaufen kann, wenn der Zielbereich innerhalb des PCR-Fragments für die SMART PROBE frei zugänglich ist, sind vor allem Sekundärstrukturen für eine schnelle Kinetik der Reaktion maßgeblich.

Um die Sekundärstruktur des betrachteten 240 bp PCR-Fragments (Primer 27f und 228r) des nicht kodierenden Stranges der 16S rDNA von *M.xenopi* zu erhalten, wurde die Sequenz bei unterschiedlichen Temperaturen und einer Natriumionenkonzentration von 300 mM berechnet.

Die Modellierung zeigt bei höheren Temperaturen eine geringere Zahl an Sekundärstrukturen. Diese werden durch einen Rückgang der intramolekularen Hybridisierungen der Basensequenz hervorgerufen. Somit ist der Zielbereich der DNA für eine Hybridisierung leichter zugänglich. Bei dem betrachteten 240 bp Fragment des *M.xenopi* liegt die Sequenz der variablen Region zwei ab 50°C frei vor (Abbildung 4-3).

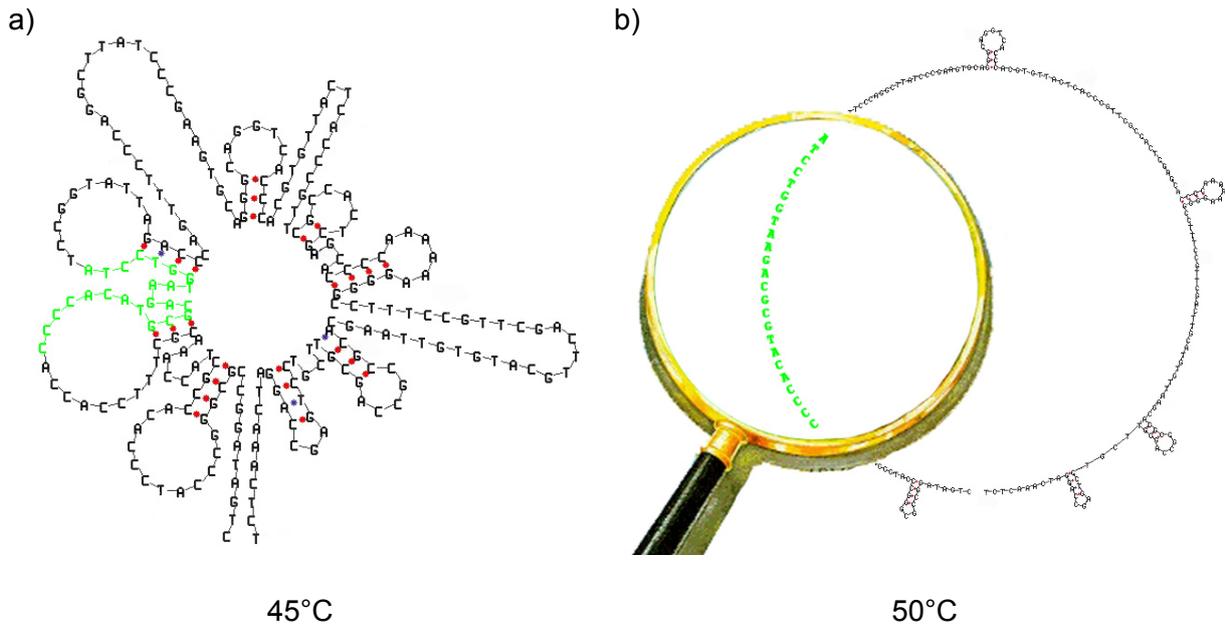


Abbildung 4-3: Sekundärstrukturen des Gegenstrangs des 240 bp Amplifikats von *Mycobacterium Xenopi* berechnet mit *mfold* bei 45°C (a) und 50°C (b) bei  $[Na^+]=300$  mM,  $[Mg^{2+}]=0$  mM.

Im Hinblick auf die Zielsequenz scheint daher bei der Durchführung der Reaktion eine Temperatur von 50°C oder mehr empfehlenswert, da eine Doppelhelixbildung von SMART PROBE und Zielsequenz thermodynamisch nur bevorzugt zur geschlossenen Sonde ist, wenn die komplementäre Zielsequenz nicht in einer Sekundärstruktur gefaltet vorliegt.

Aus diesem Grund wurde bei der Modellierung der SMART PROBES eine Temperatur von 50°C so wie eine Salzkonzentration von 300 mM  $Na^+$  angenommen. So konnte für die Sonde eine freie Zugänglichkeit zur Zielsequenz gewährleistet werden.

Die theoretisch modellierten Sekundärstrukturen der sechs *M.xenopi*-spezifischen Sonden sind in Abbildung 4-4 zu sehen. Gezeigt ist die jeweils energetisch stabilste Struktur.

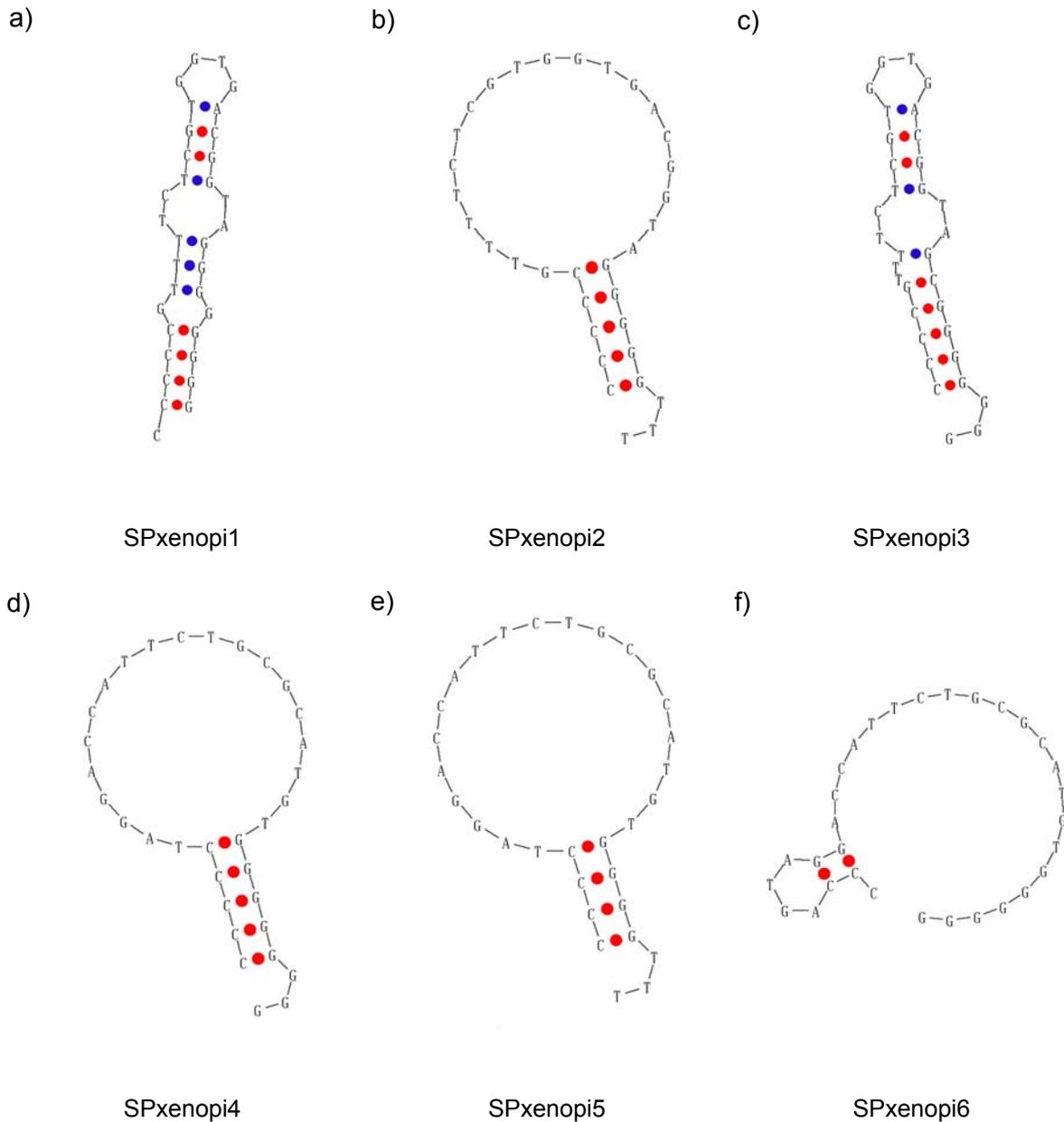


Abbildung 4-4: Jeweils Stabilste Struktur der sechs SMART PROBES für *M.xenopi* modelliert mit *mfold* bei 50°C, [Na<sup>+</sup>]=300 mM, [Mg<sup>2+</sup>]=0 mM.

Die stabilsten Sekundärstrukturen sind nicht unbedingt diejenigen, welche eine Stamm-Schleife Struktur ausbilden. So tritt beispielsweise in der stabilsten Sekundärstruktur von SPXenopi1 (a) ein C-Überhang auf, wodurch Basenpaarungen in der Haarnadelschleife ermöglicht werden, welche sich stabilisierend auf die freie Gibbssche Energie auswirken. Das Vorhandensein eines C-Überhangs wird aller Voraussicht nach die Löschung des Farbstoffs durch den fehlenden, unmittelbaren Kontakt zu einem fluoreszenzlöschenden Guanosin, verschlechtern.

Solche Basenpaarung in der Schleife treten auch bei SPxenopi3 (c) auf. Sie dürften sich wie bei SPxenopi1 negativ auf die Reaktivität auswirken. Gepaarte Basen sind bei einer Hybridisierung an die Gegensequenz nicht mehr frei zugänglich, so dass vor der Reaktion mit der Zielsequenz noch die Hybridisierungsenergie aufgebracht werden muss, um diese Basenpaarungen zu spalten.

SPxenopi6 (f) bildet bei 50°C zwar einen Hairpin aus, jedoch nicht die erforderte Stamm-Schleife-Struktur, da die thermische Energie so hoch ist, dass alle Basenpaarungen des ursprünglichen Stamms aufgehoben werden. Diese Sonden scheinen nach der Modellierung für Reaktionen bei hohen Temperaturen auf Grund der hier fehlenden Hairpinstruktur nicht geeignet. SPxenopi6 wird voraussichtlich durch eine hohe Quantenausbeute nur zu einem geringen Fluoreszenzanstieg nach Hybridisierung an Zielsequenz führen.

Die in Abbildung 4-4 gezeigten Strukturen können jedoch nur eingeschränkt zum Entwurf von SMART PROBES herangezogen werden, da diese Form der Darstellung nur die jeweils stabilste Konformation der SMART PROBES und die freie Gibbsche Energie dieser stabilsten Struktur liefert. Bei Hybridisierungsexperimenten sind jedoch alle theoretisch möglichen Sekundärstrukturen im Gleichgewicht vorhanden, weshalb sie für Vorhersagen der Reaktion ebenfalls betrachtet werden sollten. Die Vorhersage des Energiegehalts und der Reaktivität einer SMART PROBE ist mittels Modellierung der stabilsten Sekundärstruktur bei vorgegebener Temperatur und Salzkonzentration daher nur näherungsweise anwendbar.

Eine genauere und verfeinerte Möglichkeit der theoretischen Betrachtung von DNA-Strukturen sind Energie Dot Plots (Abbildung 4-6). Diese visualisieren die Superposition aller möglichen Sekundärstrukturen von DNA Oligonukleotiden.

Abbildung 4-5 stellt eine vereinfachte Darstellung eines Energie Dot Plots für folgende Sequenz dar:

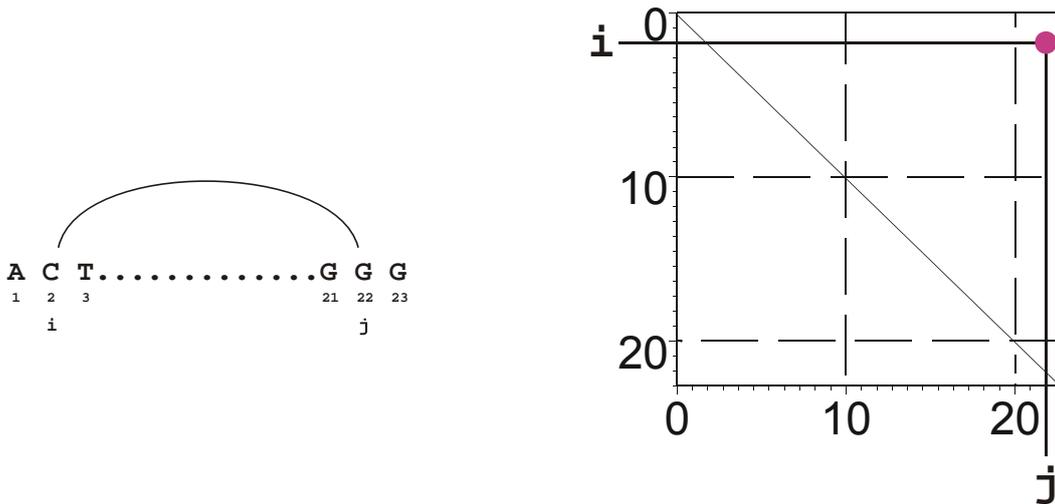


Abbildung 4-5: Darstellung eines Energie Dot Plots für obige Sequenz.

Jedes Basenpaar  $(i, j)$  einer Helix wird hierbei durch einen Punkt in Zeile  $i$  und Reihe  $j$  dargestellt. In der Beispielsequenz findet eine Basenpaarung zwischen dem C, welches die zweite Base ist, und dem G mit der Basennummer 22 statt. Das Basenpaar  $(i, j)$  ist also  $(2, 22)$ . Diese Paarung wird im Energie Dot Plot mit einem Punkt angezeigt. Die minimale freie Energie einer Helix, beziehungsweise die minimale freie Energie der stabilsten Sekundärstruktur, welche diese Basenpaarung enthält, wird durch die Farbe wiedergegeben.

Abbildung 4-6 zeigt die Energie Dot Plots der sechs SPxenopi Hairpins.

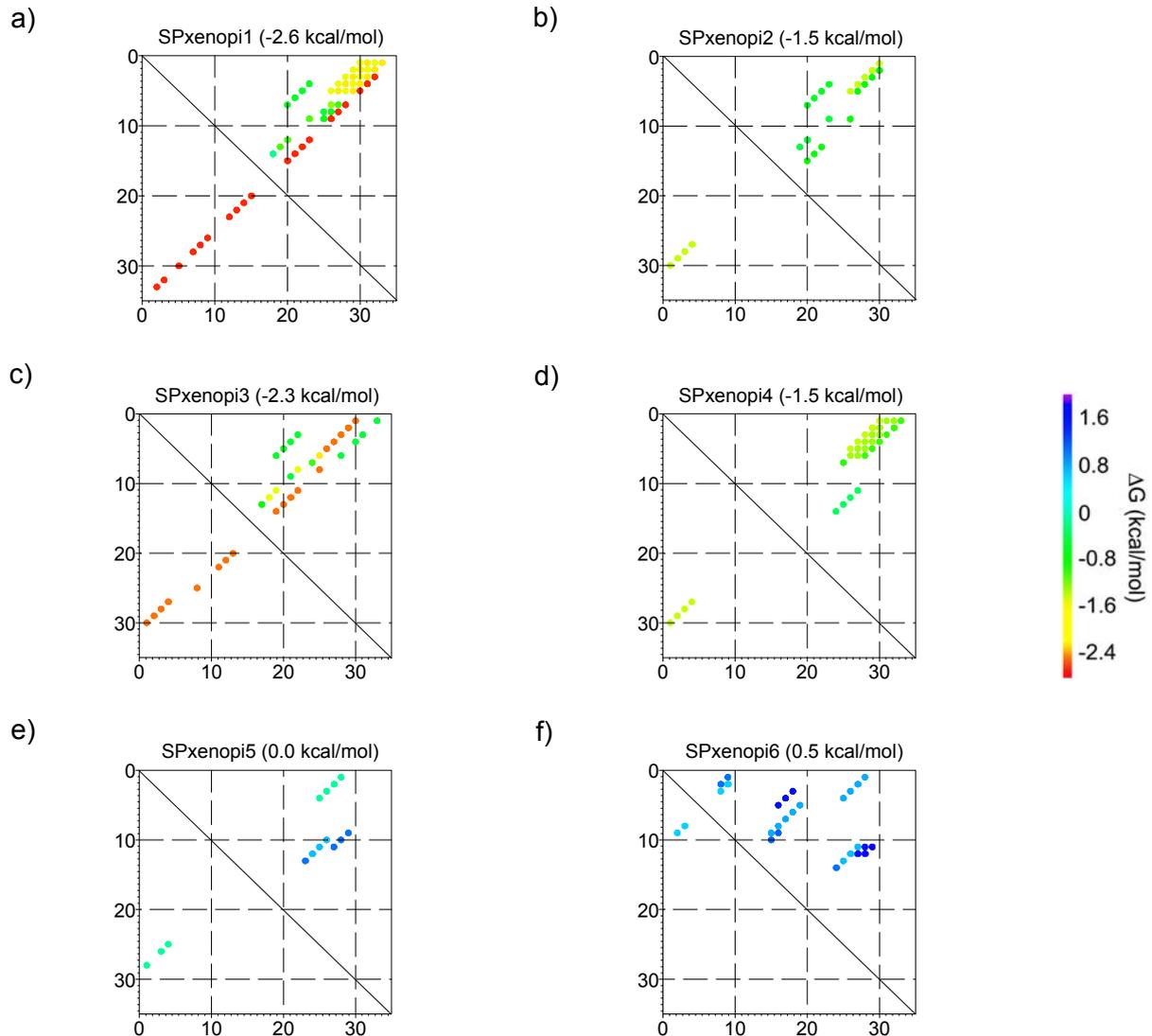


Abbildung 4-6: Dot Plots der sechs SMART PROBES für *M.xenopi* berechnet mit *mfold* bei 50 °C,  $[Na^+]=300$  mM,  $[Mg^{2+}]=0$  mM.

Im oberen, rechten Dreieck wird die Superposition aller möglichen Sekundärstrukturen der SMART PROBE dargestellt. Im linken, unteren Dreieck ist jeweils die Basenpaarung der stabilsten Sekundärstruktur abgebildet.

Da für eine effiziente Löschung des Farbstoffmoleküls eine Nähe zum Guanosin-Überhang unabdingbar ist, muss sich das 5'-Ende in der Nähe der endständigen Guanosine befinden. Gibt es mehrere gelöschte Konformationen einer Struktur, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden, hybridisiert der Hairpin leichter aus einer dieser Strukturen heraus und die Reaktivität wird erhöht. Ebenso ist die Löschung in Anwesenheit von mehreren Guanosinen erhöht. Basenpaarungen in der Haarnadelschleife sollten möglichst nicht in Sekun-

därstrukturen vorkommen, um eine freie Zugänglichkeit der Basen für eine Hybridisierung zu gewährleisten. Ein schnelles, leichtes Öffnen der SMART PROBE bei gelöschter Fluoreszenz ist bei Strukturen zu erwarten, welche weder zu stabil sind noch zu instabil sind. Dieses Maß für die Stabilität kann mit Hilfe der Gibbsschen Energie erbracht werden.

Folglich sollte, bei Betrachtung der Dot Plots, die SMART PROBE SPxenopi4 (d) bei der Reaktion mit Gegensequenz die besten Ergebnisse liefern. Sie weist bei mehreren Konformationen, welche ein flexibles Vorbeigleiten des 3'-Endes an den Guanosinen des 5'-Endes erlauben, nur in einer Struktur Basenpaarungen in der Schleife auf. Somit sollte die Struktur flexibel genug sein, um leicht eine Reaktion einzugehen, jedoch stabil genug, dass die Quantenausbeute gering bleibt. Die Basenabfolge der Haarnadelschleife wäre für eine Hybridisierung frei zugänglich.

SPxenopi2 (b) wäre hinsichtlich der freien Gibbsschen Energie von  $-1,5$  kcal/mol in einem Stabilitätsbereich, der eine leichte Reaktion zulassen sollte. Das Aufweisen von zu vielen Sekundärstrukturen mit Basenpaarung der Schleife sowie das Fehlen eines ausgeprägten Stammes lässt eine erschwerte Reaktion erwarten.

Die Dot Plots von SPxenopi5 (e) und SPxenopi6 (f) weisen positive, freie Gibbssche Energien auf. Diese SMART PROBES liegen im thermodynamischen Gleichgewicht überwiegend geöffnet vor. Im Dot Plot kann man das Fehlen von Basenpaarungen im Stamm erkennen.

SPxenopi1 (a) und SPxenopi3 (c) hingegen besitzen im Bereich der Haarnadelschleife sehr viele Basenpaarungen. Sie sind somit wahrscheinlich zu stabil, um schnell und unter einem größtmöglichen Fluoreszenzanstieg zu reagieren.

Zur Modellierung einer gut gelöschten und dabei schnell reagierenden SMART PROBE sollte nach den vorherigen Betrachtungen Folgendes beachtet werden:

- Das Farbstoffmolekül muss sich in nächster Nähe zum Guanosinüberhang befinden.
- Die beiden Sequenzabschnitte, die den Stamm formen, sollten mehrerer Hybridisierungsmöglichkeiten aufweisen, das heißt der Guanosin-Überhang sollte gleiten können.
- Die freie Gibbssche Energie sollte zwischen  $-1,5$  kcal/mol und  $-2,0$  kcal/mol liegen, um neben einer effizienten Löschung reaktiv genug für die Hybridisierung an die Gegensequenz zu sein. Nach der Boltzmann Verteilung wäre eine geschlossene Sekundärstruktur mit  $-1,5$  kcal/mol zehnmal wahrscheinlicher als eine geöffnete Form, für deren Energie  $0,0$  kcal/mol angenommen werden können.

In Hinblick auf diese Aspekte konnten selektive SMART PROBES für die Spezies *M.tuberculosis*, *M.fortuitum*, *M.avium*, *M.kansasii*, *M.intracellulare* und *M.abscessus* modelliert und hergestellt werden.

Die Optimierung der experimentellen Durchführung erfolgte weiterhin mit den sechs SMART PROBES der Spezies *M.xenopi*.

### **4.4. Charakterisierung der *M.xenopi*-spezifischen SMART PROBES und Optimierung des homogenen Versuchsaufbaus**

Bei der Charakterisierung der sechs *M.xenopi*-spezifischen Hairpins wurden folgende Punkte betrachtet:

- Vergleich der experimentell ermittelten Schmelzpunkte mit den mit Hilfe von *mfold* berechneten theoretischen Werten.
- Relativer Fluoreszenzanstieg nach Zugabe künstlicher Gegensequenz.
- Vergleich der berechneten freien Gibbsschen Energie  $\Delta G$  mit der relativen Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_F$ .
- Lebensdauern der Sonden im Ausgangszustand sowie nach Reaktion mit Gegensequenz.

#### **4.4.1. SCHMELZKURVEN UND SCHMELZPUNKTE**

Um einen experimentellen Wert für die günstigste Temperatur der Reaktion zu erhalten, wurde die Fluoreszenzintensität der sechs SMART PROBES beim Erwärmen und Abkühlen in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen (Abbildung 4-7). Durch Aufheizen der Probe öffnet sich die Hairpinstruktur, und eine Löschung durch Guanosinbasen ist durch die fehlende Nähe zu diesen nicht mehr möglich. Die Schmelzpunkte wird bestimmt als der Wendepunkt der Kurve. Zusätzlich zu den Schmelzpunkten geben die Kurven Aufschluss darüber, bis zu welcher Temperatur die SMART PROBES in einem geschlossenen, gelöschten Zustand vorliegen. Dies ist hinsichtlich der optimalen Temperatur, bei der die Reaktion durchgeführt wird, von Interesse, da ein Minimum der Fluoreszenz als Ausgangspunkt den größtmöglichen Anstieg liefern wird.

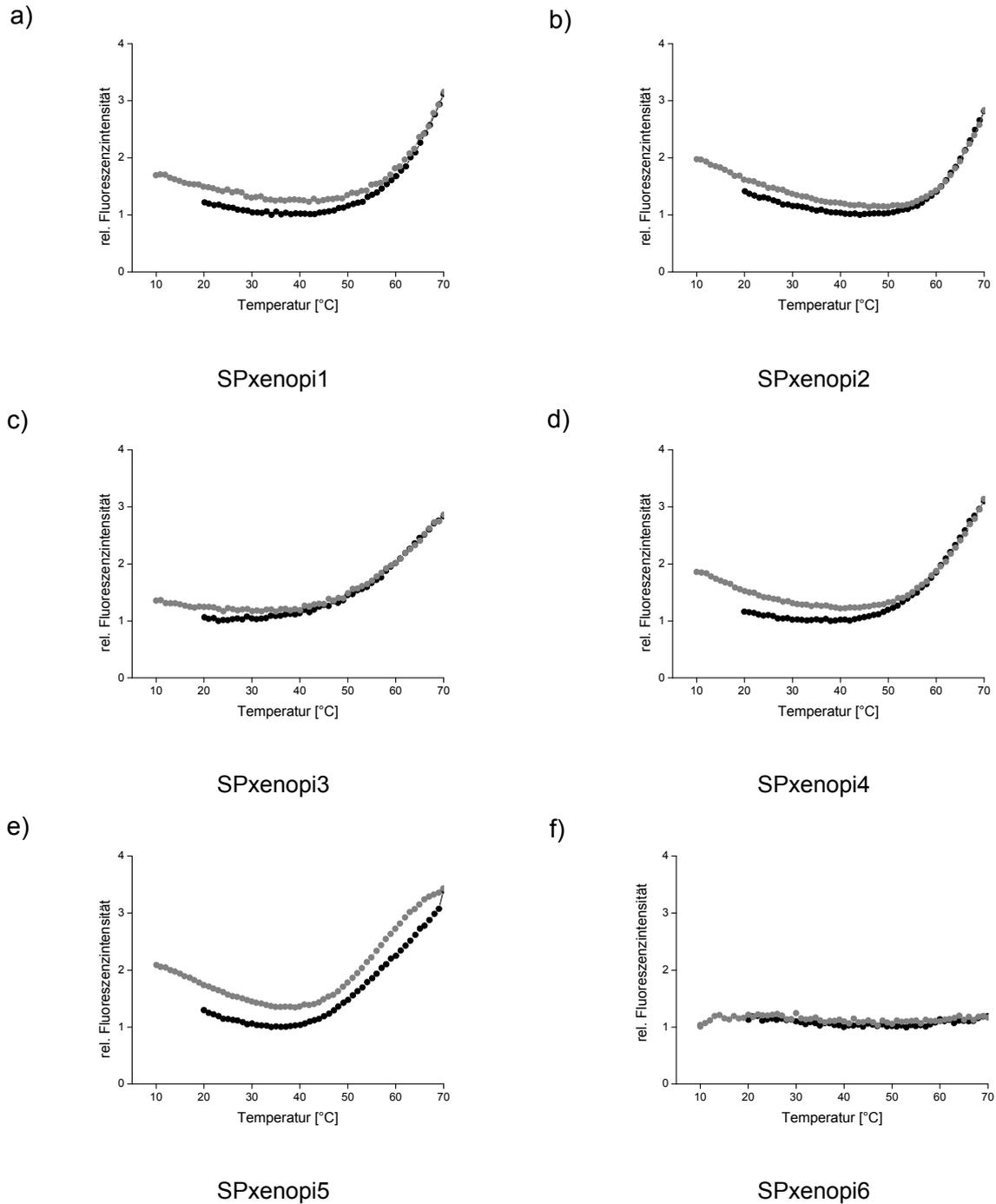


Abbildung 4-7: Fluoreszenzintensitäten der sechs SMART PROBES für *M.xenopi* in Abhängigkeit von der Temperatur. Schwarz: aufheizen, grau: abkühlen.

Aus den Schmelzkurven ist ersichtlich, dass SPxenopi 1-5 (a-e) relativ zur gelöschten Struktur bei 70°C ungefähr 3 bis 4 fach stärker fluoreszieren. Lediglich SPxenopi6 (f) liegt, wie schon nach den Dot Plots erwartet, bei Raumtemperatur geöffnet vor und zeigt keinen Anstieg durch Öffnung der Sondenstruktur bei hohen Temperaturen.

Tabelle 4-2 zeigt eine Übersicht über die mit *mfold* berechneten und die gemessenen Schmelzpunkte der SMART PROBES.

Hairpin	Stammlänge	Überhang	T <sub>m</sub> [°C] <i>mfold</i>	T <sub>m</sub> [°C] exp.
SPxenopi1	5	dG <sub>3</sub>	62,3	68,6
SPxenopi2	5	dT <sub>3</sub>	61,3	66,1
SPxenopi3	5	dG <sub>3</sub>	62,5	65,2
SPxenopi4	5	dG <sub>3</sub>	61,4	64,2
SPxenopi5	4	dT <sub>3</sub>	49,0	60,5
SPxenopi6	4	dG <sub>3</sub>	57,4	65,5

Tabelle 4-2: Übersicht über die berechneten und experimentell bestimmten Schmelzpunkte der SMART PROBES.

Hier nach hat die Anzahl der Basenpaarungen im Stamm einen signifikanten Einfluss auf die Schmelztemperatur. Die Verlängerung des Stamms von vier auf fünf Basen kann die Schmelztemperatur um mehrere Grad Celsius erhöhen. Jedoch spielen auch andere stabilisierende Faktoren eine Rolle, durch welche die Schmelztemperatur ebenfalls beeinflusst wird. Durch eine zusätzliche Basenpaarung findet eine energetische Stabilisierung der Struktur statt, was in einer höheren Schmelztemperatur resultiert, da ein Aufbrechen des Stammes nun mehr Energie benötigt. Ein Vergleich der berechneten mit den gemessenen Schmelztemperaturen der SMART PROBES zeigt, dass die gemessenen Werte etwas höher liegen als die modellierten. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass der in *mfold* verwendete Algorithmus Wechselwirkungen des Farbstoffs mit dem Stamm unberücksichtigt lässt. Diese Wechselwirkung hat jedoch, gerade bei kurzen Stämmen, einen vergleichsweise großen Einfluss auf die Stabilität. Die mit *mfold* berechneten Werte können lediglich Tendenzen der Schmelztemperatur bei ähnlichen Hairpins wiedergeben. Eine Vorhersage der exakten Temperatur für die Schleifenöffnung ist hiermit jedoch nicht möglich.

Für einen größtmöglichen Fluoreszenzanstieg sollten also Temperaturen gewählt werden, die unterhalb der Schmelzpunkte liegen. Da das PCR-Produkt nach obigen Berechnungen

erst ab einer Temperatur von 50°C für eine Hybridisierung frei zugänglich ist, empfiehlt sich für Hybridisierungsexperimente eine Temperatur von 50°C. Bei dieser Temperatur ist die Sonde noch geschlossen und zeigt Ihre geringste Quantenausbeute, während die Zielsequenz frei zugänglich für eine Reaktion ist. Dies sollte zu einer schnellen Kinetik bei größtmöglichem Fluoreszenzanstieg führen.

### 4.4.2. FREIE GIBBSSCHE ENERGIE UND FLUORESZENZQUANTENAUSBEUTE

Neben der Darstellung von Dot Plots kann mit dem Programm *mfold* auch die freie Gibbsche Energie der energetisch günstigsten Hairpin Struktur berechnet werden. Diese gibt Aufschluss über die Stabilität einer Sekundärstruktur. Bei Energiewerten der SMART PROBE bis -1,0 kcal/mol handelt es sich um eine relativ instabile Stamm-Schleife Struktur. Im zeitlichen Mittel wird die geschlossene Haarnadelschleifenstruktur nur selten vorliegen. Daraus resultiert eine Sonde mit hoher Quantenausbeute, welche kaum gelöschten Farbstoff trägt und somit zu einem geringen Anstieg der Fluoreszenz nach Reaktion mit Gegensequenz führt. Beträgt die freie Gibbsche Energie einen Wert von -1,5 kcal/mol oder weniger, führt dies zu einer sehr stabilen und effizient gelöschten Sonde. Für diese Sonden muss, damit es zu einer Reaktion kommt, mehr Energie aufgebracht werden. Diese muss in Form von Wärme, also durch eine hohe Temperatur, oder in Form einer bei Reaktion hoher freiwerdender Hybridisierungsenergie, zugeführt werden. Viel Energie wird vor allem dann frei, wenn ein langer Hybridisierungsbereich vorhanden ist, oder aber der Bereich einen hohen Anteil an G-C-Paarungen besitzt. Durch die Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken trägt eine G-C-Paarung eine Energie von 6,0-9,6 kcal/mol bei. Eine A-T-Paarung bildet hingegen lediglich zwei Wasserstoffbrücken aus und kommt somit auf nur 3,6-6,0 kcal/mol [Arora 1998]. Bei natürlichen Sequenzen hat man keinen Einfluss auf die Basenabfolge und muss zugunsten erhöhter Selektivität einer Sonde auf einen kleinen Sequenzbereich zurückgreifen, welcher zweifelsohne auch A-T-Basenpaare enthalten wird. Stehen verschiedene Regionen für eine Sonde zur Verfügung, kann dieses Kriterium jedoch hilfreich für die Auswahl sein.

Auf Grund dieser Betrachtungen scheint eine SMART PROBE mit einer freien Gibbschen Energie von -2,0 bis -1,5 kcal/mol am zweckmäßigsten zu sein. Somit wären die Eigenschaften einer guten Fluoreszenzlöschung vereint mit einer schnellen Reaktionskinetik.

Die Stabilität einer Sonde hat unter anderem auch Auswirkungen auf die relative Quantenausbeute  $\Phi_{F,rel}$ . Diese gibt das Ausmaß der Löschung eines Farbstoffs in der Hairpinstruktur wieder, wobei ein Wert von 1 keine Löschung relativ zum freien Farbstoff bedeutet, und ein Wert von 0 einer vollständigen Löschung entspricht. Die relative Quantenausbeute sollte bei einer stark negativen freien Gibbschen Energie einer SMART PROBE gering sein, gleichbedeutend mit einer sehr effizienten Löschung des Farbstoffs. In der Praxis beobachtet man

jedoch trotz stabiler Hairpins Quantenausbeuten, welche zwischen 0 und 1 liegen. Dies kommt daher, dass die Nähe zum Fluoreszenzlöschenden Guanosin trotz geschlossener Struktur nicht immer optimal für den Elektronentransfer ist.

Tabelle 4-3 zeigt die mit *mfold* berechneten freien Gibbsschen Energien bei 50°C, die Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_{F,rel}$  relativ zu einer Sonde ohne Stamm bei 20°C, sowie die Anstiege der Fluoreszenzintensität  $I_0/I_C$  nach Reaktion mit künstlicher Gegensequenz bei 50°C.

SMART PROBE	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Phi_{F,rel}$ (20°C)	$I_0/I_C$ (50°C)
SPxenopi1	-2,6	0,21	2,95
SPxenopi2	-1,5	0,24	2,56
SPxenopi3	-2,3	0,11	2,13
SPxenopi4	-1,5	0,21	3,45
SPxenopi5	0,0	0,36	2,36
SPxenopi6	+0,5	0,30	2,04

Tabelle 4-3: Freie Gibbssche Energie  $\Delta G$  der stabilsten Sekundärstruktur der sechs SMART PROBES des *M.xenopi*, sowie die relative Quantenausbeute  $\Phi_{F,rel}$  bei 20°C und der relative Fluoreszenzanstieg  $I_0/I_C$  bei 50°C.

SPxenopi5 und SPxenopi6, welche eine hohe freie Gibbssche Energie aufweisen, zeigen eine größere Fluoreszenzquantenausbeute, stark negative Gibbssche Energien, wie bei SPxenopi1 und SPxenopi3, führen zu niedrigen Quantenausbeuten. Bei der Reaktion mit künstlichen Gegensequenzen sollten daher die Sonden SPxenopi1 und 3 die höchsten Anstiege zeigen, während SPxenopi5 und 6 zu keinen oder geringen Intensitätserhöhungen führen sollten.

#### 4.4.3. REAKTIONEN MIT KÜNSTLICHER GEGENSEQUENZ

Unter Berücksichtigung der optimalen Reaktionstemperatur und Salzkonzentrationen wurden die sechs SMART PROBES mit künstlichen Gegensequenzen zur Reaktion gebracht. Abbildung 4-8 zeigt den zeitlichen Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität, der das Maß der fortschreitenden Hybridisierung der farbstoffmarkierten DNA an die künstliche Gegensequenz widerspiegelt. Die Reaktionen wurden bei 50°C in Tris-HCl, pH 7,5 durchgeführt, indem einer  $10^{-8}$  M Lösung der jeweiligen SMART PROBE ein 10 facher Überschuss an künstlicher, einzelsträngiger Gegensequenz (Oligo\_xenopi1 für die variable Region 1, Oligo\_xenopi2 für die variable Region 2) zugegeben wurde.

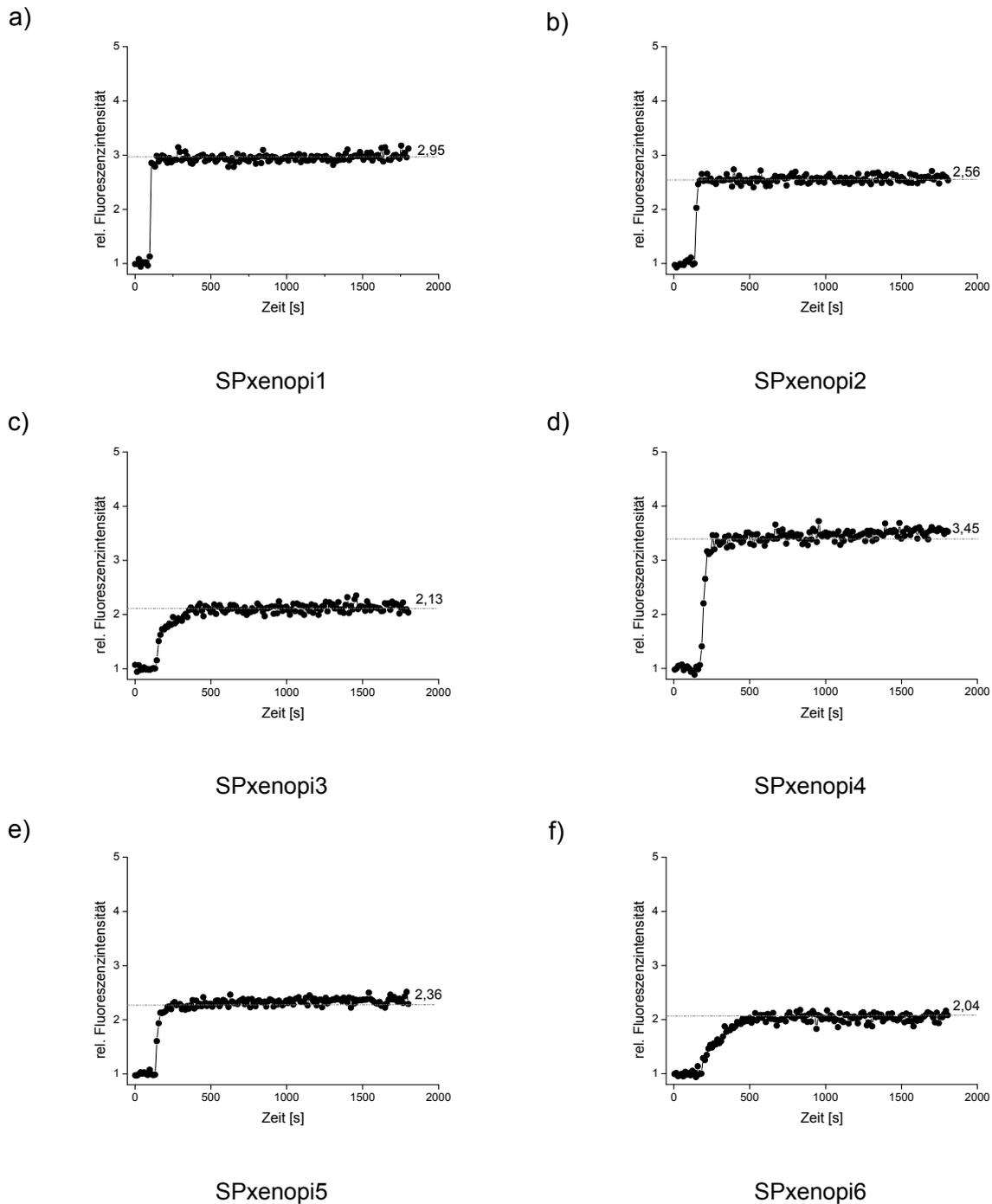


Abbildung 4-8: Kinetik der Reaktion und relative Fluoreszenzanstiege der sechs SMART PROBES ( $10^{-8}\text{M}$ ) für *M.xenopi* nach Zugabe von zehnfachem Überschuss an künstlicher Gegensequenz ( $10^{-7}\text{M}$ ) bei  $50^{\circ}\text{C}$ .

Bei allen SMART PROBES ist ein Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen. Den höchsten Fluoreszenzanstieg ( $I_0/I_C=3,45$ ) zeigt SPxenopi4 (d), was hinsichtlich der Gibbschen Energie ( $-1,5 \text{ kcal/mol}$ ) verständlich scheint. Die Struktur ist weder zu stabil noch zu reaktiv. Die relative Quantenausbeute ist mit 0,21 zwar gering, jedoch sollte SPxenopi1 (a) ( $I_0/I_C=2,95$ ) mit der selben Quantenausbeute zu einem ähnlichen Anstieg führen, und SPxenopi3 (c)

( $I_0/I_C=2,13$ ) mit einer Quantenausbeute von 0,11 sogar zu einem höheren. Beide Sonden sind jedoch zu stabil, so dass bei 50°C das Gleichgewicht auf der Seite der geschlossenen Hairpins liegt. SPxenopi5 (e) ( $I_0/I_C=2,36$ ) mit nur vier Basen im Stamm und SPxenopi6 (f) ( $I_0/I_C=2,04$ ) mit keinem Stamm zeigen deutlich geringere Anstiege. Dies ist auch mit den hohen Quantenausbeuten und der Gibbsschen Energie im Einklang. SPxenopi6 reagiert im Vergleich zu den anderen *M.xenopi* spezifischen SMART PROBES langsamer. Schon in den Dot Plots war zu erkennen, dass sich bei SPxenopi6 keine Stamm-Schleife-Struktur ausbilden kann, wodurch erwartet wurde, dass keine effektiv gelöschte Sonde vorliegt. Die freien Gibbsschen Energien von 0,0 kcal/mol (SPxenopi5,) und 0,5 kcal/mol (SPxenopi6) weisen ebenfalls darauf hin, dass eine Hairpinstruktur nicht bevorzugt zu anderen Sekundärstrukturen der Sondensequenz vorliegen wird. Somit liegen wahrscheinlich nach der Reaktion alle Sonden geöffnet vor, jedoch ist auf Grund des geringen Anteils an geschlossenen SMART PROBES vor der Reaktion der Fluoreszenzanstieg geringer.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch richtige Wahl der Sonden und der Versuchsbedingungen spezies-spezifische SMART PROBES bereitgestellt werden können, die das Vorhandensein einer spezifischen Zielsequenz erkennen.

#### 4.4.4. FLUORESZENZLEBENSDAUERN

Spektroskopische Eigenschaften von Farbstoffen ändern sich nach Ankopplung an ein Oligonukleotid. Neben einer bathochromen Verschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren werden auch die Fluoreszenzlebensdauern beeinflusst. Nach Kopplung an ein Oligonukleotid erfolgt eine Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer und in den meisten Fällen kann das Abklingverhalten nicht mehr wie bei den reinen Farbstoffen mit einer monoexponentiellen Abklingkurve beschrieben werden. Anhand der Fluoreszenzlebensdauern  $\tau$  können unter anderem Rückschlüsse auf die Struktur eines Hairpins gezogen werden. Die in Tabelle 4-4 aufgeführten Lebensdauern der sechs SMART PROBES weisen ein mehr exponentielles Fluoreszenzverhalten auf, dass befriedigend an ein biexponentielles Modell angepasst werden kann, wobei  $\chi^2 \sim 1$  betrug.

SMART PROBE	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$ [ns]	
	freier Hairpin	hybridisierter Hairpin
SPxenopi1	1,06 [2,02/0,35] (0,12)	2,07 [2,77/0,86] (0,35)
SPxenopi2	1,25 [2,19/0,46] (0,15)	1,86 [2,61/0,72] (0,30)
SPxenopi3	1,00 [1,78/0,36] (0,14)	1,77 [2,64/0,87] (0,25)
SPxenopi4	1,56 [2,34/0,37] (0,19)	2,88 [2,97/0,27] (0,72)
SPxenopi5	1,64 [2,21/0,43] (0,30)	3,14 [3,26/2,75] (0,73)
SPxenopi6	1,32 [1,98/0,48] (0,24)	2,64 [2,92/0,64] (0,61)

Tabelle 4-4: Fluoreszenzlebensdauern der SMART PROBES. Angegeben sind die Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_{av}$  und der Amplitudenanteil  $a_1$  der längeren Komponente:  $\tau_{av} [\tau_1/\tau_2] (a_1)$ .  $\tau_{av} = \tau_1 f_1 + \tau_2 f_2$ , wobei  $f_1 = a_1 \tau_1 / (a_1 \tau_1 + a_2 \tau_2)$ .

Insgesamt wird eine Verkürzung der mittleren Lebensdauer im Vergleich zum freien Farbstoff MR 121 gefunden ( $\tau=1,87$  ns, wässrige Lösung). Von den erhaltenen Lebensdauern ist, verglichen mit der Lebensdauer des freien Farbstoffs, meist eine Komponente  $\tau_1$  länger und die andere Komponente  $\tau_2$  kürzer.

Die lange Lebensdauerkomponente beruht auf der Wechselwirkung mit den Nukleobasen Adenosin, Thymidin und Cytosin, welche elektronenziehend wirken. Durch die Wechselwirkung mit den Nukleobasen wird die dem Wasser zugewandte Oberfläche des Farbstoffs reduziert. Wasser als Umgebungsmolekül erniedrigt die Fluoreszenz langwelliger Oxazine [Sauer 1995].

Die Wechselwirkung mit Guanosin als Elektronendonator führt zu der kurzen Lebensdauerkomponente [Lieberwirth 1998]. Das Ausmaß der Löschung ist vom Abstand zwischen Elektronendonator, hier Guanosin, und Elektronenakzeptor, das Farbstoffmolekül, abhängig. Je besser sich ein koplanarer Komplex zwischen Farbstoff und Guanosin ausbilden kann, desto effektiver ist die SMART PROBE gelöscht [Sauer 1995].

Durch die unterschiedlichen Positionen der Guanosine in den Sekundärstrukturen unterscheiden sich die beiden Lebensdauerkomponenten in unterschiedlichen SMART PROBES. Schlecht gelöschte Sonden besitzen einen geringeren Anteil an kurzer, gelöschter Komponente (SPxenopi5, SPxenopi6) als gut gelöschte SMART PROBES (SPxenopi1, SPxenopi 4). Daraus ergibt sich eine kürzere mittlere Lebensdauer bei effizienter gelöschten Proben.

Als Mechanismus der Fluoreszenzlöschung wird ein photoinduzierter Elektronentransfer angenommen. Betrachtet man die in Acetonitril gemessenen Redoxpotenziale der

2'-Desoxyribonukleoside dA, dC, T und dG, findet man, dass die Nucleobase Guanosen am leichtesten oxidiert wird ( $E_{\text{Red, dA vs SCE}} = -2,76 \text{ V}$ ,  $E_{\text{Red, dC}} [\text{V}] = -2,56 \text{ V}$ ,  $E_{\text{Red, T}} = -2,42 \text{ V}$ ,  $E_{\text{Red, dG}} = < -3,00 \text{ V}$ ). Das heißt Guanosen wirkt am stärksten reduzierend [Kittler 1980, Seidel 1992, Sauer 1995]. Mit Hilfe der Rehm-Weller-Gleichung [Rehm 1969] kann die freie Reaktionsenthalpie abgeschätzt werden, woraus sich ergibt sich, dass Guanosen als einzige Nucleobase in der Lage ist eine Löschung bei MR 121 ( $E_{\text{Red, MR 121}} [\text{V}] = -0,42$ ) zu erzielen.

Nach Reaktion mit komplementärer Gegensequenz erhöht sich die mittlere Lebensdauer. Sowohl die aus der Fluoreszenzlöschung resultierende Komponente  $\tau_2$  als auch die lange Komponente  $\tau_1$  verlängern sich, wobei die Wichtung der langen Komponente zunimmt (steigende  $a_1$  Werte). Nun kommt es zu anderen Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und Guanosen als im geschlossenen Hairpin. Durch Fehlen des direkten Kontakts der Guanosenmoleküle mit dem Farbstoff nach der Hybridisierung an die Gegensequenz kommt es nicht mehr zu einem Elektronentransfer zwischen Guanosen und Farbstoff. Es resultiert eine Abnahme der Fluoreszenzlöschung.

### **4.5. Reaktionen mit natürlichen Sequenzen**

Die Anwendung von SMART PROBES in der klinischen Diagnostik setzt voraus, dass die Sonden nicht nur mit künstlichen, einzelsträngigen Sequenzen reagieren, sondern auch mit doppelsträngigen PCR-Amplifikaten der Mykobakterienspezies die erwünschten Fluoreszenzanstiege erbringen. Um dies zu testen, wurde exemplarisch die beste Sonde SPxenopi4 eingesetzt und mit PCR-Fragmenten der mykobakteriellen 16s rDNA zu Reaktion gebracht (NR. 398 *M.xenopi* sowie Nr. 366 *M.fortuitum*).

#### **4.5.1. PCR-FRAGMENTLÄNGE**

Da PCR-Fragmente aus natürlichen Proben in unterschiedlichen Längen amplifiziert werden können, wurde zunächst untersucht, welche Fragmentlänge sich am besten für Reaktionen mit SMART PROBES eignet.

Mit zunehmender Amplifikatlänge ist eine wachsende Anzahl an Sekundärstrukturen zu erwarten, was einen wesentlichen Einfluss auf die Reaktivität besitzt. Es wurden Fragmente in den Längen von 85 bp bis 600 bp der 16S rDNA amplifiziert, die jeweils die Zielsequenz der SMART PROBE beinhalten.

Die sechs PCR-Fragmente wurden für Hybridisierungsreaktionen herangezogen, welche auf Grund der vorangegangenen Experimente mit künstlichen DNA-Sequenzen bei einer Temperatur von 50°C durchgeführt wurden. Um das doppelsträngig vorliegende PCR-Fragment

zur Reaktion bringen zu können, musste es durch 10 minütiges Denaturieren bei 99°C in Einzelstränge zerlegt werden. Die Reaktion wurde wiederum durch Vorlegen einer  $10^{-8}$  mol/l Lösung von SPxenopi4 durchgeführt, welcher ein zehnfacher Überschuss des jeweiligen PCR-Fragments zugegeben wurde. Als Negativkontrolle diente das PCR-Fragment entsprechender Länge von *M.fortuitum* (Abbildung 4-9).

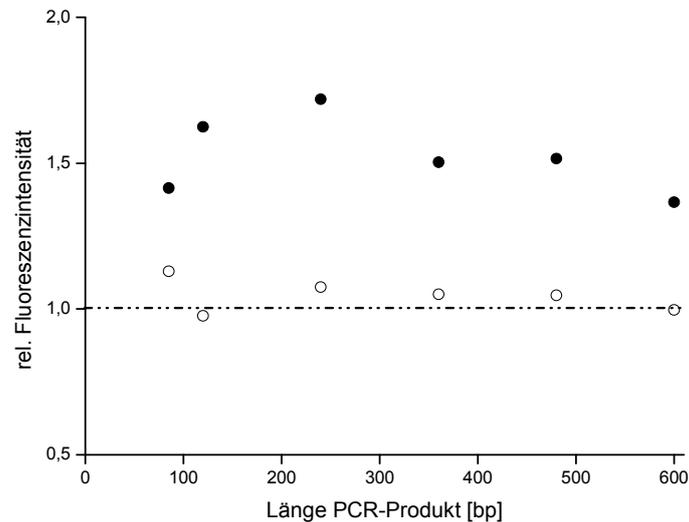


Abbildung 4-9: Relative Fluoreszenzintensität nach Reaktion von SPxenopi4 mit PCR-Fragmenten ( $10^{-7}$  M) unterschiedlicher Länge (85 bp bis 600 bp) von *M.xenopi* (schwarze Kreise) und *M.fortuitum* (weiße Kreise) bei 50°C.

Die Kurven zeigen einen maximalen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einer Zugabe von komplementärer Zielsequenz mit einer Fragmentlänge von 240 bp. Im Vergleich dazu kommt es bei PCR-Fragmenten von *M.fortuitum* zu keinem nennenswerten Anstieg der Fluoreszenz. Während der Abfall der relativen Fluoreszenzintensität bei längeren Fragmenten erwartungsgemäß aus einer höheren Anzahl an möglichen Sekundärstrukturen resultiert, ist der geringe Anstieg der Intensität bei 85 bp und 120 bp nicht geklärt, was Spielraum für eventuelle zukünftige Untersuchungen offen lässt.

In den folgenden Versuchen wurden daher PCR-Fragmente mit 240 bp eingesetzt, um einen maximalen Anstieg der Fluoreszenzintensität zu erreichen.

### 4.5.2. HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUR

Nach den Berechnungen der Sekundärstrukturen mit *mfold* (Abschnitt 1-3) sollte die optimale Temperatur der Reaktion bei etwa 50°C liegen. Um dies experimentell auch mit natürlichen Sequenzen zu bestätigen, wurde die Bindung von SPxenopi4 an ein 240 bp langes PCR-Fragment von *M.xenopi* bei Temperaturen von 20°C bis 60°C getestet. Als Negativkontrolle

wurde abermals das nicht passende PCR-Fragment von *M. fortuitum* verwendet (Abbildung 4-10).

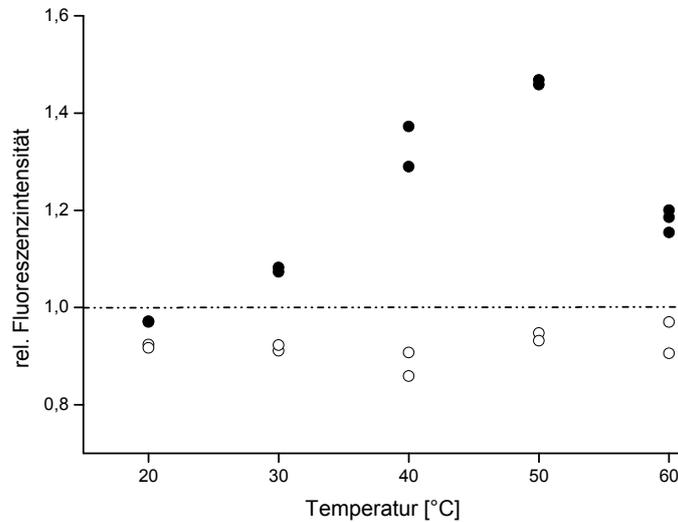


Abbildung 4-10: Relative Fluoreszenzintensität nach Reaktion von SPxenopi4 mit 240 bp PCR-Fragmenten ( $10^{-7}$  M) von *M. xenopi* (schwarze Kreise) und *M. fortuitum* (weiße Kreise) bei Temperaturen zwischen 20°C und 60°C.

Wie schon in den Reaktionen mit künstlichen Gegensequenzen zeigt sich tatsächlich ein Maximum des Fluoreszenzanstiegs bei 50°C. Ab dieser Temperatur ist nach der Modellierung die Anzahl der stabilen Sekundärsequenzen klein, und das Fragment liegt überwiegend ungepaart vor. Wie nach diesem Modell zu erwarten ist, ergibt die Reaktion mit nicht komplementärem PCR-Produkt von *M. fortuitum* gleicher Fragmentlänge über den gesamten Temperaturbereich keinen Anstieg. Der Abfall der Fluoreszenz bei 60°C trotz frei zugänglichem PCR-Fragment ist aus der Struktur der SMART PROBE zu erklären. In der Schmelzkurve erkennt man bei 60°C schon eine leichte Öffnung der Struktur, was eine höhere Quantenausbeute zur Folge hat. Der resultierende Fluoreszenzanstieg bei höheren Temperaturen ist daher geringer.

### 4.5.3. HYBRIDISIERUNGSEFFIZIENZ

Wie effizient und damit vollständig die Hybridisierungsreaktion abläuft wurde bestimmt, indem ein 100 facher Überschuss an 240 bp PCR-Produkt bei 50°C zu der  $10^{-8}$  M SMART PROBE gegeben wurde (Abbildung 4-11).

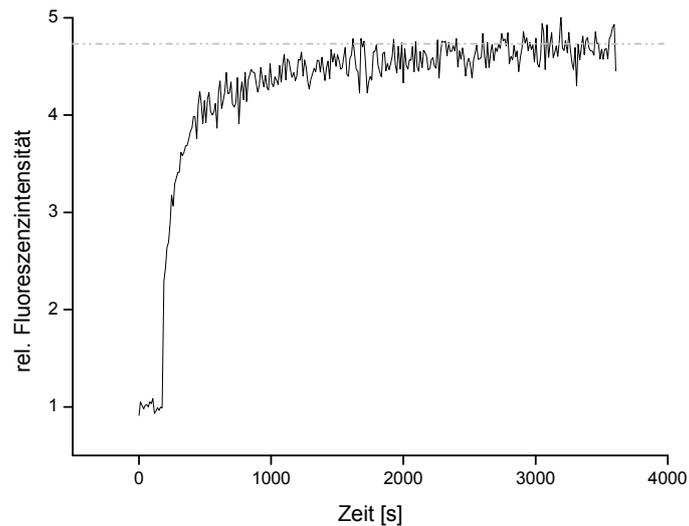


Abbildung 4-11: Anstieg der Fluoreszenzintensität von SPxenopi4 ( $10^{-8}$  M) mit der Zeit nach Zugabe eines 100 fachen Überschusses des 240 bp PCR-Amplicons von *M.xenopi* bei 50°C.

Schon nach den ersten 500 s zeigt sich ein 4,7 facher Anstieg der Fluoreszenzintensität. Betrachtet man die berechnete Effizienz der Sonde, welche sich in der relativen Quantenausbeute widerspiegelt, so ist diese im Verhältnis zu einer Sonde ohne Stamm 0,21. Dies würde bei vollständiger Hybridisierung an die Gegensequenz einen maximalen Anstieg von 4,8 zur Folge haben. Die experimentellen Daten stimmen damit sehr gut überein, woraus man schließen kann, dass mit den gewählten Parametern die Reaktion von SMART PROBES mit PCR-Fragmenten hervorragend funktioniert.

#### 4.5.4. NACHWEISGRENZE

Um einen schnellen Nachweis einer Tuberkuloseerkrankung gewährleisten zu können, wäre es von Vorteil, das Nachweisverfahren amplifikationsfrei durchführen zu können. Daher ist die Nachweisgrenze von natürlichen Sequenzen durch SMART PROBES von höchstem Interesse. Um die Sensitivität von SMART PROBES zu testen, wurde für das PCR-Fragment von *M.xenopi* Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-6}$  M bis  $1 \cdot 10^{-9}$  M die relative Fluoreszenzintensität bei optimalen Versuchsbedingungen ( $50^{\circ}\text{C}$ , 240 bp) bestimmt (Abbildung 4-12).

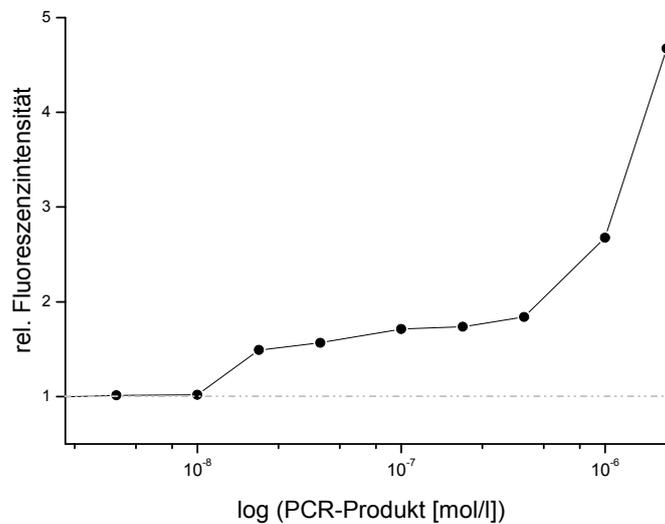


Abbildung 4-12: Relative Fluoreszenzintensität von SPxenopi4 ( $10^{-8}$  M) bei verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-6}$  M bis  $10^{-9}$  M) des 240 bp PCR-Amplicons von *M.xenopi* bei  $50^{\circ}\text{C}$

Die Identifikation des PCR-Amplifikats gelingt bis zu Konzentrationen von  $2 \cdot 10^{-8}$  M. Dies reicht für den direkten Nachweis von Mykobakterien nicht aus, welche in Konzentrationen von ungefähr  $10^{-12}$  M im Sputum vorliegen.

Eine Steigerung in der Sensitivität soll durch einen auf Mikrosphären basierten Ansatz erreicht werden, welcher in Abschnitt 4.8. behandelt wird.

#### 4.6. Spezies-spezifische Identifizierung verschiedener Mykobakterien mittels SMART PROBES

Die Spezifität von SMART PROBES wurde anhand der Sonde SPxenopi4, sowie drei weitere ausgewählter SMART PROBES für die Spezies *M.fortuitum*, *M.avium* und *M.tuberculosis* überprüft. Hierzu wurden die vier Sonden mit 15 Mykobakterienspezies, die im Rahmen der Routinediagnostik am Hygiene Institut der Universität Heidelberg am häufigsten aus Patientematerial isoliert wurden, zur Reaktion gebracht. Die Fragmente wurden alle mit dem Primerpaar 27f/228r in 240 bp Länge mittels PCR amplifiziert.

Die jeweils nicht komplementären Amplifikate enthielten im Bereich der Schleifensequenz des jeweiligen Hairpins unterschiedliche Anzahlen nicht komplementärer Basen (Tabelle 4-5).

Hairpin	Spezifität	Anzahl nicht komplementärer Basen bei unterschiedlichen Spezies	
		minimal	maximal
SPavium	<i>M.avium</i>	3	11
		<i>M.gordonae, M.interjectum, M.intracellulare</i>	<i>M.peregrinum</i>
SPfortuitum	<i>M.fortuitum</i>	3	11
		<i>M.abscessus, M.peregrinum</i>	<i>M.intracellulare</i>
SPxenopi4	<i>M.xenopi</i>	4	12
		<i>M.gastri, M.kansasii</i>	<i>M.peregrinum</i>
SPtuberculosis	MTBC	3	5
		<i>M.fortuitum, M.gastri, M.gordonae, M.interjectum, M.kansasii, M.marinum, M.peregrinum</i>	<i>M.celatum, M.intracellulare, M.xenopi</i>

Tabelle 4-5: Anzahl der Fehlbasen im Bereich der Schleifensequenz der SMART PROBE zu den PCR-Fragmenten der verwendeten Mykobakterien.

Amplifikate mit einer großen Anzahl nicht komplementärer Basen sollte sich gut vom passenden Amplifikat diskriminieren lassen. Wenige Basen sollten zu geringeren Unterschieden in der relativen Fluoreszenzintensität führen.

Um die generelle Anwendbarkeit zur Voraussage von Reaktivität und Spezifität der Sonden mittels theoretischen Berechnungen zu manifestieren, wurden die drei neuen Sonden des NTM Komplexes durch Berechnung mit *mfold* entwickelt. In den dazugehörigen Dot Plots kann man sehr gut erkennen, dass die drei entwickelten Sonden bei großem Anteil von Stamm-Schleife-Strukturen eine hohe Verschiebbarkeit des 3'-Endes gegen das 5'-Ende aufweisen (Abbildung 4-13). Die freien Gibbschen Energien befinden sich im Bereich zwischen -1,5 kcal/mol und -2,1 kcal/mol und sollten somit eine gute Reaktionsfähigkeit bei gelöschter Struktur aufweisen.

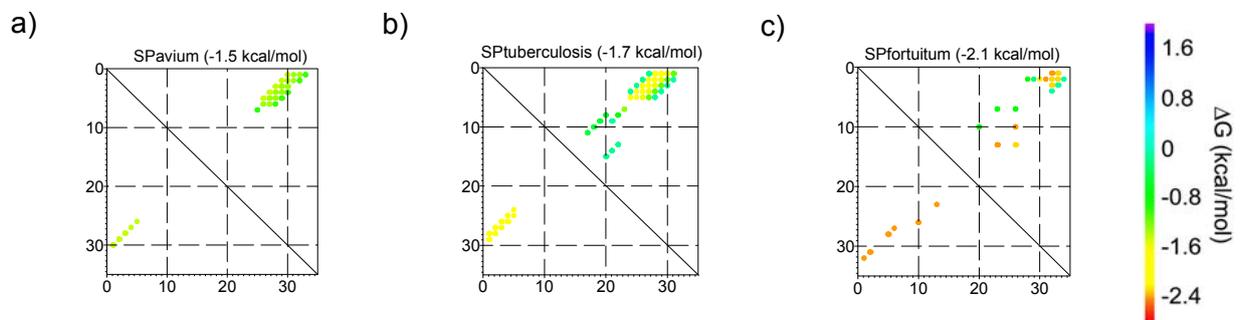
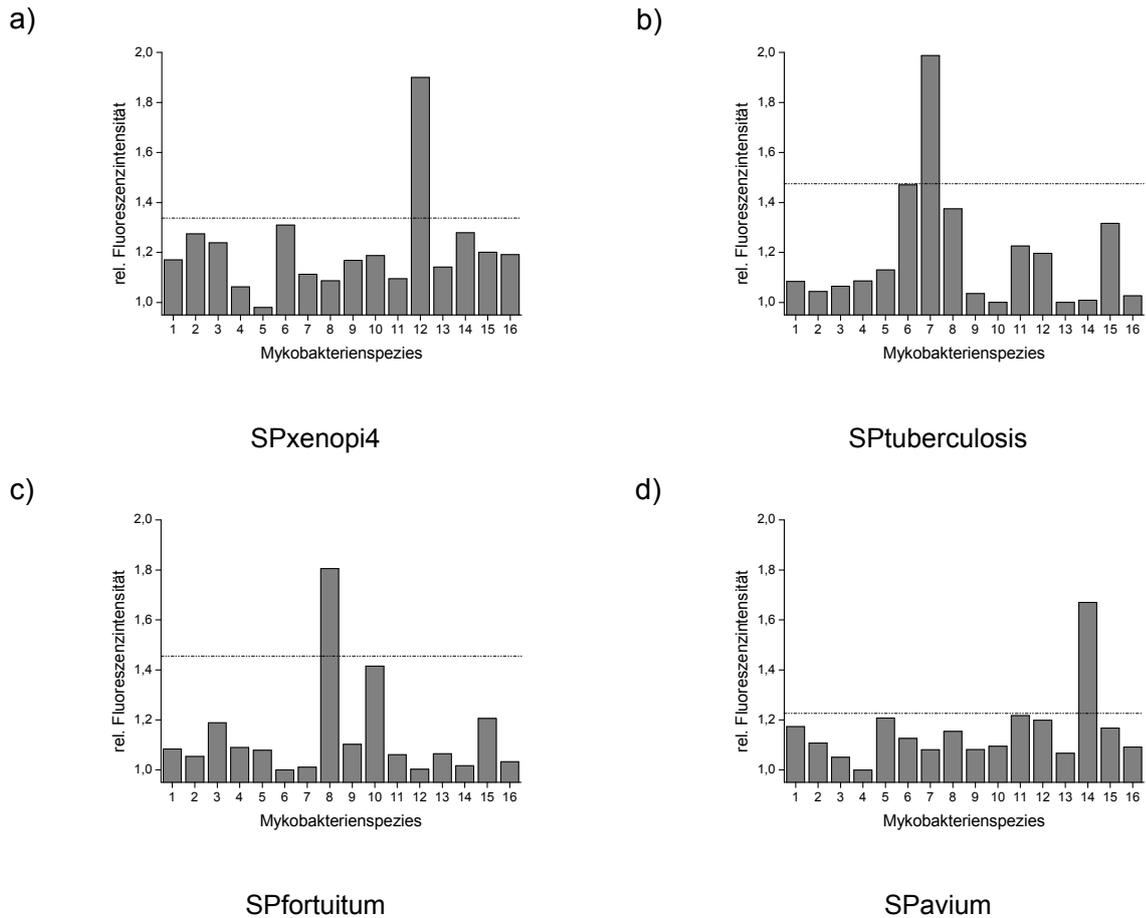


Abbildung 4-13: Dot Plots der SMART PROBES a) SPavium, b) SPtuberculosis und c) SPfortuitum berechnet mit *mfold* bei 50 °C,  $[\text{Na}^+]=300$  mM,  $[\text{Mg}^{2+}]=0$ .

Die vier SMART PROBES wurden, wie in Abschnitt 4.5.6. beschrieben, bei 50°C hybridisiert. Abbildung 4-14 zeigt die relative Fluoreszenzintensität bei Zugabe der 15 unterschiedlichen Mykobakterienspezies.



1 = *M.szulgai*, 2 = *M.kansasii*, 3 = *M.abscessus*, 4 = *M.gastri*, 5 = *M.gordonae*, 6 = *M.celatum*,  
 7 = *M.tuberculosis*, 8 = *M.fortuitum*, 9 = *M.malmoense*, 10 = *M.peregrinum*, 11 = *M.interjectum*,  
 12 = *M.xenopi*, 13 = *M.chelonae*, 14 = *M.avium*, 15 = *M.marinum*, 16 = *M.intracellulare*

Abbildung 4-14: Relative Fluoreszenzintensität von a) SPxenopi4, b) SPtuberculosis, c) SPfortuitum und d) SPavium ( $10^{-7}$  M) nach Hybridisierung mit einem 10 fachen Überschuss an PCR-Amplicons ( $10^{-8}$  M) von 16 verschiedenen Mykobakterien bei  $50^{\circ}\text{C}$ .

Alle eingesetzten Sonden können die zugehörige Mykobakterienspezies durch unterschiedlich starke Fluoreszenzanstiege eindeutig identifizieren. Die manuelle Festlegung eines Grenzwertes der relativen Fluoreszenzintensität erlaubt eine eindeutige Differenzierung der jeweiligen Spezies gegen 15 weitere Arten mit den in Tabelle 4-5 dargestellten Sequenzunterschieden. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Anzahl der Fehlbasen eines PCR-Amplifikats im Bereich der Sondensequenz und dem Anstieg in der Fluoreszenz ist jedoch nicht zu erkennen.

Durch die Optimierung experimenteller Versuchsparameter (Temperatur, Fragmentlänge) ist mit diesem Modellsystem also eine spezies-spezifische und sensitive Identifizierung unterschiedlicher Mykobakterienarten möglich.

#### **4.7. Detektion der Rifampicin Resistenz vermittelnden Mutation S<sup>456</sup>L**

Von höchster Bedeutung für die Diagnostik ist der sichere und gezielte Nachweis von Sequenzen, welche sich in nur einer Nukleobase unterscheiden, so genannter Punktmutationen. Eine der wichtigsten Punktmutationen ist die Rifampicin Resistenz vermittelnde Mutation am Codon S<sup>456</sup>L (TCG → TTG) im *rpoB* Gen von *M.tuberculosis* Isolaten. Durch den Austausch des Cytosins mit Thymin kommt es zu einer Substitution von der Aminosäure Serin durch die Aminosäure Leucin.

Mittels SMART PROBES sollte nun zwischen PCR-Produkten von Rifampicin sensiblen und Rifampicin resistenten Isolaten diskriminiert werden.

Es wurden elf SMART PROBES nach den in Abschnitt 3-3 erwähnten Kriterien berechnet und synthetisiert. Diese besitzen zwischen vier und zehn Basen in der Schleifensequenz und Stämme aus vier oder fünf Nukleotiden (Tabelle 4-6). Die unterstrichene Basenabfolge hybridisiert an die Zielsequenz im *rpoB* Gen. Grau unterlegt sind die Basenunterschiede zwischen resistentem und Wildtypisolat. Diese wurden zunächst mit künstlichen Oligonukleotiden auf Ihre Eignung zur Diskriminierung zwischen Wildtyp und mutationstragender DNA-Sequenzen untersucht.

Auf Grund der Sequenzabfolge der DNA wurden manche dieser Sonden so modelliert, dass das 3'-Ende des Stamms ebenfalls Teile der Zielsequenz beinhaltet und ebenfalls an diese hybridisiert. Somit enthält der Stamm nicht nur G-C Basenpaarungen, sondern auch T-A Paarungen. Nach Berechnung mit *mfold* sollten diese Hairpins dennoch stabil genug sein, um als SMART PROBES eingesetzt zu werden. Zur Verstärkung der Löschung wurde bei den Sonden ein Überhang von drei Thymidinen gewählt. Diese zeigen ebenfalls einen positiven, jedoch geringeren Einfluss auf die Löschung als Guanosin [Heinlein 2003]. Auf einen Guanosinüberhang konnte bei diesen Sonden auf Grund einer dadurch resultierenden zu starken Fluktuationmöglichkeit nicht zurückgegriffen werden.

## Experimente und Ergebnisse

SMART PROBE	DNA-Sequenz 5' – 3'				$T_m$ [°C] <i>mfold</i>	$\Delta G$ (kcal/mol)
S456L_a_10L5S	CCGAC	<u>AGCGCCAACA</u>	GTCGG	TTT	61,9	-1,6
S456L_b_9L5S	CCGAC	<u>GCGCCAACA</u>	GTCGG	TTT	61,2	-1,5
S456L_d_7L5S	CCGAC	<u>GCCAACA</u>	GTCGG	TTT	61,2	-1,5
S456L_d_7L4S	CCCC	<u>GCCAACA</u>	GGGG	TTT	57,9	-0,9
S456L_f_6L5S	CCGAC	<u>CCAACA</u>	GTCGG	TTT	63,9	-1,7
S456L_f_6L4S	CCCC	<u>CCAACA</u>	GGGG	TTT	60,8	-2,2
S456L_g_5L5S	CCGAC	<u>CAACA</u>	GTCGG	TTT	69,6	-2,5
S456L_g_5L4S	CCCC	<u>CAACA</u>	GGGG	TTT	68,9	-1,8
S456L_h_4L5S	CCGAC	<u>AACA</u>	GTCGG	TTT	61,3	-1,4
S456L_h_4L4S	CCCC	<u>AACA</u>	GGGG	TTT	57,7	-0,9
S456L_d <sub>2</sub> _7L5S	CCCCA	<u>TTGGCGC</u>	TGGGG	TTT	60,1	-1,2

Tabelle 4-6: DNA-Sequenz, Schmelztemperatur  $T_m$  und freie Gibbsche Energie  $\Delta G$  der elf SMART PROBES zum Nachweis der Punktmutation S<sup>456</sup>L.

Um eine exakte Erkennung der Sequenzabfolge zu gewährleisten, wurde die Anzahl der Basen in der Haarnadelschleife möglichst kurz gehalten. Das sollte Verhindern, dass eine Hybridisierung trotz Fehlstelle akzeptiert wird, da bei einer kurzen Sequenz solch ein Fehler in der Basenabfolge auf Grund der stärkeren Gewichtung in einer kurzen Schleife weniger toleriert wird. Dadurch ergab sich bei fast allen SMART PROBES nur eine mögliche Sekundärstruktur. Die Gibbschen Energien  $\Delta G$  und die Schmelztemperaturen  $T_m$  lagen bei allen zwischen -1,6 kcal/mol und -1,9 kcal/mol beziehungsweise zwischen 60°C und 70°C, was nach Kapitel 4.3. optimale Voraussetzungen für eine einwandfreie Funktionsweise von SMART PROBES sind. Nur die Forderung nach einem flexiblen Stamm konnte auf Grund des Thymidin-Überhangs nicht gewährleistet werden.

Der Nachweis von Punktmutationen mittels SMART PROBES wurden zuerst mit künstlichen, einzelsträngigen DNA Sequenzen bei Temperaturen zwischen 30°C und 50°C durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen konnten von den elf SMART PROBES nur zwei, S456\_d<sub>2</sub>\_7L5S und S456L\_d\_7L5S, eindeutig zwischen Wildtypsequenz (grau) und mutati-onstragender Sequenz (schwarz) unterscheiden (Abbildung 4-15).

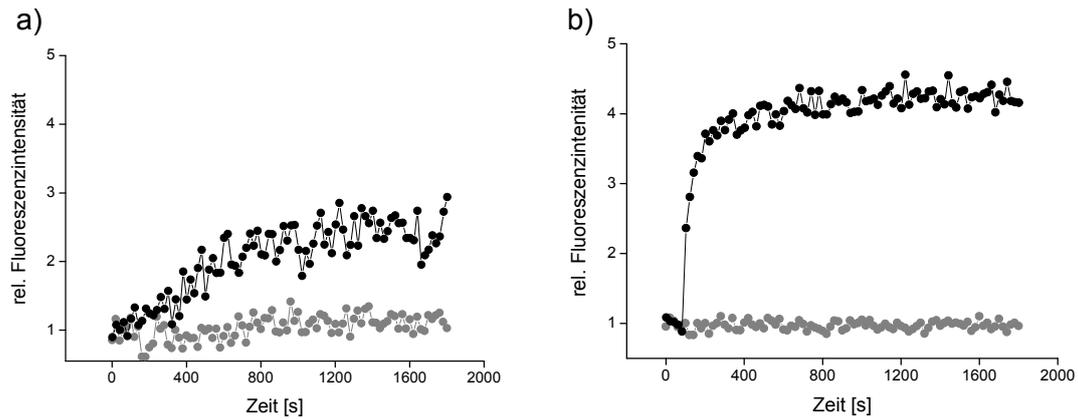


Abbildung 4-15: Anstieg der Fluoreszenzintensität von a) S456L\_d\_7L5S ( $5 \cdot 10^{-8}$  M) und b) S456L\_d₂\_7L5S ( $5 \cdot 10^{-8}$  M) rechts mit der Zeit nach Zugabe eines 100 fachen Überschusses an künstlicher Gegensequenz des Wildtyps (grau) und des mutationstragenden Isolats (schwarz) bei 30°C.

Die SMART PROBES mit den größten Schleifen, und damit die weniger spezifischen, S456L\_a\_10L5S und S456L\_b\_9L5S, zeigten sowohl bei Reaktion mit komplementärer als auch mit Wildtypsequenz einen Anstieg (Abbildung 4-16). Trotz zweier, nach obigen Kriterien, stabiler Sonden ist es diesen nicht möglich, bei Hybridisierung von neun oder zehn Basen der Schleifensequenz eine Fehlstelle eindeutig zu diskriminieren und somit Punktmutationen nachzuweisen.

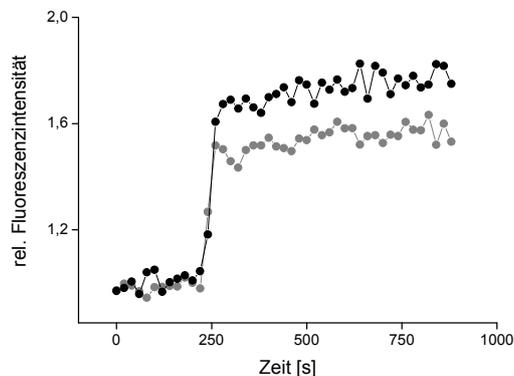


Abbildung 4-16: Anstieg der Fluoreszenzintensität von S456L\_a\_10L5S ( $5 \cdot 10^{-7}$  M) mit der Zeit nach Zugabe eines 100 fachen Überschusses an künstlicher Gegensequenz des Wildtyps (grau) und des mutationstragenden Isolats (schwarz) bei 50°C.

Die Sonden S456L\_f\_6L5S, S456L\_g\_5L5S und S456L\_h\_4L5S führten weder mit komplementärer noch mit Wildtypsequenz zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität (Abbildung 4-17). Die bei diesen Sonden mit sechs, fünf und vier Basen sehr kleine Schleife reagiert nur sehr schwer mit Gegensequenz. Der Energiegewinn bei einer Hybridisierung von vier bis sechs Basen an die komplementäre Zielsequenz, welche aus G-C-Paarungen und T-A-Paaren besteht, überwiegt hier nicht die Energie der geschlossenen Form, welche einen Stamm aus vier G-C-Basenpaarungen und einer A-T-Basenpaarung enthält. Somit reichen weniger als sechs Basen in der Haarnadelschleife nicht aus, um die Struktur durch Hybridisierung an eine Gegensequenz zu öffnen.

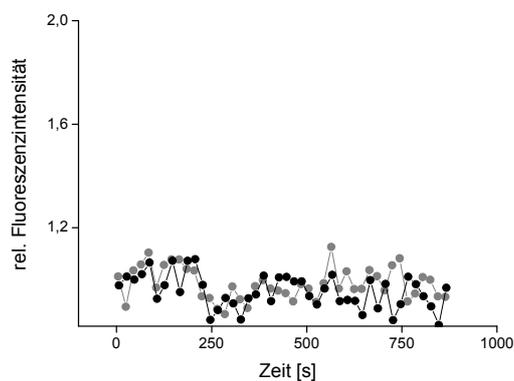


Abbildung 4-17: Anstieg der Fluoreszenzintensität von S456L\_g\_5L5S ( $1 \cdot 10^{-7}$  M) mit der Zeit nach Zugabe eines 100 fachen Überschusses an künstlicher Gegensequenz des Wildtyps (grau) und des mutationstragenden Isolats (schwarz) bei 50°C.

Mit Hilfe der freien Gibbschen Energie kann nur etwas darüber ausgesagt werden, wie stabil eine Struktur ist. Es muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, wie groß der Energieunterschied zwischen geschlossener Sonde bei freier Zielsequenz und an Gegensequenz hybridisierter Sonde ist. Reicht dieser nicht aus, um die Aktivierungsenergie zu überwinden, findet keine Reaktion statt.

Dies wird dadurch belegt, dass die Sonden mit einem vier Basen beinhaltenden Stamm S456L\_d\_7L4S, S456L\_f\_6L4S, S456L\_g\_5L4S und S456L\_h\_4L4S sowohl mit Wildtypsequenz als auch mit mutationstragender Sequenz geöffnet werden. Diese Strukturen sind durch den kurzen Stamm zu instabil, um eine einzelne Mutation in der Sequenzabfolge zu erkennen.

Für SMART PROBES, welche Punktmutationen erkennen sollen, müssen daher sehr viel strengere Auswahlkriterien herangezogen werden. So kann nicht allein durch Berechnung der Gibbschen Energie die Spezifität einer Sonde vorausgesagt werden. Es muss auch die Größe der Haarnadelschleife und die Länge des Stamms betrachtet werden. Eine Haarna-

delschleife mit mehr als acht Basen kann Punktmutationen nicht erkennen. Die bei der Hybridisierung an Sequenzen mit einer Fehlstelle freiwerdende Energie reicht nicht aus, um die Sonde zu öffnen. Ist der Energiegewinn bei der Reaktion zu gering, so dass die Aktivierungsenergie nicht aufgebracht werden kann, findet keine Reaktion statt. Dies ist bei zu kleinen Haarnadelschleifen, wie sie S456L\_f\_6L5S, S456L\_g\_5L5S und S456L\_h\_4L5S besitzen der Fall.

Zur Diskriminierung von Punktmutationen bei doppelsträngigen PCR-Amplifikaten wurde die, in den vorangegangenen Experimenten bewährte SMART PROBE S456\_d<sub>2</sub>\_7L5S, eingesetzt. Ein 159 bp langes PCR-Amplifikat und ein 790 bp umfassendes Amplifikat der mutationstragenden Sequenz und der Wildtypsequenz wurden hierfür hergestellt. Die Durchführung der Reaktionen fand analog zu den Ergebnissen vorangegangener Experimente mit Mykobakterien-PCR statt, indem das PCR-Produkt 5 Minuten bei 99°C denaturiert wurde, bevor es nach dem Abkühlen im 100 fachen Überschuss mit der SMART PROBE zur Reaktion gebracht wurde (Abbildung 4-18).

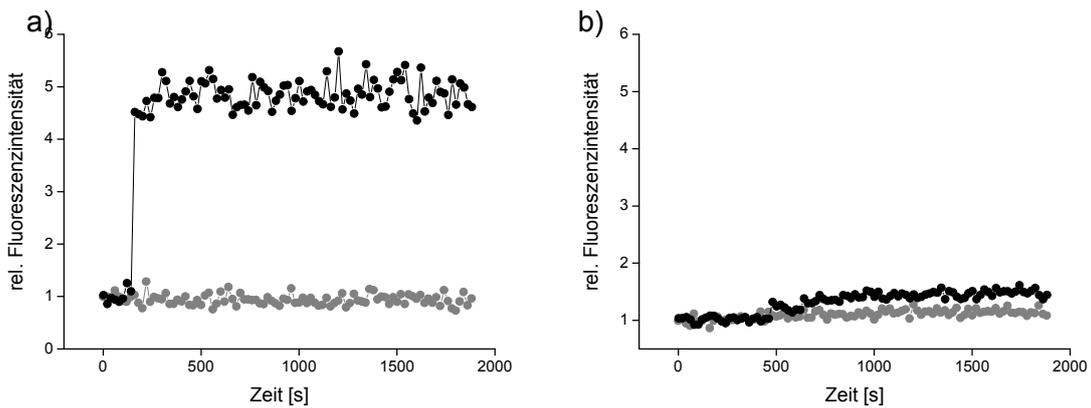


Abbildung 4-18: Anstieg der Fluoreszenzintensität von S456L\_d<sub>2</sub>\_7L5S (5 · 10<sup>-7</sup> M) mit der Zeit nach Zugabe eines 100 fachen Überschusses an a) 157 bp und b) 790 bp PCR-Amplifikats des Wildtyps (grau) und des mutationstragenden Isolats (schwarz) bei 50°C.

Mittels der SMART PROBE S456\_d2\_7L5S war es möglich, die Wildtypsequenz von der mutationstragenden Sequenz mit der S<sup>456</sup>L Mutation bei *M.tuberculosis* zu unterscheiden. Jedoch sollte, wie bei den Versuchen mit anderen Mykobakterienspezies des NTM Komplexes, ein möglichst kurzes Amplifikat gewählt werden. Bei einer Länge von 157 bp ist mit einem 4,7 fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität ein eindeutiger Nachweis möglich, während das 790 bp lange Amplifikat zu einem sehr geringen, 1,5 fachen Anstieg führt. Auch hier dürften zahlreicheren Sekundärstrukturen bei längeren Fragmenten dafür verantwortlich sein, dass die Hybridisierungsregion für die SMART PROBE nicht frei zugänglich ist.

Erstmals konnte also in diesen Arbeiten die Diskriminierung von Punktmutationen mittels PCR-Amplifikat unter Verwendung von SMART PROBES gezeigt werden.

### **4.8. Anwendung der SMART PROBES auf Mikrosphären**

Homogene Untersuchungsmethoden erfahren häufig eine Begrenzung hinsichtlich ihrer Nachweisgrenze. Obwohl neue Methoden, wie beispielsweise die Einzelmolekülspektroskopie, die Nachweisgrenzen um ein vielfaches erniedrigen, können auch alternative, weniger aufwändige, heterogene Methoden die Empfindlichkeit eines Systems steigern.

Die Anwendung der SMART PROBES auf Mikrosphären stellt eine weitere Möglichkeit zur Detektion spezifischer Zielsequenzen dar. Hierbei wird das Fluoreszenzsignal ohne Einzelmolekülempfindlichkeit einfach und schnell ausgelesen. Durch die Fluoreszenzlöschung im geschlossenen Zustand kann bei dieser Methode die Empfindlichkeit im Vergleich zu anderen, heterogenen Verfahren durch Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz drastisch erhöht werden. Diese Methode beruht auf der Immobilisierung biotinylierter DNA-Sequenzen an streptavidinbeschichteten Silicakügelchen (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN) und anschließender Inkubation mit komplementärer DNA-Sequenz. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung des Signals an der Oberfläche.

Die streptavidinbelegten Kügelchen werden mit biotinyliertem Oligonukleotid zur Reaktion gebracht, welches sofort an das Streptavidin bindet. Dieses Oligonukleotid fungiert entweder als nachzuweisende Zielsequenz (Abbildung 4-19 a: konventionelle Nachweis), oder es erfüllt die Aufgabe eines Verbindungsstücks, welches ein weiteres Oligonukleotid bindet (Abbildung 4-19 b: Sandwich Nachweis). Bei Zugabe der SMART PROBE hybridisiert diese an ihre komplementäre Zielsequenz und öffnet sich. Binnen weniger Minuten reichern sich die Kügelchen auf Grund der Schwerkraft am Boden der Mikrotiterplatte an. Die Reaktion kann anhand der Fluoreszenzintensität der Kügelchen einfach und schnell mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Eine weitere Möglichkeit liegt darin, die SMART PROBE direkt an das Kügelchen zu binden (Abbildung 4-19 c: Inverser Nachweis). Bei diesem inversen Nachweis kommt man, wie bei Ansatz a, mit nur zwei Oligonukleotiden, der Zielsequenz und dem Hairpin, aus. Der Vorteil läge darin, dass die Zielsequenz ohne weitere Modifikationen direkt eingesetzt werden könnte. Diese Methode ist jedoch nicht praktikabel, da sich oberflächengebundene SMART PROBES unspezifisch öffnen. Um dies zu verhindern, müsste die Oberfläche aufwändig modifiziert werden, beispielsweise mit Polyethylenglycol (PEG) [Piestert 2003].

Die drei Anwendungsmöglichkeiten sind in Abbildung 4-19 dargestellt.

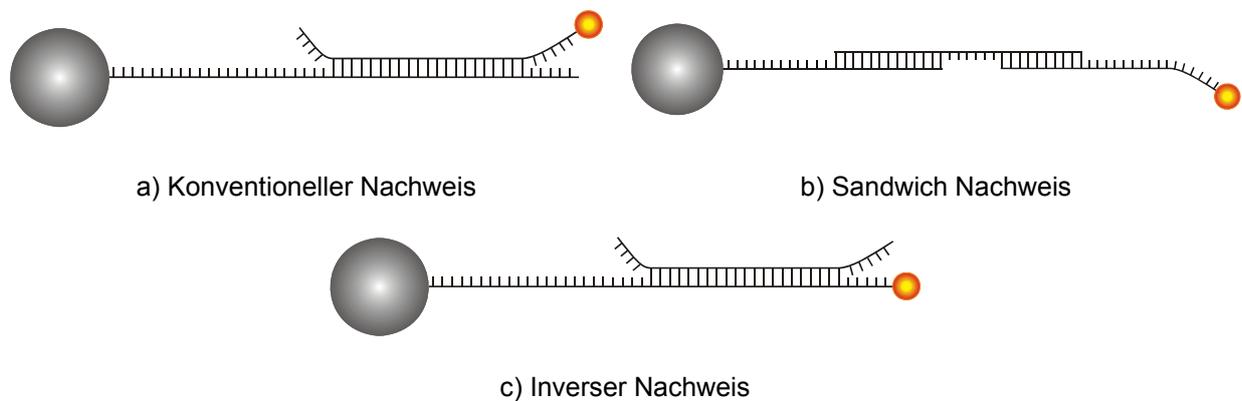


Abbildung 4-19: a) Konventioneller Nachweis mit SMART PROBES; b) Sandwich Nachweis mit SMART PROBES; c) Inverser Nachweis mit SMART PROBES.

### 4.8.1. DIE ZWEI VERWENDETEN SYSTEME

Bei dem konventionellen Nachweis werden zwei Oligonukleotide eingesetzt. Eines trägt die zu detektierende Basenabfolge. Das zweite trägt die dazu komplementäre Sequenz. Letzteres dient als Sonde und ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Aus früheren Untersuchungen [Stöhr 2004] geht hervor, dass als Sonde idealer Weise eine SMART PROBE eingesetzt wird. Hier tritt im Vergleich zu einem linearen Oligonukleotid eine erhebliche Verringerung der unspezifischen Fluoreszenz auf. Die Nachweisgrenze kann durch diese Methode um ein bis zwei Größenordnungen erhöht werden. Abbildung 4-20 stellt die Funktionsweise dieser Methode dar.

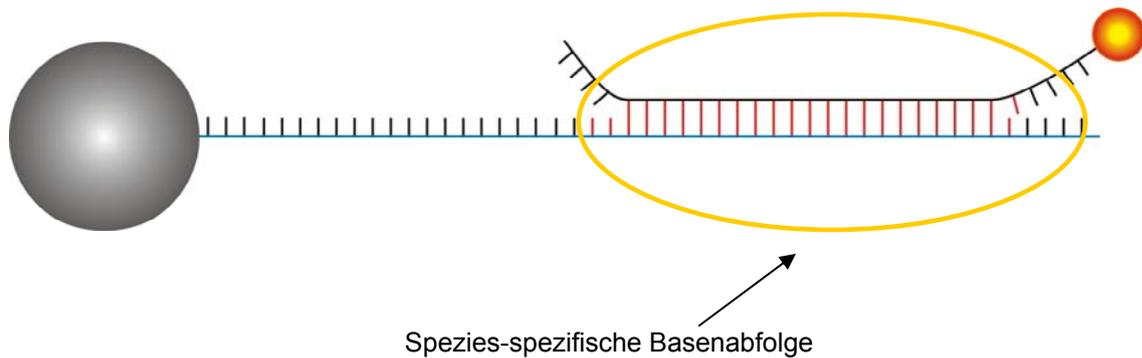


Abbildung 4-20: Konventionelles Nachweissystem. Rot dargestellt sind die Basen der nachzuweisenden Sequenz und die Basen des dazu komplementären Teils der SMART PROBE. Blau dargestellt das Phosphatrückgrat der Zielsequenz, schwarz dargestellt das Phosphatrückgrat der SMART PROBE.

Blau hervorgehoben ist das Phosphatrückgrat des zu detektierenden Oligonukleotids. Dieses ist über ein Biotinmolekül (nicht dargestellt) kovalent an die Glaskugel gekoppelt. Die rot gezeichneten Nukleotide stellen den variablen Bereich der Sequenz dar. Dieser ist die Zielregion, an welche die SMART PROBE mit ihren komplementären Basen (rot) hybridisiert.

Eine Einschränkung erfährt dieses System durch die Biotinmarkierung, welche zur Ankopplung an die Kugeloberfläche nötig ist. PCR-Produkte müssten für diesen Nachweis mit einem biotinyliertem Primer amplifiziert werden. Des Weiteren kann nur eine Spezies von Mykobakterien in einem Ansatz detektiert werden.

Hier könnte das Sandwich System von Vorteil sein (Abbildung 4-21). Bei diesem Verfahren wird an zwei Sequenzabschnitten des nachzuweisenden Oligonukleotids hybridisiert (blaues Phosphatrückgrat). Ein Sequenzabschnitt wird durch die SMART PROBE nachgewiesen (rote Basen), der andere über ein Oligonukleotid, welches über eine kovalente Biotin-Streptavidin-Bindung an das Kügelchen gekoppelt ist (grüne Basen). Der Vorteil dieses Systems wäre zum einen, dass unmodifizierte PCR-Produkte ohne Biotinbindungsstelle eingesetzt werden könnten, zum anderen können mehrere Spezies eines Genus gleichzeitig nachgewiesen werden. So wurde der konservierte Bereich des Genus *Mycobacterium*, welcher durch die grüne Basenabfolge verdeutlicht wird, gleichzeitig neben unterschiedlichen Spezies (*M.xenopi*, *M.tuberculosis*, *M.avium* etc.) nachgewiesen.

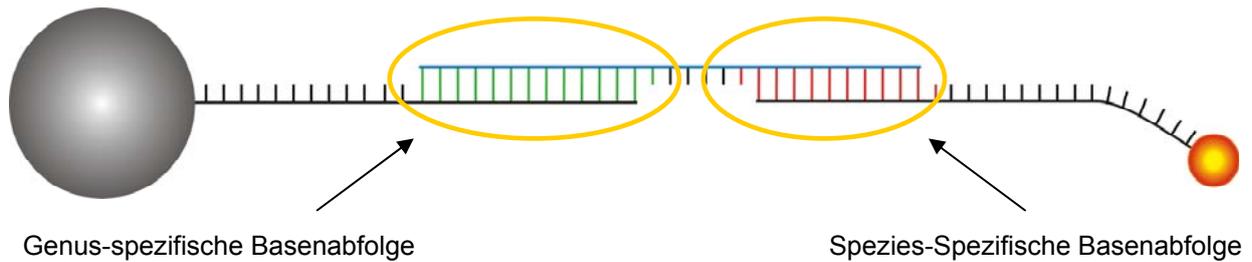


Abbildung 4-21: Sandwich Nachweis. Rot die spezies-spezifische Basenabfolge, grün die genus-spezifische Basenabfolge. Das blaue Phosphatrückgrat stellt das nachzuweisende PCR-Amplifikat dar.

#### 4.8.2. REAKTIONEN MIT KÜNSTLICHEN SEQUENZEN ZUR OPTIMIERUNG DES VERFAHRENS

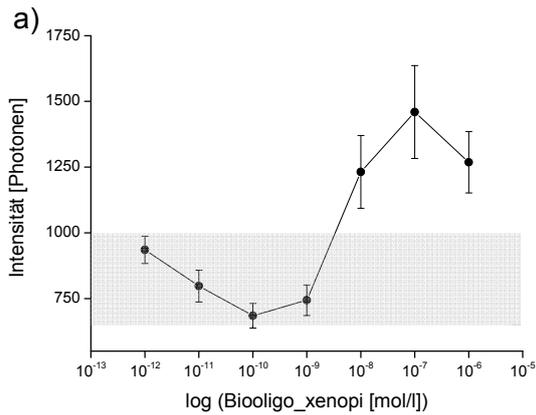
Für die Wahl der optimalen Versuchsbedingungen wurde auf vorhandene Arbeiten zurückgegriffen [Stöhr 2004].

Um eine Belegungsdichte der Oberfläche zu erhalten, die hoch genug ist, um für die computergestützte Auswertung eine gute Statistik zu ermöglichen, wurde mit 0,5 µl der Kügelchen-Stocklösung pro Ansatz gearbeitet. Dies entspricht ungefähr  $3 \cdot 10^5$  Kügelchen. Bei dieser Konzentration findet noch keine Überlagerung der Kügelchen statt, welche zu Schwierigkeiten bei der Auswertung führen würden. Dies führt beim Arbeiten in 384 Kammer Platten zu einer Belegung der Oberfläche mit Kugeln von ca. 25%, wobei jede Kammer eine Grundfläche von 10,69 mm<sup>2</sup> besitzt.

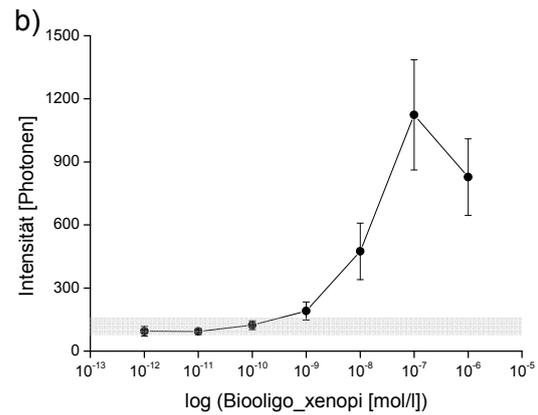
Um die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens zu testen, wurden zuerst Versuche mit künstlichen Sequenzen durchgeführt.

##### *Der Konventionelle Nachweis*

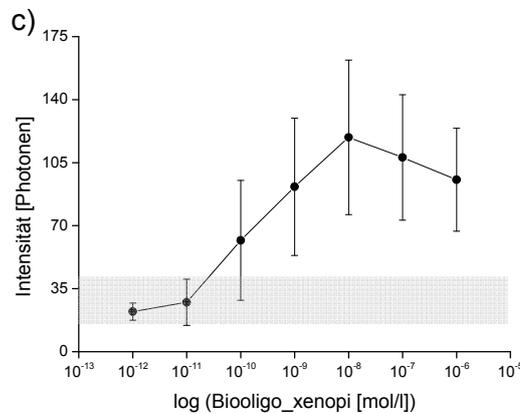
Im konventionellen System wurde hierzu die Konzentration der DNA, welche an die Kügelchen gekoppelt ist und daher ein Biotinmolekül trägt, bei konstanter SMART PROBE Konzentration variiert (Abbildung 4-22). Als SMART PROBE diente die schon in Ensemblemessungen bewährte SPxenopi4. Die verwendete, 120 Basen lange Gegensequenz Biooligo\_Xenopi, trägt am 5'-Ende ein Biotinmolekül. Für dieses Oligonukleotid konnte nicht auf ein 240 bp langes Fragment zurückgegriffen werden, welches optimale Voraussetzungen für die Reaktion liefern sollte. Oligonukleotide dieser Länge sind synthetisch kaum zugänglich.



$c(\text{SPxenopi4})=10^{-7} \text{ mol/l}$



$c(\text{SPxenopi4})=10^{-8} \text{ mol/l}$



$c(\text{SPxenopi4})=10^{-9} \text{ mol/l}$

Abbildung 4-22: Titrationskurven des Bioligo\_xenopi bei Konzentrationen der SPxenopi4 von a)  $10^{-7}$ , b)  $10^{-8}$  und c)  $10^{-9}$  mol/l. Grau schraffiert ist der Bereich der Hintergrundfluoreszenz.

Die Titrationskurven in Abbildung 4-22 stellen die Intensität der Gesamtfluoreszenz über der Konzentration des biotinylierten Oligonukleotids Bioligo\_xenopi dar. Jede der drei Kurven verläuft über einen Maximalwert zu einem konstanten Bereich der Hintergrundfluoreszenz. Die Ergebnisse der Titrationsen sind in Tabelle 4-7 zusammengefasst.

Der Fehler ergibt sich aus der Standardabweichung der Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten von unterschiedlichen Messungen.

Konz. SMART PROBE [mol/l]	Maximale Fluoreszenz bei c(Biooligo_xenopi) [mol/l]	Nachweisgrenze [mol/l]
$10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-9}$
$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-10}$

Tabelle 4-7: Konzentrationen des Biooligo\_xenopi, bei denen die Fluoreszenz maximal ist, Nachweisgrenze des Biooligo\_xenopi; jeweils bei konstanter SMART PROBE Konzentration von  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  mol/l.

Das Nachweisverfahren wird demnach umso sensitiver, je geringer die Konzentration an SMART PROBE ist.

Je nach Ausgangskonzentration der SMART PROBE ist eine computergestützte Auswertung bis zu einer minimalen Konzentration von  $10^{-10}$  mol/l möglich. Bei niedrigeren Konzentrationen gehen die Kurven in einen Bereich konstanter Hintergrundfluoreszenz über. Dieser untere Grenzwert kommt durch ein unspezifisches Öffnen der SMART PROBE an der Oberfläche der Glaskugel zustande. In den Abbildungen wird er durch die grau schraffierte Fläche angedeutet. Dieser Bereich wird durch Betrachtung der zugehörigen Fluoreszenzbilder der Blindproben festgelegt. Der Abfall der Fluoreszenzintensität bei hohen Konzentrationen der biotinylierten Sequenz ist darin begründet, dass es bei hoher Belegung der Kügelchen mit biotinylierter Sequenz zu sterischen Hinderungen kommt. Dadurch wird die Kopplung von zusätzlicher biotinylierter Sequenz an die Kugeloberfläche unterbunden. Ebenso ist aufgrund der starken sterischen Blockierung die Hybridisierung der biotinylierten Sequenz mit dem Hairpin erschwert.

Eine Reduzierung der Konzentration der SMART PROBE erhöht die Empfindlichkeit des Systems. Da bei geringeren Konzentrationen von SMART PROBE weniger unspezifische Öffnungen an der Oberfläche stattfinden können, wird die Hintergrundfluoreszenz verringert. Somit ist ein sensitiverer Nachweis an Zielsequenz möglich. Die nicht dargestellte Titrationsreihe bei einer Sondenkonzentration von  $10^{-10}$  mol/l zeigt jedoch, dass diese nicht beliebig tief gesenkt werden kann. Die Fluoreszenzintensität bei Konzentrationen die kleiner sind als  $10^{-9}$  mol/l ist zu gering, um sie noch computergestützt auswerten zu können.

Für optimale Versuchsbedingungen mit dem konventionellen Ansatz sollte die Konzentration der SMART PROBE bei  $10^{-8}$  oder  $10^{-9}$  mol/l liegen. Dies ermöglicht eine eindeutige Signaldetektion mit Computerprogrammen bis zu Konzentrationen der Zielsequenz von  $10^{-8}$  mol/l. Bei einer Konzentration des Hairpins die höher ist als  $10^{-7}$  mol/l wird die Detektion durch vermehrte unspezifische Fluoreszenz der SMART PROBE, welche an der Oberfläche der Kügel-

chen adsorbieren, erschwert. Bei Konzentrationen unter  $10^{-10}$  mol/l hebt sich das Fluoreszenzsignal nicht stark genug vom Hintergrund ab. Eine Auswertung mit dem verwendeten Computerprogramm ist daher nicht mehr möglich.

Beim Betrachten der Aufnahmen erscheint das Nachweisverfahren durchaus sensitiver als die computergestützte Auswertung vermuten lässt. Mit dem Auge lässt sich, bei einer Konzentration der SMART PROBE von  $10^{-8}$  mol/l, noch deutlich die Fluoreszenz bei einer Konzentration des Biooligo\_xenopi von  $10^{-12}$  mol/l erkennen (Abbildung 4-23, c). Diese Diskrepanz zwischen computergestützter Auswertung und Betrachtung der Bilder lässt Möglichkeiten zur Optimierung der Software offen.

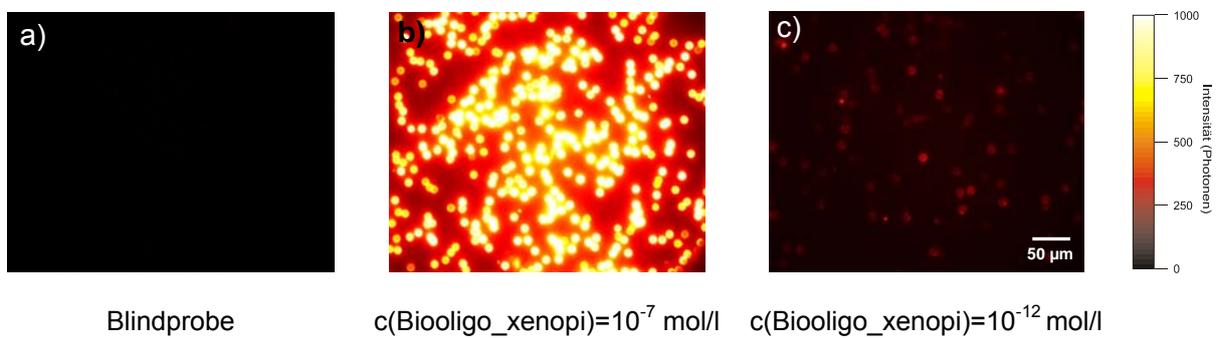


Abbildung 4-23: Aufnahmen der K ugelchen bei unterschiedlicher Oligokonzentration a) 0, b)  $10^{-7}$ , c)  $10^{-12}$  mol/l;  $c(\text{SPxenopi4})=10^{-8}$  mol/l.

Der Sandwich Nachweis

Von größerer praktischer Bedeutung ist allerdings das oben beschriebene Sandwich System. Zum einen muss die Zielsequenz kein Biotinmolekül tragen, wodurch PCR-freie Nachweisverfahren möglich wären. Zum anderen können mehrere Spezies eines Genus gleichzeitig durch SMART PROBES, welche unterschiedliche Farbstoffe tragen detektiert werden. Beispielsweise kann neben dem Genus *Mycobacterium* die Spezies *M.tuberculosis* nachgewiesen werden.

Auch für dieses Verfahren mussten anhand des künstlichen Systems die optimalen Versuchsparameter festgelegt werden. Mehrere Kriterien waren hier zu berücksichtigen. Neben der Konzentration des biotinylierten Oligonukleotids, welches an das Kügelchen bindet, kann die Konzentration der SMART PROBE und die des dritten Oligonukleotids, welches die zu detektierende Sequenzenfolge trägt, verändert werden.

Für die Untersuchung wurde der variable Bereich zwei der hypervariablen Regionen der 16S rDNA herangezogen. In dieser Sequenzabfolge sollte sowohl die Spezies *M.xenopi* als auch die Spezies *M.tuberculosis* mittels SMART PROBE erkannt werden. Für den Nachweis der Spezies *M.xenopi* wurde die SMART PROBE SPxenopi4, in Kombination mit Biooligo\_sand\_xen und Gegen\_xenopi verwendet (Abbildung 4-24, a). Zur Detektion der spezies-spezifischen Sequenz von *M.tuberculosis* diente die Sonde SPtuberculosis zusammen mit Biooligo\_sand\_tub und Gegen\_tuberculosis (Abbildung 4-24, b).

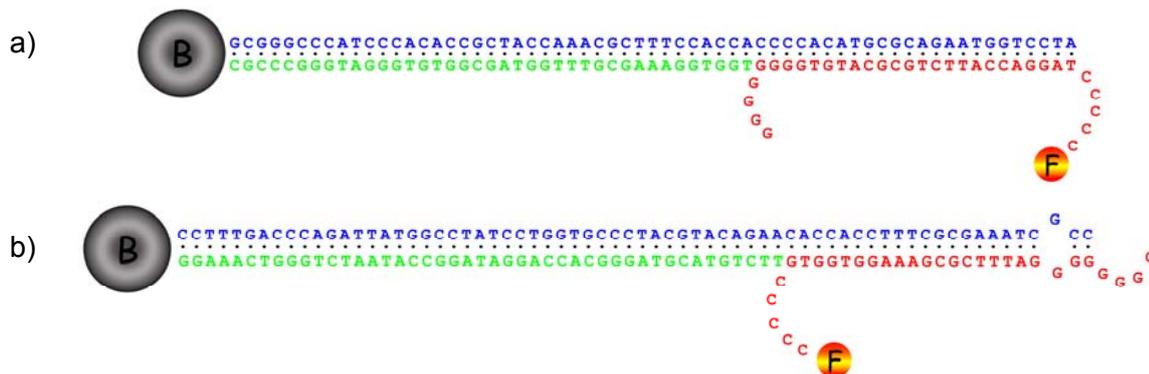


Abbildung 4-24: Mit *mfold* berechnete Struktur der hybridisierten Sandwich Systeme zum Nachweis von *M.xenopi* (a) und *M.tuberculosis* (b). Grün: biotinylierte Sequenz, blau: 120 bp Oligonukleotid, rot: SMART PROBE.

Zunächst wurden zur Bestimmung der Nachweisgrenze die Zielsequenzen Gegen\_xenopi beziehungsweise Gegen\_tuberculosis in Konzentrationen von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l titriert. Die Konzentration von biotinylierter Sequenz und SMART PROBE wurden konstant im Verhältnis 1:1 gehalten. Sie wurden in den Konzentrationen  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M und  $10^{-10}$  M eingesetzt. Abbildung 4-25 zeigt exemplarisch das Verhalten des Systems bei einer Konzentration von SMART PROBE und biotinylierter Sequenz von  $10^{-8}$  M. Zur besseren bildlichen Darstellung wurden unterschiedliche Intensitätsskalen verwendet.

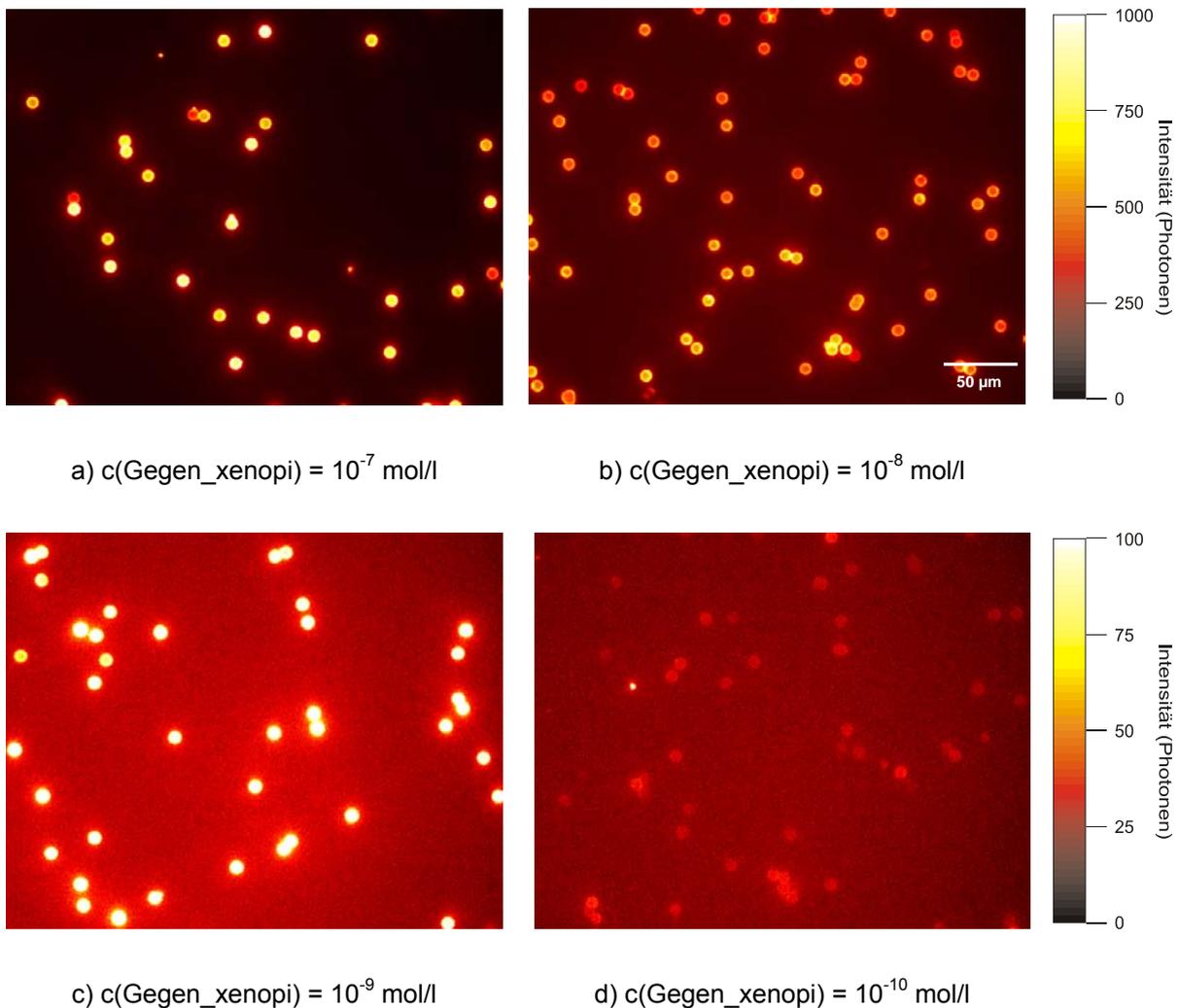
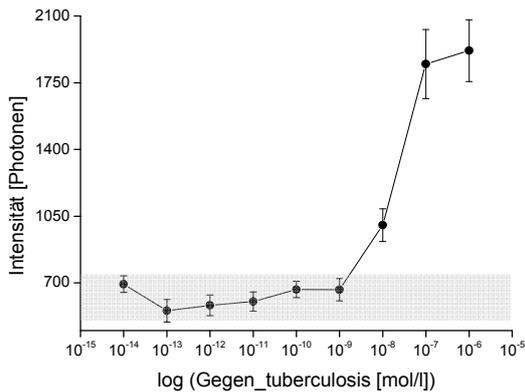


Abbildung 4-25 Nachweis von Gegen\_xenopi bei Konzentrationen von a)  $10^{-7}$  mol/l, b)  $10^{-8}$  mol/l, c)  $10^{-9}$  mol/l und d)  $10^{-10}$  mol/l; Konzentration SPxenopi4 und Biooligo\_sand\_xen =  $10^{-8}$  mol/l.

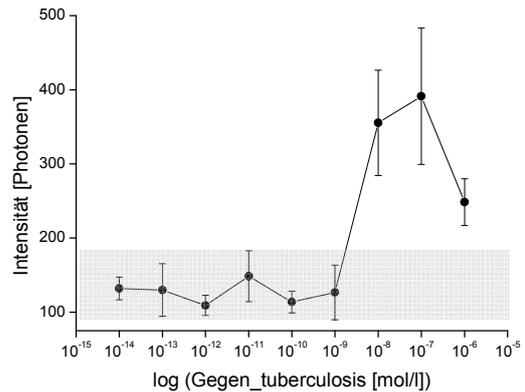
In den Abbildungen können künstliche, einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen bis zu Konzentrationsbereichen von  $10^{-10}$  mol/l nachgewiesen werden. Bei geringeren Konzentrationen (nicht dargestellt) sind keine eindeutigen Fluoreszenzsignale zu erkennen.

In Abbildung 4-26 sind exemplarisch die Titrationskurven für das System zum Nachweis von *M.tuberculosis* bei gleicher Konzentration von SPtuberculosis und Biooligo\_sand\_tub ( $10^{-7}$  bis  $10^{-9}$  mol/l) dargestellt. Grau schraffiert ist der Bereich der Hintergrundfluoreszenz.

a)

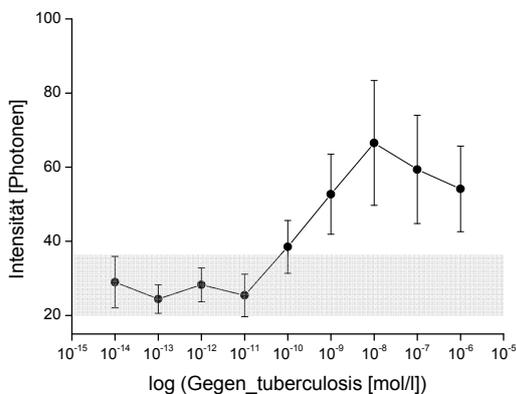


b)

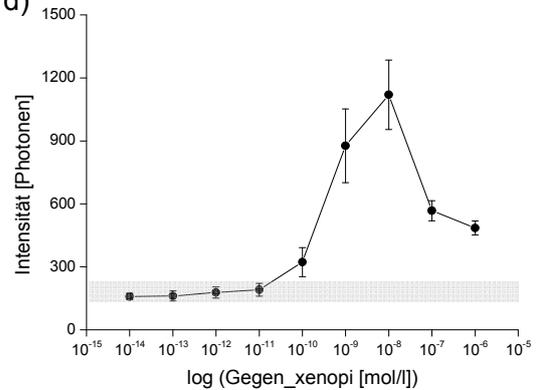


c(SPtuberculosis)=c(Biooligo\_sand\_tub)= $10^{-7}$  mol/l    c(SPtuberculosis)=c(Biooligo\_sand\_tub)= $10^{-8}$  mol/l

c)



d)



c(SPtuberculosis)=c(Biooligo\_sand\_tub)= $10^{-9}$  mol/l    c(SPxenopi)=c(Biooligo\_sand\_xenopi)= $10^{-8}$  mol/l

Abbildung 4-26: Kurven der Titration von Gegen\_tuberculosis in Konzentrationen von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l bei konstanter Konzentration der Oligonukleotide SPtuberculosis und Biooligo\_sand\_tub a)  $10^{-7}$  mol/l b)  $10^{-7}$  mol/l c)  $10^{-9}$  mol/l. d) Titrationskurve von Gegen\_xenopi von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l bei Konzentration der Oligonukleotide SPxenopi und Biooligo\_sand\_xenopi von  $10^{-8}$  mol/l. Grau schraffiert der Bereich der Hintergrundfluoreszenz.

Da die Intensität der Aufnahmen bei Konzentrationen der SMART PROBE und des biotinylierten Oligonukleotids von  $10^{-10}$  mol/l zu gering zur Auswertung mit dem Computer ist, werden diese nicht dargestellt.

Die Fluoreszenz der Kügelchen erreicht jeweils ihr Maximum bei einer Konzentration an Gegensequenz, welche um eine Zehnerpotenz höher liegt als die Konzentration von SMART PROBE und biotinyliertem Oligonukleotid. Tabelle 4-8 fasst die Ergebnisse der Titrationsreihen von Gegen\_xenopi und Gegen\_tuberculosis zusammen.

Konz. SMART PROBE/Biot. Oligo [mol/l]	Maximale Fluoreszenz bei c(Gegen_tub) [mol/l]	Nachweisgrenze Gegen_tub [mol/l]	Maximale Fluoreszenz bei c(Gegen_xenopi) [mol/l]	Nachweisgrenze Gegen_xenopi [mol/l]
$10^{-7}$	$10^{-5}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-11}$
$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-10}$	-	-

Tabelle 4-8: Ergebnisse der Titrations der Gegensequenzen Gegen\_tuberculosis und Gegen\_xenopi bei konstanten Konzentrationen an SMART PROBE und biotinyliertem Oligonukleotid ( $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  mol/l). Bilder bei  $10^{-9}$  mol/l für *M.xenopi* nicht mehr auswertbar.

Abermals ist das Nachweisverfahren bei niedrigen Konzentrationen an SMART PROBE und biotinylierter Sequenz sensitiver.

Der Abfall der Fluoreszenzintensität bei Konzentrationen, die höher sind als die der SMART PROBES und der biotinylierten Oligonukleotide, lässt sich in theoretischen Überlegungen zu der Struktur des Sandwich-Systems erklären. Dasselbe gilt für den Abfall der Fluoreszenzintensität zu niedrigeren Konzentrationen hin. Geringe Fluoreszenzintensitäten bei hohen Konzentrationen an Zielsequenz kommen zustande, da alle SMART PROBES (rot) an Zielsequenz (blau) hybridisieren. Ebenso sind die an das Kügelchen gebundenen Oligonukleotide (grün) vollständig durch Zielsequenz (blau) abgesättigt (Abbildung 4-27).

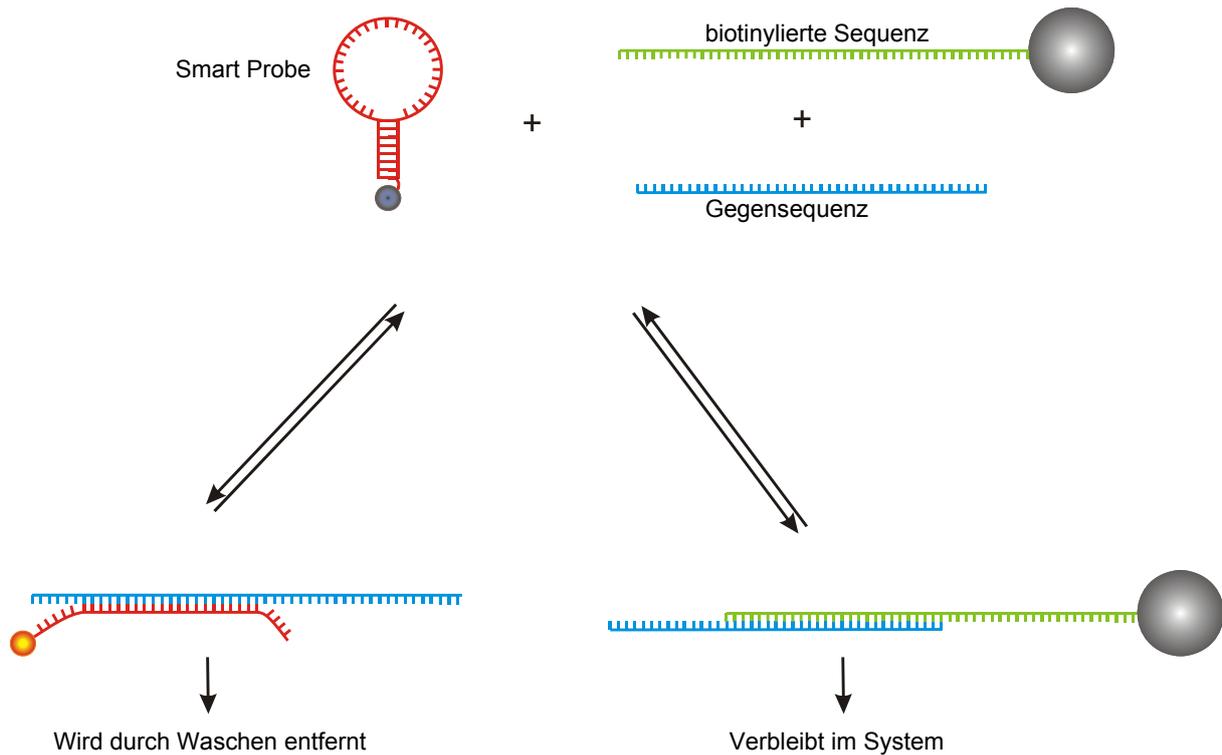


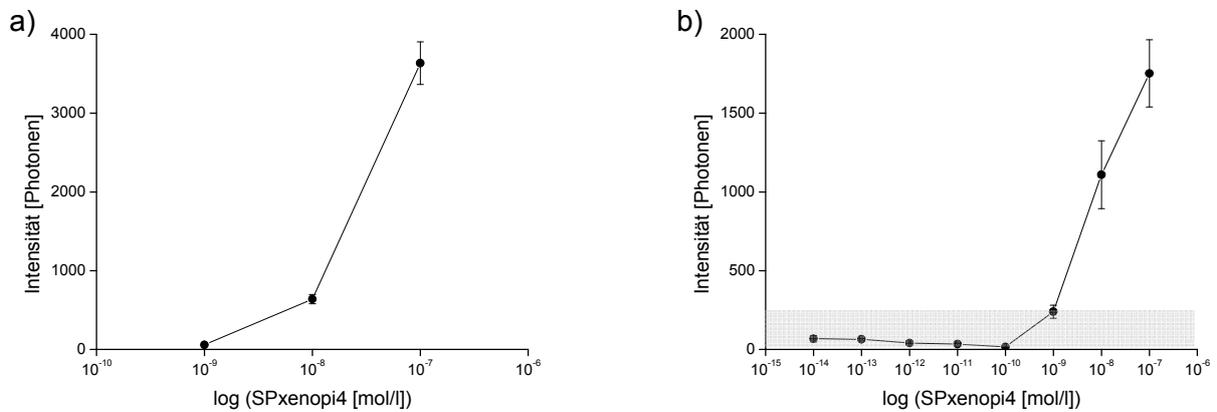
Abbildung 4-27: Gleichgewicht von SMART PROBE, Gegensequenz und biotinylierter Sequenz im Fall von Überschuss an Gegensequenz.

Die nicht gebundene Hybridstruktur von SMART PROBE und Zielsequenz wird nach der Inkubationsphase in einem Waschschriff entfernt, um die Detektion von geöffneter Sonde, die nicht an ein Kugelchen gebunden ist, zu minimieren. Zur Hybridisierung an den von Zielsequenz und kugelchengebundenem Oligonukleotid gebildeten Komplex ist daher nur noch wenig SMART PROBE übrig. Die Bildung des Sandwich Systems ist nur noch selten möglich. Somit kann es nicht zu einer Aufkonzentration der Fluoreszenz an der Kugeloberfläche kommen, die Fluoreszenzintensität bleibt gering. Durch Annäherung der Konzentration der Zielsequenz an die der Sonde steigt die Fluoreszenzintensität drastisch an. Diesem Sachverhalt liegt die Tatsache zugrunde, dass nun kein Überschuss an Zielsequenz mehr vorhanden ist. Eine Zielsequenz, welche an die SMART PROBE hybridisiert, hat weiterhin die Möglichkeit, mit der biotinylierten Sequenz zu reagieren. Ein Maximum der Intensität wäre also bei einem Konzentrationsverhältnis von 1:1:1 der drei Komponenten zu erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die Ursache hierfür liegt vermutlich darin, dass die Hybridisierungen nicht vollständig ablaufen. Somit ist die reelle Konzentration der Zielsequenz im hybridisierten Sandwich System geringer als ursprünglich erwartet. Der Abfall der Intensität bei niedrigen Konzentrationen ist, analog zum konventionellen System, auf das Erreichen der Detekti-

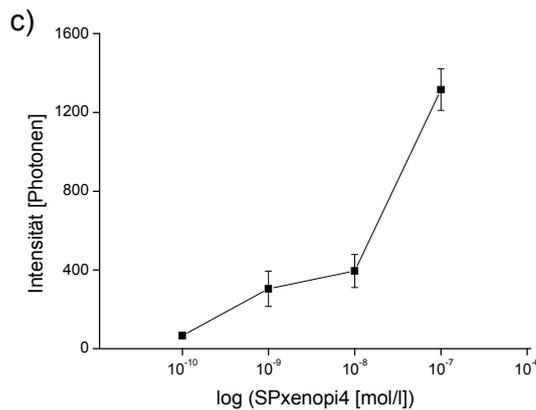
onsgrenze bei  $10^{-10}$  mol/l zurückzuführen. Diese ist bedingt durch unspezifische Öffnung der Sonde an der Kugeloberfläche.

Andere Möglichkeiten zur Variation des Systems stellen die Titration der SMART PROBE oder die Titration der biotinylierten Sequenz dar. Diese wurde beispielhaft mit den Oligonukleotiden für den Nachweis von *M.xenopi* vorgenommen.

Während der Titration von SPxenopi4 wurden die Konzentrationen der anderen beiden Sequenzen, Biooligo\_sand\_xen und Gegen\_xenopi, konstant gehalten. Es wurden Hairpinks-konzentration von  $10^{-7}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l titriert. Die Konzentrationen der Hybridisierungspartner waren  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l und  $10^{-9}$  mol/l (Abbildung 4-28).



$c(\text{Biooligo\_sand\_xenopi})=c(\text{Gegen\_xenopi})=10^{-7}$  mol/l     $c(\text{Biooligo\_sand\_xenopi})=c(\text{Gegen\_xenopi})=10^{-8}$  mol/l

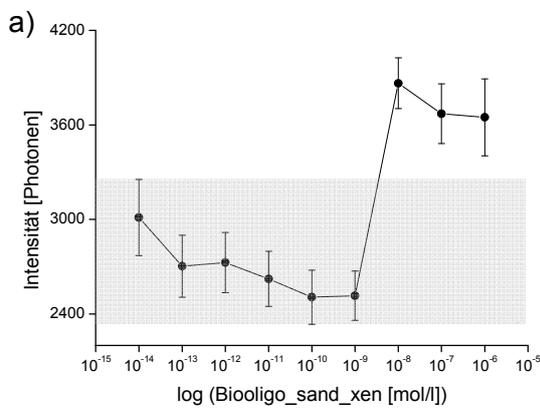


$c(\text{Biooligo\_sand\_xenopi})=c(\text{Gegen\_xenopi})=10^{-9}$  mol/l

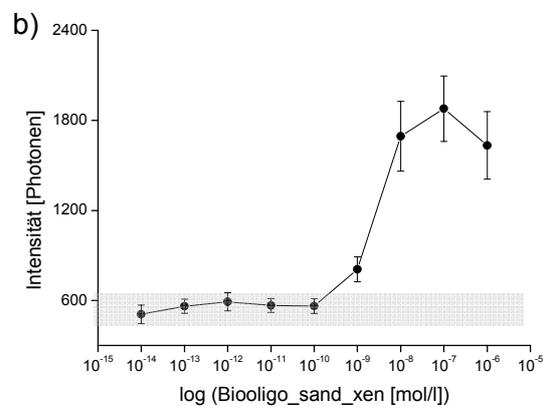
Abbildung 4-28: Kurven der Titration von SPxenopi4 in Konzentrationen von  $10^{-7}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l bei konstanter Konzentration der Oligonukleotide Biooligo\_sand\_xenopi und Gegen\_xenopi ( $10^{-7}$  –  $10^{-9}$  mol/l). Grau schraffiert der Bereich der Hintergrundfluoreszenz.

Die Titrationskurven der SMART PROBES zeigen einen rapiden Abfall der Fluoreszenzintensität hin zu niedrigeren Konzentrationen. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass der Hairpin der Träger der Fluoreszenz ist. Bei niedrigen Konzentrationen der Sonde ist folglich die Fluoreszenz geringer. Ab einer Konzentration der SMART PROBE von  $10^{-10}$  mol/l ist so gut wie keine Fluoreszenz mehr nachweisbar. Somit sind viele Bilder nicht mehr computergestützt auswertbar.

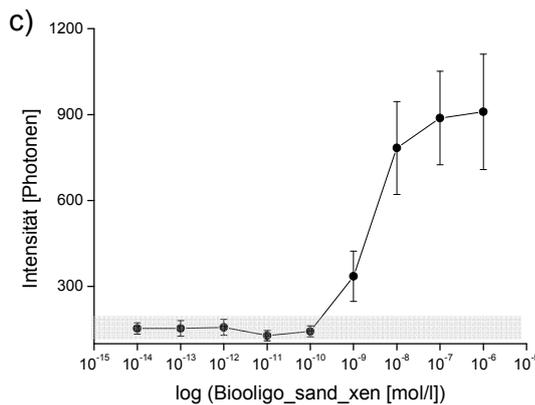
Die Titration der biotinylierten Sequenz Biooligo\_sand\_xen erfolgte entsprechend der Titration der SMART PROBE. Es wurden Konzentrationen von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l titriert. Die Konzentrationen der Gegensequenzen betragen  $10^{-7}$  mol/l,  $10^{-8}$  mol/l und  $10^{-9}$  mol/l (Abbildung 4-29).



$c(\text{SPxenopi4})=c(\text{Gegen\_xenopi})=10^{-7}$  mol/l



$c(\text{SPxenopi4})=c(\text{Gegen\_xenopi})=10^{-8}$  mol/l



$c(\text{SPxenopi4})=c(\text{Gegen\_xenopi})=10^{-9}$  mol/l

Abbildung 4-29: Kurven der Titration von Biooligo\_sand\_xen in Konzentrationen von  $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-14}$  mol/l bei konstanter Konzentration der SPxenopi4 und Gegen\_xenopi a)  $10^{-7}$  mol/l b)  $10^{-8}$  mol/l und c)  $10^{-9}$  mol/l. Grau schraffiert der Bereich der Hintergrundfluoreszenz.

Bei niedrigen Konzentrationen an biotinyliertem Oligonukleotid kann nicht genügend SMART PROBE auf dem Kügelchen angereichert werden um eine detektierbare Fluoreszenz zu erhalten. Steigt die Konzentration des Biooligos\_xenopi, so ist ab einer bestimmten Schwellenkonzentration Fluoreszenz detektierbar. Diese lag bei zirka  $10^{-9}$  mol/l in den Versuchen, bei denen die Gegenstränge bei  $10^{-8}$  mol/l und  $10^{-9}$  mol/l eingesetzt wurden (Bild b und c). Wenn SMART PROBE und Gegensequenz eine Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l (Bild a) besaßen, wurde erst ab  $10^{-8}$  mol/l Fluoreszenz detektiert. Dieser Unterschied des Schwellenwerts von Bild a) zu Bild b) und c) ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei  $10^{-7}$  mol/l die SMART PROBE durch unspezifische Öffnung zu einer hohen Hintergrundfluoreszenz führt. Das Maximum der Kurven verschiebt sich mit geringer werdender Konzentration an Gegensequenz und SMART PROBE (b und c) zu höheren Werten. So liegt es bei  $c(\text{Gegen\_xenopi}) = c(\text{SPxenopi4}) = 10^{-7}$  mol/l bei  $10^{-8}$  mol/l, während es sich zu  $10^{-7}$  beziehungsweise  $10^{-6}$  mol/l verschiebt, wenn sich die Konzentrationen der Gegensequenzen verringern (b und c). Ist die Konzentration von SMART PROBE und Zielsequenz hoch (Bild a), können alle kügelchengebundenen Oligonukleotide mit der Fluoreszenzsonde abgesättigt werden. Daher hat die Kurve I bei  $10^{-8}$  mol/l ihr Maximum. Steigt die Konzentration des Biooligo\_sand\_xenopi in Titration I an, so kommt es zu sterischen Hinderungen der Sequenzen, und es können keine weiteren Hybridisierungen mehr stattfinden. Das Fluoreszenzsignal liegt oberhalb des Maximums bei einem konstanten Wert. Erniedrigt sich die Konzentration des Hairpins und der Zielsequenz (Bild b und c), so können nicht sofort alle kügelchengebundenen Oligonukleotide abgesättigt werden. Die stärkste Fluoreszenzintensität wird erst bei  $10^{-7}$  beziehungsweise  $10^{-6}$  mol/l erreicht. Die Maxima der Fluoreszenz liegen nicht bei einer 1:1:1 Konzentration der Sequenzen, da die Kopplung der biotinylierten Sequenz an das Kügelchen nicht mit 100%igem Umsatz abläuft. Somit ist die nominelle Konzentration an Oligonukleotiden, die an das Glaskügelchen gebunden sind, geringer als die vorgelegte Konzentration. Der Intensitätsabfall in Kurve b) bei  $10^{-5}$  mol/l kommt wiederum durch sterische Hinderungen zustande, welche sich durch die große Anzahl an SMART PROBES auf der Kugeloberfläche ergibt. Die Kurve, bei der die Konzentrationen von SMART PROBE und Zielsequenz  $10^{-9}$  mol/l ist (nicht dargestellt), verläuft nach obigen Betrachtungen erwartungsgemäß. Nachdem die Detektionsgrenze, welche bei  $10^{-9}$  mol/l liegt, erreicht ist, steigt die Fluoreszenz so lange stetig an, bis alle kügelchengebundenen Oligonukleotide mit den anderen Sequenzen abgesättigt sind. Da durch die geringe Konzentration an SMART PROBE von  $10^{-10}$  mol/l diese im Unterschuss zur biotinylierten Sequenz vorliegt, sind nie alle Oligonukleotide am Kügelchen hybridisiert. Je mehr biotinylierte Oligonukleotide an der Oberfläche der Kugel binden, desto mehr SMART PROBES werden aus dem Reaktionsgemisch durch Hybridisierung abgefangen. Somit steigt die Fluoreszenz mit steigender Konzentration an kügelchengebundenem Oligo-

nukleotid an. Durch längere Reaktionszeiten kann die Effizienz der Reaktion gesteigert werden, weil die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Molekülen erhöht wird.

Zusammenfassend gilt für Reaktionen mit dem Sandwich-System:

- Die Belegung der Oberfläche mit biotinyliertem Oligonukleotid ist am effektivsten, wenn die sterische Hinderung, sowohl von kügelchengebundenen Sequenzen untereinander, als auch nach der Hybridisierung von Gegensequenz und SMART PROBE möglichst gering ist. Die größtmögliche Hybridisierungswahrscheinlichkeit tritt auf, wenn die biotinylierte Sequenz in Konzentrationen kleiner  $10^{-7}$  mol/l eingesetzt wird.
- Die Oberfläche muss genug potentielle Bindungsstellen aufweisen, damit sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund messbar abhebt. Dies ist ab Konzentrationen der kügelchengebundenen Oligonukleotide von  $10^{-9}$  mol/l der Fall.
- Die Konzentration der SMART PROBE sollte idealer Weise in der Größenordnung der Konzentration der Zielsequenzkonzentration liegen. Dadurch wird gewährleistet, dass alle Zielsequenzen mit einer SMART PROBE hybridisieren können.
- Das Sandwich System arbeitet somit am sensitivsten, wenn die Oberfläche der Kügelchen nicht zu stark mit biotinylierter Sequenz belegt ist und die SMART PROBE nicht im Überschuss vorhanden ist.

### 4.8.3. REAKTIONEN MIT NATÜRLICHEN SEQUENZEN

Um eine Anwendung in der Diagnostik zu finden, muss sich das mikrosphärenbasierte Nachweisverfahren in Reaktionen mit PCR-Amplifikaten beweisen.

Für die Versuche mit doppelsträngigen PCR-Produkten wurden zuerst die bewährten SMART PROBES SPxenopi4 und SPtuberculosis verwendet. Als PCR-Fragmente wurden 240 bp lange Amplifikate (Primer 16S-27f und 16S-222r) der 16S rDNA eingesetzt. Die Zielsequenz für die SMART PROBE lag im variablen Bereich zwei (Abschnitt 5-1). Die Konzentrationen der SMART PROBES und der kügelchengebundenen Oligonukleotide wurden bei  $10^{-8}$  mol/l gehalten. Die Konzentration des PCR-Produkts wurde von  $10^{-7}$  mol/l bis  $10^{-12}$  mol/l titriert. Da bei 240 bp langen Sequenzen die Wahrscheinlichkeit von unspezifischer Hybridisierung und Sondenöffnung größer ist als bei kurzen, künstlichen Sequenzen, mussten diese Reaktionen durch Blindproben ausgeschlossen werden. Hierzu wurden beide SMART PROBES mit dem PCR-Produkt der jeweils anderen Spezies titriert, das heißt SPxenopi4 wurde mit dem PCR-Amplifikat von *M.tuberculosis* zur Reaktion gebracht, so wie um-

gekehrt SPtuberculosis mit dem PCR-Produkt von *M.xenopi*. Die so erhaltenen Titrationskurven sind in Abbildung 4-30 dargestellt.

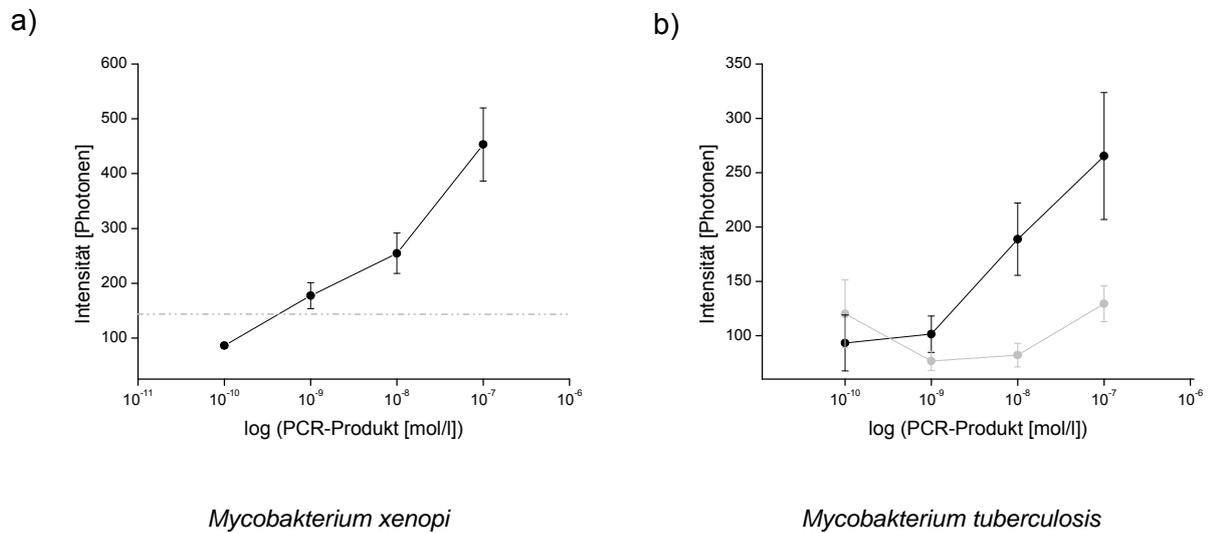
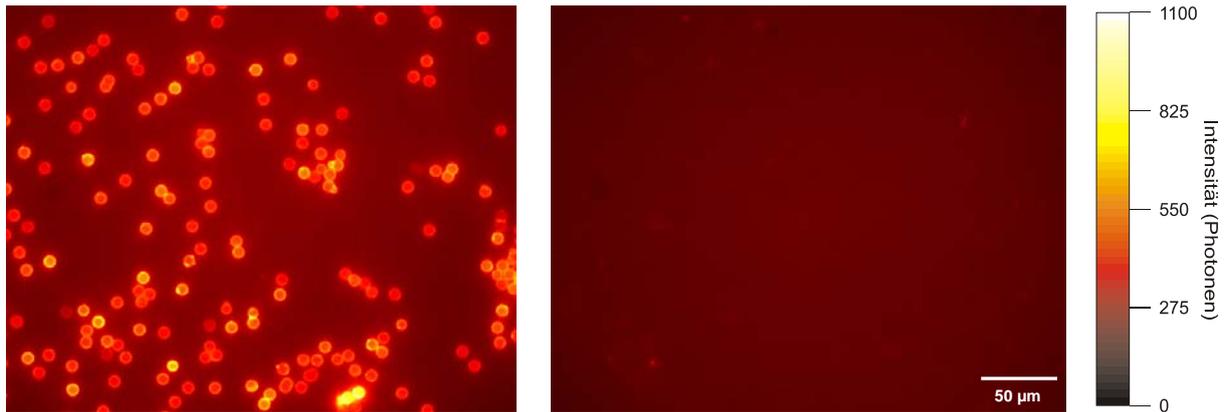


Abbildung 4-30: Titrationskurven der PCR-Amplifikate a) SPxenopi4 gegen PCR-Produkt *M.xenopi* (schwarz) und PCR-Produkt *M.tuberculosis* (grau); b) SPtuberculosis gegen PCR-Produkt *M.tuberculosis* (schwarz) und PCR-Produkt *M.xenopi* (grau).

Wie man in den Abbildungen erkennen kann, sind beide SMART PROBES in der Lage, das jeweils komplementäre PCR-Amplifikat spezifisch nachzuweisen. Die Reaktion des PCR-Produkts der Spezies *M.tuberculosis* mit SPxenopi4 führte zu so geringer unspezifischer Fluoreszenz, dass die Bilder nicht mehr computergestützt auswertbar sind. Die mittlere Fluoreszenz des Hintergrundes dieser Bilder wird durch die gestrichelte, graue Linie dargestellt. Die Fluoreszenzbilder der Reaktion von SPxenopi4 mit den PCR-Produkten zeigt Abbildung 4-31.

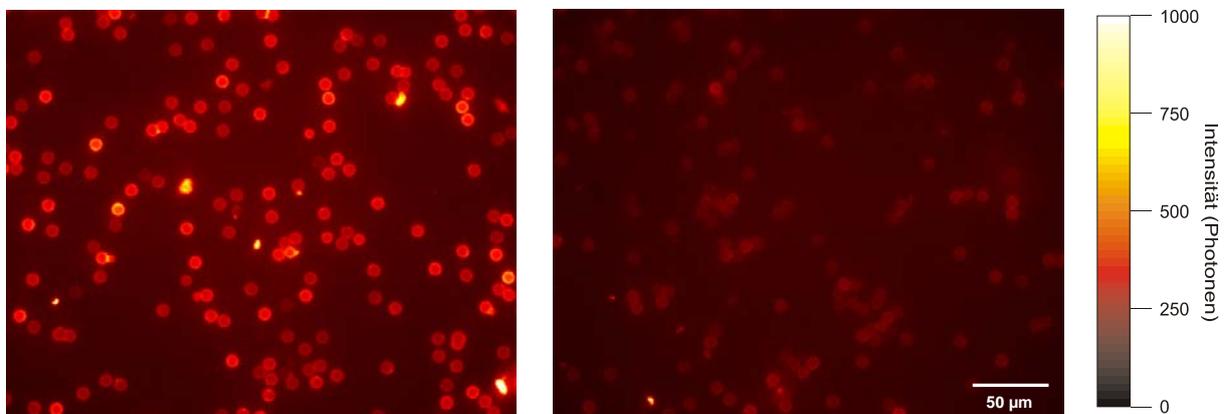


a)  $c(\text{SPxenopi4})=c(\text{Bio\_sand\_xenopi})$   
 $=10^{-8}$  mol/l;  $c(\text{PCR-Produkt}$   
 $M.xenopi)=10^{-7}$  mol/l

b)  $c(\text{SPxenopi4})=c(\text{Biooligo\_sand\_xenopi})$   
 $=10^{-8}$  mol/l;  $c(\text{PCR-Produkt}$   
 $M.tuberculosis)=10^{-7}$  mol/l

Abbildung 4-31: Fluoreszenzbilder der positiven Probe (a) und der Blindprobe (a) für die Spezies *M.xenopi* [ $c(\text{SPxenopi4})=c(\text{Biooligo\_sand\_xenopi})=10^{-8}$  mol/l,  $c(\text{PCR})=10^{-7}$  mol/l].

Beim Nachweis von *M.tuberculosis* ist die Blindprobe mit dem PCR-Amplifikat von *M.xenopi* hell genug, um computergestützt ausgewertet zu werden. Auch hier ist eine Diskriminierung zwischen komplementärer Sequenz und nicht komplementärer Sequenz leicht möglich (Abbildung 4-32).



a)  $c(\text{SPtuberculosis})=c(\text{Biooligo\_sand\_tub})$   
 $=10^{-8}$  mol/l;  $c(\text{PCR-Produkt}$   
 $M.tuberculosis)=10^{-7}$  mol/l

b)  $c(\text{SPtuberculosis})=c(\text{Bio\_sand\_tub})$   
 $=10^{-8}$  mol/l;  $c(\text{PCR-Produkt}$   
 $M.xenopi)=10^{-7}$  mol/l

Abbildung 4-32: Fluoreszenzbilder der positiven Probe (a) und der Blindprobe (b) für die Spezies *M.tuberculosis* [ $c(\text{SPtuberculosis})=c(\text{Bio\_sand\_tub})=10^{-8}$  mol/l,  $c(\text{PCR})=10^{-7}$  mol/l].

Mit diesem Verfahren ist ein Nachweis für die Spezies *M.tuberculosis* bis zu einer PCR-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l möglich. Für die Spezies *M.xenopi* sogar bis  $10^{-9}$  mol/l. Die schlechtere Sensitivität im Gegensatz zu den Versuchen mit künstlichen Sequenzen kommt durch die erschwerten Reaktionsbedingungen zustande. Bei der zweiten Inkubationsphase

hybridisiert nur ein Strang des doppelsträngigen PCR-Produktes an biotinyliertes Oligonukleotid. Somit muss dieses zuerst denaturiert werden, bevor es reagieren kann. Eine optimale Abtrennung des Gegenstranges ist jedoch nur schlecht möglich, so dass ein gewisser Anteil des komplementären PCR-Stranges durch Rehybridisierung der Doppelhelix abgefangen wird. Es steht also weniger PCR-Produkt für die Bildung des Sandwich Systems zur Verfügung als nominell eingesetzt wurde. Zusätzlich ist die Reaktion bei langen Sequenzen, wie sie bei PCR-Amplifikaten vorliegen, erschwert. Folglich ist die maximal zu erreichende Fluoreszenzintensität geringer als bei künstlichen Sequenzen.

Nachdem die Funktionalität des Systems mit PCR-Produkten bewiesen war, wurde versucht, das Verfahren für die vier SMART PROBES des homogenen Nachweises SPxenopi4, SPtuberculosis, SPavium und SPfortuitum, sowie für drei weitere Spezies (*M.intracellulare*, *M.kansasii* und *M.abscessus*) zu etablieren. Es sollte soweit verbessert werden, dass mit einem System sowohl der Genus *Mycobacterium*, als auch die Spezies (beispielsweise *M.xenopi*) erkannt werden kann.

Hierzu wurden 240 bp lange PCR-Fragmente (Primer 16S-27f und 16S-222r) der 16S rDNA, die den Zielbereich der jeweiligen SMART PROBE (Variable Region 2) enthalten, für alle 16 Spezies amplifiziert. Als biotinyliertes Oligonukleotid diente das Biooligo\_PCR, welches einen Abschnitt der konservierten Regionen der 16S rDNA enthält. Somit findet eine Hybridisierung an dieses Oligonukleotid nur statt, wenn es sich um ein PCR-Produkt eines Mykobakteriums handelt. Die SMART PROBES sind komplementär zu einem Abschnitt der variablen Region zwei, welcher zu der entsprechenden Spezies gehört. So ist beispielsweise SPavium komplementär zum PCR-Produkt der Spezies *M.avium*. Fluoreszenzanstiege sollten also nur detektiert werden, wenn der Genus und die Spezies erkannt werden.

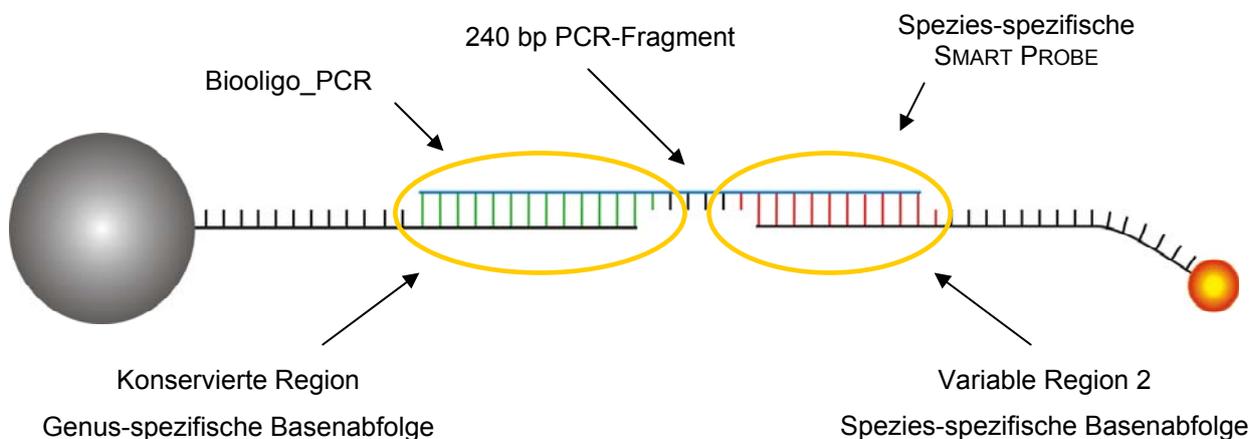


Abbildung 4-33: Spezifischer Sandwich-Nachweis von Genus und Spezies.

Die PCR-Fragmente wurden in Konzentrationen von  $10^{-8}$  mol/l eingesetzt. Sie wurden mit äquimolaren Mengen an 5'-biotinmarkiertem Oligonukleotid an die entsprechende SMART PROBE hybridisiert (Abbildung 4-33). Als Blindprobe zu jeder Spezies wurden PCR-Fragmente der jeweils 15 nichtkomplementären Mykobakterienspezies verwendet.

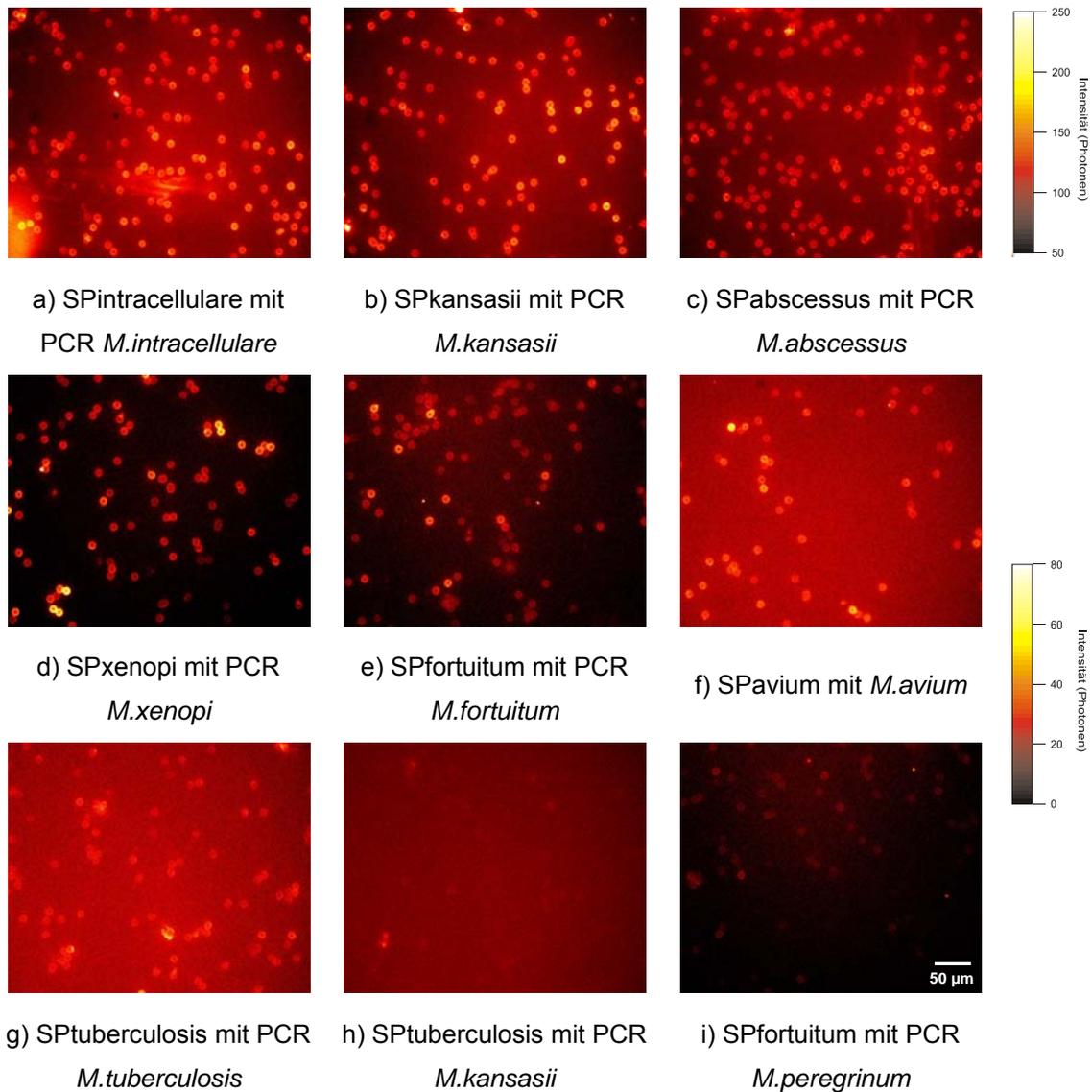


Abbildung 4-34 Spezifischer Sandwich-Nachweis von Genus *Mycobacterium* und den Spezies a) *M.avium*, b) *M.fortuitum*, c) *M.xenopi*, d) *M.abscessus*, e) *M.tuberculosis*, f) *M.intracellulare* und g) *M.kansasii*. Als Blindproben sind der Nachweis von h) *M.kansasii* mit SPtuberculosis und der Nachweis von i) *M.peregrinum* mit SPfortuitum gezeigt.

Abbildung 4-34 zeigt Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Kügelchen nach Hybridisierung der sieben verwendeten SMART PROBES an ihre komplementären PCR-Fragmente. Als Blindprobe sind exemplarisch die Reaktionen von SPtuberculosis mit dem PCR-Amplifikat von *M. kansasii* (nichtkomplementäre Zielsequenz, 3 Fehlbasen) gezeigt, sowie die Reaktion

von SPfortuitum mit PCR-Produkt von *M.peregrinum* (3 Fehlbasen). Die PCR-Fragmente, das Biooligo\_PCR und die jeweiligen SMART PROBES, wurden in Konzentrationen von  $10^{-8}$  mol/l eingesetzt.

Der Nachweis der Spezies *M.tuberculosis*, *M.xenopi* und *M.avium* zeigt nur messbare Fluoreszenzintensität mit dem spezies-spezifischen PCR-Produkten. SPfortuitum erzeugt ein messbares, wenn auch schwaches Fluoreszenzsignal mit der Spezies *M.peregrinum*. Diese beiden Spezies sind genetisch eng verwandt und treten meist gemeinsam auf. Die Bilder der Reaktion von SPfortuitum mit PCR-Produkt der Spezies *M.fortuitum*, *M.peregrinum* und *M.tuberculosis* sind in Abbildung 4-35 gezeigt.

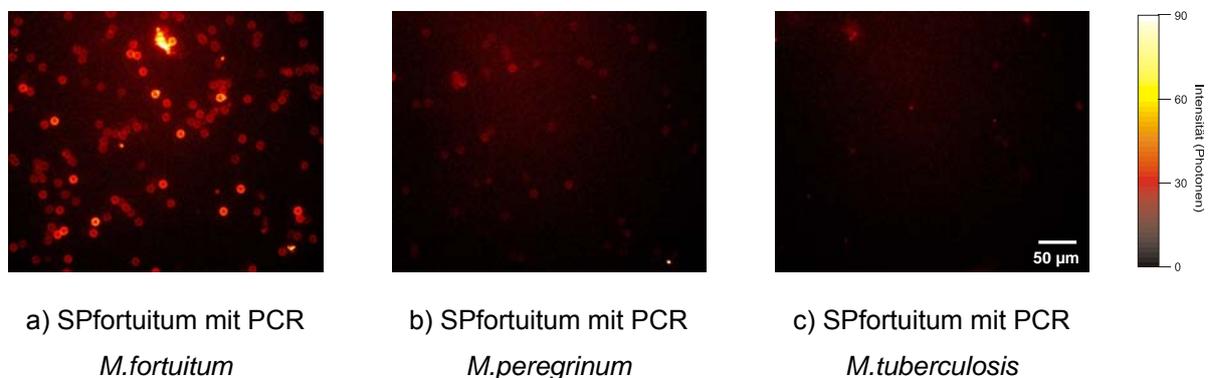


Abbildung 4-35: Sandwich-Nachweis mit SPfortuitum und den PCR-Amplifikaten von a) *M.fortuitum*, b) *M.peregrinum* und c) *M.tuberculosis* [ $c(\text{SPfortuitum})=c(\text{Biooligo\_xenopi})=c(\text{PCR})=10^{-8}$  mol/l].

Ähnliches Verhalten zeigt SPabscessus mit PCR-Produkten von *M.szulgai*, *M.gastri*, *M.celatum*, *M.interjectum*, *M.chelonae* und *M.avium*.

Das Verhalten der SMART PROBES SPxenopi4, SPfortuitum, SPtuberculosis, SPavium und SPabscessus in Gegenwart der 16 verwendeten Mykobakterienspezies ist in Abbildung 4-36 gezeigt. Für SPkansasii, SPabscessus und SPintracellulare konnten die Bilder nicht computergestützt ausgewertet werden, da die Fluoreszenz zu gering war.

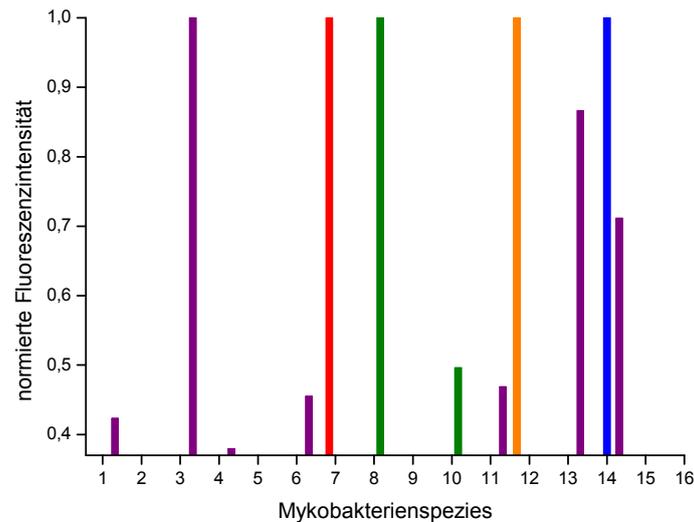


Abbildung 4-36: Normierte Fluoreszenzintensitäten und Speziespezifität der SMART PROBES SPtuberculosis (rot), xenopi4 (rosa), SPAvium (blau), SPfortuitum (grün), SPabscessus (gelb) [1: *M. szulgai*; 2: *M. kansasii*; 3: *M. abscessus*; 4: *M. gastri*; 5: *M. gordonae*; 6: *M. celatum*; 7: *M. tuberculosis*; 8: *M. fortuitum*; 9: *M. malmoense*; 10: *M. peregrium*; 11: *M. interjectum*; 12: *M. xenopi*; 13: *M. chelonae*; 14: *M. avium*; 15: *M. marinum*; 16: *M. intracellulare*].

Die SMART PROBES SPtuberculosis, SPxenopi4 und SPAvium zeigen eine Reaktion nur mit exakt komplementärer Zielsequenz. Die Sonden SPfortuitum und SPabscessus sind nicht in der Lage, spezifisch die passende Spezies zu erkennen. Durch weitere Optimierung dieser Sonden sollte jedoch ein eindeutiger Nachweis möglich werden.

Anhand dieses kügelchenbasierenden Modellsystems, bestehend aus den am häufigsten aus klinischem Patientenmaterial (Hygiene-Institut, Universitätsklinikum Heidelberg) isolierten Mykobakterienspezies, kann gezeigt werden, dass die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie die spezies-spezifische Identifizierung unterschiedlicher Mykobakterienarten erlaubt. Die Nachweisgrenze kann bis auf  $10^{-10}$  mol/l gesenkt werden, was einen zukünftigen Einsatz als hochsensitives und hochselektives Verfahren zulässt.

### SNAP-TAGS

Die Fluoreszenzlöschung von Farbstoffen durch Guanin kann neben dem Einsatz in der medizinischen Diagnostik auch in der molekularbiologischen Grundlagenforschung angewendet werden.

Die chemische Modifikation von Proteinen mit fluoreszierenden Molekülen ist ein bedeutendes Werkzeug, um die Funktionalität und den Zustand von Proteinen innerhalb und außerhalb ihrer natürlichen Umgebung – der lebenden Zelle – zu untersuchen.

Etablierte Methoden nutzen für die Markierung von Proteinen in Zellen entweder die unspezifische Markierung mit reaktiven Farbstoffen, oder aber fluoreszierende Fusionsproteine wie das grün fluoreszierende Protein (GFP), gelb oder cyan fluoreszierende Proteine (YFP und CFP) [Tsien 1998]. SNAP-TAGS sind eine neue Markierungstechnik, welches die Möglichkeit bietet, spezifisch fluoreszierende Moleküle kovalent an O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT) zu binden. Die Vorteile dieses Systems gegenüber anderen, Fusionsproteine verwendenden, ist die geringe Größe von nur 20 kDa. Der Einsatz kommerziell erhältlicher, synthetischer Farbstoffen macht das System auch für spektroskopische Methoden interessant. Beispielsweise können Sonden hergestellt werden, welche photostabiler sind als fluoreszierende Fusionsproteine. Außerdem können die variablen Eigenschaften von Farbstoffen ausgenutzt werden, wie beispielsweise die unterschiedlichen Lebensdauern beim Einsatz in der Fluoreszenzlebensdauerspektroskopie (FLIM, Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Des Weiteren kann auch hier die Löschung der Fluoreszenz der Farbstoffe durch Guanin ausgenutzt werden. So können Substrate eingesetzt werden, welche erst am Zielmolekül fluoresziert und somit die unspezifische Hintergrundfluoreszenz minimieren.

Die Arbeiten mit diesem System beinhalten mehrere Schritte:

- Wahl geeigneter Farbstoffe
- Untersuchung des photochemischen Verhaltens der O<sup>6</sup>-BG-Fluorophore
- Reaktionen *in vitro* mit Fusionsproteinen
- Markierung von AGT Fusionsproteinen in *E. coli* und CHO-H2B Zellen

## 4.9. Farbstoffwahl

Um einen möglichst breiten Spektralbereich mit BG-Substraten abzudecken, wurden zuerst Farbstoffe verschiedenster Substanzklassen an BG-NH<sub>2</sub> gekoppelt. Die Produkte wurden hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften charakterisiert. Neben der Möglichkeit, die Fluoreszenz durch Guanin zu löschen, sollten die Farbstoffe folgende Anforderungen, welche für den Einsatz in bioanalytischen Nachweisverfahren wichtig sind, erfüllen:

- hohe Fluoreszenzquantenausbeute in wässrigem Milieu
- ausreichende Photostabilitäten unter den gegebenen Messbedingungen
- große Extinktionskoeffizienten bei der Anregungswellenlänge
- gute Wasserlöslichkeit zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen mit biologischen Molekülen
- geeignete Verknüpfungsstelle für die kovalente Ankopplung an O<sup>6</sup>-BG-NH<sub>2</sub>

Tabelle 4-9 führt die verwendeten Farbstoffe auf. Bei allen Farbstoffen handelt es sich um kommerziell erhältliche synthetische, organische Fluorophore. Für die Kopplung an BG-NH<sub>2</sub>, welches eine primäre Aminogruppe aufweist, wurde eine aminreaktive Form des Farbstoffs verwendet (Isothiocyanat oder N-Hydroxysuccinimid (NHS) - Ester). Das Spektrum der verwendeten Farbstoffe erstreckt sich über den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich (400 nm bis 700 nm). Es wurden hauptsächlich Farbstoffe gewählt, welche zu den häufigen Farbstoffklassen der Oxazine, Cyanine, Rhodamine und Fluoresceine gehören.

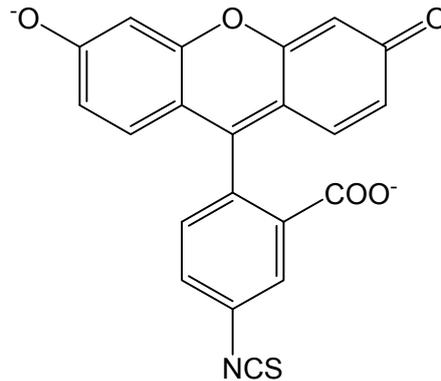
## Experimente und Ergebnisse

Farbstoff	$\lambda_{\text{abs}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	Derivat von	$\Phi_f$	$\epsilon$ [ $10^4 \cdot \text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
ATTO 425	436	484	Coumarin	0,90	4,5
FAM	494	518	Fluorescein	0,95	7,8
Rhodamine Green	498	521	Rhodamin	0,92	7,8
ATTO 488	501	523	Rhodamin	0,80	9,0
ATTO 495	495	527	Acridin orange	0,45	8,0
Dyomics 505	505	530	Rhodamin	n.A.	8,0
TET	521	536	Fluorescein	n.A.	9,9
ATTO 520	516	538	Rhodamin	0,90	11
Eosin	529	544	Fluorescein	0,57	8,9
ATTO 532	532	553	Rhodamin	0,90	11,5
Alexa Fluor 532	531	554	Rhodamin	0,61	8,1
Rhodamine B	544	584	Rhodamin	0,49	10,6
Cy 3b	558	572	Cyanin	0,67	15
ATTO 550	554	576	Rhodamin	0,80	12
TAMRA	546	579	Rhodamin	0,28	9,5
ATTO 565	563	592	Rhodamin	0,90	12
Alexa Fluor 568	578	603	Rhodamin	0,69	8,8
Alexa Fluor 594	590	617	Rhodamin	0,66	9,2
ATTO 590	594	624	Rhodamin	0,80	12
ATTO 620	619	643	Carbopyronin	0,50	12
ATTO 633	629	657	Carbopyronin	0,64	13
Dyomics 630	636	657	Cyanin	n.A.	20
ATTO 635	635	659	Carbopyronin	0,25	12
Cy 5	646	664	Cyanin	0,20	25
ATTO 647N	644	669	Carborhodamin	0,65	15
MR 121	660	675	Oxazin	0,30	12,5
DY 113	650	677	Oxazin	0,30	12,5
ATTO 655	663	684	Oxazin	0,30	12,5
ATTO 680	680	700	Oxazin	0,30	12,5
ATTO 700	700	719	Oxazin	0,25	12

Tabelle 4-9: Spektrale Daten der untersuchten Farbstoffe. Die Werte wurden in Phosphatpuffer pH 7,0 gemessen. Die Strukturen, soweit bekannt, werden im Anhang dargestellt.

### Fluorescein

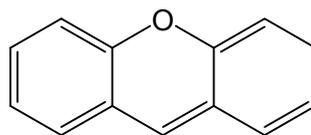
Eine der gebräuchlichsten Fluoreszenzsonden ist das Fluoresceinisothiocyanat und dessen Derivate. Die Fähigkeit dieser Farbstoffklasse zu fluoreszieren kommt durch die aromatische Struktur des planaren Dreiringsystems zustande. Durch die hohe Fluoreszenzquantenausbeute dieser Farbstoffe, welche über 0,90 liegt, sowie einem Extinktionskoeffizienten von ca.  $9 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , sind diese Farbstoffe für die Anregung mit Lasern äußerst geeignet.



Fluoresceinisithiocyanat

### Rhodamin

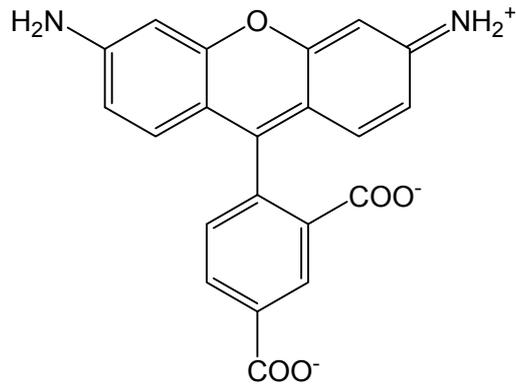
Neben dem Einsatz des klassischen Fluoreszenzmarkers Fluorescein werden immer häufiger Rhodaminfarbstoffe in biodiagnostischen Nachweisverfahren verwendet. Diese leiten sich, wie Fluoresceine, vom Grundgerüst der Xanthen-Farbstoffe ab.



Xanthen-Farbstoff

Die Verschiebung zu längeren Wellenlängen erfolgt vor allem durch Substitution an Position 3 und 6 des Xanthen-Grundgerüsts. Substituiert man an diesen Kohlenstoffatomen mit Stickstoffhaltigen Gruppen wie beispielsweise  $-\text{NH}_2$  oder  $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , so erhält man Pyronine. Rhodamine entstehen durch zusätzliche Substitution an Position 9 mit Carboxyphenylen. Der Vorteil gegenüber Fluoresceinfarbstoffen liegt in der sehr hohen Photostabilität von über 1 Million Absorptionszyklen in alkoholischer Lösung [Soper 1992]. Rhodaminfarbstoffe haben durch das planare, aromatische Multiringssystem ebenfalls die Eigenschaft zu fluoreszieren. Typischerweise haben sie Extinktionskoeffizienten von  $10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Die Fluoreszenz-

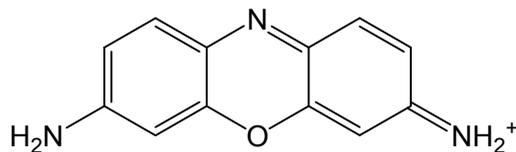
quantenausbeute kann bis zu 0,99 betragen [Zander 1991]. Sie decken den Wellenlängenbereich von ~500 nm bis ~800 nm ab.



Rhodamine Green

### *Oxazine*

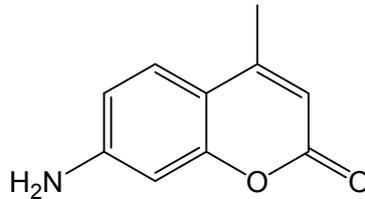
Ersetzt man formell die zentrale Methingruppe eines Rhodamin- oder Pyroninfarbstoffs durch ein Stickstoffatom, verschiebt sich deren Wellenlänge um bis zu 100 nm bathochrom [Kuhn 1959]. Solche Moleküle werden als Oxazine bezeichnet. Oxazine sind photochemisch sehr viel stabiler als Pyronine und Rhodamine. Sie stellen effiziente Laserfarbstoffe dar, welche einen Stokesshift von ~30 nm aufweisen.



Oxazine 118

### Coumarine

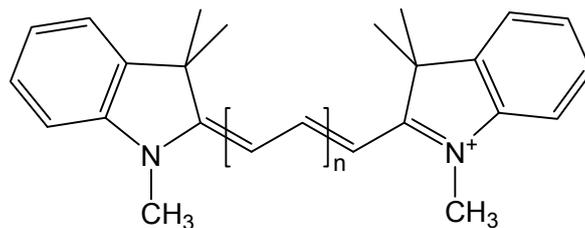
Eine Gruppe von weit verbreiteten Farbstoffen für die Laserspektroskopie stellen die im blaugrünen Wellenlängenbereich emittierenden Coumarinderivate dar. Coumarinfarbstoffe haben Quantenausbeuten von 0,70 und sehr starke Stokes-Verschiebungen. Ihre Absorptionsmaxima liegen zwischen 350 nm und 430 nm.



Coumarin 120

### Cyanine

Eine Reihe neuerer Farbstoffe beruht auf der Struktur von Sulfoindocyaninen [Mujumdar 1993]. Diese Farbstoffe zeichnen sich durch pH unabhängige Fluoreszenzeigenschaften aus. Sie haben in der Regel kurze Fluoreszenzlebensdauern und relativ niedrige Fluoreszenzquantenausbeuten von unter 0,30. Durch Ihre großen Extinktionskoeffizienten von bis zu  $2,5 \cdot 10^5 \cdot \text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  und ihren breiten Spektralbereich vom sichtbaren bis zum nahen Infrarot sind sie exzellente Fluoreszenzfarbstoffe.



Cyanin-Grundgerüst

Zunächst wurden die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe und der BG-Substrate in unterschiedlichen Lösungsmitteln untersucht.

#### 4.10. Lebensdauern und relative Fluoreszenzquantenausbeuten

Nach Ankopplung von Farbstoffen an Nucleobasen oder Proteine verändern sich deren spektroskopische Eigenschaften. Sowohl Absorptions- und Emissionsspektren, als auch die Fluoreszenzlebensdauern und -quantenausbeuten werden beeinflusst.

Ein Maß für die Stärke der Fluoreszenzlöschung der O<sup>6</sup>-BG-Substrate stellt die Quantenausbeute relativ zum freien Fluorophor dar. Tabelle 4-10 zeigt die relativen Quantenausbeuten der O<sup>6</sup>-BG-Substrate sowie die einiger AGT gebundener Fluorophore in drei verschiedenen Medien (PBS (ph 7), DMF und DMSO).

Substrat	rel. Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{rel}$		
	PBS ( $\epsilon_r=80,4$ )	DMSO ( $\epsilon_r=45$ )	DMF ( $\epsilon_r=37$ )
BG-ATTO 425	0,28 (a) 0,27 (b)	1,00 (a)	0,71 (a)
BG-FAM	9,38 7,98	farblos	farblos
BG-Rhodamine Green	0,32 0,79	0,62	0,90
BG-ATTO 488	0,09 0,10	0,82	0,56
BG-ATTO 495	0,83	0,82	0,84
BG-Dyomics 505	0,38 0,46	0,67	1,01
BG-TET	2,32 2,28	10,42	65,4
BG-ATTO 520	0,76	0,99	0,84
BG-Eosin	0,90 1,13	0,87	1,15
BG-ATTO 532	0,90	0,91	0,92
BG-Alexa 532	0,92	0,85	1,00
BG-Rhodamine B	0,85 1,32	1,77	1,30

## Experimente und Ergebnisse

BG-Cy 3b	0,82	0,75	0,75
BG-ATTO 550	0,17	0,84	0,73
BG-TAMRA	0,56 4,47	1,15	0,55
BG-ATTO 565	0,95	0,72	1,17
BG-Alexa 568	1,15	0,85	1,23
BG-Alexa 594	1,17	0,75	1,36
BG-ATTO 590	0,73	0,65	0,39
BG-ATTO 620	0,16	0,75	0,73
BG-ATTO 633	0,47	1,09	0,93
BG-Dyomics 630	1,27	0,85	0,93
BG-ATTO 635	0,98	1,00	1,02
BG-Cy 5	0,96	0,89	0,72
BG-ATTO 647N	1,00 1,21	0,97	1,03
BG-MR 121	0,08 0,44	0,69	0,48
BG-Dy 113	1,00	1,00	1,19
BG-ATTO 655	0,08 0,15	0,53	0,46
BG-ATTO 680	0,10 0,28	0,53	0,65
BG-ATTO 700	0,12	0,48	0,66

Tabelle 4-10: Relative Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_{rel}$  in PBS, DMF und DMSO mit unterschiedlicher Polarität  $\epsilon_r$  [ $A \ s \ V^{-1} \ m^{-1}$ ]. (a) Quantenausbeute des  $O^6$ -BG-Substrats relativ zum freien Fluorophor (b) Quantenausbeute des  $O^6$ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT)-gebundenen Fluorophors relativ zum freien Fluorophor.

Als Mechanismus für die Löschung wird ein photoinduzierter Elektronentransfer vom Guanin zum Farbstoffmolekül angenommen [Sauer 1995]. Da Guanin leicht oxidiert wird, wirkt es auf Farbstoffe, deren Oxidationspotenzial höher liegt als das des Guanins (1,25 V in Acetonitril) stark reduzierend [Kittler 1980]. Eine Löschung kann nur dann erfolgen, wenn es die Redoxpotenziale der Farbstoffe erlauben. Es findet also eine Basenoxidation und eine Farbstoffreduktion statt.

Die Quantenausbeuten sind im wässrigen Medium kleiner als in organischen Lösungsmitteln. Mit steigender Lösungsmittelpolarität wird eine Erhöhung der Fluoreszenzlöschung beobachtet, da das entstandene Radikationenpaar besser stabilisiert werden kann. Daher ist gerade in wässrigem Medium, in dem auch die meisten biochemischen Anwendungen stattfinden, die Fluoreszenzlöschung am effektivsten. Der Unterschied der Elektronegativität ist in DMF und DMSO mit  $\epsilon_r=45 \cdot \text{A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$  beziehungsweise  $\epsilon_r=37 \cdot \text{A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$  recht gering, weshalb hier die Quantenausbeuten sehr ähnlich sind.

Als Sonden für den hintergrundreduzierten Nachweis eignen sich diesen Ergebnissen zu folge vor allem die Oxazinderivate BG-ATTO 700, BG-ATTO 680, BG-ATTO 655 und BG-MR 121. Auch das Carbopyronin ATTO-620 ist im BG-gebundenen Zustand mit einer Quantenausbeute von 0,16 effizient gelöscht. Im blauen Wellenlängenbereich ist das Coumarinderivat BG-425 mit 0,28 gut gelöscht. Einige Rhodamine wie BG-488 mit 0,90, oder auch BG-550, BG-DY 505 oder BG-TAMRA und BG-Rhodamine Green zeigen ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung. Die anderen Substrate weisen die Eigenschaft der Fluoreszenzlöschung nicht auf und werden somit im Versuch zu unspezifischer Hintergrundfluoreszenz führen.

Nach Reaktion mit hAGT steigen die relativen Quantenausbeuten an. Sie erreichen jedoch nicht ganz den Wert des freien Farbstoffs. Dies ist darin begründet, dass auch in Proteinen Substituenten vorhanden sind, wie beispielsweise Tryptophan, die Farbstoffe löschen. Durch Wechselwirkungen mit dem Protein kann es also ebenfalls zu Fluoreszenzlöschung kommen.

Einige Farbstoffe zeigen nach Reaktion mit BG relative Quantenausbeuten über 1 wie zum Beispiel die BG-Substrate der Alexa Fluor-Farbstoffe oder BG-TET. Das Reduktionspotenzial dieser Farbstoffe ist wahrscheinlich größer als das des Guanins. Somit wird keine Fluoreszenzlöschung, sondern eine Verstärkung der Fluoreszenz aufgrund eines resultierenden Elektronendefizits am Farbstoff beobachtet.

Eine Verstärkung der Fluoreszenz kann daher ebenfalls nach Bindung an AGT erfolgen. Daher steigt beispielsweise die Quantenausbeute von BG-TAMRA nach Reaktion mit AGT von 0,56 auf 4,47.

Neben der Quantenausbeute beeinflusst ein Fluoreszenzlöcher wie Guanin auch die Fluoreszenzlebensdauer. Tabelle 4-11 zeigt die Lebensdauern der gelöschten BG-Substrate und der dazugehörigen freien Farbstoffe. Da die Eigenschaften der Fluoreszenz von der Polarität des Lösungsmittels abhängen, wurden die Lebensdauern in verschiedenen Lösungsmitteln gemessen. Aufgrund ihrer hydrophoben Strukturen besitzen vor allem langwellig absorbierende Fluoreszenzfarbstoffe in wässrigen Lösungsmitteln eine verstärkte Tendenz, die dem Wasser zugewandte Oberfläche zu verringern. Wasser als Umgebungsmolekül erniedrigt also die Fluoreszenz von Farbstoffen. Für PBS wird die Polarität des Wasser angenommen ( $\epsilon_r=80,4 \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ). Es wurde anstelle von diesem verwendet, da es normalerweise als Standardpuffer für biologische Proben eingesetzt wird. DMSO und DMF sind mit  $\epsilon_r=45 \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$  und  $\epsilon_r=37 \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$  weniger polar. Die Farbstoffkonzentration wurde zur Messung der Lebensdauern auf  $10^{-7} \text{ mol/l}$  gewählt, um interchromophore Wechselwirkungen und pile-up Effekte zu vermeiden.

## Experimente und Ergebnisse

Substrat	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$ [ns]		
	PBS ( $\epsilon_r=80,4$ )	DMSO ( $\epsilon_r=45$ )	DMF ( $\epsilon_r=37$ )
ATTO 425	3,56	2,89	2,91
BG-ATTO 425	2,63/0,53 (0,41)	2,85	2,82
ATTO 488	4,13	3,60	3,68
BG-ATTO 488	2,52/0,83 (0,50)	3,25	2,84
ATTO 550	3,59	3,34	3,45
BG-ATTO 550	2,89/0,31 (0,37)	3,19	3,19
ATTO 620	2,84	3,52	3,63
BG-ATTO 620	2,61/0,47 (0,24)	3,14	3,24
MR 121	1,87	3,68	3,85
BG-MR 121	1,71/0,60 (0,62)	3,06	2,77
ATTO 655	1,93	3,84	3,88
BG-ATTO 655	1,65/0,30 (0,40)	3,13	2,84
ATTO 680	1,75	3,69	2,96
BG-ATTO 680	1,65/0,32 (0,39)	3,18	3,03
ATTO 700	1,65	3,74	3,72
BG-ATTO 700	1,67/0,44 (0,33)	3,25	3,03

Tabelle 4-11: Fluoreszenzlebensdauern einiger der verwendeten Substrate ( $c=10^{-7}$  mol/l) in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität  $\epsilon_r$  [ $A \cdot s \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$ ]. Wenn ein biexponentielles Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik angewendet wurde, sind die beiden Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und der Amplitudenanteil  $a_1$  der längeren Komponente angegeben:  $\tau_1/\tau_2$  ( $a_1$ ).

Nach Kopplung an das O<sup>6</sup>-BG erfolgt eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauern der Farbstoffe in organischen Lösungsmitteln (DMF, DMSO). Das Selbe gilt für wässrige Lösungen, jedoch zeigt hier die Fluoreszenzkinetik die Existenz von zwei Komponenten. Ein biexponentielles Modell mit einer konstanten Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_2$  und einer längeren Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_1$  liefert die beste Anpassung. Je besser das Fluorophor gelöscht ist, desto kürzer ist die längere Komponente. Dies steht im Einklang mit intermolekularen Löschesperimenten mit 2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat [Sauer 1995]. Sauer postuliert aufgrund seiner Löschesperimente das Vorhandensein eines fluoreszierenden Grundzustandskomplexes mit bathochrom verschobener Absorption und Emission, welcher im Gleichgewicht zur freien, unkomplexierten Form steht. Bei einer Aggregation des Farbstoffs mit dem Nukleotids Guanin wird die Fluoreszenz in Abhängigkeit vom Reduktionspotenzial des Farb-

stoffs gelöscht. Daher besitzt der Farbstoff-Guanin-Komplex einen gewissen *charge-transfer* Charakter, der im ersten angeregten Zustand verstärkt wird. Es resultiert ein Elektronentransfer vom Grundzustand des Guanins zum ersten angeregten Zustand des Farbstoffs, wobei die Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer reduziert wird. Die lange Lebensdauerkomponente resultiert aus diesem gelöschten Komplex.

Die kurze Lebensdauer resultiert aus nicht effizient gelöschtem Farbstoff und stellt eine statische Komponente dar. Wenn Farbstoff und Guanin einen Komplex mit koplanarer Anordnung eingehen können, dann ist die Fluoreszenz des Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe innerhalb des Komplexes sehr stark gelöscht. Die Abklingzeiten dieser Komplexe würden wahrscheinlich unterhalb von 50 ps liegen. Ihre Fluoreszenz könnte man also nicht sehen. Die Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von ungefähr 0,4 ns stammt von Komplexen mit nicht optimaler, koplanarer Wechselwirkung.

Die Löschung setzt sich also zusammen aus einer dynamischen Komponente des Farbstoff-Guanin-Komplexes und einer statischen Komponente, resultierend aus nicht vollständig gelöschtem Farbstoff.

Die Löscheffizienz ist daher auch abhängig von dem Linker zwischen Guanin und konjugiertem System. Nur bei einer hohen Flexibilität des Linkers kann es zu einer koplanaren Anordnung von Guanin und Farbstoff kommen. So erfährt MR 121, welches einen Buttersäurelinker besitzt, eine starke Löschung, während DY 113, das einen kürzeren Essigsäurelinker besitzt, nicht gelöscht wird. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine bevorzugte Konformation mit optimaler Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Löschemolekül existiert, was wiederum in einer starken Löschung resultiert.

Die Farbstoffe und BG-Substrate in Tabelle 4-12 besitzen Fluoreszenzlebensdauern, die nach Kopplung an das BG-NH<sub>2</sub> in wässriger Umgebung zum großen Teil weiterhin eine monoexponentielle Fluoreszenzkinetik aufweisen.

## Experimente und Ergebnisse

Substrat	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$ [ns]		
	PBS	DMSO	DMF
ATTO 495	1,25/0,67 (0,43)	1,17	1,17
BG-ATTO 495	2,10/0,87 (0,79)	1,37	1,43
ATTO 520	3,66	3,29	3,35
BG-ATTO 520	3,49	3,10	3,31/0,30 (0,68)
ATTO 532	3,79	3,60	3,69
BG-ATTO 532	3,74	3,56	3,66
Alexa 532	2,66	2,33	3,38/2,24 (0,32)
BG-Alexa 532	2,60	2,16	2,22
Cy 3b	2,46	2,50	2,54
BG-Cy 3b	2,54	2,44	2,44
ATTO 565	3,74/0,66 (0,74)	3,82	3,95
BG-ATTO 565	3,91	3,67	3,66
Alexa 568	2,92	3,58	3,58
BG-Alexa 568	3,44	3,60	3,71
Alexa 594	3,46	4,04	4,12
BG-Alexa 594	3,90	4,03	4,19
ATTO 590	3,90/1,41 (0,64)	3,14	3,80
BG-ATTO 590	3,90	3,68	3,36
ATTO 633	3,90	3,90	4,09
BG-ATTO 633	2,49	3,80	3,87
ATTO 635	1,88	3,45	3,47
BG-ATTO 635	2,04	3,32	3,27
Cy 5	0,89	0,89	1,44
BG-Cy 5	1,65/0,32 (0,39)	1,66	1,44
ATTO 647N	3,56	3,99	4,13
BG-ATTO 647N	3,68	3,91	3,98
DY 113	1,62	3,38	3,37
BG-Dy 113	1,62	2,94	3,04

Tabelle 4-12: Fluoreszenzlebensdauern einiger Substrate in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität. Wenn ein biexponentielles Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik angewendet wurde, sind die beiden Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1, \tau_2$  und der Amplitudenanteil  $a_1$  der längeren Komponente angegeben:  $\tau_1/\tau_2 (a_1)$ .

BG-Cy 5 und BG-ATTO 495 sind Substrate, die nicht gelöscht sind, jedoch eine biexponentielle Fluoreszenzkinetik aufweisen.

Verschiedene Farbstoffklassen werden durch die Lösungsmittelpolarität unterschiedlich beeinflusst. In organischen Lösungsmitteln verringern sich die Lebensdauern im gekoppelten Zustand nur geringfügig und bleiben monoexponentiell. Hier kann die koplanare Anordnung zwischen Farbstoff und Guanin nicht stabilisiert werden und die kurze Lebensdauerkomponente entsteht nicht [Sauer 1995].

Coumarine und Rhodamine weisen bei niedrigerer Polarität eine kürzere Lebensdauer auf als in stark polaren Lösungsmitteln. Oxazine und Carbopyronine hingegen erfahren eine Verlängerung der Lebensdauer in weniger polaren Medien wie DMF und DMSO. Cyanine ändern die Lebensdauer nur geringfügig und können daher im Bereich der verwendeten Lösungsmittel als konstant angesehen werden.

Die größte Veränderung in der Lebensdauer zeigen die Oxazine, die, im Vergleich zu wässrigen Lösungen, die Lebensdauer in DMF mehr als verdoppeln [Buschmann 2003]. Dieser Effekt kann durch die O-H-Schwingung in Wasser erklärt werden. Diese führt zu einer schnelleren Relaxation vom ersten angeregten Zustand  $S_1$  in den Grundzustand  $S_0$ . Aufgrund der kleinen Masse eines Wasserstoffatoms haben die Quanten einer H-Streckschwingung die höchsten Energien in organischen Farbstoffen. Daher sind diese am ehesten für strahlungslosen Übergang  $S_1 \rightarrow S_0$  verantwortlich [Drexhage 1973]. In deuterierten Lösungsmitteln werden diese Effekte nicht beobachtet, da ein schneller Austausch der Protonen mit Deuterium stattfindet [Sauer 1995].

#### 4.11. In vitro Assay

Um das Potenzial der hAGT-Markierung zu testen, wurden die O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Substrate mit AGT-Fusionsprotein zur Reaktion gebracht. AGT-Fusionsprotein wurde von Tanja Erhard und Sonja Schulmeister am ZMBH hergestellt und zur Verfügung gestellt. Es wurde durch Expression in *Escherichia coli* gewonnen und aufgereinigt.

Farbstoffe, die von Guanin gelöscht werden, sollten nach der Reaktion mit AGT eine erhöhte Quantenausbeute liefern. Durch das Koppeln an Protein wird der Farbstoff vom Guanin entfernt, wodurch dieses nicht mehr als Löschmolekül zur Verfügung steht. Abbildung 4-37 zeigt einen typischen Fluoreszenzanstieg nach Reaktion von BG-MR 121 mit AGT. Die Reaktion des BG-Cy 5 zeigt das Fluoreszenzverhalten eines nicht fluoreszenzgelöschten Substrats. Die relative Fluoreszenzintensität steigt bei diesem nach der Reaktion nicht an.

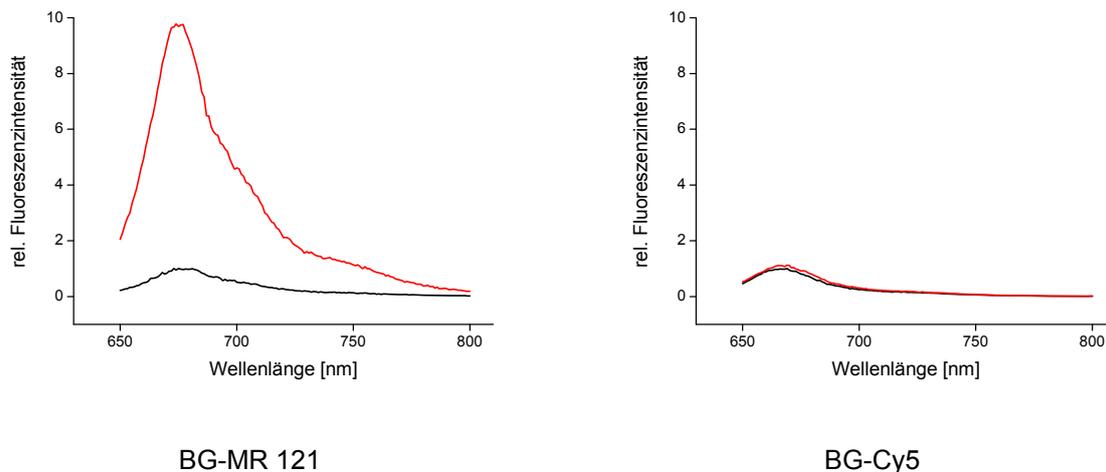


Abbildung 4-37: Anstieg der Fluoreszenzintensität von BG-MR 121 (links) und BG-Cy 5 (rechts) nach Reaktion mit hAGT.

Die Fluoreszenzintensität der farbstoffmarkierten Fusionsprodukte wurde mit der Intensität der O<sup>6</sup>-BG-Farbstoffsubstrate in Relation gesetzt.

Tabelle 4-13 zeigt die relativen Fluoreszenzanstiege der Substrate für Oxazine und Carborhodamine. Das Protein wurde im 1000 fachen Überschuss zum BG-Substrat, welches in einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> mol/l vorlag, eingesetzt. Es wurde jeweils eine Messung vor Zugabe des Proteins und eine nach 5h Reaktion bei 25°C gemacht. Zum besseren Verständnis sind nochmals die relativen Quantenausbeuten  $\Phi_{rel}$ , sowie die Lebensdauern vor und nach der Reaktion mit dem Protein gezeigt.

Substrat	rel. Fluoreszenzanstieg 25°C	$\Phi_{rel}$	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$ [ns]	
			vor Reaktion	nach Reaktion
BG-ATTO 647N	1,0	0,99	3,66	3,79
BG-MR 121	7,0	0,08	1,73/0,49 (0,80)	2,60/0,65 (0,67)
BG-DY 113	1,4	1,00	1,61	1,58
BG-ATTO 655	2,8	0,08	-	-
BG-ATTO 680	3,8	0,10	1,68/0,34 (0,48)	2,15/0,68 (0,74)
BG-ATTO 700	3,8	0,12	1,83/0,47 (0,33)	2,64/1,37 (0,62)

Tabelle 4-13: Relative Fluoreszenzanstiege der auf Oxazinen basierenden BG-Substrate nach Reaktion mit hAGT bei 25°C, relative Quantenausbeuten und Lebensdauern vor und nach Reaktion. Wenn ein biexponentielles Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik angewendet wurde, sind die beiden Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und der Amplitudenanteil  $a_1$  der längeren Komponente angegeben:  $\tau_1/\tau_2$  ( $a_1$ ).

Die nicht gelöschten Produkte BG-ATTO 647N und BG-DY 113, welche eine Quantenausbeuten von ~1 aufweisen, zeigen erwartungsgemäß keinen bemerkenswerten Fluoreszenzanstieg. Die Lebensdauern der Farbstoffe ändern sich bei beiden Substraten vor und nach der Reaktion nicht wesentlich. Wie für nicht gelöschte Farbstoffe üblich, bleiben die Lebensdauern mit einer monoexponentiellen Abklingkurve beschreibbar.

Die fluoreszenzgelöschten Produkte BG-MR 121, BG-ATTO 655, BG-ATTO 680 und BG-ATTO 700, welche alle Quantenausbeuten um 0,10 besitzen, zeigen einen Fluoreszenzanstieg bei Reaktion mit AGT. Die Lebensdauern bleiben vor und nach der Reaktion biexponentiell. Insgesamt wird eine Verlängerung der Lebensdauerkomponente  $\tau_1$  festgestellt. Die Verlängerung könnte durch Wechselwirkung mit oxidierend wirkenden Aminosäuren, welche Elektronen vom Farbstoffmolekül abziehen, zustande kommen. Durch veränderte Wechselwirkungen am Protein würde sich ebenfalls die kurze Komponente  $\tau_2$  verändern.

Bemerkenswert ist, dass die Substrate nicht immer zu dem erwarteten Fluoreszenzanstieg führen. BG-MR 121 zeigt bei einer Quantenausbeute von 0,08 einen 7,2 fachen Anstieg. BG-ATTO 655 sowie die Substrate BG-ATTO 680 und BG-ATTO 700 weisen jedoch einen viel zu geringen Anstieg auf. Sie steigen nur um das 2 bis 3 fache an. Dies kommt vermutlich dadurch, dass die Reaktion bei 25°C unvollständig abläuft. Das heißt, nicht alle BG-Fluorophore übertragen Ihren Farbstoff auf das Protein und somit wird der maximal erwartete Fluoreszenzanstieg nicht erreicht.

Tabelle 4-14 zeigt den Vergleich der Anstiege bei 25°C und 37°C.

Substrat	rel. Fluoreszenzanstieg		
	25°C	37°C	37°C (unbeschichtet)
BG-ATTO 647N	1,0	5,6	6,8
BG-MR 121	7,6	17,7	20,9
BG-DY 113	1,4	3,0	2,9
BG-ATTO 655	2,8	13,5	24,0
BG-ATTO 680	3,8	28,0	25,9
BG-ATTO 700	3,8	31,6	34,1

Tabelle 4-14: Relative Fluoreszenzanstiege einiger BG-Substrate bei 25°C und 37°C in silylierten Küvetten und bei 37°C in unbehandelten Küvetten.

Bei allen Substraten steigt die Fluoreszenzintensität bei 37°C nochmals an. Sowohl die ursprünglich gelöschten als auch die nicht gelöschten Substrate zeigen einen Fluoreszenzanstieg. Die Reaktion läuft bei 37°C offensichtlich vollständiger ab. Die Substrate, bei denen auf Grund einer Fluoreszenzlöschung im Ausgangszustand ein Anstieg zu erwarten ist, steigen teilweise um das 20 bis 30 fache an. Dies ist auf Lösungsmittelleffekte oder auf Viskositätseffekte nach Bindung an das Protein zurückzuführen (Kapitel 4-12).

Wenn man voraussetzt, dass Proteine hydrophobe Taschen mit Stellen aufweisen, welche eine Affinität zu den Farbstoffen besitzen, dann ergeben sich zwei Konsequenzen:

- (1) Durch die veränderte Polarität an der Proteinoberfläche wird die Fluoreszenz beeinflusst.
- (2) Durch erhöhte Umgebungviskosität für den Farbstoff nach Kopplung an das Proteinmolekül ist die Relaxation vom Angeregten- in den Grundzustand gehindert, was in einer stärkeren Fluoreszenzintensität resultiert.

Eine zusätzliche Beeinflussung des Fluoreszenzanstiegs könnte das Verhalten von hydrophoben Farbstoffen sein, an der Glaswand zu adsorbieren. So ist bei diesen Substraten die Intensität in unbehandelten Küvetten sehr viel höher als in Küvetten, welche zwecks Passivierung mit Trichlorsilan beschichtet wurden. Substrate, die an der Glasoberfläche adsorbieren verringern die nominelle Konzentration und tragen somit nicht mehr zur Ausgangsfluoreszenz bei. Bei der Reaktion mit Protein werden sie von der Wand wieder abgelöst und markieren das Protein. Somit tragen sie wieder zur Fluoreszenz bei. Dies führt zu falschen Fluoreszenzanstiegen, welche nicht aus an Protein gebundenem Fluorophor resultieren, sondern aus falsch angenommenen BG-Substrat-Konzentrationen.

Die Unterschiede der Messungen in passivierten Küvetten und unbehandelten Küvetten bei 37°C zeigt die letzte Spalte von Tabelle 4-14. Hydrophobe Farbstoffe wie MR 121 und ATTO 700 zeigen in unbeschichteten Küvetten eine bis zu 1,2 fach erhöhte Fluoreszenz.

In Tabelle 4-15 sind die Fluoreszenzanstiege der Substrate zu sehen, welche auf Rhodaminfarbstoffen basieren.

Substrat	rel. Fluoreszenzanstieg 25°C	$\Phi_{rel}$	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$ [ns]	
			vor Reaktion	nach Reaktion
BG-ATTO 488	2,3	0,09	3,25/1,33 (0,43)	3,61/1,18 (0,56)
BG-ATTO 520	1,0	0,75	3,60	3,72
BG-ATTO 532	0,9	0,90	3,83	3,82
BG-Alexa 532	1,5	0,92	2,76	3,25/0,95 (0,81)
BG-ATTO 550	5,7	0,17	-	-
BG-ATTO 565	2,2	1,00	3,81	4,42
BG-Alexa 568	1,7	1,15	3,50	3,52
BG-Alexa 594	3,3	1,12	3,88	4,06

Tabelle 4-15: Relative Fluoreszenzanstiege der auf Rhodaminen basierenden BG-Substraten nach Reaktion mit AGT bei 25°C, relative Quantenausbeuten und Lebensdauern vor und nach Reaktion. Wenn ein biexponentielles Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik angewendet wurde, sind die beiden Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und der Amplitudenanteil  $a_1$  der längeren Komponente angegeben:  $\tau_1/\tau_2$  ( $a_1$ ).

Auch bei den Rhodaminderivaten zeigen die nicht gelöschten Produkte BG-ATTO 520 und BG-ATTO 532 keinen Fluoreszenzanstieg sowie keine Veränderung in der Fluoreszenzlebensdauer.

BG-Alexa 532 hingegen ist ebenfalls nicht gelöscht, zeigt jedoch einen geringen Anstieg in der Fluoreszenz sowie eine Lebensdauer, welche nach Ankopplung an das Protein biexponentiell wird. Dies könnte ebenfalls auf Wechselwirkungen an der Proteinoberfläche zurückzuführen sein.

Auch die beiden anderen, auf Alexa-Farbstoffen basierenden Substrate, BG-Alexa 568 und BG-Alexa 594, zeigen ein ähnliches Verhalten. Zwar ändert sich bei ihnen die Lebensdauer nicht gravierend, allerdings wird sie länger und lässt daher auf Wechselwirkungen mit dem Protein schließen. Abermals findet ein Anstieg der Fluoreszenzintensität statt. Ähnliche spektroskopische Eigenschaften weist die Reaktion mit BG-ATTO 565 auf. Die drei Farbstoffe haben sehr ähnliche Grundgerüste.

## Experimente und Ergebnisse

---

BG-ATTO 488 zeigt wie erwartet einen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Jedoch ist dieser mit 2,3 bei einer relativen Quantenausbeute von 0,09 nur gering.

Tabelle 4-16 zeigt Fluoreszenzanstiege bei 25°C und 37°C sowie die Anstiege in unbeschichteten Küvetten bei 37°C.

---

Substrat	rel. Fluoreszenzanstieg		
	25°C	37°C	Unbeschichtet 37°C
BG-ATTO 488	2,3	1,6	5,7
BG-ATTO 520	1,0	1,4	6,1
BG-ATTO 532	0,9	0,9	1,0
BG-Alexa 532	1,5	2,4	2,9
BG-ATTO 550	5,7	9,4	8,5
BG-ATTO 565	2,2	3,7	3,0
BG-Alexa 568	1,7	1,3	1,7
BG-Alexa 594	3,3	3,0	2,2

---

Tabelle 4-16: Relative Fluoreszenzanstiege einiger BG-Substrate bei 25°C, 37°C in silylierten Küvetten und bei 37°C in unbeschichteten Küvetten.

Auch hier zeigt sich bei einigen Substraten die Tendenz zu größeren Fluoreszenzintensitäten bei steigender Temperatur. Ebenso ist der Anstieg in unbeschichteten Küvetten größer als in silylierten. Diese Ergebnisse untermauern obige Betrachtungen.

Tabelle 4-17 zeigt abschließend die restlichen Farbstoffe, welche verschiedenen anderen Farbstoffklassen angehören.

Substrat	rel. Fluoreszenzanstieg 25°C	$\Phi_{\text{rel}}$	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$ [ns]	
			vor Reaktion	nach Reaktion
BG-ATTO 425	4,0	0,28	2,80/0,52 (0,39)	3,91/1,47 (0,60)
BG-ATTO 495	5,2	0,83	1,87/0,69 (0,24)	2,21/0,97 (0,40)
BG-CY 3b	2,0	0,82	2,57	2,63
BG-ATTO 620	1,3	0,16	2,66	2,77
BG-ATTO 633	2,3	0,47	2,78	2,82
BG-Dyomics 630	1,5	1,27	-	-
BG-CY 5	1,1	0,96	1,85	1,38

Tabelle 4-17: Relative Fluoreszenzanstiege von BG-Substraten nach Reaktion mit AGT bei 25°C, relative Quantenausbeuten und Lebensdauern vor und nach Reaktion. Wenn ein biexponentielles Modell zur Beschreibung der Fluoreszenzkinetik angewendet wurde, sind die beiden Fluoreszenzlebensdauern  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  und der Amplitudenanteil  $a_1$  der längeren Komponente angegeben:  $\tau_1/\tau_2$  ( $a_1$ ).

BG-ATTO 620 ist das einzige fluoreszenzgelöschte Substrat. Dieses zeigt bei 25°C noch keinen bemerkenswerten Anstieg und nur eine geringe Verlängerung der Lebensdauer.

Die beiden Substrate BG-ATTO 425 und BG-ATTO 495 weisen schon bei 25°C einen 4 fachen beziehungsweise 5,2 fachen Fluoreszenzanstieg auf. Entsprechend ist die Lebensdauer nach Reaktion mit Protein weiterhin biexponentiell.

Ergänzend werden in Tabelle 4-18 noch die Anstiege bei 37°C und in unbeschichteten Küvetten bei 37°C gezeigt.

Substrat	rel. Fluoreszenzanstieg		
	25°C	37°C	Unbeschichtet 37°C
BG-ATTO 425	4,0	7,3	9,4
BG-ATTO 495	5,2	5,6	6,6
BG-CY3b	2,0	3,5	3,1
BG-ATTO 620	1,3	2,1	7,0
BG-ATTO 633	2,3	4,7	4,2
BG-Dyomics 630	1,5	2,0	4,6
BG-CY5	1,1	1,5	4,2

Tabelle 4-18: Relative Fluoreszenzanstiege einiger BG-Substrate bei 25°C und 37°C in silylierten Küvetten und bei 37°C in unbehandelten Küvetten.

Anhand dieser Ergebnisse sieht man, dass es viele Parameter gibt, welche den Fluoreszenzanstieg beeinflussen können. So wurden durch Verwendung von beschichteten Küvetten zwar Adhäsionseffekte bestmöglich unterbunden, doch resultierten trotzdem unerwartet hohe Fluoreszenzanstiege.

Mit den bis jetzt erhaltenen Ergebnissen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob nach der Reaktion ein Fluoreszenzanstieg der im Ausgangszustand gelöschten Sonde resultiert.

Da offensichtlich Wechselwirkungen mit dem Protein auftreten, wird in dem nächsten Kapitel näher auf diese eingegangen.

## **4.12. Allgemeine und Spezifische Lösungsmittelleffekte**

Lösungsmittelpolaritäten und die lokale Umgebung von polaren Fluorophoren können erhebliche Auswirkungen auf deren spektroskopische Eigenschaften haben. So beobachtet man bei vielen Substanzen eine Verschiebung des Emissionsmaximums beim Wechsel zu einem Lösungsmittel mit anderer Polarität. Die Auswirkungen von Lösungsmitteln und der Umgebung von Fluorophoren, beispielsweise eine Oberfläche oder ein Biomolekül, sind so komplex, dass keine einfache Theorie alle Effekte erklären könnte. Spektrale Verschiebungen können ein generelles Resultat der Lösungsmittelpolarität sein, wobei die Energie des angeregten Zustandes mit zunehmender Polarität abnimmt. Spektrale Verschiebungen können aber auch durch Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösungsmittel auftreten, welche auf Ladungsseparation im angeregten Zustand zurückzuführen ist.

Zur Überprüfung, ob die teilweise stark erhöhten Fluoreszenzanstiege nach Reaktion mit hAGT durch Lösungsmittelleffekte hervorgerufen werden, wurden Farbstoffe unterschiedlicher Klassen hinsichtlich allgemeiner und spezifischer Lösungsmittelleffekte untersucht. Da das Fluoreszenzverhalten auch von der Viskosität abhängen kann, wurden des Weiteren die Emissionsspektren der Farbstoffe in Glycerin betrachtet.

### **4.12.1. ALLGEMEINE LÖSUNGSMITTELEFFEKTE**

Die Interpretation der Emissionsspektren hinsichtlich ihrer Lösungsmittelabhängigkeit ist, bedingt durch die Vielzahl von möglichen Wechselwirkungen, ein sehr komplexes Thema. Allgemeine Lösungsmittelleffekte treten immer dann auf, wenn Fluorophore in Lösungsmitteln gelöst werden. Abhängig von der Lösungsmittelpolarität tritt eine Veränderung der Lage, der Intensität und der Gestalt der Absorptions- und Emissionsbanden auf. Bei diesem auch als Solvatochromie bezeichneten Effekt unterscheidet man zwischen positiver und negativer Solvatochromie. Bei der positiven Solvatochromie wird die Absorptionsbande mit steigender Lösungsmittelpolarität bathochrom, das heißt zu größeren Wellenlängen verschoben, bei der negativen Solvatochromie hypsochrom, das heißt zu kleineren Wellenlängen. Solvatationseffekte nehmen mit größer werdender Polarität des Lösungsmittels zu, so dass die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum wächst. Sie sind unabhängig von den chemischen Eigenschaften des Fluorophors und des Lösungsmittels.

Da die Wellenlänge, bei der die Emission der Farbstoffe detektiert wurde, sowohl vor als auch nach der Reaktion gleich gewählt wurde, könnte eine spektrale Verschiebung dazu

führen, dass mehr oder weniger Fluoreszenzlicht, je nach Verschiebungsrichtung, detektiert wird.

Tabelle 4-19 zeigt die Verschiebung der Emissionsmaxima unterschiedlicher Farbstoffe in Lösungsmitteln steigender Polarität.

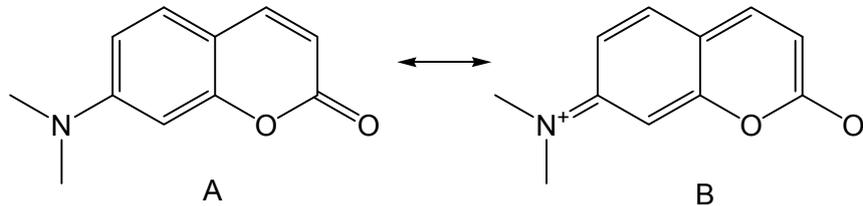
Die Emissionsspektren der Oxazinderivate und des Coumarins (ATTO 425) zeigen eine positive Solvatochromie, wohingegen die Farbstoffe der übrigen Substanzklassen eine negative Solvatochromie aufweisen.

## Experimente und Ergebnisse

	$\lambda_{em}$ Toluol ( $\epsilon=2,4$ )	$\lambda_{em}$ Ethylace- tat ( $\epsilon=13,1$ )	$\lambda_{em}$ Butanol ( $\epsilon=17,8$ )	$\lambda_{em}$ Aceton ( $\epsilon=21,4$ )	$\lambda_{em}$ Wasser ( $\epsilon=80,4$ )
ATTO 425	455	455	467	463	482
ATTO 488	545	528	532	526	524
ATTO 495	532	530	525	530	527
ATTO 520	552	551	554	549	546
ATTO 532	567	564	563	560	556
CY 3b	587	581	585	582	572
ATTO 550	589	585	581	577	578
ATTO 565	-	600	593	601	597
Alexa Fluor 568	643	638	607	613	606
Alexa Fluor 594	640	641	623	634	625
ATTO 590	635	631	626	633	620
ATTO 620	654	651	650	647	644
ATTO 633	659	654	657	656	656
Dyomics 630	671	665	663	666	652
ATTO 635	663	664	662	664	660
CY 5	-	-	692	694	678
ATTO 647N	675	666	668	667	667
MR 121	670	668	676	669	676
DY 113	669	665	675	668	674
ATTO 655	665	667	676	674	683
ATTO 680	693	693	701	700	703
ATTO 700	-	709	715	715	723

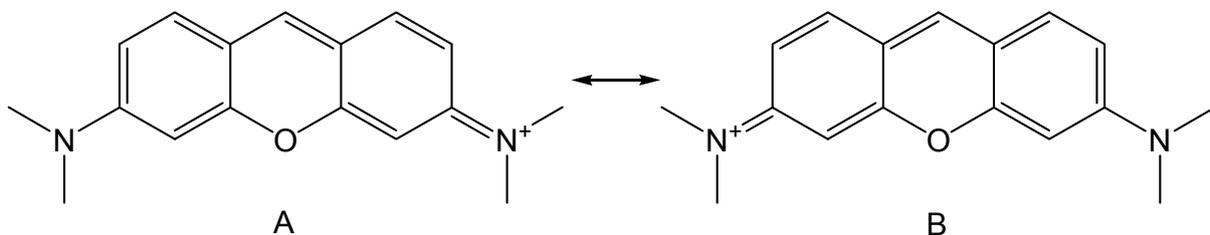
Tabelle 4-19: Verschiebung des Emissionsmaxima in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität  $\epsilon_r$  [ $\text{A s V}^{-1} \text{m}^{-1}$ ]  
rot: bathochromer Shift, blau: hypsochromer Shift.

Das Coumarinderivat ATTO 425 weist die größte spektrale Verschiebung von 27 nm auf. Dies ist auf die mesomeren Formen des Chromophors zurückzuführen.



Im elektronischen Grundzustand ähnelt die  $\pi$ -Elektronendichteverteilung des Moleküls der mesomeren Form A. Wird die polare mesomere Form B stabilisiert, so resultiert daraus eine Verschiebung des Absorptions- und Emissionsbandes zu längeren Wellenlängen. Eine Stabilisierung tritt unter anderem dann auf, wenn das Molekül von polaren Lösungsmittelmolekülen umgeben ist.

Anders ist es bei den Rhodamin- und Fluoresceinderivaten. Die  $\pi$ -Elektronendichteverteilung in den Chromophoren von Xanthen-Derivaten kann mit den beiden identischen mesomeren Strukturen A und B beschrieben werden (hier am Beispiel eines Pyronins gezeigt).



Da die beiden Strukturen eine identische Gewichtung im System haben, besitzen Xanthen-Farbstoffe weder im Grundzustand, noch im elektronisch angeregten Zustand, ein permanentes Dipolmoment parallel zur Moleküllängsachse. Da das Übergangsmoment der Hauptabsorptionsbande auch parallel zur Moleküllängsachse verläuft, ist die Abhängigkeit des Absorptions- und Emissionsspektrums von der Lösungsmittelpolarität vernachlässigbar gering.

Dies gilt für die Oxazinfarbstoffe. Oxazine haben ebenfalls zwei identische mesomere Strukturen. Sie zeigen daher keine Beeinflussung durch die Polarität des Lösungsmittels.

In Abbildung 4-38 werden exemplarisch die Spektren von drei Farbstoffen in den fünf verwendeten Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität gezeigt.

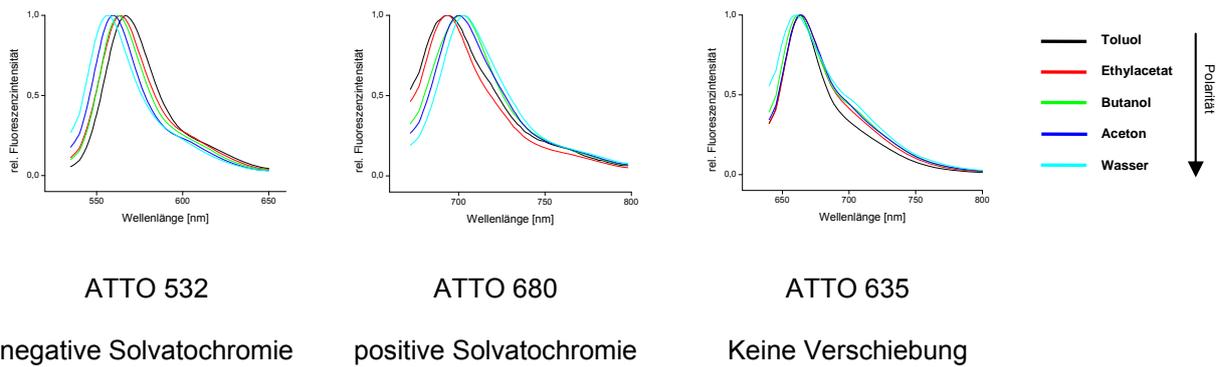


Abbildung 4-38: Emissionsspektren der Farbstoffe ATTO 532, ATTO 680 und ATTO 635 in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität.

ATTO 532 zeigt eine schwache hypsochrome Verschiebung von 11 nm. Dies passt zu den Eigenschaften eines Rhodaminderivats. ATTO 680 zeigt eine geringe bathochrome Verschiebung von 10 nm. Als Oxazinderivat zeigt es kaum einen Effekt auf veränderte Lösungsmittelpolarität. ATTO 635 hat, für Carbopyronine typisch, eine vernachlässigbare Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität.

Bis auf das Coumarinderivat weist keiner der untersuchten Farbstoffe eine große Verschiebung des Emissionsmaximums auf. Meistens betragen die Verschiebungen weniger als 20 nm. Dies kann als vernachlässigbar angesehen werden, wenn man beachtet, dass Anstiege erklärt werden sollen, welche oft 3 bis 5 fach höher sind als erwartet.

Allgemeine Lösungsmittelleffekte scheinen daher nicht der Grund für die Fluoreszenzverstärkung nach Reaktion mit hAGT zu sein.

#### 4.12.2. SPEZIFISCHE LÖSUNGSMITTELEFFEKTE

Die beschriebenen allgemeinen Lösungsmittelleffekte sind eine Folge der Anwesenheit aller umgebenden Lösungsmittelmoleküle. Sie spiegeln den kollektiven Einfluss aller Moleküle wider. Allgemeine Lösungsmittelleffekte treten auf Grund der elektronischen Polarisierbarkeit des Lösungsmittels auf, welche durch den Brechungsindex beschrieben wird, und auf Grund der molekularen Polarisierbarkeit des Lösungsmittels, welche, als Funktion der Dielektrizitätskonstante, auf die Orientierung der Dipole zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu kommen spezifische Lösungsmittelleffekte durch Wechselwirkungen mit einem oder wenigen umgebenden Molekülen zustande. Sie werden durch die chemischen Eigenschaften von Fluorophor und Lösungsmittelmolekül verursacht. So können schon kleine Mengen von Aceton die Spektren der Farbstoffe stark verändern, obwohl die Anzahl ihrer Moleküle viel zu gering ist, um die gesamte Masse der Lösungsmittelmoleküle zu beeinflussen. Die Polarität bleibt somit quasi unverändert. Spezifische Lösungsmittelleffekte kommen beispielsweise durch Wasserstoffbrückenbindungen, Säure-Base Chemie oder auch *charge-transfer* Wechselwirkungen zustande.

Spezifische Lösungsmittelleffekte sollten hier untersucht werden, indem die Emissionsspektren der Fluorophore und der BG-Substrate in Toluol ( $\epsilon_r=5 \cdot \text{A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ) mit verschiedenen prozentualen Anteilen von Aceton ( $\epsilon_r=21,4 \cdot \text{A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ) gemessen wurden. Abbildung 4-39 zeigt die Emissionskurven einiger Farbstoffe und BG-Substrate bei unterschiedlichen Konzentrationen an Aceton in Toluol.

## Experimente und Ergebnisse

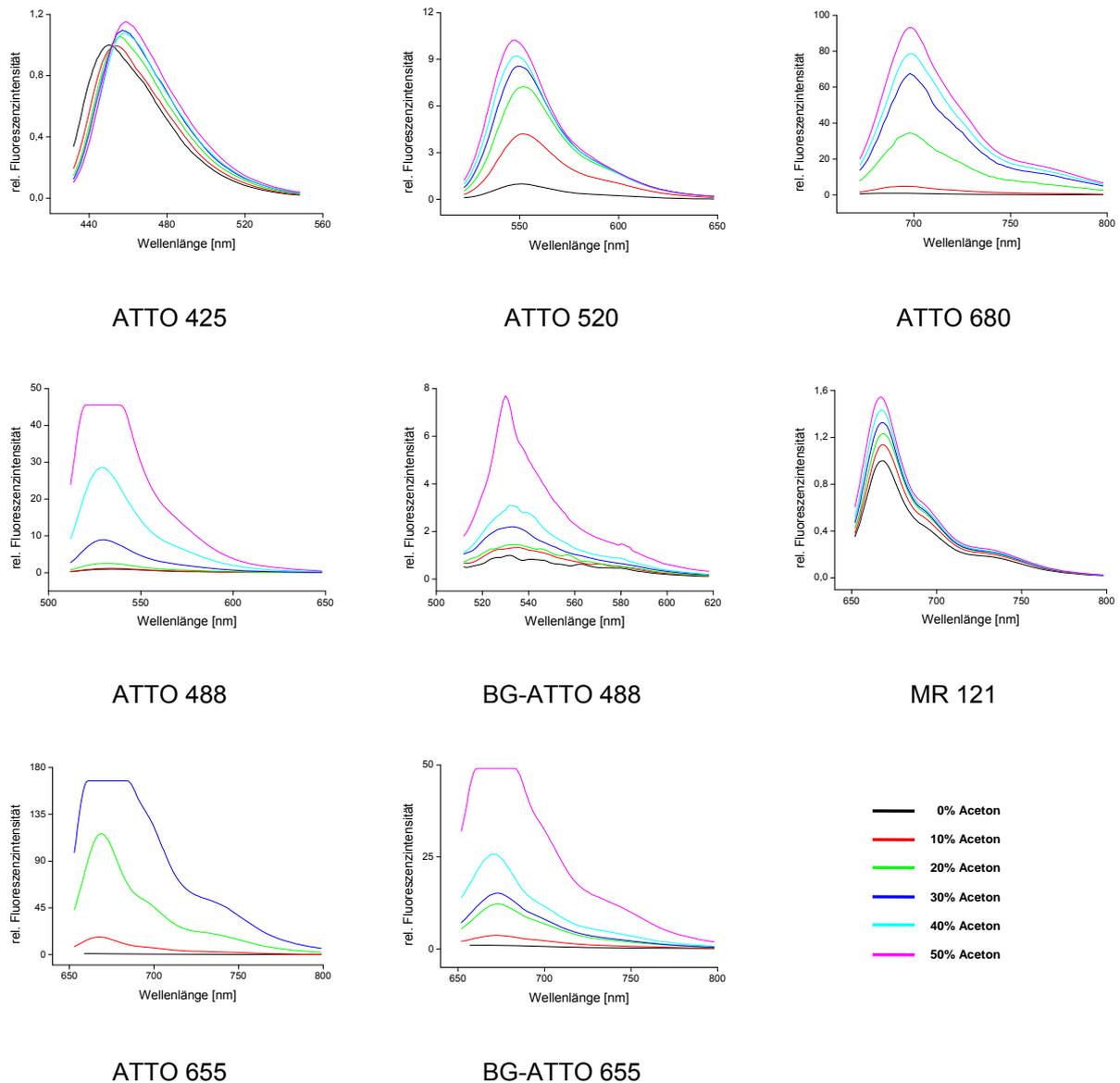


Abbildung 4-39: Emissionsspektren verschiedener Farbstoffe und BG-Substrate in Toluol-Aceton Gemischen. Prozentualer Anteil von Aceton in Toluol: 0% (schwarz), 10% (rot), 20% (grün), 30% (blau), 40% (hellblau), 50% (rosa).

ATTO 425 ist der einzige Farbstoff, welcher bei steigender Acetonkonzentration eine Verschiebung zu längeren Wellenlängen erfährt. Dies ist auf die, wenn auch minimale, Zunahme der Polarität des Lösungsmittels zurückzuführen. Toluol hat eine Dielektrizitätskonstante  $\epsilon_r$  von  $5 \cdot A \cdot s \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$ , während Aceton ein  $\epsilon_r$  von  $21,4 \cdot A \cdot s \cdot V^{-1} \cdot m^{-1}$  besitzt. Eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität ist jedoch nicht vorhanden. ATTO 425 zeigt keine sekundären Lösungsmittelleffekte, jedoch eine negative Solvatochromie.

Da es sich bei den anderen Farbstoffen um Rhodamine und Oxazine handelt, erfahren diese durch die geringe Zunahme der Polarität bei Zugabe von Aceton keine Verschiebung der Emissionswellenlänge. Die Intensität der Emission verstärkt sich jedoch bei manchen Farb-

stoffen drastisch. ATTO 680 und ATTO 655 zeigen eine extreme Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration des Acetons. Somit weisen sie große sekundäre Lösungsmittelleffekte auf. Bei ATTO 655 sind diese Effekte sehr viel stärker als bei ATTO 680. Jedoch ist gerade ATTO 680 mit einem ~30 fachen Anstieg nach Reaktion mit hAGT ein Farbstoff, der sehr stark beeinflusst werden sollte. Dies lässt den Schluss zu, dass noch andere Effekte auf den Farbstoff einwirken müssen, wenn er an Protein gekoppelt ist.

MR 121 zeigt eine äußerst geringe Abhängigkeit von der Acetonkonzentration. Auch dieser steigt aber 17 fach an bei einer Quantenausbeute von 0,08. Andererseits zeigt ATTO 488 einen sekundären Lösungsmittelleffekt, obwohl sich die Intensität des Farbstoffs bei Kopplung an das Protein nicht verändert. Dies ist verwunderlich, da seine Quantenausbeute bei 0,09 liegt.

Vergleicht man ATTO 655 mit dem BG-ATTO 655 Substrat, erkennt man, dass das Substrat eine sehr viel schwächere Abhängigkeit vom Lösungsmittel zeigt. Dies liegt an der Nähe des Benzylguanins zum Farbstoff. Benzylguanin schirmt in gewissem Maße Lösungsmittelmoleküle ab. Das selbe Resultat ergibt sich für ATTO 488 und dessen BG-Substrat. Auch hier ist der Einfluss auf das Emissionsspektrum nach Ankopplung an das Benzylguanin geringer.

Einige Farbstoffe zeigen einen Einfluss der spezifischen Lösungsmittelleffekte auf spektroskopische Eigenschaften. Dies kann teilweise die Verstärkung der Intensität des Farbstoffs nach der Markierung des Proteins erklären (zum Beispiel bei BG-ATTO 655 oder BG-ATTO 680). Jedoch sind nicht alle Farbstoffe von Lösungsmittelleffekten beeinflussbar.

Spezifische Lösungsmittelleffekte können beim Betrachten obiger Ergebnisse nicht auf Struktureigenschaften von Farbstoffklassen zurückzuführen sein. Vielmehr werden sie von den chemischen Eigenschaften jedes einzelnen Farbstoffs verursacht.

Da die Relaxationsrate aus dem angeregten Zustand und somit die Emissionsintensität auch von der Viskosität abhängt, könnte diese ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die spektralen Eigenschaften haben.

### 4.12.3. EINFLUSS DER VISKOSITÄT

Lösungsmittel höherer Viskosität beeinflussen die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren. Dies rührt daher, dass viskosere Medien zu längeren Reorganisationszeiten der umgebenden Lösungsmittelmoleküle führen, wodurch die Entpopularisierung des angeregten Zustandes beeinflusst wird.

Es ist bekannt, dass planare, starre Strukturen von Farbstoffen zu höheren Fluoreszenzeffizienzen führen können [Förster 1948]. In solchen Strukturen ist es den Farbstoffen nicht möglich ein Gleichgewicht im angeregten Zustand mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen einzustellen. Eines der beeindruckendsten Beispiele hierfür ist das Fluorescein. Dieses ist in alkalischen Lösungen, wo es in der chinoiden Form vorliegt, nicht fluoreszent. Kann sich jedoch in sauren oder neutralen Lösungsmitteln die starre, lactoide Form ausbilden, erreicht es eine Quantenausbeute von 0,90. Die Sauerstoffbrücke fixiert das Fluoresceingerüst, so dass die interne Relaxation erhöht wird und die Fluoreszenz drastisch ansteigt. Ein weiteres Beispiel ist Rhodamine B. Dieses hat in Glycerin eine Quantenausbeute von fast 1, verglichen mit 0,49 in Wasser.

Ist die Viskosität eines Lösungsmittels groß genug, wird die Gleichgewichtseinstellung mit den umgebenden Lösungsmitteldipolen im angeregten Zustand verhindert. Somit bleibt bei der Emission des Lichts die planare Konformation des Grundzustandes erhalten [Drexhage 1973].

Ein Farbstoff, welcher an ein Biomolekül gebunden ist, hat je nach Bindungsstelle ebenfalls nicht die Möglichkeit, sich im angeregten Zustand umzuorientieren. Dies kommt dem Zustand in einer viskosen Umgebung gleich. Befindet sich der Farbstoff also an einem Protein, kann es zu den gleichen Effekten kommen wie in viskosen Lösungsmitteln [Lakowicz 1999].

Tabelle 4-20 zeigt die relative Fluoreszenzintensität einiger Farbstoffe in verschiedenen Konzentrationen von Glycerin in Wasser, sowie die Verschiebung der Emissionsmaxima.

## Experimente und Ergebnisse

% Glycerin	rel. Fluoreszenzintensität										
	ATTO 425	ATTO 488	ATTO 520	ATTO 532	Rhodamine Green	ATTO 565	ATTO 620	ATTO 647N	ATTO 655	ATTO 680	MR 121
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1,01	0,93	1,09	0,97	0,94	1,17	1,48	1,8	1,11	1,24	1,19
20	1,21	0,9	1,12	0,93	0,9	1,24	1,8	1,99	1,48	1,43	1,49
30	1,45	0,85	1,16	0,9	0,86	1,33	1,78	2,7	1,52	1,85	1,5
50	1,6	0,76	1,07	0,88	0,79	1,63	1,87	3,74	1,88	2,47	1,75
70	1,9	0,69	1,01	0,85	0,75	1,88	1,93	5,26	2,03	2,73	1,89
80	1,98	0,61	0,93	0,79	0,71	2,02	2,06	6,97	2,24	2,93	1,88
Verschiebung $\lambda_{em}$ [nm]	482,5 – 479,2	521,0 – 527,3	542,8 – 549,8	551,9 – 556,6	523,7 – 531,0	584,9 – 591,4	637,8 – 643,2	660,9 – 662,9	676,9 – 684,3	695,6 – 705,1	673,1 – 682,3

Tabelle 4-20: Relative Fluoreszenzintensitäten einiger Farbstoffe in Abhängigkeit der Glycerinkonzentration.

Den stärksten Viskositätseffekt zeigt das Carborhodamin ATTO 647N. Eine steigende Glycerinkonzentration führt zu einem fast 7 fachen Anstieg bei 80% Glycerin in Wasser. Wenn man annimmt, dass die Kopplung an das Protein die Bewegung des Farbstoffs einschränkt, so dass keine Reorganisation im angeregten Zustand stattfinden kann, könnte dies den 5,6 fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Reaktion mit AGT erklären, wobei BG-ATTO 647N eine relative Quantenausbeute von 1 besitzt. Dies führt zu einer 7 fachen Fluoreszenzverstärkung.

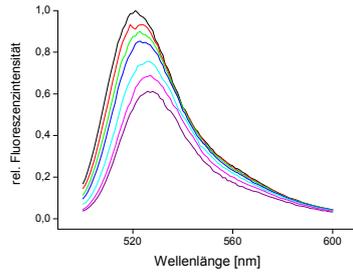
Die Oxazine zeigen ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenzintensität mit zunehmender Konzentration an Glycerin. Mit einem ~2 fachen Anstieg ist der Einfluss der Viskosität jedoch geringer als bei dem Carborhodamin. Bei MR 121 wird die Fluoreszenz um den Faktor 1,88 erhöht, wohingegen sie bei ATTO 680 um einen Faktor 2,93 steigt. Somit kann erklärt werden, weshalb, bei ungefähr gleicher Quantenausbeute von 0,08, ATTO 680 einen 28 fachen Anstieg bei Reaktion mit Protein erfährt, während sich die Fluoreszenzintensität von MR 121 nur 17 fach erhöht. Hinzu kommt, dass ATTO 680 zusätzlich noch sekundäre Lösungsmittelleffekte zeigt. Dies könnte die Diskrepanz der unterschiedlichen Fluoreszenzanstiege bei der Reaktion mit hAGT erklären.

Die übrigen Farbstoffe, bei denen es sich hauptsächlich um Rhodamine handelt, weisen kein einheitliches Verhalten auf. Während die Fluoreszenzintensität von Rhodamine Green bei einer Glycerinkonzentration von 80% auf 0,71 abfällt, steigt die von ATTO 565 um das 2 fache an.

Bis auf das Coumarinderivat ATTO 425 werden alle Farbstoffe mit zunehmender Viskosität bathochrom verschoben. Dies steht im Einklang mit der Abnahme der Polarität bei zunehmender Glycerinkonzentration. Wie schon in Kapitel 4.12.1 beschrieben werden Coumarine durch Lösungsmittelpolaritäten sehr stark beeinflusst.

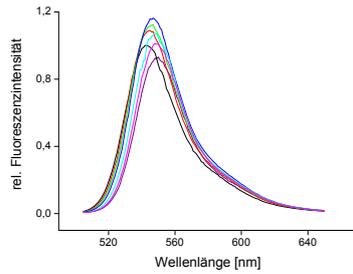
Abbildung 4-40 zeigt exemplarisch die Emissionskurven vier unterschiedlicher Farbstoffe bei steigender Konzentration an Glycerin.

ATTO 488  
(Rhodamin)



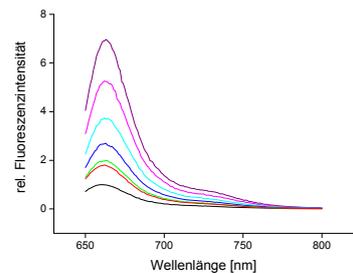
- Abfall der Fluoreszenzintensität
- bathochrome Verschiebung

ATTO 520  
(Rhodamin)



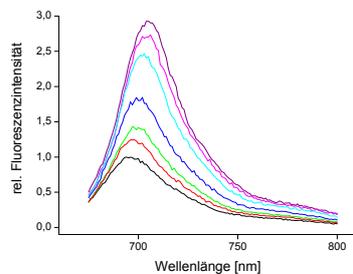
- erst Zunahme, dann Abfall der Fluoreszenzintensität
- bathochrome Verschiebung

ATTO 647N  
(Carbopyronin)



- Anstieg der Fluoreszenzintensität
- Keine Verschiebung

ATTO 680  
(Oxazin)



- Anstieg der Fluoreszenzintensität
- bathochrome Verschiebung

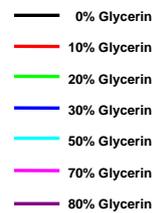


Abbildung 4-40: Emissionskurven von ATTO 488, ATTO 520, ATTO 647N und ATTO 680 bei steigender Glycérinkonzentration.

ATTO 488 zeigt einen Abfall der Fluoreszenzintensität bei steigender Viskosität. Dies könnte eine Erklärung für den fehlenden Fluoreszenzanstieg nach Reaktion mit einem Protein sein. Bei einer Quantenausbeute von 0,09 sollte man einen höheren Anstieg als 1,6 fach erwarten. Jedoch zeigt ATTO 488 eine Verstärkung der Fluoreszenz aufgrund von positiven sekundären Lösungsmittelleffekten.

ATTO 520, ebenfalls ein Rhodamin, zeigt ein vollkommen anderes Verhalten. Zunächst steigt die Fluoreszenzintensität an, dann jedoch fällt sie wieder kontinuierlich ab.

Auch ATTO 565 erfährt einen 2 fachen Anstieg bei 80% Glycerin. Dadurch könnte der 3,72 fache Anstieg bei Reaktion mit hAGT erklärt werden, da ATTO 565 als BG-Substrat nicht gelöscht vorliegt.

An diesen Beispielen sieht man sehr gut, dass das Zusammenspiel verschiedener Effekte sehr komplex ist und keine einfache Theorie das Verhalten der Farbstoffe erklären kann. Verschiedene Farbstoffklassen reagieren teilweise mit gegenläufigen Effekten hinsichtlich ihres Verhaltens als Fluorophor auf die veränderte Umgebung am Protein. Die Voraussage des Verhaltens nach Ankopplung an ein Protein ist fast nicht möglich. So kann nicht ohne weiteres im Vorfeld gesagt werden, ob ein BG-Substrat, welches gelöscht ist, am Protein auch wirklich den gewünschten Anstieg der Fluoreszenz erfährt beziehungsweise ob ein nicht gelöschter Farbstoff womöglich zu einem Fluoreszenzanstieg führt.

In *in vitro* Experimenten zeigt sich, dass vor allem Oxazine, mit einem bis zu 20 und 30 fachen Anstieg bei 37°C als Farbstoffe für gelöschte Fluoreszenzsonden optimal geeignet sind. Jedoch können auch Rhodamine und Carbopyronine zu akzeptablen Anstiegen führen (bis zu 20 fach). Im nachfolgenden Abschnitt wurde nun überprüft, ob die Sonden sich auch für *in vivo* Experimente eignen.

### **4.13. Experimente in lebenden Zellen**

Die *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass O<sup>6</sup>-BG-Farbstoffsubstrate effizient mit hAGT reagieren und dieses mit Farbstoff markieren können. Handelt es sich um ein fluoreszenzgelöschtes Substrat, kommt es zu einer Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Ankopplung an das Protein. Einige Farbstoffe erfahren durch die Bindung an hAGT zusätzlich eine Fluoreszenzverstärkung.

Nun sollte untersucht werden, ob sich die hAGT-Markierung mit den gewählten BG-Substraten auch in lebenden Zellen durchführen lässt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob bei Reaktionen mit gelöschten BG-Fluorophoren die Hintergrundfluoreszenz reduziert wird.

Bei Experimenten in lebenden Zellen erfährt das SNAP-TAG System seine größte Einschränkung. Oft zeigen die BG-Farbstoffsubstrate, beispielsweise BG-ATTO 495, eine zu schnelle Photozerstörung, oder aber das BG-Farbstoffsubstrat ist nicht zellpermeabel. Daher musste zunächst geklärt werden, ob die synthetisierten O<sup>6</sup>-BG-Fluorophore zellpermeabel sind, wie effizient die Markierung verläuft und ob die hAGT-Farbstoffsubstrate in der Zelle für die Anregung mit Quecksilberlampen oder Lasern stabil genug sind.

Hierfür wurde die Reaktion von O<sup>6</sup>-BG-Substraten mit hAGT sowohl in *E. coli* als auch in CHO-H2B Zellen untersucht.

#### **4.13.1. HAGT MARKIERUNG IN *ESCHERIA COLI***

Das endogene hAGT von *E. coli* kann mit O<sup>6</sup>-BG und dessen Derivaten nicht reagieren, so dass hAGT Fusionsproteine in *E. coli* spezifisch markiert werden können.

Nachdem durch Induktion mit IPTG das Protein in *E. coli* exprimiert wurde, sollte es mit O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstraten angefärbt werden (Abbildung 4-41). Nach 2 h Inkubation mit BG-Substrat ( $c = 5 \mu\text{M}$ ) wurden die Zellen gewaschen, um überschüssige Farbstoffsubstrate zu entfernen. Danach wurden die Bakterien mit Poly-L-Lysin fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Die Anregung erfolgte mit einer Quecksilberlampe über einen Anregungsfilter, welcher die erforderliche Anregungswellenlänge transmittiert.

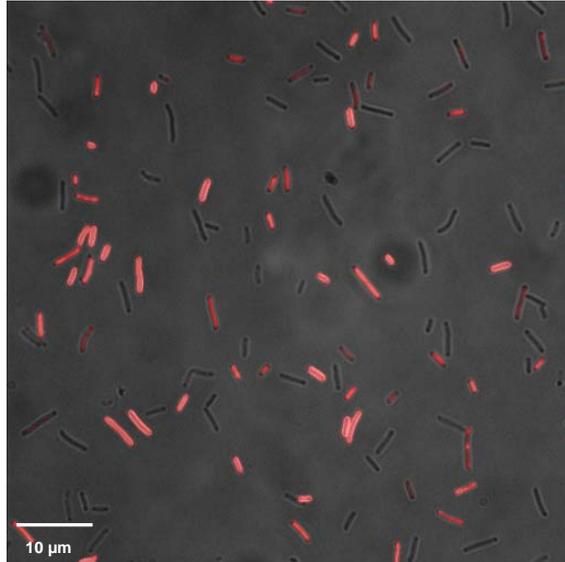


Abbildung 4-41: Überlagerung von Fluoreszenz- und Durchlichtbild von hAGT exprimierenden *E. coli*, welche mit BG-ATTO 647N angefärbt wurden.

Zur Überprüfung der Spezifität der Markierung wurden *E. coli*, welche kein Fusionsprotein exprimieren, als Blindprobe eingesetzt.

Da trotz reproduzierbaren Expressionsbedingungen die Menge an exprimiertem Protein variieren kann, wurden nur Bakterienkulturen verglichen, welche am selben Tag angezogen wurden.

Für die Anregung und Detektion der Fluorophore wurden unterschiedliche Filtersätze verwendet (Kapitel 3.10.2.). Jeder Filtersatz lässt nur eine bestimmte Wellenlänge als Anregungslicht sowie einen gewissen Anteil an Fluoreszenzlicht durch. Da die Farbstoffe unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen, erfolgt die Anregung der Farbstoffe nicht für jeden gleich effizient. Das selbe gilt für die Detektion der Fluoreszenz. Da nur ein gewisser Anteil an Fluoreszenzlicht von einem Filter transmittiert wird, ist die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffs unterschiedlich stark. Um die Fluoreszenzintensitäten der markierten *E. coli*, die mit dem selben Filtersatz vermessen wurden, vergleichen zu können, muss der Unterschied in Anregungs- und Emissionseffizienz berücksichtigt werden. Dazu wurden die Überlappungsintegrale der Transmissionskurven der Filter mit den Absorptions- beziehungsweise Emissionsspektren der Farbstoffe berechnet. Die Multiplikation der Überlappungsintegrale für Absorption und Emission ergibt den prozentualen Anteil an Licht, der im Optimalfall mit dem verwendeten Filtersatz und dem Farbstoff erreicht werden kann.

Der Anteil des detektierten Lichts (DL) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$DL = \int A(x)dx \cdot \int E(x)dx \cdot \int T_{Abs}(x)dx \cdot \int T_{Em}(x)dx$$

wobei  $A(x)$  die Absorptionskurve des Farbstoffs ist,  $E(x)$  die Emissionskurve,  $T_{Abs}$  die Transmission des Lichts durch den Anregungsfilter und  $T_{Em}$  die Transmission des Emissionsfilters.

Folgende Effizienzen ergaben sich für die Detektion der unterschiedlichen Farbstoffe (Tabelle 4-21).

Substrat	Überlappungsintegral Absorption	Überlappungsintegral Emission	Effizienz
BG-ATTO 425	2,59	28,88	0,007
BG-ATTO 495	27,69	37,18	0,103
BG-ATTO 520	13,28	28,78	0,038
BG-ATTO 620	14,95	17,58	0,026
BG-ATTO 633	23,62	25,87	0,061
BG-ATTO 635	23,28	25,99	0,061
BG-DY 630	25,39	15,92	0,040
BG-ATTO 647N	14,89	27,93	0,042
BG-CY 5	14,82	23,36	0,035
BG-MR 121	14,89	26,92	0,040
BG-CY 5	14,82	23,36	0,035

Tabelle 4-21: Effizienz der Fluoreszenzdetektion beim verwendeten Filtersatzes für jeden Farbstoff.

Die Werte der Effizienz wurden mit den mittleren Fluoreszenzintensitäten der Bakterien verrechnet. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der *E. coli* wurden erhalten, indem eine Partikelerkennung angewendet wurde, welche jeden fluoreszierenden *E. coli* eines Bildes erkannte. Die Fluoreszenzintensitäten der *E. coli* eines Bildes wurden gemittelt, wodurch die mittlere Fluoreszenzintensität des gesamten Bildes bestimmt wurde. Aus der Berechnung der Intensität mehrerer Bilder eines Farbstoffs ergab sich die Standardabweichung. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde nun mit der Effizienz so verrechnet, dass man zu einer mittleren Fluoreszenzintensität kam, welche einer 100%igen Anregung und Detektion entsprechen

würde. Dieser Wert wurde wiederum mit der absoluten Quantenausbeute multipliziert. Die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe wurden in die Berechnung nicht mit einbezogen. Die so erhaltenen Werte der mittleren Fluoreszenzintensität und deren Standardabweichung lassen einen Vergleich von Farbstoffen, die mit dem selben Filtersatzes gemessen wurden, zu.

Tabelle 4-22 zeigt die Bilder der markierten *E. coli*, welche unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskop erhalten wurden. Ebenfalls sind die dazugehörigen Durchlichtbilder dargestellt. Vergleicht man Durchlichtbild mit Fluoreszenzbild, erhält man einen ungefähren Einblick, wie viel Prozent der hAGT exprimierenden Bakterien markiert wurden.

Die Blindproben zeigten alle, dass die BG-Sonden, welche nicht binden, effektiv aus dem Bakterium gewaschen werden. Manche Farbstoffe zeigen eine geringe Anfärbung der *E. coli*, doch ist diese verglichen mit den Intensitäten der positiven Proben verschwindend gering. Aufgrund der fehlenden Aussagekraft der Bilder der Blindproben sind diese nicht dargestellt.

## Experimente und Ergebnisse

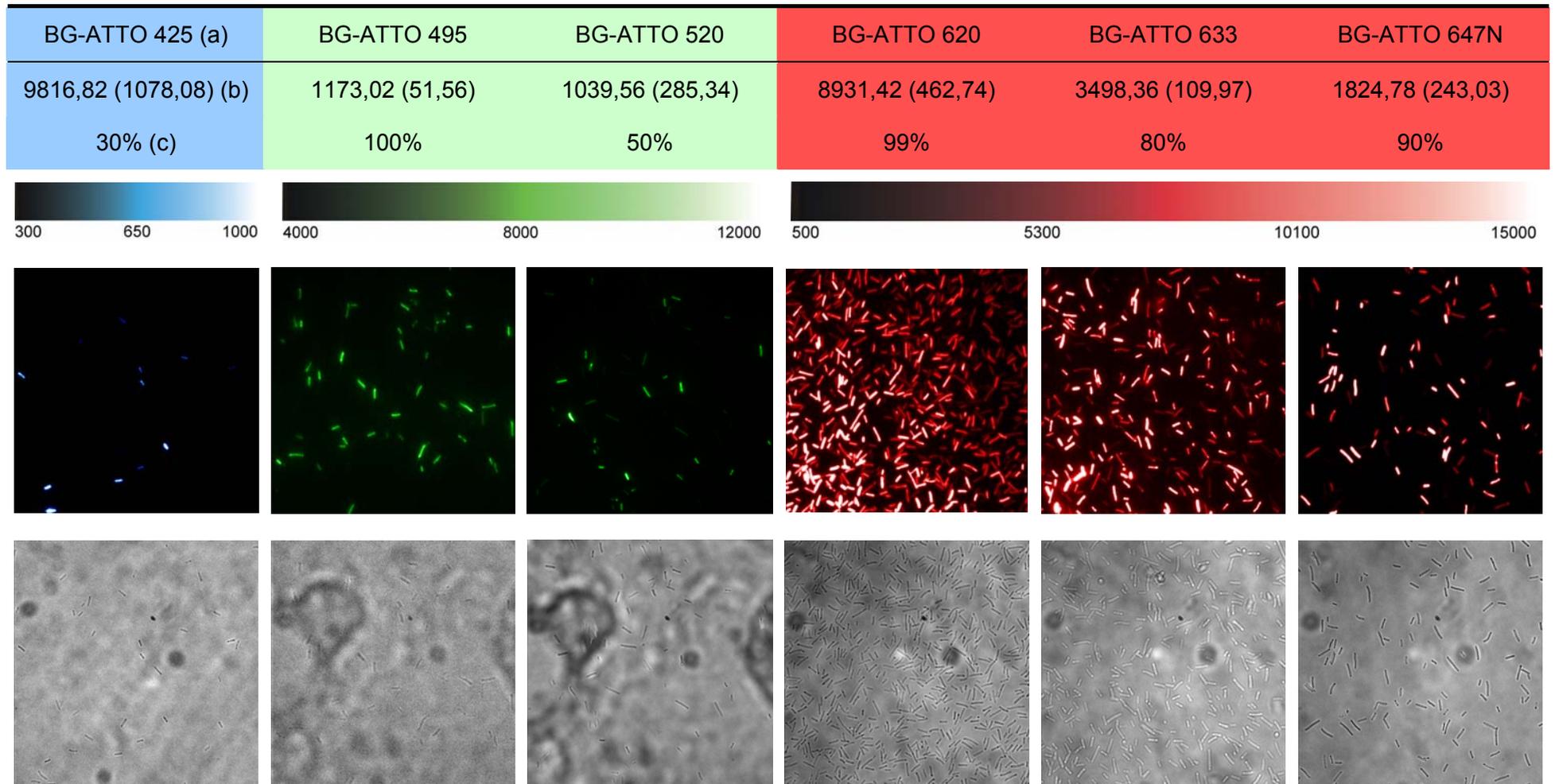


Tabelle 4-22: Fluoreszenz- und Durchlichtbilder der hAGT exprimierenden *E. coli*, angefärbt mit dem jeweiligen unter (a) genannten Substrat; (b) relative Fluoreszenzintensität der markierten Zellen mit Standardabweichung; (c) Prozentsatz der angefärbten Zellen einer Probe.

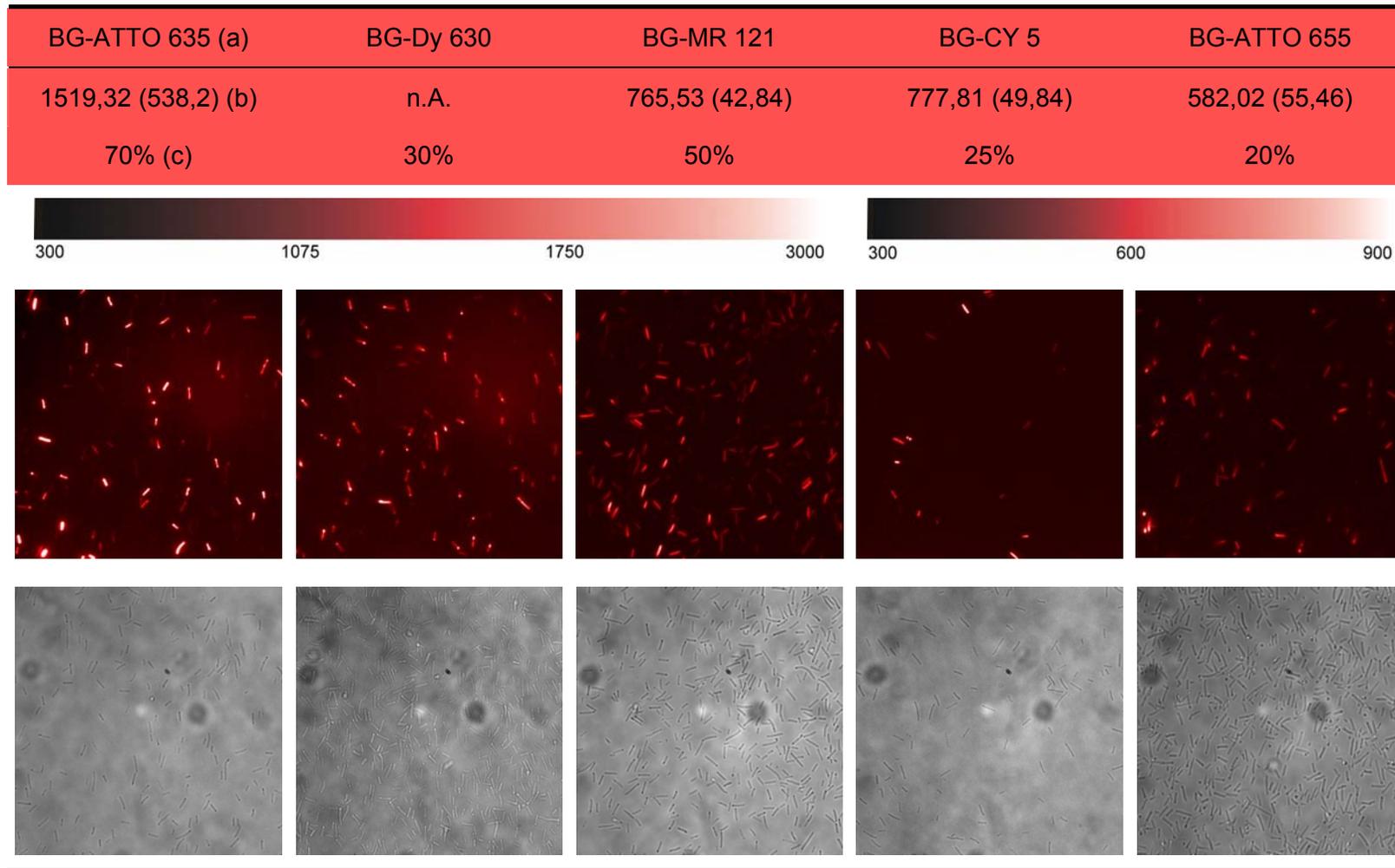


Tabelle 4-23: Fluoreszenz- und Durchlichtbilder der hAGT exprimierenden *E. coli*, angefärbt mit dem jeweiligen unter (a) genannten Substrat; (b) relative Fluoreszenzintensität der markierten Zellen mit Standardabweichung; (c) Prozentsatz der angefärbten Zellen einer Probe.

Das BG-Substrat, welches am besten durch die Zellmembran gelangt und die effizienteste Reaktion mit hAGT durchführt, zeichnet sich dadurch aus, dass es eine sehr hohe mittlere Fluoreszenz aufweist. Außerdem ist es in der Lage, einen hohen Prozentsatz an *E. coli* Bakterien anzufärben.

Für den roten Wellenlängenbereich sind es vor allem die Substrate BG-ATTO 620 und BG-ATTO 633, welche sich hervorragend für die Anfärbung von hAGT in *E. coli* eignen. Neben einer großen Anzahl von Bakterien, welche sie in einer Probe anfärben, weisen sie mit 8931,42 und 3498,36 die höchsten mittleren Fluoreszenzwerte auf. Die beiden Substrate basieren auf zwei Farbstoffen, die sich durch ihre sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute sowie hohe thermische und photochemische Stabilität auszeichnen. Daher eignen sich im roten Spektralbereich die Substrate BG-ATTO 620 und BG-ATTO 633 außerordentlich gut für die Markierung von Proteinen in *E. coli*.

Ebenfalls akzeptable Ergebnisse liefern die Substrate BG-ATTO 635 und BG-ATTO 647N. Mit mittleren Fluoreszenzintensitäten von 1519,32 und 1824,78 kann man ihre Helligkeit als durchschnittlich betrachten. Ihre prozentuale Anfärbung der Bakterien ist mit 70% und 90% sehr gut.

Schlechte Resultate hingegen liefern die auf Cyanin- und Oxazinstrukturen basierenden Substrate BG-CY 5 und BG-DY 630, sowie BG-MR 121 und BG-ATTO 655. Sie sind nur bei 30% der *E. coli* in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen. Außerdem liegt die mittlere Fluoreszenzintensität zwischen 500 und 700, was einer schlechten Ausbeute gleichkommt. Diese Substrate eignen sich weniger für die hAGT-Markierung in *E. coli*.

Die größte mittlere Fluoreszenzintensität resultiert aus der Reaktion des BG-ATTO 425 mit hAGT. Dieses Substrat färbt jedoch nur 30% der Zellen an.

Das Rhodaminderivate BG-ATTO 520 sowie das Acridin Orange Derivat BG-ATTO 495 liefern beide mäßig gute Ergebnisse. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten liegen bei 1000. Jedoch färbt BG-ATTO 495 100% der Zellen an. Dies ist vermutlich auf die relativ kleine Struktur des Farbstoffs zurückzuführen, wodurch er eine leichte Membrandurchgängigkeit besitzt. Jedoch wird dieser Farbstoff sehr schnell photozerstört und eignet sich daher nicht für die Anregung mit Quecksilberlampen oder gar Lasern.

Die schlechtesten Resultate wurden mit Oxazinen und Cyaninen erhalten. Dies könnte auf die Größe der Substrate zurückgeführt werden. Wie in Kapitel 4.13.2. beschrieben wird, sind diese Substrate ebenfalls nicht in der Lage, Säugerzellen anzufärben. Die beiden Farbstoffklassen sind sehr voluminös und eignen sich daher sehr schlecht dazu, Zellmembranen zu durchdringen.

Die Rhodaminderivate, welche kleinere Molekülgerüste besitzen, gelangen leichter durch die Zellmembran und führen zu einer effizienteren Markierung des hAGT. Das kleinste, in obigen Versuchen verwendete Molekül, stellt das BG-ATTO 495 dar. Mit einer 100%igen Anfärbung der *E. coli* weist es auch die beste Membrangängigkeit auf.

Die Auswirkungen der Größe der Moleküle auf die Fähigkeit, Zellmembranen zu überwinden, wird ausführlich in Kapitel 4.13.2. erläutert.

Alle hier getesteten BG-Fluorophore sind in der Lage, *E. coli* spezifisch anzufärben. Obwohl es manchen Farbstoffen besser gelingt, durch die Zellmembran zu gelangen, wie beispielsweise den Carbopyroninen und Rhodaminen.

Aufgrund der leicht durchführbaren Waschschriffe bei Experimenten mit *E. coli* ist in diesen Versuchen die Fluoreszenzlöschung nicht gebundener Substrate von geringerem Interesse. Die Anfärbung verläuft so selektiv, dass mit einem Fluoreszenzmikroskop keine unspezifisch adsorbierten BG-Fluorophore detektiert werden können, welche durch das Waschen nicht entfernt wurden. Für sensitivere Anwendungen, wie beispielsweise die Einzelmolekülspektroskopie, kann die Verwendung gelöschter Substrate, wie beispielsweise BG-MR 121, von großem Vorteil sein. Unspezifische Hintergrundfluoreszenz wird in diesem Verfahren sehr viel genauer detektiert und separiert.

#### 4.13.2. HAGT MARKIERUNG IN SÄUGERZELLEN

Das kovalente und spezifische Markieren von AGT-Fusionsproteinen in *E. coli* hat gezeigt, dass O<sup>6</sup>-BG-Substrate die Zellmembran von Bakterien durchdringen können und dort spezifisch mit AGT reagieren. Nun sollte versucht werden, dies auf das Markieren von AGT in Säugerzellen anzuwenden. Hier wäre eine reduzierte Hintergrundfluoreszenz durch Löschung des Farbstoffs am O<sup>6</sup>-BG-Substrate von besonderem Interesse. Zeitaufwändige Waschschriffe im Anschluss an die Inkubation des Substrats würden dadurch überflüssig.

Für die Markierung von Fusionsproteinen in Säugerzellen wurden AGT-defiziente CHO Zellen (Chinesische Hamster Ovarien) mit Expressionsvektoren transfiziert, die das Gen eines AGT-Fusionsproteins enthielten. Die Zelllinien wurden von der Firma Covalys (Witterswill, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung der AGT-Markierung wurde das Fusionsprotein im Nukleus lokalisiert. Nach Anfärbung mit den O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstraten wurde die Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Zur Markierung der Proteine können nur BG-Substrate verwendet werden, welche membrangängig sind. Daher mussten die Substrate zuerst auf diese Eigenschaft hin untersucht werden.

Neben der spezifischen Markierung des Zellkerns sollte weiterhin herausgefunden werden, welche Substrate auf Grund der Löschung des Farbstoffs besonders gut zur bildgebenden Analytik geeignet sind.

Hierzu wurden folgende 21 Substrate getestet: BG-488, BG-495, BG-DY 505, BG-Rhodamine Green, BG-520, BG-FAM, BG-TET, BG-Rhodamin B, BG-Eosin, BG-TAMRA, BG-565, BG-590, BG-620, BG-633, BG-635, BG-647N, BG-CY 5, BG-DY 113, BG-DY 630, BG-MR 121. In einem typischen Experiment zur Anfärbung des AGT wurden die Zellen 30 Minuten mit 5 µM BG-Substrat inkubiert. Nach anschließendem Mediumwechsel wurden sie nochmals 30 Minuten gewaschen. Während der Inkubationszeit dringt das BG-Farbstoffsubstrat in die Zelle ein und reagiert mit dem AGT Fusionsprotein. Auf Grund unterschiedlicher Zellpermeabilität gelangen die Substrate unterschiedlich gut in die Zelle. Bei den verwendeten CHO-H2B Zellen wird der Kern angefärbt, da dort das Zielprotein exprimiert wird. Abbildung 4-42 zeigt Fluoreszenzbilder von CHO-H2B Zellen nach Anfärbung mit BG-Rhodamine Green (links) und BG-DY 630 (rechts).

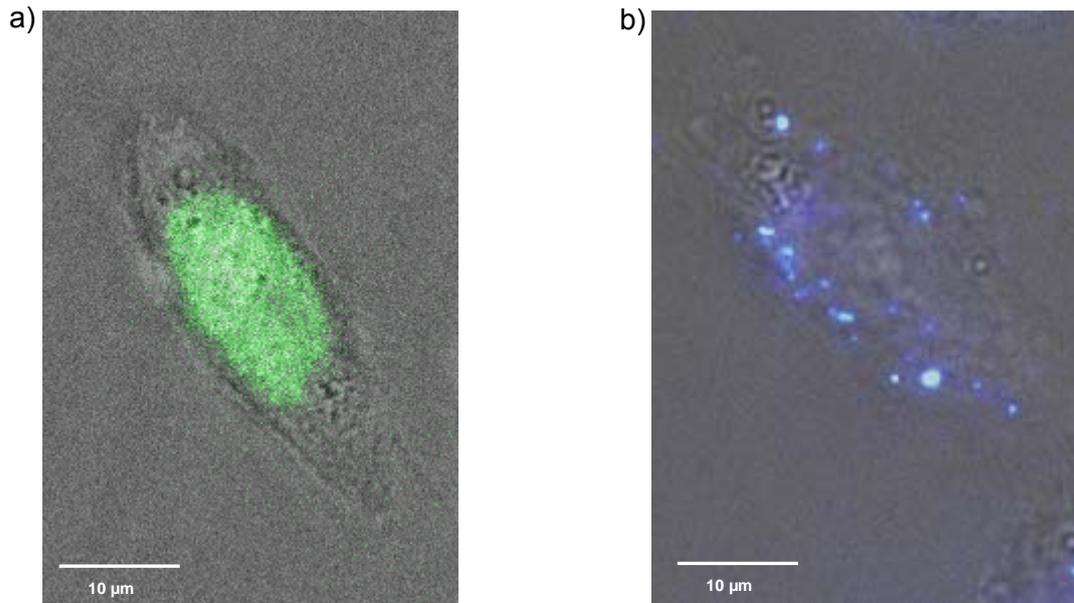


Abbildung 4-42: Markierung von CHO-H2B Zellen mit a) BG-Rhodamine Green und b) BG-DY 630.

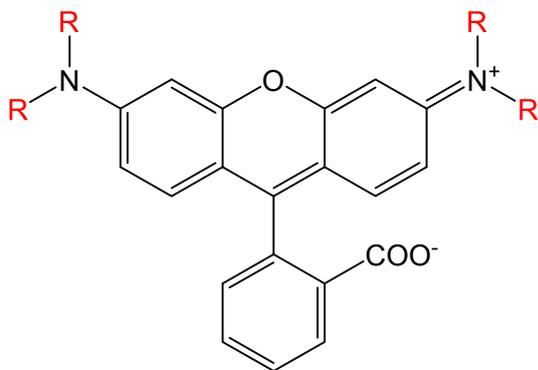
Die Bilder lassen deutlich erkennen, dass BG-Rhodamine Green ausschließlich den Zellkern markiert. BG-DY 630 hingegen liefert eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma. Eine gezielte Anfärbung des Kerns kann mit diesem Substrat nicht erreicht werden.

Die Experimente zeigten schnell, dass nur die Substrate BG-Rhodamine Green und BG-FAM den Zellkern anfärben können.

Daher stellt sich die Frage, welche Eigenschaften ein Substrat zellpermeabel machen, und weshalb andere Substrate nicht zum Zellkern vordringen können.

Um diese Frage zu beantworten werden hierfür zunächst die Strukturen der drei kommerziell erhältlichen Rhodaminderivate Rhodamine Green, Tetramethylrhodamine (TMR) und Rhodamin B betrachtet (Abbildung 4-43).

Rhodamine



	R
Rhodamine Green	H
TMR	CH <sub>3</sub>
Rhodamine B	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

Abbildung 4-43: Strukturen der Rhodaminderivate Rhodamine Green, TMR und Rhodamine B.

Die drei Rhodamine unterscheiden sich in ihrer Struktur durch die Substituenten an den Stickstoffatomen (R). Während R in Rhodamine Green Wasserstoffatomen entspricht, wodurch sterisch anspruchslose Aminogruppen an Position 3 und 6 vorliegen, sind es bei TMR zwei Methylgruppen, wodurch sterisch anspruchsvollere Dimethylaminen an Position 3 und 6 vorliegen. Bei Rhodamine B führen je zwei Ethylgruppen zu Diethylaminen. In den Experimenten wurde anstelle von TMR das strukturell verwandte Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) eingesetzt. Dieses unterscheidet sich lediglich durch eine Carboxylgruppe an Position 5 des 2-Carboxyphenyls. Diese wird mittels N-Hydroxysuccinimid (NHS) in einen Succinimidylester (SE) umgewandelt, welcher zur Ankopplung an das Benzylguanin nötig ist. Ebenso wurden von Rhodamine Green der Succinimidylester verwendet und von Rhodamine B das entsprechenden Isothiocyanat. Diese besitzen indes keine eigenen Trivialnamen. In den Experimenten zeigte sich, dass BG-Rhodamine B und BG-TAMRA nicht zellpermeabel sind. Mit BG-Rhodamine Green hingegen konnte der Zellkern angefärbt werden. Dies lässt vermuten, dass die Größe der Farbstoffe, beziehungsweise der O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Substrate, eine entscheidende Funktion für die Membranpermeabilität der Substrate hat.

Bei weiteren Betrachtungen zeigt sich, dass BG-DY 505, welches den Farbstoff Dyomics 505 trägt, ebenfalls nicht zelldurchlässig ist. Dies ist erstaunlich, da sich Rhodamine Green und Dyomics 505 nur durch eine aliphatische Kette unterscheiden (Abbildung 4-44).

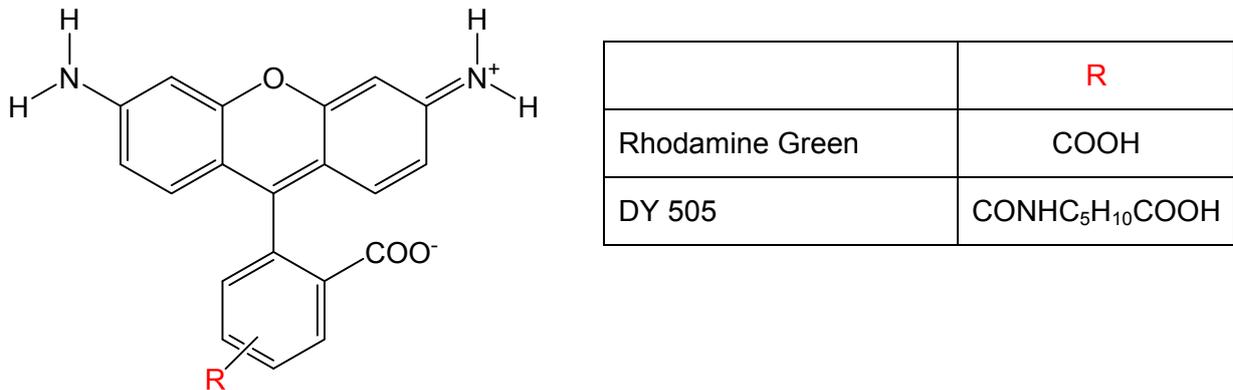
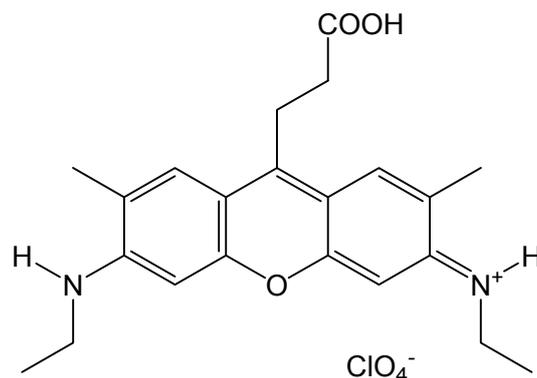


Abbildung 4-44: Strukturen von Rhodamine Green und Dyomics 505.

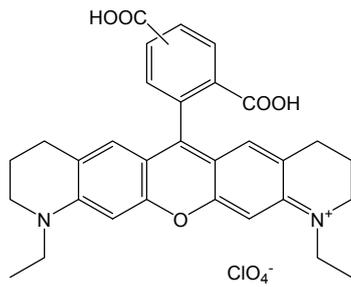
Dies zeigt, dass sich nicht nur eine geringe Vergrößerung des Moleküls negativ auf die Zellpermeabilität auswirkt, sondern auch zu lange Seitenketten diesen Einfluss haben.

Die übrigen eingesetzten Rhodaminderivate sind ebenfalls nicht in der Lage, den Zellkern anzufärben. ATTO 520 trägt neben zwei Monoethylaminogruppen an Position 3 und 6 des Xanthengerüsts an Position 2 und 7 jeweils eine Methylgruppe.

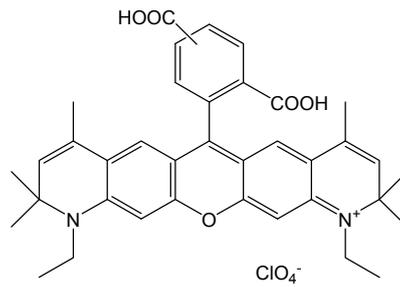


ATTO 520

Das Xanthengerüsts wird durch diese Substituenten wiederum zu groß, um zellpermeabel zu sein. ATTO 565 und ATTO 590 weisen durch zwei annelierte Ringe an Position 3 und 6 eine noch umfangreichere Struktur auf.



ATTO 565



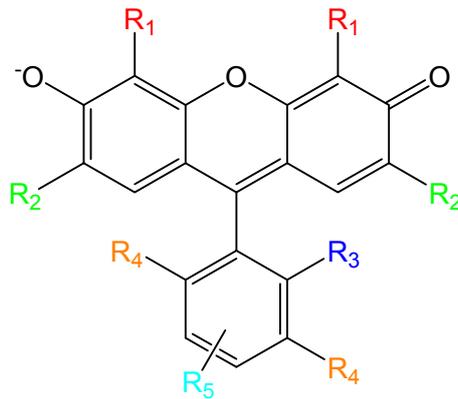
ATTO 590

Die beiden Benzylguanin-Substrate von ATTO 565 und ATTO 590 sind daher aufgrund ihrer Größe nicht zellpermeabel.

Die Struktur von ATTO 488 ist leider nicht offengelegt, weshalb das Verhalten von BG-ATTO 488 nicht geklärt werden kann.

Um dem Sachverhalt des Größenausschlusses der Substrate genauer auf den Grund zu gehen, wurden die fünf Fluoresceinderivate Carboxyfluorescein (FAM), Oregon Green, Pennsylvania Green, Tetrachlorofluorescein (TET) und Tetrabromofluorescein (hier als Eosin bezeichnet) untersucht (Abbildung 4-45).

Fluoresceine



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
FAM	H	H	COOH	H	COOH
Oregon Green	H	F	COOH	H	COOH
Pennsylvania Green	H	F	CH <sub>3</sub>	H	COOH
TET	H	Cl	COOH	Cl	COOH
Eosin	Br	Br	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COOH

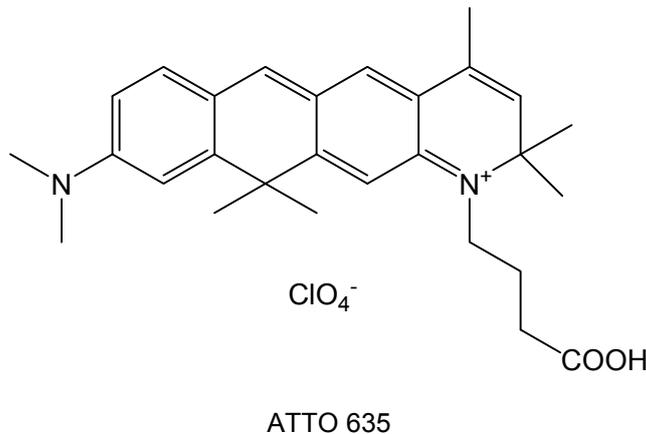
Abbildung 4-45: Strukturen der Fluoresceinderivate Carboxyfluorescein, Oregon Green, Pennsylvania Green, TET und Tetrabromofluorescein (Eosin).

Die fünf Fluoresceinderivate unterscheiden sich in ihren Substituenten R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> und R<sub>5</sub>. FAM ist mit lediglich zwei Carboxylgruppen und drei Wasserstoffen am kleinsten. In den Experimenten hat sich dieses Substrat als zellpermeabel herausgestellt. Es war somit fähig, den Zellkern selektiv anzufärben. Die Substrate BG-Oregon Green und BG-Pennsylvania Green wurden nicht in eigenen Experimenten untersucht. Jedoch ist aus der Literatur bekannt, dass beide in der Lage sind, den Zellkern anzufärben [Mottram 2007]. Mottram konnte weiter zeigen, dass BG-Pennsylvania Green bessere Zellpermeabilität zeigt als BG-Oregon Green. Betrachtet man die Strukturen der beiden Farbstoffe, fällt auf, dass diese sich nur in dem Substituenten R<sub>3</sub> unterscheiden. Pennsylvania Green trägt eine Methylgruppe, während diese bei Oregon Green durch eine voluminösere Carboxylgruppe substituiert ist. Abermals scheint nur ein geringer Unterschied in der Größe des Substrats der Auslöser für die Membrangängigkeit zu sein. Die Experimente mit den Substrate BG-TET ergaben keine Anfärbung des Zellkerns. TET unterscheidet sich lediglich dadurch von Oregon Green,

dass es an  $R_2$  anstelle eines Fluoratoms ein Chloratom trägt, und an  $R_4$  statt eines Wasserstoffatoms ebenfalls ein Chloratom. Abermals ist ein geringer Unterschied in der Größe ausschlaggebend für die Membrandurchlässigkeit der Sonde. Anhand dieser Überlegungen ist es vorhersehbar, dass BG-Eosin nicht in der Lage ist, den Kern zu färben. Eosin trägt als einziger Farbstoff an  $R_1$  ein Bromatom, während sich bei den anderen Farbstoffen dort ein Wasserstoffatom befindet. Ebenso trägt es ein Bromatom als Substituenten  $R_2$ . Zusätzlich trägt es an  $R_3$  eine Sulfonsäure und an  $R_5$  eine Carboxylgruppe. Damit ist das Farbstoffmolekül das größte der betrachteten Fluoresceinderivate und erwiesen sich im Experiment ebenfalls als nicht zellpermeabel.

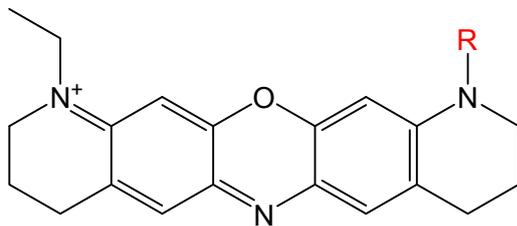
### *Carbopyronine*

Die BG-Substrate der Carbopyronine ATTO 635, ATTO 620 und ATTO 633 sind ebenfalls nicht in der Lage, in den Zellkern zu gelangen. Die Strukturen von ATTO 620 und ATTO 633 sind ebenfalls nicht freigegeben. Jedoch sind sie strukturell verwandt mit ATTO 635. Die Struktur von diesem ist mit vier annelierten Ringen sehr ausladend und daher nicht membrangängig.



Oxazine

Für O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Substrate der Farbstoffklasse der Oxazine, MR 121, DY 113 und ATTO 655, wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet. Die Struktur des ATTO 655 ist abermals nicht bekannt. Die im Grundgerüst identischen Farbstoffe MR 121 und DY 113 sind in Abbildung 4-46 zu sehen.



ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>

	R
MR 121	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> COOH
DY 113	CH <sub>2</sub> COOH

Abbildung 4-46: Strukturen von MR 121 und DY 113.

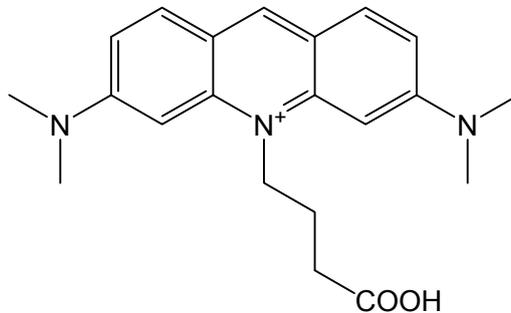
Die beiden Farbstoffe unterscheiden sich lediglich in dem Substituenten **R**. Dieser ist im Fall von DY 113 eine Essigsäure, bei MR 121 handelt es sich um einen Buttersäurelinker. Trotz sehr kurzem Linker im Fall von DY 113 ist dessen BG-Substrat nicht in der Lage, den Kern zu färben. Das den Farbstoffen zugrunde liegende Gerüst allein ist schon zu voluminös, um durch die Zellmembran zu gelangen. Der Unterschied in der Länge des Linkers ist daher in diesem Fall nicht ausschlaggebend für die Membranpermeabilität. Nicht allein das Vorhandensein eines Linkers, wie bei den beiden strukturverwandten Dyomics 505 und Rhodamine Green, darf also bei der Suche eines membrangängigen Farbstoffs berücksichtigt werden. Auch die Größe des Grundgerüsts muss in die Auswahl mit einfließen. Neben dem Linker sollte auf jeden Fall die Größe des Farbstoffs in Betracht gezogen werden.

### Cyanine

Ebenfalls sehr umfassende chromophore Systeme besitzen die Cyaninderivate Dyomics 630 und Cy 5. Dies ist typisch für Cyanine, wodurch sie nicht membrangängig sind.

Über das Verhalten des Farbstoffs ATTO 647N kann keine Aussage getroffen werden, da seine Struktur nicht freigegeben ist. Es kann aber angenommen werden, dass diesem, wie für rot fluoreszierende Farbstoffe üblich, ein erweitertes chromophores System zugrunde liegt, welches die Zellpermeabilität unterbindet.

Bei dem letzten Farbstoff, ATTO 495, handelt sich um ein Derivat von Acridin Orange. ATTO 495 hat mit drei annelierten Ringen ein relativ kleines chromophores System.



ATTO 495

Das Grundgerüst ähnelt hinsichtlich der Größe dem von TMR. Lediglich die Carboxyphenylgruppe ist durch einen Buttersäurelinker ersetzt. Ebenso wie TMR ist es dem BG-ATTO 495 Substrat nicht möglich, den Zellkern anzufärben.

Unter den getesteten Farbstoffen befinden sich sowohl hydrophobe als auch hydrophile Moleküle. ATTO 488 beispielsweise stellt einen sehr hydrophilen Farbstoff dar. Bei Aufreinigung mit der HPLC kommt er bei 25% wässriger Lösung. Ähnliches gilt für FAM, TET oder ATTO 565. Als Beispiel eines sehr hydrophoben Farbstoffes ist ATTO 647N zu nennen. Mit einer Retentionszeit von 28 Minuten kommt er bei ca. 60% wässriger Lösung. Ähnliches gilt für ATTO 635 oder Rhodamine B. Daher kann angenommen werden, dass die Wasserlöslichkeit nicht der beeinflussende Faktor für die Membrangängigkeit der BG-Substrate ist.

Große chromophore Systeme sind also nicht in der Lage, die Barriere der Zellmembran zu überwinden. Die Größenbeschränkung scheint sich jedoch innerhalb kleinster Bereiche abzuspielen. Schon der Wechsel von einem Wasserstoff zu einer Methylgruppe oder, wie im Fall von TET und Oregon Green, die Substitution eines Fluors durch Chlor kann dies verursachen. Das Ausschlusskriterium der Molekülgröße erscheint als entscheidendes Kriterium dafür, dass noch keine Farbstoffe mit Emissionswellenlängen über 520 nm gefunden wur-

den, welche als BG-Substrat membrangängig sind. Langwellige, rote Farbstoffe besitzen immer ausgedehnte chromophore Systeme.

Es wird daher eine große Herausforderung für die Synthesechemie sein, rotfluoreszierende Farbstoffe zu synthetisieren, welche klein genug sind, um durch die Zellmembran hindurch zu kommen.

Neben Methoden, welche die Sonden mechanisch in die Zelle schleusen, wie Elektroporation oder Mikroinjektion, könnte eine mögliche Methode, um rote Farbstoffe in die Zelle zu bringen, in der Verwendung von 4-(4-(Aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amine, oder kurz CP-NH<sub>2</sub>, liegen (Abbildung 4-47). Dieses ebenfalls mit hAGT reagierende Molekül besitzt anstelle des Guanins des BG-NH<sub>2</sub> ein Chlorpyrimidin. Hiermit ist es gelungen, den als BG-Substrat nicht zellpermeablen Farbstoff TAMRA membrangängig zu machen.

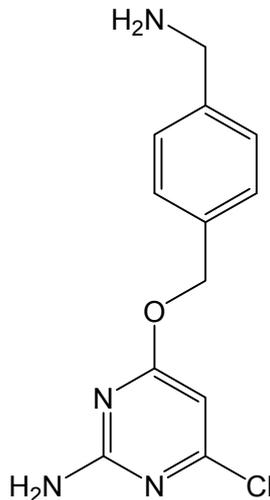


Abbildung 4-47: CP-NH<sub>2</sub> (4-(4-(aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amine).

Aufgrund der vergleichbaren Größe von TAMRA und ATTO 495 sollte es mit CP-NH<sub>2</sub> ebenfalls gelingen, diesen Farbstoff für die Markierung im Zellkern zu verwenden. Aufgrund seiner geringen photophysikalischen Stabilität eignet er sich jedoch nicht gut zur Anregung mit Lasern.

Substrate von CP-NH<sub>2</sub> sind nicht in der Lage, die Fluoreszenz von Farbstoffen effektiv zu löschen. Daher wären mögliche Substrate vielleicht in der Lage, Proteine in Zellen zu markieren. Der entscheidende Vorteil einer reduzierten Hintergrundfluoreszenz kann mit diesem Molekül jedoch nicht ausgenutzt werden.

## 5. Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurden fluoreszenzgelöschte Sonden für diagnostische und analytische Anwendungen entwickelt.

Im ersten Teil wurden SMART PROBES für den Einsatz in der Tuberkulosedagnostik weiterentwickelt. Damit gelang es, spezifisch die DNA-Sequenz von Mykobakterien nachzuweisen und Punktmutationen zu unterscheiden.

Im zweiten Teil wurde eine Methode zur hintergrundreduzierten *in vitro* und *in vivo* Proteinmarkierung erarbeitet. Diese basiert auf dem kommerziell erhältlichen SNAP-TAG System.

### SMART PROBES für die Anwendung in der Tuberkulosedagnostik

Nach den neusten Zahlen der Weltgesundheitsorganisation WHO ist die Infektion mit Tuberkulose in den letzten Jahren wieder im Zunehmen begriffen. In Osteuropa sind Zahl und Schwere der Tuberkuloseinfektionen laut internationaler Föderation der Rotkreuz- und Rothalbmond-Gesellschaften auf dem höchsten Stand seit dem Zweiten Weltkrieg. Auch weltweit gewinnt sie durch Migration an Bedeutung als Risikofaktor, vor allem für immungeschwächte Menschen mit HIV oder Krebs. Insgesamt erkranken in Europa jährlich 450 000 Menschen an der Tuberkulose. 70 000 versterben an den Folgen der Infektion.

Das besondere Interesse einer Therapie richtet sich auf die antibiotikaresistenten Erreger der Tuberkulose. Durch Behandlungsfehler nimmt die Anzahl resistenter Keime insbesondere in Ländern mit schlechterer medizinischer Infrastruktur, dramatisch zu. Die Behandlung von antibiotikaresistenten Mykobakterien ist schwieriger und dauert länger als die Behandlung einer konventionellen Tuberkulose.

Aufgrund dieses unterschiedlichen Ansprechens auf Antibiotika ist ein schnelles und sicheres Detektionssystem zur Resistenzbestimmung, das außerdem sensitiv und spezifisch arbeitet, von großem Interesse. Auf herkömmlichem Weg dauert die Testung auf den Erreger, aufgrund der hohen Generationszeit von Mykobakterien von 16 bis 20 Stunden, mehrere Wochen [Good 1998]. Obwohl es für die Routinediagnostik einige Nachweismethoden gibt, welche auf der Grundlage von fluoreszierenden Sonden basieren, ist die Nachfrage nach Systemen mit höherer Sensitivität und einfacherer Anwendbarkeit groß.

Eine genauso große Herausforderung stellt die Identifizierung der verschiedenen Mykobaktérienspezies dar. Bedingt durch die stark unterschiedliche Pathogenität sowie die unterschiedliche klinische Bedeutung ist, vor allem hinsichtlich einer adäquaten antibiotischen Behand-

lung, eine rasche und sichere Identifizierung und Differenzierung der Spezies der einzelnen Arten dringend notwendig.

SMART PROBES stellen hier eine Möglichkeit dar, diesen Ansprüchen gerecht zu werden.

In dieser Arbeit konnte die Funktionsweise sowie das Design von SMART PROBES entscheidend verbessert werden. SMART PROBES sind einfach fluoreszenzmarkierte DNA Hairpinsonden, die spezifisch durch Guanosin gelöscht werden. Es wurde gezeigt, dass sowohl die spezifische Erkennung von verschiedenen Mykobakterienspezies möglich ist, als auch die Detektion resistenzvermittelnder Mutationen mit den Sonden erkannt werden kann.

### Sondenmodellierung

Zunächst mussten die an der Universität Heidelberg in der Gruppe von Markus Sauer entwickelten Sonden [Knemeyer 2000] bezüglich ihres Designs weiterentwickelt und verbessert werden. Hierzu wurde die mykobakteriellen 16S rDNA als Modellsystem verwendet. Anhand von Modellierungen mit dem Programm *mfold* gelang es, strukturelle Merkmale der SMART PROBES, wie mögliche Sekundärstrukturen und deren freie Gibbsche Energie, sowie relative Quantenausbeute und Lebensdauer, erheblich besser vorausszusagen. Dadurch konnten Probleme wie ungenügende Löschung, schlechte Fluoreszenzanstiege nach Hybridisierung, geringe Selektivität für die Zielsequenz und Unreproduzierbarkeit der Fluoreszenzanstiege eliminiert werden. In die Modellierung flossen die Parameter Temperatur und Salzkonzentration ein. Die Zuhilfenahme von Energie Dot Plots führte zu einer exakteren Aussage bezüglich der möglichen Sekundärstrukturen als die einfache Modellierung der stabilsten Sekundärstruktur. Dot Plots erlauben es, durch eine Superposition aller möglichen Basenpaarungen Sekundärstrukturen mit ihrer freien Gibbschen Energie und die dazugehörigen Basenpaarungen zu ermitteln. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein ausbalanciertes System zwischen freier Gibbscher Energie  $\Delta G$  und der Hybridisierungsenergie, die von der Länge der Schleife abhängt, für das selektive Arbeiten der SMART PROBE nötig ist. Somit konnten SMART PROBES synthetisiert werden, die stabil genug sind, um zu einer effektiven Fluoreszenzlöschung zu führen, jedoch auch reaktiv genug sind, um eine schnelle Reaktionskinetik aufzuweisen.

Mit Hilfe dieser neuartigen Modellierung konnten spezies-spezifische SMART PROBES für die Spezies *M.xenopi*, *M.tuberculosis*, *M.fortuitum*, *M.avium*, *M.abscessus*, *M.kansasii*, *M.intracellulare* und *M.abscessus* ermittelt werden.

Mit dem Programm *mfold* wurden ebenfalls die Sekundärstrukturen der Zielsequenzen modelliert. Hierbei ergab sich, dass die Zielsequenz erst bei erhöhten Temperaturen ab zirka 50°C mit wenigen internen Basenpaarungen vorliegt. Somit konnte vorausgesagt werden,

dass erst ab einer Temperatur von 50°C die Reaktion von SMART PROBE und Zielsequenz energetisch begünstigt ist. Diese Voraussage konnte in Experimenten bestätigt werden.

### Nachweis künstlicher DNA-Sequenzen

Um die berechneten Sonden auf ihre Funktionalität zu testen und somit den Beweis zu erbringen, dass Sekundärstruktur und Hybridisierungsenergie von entscheidender Bedeutung sind, wurden für das Modellsystem der 16S rDNA sechs SMART PROBES für die Spezies *M.xenopi* entworfen (SPxenopi1-6). Diese Sonden wurden hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften untersucht.

Für die Wahl der optimalen Temperatur, bei der die Sonden noch geschlossen sind, die Gegensequenz aber schon ungepaart vorliegt, wurden die Schmelzpunkte bestimmt. Hieraus ergab sich, dass für das betrachtete System eine Temperatur von 50°C optimal ist, da bei dieser Temperatur die SMART PROBE noch geschlossen vorliegt, wodurch die Fluoreszenzlöschung maximal ist. Die Zielsequenz weist nach der Modellierung bei dieser Temperatur keine internen Basenpaarungen mehr auf, wodurch eine Hybridisierung leicht und schnell ablaufen sollte. Anhand dieser Voraussagen konnte ein maximaler Fluoreszenzanstieg mit den Sonden erzielt werden.

Ein Maß für die Güte der Fluoreszenzlöschung des Farbstoffes stellt die Quantenausbeute relativ zu der eines linearen, farbstoffmarkierten Oligonukleotids dar. Durch deren Bestimmung für die sechs SPxenopi SMART PROBES konnte belegt werden, dass die Sonden, die nach der Modellierung die geringste freie Gibbssche Energie aufweisen, auch am effizientesten gelöscht werden.

Die sechs Sonden wurden daraufhin mit künstlichen Gegensequenzen zur Reaktion gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass die Sonden, welche nach der theoretischen Berechnung eine freie Gibbssche Energie von zirka -1,5 kcal/mol besitzen weder zu stabil sind, um zu reagieren, noch zu instabil, um nicht mehr effizient gelöscht zu werden. Die größten Fluoreszenzanstiege wurden mit den Sonden SPxenopi1 und SPxenopi4 erzielt. Tabelle 5-1 gibt eine Zusammenfassung über die freien Gibbsschen Energien der sechs Sonden, die relativen Quantenausbeuten, die erzielten Fluoreszenzanstiege  $I_0/I_C$  bei 50°C und die experimentell gemessenen Schmelztemperaturen.

Hairpin	$\Delta G$ (kcal/mol)	$\Phi_{F,rel}$ (20°C)	$I_0/I_C$ (50°C)	$T_m$ [°C] exp.
SPxenopi1	-2,6	0,21	2,95	68,6
SPxenopi2	-1,5	0,24	2,56	66,1
SPxenopi3	-2,3	0,11	2,13	65,2
SPxenopi4	-1,5	0,21	3,45	64,2
SPxenopi5	0,0	0,36	2,36	60,5
SPxenopi6	+0,5	0,30	2,04	65,5

Tabelle 5-1: Freie Gibbsche Energie  $\Delta G$ , relative Quantenausbeute  $\Phi_{F,rel}$ , Fluoreszenzanstieg  $I_0/I_C$  und Schmelztemperatur  $T_m$  [°C] der sechs SMART PROBES zur Detektion von *M.xenopi*.

### Reaktionen mit PCR-Amplifikaten

Um das System auch für klinische Anwendungen zu etablieren, wurden die Sonden nach Ermittlung der optimalen Versuchsparameter mit PCR-Amplifikaten umgesetzt. Neben der Länge der Amplifikate wurde auch die Reaktionstemperatur variiert.

Auch bei Anwendung mit natürlichen Sequenzen erbrachten die Hybridisierungsversuche bei 50°C die besten Fluoreszenzanstiege. Es zeigte sich das selbe Verhalten wie bei Reaktionen mit künstlichen Sequenzen. Dies kann als weiterer Beleg für die durch die Modellierung erhaltenen Ergebnisse gesehen werden.

Hinsichtlich der Sequenzlänge erbrachte das 120 bp Amplifikat die beste Hybridisierungseffizienz mit einem zirka 5 fachen Fluoreszenzanstieg bei 100 fachen Überschuss an PCR-Produkt.

Durch die in dieser Arbeit vorgenommene Optimierung der SMART PROBE Modellierung und durch die verbesserte Vorhersagbarkeit der optimalen Reaktionsbedingungen gelang es, PCR-Amplifikate bis zu einer Konzentration von  $2 \cdot 10^{-8}$  M nachzuweisen.

Die für die Spezies *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.fortuitum* und *M.xenopi* synthetisierten Sonden konnten ebenfalls ihre Funktionalität bei der Reaktion mit fünfzehn der am häufigsten isolierten Mykobakterienspezies der Uniklinik Heidelberg beweisen. So konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage waren, spezifisch ihre komplementäre Spezies zu detektieren.

### Oberflächenbasiertes Nachweisverfahren

Um eine gesteigerte Sensitivität zu erreichen, wurde das Prinzip der SMART PROBES für ein oberflächenbasierendes Nachweisverfahren weiterentwickelt. Hierbei wurden Silicakügelchen verwendet, welche spezifische Streptavidinbindungsstellen für Biotin aufweisen. So konnten DNA Einzelstränge an die Oberfläche gebunden werden. Diese DNA Einzelstränge standen anschließend für die Hybridisierung mit SMART PROBES zur Verfügung (Abbildung 5-1).

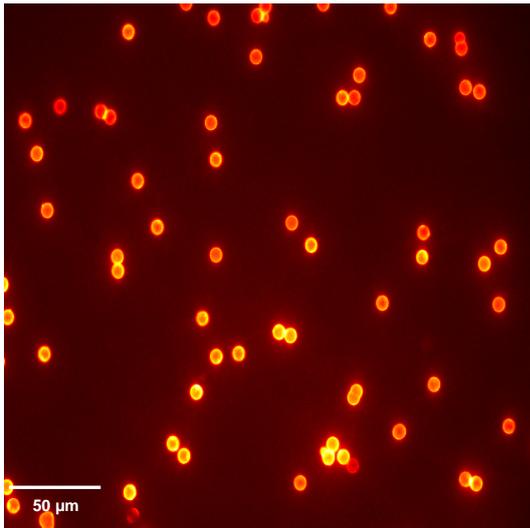


Abbildung 5-1: Nachweis von DNA-Sequenzen auf Microsphären mittels Smart Probes.

Es wurden zwei mögliche Reaktionssysteme getestet. Ein konventionelles, das neben der SMART PROBE noch die Zielsequenz beinhaltet. Diese wurde über eine Biotingruppe am Ende des Oligonukleotids an das Kügelchen gebunden. Die zweite Möglichkeit besteht in dem so genannten Sandwich Nachweis. Hierbei kommt ein zusätzliches, drittes Hilfsoligonukleotid, welches die Biotingruppe trägt und somit die Sonden und die Zielsequenz an die Oberfläche bindet, zum Einsatz.

Zunächst wurde anhand von künstlichen Sequenzen das System so weit entwickelt, dass die optimale Belegungsdichte und die optimalen Reaktionsbedingungen herausgefunden werden konnten. Es erwies sich, dass vor allem das Verhältnis der Konzentrationen von SMART PROBE, Zielsequenz und Kügelchen eine wichtige Rolle spielt. Anschließend konnte mit diesem Messansatz das System so weit verbessert werden, dass PCR Produkte bis in den picomolaren Bereich nachgewiesen werden konnten.

Insbesondere das Sandwich System sollte in heterogenen, PCR-freien Nachweisverfahren für die medizinische Diagnostik von großem Interesse sein. Ein Vorteil ist darin zu sehen, dass die Zielsequenz nicht an Biotin gekoppelt werden muss. Körperflüssigkeiten könnten so direkt zum Nachweis herangezogen werden.

Mögliche Anwendungsbereiche der Mikrosphären finden sich in Form eines Diagnose-Chips für die Früherkennung einer Antibiotikaresistenz auf Basis der Chip Technologie. Solche „lab-on-a-chip“ Ansätze, wie der bereits etablierte „Lilliput“-Chip der Firma Merlin Diagnostika, können zur schnellen und zuverlässigen Erkennung von Krankheitserregern führen. Durch örtliche Trennung der Sonden auf dem Chip können Verfahren entwickelt werden, die durch Parallelisierung mehrere Erreger gleichzeitig nachweisen können. Das selbe könnte über die Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe für die SMART PROBES geschehen. Da-

durch könnte jedem Erreger eine bestimmte Emissionswellenlänge zugewiesen werden. Solche Technologien können auch in Flusszellen eingesetzt werden, welche sich durch erhöhte Umsatzraten auszeichnen.

Der Nachweis auf Mikrosphären sowie die Miniaturisierung und Instrumente, die ein einfaches Auslesen erlauben, machen Detektionsverfahren möglich, welche weltweit im Kampf gegen Infektionskrankheiten eingesetzt werden können. Die Kombination von spezifischen und sensitiven diagnostischen Verfahren erlaubt eine schnellere, billigere und zuverlässigere Diagnostik, die in der Zukunft eine Möglichkeit zur Identifizierung des genetischen Codes von Erregern ohne PCR darstellen könnte.

### Nachweis von Punktmutationen

Anspruchsvoller ist der Nachweis von Punktmutationen. Der Austausch einer einzigen Base im genetischen Code des Mykobakteriums ist die Ursache für Antibiotikaresistenzen. Um diese zu detektieren, wurde wiederum ein Modellsystem herangezogen. Dafür wurde eine der bekanntesten Punktmutationen am Codon S<sup>456</sup>L (TCG → TTG) im *rpoB* Gen von *M.tuberculosis* Isolaten verwendet, die eine Resistenz gegen Rifampicin zur Folge hat.

Durch exaktes Anpassen der Stamm-Schleife-Verhältnisse gelang es, zwei Sonden zu modellieren, die in Lösungsmessungen PCR-Wildtypisolate von resistenzvermittelnden PCR-Isolaten diskriminieren konnten. Hierbei wurde eine Sensitivität von  $5 \cdot 10^{-7}$  M erreicht.

Die Etablierung von SMART PROBES in der molekularen Diagnostik kann ein PCR freies, hochempfindliches Nachweisverfahren mit eindeutiger Diskriminierung zwischen korrekter und leicht veränderter Zielsequenz liefern. Die Sensitivität reicht hier bis zum Aufspüren von Punktmutationen. Derart, mit verschiedenen SMART PROBES befüllte Mikrochips, die selektiv auf diverse Erreger reagieren, könnten winzigste Tropfen Körperflüssigkeit gleichzeitig auf unterschiedlichste Resistenzen hin untersuchen.

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit eine Grundlage für die Entwicklung hochempfindlicher Nachweisverfahren zur Detektion spezies-spezifischer, natürlicher Sequenzen geschaffen.

Um das System weiter zu verbessern, bedarf es unter anderem auch in der computergestützten Erkennung der Kügelchen einer Verbesserung. Das Programm *Analyze Bead* kann bei Konzentrationen unterhalb  $10^{-10}$  M nicht mehr angewendet werden. Bei diesen Konzentrationen unterscheidet sich das Signal der Kügelchen zu wenig vom Hintergrundsignal. Eine weitere Erhöhung in der Sensitivität kann durch einen optimierten Aufbau des Fluoreszenzmikroskops erreicht werden. So könnte zudem durch Anwendung einer Laserdiode oder ei-

ner LED (Light Emitting Diode) im Gegensatz zur Quecksilberlampe der Farbstoff bei seinem Absorptionsmaximum angeregt werden und somit die Emission erhöht werden.

Zukünftig können hier Arbeiten zur Umsetzung, Anpassung und Optimierung der SMART PROBE / Mikrosphären-Technik vorgenommen werden.

Durch Anpassung der SMART PROBES an spezies-spezifische DNA-Sequenzen konnten Nachweisverfahren entwickelt werden, die gegenüber den Standardverfahren erheblich gesteigerte Empfindlichkeit besitzen und eine eindeutige Diskriminierung zwischen korrekter und leicht veränderter Zielsequenz erlauben [Stöhr 2005]. Schon der Austausch eines einzigen Nukleotids (Single-Point-Mutation) in der Zielsequenz, was gerade bei antibiotikaresistenten Erregern häufig auftritt, führt zu einem Ausbleiben des Fluoreszenzanstiegs bei der Reaktion der SMART PROBE mit der Ziel-DNA.

Mit SMART PROBES kann ein kostengünstiges und flexibel einsetzbares System bereitgestellt werden, welches sich durch die bedienerfreundliche und einfach zu handhabende Technologie auszeichnen. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann eine Diagnose innerhalb weniger Stunden und damit verbunden auch der sofortige Einsatz eines effektiven Antibiotikums möglich werden. So könnte in naher Zukunft mit Hilfe von SMART PROBES die exakte Differenzierung von Krankheitserregern „in Echtzeit“ vorgenommen werden. Dadurch könnte ein Meilenstein im Kampf gegen Infektionskrankheiten gesetzt und in den nationalen und internationalen Diagnosemarkt eingestiegen werden.

### **Proteinanmarkierung *in vitro* und in lebenden Zellen mit SNAP-TAGS**

Die bekanntesten nicht invasiven Methoden zur Anfärbung von Proteinen in lebenden Zellen stellten bis jetzt die Verwendung von autofluoreszierenden Proteinen oder die Verwendung des TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAGS dar.

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen durch kovalente Anbindung von organischen Farbstoffen ist aufgrund der Vielzahl von erhältlichen Farbstoffen und der Variabilität der Eigenschaften von synthetischen Fluorophoren eine bedeutende Zukunftstechnologie. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode der Proteinmarkierung in lebenden Zellen, die SNAP-TAG Technik [Keppler 2004], weiterentwickelt. Die Proteinanfärbung mit SNAP-TAGS beruht auf einem Hybridsystem aus einer kurzen, genetisch kodierten Proteinsequenz (182 Aminosäuren, 21 kDa) und einem kleinen organischen Fluorophor. Diese Strategie erlaubt eine schnelle und irreversible Markierung von AGT-Fusionsproteinen.

Diese Technologie basiert auf dem ungewöhnlichen Reparaturmechanismus des humanen DNA Reparaturproteins O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT). Dieser führt einen

irreversiblen Transfer der Benzylgruppe von O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>-BG) auf ein Cystein des humanen DNA Reparaturproteins O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT) durch, resultierend in einer Thioetherbindung. Dieses Protein besitzt spezifische Aktivität für O<sup>6</sup>-BG-Derivate, die zum kovalenten Markieren von AGT-Fusionsproteinen *in vitro* und in lebenden Zellen eingesetzt werden.

Dieses System weist neben dem Vorteil der spezifischen Markierung mit organischen Fluorophoren den Nachteil auf, dass BG-Substrate, welche nicht umgesetzt wurden, zu unspezifischer Hintergrundfluoreszenz führen. Diese müssen, wie auch bei anderen kommerziell erhältlichen Systemen (TETRACYSTEIN-BIARSENICAL TAGS, HALOTAG), durch arbeitsintensive Waschschrinen entfernt werden.

In dieser Arbeit wurde die Proteinmarkierung mit SNAP-TAGS dahingehend weiterentwickelt, dass fluoreszenzgelöschte O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstrate eingesetzt werden können. Diese erlauben eine hintergrundreduzierte Proteinanfärbung des Proteins O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT).

Die Fluoreszenzlöschung der O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstrate erfolgt analog zu den SMART PROBES durch photoinduzierten Elektronentransfer vom Guanin des Benzylguanins auf den Fluoreszenzfarbstoff. Durch eine gezielte Auswahl von O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Farbstoffsubstraten konnten effektiv gelöschte BG-Substrate entwickelt werden. Es wurden Farbstoffe gefunden, die spezifisch gelöscht werden, wenn sie an die *para*-Position des O<sup>6</sup>-Benzylguanins gekoppelt sind. Um zu zeigen, dass sich gelöschte Substrate zur kovalenten Markierung in lebenden Zellen mit reduzierter Hintergrundfluoreszenz eignen, wurden damit *E. coli*- und CHO-Zellen angefärbt.

### Farbstoffwahl

O<sup>6</sup>-Benzylguanin Derivate, welche an der *para*-Position einen Fluoreszenzfarbstoff tragen, sind in der Lage, durch Photoinduzierten Elektronentransfer vom Guanin auf den Farbstoff, diesen in seiner Fluoreszenz zu löschen. Um ein effektiv gelöschtes synthetisches Fluorophor zu finden, wurden 30 Farbstoffe an O<sup>6</sup>-Benzylguanin (BG-NH<sub>2</sub>) gekoppelt. Hierbei handelte es sich um Farbstoffe der Klassen Oxazine, Cyanine, Rhodamine und Fluoresceine. Sie decken den gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich von 400 nm bis 700 nm ab.

Die BG-Farbstoffsubstrate wurden hinsichtlich ihrer spektroskopischen Eigenschaften, wie der Fluoreszenzlebensdauer und der relativen Quantenausbeuten untersucht. Hierbei wurde das Augenmerk vor allem auf die Quantenausbeuten relativ zum freien Farbstoff gelegt. Diese sind ein Maß dafür, wie gut der Farbstoff an der *para*-Position des O<sup>6</sup>-Benzylguanins gelöscht ist. Nur ein effektiv fluoreszenzgelöschter Farbstoff führt zur Unterbindung eines un-

spezifischen Hintergrundsignals, da die Sonde dadurch nur eine sehr geringe Restfluoreszenz im nicht umgesetzten Zustand aufweist. Es erwiesen sich vor allem die Oxazinderivate BG-ATTO 700, BG-ATTO 680, BG-ATTO 655 und BG-MR 121, sowie das das Carbopyronin ATTO-620 als sehr gut gelöscht. Für Anwendungen im blauen Wellenlängenbereich kann das fluoreszenzgelöschte BG-Substrat des Coumarinderivats ATTO-425 eingesetzt werden. Einige Rhodamine wie BG-550, BG-DY 505 oder BG-TAMRA und BG-Rhodamine Green zeigen ebenfalls eine Fluoreszenzlöschung, wenngleich diese mit einer relativen Quantenausbeute von zirka 0,40 wesentlich schwächer ist als bei den oben genannten Substraten. Tabelle 5-2 fasst die Quantenausbeuten der Substrate, welche für eine hintergrundreduzierte Anwendung in Frage kommen, nochmals zusammen.

Substrat	Derivat von	rel. Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_{\text{rel}}$ in PBS
BG-ATTO 425	Coumarin	0,28
BG-ATTO 550	Rhodamin	0,17
BG-Dyomics 505	Rhodamin	0,38
BG-TAMRA	Rhodamin	0,56
BG-Rhodamine Green	Rhodamin	0,32
BG-MR 121	Oxazin	0,08
BG-ATTO 655	Oxazin	0,08
BG-ATTO 680	Oxazin	0,10
BG-ATTO 700	Oxazin	0,12

Tabelle 5-2: Relative Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi_{\text{rel}}$  der effizient gelöschten O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Substrate.

### ***In vitro* Anwendungen**

Um den maximal erreichbaren Fluoreszenzanstieg der Substrate zu bestimmen, wurden diese mit isoliertem AGT-Fusionsprotein *in vitro* zur Reaktion gebracht, und die Fluoreszenz sowohl vor als auch nach der Reaktion mit dem Protein gemessen.

Es zeigte sich, dass nicht alle Substrate den aus der Quantenausbeute vorhergesagten Fluoreszenzanstieg bei 25°C erreichten. Dies lag an der unvollständig ablaufenden Reaktion bei dieser Temperatur. In Experimenten bei 37°C konnten höhere Anstiege ermittelt werden. Die erzielten Anstiege lagen teilweise um ein Vielfaches über dem Anstieg, welcher allein aufgrund der Fluoreszenzlöschung zu erwarten wäre. So zeigt BG-ATTO 700 einen 31,6 fachen Anstieg bei einer relativen Quantenausbeute von 0,12. Für diese Quantenausbeute ließe

sich bei Entfernung des Guanins maximal einen acht bis neunfachen Anstieg erwarten. BG-ATTO 680 zeigte einen 28 fachen Anstieg bei einer relativen Quantenausbeute von 0,10. Ebenso wiesen einige nicht gelöschte Substrate, wie zum Beispiel BG-ATTO 495 oder BG-Alexa 594, einen nicht erwarteten Fluoreszenzanstieg nach der Reaktion mit dem AGT-Fusionsprotein auf.

Um diese Diskrepanz zu erklären, wurden die Substrate hinsichtlich ihres Verhaltens in unterschiedlichen Lösungsmitteln untersucht, da sowohl allgemeine als auch spezifische Lösungsmittelleffekte bekanntermaßen einen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten eines Chromophors haben. Durch die Ankopplung des Farbstoffs an die Proteinoberfläche kommt es zu einer Veränderung der chemischen Umgebung der Farbstoffe. Die Polarität der Umgebung des Farbstoffs wird durch die Nähe Proteinoberfläche verändert. Es kommt zu hydrophoben oder hydrophilen Wechselwirkungen. Lösungsmittelleinflüsse können daher Einblick in die Fluoreszenzeigenschaften der proteingekoppelten Farbstoffe bieten. Ebenfalls verhält sich ein Farbstoff dadurch, dass er an ein großes Makromolekül gebunden ist, wie in einer Umgebung mit höherer Viskosität. Ist die Viskosität eines Lösungsmittels groß genug, wird die Gleichgewichtseinstellung mit den umgebenden Lösungsmitteldipolen im angeregten Zustand verhindert. Bei der Emission des Lichts bleibt die planare Konformation des Grundzustandes erhalten und die Fluoreszenzintensität verändert sich.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die umgebenden Lösungsmittelmoleküle, als auch die Viskosität einen Einfluss auf die spektroskopischen Eigenschaften wie Absorptions- und Emissionswellenlänge oder Lebensdauern der Substrate haben. Solvatochromieeffekte besaßen hierbei einen geringeren Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften als spezifische Lösungsmittelleffekte. Spezifische Lösungsmittelleffekte kommen durch die chemischen Eigenschaften der umgebenden Lösungsmittelmoleküle zustande [Lakowicz 1999, Buschmann 2003]. So zeigen BG-Substrate wie BG-ATTO 655 oder BG-ATTO 488 bei Steigerung der Polarität durch Erhöhung der Acetonkonzentration einer Toluol-Aceton Lösung erhebliche Fluoreszenzverstärkungen. Ebenso konnte durch Erhöhung der Viskosität der Lösung ein erheblicher Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften festgestellt werden. Das Carborhodamin ATTO 647N zeigt beispielsweise bei Erhöhung der Glycerinkonzentration einer wässrigen Lösung auf 50% einen fast 7 fachen Fluoreszenzanstieg.

Die Summe dieser Effekte kann die Fluoreszenzverstärkung der Farbstoffe nach Markierung des hAGT erklären. Jedoch sind sie, je nach Farbstoff, so komplex und unterschiedlich stark ausgeprägt, dass eine einfache Voraussage des Fluoreszenzanstiegs nach Kopplung an das Protein nicht möglich ist.

Mit den entwickelten BG-Farbstoffsubstraten kann nach Kopplung an hAGT eine im Vergleich zum Ausgangszustand gesteigerte Fluoreszenzintensität erzielt werden. Somit konnte

in dieser Arbeit eine *in vivo* Proteinmarkierungsmethode entwickelt werden, die Messungen mit reduzierter Hintergrundfluoreszenz ermöglicht.

### Anwendung in lebenden Zellen

Nachdem der Beweis erbracht war, dass ein Fluoreszenzanstieg bei der Markierung des hAGTs möglich ist, wurden mit den synthetisierten BG-Substraten hAGT-Fusionsproteine in *E. coli* angefärbt.

Hierbei stellte sich heraus, dass alle Substrate in der Lage waren, hAGT in *E. coli* anzufärben.

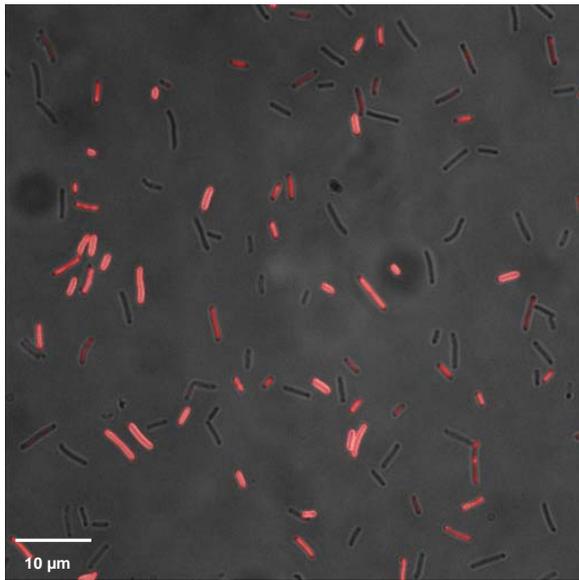


Abbildung 5-2: Überlagerung von Fluoreszenz- und Durchlichtbild von hAGT exprimierenden *E. coli*, welche mit BG-ATTO 647N angefärbt wurden.

Da Waschschriffe bei der Anfärbung von *E. coli* äußerst unkompliziert sind und keinen großen Zeitaufwand bedeuten, ist es hier nicht zwingend nötig, gelöschte Substrate zu verwenden. Somit kann es von Vorteil sein, auf die Eigenschaft der Fluoreszenzlöschung zu verzichten und somit die Möglichkeit einer Anfärbung mit der Wellenlänge der Wahl zu bekommen.

Die Substrate, welche die intensivste Anfärbung erzielen und zusätzlich möglichst viele Bakterien anfärben sind daher am geeignetsten. BG-ATTO 633 und BG-ATTO 620 erwiesen sich als die Substrate, welche neben einer sehr hohen Photostabilität auch eine ausgezeichnete Quantenausbeute aufweisen.

Zudem sind sie in der Lage, fast alle Bakterien anzufärben. Abbildung 5-2 zeigt die Überlagerung des Fluoreszenzbildes und des Durchlichtbildes von hAGT exprimierenden *E. coli*. Diese wurden mit BG-Atto 647N angefärbt. Es ist zu erkennen, dass nur zirka 50% der Bakterien angefärbt wurden.

In Experimenten mit CHO-Zellen (Chinesische Hamster Ovarien) ist es, im Gegensatz zu solchen mit Bakterien, durchaus von großem Interesse, Waschschriffe zu umgehen, da diese in diesem Fall sehr zeitaufwändig sind. Dies kann durch den Einsatz von fluoreszenzgelöschten BG-Substraten erreicht werden. Hierbei führt nicht umgesetztes Edukt zu einer sehr geringen Hintergrundfluoreszenz. Problematisch bei Säugerzellen ist jedoch die Membrandurchlässigkeit für die BG-Substrate. So mussten zuerst die Substrate auf ihre Fähigkeit getestet werden, den Zellkern von AGT-defizienten CHO Zellen anzufärben. Diese Zellen wa-

ren mit Expressionsvektoren, die das Gen eines AGT-Fusionsproteins enthielten, transient transfiziert. Die spezifische Markierung des Zellkerns konnte nur mit den beiden Substraten BG-Rhodamine Green und BG-FAM erzielt werden.

Durch systematische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Größe der Produkte ein ausschlaggebender Faktor dafür zu sein scheint, ob die Zelle das O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Substrat aufnimmt oder nicht. So konnte beispielsweise bei den BG-Substraten der Rhodaminderivate Rhodamine Green, Tetramethylrhodamine und Rhodamine B festgestellt werden, dass nur das Substrat des Rhodamine Greens die Zellmembran durchdringen kann, während BG-Rhodamine B und BG-TMR nicht mehr zellpermeabel sind. Eine Erklärung hierfür könnte in der Größe der Substituenten am Stickstoff liegen. Hierbei handelt es sich um Wasserstoff bei Rhodamine Green, Methylsubstituenten beim TMR und Ethylketten am Rhodamine B. Mit zunehmendem Volumen der Substituenten nimmt die Zellpermeabilität der Substrate entscheidend ab.

Ebenso scheint ein zu langer Linker am Farbstoff ein Ausschlusskriterium für membrangängige Sonden darzustellen. So ist BG-DY 505 nicht in der Lage, den Zellkern anzufärben, BG-Rhodamine Green, welcher sich lediglich durch das Fehlen einer aliphatischen Kette von DY 505 unterscheidet, ist jedoch zellpermeabel. Auch in diesem Beispiel ist das voluminösere Molekül nicht in der Lage, die Membran zu durchdringen.

Die Limitierung der Membrangängigkeit durch die Größe des O<sup>6</sup>-Benzylguanin-Substrat kann durch den Einsatz des 4-(4-(Aminomethyl)benzyloxy)-6-chloropyrimidin-2-amine, oder kurz CP-NH<sub>2</sub>, möglicherweise für einige Farbstoffe umgangen werden. Dieses Molekül ist kleiner als BG-NH<sub>2</sub>. Hierdurch gelang es mit dem CP-TMR-Substrat, den nicht membrangängigen Farbstoff TMR in die Zelle zu bekommen. Der große Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass CP-Substrate nicht fluoreszenzgelöscht sind, und somit kein hintergrundfluoreszenzreduziertes Verfahren darstellt.

Alle kommerziellen Systeme, welche auf Tags basieren, weisen die Problematik auf, dass mit zunehmender Größe des Tag Systems die Spezifität abnimmt. So erfährt die HALOTAG Technologie bezüglich der einsetzbaren Farbstoffe dieselben Beschränkungen wie das SNAP-TAG System.

In weiteren Arbeiten muss die Methoden dahingehend weiterentwickelt werden, dass der Transport in die Zelle erleichtert wird. Hierbei könnte die Verwendung von Proteinen, welche die so genannte Proteintransduktionsdomäne (Protein Transduction Domain, PTD) aufweisen, eine Möglichkeit bieten. Diese Domäne ist dafür verantwortlich, dass biologische Membranen durch Transduktion durchdrungen werden können [Frankel 1988]. Unter Verwendung von Peptiden, welche diese Domäne aufweisen, wie HIV-1 TAT oder auch argininreiche Peptide, konnten bereits fluoreszenzmarkierte Streptavidine und Oligonukleotide, sowie Molecu-

lar Beacons und 20 nm Fluoreszenzbeads in CHO-Zellen geschleust werden [Nitin 2004]. In neueren Arbeiten [Roth 2006] konnte mit Hilfe der  $\beta$ -homologen Aminosäure Arginin der Transport von Farbstoffen in die Zelle erheblich erleichtert werden. Der Vorteil gegenüber den nativ vorkommenden  $\alpha$ -Argininen liegt in der Stabilität gegenüber proteolytisch zersetzenden Enzyme. Zur Aufnahme der  $\beta$ -Arginine wird ein Mechanismus postuliert, in dem das positiv geladene Peptid an die negativ geladene Membran der Zelle bindet. Der so erzielte Ladungsausgleich bewirkt eine Einstülpung der Membran und damit verbunden die Durchschleusung des Peptids [Prochiantz 2000].

Weiterhin könnten durch Anpassung struktureller Eigenschaften rotfluoreszierende Farbstoffe synthetisiert werden, die klein genug sind, um die Zellmembran zu durchdringen, und trotzdem gelöscht werden. Auch wäre die Entwicklung von Farbstoffen im Bereich von 530 nm bis 550 nm, welche effizienter gelöscht werden, eine zukünftige Herausforderung. Dieser Wellenlängenbereich ist schon durch kleinere chromophore Systeme zugänglich und daher erfolversprechender für eine nichtinvasive Inkubation.

Mit dem Markieren von hAGT mittels fluoreszenzgelöschter Sonden steht eine vielseitige Alternative zu den bereits bestehenden Markierungsmethoden von Proteinen in lebenden Zellen sowie *in vitro* zur Verfügung. Die Möglichkeit, die Fluoreszenz von organischen Farbstoffen im Ausgangszustand der BG-Substrate zu löschen, ist von erheblichem Interesse für das selektive Markieren von Proteinen. So können beispielsweise Interaktionen von Proteinen innerhalb der Zelle oder Transportprozessen in der Zelle mit gesteigerter Sensitivität untersucht werden. Ebenso könnten mittels der Detektion von Fluoreszenz örtliche Auflösungen von Zellkompartimenten durchgeführt werden, die Dynamik von Prozessen oder Signalwegen innerhalb der Zelle untersucht werden. Der Einsatz von organischen Fluorophoren, im Gegensatz zu autofluoreszierenden Proteinen, eignet sich vor allem für laserspektroskopische Anwendungen wie der Einzelmolekülspektroskopie, der stimulierten Emissionslöschung (STED) oder der bildgebenden Diffusionsmikroskopie (Diffusion Imaging Microscopy, DIM), da synthetische Farbstoffe eine wesentlich höhere Photostabilität aufweisen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass das kovalente Markieren von AGT-Fusionsproteinen mit kleinen, organischen Fluorophoren ein vielfältiges System darstellt, um Proteine sowohl *in vitro* als auch in lebenden Zellen zu markieren. Durch die Löschung der Fluoreszenz der Farbstoffe kann ein hintergrundreduziertes Markierungssystem bereitgestellt werden, das erheblich spezifischer und weniger arbeitsaufwändig als herkömmliche Verfahren ist. Somit bietet die Anwendung fluoreszenzgelöschter BG-Substrate für das SNAP-TAG System eine Erweiterung der momentan gängigen Systeme zur bildgebenden Analytik in Echtzeit.

## 6. Literaturverzeichnis

- S. R. Adams, R. E. Campbell. New biarsenical Ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: Synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc*, **2002**, *124*, 6063-6076.
- M. E. Akerman, W. C. W. Chan. Nanocrystal targeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, *99*, 12617-12621.
- A. P. Alivisatos. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science*, **1999**, *271*, 933-937.
- R. Ando, H. Mizuno. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science*, **2004**, *306*, 1370-1373.
- M. Andresen, R. Schmitz-Salue. Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell*, **2004**, *15*, 5616-5622.
- W. Ansorge, B. Sproat, J. Stegemann, C.J. Schwager. A non-radioactive automated method for DNA sequence determination. *Biochem Biophys Meth*, **1986**, *13*, 315-323.
- W. Ansorge, J. Zimmermann, C. Schwager, J. Stegemann, H. Erfle, H. Voss. One label, one tube, Sanger DNA sequencing in one and two lanes on a gel. *Nucleic Acid Res*, **1990**, *18*, 3419-3420.
- S. J. Anthonycahill, M. C. Griffith. Site-Specific Mutagenesis with Unnatural Amino-Acids. *Trends Biochem Sci*, **1989**, *14*, 400-403.
- N. Arora, B. Jayaram. Energetics of base pairs in B-DNA in solution: An appraisal of potential functions and dielectric treatments. *J Phys Chem B*, **1998**, *102*, 6139-6144.
- ATS. 2000. Management of opportunist mycobacterial infections: Joint Tuberculosis Committee Guidelines 1999. Subcommittee of the Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. *Thorax*, **2000**, *55*, 210-218.
- H. G. O. Becker. Einführung in die Photochemie. 2. Aufl., *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*, **1983**.
- O. Brändli, G. Prod'hom, T. Rochat, J. P. Zellweger. Klinik und Diagnose der Tuberkulose. *Schweiz Med Forum*, **2003**, *21*, 492-497.
- J. A. Brumbaugh, L.R. Middendorf, D. L. Grone, J. L. Ruth. Continuous, On-Line DNA Sequencing Using Oligodeoxynucleotide Primers with Multiple Fluorophores. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**, *85*, 5610-5614.

- F. Brunello, M. Ligozzi, E. Cristelli, S. Bonora, E. Tortoli. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene. *J Clin Microbiol*, **2001**, 39, 2799-2806.
- J. Brunner, R. Krämer. Copper(II)-Quenched Oligonucleotide Probes for Fluorescent DNA Sensing. *J Am Chem*, **2004**, 126, 13626-13627.
- V. Buschmann, K. D. Weston. Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes. *Bioconj Chem*, **2003**, 14, 195-204.
- R. E. Campbell, O. Tour. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, 99, 7877-7882.
- A. Castro, J. G. K. Williams. Single-molecule detection of specific nucleic acid sequences in unamplified genomic DNA. *Anal Chem*, **1997**, 69, 3915-3920.
- R. Cavanagh, M. Begon, M. Bennett, T. Ergon, I. M. Graham. Mycobacterium microti infection (vole tuberculosis) in wild rodent populations. *J Clin Microbiol*, **2002**, 40, 3281-3285.
- C. Chamberlain, K. M. Hahn. Watching proteins in the wild: Fluorescence methods to study protein dynamics in living cells. *Traffic*, **2000**, 1, 755-762.
- J. M. Chen, Y. P. Zhang. Depletion of O-6-Methylguanine DNA Methyltransferase and Potentiation of 1,3-Bis(2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea Antitumor-Activity by O-6-Benzylguanine In-vitro. *Carcinogenesis*, **1993**, 14, 1057-1060.
- P. J. Chesney. Nontuberculous mycobacteria. *Pediatr Rev*, **2002**, 23, 300-309.
- J. W. Chin, T. A. Cropp. An expanded eukaryotic genetic code. *Science*, **2003**, 301, 964-967.
- G. M. Ciocco, R. C. Moschel. Specific labeling of O-6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase by Reaction with O-6-(P-Hydroxy[H-3]Methylbenzyl)Guanine. *Cancer Res*. **1995**, 55, 4085-4091.
- J. E. Clarridge. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, **2004**, 17, 840-62, table of contents.
- E. U. Condon. Nuclear motions associated with electron transitions in diatomic molecules. *Physical Review*. **1928**, 32, 858-872.
- R. Damoiseaux, A. Keppler. Synthesis and applications of chemical probes for human O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chembiochem*, **2001**, 2, 285-287.
- D. S. Daniels, C. D. Mol. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *Embo J*, **2000**, 19, 1719-1730.

- D. S. Daniels, T. T. Woo. DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol*, **2004**, 11, 714-720.
- S. Y. Dawn, R. S. Yeo, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, Q. Zhu, S. Q. Yao. Cell-permeable small molecule probes for site-specific labelling of proteins. *Chem Comm*, **2003**, 2870-2871.
- H. De Beenhouwer, Z. Liang, P. De Rijk, C. Van Eekeren, F. Portaels. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization. *J Clin Microbiol*, **1995**, 33, 2994-2998.
- R. Debiasio, G. R. Bright. 5-Parameter Fluorescence Imaging - Wound-Healing of Living Swiss 3t3 Cells. *J Cell Biol*, **1987**, 105, 1613-1622.
- T. J. Deerinck, M. E. Martone. Fluorescence Photooxidation with Eosin - a Method for High-Resolution Immunolocalization and in-Situ Hybridization Detection for Light and Electron-Microscopy. *J Cell Biol*, **1994**, 126, 901-910.
- E. Desmond, A. T. Ahmed, W. S. Probert, J. Ely, Y. Jang. Mycobacterium africanum cases, California. *Emerg Infect Dis*, **2004**, 10, 921-923.
- A. Devallois, K. S. Goh, N. Rastogi. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, **1997**, 35, 2969-2973.
- G. Devulder, M. Perouse de Montclos, J. P. Flandrois. A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus Mycobacterium as a model. *Int J Syst Evol Microbiol*, **2005**, 55, 293-302.
- B. DiBartolo. Radionational Processes. *Plenum Press, New York-London*, **1980**.
- M. E. Dolan, R. C. Moschel. Depletion of Mammalian Oxygen-6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Activity by Oxygen-6-Benzylguanine Provides a Means to Evaluate the Role of This Protein in Protection against Carcinogenic and Therapeutic Alkylating-Agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1990**, 87, 5368-5372.
- S. Dostal, E. Richter, D. Harmsen. Concise guide to mycobacteria and their molecular differentiation. **2003**.
- K. H. Drexhage. Structure and Properties of Laser Dyes. Topics in Applied Physics – Dye Lasers – *Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York*, **1973**, 144-179.
- B. Dubertret, M. Calame. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotech*, **2001**, 19, 365-370.

- H. P. Easwaran, H. Leonhardt. Cell cycle markers for live cell analyses. *Cell Cycle*, **2005**, *4*, 453-455.
- H. H. El-Hajj, S. A. Marras, S. Tyagi, F. R. Kramer, D. Alland. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J Clin Microbiol*, **2001**, *39*, 4131-4137.
- J. P. Euzéby. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **2006**, 590-592.
- T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, **1948**, *2*, 55-75.
- A. D. Frankel, C. O. Pabo. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, **1988**, *55*, 1189-1193.
- H. S. Friedman, J. Pluda. Phase I trial of carmustine plus O-6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol*, **2000**, *18*, 3522-3528.
- H. S. Friedman, S. Keir. O-6-benzylguanine-mediated enhancement of chemotherapy. *Mol Cancer Ther*, **2002**, *1*, 943-948.
- M. Fukushima, K. Kakinuma, H. Hayashi, H. Nagai, K. Ito. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol*, **2003**, *41*, 2605-2615.
- G. Gaietta, T. J. Deerinck. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science*, **2002**, *296*, 503-507.
- H. K. Geiss, R. Feldhues, O. Nolte, R. Rieker. Landouzy septicemia (sepsis tuberculosa acutissima) due to *Mycobacterium microti* in an immunocompetent man. *Infection*, **2005**, *33*, 393-396.
- L. M. Gillman, J. Gunton, C. Y. Turenne, J. Wolfe, A. M. Kabani. Identification of *Mycobacterium* species by multiple-fluorescence PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, **2001**, *39*, 3085-3091.
- I. Gariat, T. W. Muir, F. B. Perler. Protein splicing and its applications. *Genet Eng (N Y)*, **2001**, *23*, 171-199.
- I. Gariat, T. W. Muir. Protein semi-synthesis in living cells. *J Am Chem Soc*, **2003**, *125*, 7180-7181.
- L. Good, P. E. Nielsen. Inhibition of translation and bacterial growth by peptide nucleic acid targeted to ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 2073-2076.
- Z. R. Grabowski, A. Grabowska. The Förster cycle reconsidered. *Z Phys Chem, Neue Folge*, **1976**, *101*, 197-208.

- O. Griesbeck, G. S. Baird. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein - Mechanism and applications. *J Biol Chem*, **2001**, 267, 29188-29194.
- B. Häfner, H. Haag, H. K. Geiss, O. Nolte. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. *Mol Cell Probes*, **2004**, 18, 59-65.
- B. Häfner. Entwicklung eines sondenbasierten Assays zur molekularen Differenzierung verschiedener Mykobakterienspezies. *Dissertation*, Universität Kaiserslautern, **2006**.
- P. R. Hammond. Self-absorption of molecular fluorescence, the design of equipment for measurement of fluorescence decay, and the decay time of some laser dyes. *J Chem Phys*, **1979**, 70, 3884-3894.
- D. Harmsen, S. Dostal, A. Roth, S. Niemann, J. Rothganger. RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of Mycobacterium species. *BMC Infect Dis*, **2003**, 3, 26.
- T. Heinlein, J. P. Knemeyer, O. Piestert, M. Sauer. Photoinduced electron transfer between fluorescent dyes and guanosine residues in DNA-hairpins. *J Phys Chem B*, **2003**, 107, 7957-7964.
- H. P. Hinrikson, G. E. Pfyffer. Mycobacterial Mycolic Acids. *Med Microbiol Lett*, **1994**, 3, 49-57.
- G. L. Hobby, A. P. Holman, M. D. Iseman, J. M. Jones. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, **1973**, 4, 94-104.
- M. Jahnz, P. Schwille. An ultrasensitive site-specific DNA recombination assay based on dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nucleic Acid Res*, **2005**, 33, e60.
- M. Kasha. Collisional Perturbation of Spin-Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation. *J Chem Phys*, **1952**, 20, 71-74.
- A. Keppler, S. Gendreizig. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature Biotech*, **2003**, 21, 86-89.
- A. Keppler. Covalent Labeling of Fusion Proteins inside Living Cells. *Dissertation*, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, **2004**.
- A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D. P. Herten. Direct Monitoring of Formation and Dissociation of Individual Metal Complexes by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy. *Angew Chem Int Ed*, **2007**, 46, 3363-3366.

- B. J. Kim, S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bai. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol*, **1999**, 37, 1714-1720.
- L. Kittler, G. Löber, F. Gollmick, H. Berg. Redox processes during photodynamic damage of DNA. III. Redox mechanism of photosensitization and radical reaction. *J Electroanal Chem*, **1980**, 116, 503-511.
- J. P. Knemeyer, N. Marme, M. Sauer. Probes for detection of specific DNA sequences at the single-molecule level. *Anal Chem*, **2000**, 72, 3717-3724.
- R. Kramer. Fluoreszenz-Chemosensoren für Cu<sup>2+</sup>-Ionen: schnell, selektiv und hochempfindlich *Angew Chem*, **1998**, 110, 804-806.
- H. Kuhn. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Ed. Zechmeister, D. L., Vol. 16, Springer-Verlag, Berlin, **1959**.
- S. A. Kyrtopoulos, L. M. Anderson. DNA adducts and the mechanism of carcinogenesis and cytotoxicity of methylating agents of environmental and clinical significance. *Cancer Detect Prev*, **1997**, 21, 391-405.
- J. R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition. Plenum Press, New York, **1999**.
- P. A. Lambert. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol*, **2002**, 92 Suppl, 46S-54S.
- L. G. Lee, C. R. Connell, W. Bloch. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*, **1993**, 21, 3761-3766.
- K. B. Lehmann, R. Neumann. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. J.F.Lehmann, München, **1896**, 1st.ed.
- U. Lieberwirth. Synthese und Optimierung multiplexfarbstoffmarkierter DNS-Primer und ihre Anwendung in der DNS-Sequenzierung. *Dissertation*, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, **1998**.
- E. Lippert. Spektroskopische Bestimmung des Dipolmomentes aromatischer Verbindungen im ersten angeregten Singulettzustand. *Z Elektrochem*, **1957**, 61, 962-975.
- J. Lippincott-Schwartz, J. F. Presley. Monitoring the dynamics and mobility of membrane proteins tagged with green fluorescent protein. *Methods Cell Biol*, **1999**, 58, 261-281.
- J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, **2003**, 300, 87-91.

- D. Magde, E. Elson, W. W. Webb. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System – Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys Rev Lett*, **1972**, 11, 705-708
- R. A. Marcus. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. *J Chem Phys*, **1956**, 24, 966-978.
- D. Mendel, V. W. Cornish. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic-Code. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **1995**, 24, 435-462.
- X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*, **2005**, 307, 538-544.
- J. Miltgen, M. Morillon, J. L. Koeck, A. Varnerot, J. F. Briant. Two cases of pulmonary tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* subsp *canetti*. *Emerg Infect Dis*, **2002**, 8, 1350-1352.
- A. Miyawaki, A. Sawano. Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol*, **2003**, Suppl, S1-S7.
- L. E. Morrison, T. C. Halder, L. M. Stols. Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization. *Anal Biochem*, **1989**, 183, 231-244.
- L. F. Mottram, E. Maddox. A concise synthesis of the Pennsylvania green fluorophore and labeling of intracellular targets with O-6-benzylguanine derivatives. *Organic Letters*, **2007**, 9, 3741-3744.
- R. B. Mujumdar, L. A. Ernst. Cyanine Dye Labeling Reagents - Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconj Chem*, **1993**, 4, 105-111.
- M. Müller. Die Bedeutung der „single point mutations“ im *rpoB* Gen für die Rifampicin Resistenz am Modellsystem *Neisseria meningitidis* und Entwicklung von Strategien zur Sondenbasierten Detektion der Resistenz bei *Mycobacterium tuberculosis*. *Dissertation*, Universität Kaiserslautern, **2007**.
- J. D. Myers. Development and Application of Immunocytochemical Staining Techniques - a Review. *Diagn Cytopathol*, **1989**, 5, 318-330.
- T. Nagai, K. Ibata. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, **2002**, 20, 87-90.

- B. S. Neporent, N. G. Bakhshiev. On the role of universal and specific intermolecular interactions in the influence of the solvent on the electronic spectra of molecules. *Opt Spectrosc*, **1960**, 8, 408-413.
- N. Nitin, P. J. Santangelo. Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res*, **2004**, 32, e58.
- D. V. O'Connor, D. Phillips. Time-correlated single photon counting. *Ap Op*, **1986**, 25, 460-463.
- H. Oevering, M. N. Paddon-Row, M. Heppner, A. M. Oliver, E. Cotsaris, J. W. Verhoeven, N. S. Hush. Long-Range Photoinduced Through-Bond Electron Transfer and Radiative Recombination via Rigid Nonconjugated Bridges: Distance and Solvent Dependence. *J Am Chem Soc*, **1987**, 109, 3258-3269.
- J. B. Patel, D. G. Leonard, X. Pan, J. M. Musser, R. E. Berman. Sequence-based identification of Mycobacterium species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol*, **2000**, 38, 246-251.
- G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science*, **2002**, 297, 1873-1877.
- A. N. Perov. Energy of intermediate pair interactions as a characteristic of their nature. Theory of the solvate (fluoro) chromism of three-component solutions. *Opt Spectrosc*, **1980**, 49, 371-374.
- A. S. Piatek, S. Tyagi, A. C. Pol, A. Telenti, L. P. Miller. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Nat Biotechnol*, **1998**, 16, 359-363.
- O. Piestert, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J. P. Knemeyer. A single-molecule sensitive DNA hairpin system based on intramolecular electron transfer. *Nano Letters*, **2003**, 3, 979-982.
- D. C. Prasher, V. K. Eckenrode. Primary Structure of the Aequorea-Victoria Green-Fluorescent Protein. *Gene*, **1992**, 111, 229-233.
- J. M. Prober, G. L. Trainor, R. J. Dam, W. F. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, K. Baumeister. A System for Rapid DNA sequencing with Fluorescent Chain Terminating Dideoxynucleotides. *Science*, **1989**, 238, 336-341.
- A. Prochiantz. Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Current Opinion in Cell Biology*, **2000**, 90, 400-406.

- J. J. Rasimas, S. Kanugula. Effects of zinc occupancy on human O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 980-990.
- D. Rehm, A. Weller. Kinetik und Mechanismus der Elektronenübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril. *Ber Bunsenges Physik Chem*, **1969**, *73*, 834-839.
- RKI. 2005. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2003. <http://www.rki.de>.
- D. Rodriguez-Lazaro, J. Lloyd, A. Herrewegh, J. Ikonopoulou, M. D'Agostino. A molecular beacon-based real-time NASBA assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *FEMS Microbiol Lett*, **2004**, *237*, 119-126.
- M. C. Rossi, A. Gori, G. Zehender, G. Marchetti, G. Ferrario. A PCR-colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* from culture samples and Ziehl-Neelsen-positive smears. *J Clin Microbiol*, **2000**, *38*, 1772-1776.
- M. C. Rossi, A. Gori, G. Zehender, G. Marchetti, G. Ferrario. A PCR-colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* from culture samples and Ziehl-Neelsen-positive smears. *J Clin Microbiol*, **2000**, *38*, 1772-1776.
- C. M. Roth. Untersuchungen in lebenden Zellen mit Hilfe neuer Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie. *Dissertation*, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, **2006**.
- R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **1985**, *230*, 1350-1354.
- M. Sanguinetti, B. Posteraro, F. Ardito, S. Zanetti, A. Cingolati. Routine use of PCR-reverse cross-blot hybridization assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. *J Clin Microbiol*, **1998**, *36*, 1530-1533.
- M. Sauer. Entwicklung effizienter Fluoreszenzfarbstoffe für den hochempfindlichen Nachweis von Biomolekülen unter Einsatz zeitaufgelöster LIF-Spektroskopie *Dissertation*, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, **1995**.
- P. Schwille, F. Oehlenschläger, N. G. Walter. Quantitative hybridization kinetics of DNA probes to RNA in solution followed by diffusional fluorescence correlation analysis. *Biochem*, **1996**, *35*, 10182-10193.
- C. Seidel. Laserspektroskopische Untersuchungen molekularer Aspekte der nukleobasenspezifischen Löschung von Fluoreszenzfarbstoffen. *Dissertation*, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, **1992**.

- N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discocoma* sp. Red fluorescent protein. *Nature Biotech*, **2004**, *22*, 1567-1572.
- O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, **1962**, *59*, 223-239.
- L. M. Smith, J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. H. Kent, L.E. Hood. Fluorescence Detection in Automated DNA Sequence Analysis. *Nature*, **1986**, *321*, 674-679.
- H. Soini, J. M. Musser. Molecular diagnosis of mycobacteria. *Clin Chem*, **2001**, *47*, 809-814.
- S. A. Soper, L. M. Davis, E. B. Shera. Detection and identification of single molecules in solution. *J Opt Soc Am*, **1992**, *B9*, 1761-1769.
- K. Stöhr. Untersuchungen zum Einsatz Intelligenter DNS-Sonden für den spezifischen und hochempfindlichen Nachweis von Antibiotikaresistenzen. *Diplomarbeit*, Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg, **2004**.
- K. Stöhr, B. Häfner, O. Nolte, J. Wolfrum, M. Sauer. Species-Specific Identification of Mycobacterial 16S rRNA PCR Amplicons Using Smart Probes. *Anal Chem*, **2005**, *77*, 7195-7203.
- S. J. Strickler, R. A. Berg. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetimes of molecules. *J Chem Phys*. **1962**, *37*, 814-822.
- K. Stroffekova, C. Proenza. The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins. *Pflugers Arch*, **2001**, *442*, 859-866.
- L. Stryer. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann Rev Biochem*, **1978**, *47*, 819-846.
- A. Sukhanova, M. Devy. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal Biochem*, **2004**, *324*, 60-67.
- P. Suppan. Solvatochromic Shifts - the Influence of the Medium on the Energy of Electronic States. *J Photochem Photobiol a-Chem*, **1990**, *50*, 293-330.
- A. Terskikh, A. Fradkov. "Fluorescent timer": Protein that changes color with time. *Science*, **2000**, *290*, 1585-1588.

- E. Tortoli. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev*, **2003**, *16*, 319-54.
- E. Tortoli, A. Mariottini, G. Mazzarelli. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol*, **2003**, *41*, 4418-4420.
- R. Y. Tsien. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **1998**, *67*, 509-544.
- S. Tyagi, F. R. Kramer. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat Biotechnol*, **1996**, *14*, 303.
- D. Wagner, L. S. Young. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection*, **2004**, *35*, 257-270.
- S. Weiss. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*, **1999**, *283*, 1676-1683.
- A. Weller. Photoinduced electron transfer in solution: exciplex and radical ion pair formation free enthalpies and their solvent dependence. *Z Phys Chem*, **1982**, *Neue Folge 133*, 93-98.
- J. E. Whitaker, R. P. Haugland, F. G. Prendergast. Spectral and Photophysical Studies of Benzo[c]xanthene Dyes: Dual Emission pH Sensors. *Anal Biochem*, **1991**, *194*, 330-344.
- C. T. Wittwer, M. G. Herrmann, A. A. Moss, R. P. Rasmussen. Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques*, **1997**, *22*, 130-139.
- M. M. Wu, J. Llopis. Organelle pH studies using targeted avidin and fluorescein-biotin. *Chem Biol*, **2000**, *7*, 197-209.
- M. M. Wu, J. Llopis. Studying organelle physiology with fusion protein-targeted avidin and fluorescent biotin conjugates. *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Pt B*, **2000**, *327*, 546-564.
- X. Y. Wu, H. J. Liu. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nature Biotechnology*, **2003**, *21*, 41-46.
- H. Yeager, J. Lacy, L. R. Smith, C. A. LeMaistre. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis*, **1967**, *95*, 998-1004.
- C. Zander. Abkühlung einer Farbstofflösung durch Anti-Stokes-Fluoreszenz. *Dissertation*, Universität-Gesamthochschule Siegen, **1991**.
- J. Zhang, R. E. Campbell. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2002**, *3*, 906-918.

M. Zuker, D. H. Mathews, D. H. Turner. Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide, in: J. Barciszewski, B. F. C. Clarke (Eds). *RNA Biochemistry and Biotechnology, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999*, pp. 11-43.

www1: <http://www.raw-milk-facts.com/tuberculosis.html>

www2: <http://www.science.mcmaster.ca/biochem/faculty/truant/trulab.html>

## 7. Anhang

### *Abkürzungen*

$\lambda$	Wellenlänge
$\tau$	Fluoreszenzlebensdauer
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\varepsilon_S$	statische Dielektrizitätskonstante
$\phi$	Fluoreszenzquantenausbeute
$\Delta E$	Anregungsenergie
$\mu_e$	Dipolmoment des Grundzustandes
$\mu_g$	Dipolmoment des angeregten Zustandes
A	Adenosin
A	Absorptionskoeffizient
$A_{th}$	Amplifikationsfaktor
ATS	American Thoracic Society
BG	Benzylguanosin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
c	Lichtgeschwindigkeit
CCD	Charge Coupled Device
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHO	Chinesische Hamster Ovarien
dA	2'-Desoxyadenosin
DABCYL	4-[[4-(Dimethylamino)-phenyl] azo]-benzoesäure
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol

dC	2'-Desoxycytosin
dG	2'-Desoxyguanosin
DL	detektiertes Licht
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DY	Dyomics
<i>E. coli</i>	<i>Escheria Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMCCD	Electron Multipling Charge Coupled Device
eV	Elektronenvolt
f	Oszillatorstärke
FAM	5- oder 6-Carboxyfluorescein
FCCS	two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy (Zweifarben Fluoreszenz Kreuzkorrelations-Spektroskopie)
FCS	Fluoreszenz-Korrelations Spektroskopie
FIAsH	Fluorescein Arsenical Hairpin Binder
FRET	Fluorescence Energy Transfer
G	Guanosin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
H2B	AGT-histone 2B
hAGT	humane O <sup>6</sup> -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase
HIV	Human Immundeficiency Virus (menschliches Immunschwächevirus)
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High Performance Liquid Chromotography
hsp65	heat shock protein 65
IC	internal conversation

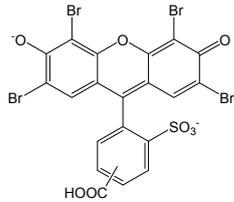
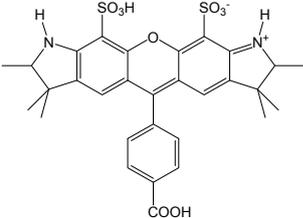
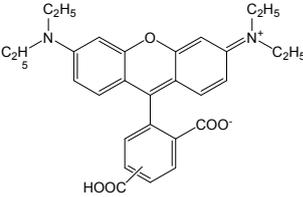
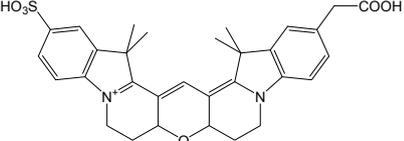
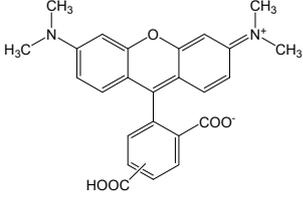
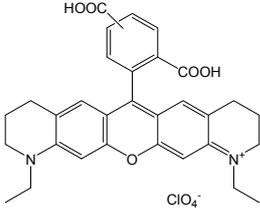
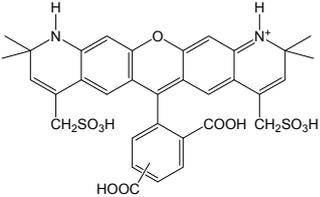
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISC	Intersystem Crossing
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
kJ	Kilojoule
LED	Light Emitting Diode
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
M	Molar
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
MTBC	<i>M.tuberculosis</i> Komplex
NHS	N-Hydroxy-Succinimide
NTM	Nontuberculous Mycobacteria
O <sup>6</sup> -BG	O <sup>6</sup> -Benzylguanin
OD	Optische Dichte
p. a.	pro analysis (Analysenrein)
PBS	Phosphate-buffered-saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Ketten Reaktion)
PEG	Polyethylenglycol
PTD	Protein Transduktions Domäne
ReAsH	Resorufin Arsenical Helix Binder
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
rpoB Gen	RNA polymerase beta-subunit encoding gene
s	Sekunde
SCE	Saturated calomel electrode
S <sub>n</sub>	Singulettzustand

SNARF	Seminaphthorhodafluor
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOMO	single occupied molecular orbital
TAMRA	5- oder 6-Carboxyrhodamin
Taq	Taq-Polymerase (aus <i>Thermus aquaticus</i> )
TB	Tuberkulose
TCSPC	time correlated single photon counting
TEAA	Triethylammoniumacetat
TET	6-carboxy-4,7,2',7'- tetachlorofluorescein
TMR	Tetramethylrhodamin
$T_m$	Schmelztemperatur
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
V	Volt
VR	variable Region
VR	Vibrational Relaxation (Schwingungsrelaxation)
w/v	weight per volume
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YFP	Yellow Fluorescent Protein
ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg
$\nu$	Frequenz
16S rDNA	16S ribosomal DNA

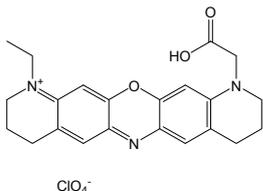
## Farbstoffe

Im Folgenden sind, soweit bekannt, die Strukturen der verwendeten Farbstoffe sowie ihre Anregungs- und Emissionswellenlängen angegeben.

Farbstoff	$\lambda_{\text{abs}}$	$\lambda_{\text{em}}$	Struktur
ATTO 425	436	484	
FAM	494	518	
Rhodamine Green	498	521	
ATTO 488	501	523	nicht angegeben
ATTO 495	495	527	
Dyomics 505	505	530	
TET	521	536	
ATTO 520	516	538	

Eosin	529	544	
ATTO 532	532	553	nicht angegeben
Alexa Fluor 532	531	554	
Rhodamine B	544	584	
Cy 3b	558	572	
ATTO 550	554	576	nicht angegeben
TAMRA	546	579	
ATTO 565	563	592	
Alexa Fluor 568	578	603	

Alexa Fluor 594	590	617	
ATTO 590	594	624	
ATTO 620	619	643	nicht angegeben
ATTO 633	629	657	nicht angegeben
Dyomics 630	636	657	
ATTO 635	635	659	
Cy 5	646	664	
ATTO 647N	644	669	nicht angegeben
MR 121	660	675	

DY 113	650	677	 <chem>CCN1CCCC1=C2C=C3C(=O)N(CCC)C(=O)O3=C4C=CC5=C2OC6=C4N=C7C=CC8=C6N(CCC)C(=O)O8</chem> $\text{ClO}_4^-$
ATTO 655	663	684	nicht angegeben
ATTO 680	680	700	nicht angegeben
ATTO 700	700	719	nicht angegeben

## **Artikel**

**Stöhr, K.**, Häfner, B., Nolte, O., Wolfrum, J., Sauer, M., and D. P. Herten. Species-specific identification of mycobacterial 16S rRNA PCR amplicons using Smart Probes. *Anal Chem*, **2005**, *77*, 7195-7203.

**Stöhr, K.**, Sieberg, D, and D. P. Herten. The Snap-Switch – A Novel Tool for background-reduced specific life-cell and *in vitro* labelling of proteins. *in preparation*.

## **Buchbeiträge**

Nolte, O., Müller, M., Häfner, B., Knemeyer, J.P., **Stöhr, K.**, Wolfrum, J., Hakenbeck, R., Denapaite, D., Schwarz-Finsterle, J., Stein, S., Herten, D.P., Hausmann, M., and M. Sauer: *Novel singly labelled probes for identification of micro-organisms, detection of antibiotic resistance genes and mutations, and tumor diagnosis (Smart Probes)*, in: POPP J & STREHLE M (eds.): *Biophotonics: Throwing a new light on Life Science – Final Report Biophotonik I*. Verlag Wiley VCH , Juli 2006

## **Vorträge**

**Stöhr, K.**, Häfner, B., Nolte, O., Sauer, M., Herten, D.P., and J. Wolfrum. *Novel approaches for fast and highly sensitive diagnosis of antibiotic resistant tuberculosis germs*, 10<sup>th</sup> International workshop on single molecule detection and ultrasensitive analysis in life science, Berlin. **2004**

## **Tagungsbeiträge**

**Stöhr, K.**, Häfner, B., Nolte, O., Sauer, M., Wolfrum, J., and D.P. Herten. *Species specific identification of mycobacterial 16S rRNA PCR amplicons using Smart Probes*. 11<sup>th</sup> international workshop on single molecule spectroscopy and ultra sensitive analysis in the life sciences, Berlin. **2005**

**Stöhr, K.**, Häfner, B., Nolte, O., Sauer, M., Wolfrum, J., and D.P. Herten. *Identification of antibiotic resistant infections by specific hybridization of Smart Probes*. 104. Hauptversammlung der Deutschen Bunsen-Gesellschaft für Physikalische Chemie, Frankfurt. **2005**

Häfner, B., **Stöhr, K.**, Sauer, M., Wolfrum, J., Herten, D.P., and O. Nolte. *Smart Probes. A novel diagnostic tool for fast and highly sensitive detection of mycobacterial species*. 26<sup>th</sup> annual congress of the European society of Mycobacteriology, Istanbul. **2005**

Knemeyer, J.P., Barsch, H., **Stöhr, K.**, Herten, D.P., Wolfrum, J., Müller, M., Häfner, B., Nolte, O., Denapaité, D., Hakenbeck, R., Finsterle, J., Hildenbrand, G., Stein, S., Schmitt, E., Kaya, Z., Schneider, H., Großmann, C., Cremer, C., Hausmann, M., and M. Sauer. *Smart Probes zur schnellen und hochempfindlichen Diagnostik von Antibiotikaresistenzen und tumorassoziierten Translokationen*, Symposium im Rahmen des Biophotonik-Schwerpunkts, Jena. **2005**

Nolte, O., Häfner, B., Herten, D.P., **Stöhr, K.**, Geiss, H.K., Sauer, M., and J. Wolfrum. *Smart Probes – A novel diagnostic tool for fast and highly sensitive detection of species specific DNA targets*, in Abstract book, 56. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene (DGHM), Münster. **2004**

Eckhardt, M., Koch, P., Anders, M., Adal, M., **Stöhr, K.**, Lampe, M., Kräusslich H.-G., Herten, D.P., Müller, B. *SNAP-tagged HIV-1 derivatives as tools for the study of viral entry and egress*, GfV Jahrestagung. **2008**

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum und Herrn Dr. Dirk-Peter Hertzen danke ich für das Überlassen des Themas, das große Interesse an meiner Arbeit und den Glauben daran, dass sie vollendet werden wird.

Herrn Prof. Dr. Markus Sauer möchte ich für die Möglichkeit danken, auf dem Gebiet der SMART PROBES arbeiten zu können und die vielen hilfreichen Tips bezüglich der Fluoreszenzlöschung.

Dr. Bernhard Fellenberg und Dr. Matthias Müller vom Hygieneinstitut der Universitätsklinik Heidelberg danke ich die zahlreichen PCR-Produkte, die tolle Zusammenarbeit und die lustige Zeit mit den SMART PROBES. Hunderte ungezählte Stunden, die wir vor dem Spektrometer auf Fluoreszenzanstiege gewartet haben, wären ohne Euch wahrscheinlich niemals von Erfolg gekrönt gewesen.

Sonja Schulmeister vom ZMBH und Tanja Erhard möchte ich für die Expression und Bereitstellung von SNAP26m danken.

Meinen Praktikantinnen Perdita Backes und Birgit Thaler danke ich für die fleißige und engagierte Arbeit mit den Mikrosphären.

Dr. Christian Roth und Daniel Sieberg danke ich für die stets freundliche und zuvorkommende Hilfe mit so manchem Computerproblem. Besonders danke ich Daniel für die häufigen Eingaben des Admin-Passworts.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, Daniel Barzan, Tanja Erhard, Pia Heinlein, Alexander Kiel, Daniel Sieberg, Christina Spassova, Haisen Ta, Tubi, Coli, Biosepp sowie Dr. Kyung-Tae Han und Dr. Mike Heilemann danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen lustigen Stunden im Labor, beim Weißwurstessen, bei Grillen und bei den Untersuchungen der Wachstumsgeschwindigkeit von Dons Schimmelkulturen.

Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Dr. Mike Heilemann, Dr. Kyung-Tae Han und Daniel Sieberg.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden, ohne deren Rückhalt und Zuspruch diese Arbeit niemals Wirklichkeit geworden wäre.

Unendlich dankbar, wo Worte nicht mehr ausreichen, bin ich all den Menschen, die in den letzten zwei Jahren bei mir waren. Mit Gesten, in Gedanken oder in Gebeten. All denen, die mich am Leben und im Leben gehalten haben, die so manche Stunde mit mir gelitten haben und dennoch den Mut und die Hoffnung nie aufgegeben haben. Aber auch denen, die mir in den letzten zwei Jahren begegnet sind, mit denen ich ein Stück ihres Lebens gemeinsam gehen durfte, und die nun schon gegangen sind.

Diese Zeit wäre ohne all diese Menschen so nie möglich gewesen.

Wenn einer alleine träumt, ist es nur ein Traum.

Wenn viele gemeinsam träumen, so ist das der Beginn einer neuen Wirklichkeit.

Don Helder Camara

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, im Januar 2008