

# INAUGURAL – DISSERTATION

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

Vorgelegt von  
Diplom-Chemiker Achim Friedrich  
aus Heilbronn (Neckar)

Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2010



Entwicklung hochempfindlicher  
Protease- und DNA-Nachweisverfahren  
für den Einsatz in der Krebsforschung und  
medizinischen Diagnostik

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Prof. Dr. Joachim Spatz



Meinen Eltern



Einer neuen Wahrheit ist nichts schädlicher als ein alter Irrtum.

*Johann Wolfgang von Goethe*

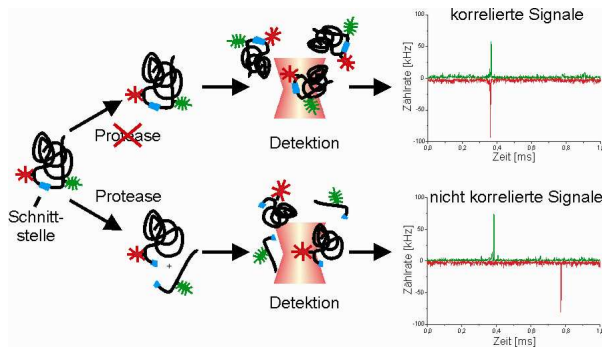




---

## KURZZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung hochempfindlicher Nachweisverfahren für proteolytische Enzyme. Viele Proteasen nehmen Schlüsselfunktionen in den Metastasierungsprozessen ein, dem größten Problem bei der Behandlung von Krebs. Sensitive Nachweismethoden für proteolytische Aktivität tragen zu einem tiefergehenden Verständnis der bei der Entstehung von Tochtergeschwüren beteiligten proteolytischen Prozesse bei und ebnet somit den Weg zur Entwicklung effektiver Antitumormedikamente. Unter Verwendung modifizierter natürlicher Proteine als Proteasesubstrate konnten zwei einzelmolekülspektroskopiebasierte Detektionsmethoden erarbeitet werden, welche einen sensitiven Nachweis proteo-



**Schema I:** Ablauf des Proteasenachweises auf Basis der Signalkorrelationsdetektion.

lytischer Aktivität erlauben. Während sich das eine Verfahren der Detektion zeitlich korrelierter Fluoreszenzsignale bedient (siehe Schema I), nutzt das andere funktionalisierte Oberflächen zur Erkennung der Proteaseaktivität. Um Proteinsubstrate fluoreszent markieren zu können, musste eine neuartige Methode etabliert werden, welche die stöchiometrische Modifizierung von Proteinen unter Erhalt ihrer biologischen Funktion ermöglicht.

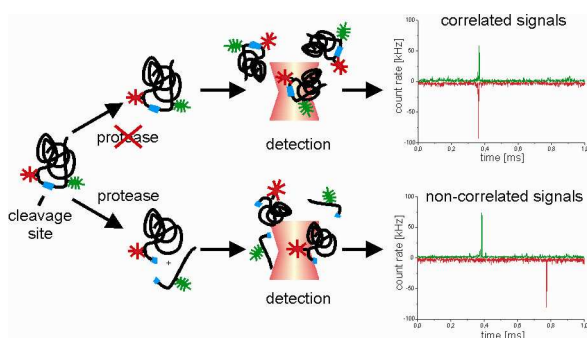
Darüber hinaus gelang die Weiterentwicklung des *Smart Probe*-basierten Nachweisverfahrens zur sensitiven und spezifischen Diskriminierung von DNA-Punktmutationen durch den Einsatz von Oligonukleotiden, die zur Sonde bei der Anbindung an die Wildtypsequenzen in Konkurrenz stehen.

Auf Grundlage der in diesen Arbeiten gesammelten Erfahrungen konnte zusätzlich eine neuartige, auf den speziellen Emissionseigenschaften des Coumarinfarbstoffs Dy-520XL beruhende DNA-Sonde konzipiert werden, welche ebenfalls eine eindeutige und einfache Diskriminierung von Punktmutationen mit hoher Sensitivität erlaubt.



## ABSTRACT

The aim of this thesis was the development of highly sensitive detection assays for proteolytic enzymes. Many proteases play key roles in metastatic processes, the major challenge for cancer treatment. Sensitive detection methods for proteolytic activity contribute to a more profound understanding of proteolytic processes involved in the development of metastasis and facilitate the development of effective anti-tumor drugs. Using modified natural proteins as protease substrates, two methods based on single-molecule spectroscopy which enable the sensitive detection of proteolytic activity were established. While the first assay deals with the



**Scheme I:** Mechanism of the protease assay based on the recognition of signal correlations.

recognition of time-correlated fluorescence signals (scheme I), the second one uses functionalized surfaces for the fluorescence-based identification of protease activity. A new protein labeling method was established in order to tag substrates fluorescently in a stoichiometric manner while preserving native protein functionality.

Furthermore, the *Smart Probe*-based assay for detecting single nucleotide polymorphisms was successfully enhanced in this work, using oligonucleotides that compete with the *Smart Probe* in binding to target sequences which contain mismatches. This modification enables the specific and sensitive recognition of single nucleotide polymorphisms.

Based on the findings of the presented work, a novel DNA-Probe was designed using the special properties of the Coumarin dye Dy-520XL, allowing a specific and simple discrimination of single nucleotide polymorphisms with high sensitivity.



---

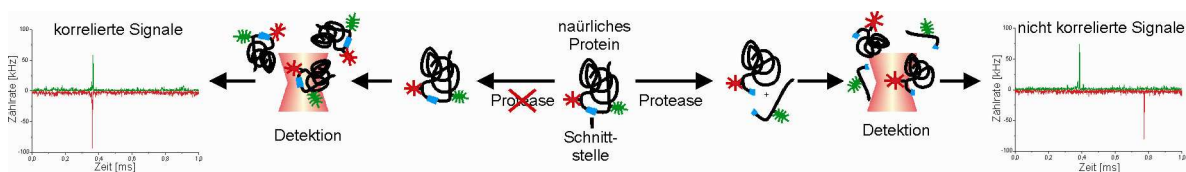
## ZUSAMMENFASSUNG

Krebs ist in Deutschland hinter Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache, obwohl Primärtumore operativ oder durch Bestrahlung gut behandelbar sind. Das Hauptproblem einer Krebserkrankung besteht in der Ausbildung von Tochtergeschwüren (Metastasen) im Krankheitsverlauf, woran über 90 % aller Patienten sterben. Schon seit Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass Proteasen maßgeblich an den Metastasierungsprozessen beteiligt sind. Die klinischen Studien mit Breitbandproteaseinhibitoren verliefen jedoch mehr als enttäuschend. Es stellte sich in den vergangenen Jahren immer deutlicher heraus, dass die proteolytischen Enzyme in vielfältiger Weise untereinander sowie mit Signalkaskaden wechselwirken und in verschiedenen Tumorstadien unterschiedliche Wirkungen entfalten. Daher ist vor weiteren Versuchen, Proteasen als Wirkstoffziele zur Tumorbekämpfung zu verwenden, ein grundlegendes Verständnis der proteolytischen Abläufe von Nöten. Dies kann mit den bisherigen Proteasetestsystemen nur bis zu einem gewissen Grad erreicht werden, da die hierbei verwendeten kurzen synthetischen Peptidsubstrate keine Tertiärstrukturen aufweisen und somit eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo*-Proteasesubstrate schwierig ist.

Aufgrund dessen war es Ziel der vorliegenden Arbeit, ein sensitives Nachweissystem für proteolytische Aktivität zu etablieren, welches sich natürlicher Proteine als Proteasesubstrate bedient. Im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen hochgradig markierten Proteinen sollten die hier eingesetzten lediglich mit einem Fluorophor modifiziert sein. Hierzu musste zunächst ein Verfahren entwickelt werden, natürliche Proteine unter Erhalt ihrer biologischen Funktionalität stöchiometrisch zu markieren. Dies gelang unter Verwendung einer DNA-Sequenz, welche zusammen mit der eigentlichen (Fluoreszenz-)Markierung kovalent an das Protein angebunden wurde. Somit konnte man anhand dieses DNA-Codes aus dem Reaktionsgemisch über eine mit komplementärem Oligonukleotid funktionalisierte Festphase selektiv die modifizierten Proteine isolieren. Eine Variation der Basenabfolge des Oligonukleotids ermöglichte ferner erstmals die parallele oder sequentielle Einführung mehrerer Markierungen unabhängig voneinander mit derselben Methode. Entsprechende Untersuchungen zeigten, dass mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten

Aufreinigungsverfahren über 90 % der modifizierten Proteinfraction isoliert werden kann. Ferner konnte die biologische Aktivität über die gesamten Markierungs- und Aufreinigungsschritte zu annähernd 80 % erhalten werden. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, dass sie ohne teure Geräte, wie beispielsweise HPLC, auskommt und somit in jedem Labor direkt praktiziert werden kann.

Unter Verwendung der damit erhaltenen Proteasesubstrate konnten im Anschluss zwei alternative Einzelmolekülspektroskopische Verfahren zur Detektion proteolytischer Aktivität etabliert werden. Im ersten System wurden die Substrate mit zwei verschiedenen Fluorophoren modifiziert - Atto 520 und Dy-520XL - welche sich mit der gleichen Wellenlänge anregen und aufgrund der großen Stokes-Verschiebung des Dy-520XL spektral getrennt detektieren ließen. Dieses Prinzip konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals mit zwei konventionellen organischen Fluorophoren auf Einzelmolekülebene realisiert werden. Der Nachweis proteolytischer Aktivität der Substrate erfolgte über die entsprechend sinkende Zahl zeitlich korrelierter Fluoreszenzereignisse von A 520 und Dy-520XL, welche durch den Verdau voneinander separiert wurden und somit unabhängig diffundierten (siehe Abbildung I). Erst die Verwendung der Einzelmolekülspektroskopie ermöglichte diese Art der Detektion, da hierfür die Fluoreszenzsignale der einzelnen Substratproteine getrennt registriert werden mussten. Ferner erlaubte sie hochempfindliche Messungen unter Einsatz geringster Probenvolumina.



**Abbildung I:** Ablauf des Proteaseaktivitätsnachweises via Detektion korrelierter Fluoreszenzsignale.

Nach Etablierung des Systems an DNA-Modellsystemen war der proteolytische Verdau von 1 pmol BSA durch 240 ng Trypsin eindeutig nachzuweisen, sowie die nicht quantitative Trypsinhemmung von AEBSF zu erfassen. In entsprechenden Messungen mit der tumorassoziierten Protease Kallikrein 6 konnte deren Aktivität in 1  $\mu$ M Lösungen ebenfalls eindeutig registriert werden.

---

Ferner erlaubt die korrelationsbasierte Detektionsmethode zeitaufgelöste Verdaumessungen, was anhand entsprechender Experimente mit DNase I bzw. Trypsin gezeigt wurde.

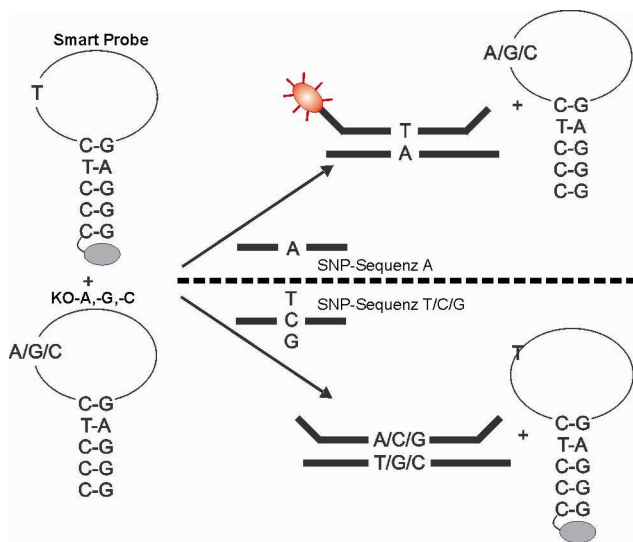
Das zweite Nachweisverfahren basiert auf mit einem Farbstoff und Biotin modifiziertem Substrat unter Verwendung streptavidinfunktionalisierter Oberflächen. Proteolytische Aktivität resultiert in diesem Fall in erhöhten Signalzahlen in der auf der Oberfläche befindlichen Probenlösung, da bei verdauten Substraten die farbstoffmarkierten Fragmente, im Gegensatz zu den biotinylierten, nicht an die Oberfläche binden. Mit diesem Verfahren war die proteolytische Aktivität von 1 nM Trypsin bzw. 30 pM Substrat sowie der hemmende Einfluss von AEBSF auf Trypsin klar nachzuweisen.

Die erzielten Ergebnisse belegen die Eignung des entwickelten Markierungsverfahrens und der darauf basierenden Nachweissysteme zur Anwendung in der Krebsforschung. Insbesondere die geringen benötigten Probenmengen, die hohe Empfindlichkeit sowie der überschaubare präparative Aufwand qualifizieren die Methode zur Bestimmung der natürlichen Substrate tumorrelevanter Proteasen und zum Test möglicher Inhibitoren.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Weiterentwicklung der *Smart Probes*, sowie dem Aufbau einer neuartigen DNA-Sonde unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Dy-520XL. Beide Sonden wurden dahingehend optimiert, hochsensitiv und spezifisch DNA-Punktmutationen zu diskriminieren. SNP-Sensitivität ist erforderlich, da Punktmutationen in vielen Fällen einen ersten Schritt auf dem Weg zur Krebsentstehung darstellen und direkt mit einem gesteigerten Krebsrisiko korrelieren. Weiterhin eignen sich SNPs als Biomarker zur Krebsfrüherkennung, wobei eine empfindliche und zugleich spezifische Erkennung wesentlich ist.

Eine Möglichkeit zur SNP-Erkennung stellen *Smart Probes* dar. Dies sind DNA-Haarnadelsonden, bei welchen die Fluoreszenzlöschung im geschlossenen Zustand auf Photoelektronentransfer zwischen Fluorophor und räumlich nahen Guaninen beruht. Durch Hybridisierung und damit verbundener Trennung von Farbstoff und Guaninen durch das Aufbrechen der Stamm-Schleifen-Struktur erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenzemission.

Da eine Hybridisierung auch mit Gegensequenzen stattfinden kann, welche nicht exakte Komplementarität aufweisen, ist für eine SNP-Detektion eine exakte Anpassung der Sonde auf die jeweilige Mutation nötig. Durch Zugabe von nicht markierten sogenannten **Konkurrenzoligonukleotiden (KOs)**, welche sich nur in der Position des SNPs von der *Smart Probe* unterscheiden, kann ein falsch-positiver Signalanstieg, hervorgerufen durch Doppelstrangausbildung zwischen *Smart Probe*



**Abbildung II:** Funktionsweise der *Smart Probe* in Verbindung mit KOs.

und einer nicht exakt komplementären Basenabfolge, effektiv unterdrückt werden, da die Konkurrenzoligonukleotide diese Sequenzen binden (Abbildung II). Unter Verwendung der

Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass selbst bei einem je 600-fachen Überschuss (1  $\mu$ M) aller drei nicht exakt komplementären Gegensequenzen ein falsch-positiver Signalanstieg der *Smart Probe* (500 pM)

komplett ausbleibt. Demgegenüber kann die SNP-Zielsequenz bis zu einer Konzentration von 10 pM nachgewiesen werden.

Die mit den *Smart Probes* gewonnenen Erkenntnisse konnten in die Entwicklung einer neuen DNA-Sonde unter Verwendung von Dy-520XL einfließen. Im Rahmen von Voruntersuchungen offenbarte der zu den 7-Aminocoumarinen zählende Farbstoff interessante Effekte. Emissionswellenlänge, Fluoreszenzquantenausbeute sowie Fluoreszenzlebensdauer änderten sich stark in Abhängigkeit der Solvenspolarität sowie der Mikroumgebung des Chromophors. Es zeigte sich, dass insbesondere beim Übergang von polar-aprotischen zu protischen Lösungsmitteln die Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer stark sinken. Dies konnte auf den in protischen Solventien stattfindenden Übergang des angeregten ICT-Zustands (*Intramolecular Charge Transfer*) zum TICT-Zustand (*Twisted Intramolecular Charge Transfer*) zurückgeführt werden, aus welchem dem Farbstoff ein zusätzlicher alternativer strahlungsloser Deaktivierungsmechanismus zur Verfügung steht.

Darüber hinaus erbrachte die kovalente Anbindung des Farbstoffs an ein Oligonukleotid eine zehnfach höhere Fluoreszenzemission, welche durch Ausbildung



---

eines DNA-Doppelstrangs unter bestimmten Voraussetzungen nochmals um das Fünffache anstieg. Dies ist durch die Abschirmung des Farbstoffs gegenüber Wassermolekülen durch die hydrophoben DNA-Basen zu erklären. Da ferner zum Erreichen des TICT-Zustands eine Rotation der 7-(Diethyl)aminogruppe notwendig ist, erschweren die Farbstoff-Basen-Wechselwirkungen den Übergang.

Das charakteristische Farbstoffverhalten diene zum Aufbau einer neuartigen DNA-Sonde. Wie bereits bei den *Smart Probes* erfolgreich praktiziert, konnte auch in diesem Zusammenhang durch Zugabe von Konkurrenzoligonukleotiden eine punktmutationsspezifische Diskriminierung mit einem Faktor von vier erreicht werden. Da die SNP-Diskriminierung der Sonde einzig auf der Anwesenheit der Konkurrenzoligonukleotide und nicht auf speziellen Sondensekundärstrukturen basiert, ermöglicht ein unkomplizierter Austausch der Konkurrenzoligonukleotid- oder der Sondensequenz den Nachweis eines anderen SNPs. Es konnten damit fünf exemplarische, über die gesamte Sondenlänge verteilte Punktmutationen selektiv nachgewiesen werden, wobei der Diskriminierungsfaktor zwischen 3,2 und 4,5 betrug. Die Verwendung der Einzelmolekülspektroskopie erlaubte die eindeutige SNP-Erkennung noch mit 30 pM Konzentrationen an Zielsequenz.

Eine Analyse basierend auf Signalquotienten erzeugt einen internen Standard und macht somit zusätzliche Vergleichsmessungen überflüssig. Darüber hinaus ist das System robust gegenüber differierender Laserleistungen oder schwankender Konzentrationen, was speziell im picomolaren Bereich oftmals nicht zu vermeiden ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Dy-520XL-basierten DNA-Sonde eine weitere Möglichkeit verfügbar ist, Punktmutationen spezifisch und hochsensitiv nachzuweisen. Sie zeichnet sich vor allem durch einen geringen Konzeptionsaufwand, als auch durch hohe Flexibilität im Hinblick auf Variation des zu erkennenden SNPs aus. Die Fluoreszenzemissionscharakteristik des zu den Coumarinen gehörenden Farbstoffs macht die Verwendung eines fluoreszenzlöschenden Moleküls obsolet und den Nachweis somit kostengünstig. Dieses neuartige Sondensystem stellt somit für die molekulare und medizinische Diagnostik ein effizientes und leistungsfähiges Instrument zu SNP-Analyse dar.



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Proteasen und Krebs.....	1
1.2	Bedeutung von DNA-Punktmutationen für die Krebsentstehung.....	12
<b>2</b>	<b>THEORIE.....</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie.....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Lichtabsorption.....	17
2.1.2	Lichtemission.....	19
2.1.3	Fluoreszenzlebensdauer und -quantenausbeute.....	22
2.1.4	Fluoreszenzlöschung.....	24
2.1.5	Statische und dynamische Fluoreszenzlöschung.....	26
2.1.6	Fluoreszenzlöschung durch Guanin.....	29
2.1.7	Lösungsmittel- und Umgebungseinflüsse auf die Fluoreszenz.....	30
2.2	<b>Nukleinsäuren.....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Aufbau und Struktur der Nukleinsäuren.....	36
2.2.2	Denaturierung, Renaturierung, Hybridisierung.....	40
2.2.3	Synthese von Oligonukleotiden.....	43
2.2.4	<i>Smart Probes</i> .....	45
2.3	<b>Proteine, Enzyme und Proteasen.....</b>	<b>47</b>
2.3.1	Transkription und Translation.....	47
2.3.2	Proteine und Enzyme.....	49
2.3.3	Proteasen.....	51
2.4	<b>Proteinmarkierung für einzelmolekülspektroskopische Anwendungen.....</b>	<b>57</b>

---

<b>3</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>61</b>
3.1	Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien.....	61
3.2	Farbstoffe.....	61
3.3	Oligonukleotide.....	62
3.4	Crosslinker.....	68
3.5	Festphasen.....	69
3.6	Peptide, Proteine und Enzyme.....	69
3.7	Geräte.....	70
3.7.1	Aufreinigungsinstrumente.....	70
3.7.2	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	71
3.7.3	Absorptionsspektrometer.....	72
3.7.4	Fluoreszenzspektrometer.....	72
3.7.5	Thermocycler.....	72
3.7.6	(Fluoreszenz-)Scanner.....	73
3.7.7	Weitere Geräte.....	73
3.8	Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie.....	74
3.9	Software.....	78
3.9.1	<i>QuickFit</i> .....	79
3.9.2	FRETtchen.....	79
3.9.3	<i>mFold</i> .....	80
3.10	Methoden.....	81
3.10.1	Kopplung von Farbstoffen an Oligonukleotide.....	81
3.10.2	Polyacrylamidgele.....	82
3.10.3	Bestimmung von Quantenausbeuten.....	84

---

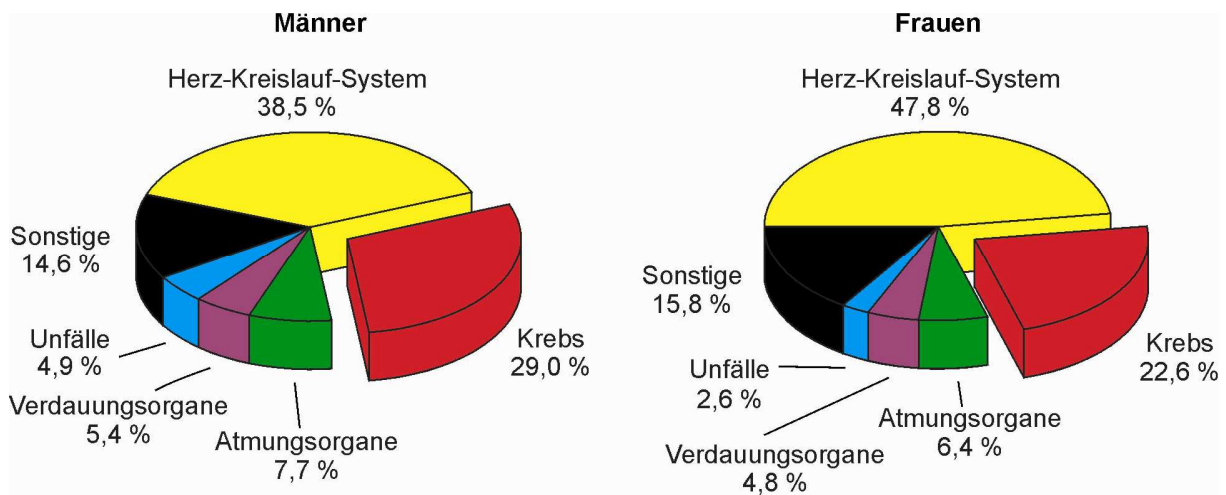
<b>4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>85</b>
<b>4.1 Konzept des Verfahrens zur stöchiometrischen Protein-</b>	
<b>modifikation.....</b>	<b>86</b>
<b>4.2 Markierung von Proteinsubstraten.....</b>	<b>87</b>
4.2.1 Markierungsziele.....	87
4.2.2 Evaluierte Kopplungsstrategien.....	88
4.2.3 SANH-SFB-Kopplung.....	97
<b>4.3 Aufreinigungssystem.....</b>	<b>105</b>
4.3.1 Funktionsweise.....	106
4.3.2 Wahl der geeigneten Festphase.....	107
4.3.3 Konzeption der DNA-Systeme.....	110
4.3.4 Ablauf der Aufreinigung.....	116
4.3.5 Quantifizierung der Auftrennung.....	118
4.3.6 Selektivität der Aufreinigung.....	119
4.3.7 Aktivität markierter Enzyme.....	122
4.3.8 Mehrfachmarkierung.....	124
<b>4.4 Einzelmolekülspektroskopischer Proteasenachweis.....</b>	<b>126</b>
4.4.1 Prinzip.....	126
4.4.2 Auswahl der Fluorophore.....	128
4.4.3 Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffs Dy-520XL.....	131
4.4.4 Entwicklung eines Programms zur Signalkorrelations-	
detektion auf Einzelmolekülebene.....	149
4.4.5 Charakterisierung des Messsystems.....	152
4.4.6 Messungen mit Modellverbindungen.....	157
4.4.7 Messung des proteolytischen Verdaus.....	160
4.4.8 Zeitaufgelöste Verdaumessungen.....	162

<b>4.5</b>	<b>Alternatives Detektionssystem.....</b>	<b>165</b>
4.5.1	Funktionsweise.....	165
4.5.2	Messung des proteolytischen Verdaus.....	166
4.5.3	Konzentrationsreihen.....	168
<b>4.6</b>	<b>Nachweis von DNA-Punktmutationen.....</b>	<b>171</b>
4.6.1	<i>Smart Probes</i> mit Konkurrenzoligonukleotiden.....	172
4.6.2	Dy-520XL-basierte DNA-Sonde.....	178
<b>5</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK.....</b>	<b>197</b>
<b>5.1</b>	<b>Einzelmolekülspektroskopischer Proteasenachweis.....</b>	<b>197</b>
5.1.1	Stöchiometrische Einfachmarkierung nativer Proteine.....	198
5.1.2	Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffs Dy-520XL.....	199
5.1.3	Verfahren zur korrelationsbasierten Detektion proteo- lytischer Aktivität.....	201
5.1.4	Oberflächengestütztes alternatives Detektionssystem.....	203
<b>5.2</b>	<b>Nachweis von DNA-Punktmutationen.....</b>	<b>203</b>
5.2.1	Weiterentwicklung des <i>Smart Probes</i> -basierten Verfah- rens zur sensitiven und spezifischen Erkennung von DNA-Punktmutationen.....	205
5.2.2	Entwicklung einer neuartigen, auf dem Coumarin- farbstoff Dy-520XL basierenden DNA-Sonde zur Erken- nung von Punktmutationen.....	206
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>209</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>223</b>

# 1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

## 1.1 Proteasen und Krebs

Krebs ist nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache beider Geschlechter in Deutschland. Laut Statistik starben hierzulande im Jahr 2007 über 210.000 Menschen, und damit jeder Vierte, an bösartigen Neubildungen (siehe Abbildung 1-1).



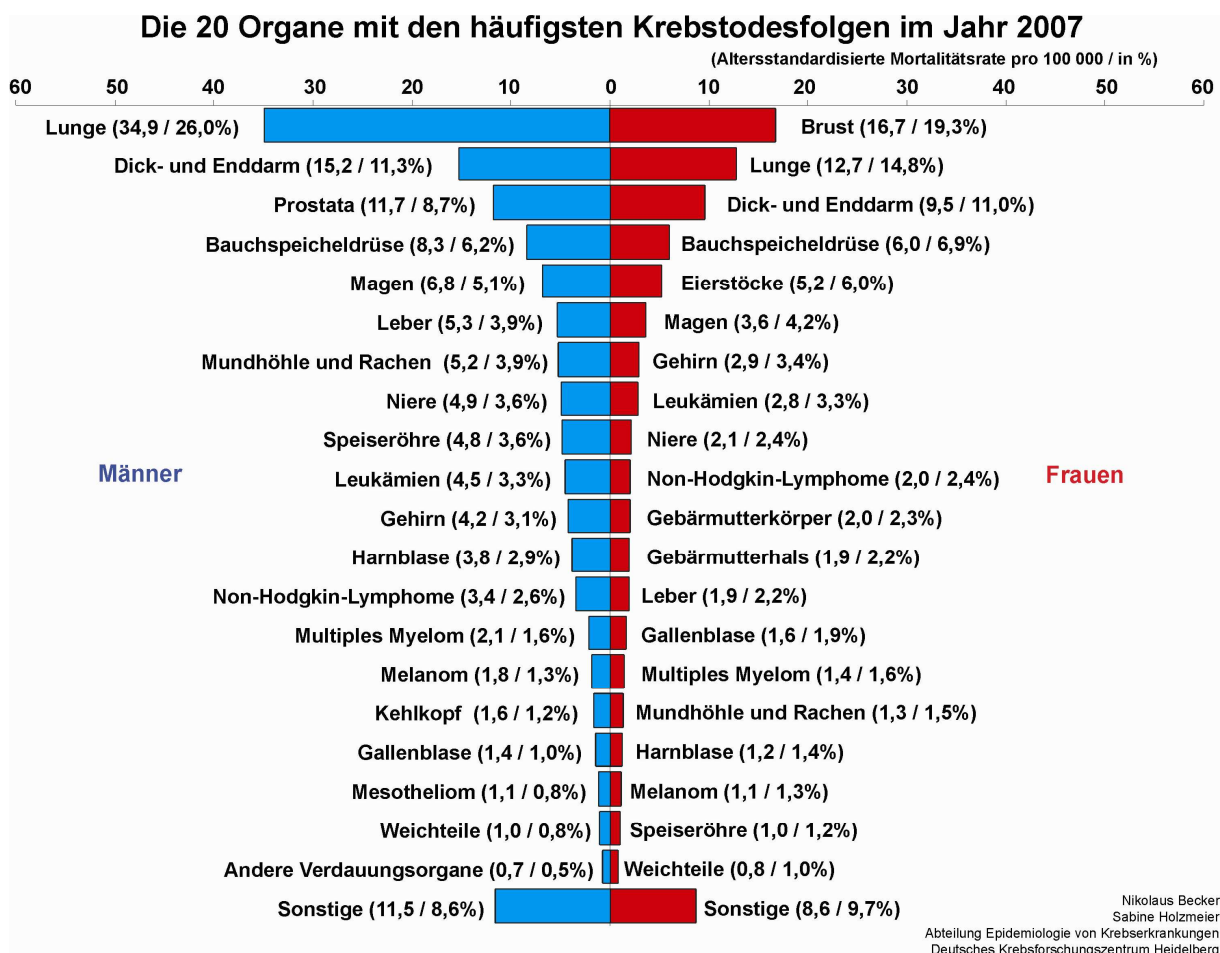
**Abbildung 1-1:** Die häufigsten Todesursachen in Deutschland 2007 [DKFZ Krebsatlas 2007].

Unter den diversen Krebsarten stellen Lungentumore bei Männern mit 26 % und Mammakarzinome bei Frauen mit 19 % die häufigsten Todesursachen dar (Abbildung 1-2). Aufgrund sich angleichender Raucherzahlen zwischen beiden Geschlechtern treten darauf zurückzuführende Malignome unter Frauen jedoch vermehrt auf.

Trotz der bedeutenden Unterschiede zwischen den einzelnen Krebsarten bezüglich ihrer Entstehung und Entwicklung, abweichender Therapie- und Heilungschancen sowie Diagnosemöglichkeiten ist aus epidemiologischer Sicht die Entstehung vieler bösartiger Tumore auf einen der folgenden Risikofaktoren zurückzuführen:

- Rauchen (25 - 30 %)
- Ernährungsgewohnheiten (20 - 42 %)
- Alkohol (3 %)
- Berufliche Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen (4 - 8 %)
- Genetische Faktoren (5 %)
- Schadstoffbelastung der Umwelt (2 %)
- Infektiöse Erreger (5 - 15 %)
- Weitere Faktoren (u.a. Medikamente, ionisierende Strahlung)

Aus der Auflistung geht hervor, dass durch Änderungen der Lebensgewohnheiten erhebliche Möglichkeiten zur Krebsprävention bestehen und die Krebssterblichkeit niedriger sein könnte, als sie heutzutage ist.

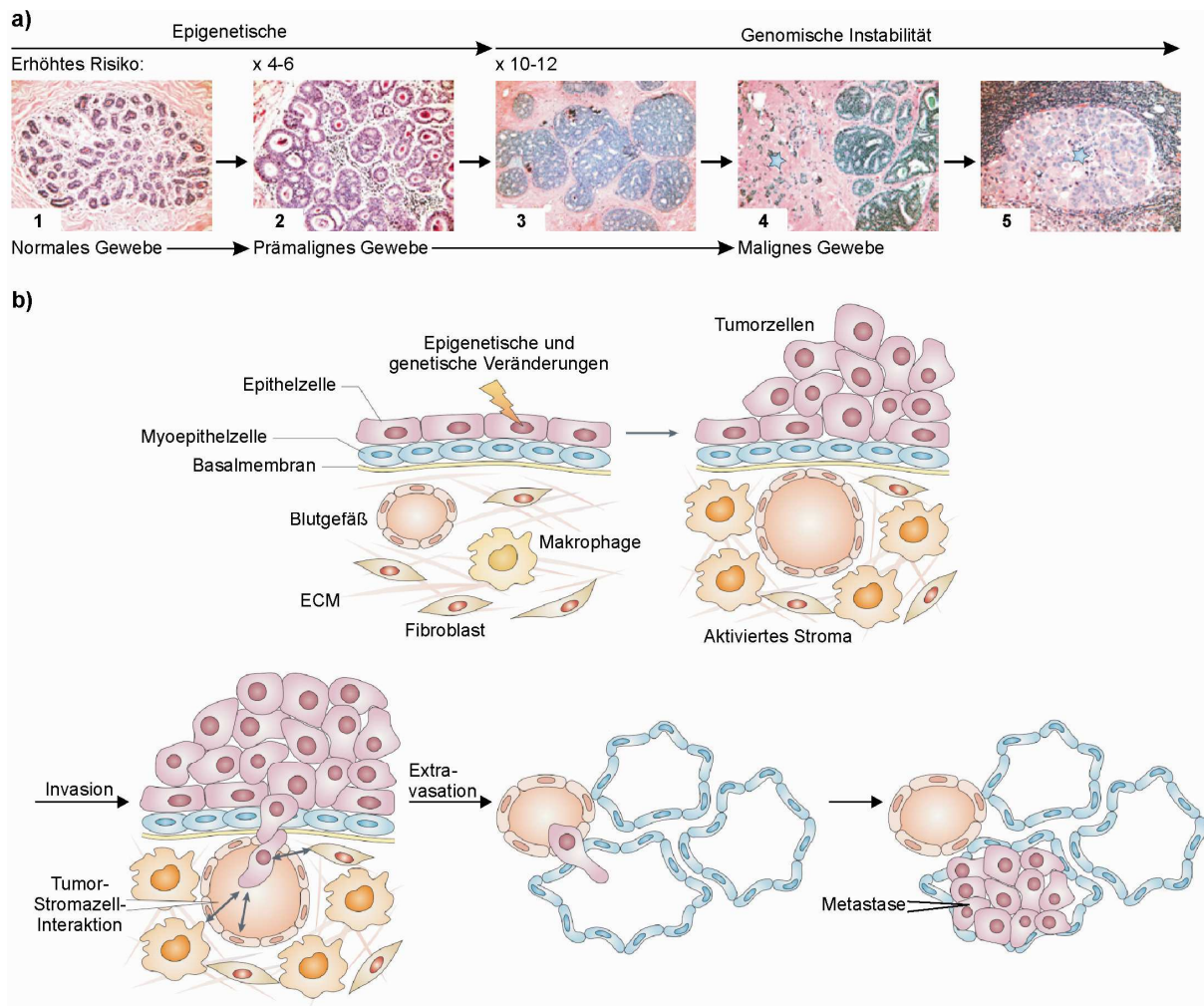


**Abbildung 1-2:** Die 20 Organe, welche in Deutschland im Jahr 2007 am häufigsten Krebserkrankungen mit Todesfolge aufwiesen [DKFZ Krebsatlas 2007].



Landläufig ist Krebs der Sammelbegriff für über 100 Krankheiten, die sich durch eine Reihe gemeinsamer Eigenschaften auszeichnen. *Hanahan* und *Weinberg* haben sechs grundlegende Ereignisse als Kriterien für Krebs aufgestellt [Hanahan 2000]. Dies sind Unabhängigkeit von der Wachstumsregulation des Organismus, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden biochemischen Signalen, Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose), unbegrenztes Zellteilungspotential, Fähigkeit zur Gefäßneubildung (Angiogenese) sowie die Möglichkeit zum Eindringen in fremdes Gewebe und zur Verbreitung in entfernte Körperregionen (Metastasierung).

Krebs ist eine Krankheit, die sich durch unkontrollierte Zellteilung und gestörte Interaktion zwischen Tumor- und Nachbargewebe auszeichnet. Abbildung 1-3 gibt einen Überblick über die verschiedenen Phasen der Tumorentstehung und -entwicklung. Der Prozess der Zellteilung ist in höheren Organismen strengt reguliert und jede Störung hat erhebliche Auswirkungen. In adulten Individuen sind Zellteilungen eher die Ausnahme als die Regel und finden nur in sehr genau definierten Regionen statt, beispielsweise in Schleimhäuten, der Keimschicht der Haut oder lokal und zeitlich begrenzt zur Wundheilung. Die restlichen Zellen ruhen bedingt durch ein fein austariertes Signalnetzwerk in einem Zustand ohne Teilung (1). Krebs entsteht, wenn dieses System aus der Balance gerät und wachstumsstimulierende Gene (Onkogene) überexprimiert und / oder wachstumshemmende Gene (Tumorsuppressorgene) ausgeschaltet werden. Ursachen hierfür sind meist genetische Mutationen in den expressionsteuernden DNA-Abschnitten der Gensequenzen (Promotor). Zellen, die derartige Mutationen aufweisen, sind nicht automatisch Krebszellen, tragen jedoch ein deutlich erhöhtes Risiko, sich zu diesen zu entwickeln. Man bezeichnet sie als prämaligne Läsion (2, 3). Durch Akkumulation mehrerer Mutationen über einen längeren Zeitraum von bis zu 30 Jahren oder durch weitere Einflüsse wie (chronische) Entzündungsreaktionen kann schließlich eine Grenze überschritten werden, ab welcher unkontrollierte Zellteilung einsetzt (4). Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbreitung in benachbartes Gewebe und zur Metastasierung (5) (blaue Sterne). In Teil b) der Abbildung sind die wichtigsten Stationen der Krebsentwicklung schematisch dargestellt.



**Abbildung 1-3:** Propagiertes Mehrstufenmodell der Krebsentstehung und -entwicklung. In **a)** sind angefärbte Gewebeschnitte verschiedener Krebsentwicklungsstadien abgebildet, Teil **b)** zeigt den schematischen Ablauf der Brustkrebsentstehung über mehrere Stadien (adaptiert aus [Vargo-Gogola 2007]).

Ungeachtet der möglichen biochemischen Ereignisse, welche zu bösartigen Neubildungen führen, und der jeweiligen Krebsart, sind Primärtumore selten tödlich und meist durch chirurgischen Eingriff oder lokale Bestrahlung behandelbar [Lee 2004]. Kommt es dagegen zu Ausbreitung des Krebses auf entfernte Organe (Metastasierung), sind die Prognosen ungünstig: die Aussicht der Patienten auf Heilung verschlechtern sich beträchtlich, etwa 90 % aller Patienten mit Metastasen sterben [Sporn 1996].

Während des stetigen Wachstums benötigt der Primärtumor mit zunehmender Größe entsprechend mehr Nährstoffe. Das Wachstum führt daher zunächst zur Unterversorgung des Tumors, was die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren zur

Aussprossung von neuen Blutgefäßen aus bereits vorhandenen auslöst. Die neugebildeten Blutgefäße stellen neben der Nährstoffversorgung des Primärtumors für Krebszellen die Möglichkeit zum Übertritt in das Blutgefäßsystem und damit zur Ausbildung von Metastasen dar.

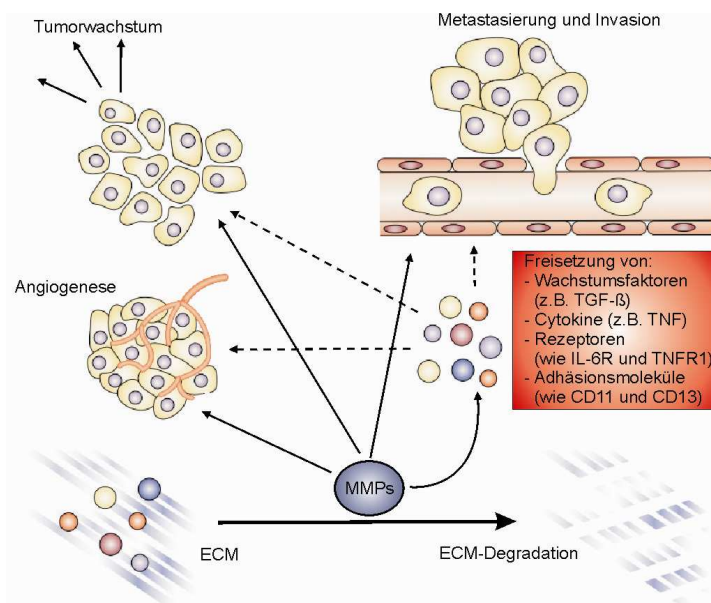
Im Zuge dieser Vorgänge vollzieht sich ein starker Abbau der extrazellulären Matrix (*Extra Cellular Matrix* - ECM) [Cairns 2003]. Dies ist ein komplexes strukturelles Netzwerk aus Proteinen und Kohlenhydraten, das die Zellen umgibt, ihnen zur Fortbewegung dient sowie dem Gewebe Halt und Struktur verschafft. Die Zell-ECM-Wechselwirkungen werden über spezielle Zelloberflächenrezeptoren gesteuert, welche die externen Reize in das Zellinnere weiterleiten und somit das Zellverhalten beeinflussen. Die Struktur der ECM basiert hauptsächlich auf der großen Familie der Kollagenproteine, welche supramolekulare Strukturen ausbilden und sich durch ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischer Zersetzung durch viele Proteasen auszeichnen. Damit bilden sie eine Barriere für invasive Tumorzellen. Neben Kollagenen weist die ECM eine Vielzahl weiterer Komponenten auf, inklusive Lamininen und Fibronectin, verschiedener Proteoglykane, Wachstumsfaktoren, Enzymen und Proteaseinhibitoren.

In ihrem Bestreben, die ECM zu beeinflussen, bilden Krebszellen extrazelluläre Proteasen, welche die ECM degradieren können [Basbaum 1996; Sloane 2006]. Sowohl zelloberflächengebundene, als auch intrazelluläre **Matrixmetalloproteinasen** (MMP), Serin- und Cysteinproteasen sowie Cathepsine, spalten und entfernen die unterschiedlichen ECM-Bestandteile, womit sie unter anderem matrixgebundene bioaktive Moleküle wie beispielsweise Wachstumsfaktoren freisetzen, welche ihrerseits die Tumorzellen beeinflussen [Lee 2004].

Zusätzlich ist seit vielen Jahren das Vorhandensein verschiedener Leukozyten bekannt [Balkwill 2001], deren Zusammensetzung je nach Tumorentwicklungsstufe und der speziellen Mikroumgebung variiert. Neben Granulozyten sind Dendritische Zellen, Makrophagen, natürliche Killerzellen und Mastzellen prominente Komponenten in (prä-)malignem Gewebe [Coussens 2002]. Früher ging man davon aus, dass deren Anwesenheit auf gescheiterte Versuche des Immunsystems zur Krebszellzerstörung zurückzuführen sei. Jedoch können unter dem Einfluss der Tumormikroumgebung ursprünglich krebsunterdrückende Entzündungszelltypen tumorfördernde Wirkung haben [Joyce 2009]. Zusätzlich sind viele dieser Zellen

weniger der Erkennung von Krebszellantigenen zuzuordnen als vielmehr der Gewebeerstörung aufgrund von Entzündungsfaktoren oder des Tumorwachstums. Das ist im speziellen bei Tumoren als Folge chronischer Entzündungen ersichtlich, wenn die Entzündungsreaktion nicht beendet wird. Deshalb kann eine chronische Entzündung eine Kettenreaktion in Gang setzen, welche die tumorfördernden Eigenschaften von Immunzellen, die diese aufgrund ihrer Reparatoreigenschaften besitzen, verstärkt [Medzhitov 2008]. Unter anderem tragen sie durch Ausschüttung von Proteasen zur Krebsentwicklung bei [Hiratsuka 2002; van Kempen 2006].

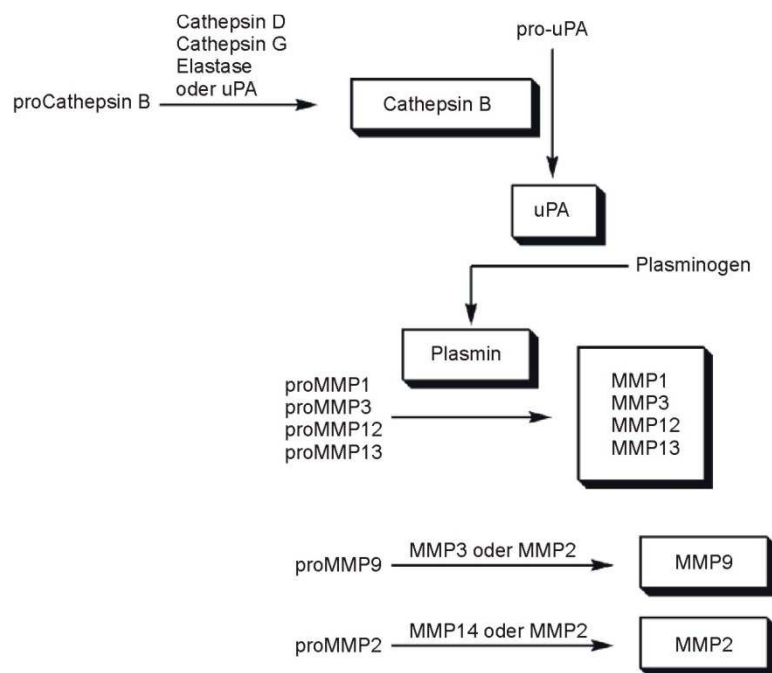
Da die ECM-Degradation eine Grundvoraussetzung für die Tumorentwicklung darstellt, kommt somit den Proteasen, insbesondere den MMPs, eine Schlüsselrolle bzgl. Tumorinvasivität, Angiogenese und nicht zuletzt Metastasierung zu [Lee 2004], was in Studien einen direkten Zusammenhang zwischen erhöhter MMP-Expression und reduzierter Überlebensdauer ergab [Rao 2003].



**Abbildung 1-4:** Schematische Darstellung tumorassoziierter Funktionen der Familie der MMPs (Abbildung nach [Rao 2003]). Sie fördern das Wachstum von Krebszellen durch ihre Wechselwirkung mit den ECM-Molekülen und Integrinen, durch Abspaltung insulinartiger Wachstumsfaktoren oder Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- $\alpha$ ) durch Spaltung ihrer Transmembranvorläufer (Shedding). Des Weiteren unterstützen sie die Angiogenese durch Erhöhung der Verfügbarkeit von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren. Ferner beeinflussen sie die Invasion und Migration durch Abbau von ECM-Komponenten wie Laminin-5, Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R), transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Tumornekrosefaktor (TNF).

Abbildung 1-4 gewährt einen Überblick über die verschiedenen Prozesse, in welche diverse MMPs involviert sind. Deshalb wurden Proteasen, vor allem MMPs, schon in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts als aussichtsreiche Ziele für die Krebstherapie erkoren. Nach vielversprechenden Tierversuchen mit Breitbandinhibitoren verliefen die nachfolgenden klinischen Studien jedoch enttäuschend [Coussens 2002; Egeblad 2002; Turk 2006]. Zusätzlich zu erheblichen Nebenwirkungen wurde in manchen Fällen ein krebsfördernder Einfluss der Inhibitoren vermutet [Overall 2002].

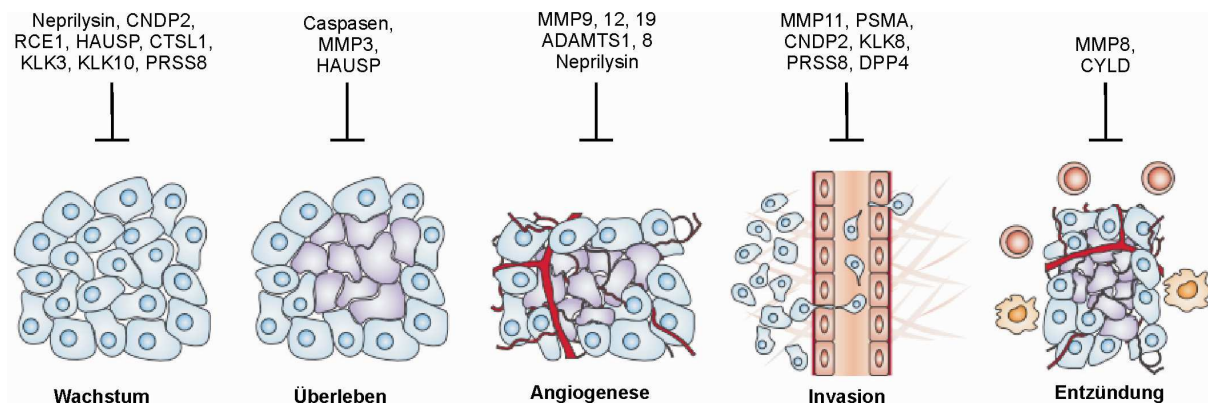
Neben den Matrix-Metalloproteasen sind noch eine Reihe weiterer Proteaseklassen an der Tumorprogression und -metastasierung beteiligt, beispielsweise die Serinprotease Urokinase (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator - uPA) sowie die Cysteinprotease Cathepsin B. Aber auch die ADAMs (a Disintegrin and Metalloprotease) und die verwandten ADAMTSs (ADAM mit Thrombospondin-domäne) sowie die meisten Vertreter der Kallikreine (KLK, Serinproteasen) weisen tumorassoziierte Eigenschaften auf.



**Abbildung 1-5:** Aktivierungskaskade einiger in die Tumormetastasierung involvierter proteolytischer Enzyme. Die mit Kästen hervorgehobenen Proteasen degradieren die ECM. Bemerkenswert ist das komplexe Zusammenspiel im Aktivierungsprozess [Lee 2004].

In den vergangenen zehn Jahren hat das tiefere Verständnis der vielfältigen Beziehungen, in welchen die verschiedenen Proteasen untereinander stehen, zahlreiche dieser damals unerwarteten Resultate erklären können (Abbildung 1-5). Es stellte sich heraus, dass unterschiedliche Proteasen die Effekte in den jeweiligen Tumorentwicklungsstadien dominieren. Ferner fungieren sie als Auslöser von Signalkaskaden, die weitere tumorfördernde Mechanismen aktivieren. Ebenfalls sind viele Transmembranproteasen an der Kommunikation zwischen Zellinnerem und extrazellulären Raum beteiligt. Für detaillierte und weitergehende Informationen sind zahlreiche sehr gute Übersichtsartikel zu diesem Themenkreis verfügbar, z.B. [Rao 2003; DeClerck 2004; Borgoño 2004; Murphy 2008].

Es konnten in den letzten Jahren jedoch auch verschiedene krebshemmende Eigenschaften diverser Proteasen entdeckt werden [López-Otín 2007]. So wird Caspase 8 eine metastasenunterdrückende Wirkung zugeschrieben [Stupack 2006] und USP7 (ubiquitinspezifische Protease 7 oder auch HAUSP) wirkt stabilisierend auf den Tumorsuppressor p53 [Li 2002]. Aber auch viele Vertreter extrazellulärer Proteasen wie MMPs, ADAMTSs oder KLKs weisen tumorhemmende Eigenschaften auf (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6:** Funktionen einiger Anti-Tumorproteasen in verschiedenen Krebsentwicklungsstufen (Abbildung nach [López-Otín 2007]).

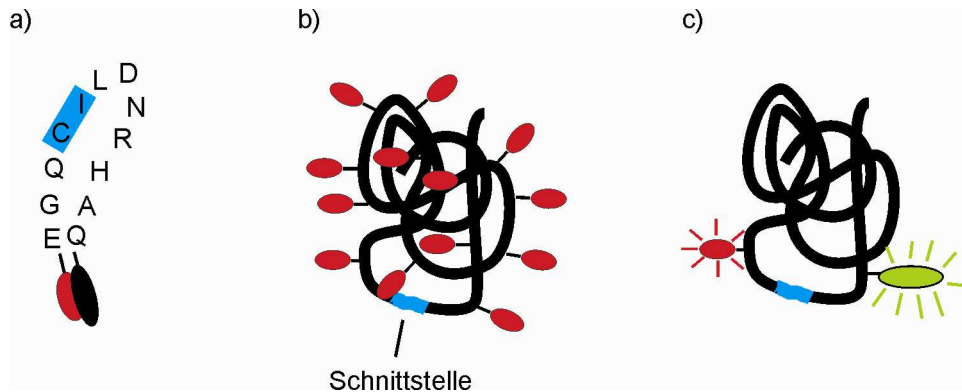
Das komplexe Zusammenspiel der Proteasen in ihren tumorassoziierten Eigenschaften, welche sich hemmend oder fördernd auf das Krebswachstum auswirken können, und die differenzierten Expressionsraten in Bezug auf Tumorart und -entwicklungsstufe erfordern ein gezieltes Ansprechen der jeweils relevanten

Proteasen in jedem einzelnen Patienten [Acuff 2006]. Hierzu ist ein detailliertes Wissen über die einzelnen Funktionen der Proteasen erforderlich.

Proteasen werden im extrazellulären Milieu als inaktive Proformen exprimiert, und erst durch verschiedene Mechanismen, an denen oft andere Proteasen beteiligt sind, aktiviert. Aufgrund dessen eignen sich antikörperbasierte Verfahren nicht als Proteasenachweis, da sie nicht zwischen inaktiver Proform und aktiver Protease unterscheiden können [DeClerck 2004]. Eine erhöhte Expressionsrate, wie von immunohistochemischen Methoden belegt, ist daher nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit einem Anstieg der proteolytischen Aktivität [Coussens 2002]. Es ist demnach erforderlich, direkt die Aktivität der Proteasen bestimmen zu können. Neben *in vivo*-Anwendung, welche mit optischen Verfahren diese bestimmten Tumorregionen zuordnen können [Mahmood 2003; Sameni 2003], ist es unerlässlich, die Proteasen *in vitro* separat zu charakterisieren [Lee 2004]. Die Verwendung von gelbasierten Methoden ist hierfür aufgrund ihres arbeitsaufwändigen und komplexen Charakters nicht empfehlenswert [Shelat 2005; Tatham 2009].

Fluoreszenzbasierte Nachweisverfahren zeichnen sich in jenem Zusammenhang durch ihre Robustheit und hohe Sensitivität, auch im Vergleich zu anderen Methoden, aus [Meldal 2005]. Aufgrund ihrer Einfachheit basieren diese meist auf kurzen, synthetischen Peptidsubstraten unter Ausnutzung von FRET (**F**luoreszenz **R**esonanz **E**nergie **T**ransfer). Dabei sind die Peptide mit Fluorophor und Löschmolekül in der Weise verknüpft, dass eine proteolytische Hydrolyse der Peptidkette zu einem Fluoreszenzanstieg führt [Carroll 1998; Cotrin 2004] (Abbildung 1-7 a). Derartige Untersuchungen geben Aufschluss über die von Proteasen jeweils erkannten Schneidesequenzen und können mit geeigneten Substraten zur Aktivitätsbestimmung herangezogen werden. Ein bedeutender Nachteil der Verfahren ist jedoch die nicht existente Tertiärstruktur der synthetischen Peptide, weshalb die Resultate aus entsprechenden Messungen nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die natürlichen *in vivo*-Substrate der jeweiligen Proteasen zulassen [Tatham 2009]. Ein anderer Ansatz basiert deshalb auf natürlichen Proteinen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen hochgradig markiert sind und deren Fluoreszenzemission durch Farbstoffdimerisierung reduziert ist (Abbildung 1-7 b). Die Spaltung des Proteins hebt die Farbstoffwechselwirkungen auf und erzeugt so einen Fluoreszenzanstieg. Die hohe Zahl an Farbstoffen beeinträchtigt jedoch ebenfalls die Proteinstruktur und reduziert die Nachweissensitivität, da die

Farbstoffzahl auf den verbleibenden Proteinfragmenten oftmals ausreicht, um die Fluoreszenz weiterhin zu löschen. Besonders bei spezifischen Proteasen mit seltenen Schneidesequenzen ergeben sich Nachweisprobleme.



**Abbildung 1-7:** Schematischer Aufbau **a)** synthetischer Peptidsubstrate, **b)** hochgradig markierte und **c)** stöchiometrisch markierte Proteinsubstrate.

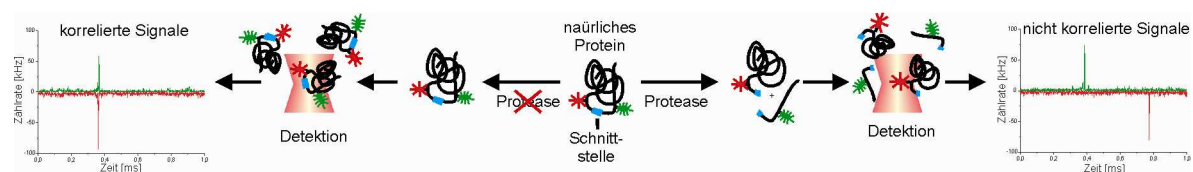
Aus oben genannten Gründen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neues hochsensitives einzelmolekülspektroskopisches Nachweisverfahren für proteolytische Enzyme entwickelt werden, welches in der Identifizierung und Charakterisierung tumorrelevanter Proteasen und deren potentieller Inhibitoren Anwendung findet. Aufgrund der direkten Auswirkungen abweichender Expressionsraten bestimmter Proteasen auf die Prognose von Krebspatienten sind in neuerer Zeit verschiedene Proteasen als vielversprechende Biomarker im Gespräch, zu deren Detektion sich das Nachweisverfahren ebenfalls eignen würde. Einer der aussichtsreichsten Biomarkerkandidaten stellt Kallikrein 6 (KLK6) dar, da es klinisch mit zahlreichen wichtigen Parametern wie einem späten Tumorstadium, Ansprechen auf Chemotherapie oder krankheitsfreiem Überleben des Patienten verknüpft werden konnte [Emami 2008].

In dem zu entwickelnden System sollten keine kurzen Peptidsubstrate, wie derzeit bei kommerziell erhältlichen Nachweisverfahren, sondern natürliche Proteinsubstrate mit ihrer nativen Struktur Verwendung finden. Damit ermöglicht das Verfahren auch die Erkennung der natürlichen *in vivo*-Substrate von Proteasen, was für ein tieferes Verständnis der proteolytischen Prozesse in der Tumorentwicklung entscheidend ist.



Um die zuvor beschriebenen Probleme einer hochgradigen Proteinmarkierung zu umgehen und gleichzeitig die Aktivität spezifischer Proteasen nachweisen zu können, sollten die Proteinsubstrate eine stöchiometrische 1:1-Markierung aufweisen (Abbildung 1-7 c). Da entsprechende universell anwendbare Verfahren nicht existieren, musste zunächst eine Methode entwickelt werden, um unter Erhalt der nativen Proteinstruktur eine derartige Markierung unabhängig von der Art des zu modifizierenden Proteins zu erzielen.

Zum Nachweis eines geschnittenen Proteins werden die Substrate mit zwei spektral getrennt detektierbaren, jedoch mit einem einzigen Laser anregbaren Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert. Da beide Markierungen statistisch erfolgen, treten immer einige Proteine auf, in denen eine Farbstoffmarkierung auf der einen Seite und der zweite Fluorophor auf der anderen Seite der für die Protease spezifischen Schneidesequenz liegt, d.h. sie werden durch einen Verdau der Protease voneinander getrennt. Somit kann man die Proteaseaktivität durch Messung der Signalkorrelation der beiden Farbstoffe bestimmen (Abbildung 1-8).



**Abbildung 1-8:** Schematischer Ablauf des Proteasenachweises basierend auf der Detektion zeitlich korrelierter Fluoreszenzsignale.

Die Verwendung von einzelmolekülspektroskopischen Methoden zur Detektion steigert nicht nur die Sensitivität, sondern ermöglicht auch das Auffinden von kleinen Subpopulationen des geschnittenen Substrats, was mit Ensembleverfahren nicht möglich ist. Zusätzlich reduziert sich die Menge des benötigten biologischen Materials, was eine Grundvoraussetzung zur Durchführung von Inhibitorenscreenings darstellt, da die betreffenden Proteasen meist lediglich in minimalen Mengen verfügbar sind [Meldal 2005]. Das System sollte an Albumin aus Rinderserum (*Bovin Serum Albumine* - BSA) und Trypsin als Modellverbindungen entwickelt und im Anschluss an Aktivitätsmessungen von tumorrelevanten Proteasen, z.B. KLK6, zum Einsatz kommen.

Neben der Markierung mit zwei Fluorophoren sollte ein alternativer Detektionsansatz verfolgt werden, wobei lediglich eine Farbstoffmarkierung in Kombination mit einem Ankermolekül (Biotin) Verwendung findet. Auch in diesem Fall trennt ein proteolytischer Verdau die beiden Markierungen. Mit einer modifizierten Festphase, die das Ankermolekül selektiv bindet, ist die Entfernung der mit diesem verbundenen Proteinteile möglich, wohingegen das farbstoffmarkierte Fragment in Lösung verbleibt. Die Proteaseaktivität ist hierbei durch Messung der Fluoreszenz der Lösung ermittelbar.

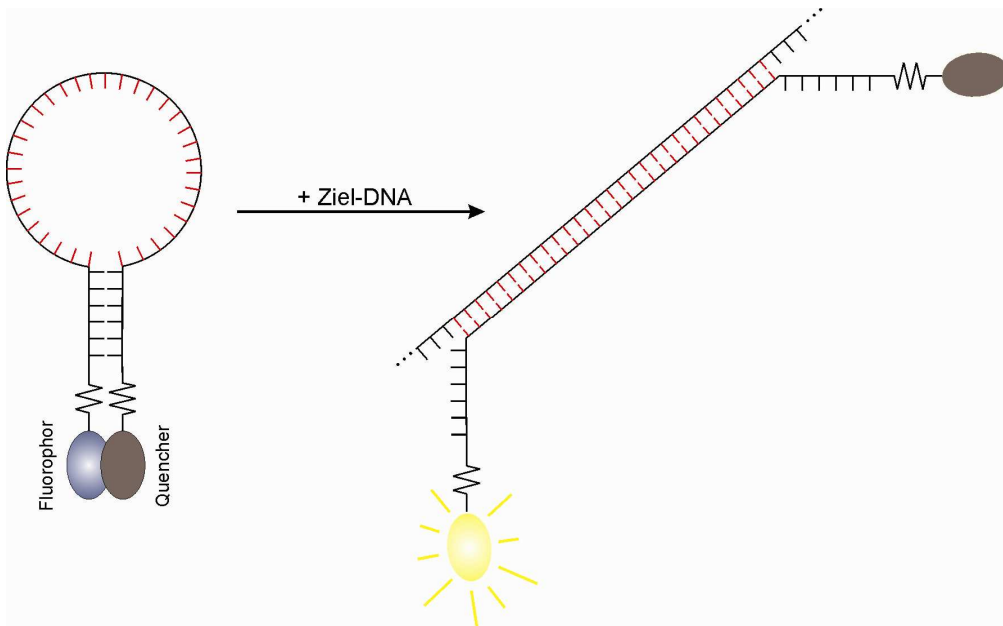
## 1.2 Bedeutung von DNA-Punktmutationen für die Krebsentstehung

Neben einer effektiven und gezielten Behandlung von Krebs ist die frühzeitige Erkennung der Krankheit von größtem Interesse, da die Heilungschancen bei rechtzeitigem Therapiebeginn um ein Vielfaches größer sind. Da die erste Stufe der Krebsentstehung das Auftreten einer DNA-Mutation darstellt, ist eine darauf zielende Früherkennung sinnvoll (siehe Abbildung 1-3). Mittlerweile ist eine Vielzahl von Genmutationen bekannt, die das Risiko an bestimmten Krebsarten zu erkranken, potenzieren. Der Großteil dieser Mutationen besteht aus sogenannten Punktmutationen (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP). Unter dem aus 30 Milliarden Basenpaaren bestehenden humanen Genom finden sich etwa zehn Millionen SNPs, und damit etwa alle 100 bis 300 Basen eine. Dabei schwankt deren Verteilung und SNPs finden sich sowohl in kodierenden als auch in nicht kodierenden Abschnitten. Zwei Drittel aller Mutationen bestehen aus einem C→T-Austausch. Obwohl die Mehrheit der SNPs ohne Bedeutung ist, können einige schwerwiegende Auswirkungen auf die individuelle Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten oder auf das Ansprechen auf Medikamente haben. In Bezug auf Krebs kommen beispielsweise SNPs in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und 2 in 8,5 % aller Brusttumoren vor [Hemminki 2004]. Ein C→T-Austausch in Exon 3 des KLK10-Gens ändert die Aminosäurekodierung von Alanin zu Serin und steht in Verbindung mit einem höheren Prostatakrebsrisiko [Bharaj 2002]. Belege für Verbindungen zwischen weiteren SNPs und der Veranlagung zu Lungen-, Blasen- und Darmkrebs wurden ebenfalls entdeckt [McGrath 2006; Nöthlings 2009; Timofeeva 2010].

Mit Hilfe der molekularen Diagnostik lassen sich somit erhöhte Krebsrisiken erkennen und durch gezielte Überwachung entsprechende Veränderungen frühzeitig behandeln. Um eine spezifische DNA-Sequenz zu detektieren werden im Allgemeinen fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide eingesetzt, die das Vorhandensein der gesuchten Sequenz durch einen Fluoreszenzanstieg anzeigen. Im Vergleich zu oberflächengebundenen und PCR- (Polymerasekettenreaktion – *Polymerase Chain Reaction*) basierten Verfahren, wie z.B. *TaqMan*-Sonden [Lee 1993], bieten Sonden mit Haarnadelstruktur, sogenannte *Hairpin*-Sonden, Vorteile in punkto Sensitivität und Spezifität.

*Molecular Beacons* (molekulare Leuchtfeuer) stellen den Urtyp dieser Sonden dar und wurden erstmalig von *Tyagi* und *Kramer* [Tyagi 1996] synthetisiert. Es sind zweifach gekoppelte Oligonukleotide, wobei sich ein Fluorophor am 5'-Ende und ein Löschmolekül am 3'-Ende des Stammes befindet. Die Fluoreszenz wird in der Regel durch einen DABCYL-Rest [Tyagi 1996], ein Löschmolekül [Yao 2004] oder ein Goldorganyl [Dubertret 2001] gelöscht.

Die Probe enthält einen zur Zielsequenz komplementären Bereich, welcher von zwei kurzen, zueinander komplementären Sequenzabschnitten, eingeschlossen ist. In Abwesenheit einer Zielsequenz hybridisieren die komplementären Bereiche des Oligonukleotids und bilden eine Stamm-Schleife-Struktur. 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 ihr komplementären Basen und das Molekül entfaltet sich (Abbildung 1-9). Die Löschung des Farbstoffs wird aufgehoben und führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.



**Abbildung 1-9:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise eines *Molecular Beacons*.

*Smart Probes* (Intelligente Sonden) stellen ein leicht verändertes, an der Universität Heidelberg von der Arbeitsgruppe um *Professor Sauer* auf der Grundlage von *Molecular Beacons* entwickeltes System dar. Dieses kommt mit einer Funktionalisierung des Oligonukleotids aus. Hierbei handelt es sich um einen Oxazin- oder Rhodaminfarbstoff, welcher in der Stamm-Schleife-Struktur durch die Nukleobase Guanin gelöscht wird. Der Einsatz eines Löschmoleküls wird daher überflüssig [Knemeyer 2000]. Bei der Guanin-Löschung findet ein photoinduzierter Elektronentransfer (PET) von der Nukleobase zum Farbstoff statt.

*Smart Probes* reagieren auf die zu ihrer Nukleotidabfolge komplementäre DNA-Sequenz, wodurch diese spezifisch nachgewiesen werden können. Die Detektion der Gegensequenz wird über einen Anstieg des Fluoreszenzsignals der Sonden vollzogen. Damit ist die minimale zum Nachweis nötige Konzentration in erster Linie von den physikalischen Detektionsmöglichkeiten für das emittierte Licht abhängig. Moderne Fluoreszenzspektrometer arbeiten bei einem Probenvolumen im Mikroliterbereich und Konzentrationen um  $10^{-8}$  M noch ausreichend empfindlich. Weitaus sensitiver ist die Einzelmolekülspektroskopie, mit der Konzentrationen bis  $10^{-14}$  M vermessen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das auf *Smart Probes* basierende Detektionssystem weiterentwickelt. Um für den Einsatz zum Nachweis von Biomarkern geeignet zu sein, muss die Erkennung von Punktmutationen nicht nur hochempfindlich, sondern auch spezifisch erfolgen. Es müssen kleinste Mengen mutierter Sequenzen unter einem großen Überschuss unveränderter (wt – **Wildtyp**) Basenabfolgen sichtbar gemacht werden [Sidransky 2002]. Zur Spezifitätserhöhung der *Smart Probes*, soll der Zusatz von zu den wt-Sequenzen komplementären *Hairpins* ohne Farbstoffmarkierung erfolgen, welche die wt-DNAs maskieren und somit einen falsch-positiven Fluoreszenzanstieg durch Hybridisierung der *Smart Probe* mit den wt-Oligonukleotiden verhindern.

Einige der in den Arbeiten zur Entwicklung des Proteaseaktivitätsnachweissystems erzielten Erkenntnisse bildeten die Grundlage zum Aufbau einer neuartigen, auf den speziellen Emissionseigenschaften des Coumarinfarbstoffs Dy-520XL basierenden DNA-Sonde zum hochsensitiven Nachweis von DNA-Punktmutationen auf Einzelmolekülebene, in welchen die im zweiten Teil der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse mit den *Smart Probes* ebenfalls mit einfließen.



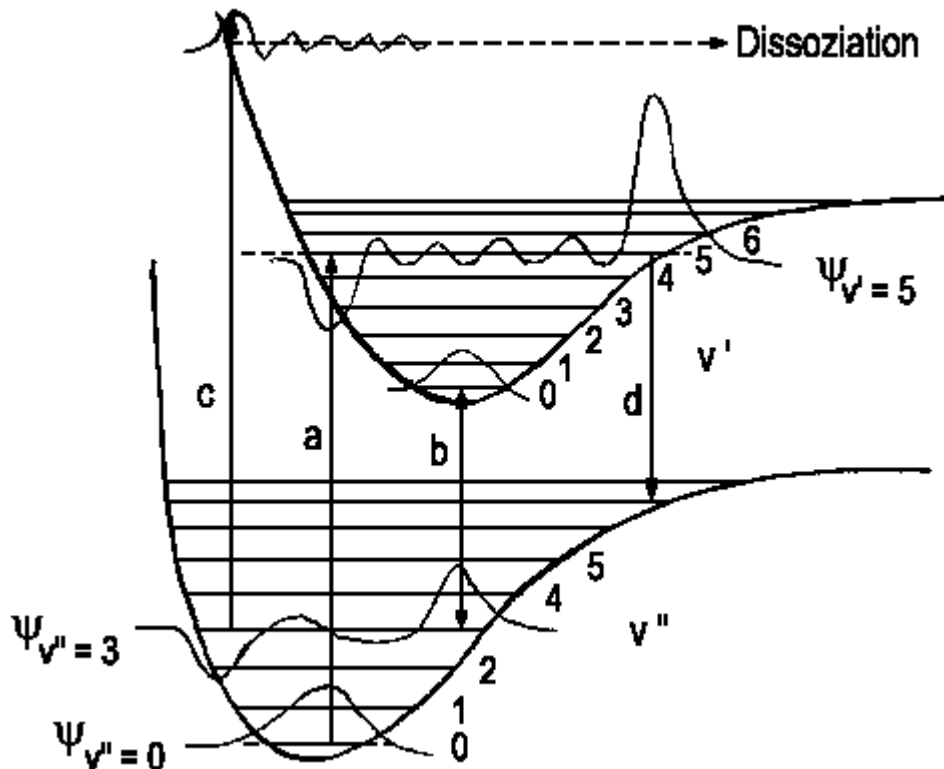
## 2 THEORIE

### 2.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

#### 2.1.1 Lichtabsorption

Während die Absorption von Photonen im infraroten Bereich des Spektrums Vibrations- und Rotationsfreiheitsgrade anregt, spielen bei Fluoreszenzfarbstoffen, welche im ultravioletten und sichtbaren Bereich absorbieren, elektronische Übergänge eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zur Rotation von Molekülen, die aufgrund ihrer geringen Anregungsenergie schon bei Raumtemperatur in höheren Niveaus besetzt ist, gehen Moleküle im Schwingungsgrundzustand erst bei höheren Temperaturen in angeregte Zustände über.

Bei elektronischen Niveaus sind die Energieunterschiede so groß (1,5 bis 3 Elektronenvolt), dass auch bei höheren Temperaturen nur der elektronische Grundzustand  $S_0$  besetzt ist, wie es die *Boltzmann*-Statistik vorhersagt. Hierbei wird durch Anhebung eines Elektrons aus dem höchsten besetzten (*Highest Occupied Molecular Orbital* - HOMO) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* - LUMO) eines Fluorophors ein elektronisch energiereicherer Zustand, z.B. der erste angeregte Zustand  $S_1$ , erreicht. Bei diesem Übergang gilt das *Franck-Condon*-Prinzip. Es setzt voraus, dass elektronische Übergänge so schnell vollzogen werden, dass die Kerne keine Zeit haben, darauf zu reagieren, da ihre Bewegungen aufgrund der großen Masse viel langsamer als die der Elektronen sind. Dieses Prinzip stellt keine allzu große Näherung dar, da die Absorptionszeiten im Bereich von Femtosekunden ( $10^{-15}$  s) liegen, wogegen sich die Kernschwingungen in der Größenordnung von Picosekunden ( $10^{-12}$  s) bewegen. Daher entspricht dies im Potentialdiagramm einem vertikalen Übergang, der in den Zustand der größten Wahrscheinlichkeitsdichte  $\psi^2$  erfolgt. Im Zustand  $S_1$  ist aber in der Regel der Gleichgewichtsabstand  $r_{gl}$  zu größeren Werten verschoben, weshalb ein schwingungsangeregter Zustand erreicht wird (Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-1:** Potentialkurven des Grund- und des ersten angeregten Zustands eines zweiatomigen Moleküls mit Schwingungsniveaus und den Wellenfunktionen  $\Psi$  nach *Boltzmann* [www1].

Damit ein derartiger Übergang stattfinden kann, müssen folgende drei Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die *Bohr'sche* Frequenzbedingung  $\Delta E = h \cdot \nu$  muss erfüllt werden, d.h. es sind nur Übergänge mit der Energie eines Vielfachen des *Planck'schen* Wirkungsquantums  $h$  ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$  Js) zugelassen.
2. Das entsprechende Übergangsdipolmoment  $M_{EA} = \langle \Psi_E | \hat{\mu} | \Psi_A \rangle$  mit  $\Psi_A$  und  $\Psi_E$  als Wellenfunktionen und  $\hat{\mu}$  als Dipolmomentoperator des Systems muss eine Projektion auf den elektrischen Feldstärkevektor des Anregungslichts besitzen.
3. Das Übergangsdipolmoment muss ungleich Null sein:  $M_{EA} = \langle \Psi_E | \hat{\mu} | \Psi_A \rangle \neq 0$ .



Die Stärke der Absorption von Licht der Wellenlänge  $\lambda$  wird durch den dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon(\lambda)$  (in  $\text{l}(\text{cm}\cdot\text{mol})^{-1}$ ) wiedergegeben. Er ist abhängig von Temperatur und Lösungsmittel. Experimentell ist er über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz (Gleichung 2.1) zugänglich:

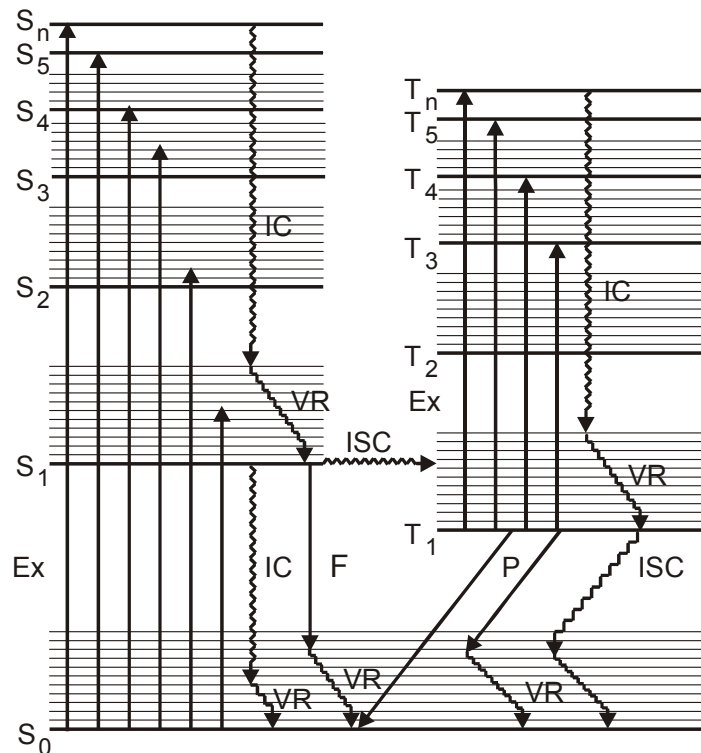
$$A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

Die Absorption  $A(\lambda)$  wird aus dem Intensitätsverhältnis von Referenz-  $I_0$  und Messstrahlintensität  $I(\lambda)$  bestimmt. Die Variablen  $c$  und  $d$  stehen für die Konzentration in mol/l bzw. die Schichtdicke in cm.

### 2.1.2 Lichtemission

Die nach der Absorption eines Lichtquants ablaufenden Vorgänge können anhand eines vereinfachten Energieniveauschemas, dem sogenannten *Jablonski-Diagramm* (Abbildung 2-2), beschrieben werden [Jablonski 1935].

Nach der Anregung, die sehr schnell erfolgt ( $k_{\text{ex}} \approx 10^{15} \text{ s}^{-1}$ ), befindet sich das Molekül im ersten oder einem höher angeregten Rotations-Schwingungs-Niveau eines Singulettzustandes ( $S_n$  mit  $n \geq 1$ ). Da neben der Elektronenanregung immer auch Schwingungen  $\Delta E_{\text{vib}}$  und Rotationen  $\Delta E_{\text{rot}}$  angeregt werden, ist meist nur noch eine breite Absorptionsbande zu sehen, die sich aus vielen Übergängen zusammensetzt. Die Energieabgabe (Emission) kann auf unterschiedlichsten Wegen geschehen. Wurden Farbstoffmoleküle in höhere Zustände als  $S_1$ , oder in höhere Schwingungsniveaus angeregt, relaxieren diese sehr schnell ( $10^{-12} \text{ s}$ ). Dies geschieht unter Wärmeabgabe durch Stöße mit anderen Molekülen (*Internal Conversion* - IC) in die *Boltzmann-Verteilung* des  $S_1$ -Zustandes.



**Abbildung 2-2:** Jablonski-Diagramm ohne Berücksichtigung der Rotationsenergieniveaus, IC: *Internal Conversion* (strahlungslose Desaktivierung), Ex: *Excitation* (Anregung), ISC: *Intersystem Crossing* (Übergang mit verbotener Spinumkehr), VR: *Vibrational Relaxation* (Schwingungsrelaxation),  $S_x$ : Singulettzustände,  $T_x$ : Triplettzustände, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz.

Für eine weitere Energieabgabe ausgehend vom  $S_1$ -Zustand stehen prinzipiell drei Möglichkeiten offen:

1. Es gibt einen weiteren strahlungslosen Übergang (IC). Dieser ist aber, aufgrund der viel höheren Energiedifferenz, nicht so schnell wie die vorherigen Übergänge aus höheren Zuständen, da die Übergangsgeschwindigkeit proportional zu  $\Delta E$  ist.
2. Das Molekül geht in den Triplettzustand  $T_1$  über (*Intersystem Crossing*). Ein derartiger Übergang ist thermodynamisch prinzipiell immer möglich, da der  $T_1$ -Zustand energetisch stets tiefer liegt als der  $S_1$ -Zustand. Er ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Spinmultiplizitäten quantenmechanisch verboten, so dass dieser Übergang, von einigen Ausnahmen abgesehen (z.B. Benzophenon), relativ selten ist. Der Übergang zwischen Zuständen verschiedener Spinmultiplizität wird durch eine starke Spin-Bahn-Kopplung

erleichtert. Eine weitere Energieabgabe kann durch den ebenfalls verbotenen  $T_1$ - $S_0$ -Übergang erreicht werden. Dieser kann sowohl strahlungslos als auch unter Lichtemission (Phosphoreszenz) erfolgen. Da es sich um einen spinverbotenen Übergang handelt, ist die Lebensdauer des  $T_1$ -Zustandes oft sehr lang ( $10^{-5}$  s), in festen Matrizen kann sie sogar bis zu einigen Minuten betragen.

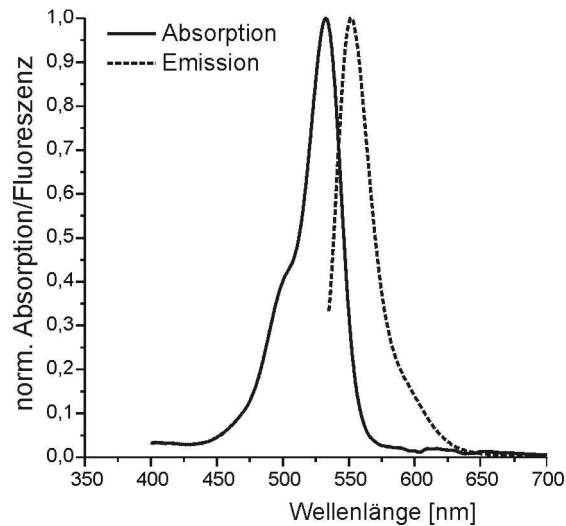
3. Unter Aussendung eines Photons findet ein Übergang vom  $S_1$ -Zustand in den  $S_0$ -Zustand statt (Fluoreszenz). Ein Fluoreszenzübergang geht immer vom niedrigsten Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes aus, da er viel langsamer ( $10^{-9}$  s) geschieht als die schneller ablaufende Schwingungsrelaxation ( $10^{-12}$  s) (*Kasha*-Regel). Der Übergang erfolgt in angeregte Schwingungsniveaus des Grundzustands, so dass man bei größeren organischen Molekülen ein diskretes und vielfältiges Linienspektrum erwarten sollte. Die Solvathülle, welche die Farbstoffmoleküle umgibt, ist bei Raumtemperatur für jedes Molekül anders strukturiert und sehr beweglich, so dass zu jedem Zeitpunkt viele verschiedene Wechselwirkungen zwischen Farbstoff- und Solvensmolekül bestehen, die eine starke Verbreiterung der Schwingungsübergänge verursachen. Dies hat zur Folge, dass bei Raumtemperatur in Lösung nur breite Emissionsbanden zu beobachten sind. Die restliche Schwingungsenergie wird durch strahlungslose Stoßdesaktivierung abgegeben.

Die Relaxationsprozesse sind in Tabelle 2-1 noch einmal zusammengefasst:

**Tabelle 2-1:** Übersicht der Zustandsübergänge in angeregten Molekülen.

Übergang	Name
$S_1 \xrightarrow{k_{IC}} S_0 + \text{Wärme}$	strahlungslose Desaktivierung (IC)
$S_1 \xrightarrow{k_f} S_0 + h\nu_f$	Fluoreszenz (F)
$S_1 \xrightarrow{k_{ISC}} T_1$	<i>Intersystem Crossing</i> (ISC)
$T_1 \xrightarrow{k_{ISC}} S_0 + \text{Wärme}$	<i>Intersystem Crossing</i> (ISC)
$T_1 \xrightarrow{k_p} S_0 + h\nu_p$	Phosphoreszenz (P)

Da es vor und nach der Fluoreszenz zu strahlungslosen Schwingungsrelaxationen kommt, besitzt die emittierte Strahlung stets geringere Energie bzw. größere Wellenlänge als die absorbierte Strahlung (Abbildung 2-3). Das Fluoreszenzspektrum ist gegenüber dem Absorptionsspektrum bathochrom verschoben (*Stokes-Verschiebung*) [Stokes 1852].



**Abbildung 2-3:** Stokes-Verschiebung zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum eines Farbstoffs.

### 2.1.3 Fluoreszenzlebensdauer- und quantenausbeute

In der Zeitdomäne kann die Fluoreszenzlebensdauer als die Entvölkerung des ersten angeregten Singulettzustandes  $S_1$  nach der Anregung mit einem infinitesimal kurzen Puls ( $\delta$ -Puls) betrachtet werden. Dabei ist die Fluoreszenzlebensdauer die Zeit, nach der die Anzahl der angeregten Moleküle oder die Fluoreszenzintensität  $[F(t)^*]$  auf  $1/e$  des Maximalwertes  $[F(t_0)^*]$  gefallen ist. In vielen Fällen lässt sich dieser Abfall durch ein Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung beschreiben, welches in integrierter Form

$$[F(t)^*] = [F(t_0)^*] e^{-t/\tau} \quad (2.2)$$

lautet, wobei in  $\tau$  alle Geschwindigkeitskonstanten, die zur Entvölkerung des angeregten Zustandes beitragen, berücksichtigt sind (Gleichung 2.3).

$$\tau = \frac{1}{k_{fl} + k_{IC} + k_{ISC}} \quad (2.3)$$

In dieser Gleichung bezeichnet  $k_{fl}$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz,  $k_{IC}$  und  $k_{ISC}$  stehen für die ebenfalls ablaufenden strahlungslosen Konkurrenzprozesse IC und ISC. Für Chromophore liegt die Fluoreszenzlebensdauer im Bereich von Nanosekunden.

Experimentell lässt sich die Fluoreszenzlebensdauer am besten bestimmen, indem man die Abnahme der Fluoreszenzintensität zeitabhängig misst. Dies ist möglich, da die beobachtbare Intensität proportional zur Anzahl der angeregten Zustände ist.

In vielen Fällen zeigt sich jedoch, dass sich das Fluoreszenzabklingverhalten nicht als monoexponentiellen Abfall beschreiben lässt. In solchen Fällen muss man die Abklingkurven als Summe mehrerer Exponentialfunktionen auffassen:

$$F(t)^* = \sum_i A_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad (2.4)$$

Der präexponentielle Faktor  $A_i$  repräsentiert die Amplitude der Komponente  $i$  mit der zugehörigen Lebensdauer  $\tau_i$ .

Die so erhaltenen Lebensdauern müssen nicht zwangsläufig eine anschauliche, physikalische Bedeutung haben. Oft stellen sie nur das Ergebnis einer mathematischen Anpassung dar. Physikalische Bedeutung erlangen die einzelnen Lebensdauern zum Beispiel, wenn verschiedene fluoreszierende Spezies in der Probe enthalten sind. Unter der Annahme, dass alle Lebenszeiten erfasst wurden, ist  $\sum A_i \cdot \tau_i$  proportional zur Fluoreszenzintensität.

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  gibt das Verhältnis von emittierten  $N_{em}$  zu absorbierten Photonen  $N_{abs}$  an [Becker 1983] (Gleichung 2.5). Sie ist stets kleiner eins, da durch Photonenabsorption angeregte Moleküle immer einen Teil ihrer Energie strahlungslos abgeben.

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (2.5)$$

Man kann die Fluoreszenzquantenausbeute auch über die Geschwindigkeitskonstanten aller konkurrierenden Prozesse definieren, die zur Desaktivierung eines elektronisch angeregten Zustands beitragen (Gleichung 2.6).

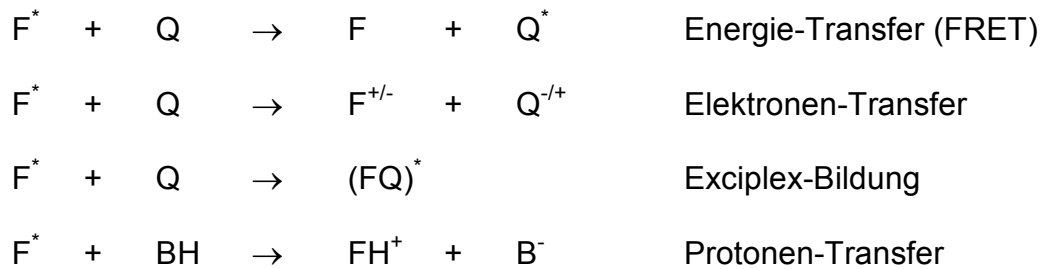
$$\Phi = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + \sum k_i} \quad (2.6)$$

Darin ist  $k_{fl}$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und  $\sum k_i$  die Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller sonstigen Prozesse, die zur Desaktivierung führen.

#### **2.1.4 Fluoreszenzlöschung**

Da sich die elektronischen Eigenschaften von Molekülen durch Anregung stark ändern, können sie im angeregten Zustand Reaktionen eingehen, die im Grundzustand nicht ablaufen. Diese können sowohl zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität als auch zu einer Verkürzung der Lebensdauer führen. In solchen Fällen spricht man allgemein von Fluoreszenzlöschung. Damit diese stattfinden kann, müssen sich das Löschmolekül und der angeregte Fluorophor in unmittelbarer Nähe zueinander befinden bzw. durch ein energieübertragendes System verbunden sein [Kan 1999].

Folgende bimolekulare Prozesse können zur Fluoreszenzlöschung beitragen:



**Abbildung 2-4:** Übersicht über mögliche Löschreaktionen eines Farbstoffs im angeregten Zustand (\* kennzeichnet angeregte Zustände; F: fluoreszierendes Molekül; Q: Löschmolekül (*Quencher*)).

Beim **Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)** wird die Anregungsenergie vom angeregten Farbstoffmolekül strahlungslos über einen Dipol-Dipol-Mechanismus auf ein geeignetes Löschmolekül übertragen. Damit dieser Transfer funktioniert, muss das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs mit dem Absorptionsspektrum des Löschmoleküls überlappen [Förster 1948; Stryer 1978]. Des Weiteren ist die Energie-Transfer-Effizienz antiproportional zur sechsten Potenz des Abstandes der Moleküle. Der **photoinduzierte Elektronentransfer (PET)** beruht auf Redoxreaktionen, welche im angeregten Zustand durch Änderung der Redoxpotentiale möglich werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird ausschließlich durch Redoxpotentiale, den Abstand und die Lage der Reaktanden zueinander bestimmt. Bei der **Exciplex-Bildung** wird chemisch ein Molekül gebildet, welches nur im angeregten Zustand stabil ist und nach der strahlungslosen Desaktivierung wieder zerfällt. Die *Exciplex*-Bildung ist ein Spezialfall des Elektronentransfers, da die chemische Reaktion durch eine Elektronenübertragung induziert wird. Ein **Protonen-Transfer** kann stattfinden, wenn im Fluorophor acide oder basische Gruppen vorhanden sind. Er beruht auf der Änderung der  $pK_a$ - bzw.  $pK_b$ -Werte des Fluorophors beim Übergang in den angeregten Zustand.

Bei allen Löschreaktionen unterscheidet man zwei grundlegende Arten von Löschmechanismen, da die Löschung sowohl inter- als auch intramolekular vonstatten gehen kann. Findet die Wechselwirkung des Löschmoleküls mit dem fluoreszierenden Molekül im angeregten Zustand statt, so spricht man von „dynamischer

Löschung“, im Gegensatz zur „statischen Löschung“, wenn die Wechselwirkung schon im Grundzustand erfolgt.

### 2.1.5 Statische und dynamische Fluoreszenzlöschung

Bei der statischen Löschung tritt die Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Löschmolekül bereits im Grundzustand auf, wodurch sich ein Grundzustandskomplex (FQ) ausbildet, welcher nicht oder nur sehr schwach fluoresziert. Aus der Komplexbildung resultiert eine herabgesetzte Konzentration des freien Farbstoffs und damit auch der Fluoreszenzintensität, wohingegen die Fluoreszenzlebensdauer der freien Farbstoffe unbeeinflusst bleibt (Abbildung 2-5). Daher stellt die Änderung der Fluoreszenzlebensdauer auch das geeignetste Kriterium zur Unterscheidung von statischen und dynamischen Löschprozessen dar.

Die statische Löschung lässt sich durch Gleichung 2.7 beschreiben.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S \cdot [Q] \quad \text{mit } K_S = \frac{[(FQ)]}{[F] \cdot [Q]} \quad (2.7)$$

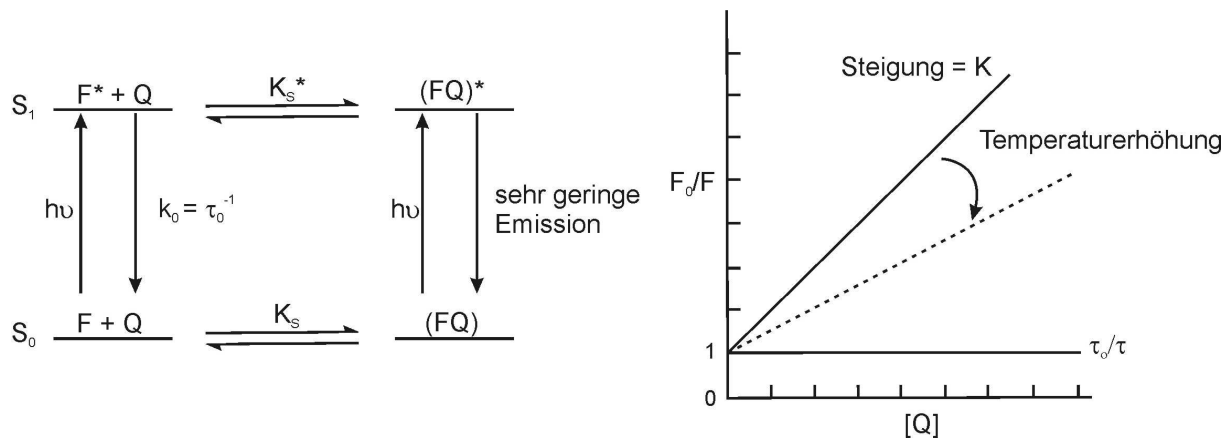
$I_0$  ( $I$ ): Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit (Abwesenheit) von Löschmolekülen

[Q]: Konzentration des Löschmoleküls

$K_S$ : Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung zwischen Fluorophor und Löschmolekül

Trägt man  $I_0/I$  gegen die Löschmolekülkonzentration [Q] auf, so erhält man eine Gerade mit Steigung  $K_S$ .





**Abbildung 2-5:links:** Schema der statischen Fluoreszenzlöschung mit zugehörigem *Stern-Volmer*-Plot (**rechts**).

Die dynamische Löschung setzt das Zusammentreffen und die Bildung eines Komplexes aus Fluorophor und Löschmolekül während der Existenz des angeregten Zustands des Fluorophors voraus. Dabei findet die Übertragung eines Teils der Anregungsenergie des Fluorophors auf das Löschmolekül mittels zuvor genannter Mechanismen (z.B. *Exciplex*-Bildung, Elektronen-Transfer) statt. Anschließend gehen sowohl der Fluorophor als auch das Löschmolekül oder ein Komplex aus beiden strahlungslos in den Grundzustand über (Abbildung 2-6) [Lakowicz 2006]. Dadurch wird sowohl die Fluoreszenzintensität als auch die Lebensdauer verringert.

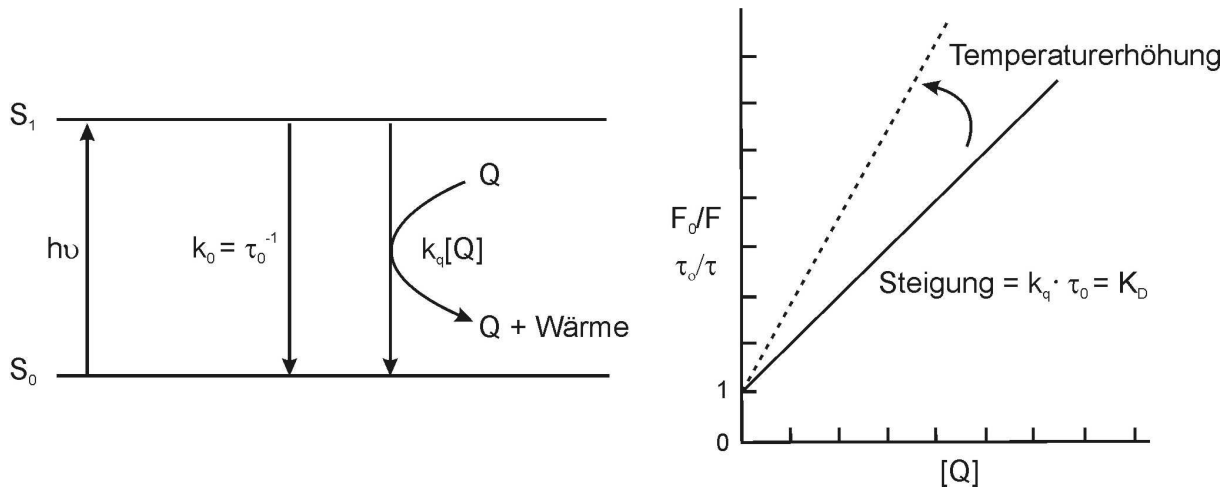
Die dynamische Löschung kann durch die *Stern-Volmer*-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (2.8)$$

$k_q$ : bimolekularer Geschwindigkeitskoeffizient der Löschung

$\tau_0$  ( $\tau$ ): Lebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit (Anwesenheit) von Löschmolekülen

Bei der Auftragung von  $\tau_0/\tau$  bzw.  $I_0/I$  gegen die Konzentration der Löschmoleküle  $[Q]$  erhält man eine Gerade, deren Steigung der *Stern-Volmer*-Konstanten  $K_D = k_q \cdot \tau_0$  entspricht:



**Abbildung 2-6:** links: Schema der dynamischen Löschung eines Fluorophors und **rechts** der entsprechende *Stern-Volmer*-Plot.

Da h\u00f6here Temperaturen zu gr\u00f6\u00dfere Diffusionskoeffizienten und damit zu h\u00f6heren bimolekularen Geschwindigkeitskonstanten der L\u00f6schung f\u00fchren und die dynamische L\u00f6schung auf Diffusion beruht, wird die L\u00f6scheffizienz (bei dynamischer L\u00f6schung) durch Temperaturerh\u00f6hung erh\u00f6ht. Im Gegensatz dazu wird bei statischer L\u00f6schung der Komplex bei Temperaturerh\u00f6hung destabilisiert. Dies f\u00fchrt zu einer verringerten L\u00f6scheffizienz und damit zu einer geringeren Steigung der Geraden im *Stern-Volmer*-Plot.

In vielen F\u00e4llen handelt es sich nicht um eine rein statische oder dynamische L\u00f6schung, sondern vielmehr um eine Mischung aus beiden. F\u00fcr diesen Fall gilt die modifizierte *Stern-Volmer*-Gleichung:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = \frac{\tau_0}{\tau} (1 + K_S \cdot [Q]) \quad (2.9)$$

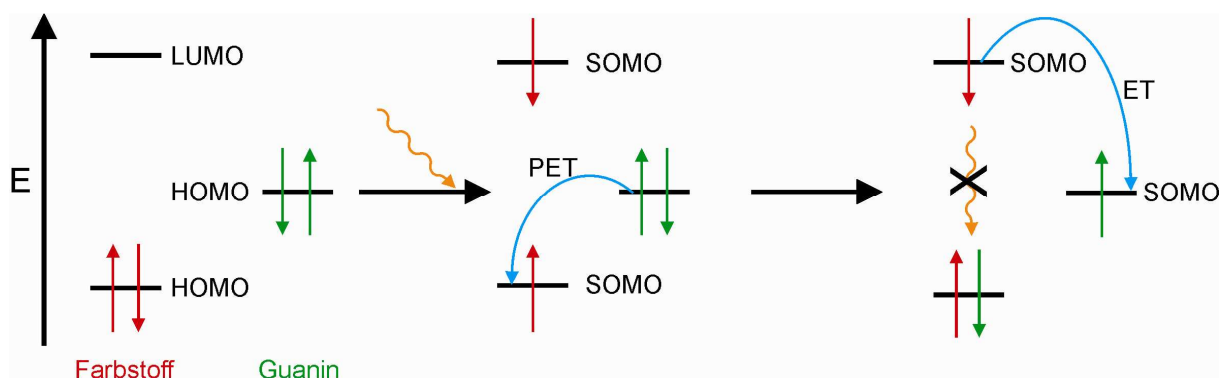
Diese Gleichung ist zweiter Ordnung bez\u00fcglich der L\u00f6schmolek\u00fclkonzentration  $[Q]$ , was im *Stern-Volmer*-Plot zu einer Abweichung von der Geraden f\u00fchrt.

### 2.1.6 Fluoreszenzlöschung durch Guanin

Die Löschung der Fluoreszenz von langwelligeren Oxazin- und Rhodaminfarbstoffen durch die Base Guanin, die Bestandteil der DNA ist, ist ein Spezialfall des photoinduzierten Elektronentransfers. Die anderen drei Basen Adenin, Cytosin und Thymin zeigen diesbezüglich keine Wirkung [Sauer 1995].

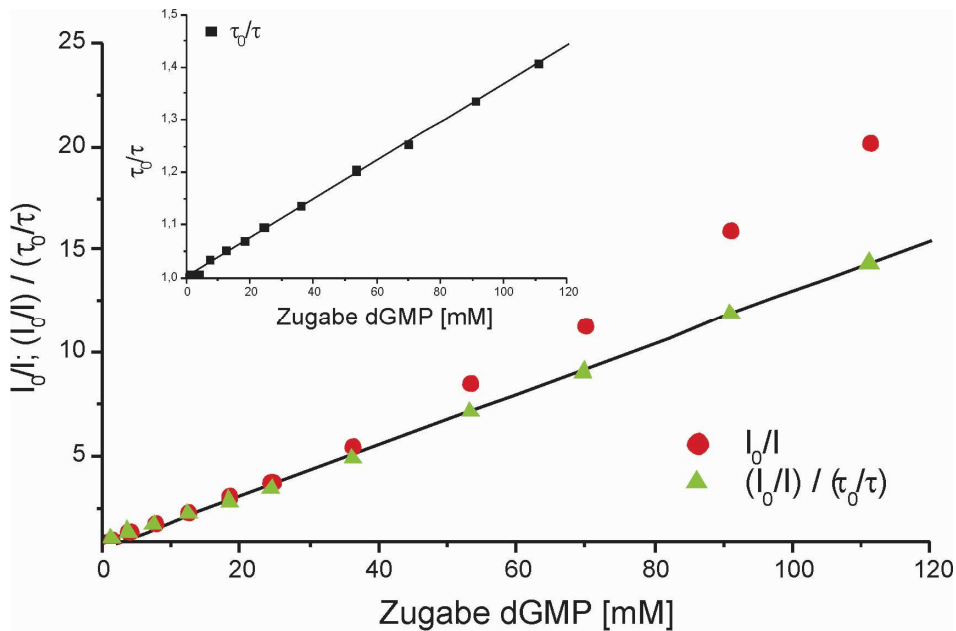
Die zugrundeliegenden inter- und intramolekularen Löschemechanismen wurden von *Sauer* [Sauer 1998], *Nord* [Nord 1998] und *Lieberwirth* [Lieberwirth 1998] genauer untersucht. *Nord* kommt in seiner Arbeit zu dem Schluss, dass die Fluorophore mit den Basen der Oligonukleotide intramolekulare Grundzustandskomplexe bilden, wobei nur die Komplexbildung mit Guanin eine starke Fluoreszenzlöschung verursacht.

Die Löschung ist noch ausgeprägter, wenn die Farbstoffe an guaninhaltige Oligonukleotide gekoppelt vorliegen, da die räumliche Nähe eine sehr hohe lokale Guaninkonzentration bewirkt. Mechanistisch wird dabei, wie in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt, nach Anregung des Farbstoffs durch ein Photon das aus dem HOMO entstandene SOMO (einfach besetztes Molekülorbital - *Single Occupied Molecular Orbital*) mit einem Elektron des räumlich nahe stehenden Guanins aufgefüllt. Die ansonsten ohne das Löschmolekül auftretende Fluoreszenz des Fluorophors kann in Folge dessen nicht mehr auftreten.



**Abbildung 2-7:** Grenzorbidialdiagramme und schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer von Guanin zum Farbstoff.

Die Fluoreszenzlöschung durch Guanin ist sowohl von dynamischer als auch von statischer Natur. Dies veranschaulicht der in Abbildung 2-8 dargestellte *Stern-Volmer*-Plot für den Oxazinfarbstoff Atto 655.



**Abbildung 2-8:** Statische und dynamische Fluoreszenzlöschung von Atto 655 durch dGMP. Links oben ist eine vergrößerte Darstellung der Auftragung von  $\tau_0/\tau$  gegen [dGMP] abgebildet, um den linearen Kurvenverlauf zu verdeutlichen.

Wird die Abnahme der Fluoreszenzintensität in der Form  $I_0/I$  gegen die steigende Konzentration von **Desoxyguanosinmonophosphat** (dGMP) aufgetragen, ergibt sich eine Kurve, in welche sowohl die statische als auch die dynamische Löschung einfließen. Dividiert man durch den dynamischen Anteil  $\tau_0/\tau$ , ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der statischen *Stern-Volmer*-Konstanten  $K_S$  entspricht.

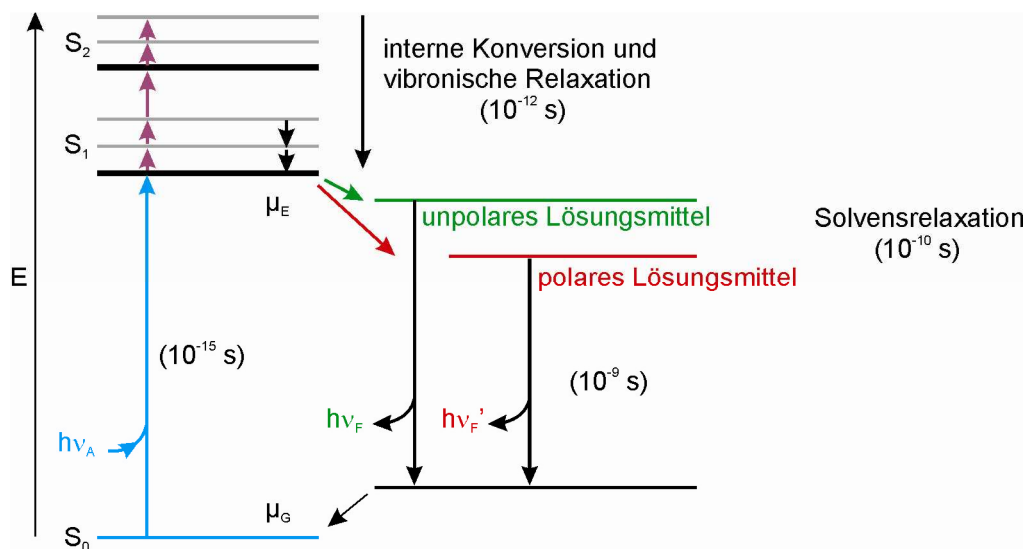
Die Auftragung des Quotienten  $\tau_0/\tau$  gegen die dGMP-Konzentration ergibt ebenfalls eine Gerade, deren Steigung die dynamische *Stern-Volmer*-Konstante  $K_D$  wiedergibt.

### 2.1.7 Lösungsmittel- und Umgebungseinflüsse auf die Fluoreszenz

Die Polarität des Lösungsmittels und die unmittelbare Umgebung haben weitreichende Auswirkungen auf die spektralen Emissionseigenschaften von Fluorophoren. Sie tragen beispielsweise zur *Stokes*-Verschiebung bei, eine der

ersten Beobachtungen im Bereich der Fluoreszenz. Die Gesamtheit der Auswirkungen von Solvens und Mikroumgebung auf die Emissionscharakteristiken von Farbstoffen sind komplex und von zusätzlichen Faktoren wie Lösungsmittelviskosität, *Charge-Transfer*-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen abhängig.

Die Tatsache, dass emittiertes Licht langwelliger als das zuvor absorbierte ist, beruht auf dynamischen Vorgängen, welche nach der Lichtabsorption ablaufen (Abbildung 2-9). Typischerweise erfolgt die Anregung des Fluorophors in den ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ), meist in ein angeregtes Schwingungsniveau innerhalb von  $S_1$ . Die überschüssige Schwingungsenergie wird jedoch rasch an die umgebenden Lösungsmittelmoleküle abgegeben. Erfolgt die Anregung in den zweiten Singulettzustand ( $S_2$ ), so vollzieht sich der Abfall in  $S_1$  über interne Konversion in  $10^{-12}$  s ebenfalls recht schnell. Durch auftretende **allgemeine Solvenseffekte** in polaren Lösungsmitteln kann sich die Emissionsbande zu noch längeren Wellenlängen (bathochrom) verschieben, da das Dipolmoment des angeregten Zustands ( $\mu_E$ ) meist größer ist als das des Grundzustands ( $\mu_G$ ). Nach eingetretener Anregung kann sich daher die Solvathülle entsprechend ihrer Dipole umorientieren (Lösungsmittelrelaxation), was zur Verringerung der Energie des angeregten Zustands  $S_1$  führt.



**Abbildung 2-9:** Jablonski-Diagramm der Fluoreszenz mit Lösungsmittelrelaxation nach [Lakowicz 2006].

Mit steigender Polarität des Lösungsmittels nimmt dieser Effekt zu und das Ausmaß der bathochromen Verschiebung der Emissionsbande steigt. Hierbei zeigen sich große Unterschiede zwischen den verschiedenen Klassen von Fluorophoren. Es erweisen sich nur diejenigen Chromophore gegenüber Solvenspolaritätsänderungen sensitiv, welche selbst ein bestimmtes Maß an Polarität aufweisen. Daher sind Resonanzfarbstoffe wie Rhodamin-, Oxazin- oder Fluoresceinderivate mit einem eher unpolaren angeregten Zustand gegenüber Lösungsmittelleffekten recht unempfindlich. Demgegenüber reagieren Vertreter der *Charge-Transfer*-Farbstoffe wie beispielsweise Coumarine, welche einen ausgeprägt polaren angeregten Zustand aufweisen, stark auf sich ändernde Solvensumgebungen.

Die Fluoreszenzlebensdauern sind mit  $10^{-9}$  bis  $10^{-8}$  s im Allgemeinen länger als die für die Lösungsmittelrelaxation benötigte Zeitspanne. Sie vollzieht sich für normalviskose Lösungen bei Raumtemperatur in  $10^{-11}$  bis  $10^{-10}$  s. Daher repräsentieren die Emissionsspektren von Fluorophoren das Ausmaß der Lösungsmittelrelaxation.

Die nach dem *Frank-Condon*-Prinzip erfolgende Photoabsorption verläuft in  $10^{-15}$  s sehr viel schneller als der Kern ( $10^{-10}$  s) oder die Lösungsmittelmoleküle reagieren können, womit die lokale Umgebung während des Absorptionsprozesses unverändert bleibt und die Absorptionsspektren so wesentlich weniger auf Solvenseffekte ansprechen.

Zur Beschreibung der Solvenseinflüsse eignet sich die **Lippert-Mataga-Gleichung** (2.10). Sie stellt eine Beziehung zwischen *Stokes*-Verschiebung  $\nu_A - \nu_E$  und dem Brechungsindex  $n$  sowie der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$  des Lösungsmittels her [Mataga 1956; Lippert 1957]:

$$\nu_A - \nu_E = \frac{2}{hc} \left( \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{konst} \quad (2.10)$$

Hierbei symbolisieren  $h$  die *Planck*-Konstante,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit und  $a$  den *Onsager*-Radius der Fluorophorkavität. Demnach haben  $n$  und  $\epsilon$  gegenläufige Auswirkungen auf die Energiedifferenz zwischen absorbiertem und emittiertem Licht.

Ein in diesem Zusammenhang oft verwendeter und aus Gleichung 2.10 abgeleiteter Wert ist die sogenannte **Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$** , welche sich nach

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2.11)$$

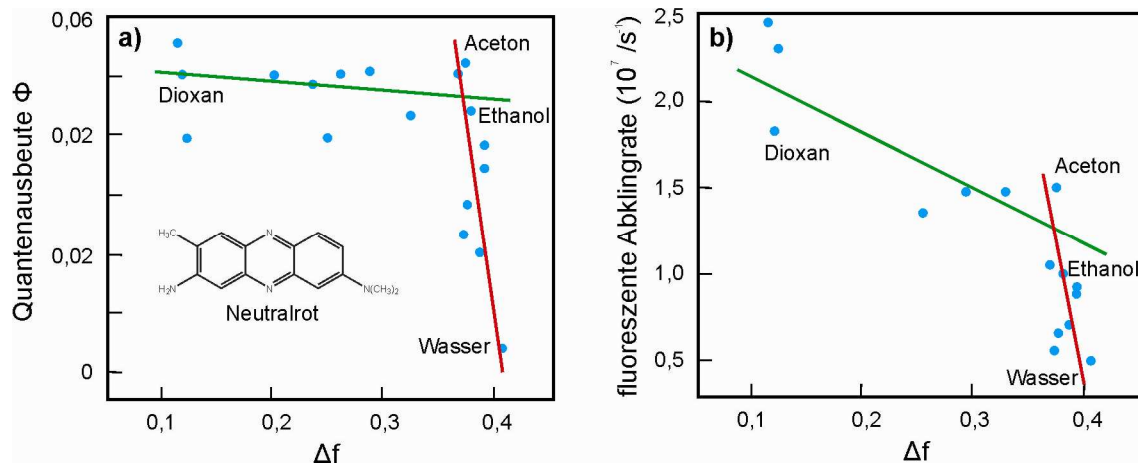
berechnet.  $\Delta f$  ist abhängig von der elektronischen Polarisierbarkeit (Hochfrequenzpolarisierbarkeit), die die Reorientierung der Solvenselektronen in Folge der Photoabsorption beschreibt, welche eine Funktion des Brechungsindex ist. Außerdem fließt in  $\Delta f$  die molekulare Polarisierbarkeit der Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle (Niederfrequenzpolarisierbarkeit) über deren Zusammenhang mit der Dielektrizitätskonstanten mit ein.

In der *Lippert-Mataga*-Gleichung werden zusätzliche Effekte und deren Auswirkungen auf den Energieunterschied, wie Wasserstoffbrückenbindungen oder interne Ladungstransfers, nicht berücksichtigt. Dass derartige Parameter durchaus großen Einfluss auf die Emissionseigenschaften haben können, zeigen die Auftragungen von Quantenausbeute bzw. strahlender Abklingrate gegen  $\Delta f$  für den Farbstoff Neutralrot (Abbildung 2-10) [Singh 1998]. Die fluoreszenten ( $k_{fl}$ ) und nicht fluoreszenten ( $k_{nfl}$ ) Abklingraten für den angeregten Farbstoff in den verschiedenen Lösungsmitteln werden nach Gleichung 2.12 und 2.13 aus den Werten von Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  und -quantenausbeute  $\Phi$  abgeschätzt [Lippert 1957; Satpati 2009].

$$k_{fl} = \frac{\Phi_{fl}}{\tau_{fl}} \quad (2.12)$$

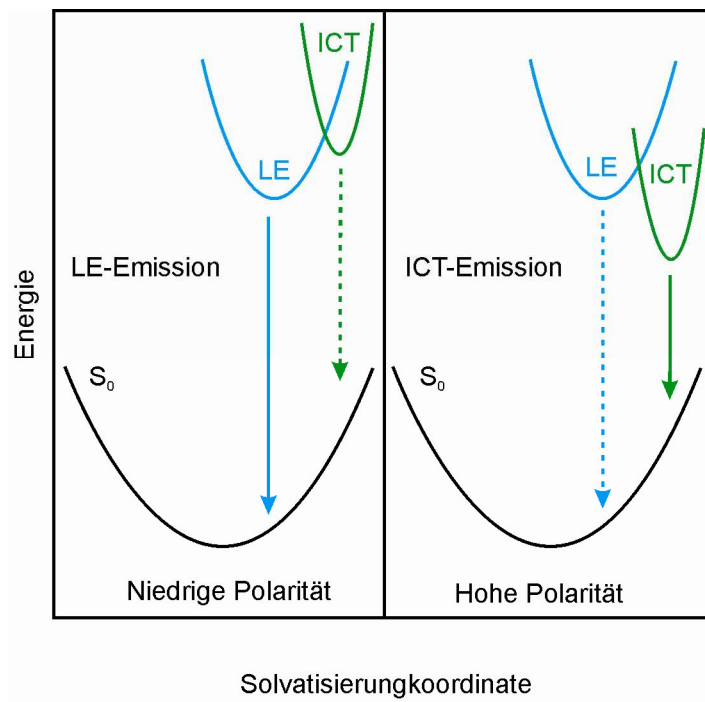
$$k_{nfl} = \frac{1}{\tau_{fl}} - \frac{\Phi_{fl}}{\tau_{fl}} \quad (2.13)$$

Für diesen Farbstoff ergibt sich eine Zunahme der Quantenausbeute  $\Phi$  bei wenig polaren Lösungsmitteln und ein starker Abfall für polare Solventien mit  $\Delta f > 0,35$ .



**Abbildung 2-10:** a) Quantenausbeuten und b) fluoreszente Abklingraten von Neutralrot in verschiedenen polaren Lösungsmitteln [Singh 1998].

Dieses Verhalten wird durch die Bildung eines **intramolekularen Ladungstransferzustands** (*Intramolecular Charge Transfer* – ICT) in stark polaren Lösungen erklärt, wohingegen in unpolaren Solventien die Emission aus einem **lokal angeregten Zustand** (*Locally Excited* – LE) von Statten geht.



**Abbildung 2-11:** Auswirkung der Solvenspolarität auf die Energien von LE- und ICT-Zustand nach Singh [Singh 1998].



Dem entspricht die Abnahme der fluoreszenten Abklingrate mit steigendem  $\Delta f$ , da die Emission des ICT-Zustands aus einer anderen elektronischen Situation als bei lokal angeregtem Zustand erfolgt (Abbildung 2-11).

Neben einem ICT-Zustand können manche Fluorophore auch einen sogenannten **verdrehten intramolekularen Ladungstransferzustand** (*Twisted Intramolecular Charge Transfer* – TICT) einnehmen. Dies ist häufig bei Farbstoffen zu beobachten, welche sowohl über eine elektronenabgebende als auch eine elektronenziehende funktionelle Gruppe verfügen. Nach der Photoabsorption erfolgt in polaren Lösungsmitteln eine Rotation der funktionellen Gruppen, womit eine vollständige Ladungsseparierung zu einer besseren Stabilisierung und demzufolge zu einer weiteren Energieverringerng des angeregten Zustands in Relation zum ICT- oder LE-Zustand führt.

Typisch für solche Farbstoffe ist zudem der starke Einfluss der **Viskosität** des Lösungsmittels auf das Emissionsverhalten. Durch erhöhte Solvensviskosität können Drehungen von Molekülteilen eingeschränkt oder verhindert werden. Haben diese Auswirkungen auf die Emissionseigenschaften, wie es beispielsweise bei Coumarinen oder *trans*-Stilben der Fall ist, sind sie davon direkt betroffen.

Ebenfalls können **spezifische Lösungsmittelleffekte** große Auswirkungen auf das Fluoreszenzverhalten von Fluorophoren ausüben. Da speziell die Mikroumgebung stark auf den Farbstoff und sein Verhalten einwirkt, genügt oft die Zugabe kleiner Stoffmengen um die Fluoreszenz in der Größenordnung von allgemeinen Lösungsmittelleffekten zu ändern, obwohl die Konzentration des zugesetzten Stoffes viel zu niedrig ist, um die makroskopischen Lösungseigenschaften wie die Solvenspolarität zu beeinflussen. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Säure-Base-Chemie oder CT-Wechselwirkungen reichen einige Moleküle in der direkten Farbstoffumgebung aus, um bei entsprechenden chemischen Eigenschaften von Molekül und Fluorophor dessen spektrale Merkmale zu prägen.

Wegen all dieser unterschiedlichen und teilweise gegenläufigen Wechselwirkungen zwischen Fluorophor und Lösung ist das Farbstoffverhalten nicht mit einer durchgängigen Theorie erklärbar. Aufgrund der Strukturvielfalt unter den heute zur Verfügung stehenden Fluoreszenzfarbstoffen und den möglichen großen Effekten bereits kleiner Modifikationen sind die Interaktionen für jeden Farbstoff individuell zu bestimmen.

## 2.2 Nukleinsäuren

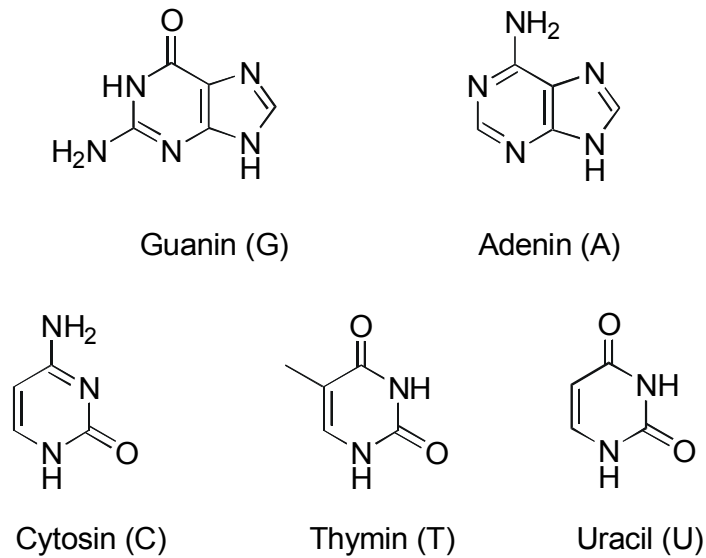
Nukleinsäuren sind die Träger der genetischen Information und essentiell an der Expression dieser beteiligt. Es werden zwei Klassen von Nukleinsäuren unterschieden, die Desoxyribonukleinsäure (*Desoxyribonucleic Acid* - DNA) und die Ribonukleinsäure (*Ribonucleic Acid* - RNA).

Die DNA wird für die Speicherung von genetischen Informationen verwendet und findet sich im Zellkern als Hauptbestandteil der Gene und Chromosomen. Die RNA ist dagegen überwiegend im Zellplasma lokalisiert. Sie übernimmt verschiedene Funktionen, ist aber hauptsächlich für die Übersetzung der in der DNA gespeicherten Information in Proteinsequenzen und die Regelung der Genexpression zuständig. Sie kann aber auch, wie zum Beispiel in einigen Viren, als Träger der Erbinformation fungieren.

### 2.2.1 Aufbau und Struktur der Nukleinsäuren

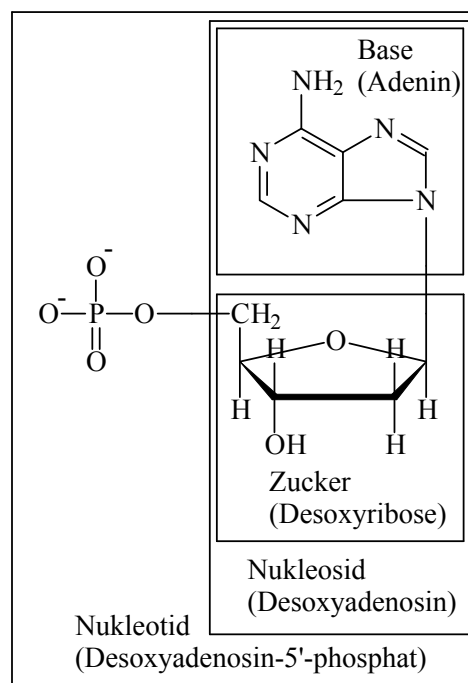
Nukleinsäuren sind langkettige, unverzweigte Polymere, die aus vier gleichartigen Monomeren aufgebaut werden. Ein Monomer, das Nukleotid, besteht aus drei Teilen: einer Nukleobase, einem Zucker und einer Phosphatgruppe.

In der DNA werden als Nukleobasen die Purine Adenin (A) und Guanin (G) und die Pyrimidine Cytosin (C) und Thymin (T) verwendet, im Falle der RNA ist das Thymin durch Uracil (U) ersetzt (Abbildung 2-12).



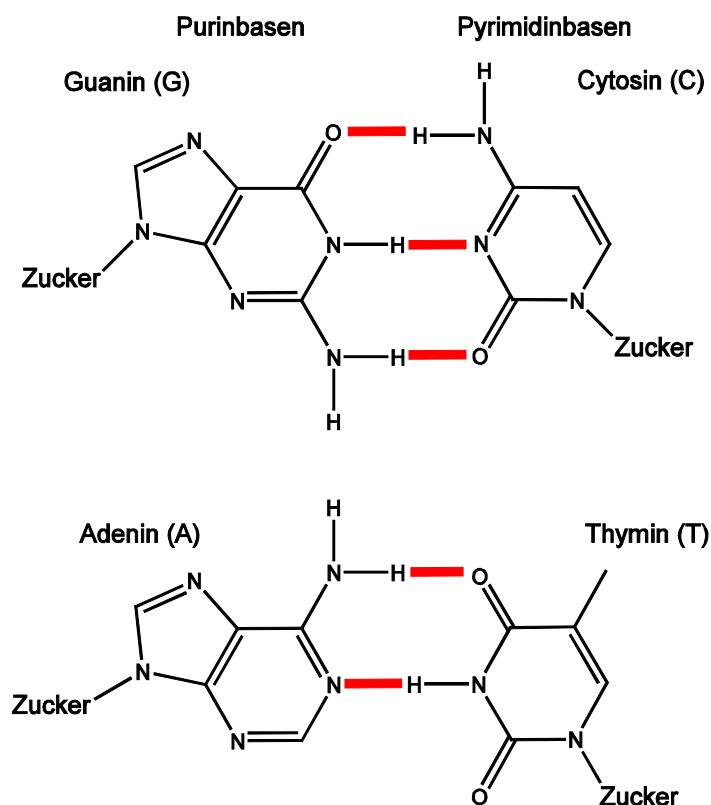
**Abbildung 2-12:** Struktur der Nucleobasen.

Die Nucleobasen werden über das C-1-Kohlenstoffatom an Ribose bzw. Desoxyribose gebunden. Diese Moleküle, bestehend aus dem Zucker und der Base, werden Nucleosid genannt. Ist an den Zucker am 5'-C eine Phosphatgruppe gebunden, spricht man von Nucleotid (Abbildung 2-13).



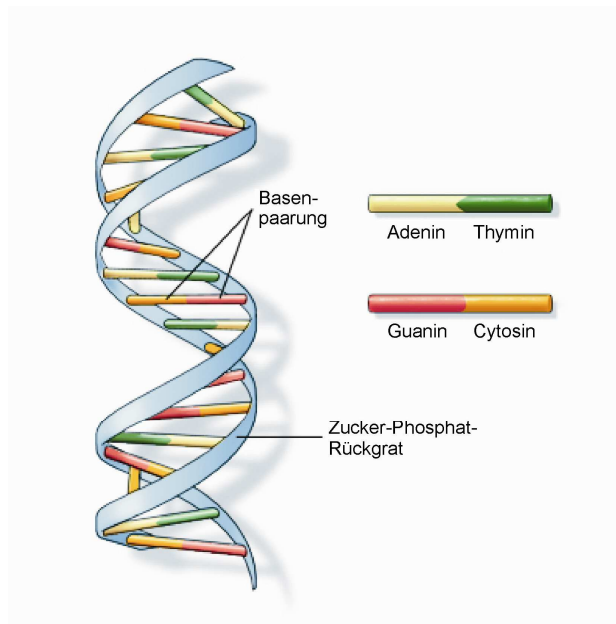
**Abbildung 2-13:** Aufbau eines Monomers der Nucleinsäure.

Die Monomere bauen die Polymerketten auf, indem die Phosphatgruppen mit den OH-Gruppen am 3'-C-Atom des Zuckers unter Wasserabspaltung einen Phosphorsäureester bilden. Die so entstehende Kette ist ein Polyanion und weist in zweierlei Hinsicht eine Polarität auf. Einerseits besitzt das 5'-Ende der Kette eine Phosphatgruppe und das 3'-Ende eine OH-Gruppe. Andererseits ist das Zucker-Phosphat-Rückgrat des DNA-Stranges mit seinen negativ geladenen Phosphatgruppen viel polarer als die Basen. Diese Tatsache fördert die Zusammenlagerung komplementärer DNA-Einzelstränge zu einer gegenläufigen Doppelhelix, in welcher in wässriger Umgebung die hydrophoben Basen innen und die hydrophilen Zucker-Phosphat-Ketten außen liegen. Die Stränge werden über Wasserstoffbrücken zusammengehalten, welche sich zwischen den einander zugewandten Basen ausbilden (Abbildung 2-14).



**Abbildung 2-14:** Darstellung der *Watson-Crick*-Basenpaarung in doppelsträngiger DNA.

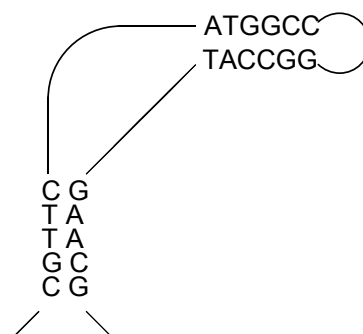
Dieses Modell wurde 1953 von *Watson* und *Crick* vorgeschlagen, wofür sie 1962 zusammen mit *Wilkins* den Nobelpreis für Medizin erhielten [Watson 1953] (Abbildung 2-15).



**Abbildung 2-15:** Aufbau des DNA-Doppelstranges (nach [www2]).

Die Stabilität dieser Doppelstränge basiert auf den unterschiedlich starken Wasserstoffbrückenbindungen. Im Basenpaar Adenin-Thymin bilden sich zwei H-Brücken aus, zwischen Guanin und Cytosin drei. Daher sind in jeder doppelsträngigen DNA stets gleich viele A und T, sowie G und C vorhanden (*Chargaff-Regel*) [Chargaff 1951; 1979].

Auch bei einzelsträngiger DNA oder RNA, welche immer als Einzelstrang vorliegt, treten derartige Hybridisierungen auf. Im Gegensatz zu den intermolekularen Basenpaarungen im DNA-Doppelstrang handelt es sich dabei um intramolekulare Wechselwirkungen. Diese erzeugen Haarnadelschleifen in unterschiedlichen Größen sowohl in Bezug auf die Länge der hybridisierten Teile als auch auf die Größe der gebildeten Schleife [Saenger 1983] (Abbildung 2-16).

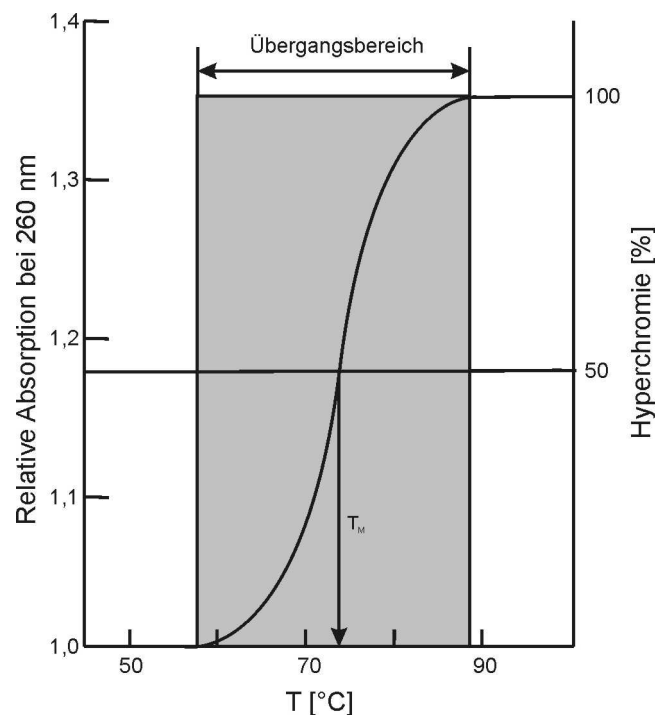


**Abbildung 2-16:** Schematische Darstellung einer Haarnadelstruktur eines DNA-/RNA-Strangs.

### 2.2.2 Denaturierung, Renaturierung, Hybridisierung

Die Wechselwirkung zwischen den komplementären Basen, welche die Doppelhelix oder die Sekundärstruktur der DNA bzw. RNA erzeugt, wird bei Temperaturerhöhung geschwächt. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur löst sich schließlich die Struktur auf, was als Denaturierung bezeichnet wird. Diese Strukturänderung findet in einem engen Temperaturfenster von einigen Grad Celsius statt (Abbildung 2-17). Unter Renaturierung versteht man den Prozess der Wiederausbildung von Sekundärstrukturen durch langsames Abkühlen. Wird eine Sekundärstruktur zwischen verschiedenen Einzelsträngen gebildet, spricht man von Hybridisierung.

Mit der Auflösung der Sekundärstruktur gehen Veränderungen der physikalischen Eigenschaften einher, wie z.B. die Zunahme von Viskosität und UV-Absorption (Hyperchromie) (Abbildung 2-17). Die Denaturierung unterliegt einem kooperativen Effekt. Das heißt, dass die noch erhaltene Struktur durch bereits geschwächte oder aufgelöste Strukturbereiche stark destabilisiert wird.



**Abbildung 2-17:** Beispiel einer DNA-Schmelzkurve.

Der Anteil an doppelsträngiger DNA wird über die UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Temperatur, bei der die Hälfte der Nukleinsäuren denaturiert ist, wird

Schmelztemperatur genannt (Wendepunkt der Schmelzkurve). Sie hängt nicht nur von der Sequenz ab, sondern wird von vielen Faktoren wie der Art und Konzentration anwesender Salze, des Lösungsmittels und der Nukleinsäurekonzentration selbst beeinflusst. Einen destabilisierenden Einfluss haben unter anderem organische Lösungsmittel wie Formamid oder Acetonitril, welche die Wechselwirkungen der Nukleobasen untereinander verringern und damit die Schmelztemperatur herabsetzen. Stabilisierend wirken sich hingegen Kationen wie  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  auf das nach außen gewandte Zucker-Phosphat-Rückgrat des Nukleinsäure-Polyanions aus und erhöhen damit die Schmelztemperatur des Hybrids. Diese Effekte sind konzentrationsabhängig und erzielen eine maximale Stabilisierung ab einer Konzentration von 50 mM  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  und 15 mM  $\text{Mg}^{2+}$  [Knemeyer 2000].

Verschiedene empirische Formeln ermöglichen eine Berechnung des Schmelzpunktes in Abhängigkeit verschiedener Faktoren [Breslauer 1986; Baldino 1989]. Für die Denaturierung langer DNA- oder RNA- Fragmente gilt für einen großen Konzentrationsbereich ein- und zweiwertiger Kationen Gleichung 2.14:

$$t_s = 81,5 + 16,6 \cdot \log_{10} \left[ \frac{[\text{Salz}]}{1.0 + 0.7 \cdot [\text{Salz}]} \right] + 0.41 \cdot (\%GC) - \frac{500}{L} \quad (2.14)$$

mit:

$t_s$  = Schmelztemperatur in °C

$[\text{Salz}] = [\text{K}^+] + [\text{Mg}^{2+}]^{0,5}$

(%GC) = Prozentualer Anteil der Guanin-Cytosin Basenpaare

L = Länge der Nukleinsäure

Um dagegen den Schmelzpunkt eines kurzen Oligonukleotids zu berechnen, wird eine Formel verwendet, welche die thermodynamischen Daten des Oligonukleotids und seiner Nachbarn sowie die Abhängigkeit der Schmelztemperatur von der Nukleotidkonzentration berücksichtigt [Breslauer 1986; 1989] (Gleichung 2.15):

$$t_s = \frac{T^\circ \Delta H^\circ}{\Delta H^\circ - \Delta G^\circ + RT \ln(C)} + 16.6 \cdot \log_{10} \left[ \frac{[\text{Salz}]}{1.0 + 0.7 \cdot [\text{Salz}]} \right] - 269.3 \quad (2.15)$$

mit:

$$\Delta H^\circ = \sum_{nm} (N_{nm} \cdot \Delta H_{nm}) + \Delta H_e^\circ$$

$$\Delta G^\circ = \sum_{nm} (N_{nm} \cdot \Delta G_{nm}) + \Delta G_e^\circ + \Delta G_i^\circ$$

$$T^\circ = 298,2 \text{ K}$$

$$R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$$

Die Indizes i und e beziehen sich auf die Beiträge, die durch die nichtbindenden Enden hervorgerufen werden. Es handelt sich um Durchschnittswerte ( $\Delta G^\circ = +2 \text{ kcal/mol}$ ;  $\Delta H_e = -5 \text{ kcal/mol}$ ;  $\Delta G_e = -1 \text{ kcal/mol}$ ). Der Index nm bezieht sich auf zwei benachbarte Basen, deren thermodynamische Daten der Tabelle 2-2 entnommen werden können [Quartin 1989]:

**Tabelle 2-2:** Thermodynamische Daten der Wechselwirkung benachbarter Basen.

Benachbarte Basen	AA	AT	TA	CA	GT	CT	GA	CG	GC	GG
	TT			TG	AC	AG	TC			CC
$-\Delta H_{nm}^\circ$ (kcal/mol)	9,1	8,6	6,0	5,8	6,5	7,8	5,6	11,9	11,1	11,0
$-\Delta G_{nm}^\circ$ (kcal/mol)	1,55	1,25	0,85	1,15	1,40	1,45	1,15	3,05	2,70	2,30

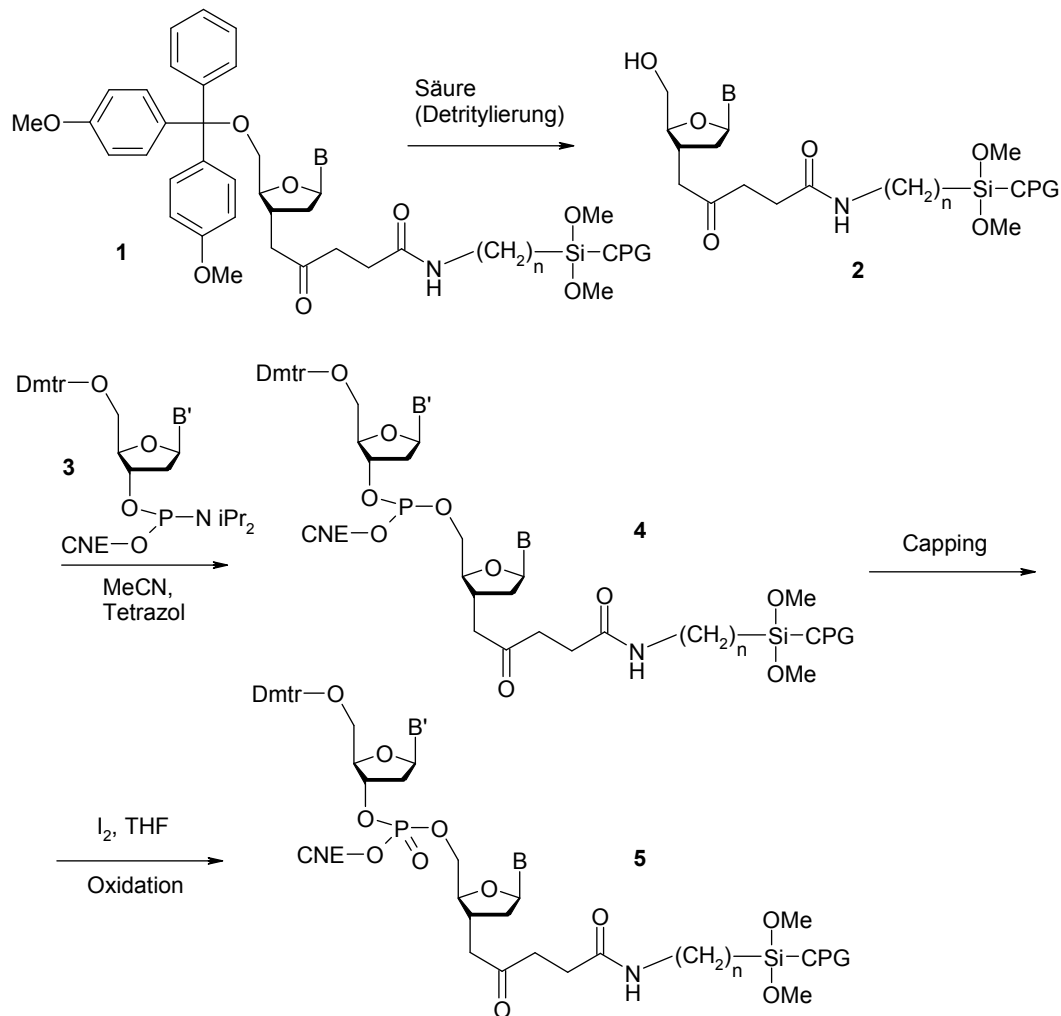


### 2.2.3 Synthese von Oligonukleotiden

Seit der Aufklärung der DNA-Struktur und der damit verbundenen rasanten Entwicklung auf diesem Forschungsgebiet wächst der Bedarf an synthetisch hergestellten Oligonukleotiden mit definierter Basenabfolge. Es ist zwar möglich mittels klassischer organischer Chemie derartige Oligonukleotide herzustellen, jedoch sind diese Synthesemethoden zeitaufwändig, teuer und bedürfen einer ausgefeilten Schutzgruppentechnik. Zudem ist es in Lösung nicht möglich, längere und reine Sequenzen in guten Ausbeuten zu erhalten. Deshalb war an Synthesen von längeren Oligonukleotiden in größerem Maßstab oder gar an eine Automatisierung nicht zu denken. Dies änderte sich erst in den 80er Jahren grundlegend mit der Einführung der Festphasenmethode durch *Miyoshi* [Miyoshi 1980]. In Anlehnung an die *Merryfield*-Festphasensynthese der Peptidchemie gelang ihm die Herstellung definierter, reiner Oligonukleotide, indem er Kügelchen aus Chlormethylpolystyrol verwendete, auf denen er ein Nukleotid fixierte und in einzelnen Reaktionszyklen weitere Nukleotide ankoppelte.

Heutzutage werden Oligonukleotide fast ausschließlich automatisiert am *Synthesizer* hergestellt, wobei das Oligonukleotid im Gegensatz zur Biosynthese vom 3'- zum 5'-Ende hin aufgebaut wird. Bei der dabei verwendeten Festphasensynthese wird das erste Monomer am 3'-Ende auf einem festen Träger immobilisiert. Ein häufig verwendetes Trägermaterial ist CPG (**C**ontrolled **P**ore **G**lass), ein nicht quellbares, chemisch inertes Silikat, das zur Anbindung des Monomers mit Aminogruppen funktionalisiert ist. Ein Succinyl-Linker, der zwischen dem Glasträger und dem Nucleosid am 3'-Ende eingebaut wird, erlaubt die Ablösung des Oligonukleotids am Ende der Synthese.

Die Synthese beginnt mit der hydrolytischen Abspaltung der 5'-Hydroxyl-Schutzgruppe (Trityl-Schutzgruppe) vom trägergebundenen Nucleosid **1** (Abbildung 2-18).



**Abbildung 2-18:** Prinzipielle Schritte bei der Oligonukleotidsynthese am DNA-Synthesizer.

Danach wird ein an der 5'-OH-Gruppe und an den Nucleobasen geschützter Baustein **3** gekoppelt, welcher an seiner 3'-Hydroxylgruppe ein Phosphorylierungs-Synthion trägt. In fast allen Syntheseautomaten wird die Phosphoramiditmethode nach *Caruthers* angewendet [Caruthers 1983]. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Stabilität der Phosphitamide gegen Hydrolyse und Oxidation, der guten Chromatographierbarkeit an Kieselgel, sowie der relativ guten Lagerfähigkeit.

Die Alkoxygruppe des Phosphitamids **3** dient gleichzeitig als Schutzgruppe. Eine schwache Säure, wie z.B. Tetrazol, aktiviert die Nucleosid-3'-phosphitamide, wodurch die Dialkylaminogruppe durch ein 5'-OH-Nucleosid (z.B. **2**) substituiert werden kann. Nicht umgesetzte Hydroxylgruppen werden anschließend durch Acetylierung blockiert. Als Reste der Alkylaminoabgangsgruppe haben sich

Diisopropylreste bewährt. Der Phosphitriester **4** wird durch Oxidation mit wässriger Iodlösung in den Phosphatriester **5** umgewandelt. Die gesamte Reaktionsfolge kann bei Raumtemperatur durchgeführt werden, wobei die Kondensationszeiten an fester Phase durch die Anwendung hoher Überschüsse dennoch nur wenige Minuten betragen.

Die Durchführung dieses Reaktionszyklus verlängert die trägergebundene Oligonukleotidkette um jeweils ein Nukleotid in 5'-Richtung. Ein derartiger Zyklus besteht aus folgenden vier Reaktionsschritten:

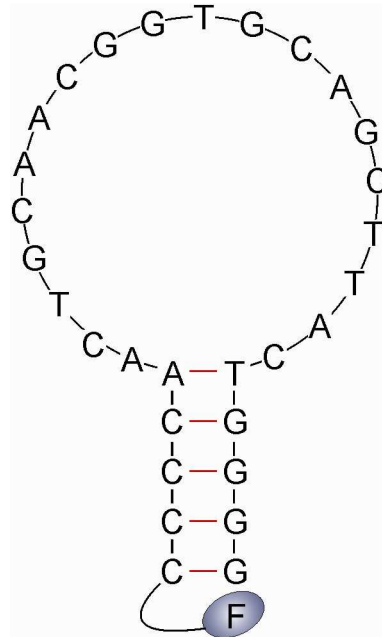
- Abspaltung (Detritylierung) der 5'-OH-Schutzgruppe,
- Aktivierung des Phosphoamidits durch Mischen mit Tetrazol und Zugabe zum trägergebundenen Oligonukleotid,
- Capping,
- Oxidation des Phosphitriesters zum Phosphatriester durch I<sub>2</sub>-Zugabe.

Ist das gewünschte Oligonukleotid synthetisiert, muss es in einem letzten Schritt von der Festphase abgespalten und von den Schutzgruppen befreit werden. Dazu wird die 5'-Dmtr-Gruppe acidolytisch abgespalten. Im Anschluss entfernt man mit wässriger Ammoniaklösung sowohl die Cyanoethylgruppe, als auch die Acylschutzgruppen der Nucleobasen, wobei auch die Succinat-Verankerung gelöst wird. Als abschließende Reinigung wird eine Ausschlusschromatographie durchgeführt, wobei die niedermolekularen Verunreinigungen, wie die Abspaltprodukte der Schutzgruppen, vom Oligonukleotid abgetrennt werden.

#### **2.2.4 Smart Probes**

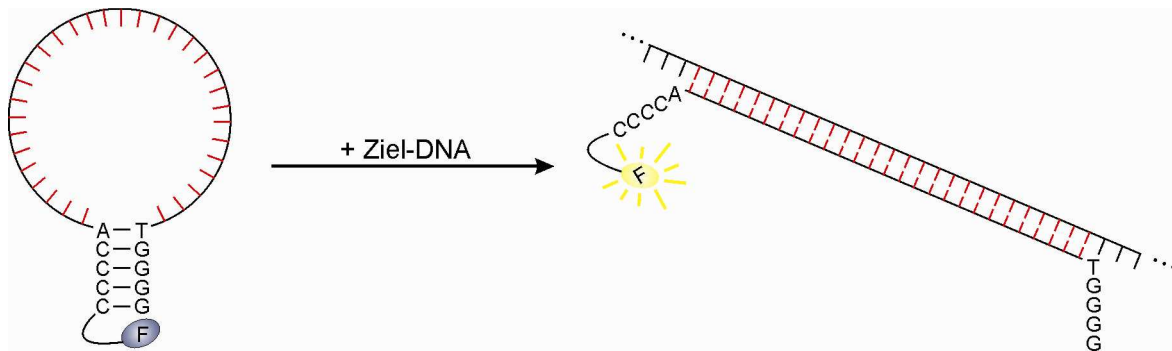
*Smart Probes* (intelligente Sonden) sind molekulare Detektoren, mit denen man hochempfindlich und spezifisch DNA-Sequenzen nachweisen kann. Eine *Smart Probe* besteht aus einem DNA-Oligonukleotid und einem Fluoreszenzfarbstoff F, der durch Desoxyguanosin gelöscht wird (Abbildung 2-19). Die Sequenz des Oligonukleotids wird so gewählt, dass es eine Stamm-Schleifen-Struktur ausbildet. In dieser sogenannten *Hairpin*-Struktur formen vier bis sieben Basenpaare den Stamm und eine variable Zahl von Basen (5-30) die Schleife. Der Fluoreszenzfarbstoff ist am 5'-Ende über einen C<sub>6</sub>-Amino-Linker an das Poly-Cytosin-Ende des Oligonukleotids gekoppelt. Durch die Basenpaarung im Stamm resultiert eine große räumliche Nähe

zum 3'-Poly-Guanosin-Ende des Oligonukleotids, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs gelöscht wird. Um eine effiziente Löschung zu erreichen, sollte der Stamm des *Hairpins* mindestens drei bis vier Guanosine enthalten. Um die Löschung noch zu verstärken, kann das 3'-Ende zusätzlich mit einem Tripel-G- oder Tripel-T-Überhang versehen werden [Heinlein 2003].



**Abbildung 2-19:** Typischer Aufbau einer *Smart Probe*.

Trifft eine *Smart Probe* auf eine DNA-Sequenz, die zu der Sequenz der Schleife des *Hairpins* komplementär ist, kommt es zur Hybridisierung dieser Bereiche und damit zu einer Öffnung der Haarnadelstruktur. Durch den so entstandenen Doppelstrang wird der Fluoreszenzfarbstoff vom löschtenden Poly-G-Ende des Oligonukleotids getrennt, woraus ein drastischer Fluoreszenzanstieg resultiert. Das zugrunde liegende Prinzip der *Smart Probe* ist in der folgenden Abbildung 2-20 schematisch dargestellt:



**Abbildung 2-20:** Schematische Darstellung einer *Smart Probe* vor und nach der Hybridisierung an die Ziel-DNA.

Durch Anpassung der *Smart Probes* an speziesspezifische DNA-Sequenzen können Nachweisverfahren entwickelt werden, welche eine gegenüber den Standardverfahren erheblich gesteigerte Empfindlichkeit besitzen und eine eindeutige Diskriminierung zwischen korrekter und leicht veränderter Zielsequenz erlauben. Schon der Austausch eines einzigen Nukleotids (SNP) in der Zielsequenz führt bei sorgfältiger Wahl der *Smart Probe* zu einem Ausbleiben des Fluoreszenzanstiegs bei Anwesenheit dieser DNA [Dubertret 2001].

## 2.3 Proteine, Enzyme und Proteasen

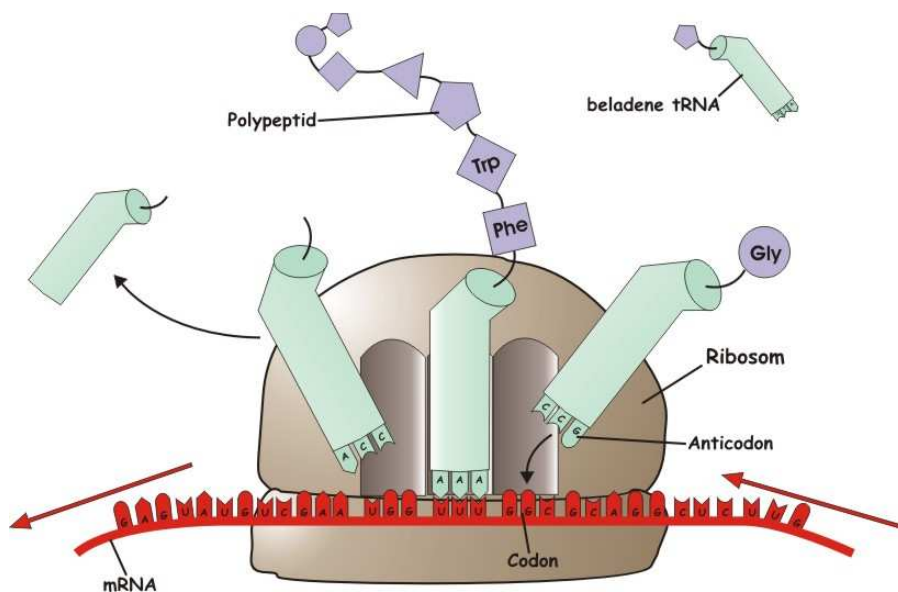
### 2.3.1 Transkription und Translation

Als Transkription bezeichnet man in der Genetik den Synthesevorgang von RNA-Sequenzen anhand eines DNA-Strangs als Vorlage. Über enzymatische Katalyse der RNA-Polymeraseeinheit wird ein Gen abgelesen und der RNA-Strang entsprechend der Basensequenz aufgebaut. Dabei wird in der RNA die Nukleobase Thymin durch Uracil ersetzt. Während der Translation entstehen durch mehrere hintereinandergeschalteter RNA-Polymeraseeinheiten gleich mehrere RNA-Sequenzen.

Nach beendeter Translation, welche sich im Zellkern abspielt, erfolgt die Prozessierung. In diesem Vorgang wird die bisherige prä-mRNA (*messenger RNA*) modifiziert, indem beispielsweise nicht kodierende Zwischensequenzen (Introns) aus der eigentlichen kodierenden Sequenz (Exons) entfernt werden (Splicing). Durch alternatives Splicing, d.h. Variierung der Art und Weise, welche Exons beibehalten

werden, kann eine Gensequenz Grundlage für die Bildung mehrere verschiedener Proteine sein. Die nun reife mRNA wird aus dem Zellkern ausgeschleust.

Im Cytoplasma dient sie in den Ribosomen im Transkriptionsprozess als Informationsträger zur Proteinsynthese (Abbildung 2-21). Da jeweils drei Nukleobasen eine Aminosäure kodieren (Codon) und demnach  $4^3 = 64$  mögliche Codons existieren, die Proteine jedoch aus lediglich 20 verschiedenen Aminosäuren bestehen, kodieren in einigen Fällen mehrere Codons die gleiche Aminosäure.



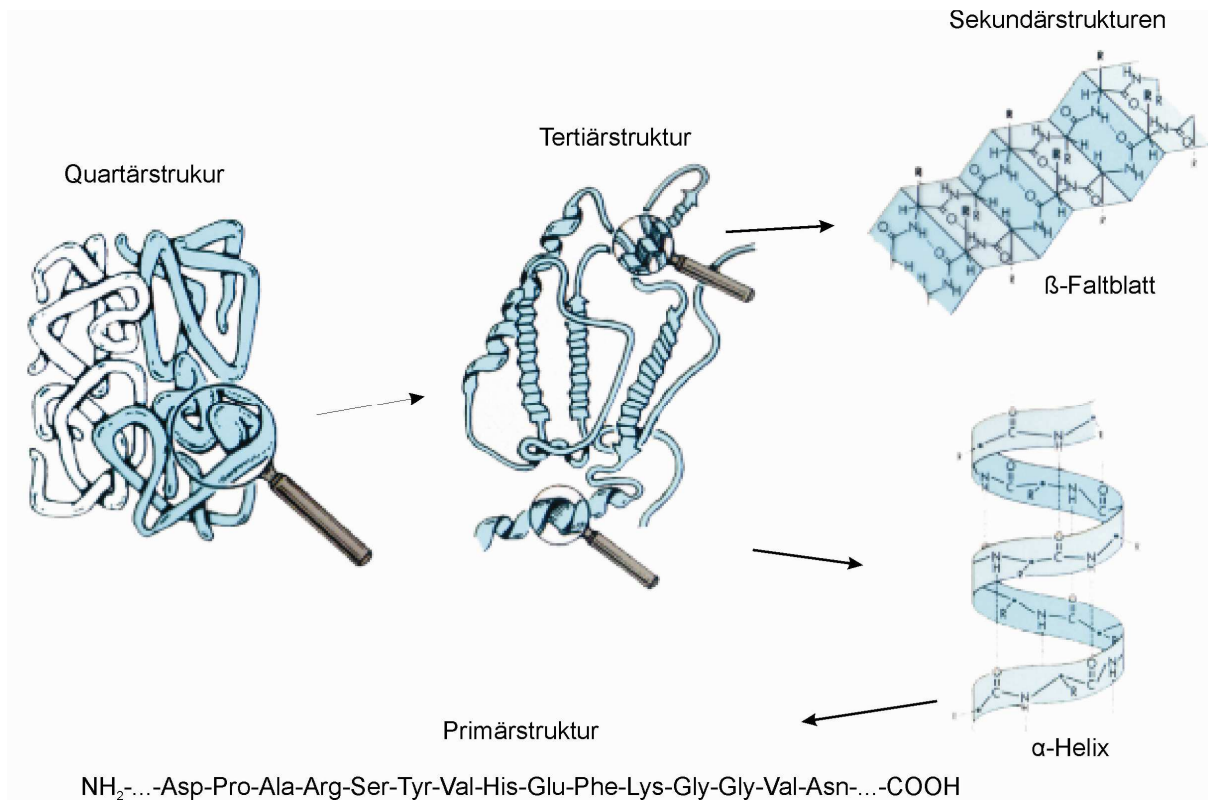
**Abbildung 2-21:** Vereinfachter schematischer Ablauf der Translation am Ribosomen [www3].

Im Ribosom binden nun tRNAs (*transfer-RNA*), welche auf der einen Seite über ein aus drei Nukleotiden bestehendes Anticodon verfügen, an die Codons der mRNA. Gleichzeitig sind die tRNAs mit den entsprechenden Aminosäuren beladen, die nun katalytisch entsprechend der Codonabfolge der mRNA zu einer Peptidkette zusammengefügt werden. Auch hier dient die mRNA durch mehrere simultan angebundene und arbeitende Ribosomen als Matrize zur Herstellung mehrerer Proteine.

### 2.3.2 Proteine und Enzyme

Proteine gehören zu den komplexesten und funktionell am exaktesten regulierten Molekülen. Sie bestehen aus einer Peptidkette aus bis zu 20 verschiedenen, kovalent miteinander verknüpften Aminosäuren, welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Seitenketten jeweils spezifische chemische Eigenschaften besitzen. Weist die Peptidkette eine Länge von zwei bis 20 Aminosäuren auf, spricht man von einem Oligopeptid, wohingegen längere Abfolgen als Polypeptide bezeichnet werden. Ab einer Länge von 100 Aminosäuren liegt ein Protein vor.

Unter der **Primärstruktur** eines Proteins wird die Aminosäuresequenz verstanden, aus der es sich aufbaut. In der Nomenklatur wird die Sequenz beginnend am N-terminalen Ende (freie Aminogruppe) bis zum C-terminalen Ende (freie Carboxygruppe) angegeben. Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäureseitenketten wechselwirken diese miteinander, was zur Ausbildung der **Sekundärstruktur** des Proteins führt. Unter ihr fasst man die räumliche Anordnung von Aminosäuren der Polypeptidkette zusammen, welche in der Sequenz nahe beieinanderliegen. Aus Wasserstoffbrücken und anderen Wechselwirkungen bauen sich aus diesen sogenannte  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter auf. Als **Tertiärstruktur** eines Proteins wird die dreidimensionale Konformation aufbauend auf Primär- und Sekundärstrukturen verstanden. Erst aufgrund der Tertiärstruktur erhält das Protein seine biologische Funktionalität und charakteristischen Eigenschaften. Im Allgemeinen etabliert sich die Tertiärstruktur aufgrund von *Van-der-Waals*-Wechselwirkungen hydrophober Aminosäuren, welche sich im Inneren des Proteins zusammenfinden, wohingegen die hydrophilen Seitenketten auf der Proteinoberfläche und damit dem polaren wässrigen Cytosol zugewandt sind. Oftmals lagern sich mehrere derartiger Proteine zu Komplexen zusammen, in deren Zusammenhang dann von der **Quartärstruktur** gesprochen wird. Abbildung 2-22 fasst die verschiedenen Strukturmerkmale zusammen.



**Abbildung 2-22:** Schematische Darstellung der vier Ebenen der Proteinstruktur [www4].

Daneben können in die Proteinstruktur zusätzlich niedermolekulare Elemente eingelagert werden, welche entweder aus organischen Molekülen (Coenzyme) oder Metallionen bestehen. Speziell wenn Proteine in biochemische Umsetzungen katalytisch eingreifen – man bezeichnet sie in diesem Fall als Enzyme – ermöglichen oftmals erst derartige Komponenten die katalytische Aktivität.

Da Enzyme an allen Stoffwechselprozessen teilnehmen, sind sie und ihre Regulation in vielen Fällen das Ziel für Medikamente. Aufgrund der unterschiedlichen Reaktionen, welche von ihnen katalysiert werden, können sie in sechs verschiedene Klassen eingeteilt werden:

- Oxidoreduktasen
- Transferasen
- Hydrolasen
- Lyasen
- Isomerasen
- Ligasen



Hierbei ist eine weitergehende Aufgliederung möglich. So sind beispielsweise die Hydrolasen, welche hydrolytische Spaltungen katalysieren, in Abhängigkeit des gespaltenen Substrats in Esterasen, Lipasen, Phosphatasen und Peptidasen bzw. Proteasen unterteilt.

### 2.3.3 Proteasen

Proteasen erfüllen in vielen biologischen Prozessen fundamentale Aufgaben und sind mit einer großen Bandbreite pathologischer Zustände, inklusive Krebs, verknüpft [López-Otín 2002]. Die wichtige Funktion von Proteasen in vielen Krankheiten unterstreicht die Tatsache, dass sie aktuell etwa zehn Prozent aller Wirkstoffziele ausmachen [Fingleton 2003]. Nachdem erkannt wurde, dass Proteasen neben ihren unspezifischen Funktionen zum Proteinabbau weitere Aufgaben übernehmen, indem sie hochselektiv spezifische Substrate prozessieren, das Zellverhalten sowie die Apoptose beeinflussen, hat sich unser Bild der Familie der Proteasen gewandelt [Turk 2006]. Innerhalb der Proteasen unterscheidet man zwischen Exo- und Endopeptidasen, je nachdem ob die hydrolysierte Peptidbindung endständig (Amino- oder Carboxypeptidase) oder innerhalb der Peptidkette lokalisiert ist. Eine weitere Gliederung ermöglicht die Art der funktionellen Gruppe im aktiven Zentrum des Enzyms, wonach sich fünf Proteaseklassen ergeben: Serin-, Cystein-, Metallo-, Threonin- und Aspartylproteasen. Das humane Degradom, d.h. die Gesamtheit von humanen Zellen produzierten Proteasen, besteht mindestens aus 569 Enzymen, die sich in 194 Metallo-, 176 Serin-, 150 Cystein-, 28 Threonin- und 21 Aspartylproteasen aufgliedern [López-Otín 2007].

Für eine weitergehende Unterteilung bietet sich die MEROPS-Klassifikation an [Rawlings 2010]. Sie basiert auf einer hierarchischen strukturbasierten Klassifizierung der Proteasen. Demnach wird jede Peptidase aufgrund statistisch signifikanter Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen einer Familie zugeschlagen. Mehrere Familien, welche homologe Proteasen enthalten, sind in Clans zusammengefasst. Die Proteaseklassifikation besteht aus einem Term der Form X12.345, wobei der Buchstabe (S, C, T, A, G, M oder U) die Art des aktiven Zentrums kodiert und die Zahlen die Clan- bzw. Familiennummer bezeichnen. So trägt beispielsweise die Cysteinprotease Caspase-8 die Bezeichnung C14.009 und Kallikrein 3, auch bekannt unter dem Namen PSA (Biomarker für Prostatakrebs -

*Prostate Specific Antigen*) als Serinprotease die Bezeichnung S01.162. In manchen Fällen ist noch eine feinere Einteilung in Subclans oder Subfamilien vorgenommen.

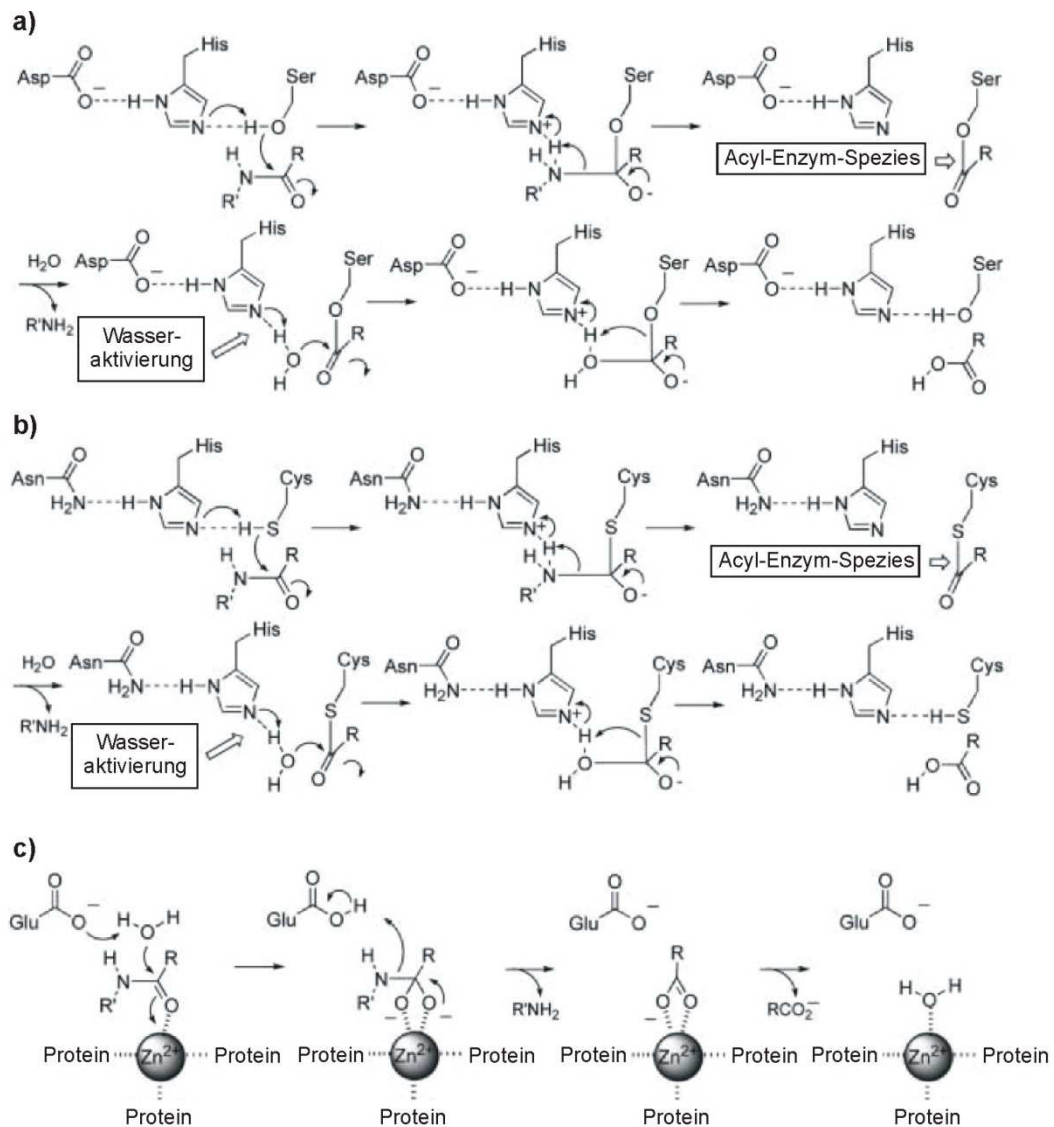
Erstmals wurden Peptidasen 1946 mit Krebs in Verbindung gebracht, als *Fischer* die Tumorinvasivität und den ECM-Abbau auf die tumorassoziierte proteolytische Aktivität zurückführte [Fischer 1946]. Das Konzept konzentrierte sich auf die extrazelluläre und perizelluläre Proteolyse, die ECM-Degradation sowie die Unterstützung von Tumorinvasivität und -metastasierung. Einzelne Proteasen wurden ab Anfang der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts identifiziert, wobei vor allem prometastatische Eigenschaften verschiedener Vertreter sekretierter Serin-, Cystein- und Metalloproteasen Beachtung geschenkt wurde. Aufgrund dessen beschäftigte sich die Forschung in den darauffolgenden zwei Dekaden hauptsächlich mit tumorfördernden Proteasen und konnte ihnen zahlreiche Beteiligungen am Invasionsprozess nachweisen. Heutzutage hat sich jedoch herausgestellt, dass Proteasen neben den späten Tumorstadien an allen Phasen der Krebsentwicklung beteiligt sind [Borgoño 2004; Mohamed 2006]. Die drei hauptsächlich involvierten Klassen der Serin-, Cystein- und Metalloproteasen hydrolysieren ihre Substrate nach unterschiedlichen Mechanismen, die Abbildung 2-23 zusammenfasst.

Serinproteasen durchlaufen einen zweistufigen Hydrolyseprozess (a), in welchem zuerst drei katalytisch aktive Aminosäureseitenketten (Asp-His-Ser) die Acylierung des Serinrestes durch das Substrat ermöglichen. Dies setzt einen Teil des Substrats als Produkt frei. Im zweiten enzymatischen Schritt wird ein Wassermolekül aktiviert, welches den Carbonylester nukleophil angreift, damit das zweite Hydrolyseprodukt freisetzt und die Protease regeneriert.

Cysteinproteasen arbeiten nach einem ähnlichen Mechanismus (b), mit dem Unterschied, dass die drei an der Katalyse beteiligten Aminosäuren aus Asn-His-Cys bestehen und die Acylierung an der Cysteinseitenkette erfolgt. Davon abgesehen zeigen Cystein- und Serinproteasen in Faltung und Ursprung deutliche Unterschiede, und sind somit nicht durch Ersatz von Cystein durch Serin oder umgekehrt auseinander hervorgegangen [Lee 2004].

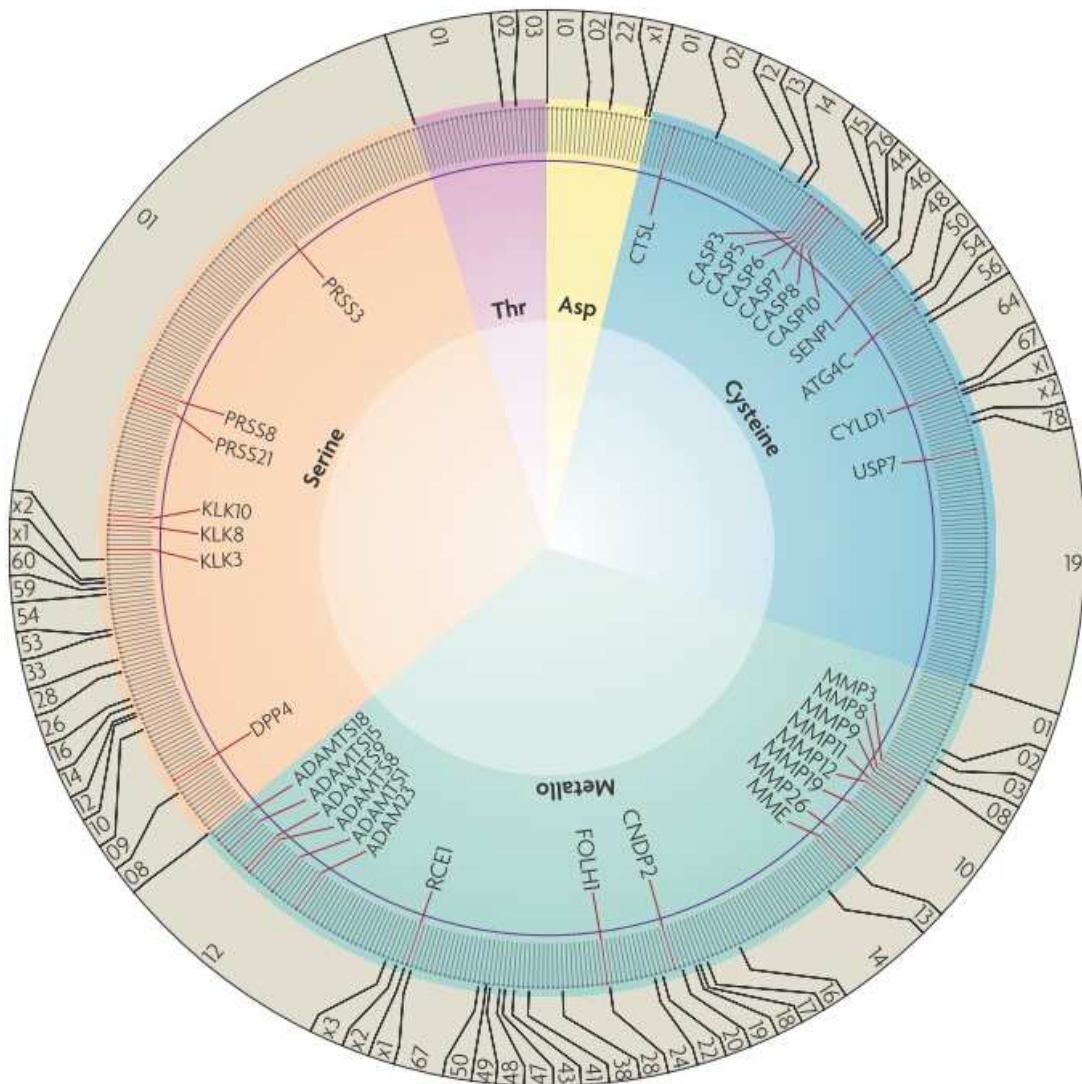
Metalloproteasen besitzen in ihrem katalytisch aktiven Zentrum ein Zinkion, das maßgeblich für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist. Der exakte Mechanismus ist zurzeit Gegenstand widersprüchlicher Meinungen. Zum einen besteht die Ansicht, dass, wie in Abbildungsteil c) gezeigt, die tetraedrische

Konformation von  $\text{Zn}^{2+}$  durch Angriff eines Wassermoleküls auf die zu hydrolysierende Amidbindung des Substrats stabilisiert wird. Eine andere Theorie besagt, dass eine Glutamatgruppe des aktiven Zentrums die Carbonylgruppe angreift um als gemischtes Anhydrid in einem zweiten Schritt zu hydrolysieren. Des Weiteren wird debattiert, ob der erste Mechanismus bei Amiden in Proteinsubstraten und der letztere bei Estersubstraten zur Geltung kommt.



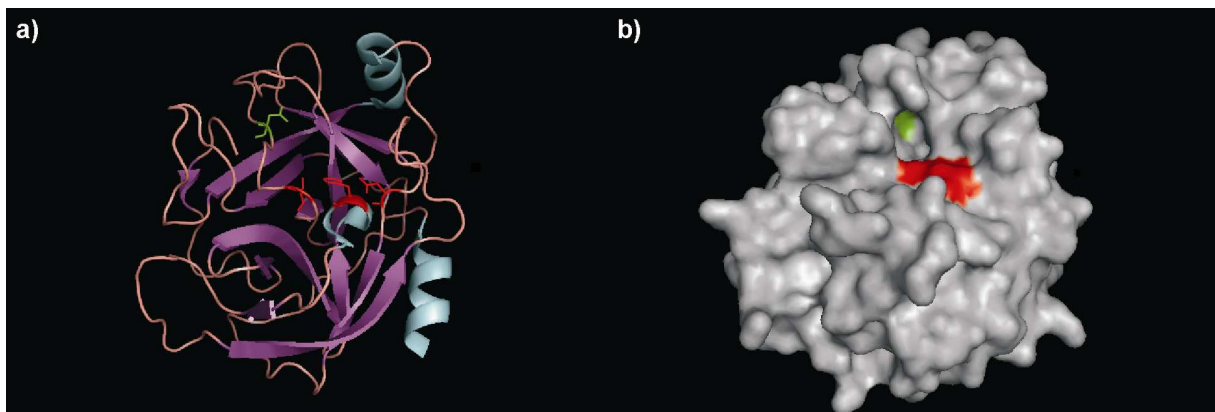
**Abbildung 2-23:** Postulierte Mechanismen für die hydrolytische Aktivität von **a)** Serin-, **b)** Cystein- und **c)** Metalloproteasen [Lee 2004].

Diese Unklarheiten und die verschiedenen Katalysemechanismen der jeweiligen Enzymklassen unterstreichen die bestehenden Schwierigkeiten bei der Inhibitorfindung zur Verhinderung von Metastasen. Ferner scheint es nicht sinnvoll, ganze Klassen von Enzymen zu hemmen, da in letzter Zeit sowohl manch intrazellulären als auch extrazellulären Proteasen tumorhemmende Eigenschaften zugeschrieben werden [Takayama 2001] (Abbildung 2-24 oder Einleitung).



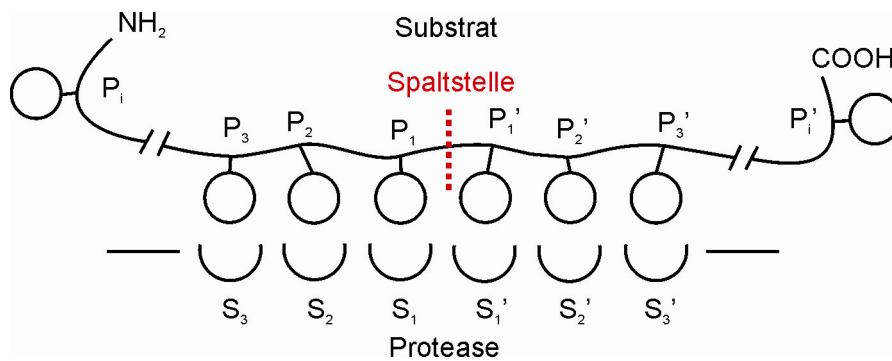
**Abbildung 2-24:** Verteilung tumorhemmender Proteasen im humanen Degradom [López-Otín 2007]. Jede graue Linie symbolisiert hierbei eine Peptidase, diejenigen mit tumorhemmenden Eigenschaften sind in rot dargestellt. Die Nummern am Rand bezeichnen die verschiedenen Proteasefamilien jeder Klasse nach der MEROPS-Systematik.

Die Serinproteasefamilie der **Kallikreine** wird im Vergleich zu Metalloproteasen erst seit kurzem mit Krebs in Verbindung gebracht. Sie besteht aus 15 hochkonservierten Peptidasen, die auf Chromosom 19q13.4 durch den längsten ununterbrochenen Cluster von Proteasegenen im menschlichen Genom kodiert werden. Kallikreine stimmen in 30 – 50 % ihrer Aminosäuresequenz überein [Yousef 2001], wobei die klassischen Kallikreine 1-3 sogar 61 – 77 % Sequenzübereinstimmung aufweisen [Clements 2004]. Zusätzlich zu der konservierten katalytischen Triade aller Serinproteasen aus His57, Asp102 und Ser195 verfügen alle KLK-Proteasen über zehn bis zwölf konservierte Cysteine, welche fünf (KLK1-3, KLK13) bzw. sechs (KLK4-12, KLK15) Disulfidbrücken ausbilden. KLKs besitzen die für chymotrypsinähnliche Serinproteasen typische Tertiärstruktur, bestehend aus zwei nebeneinanderstehenden  $\beta$ -Faltblättern und zwei  $\alpha$ -Helices, wobei die katalytische Triade die Faltblattstrukturen überbrückt [Katz 1998; Bernett 2002; Gomis-Rüth 2002]:



**Abbildung 2-25:** a) Struktur und b) Oberfläche von KLK6 (pdb-Nr. 1LO6). Hervorgehoben ist die katalytische Triade (rot), sowie die für die Substratspezifität maßgebliche Aminosäure Asp189 (grün).

Die Bezeichnung der Aminosäurereste des Substrates erfolgt wie üblich nach *Schechter* und *Berger* [Schechter 1967]. Danach befindet sich die Aminosäure, deren Aminogruppe an der zu hydrolysierenden Peptidbindung beteiligt ist, in  $P_1'$ -Position. Die Aminosäure, die die Carbonylgruppe dieser Bindung stellt, befindet sich in  $P_1$ -Position. In N-terminaler Richtung wird die Nummerierung mit  $P_2, P_3 \dots P_n$  und in Richtung des C-Terminus mit  $P_2', P_3' \dots P_n'$  fortgesetzt. Die zugehörigen Bindungsstellen im Enzym werden entsprechend mit  $S_n$  bezeichnet (Abbildung 2-26).



**Abbildung 2-26:** Schematische Darstellung der Substratbindungsstellen  $S_3 - S_3'$  der Protease und der daran bindenden Aminosäurereste  $P_3 - P_3'$  des Proteinsubstrats nach *Schechter* und *Berger*. Die Substratspaltung erfolgt zwischen  $P_1$  und  $P_1'$ .

Die Substratspezifität der chymotrypsinähnlichen Serinproteasen und damit auch der Kallikreine wird üblicherweise über die  $P_1 - S_1$ -Interaktion bestimmt [Borgoño 2004]. Für die KLKs ist zudem die Aminosäure 189 wichtig, welche sich sechs Aminosäuren N-terminal des katalytischen Ser195 befindet. Zwölf KLKs verfügen über trypsinartige Spezifität aufgrund der Anwesenheit der Aminosäuren Asp189 (KLK1, 2, 4, 5, 6, 8, 10-14) bzw. Glu189 (KLK15), welche helfen, Arginin oder Lysin an die  $P_1$ -Position zu dirigieren. Demgegenüber binden KLK3, 7, 9 mit Ser189, Asn189 und Gly189 großvolumige, unpolare Aminosäuren wie Tyrosin oder Phenylalanin an der  $P_1$ -Position, und weisen demzufolge chymotrypsinartige Spezifität auf. Sekundärwechselwirkungen außerhalb der  $P_1$ -Position aufgrund von sechs variablen Oberflächenschlaufen rund um das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade bedingen die unterschiedliche Substratspezifität innerhalb der Kallikreinfamilie [Brillard-Bourdette 1995; Oka 2002].

In der normalen Physiologie werden die Kallikreine oftmals in Haut, Brust, Prostata, Pankreas und Gehirn von sekretorischen Epithelzellen koexprimiert, welche sie in Körperflüssigkeiten wie Schweiß, Milch, Speichel, Samenplasma oder Rückenmarksflüssigkeit abgeben. Als solches sind sie an vielen normalen und pathologischen Prozessen beteiligt, wo sie unabhängig und/oder als Teil einer oder mehrerer proteolytischer Signalkaskaden agieren. Jedoch sind die physiologischen Aufgaben und *in vivo*-Substrate vieler Mitglieder der KLK-Familie mit Ausnahme von KLK1 und 3 lediglich definiert. In neuester Zeit wurden mithilfe peptidbasierter kombinatorischer Verfahren wie *Phage Display* [Deperthes 2002] oder fluoreszenzmarkierter

Peptidbibliotheken [Harris 2000] die Substratspezifität und Bindungssequenz von KLK2, 3 und 14 bestimmt [Coombs 1998; Cloutier 2002].

Viele Vertreter der Familie sind als potentielle Biomarker im Gespräch, wobei der wohl bekannteste Vertreter dieser Klasse Kallikrein 3 (KLK3) ist, auch unter dem Namen PSA als Prostatatumormarker bekannt. Neuere Daten belegen jedoch auch die Beteiligung von Kallikreinen in diversen anderen Tumorarten wie Magen-Darm-, Lungen- oder Hautkrebs [Klucky 2007; Emami 2008]. Zusätzlich zu ihrer Rolle als Biomarker zeigen sich immer mehr bedeutende Funktionen der KLKs in der Krebsentstehung, wodurch sie als Ziele für neue Antitumormedikamente zunehmend interessant werden.

## 2.4 Proteinmarkierung für einzelmolekülspektroskopische

### Anwendungen

Einzelmolekülspektroskopische Methoden haben sich als leistungsstarkes Instrument zur Untersuchung biologischer Prozesse bewährt. Im Folgenden soll deshalb ein Überblick über die zurzeit verfügbaren Methoden zur Markierung von Proteinen im Hinblick auf einzelmolekülspektroskopische Einsatzgebiete gegeben werden.

Eines der Hauptprobleme, welches sich derzeit bezüglich der Fluoreszenzmarkierungen stellt, stellen die begrenzten Möglichkeiten dar, Modifikationen ohne Störung der Proteinstruktur anzubringen [Dillingham 2008].

Eine etablierte Technik zur *in vitro*-Modifikation stellt die Reaktion an Cysteinseitenketten dar, also die **direkte chemische Modifikation**. Aufgrund der limitierten Anzahl an Cysteinen in vielen Proteinen ergibt sich die Möglichkeit, spezifische oder gar stöchiometrische Markierungen zu erzielen. Die robuste Reaktion von Thiolen mit maleimidmodifizierten Fluorophoren verläuft selektiv und unter physiologischen Bedingungen. Enthält das Protein hingegen mehrere zugängliche Cysteine resultiert die Modifikation in einem nicht homogenen Markierungsgemisch. Zudem sind Cysteine über Disulfidbrücken häufig von zentraler Bedeutung zur Erhaltung der Tertiärstruktur, weshalb sich ihre Modifikation in reduzierter oder verllorener biologischer Aktivität äußert [Hermanson 2008]. Neben

Cysteinen bieten sich die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinseitenketten für eine kovalente chemische Reaktion mit Succinimidestern an. Auch diese Reaktion läuft selektiv unter physiologischen Bedingungen ab. Aufgrund der hohen Lysinpräsenz auf der Proteinoberfläche ergeben sich jedoch meist mehrfach markierte Produkte. Eine wichtige Einschränkung dieser Methoden stellt jedoch die Tatsache dar, dass sie nicht spezifisch in Bezug auf andere anwesende Proteine und somit nur für isolierte Eiweiße und nicht *in vivo* anwendbar ist.

Um diese Einschränkungen zu umgehen, hat die Gruppe um *Schultz* als erste über cotranslationale Proteinmodifikation nicht natürliche Aminosäuren in Proteine eingeführt [Wang 2006]. Dabei benutzen sie modifizierte tRNA-Synthetasen, welche mit unnatürlichen Aminosäuren beladene tRNA-Moleküle generieren. Diese besitzen Anticodons für andere als die von den natürlichen tRNAs gebundenen Codons, wie beispielsweise Quadruplets. Damit stehen über 30 neue Aminosäuren zur Anbindung zur Verfügung, welche teils bioorthogonale Reaktivitäten wie Keto-, Azid- oder Thioestergruppen aufweisen. Diese Methoden wurden auch für *in vivo*-Markierungen verwendet [Olejnik 2005]. Ein bedeutender Nachteil dieser Vorgehensweise besteht jedoch darin, dass sie ausschließlich auf speziell exprimierte Proteine mit bekannten Gensequenzen anwendbar ist und eine posttranslationale Markierung von aus Gewebe oder Zellen isolierter Moleküle nicht erlaubt.

Rekombinante DNA-Technologien erlauben des Weiteren die Verschmelzung des zu markierenden Proteins am C- oder N-Terminus mit intrinsisch fluoreszenten Proteinen zu **Fusionsproteinen**. Der erste und bekannteste Vertreter dieser Moleküle stellt das aus Quallen isolierte GFP (**grünfluoreszierendes Protein**) dar, welches erstmals 1994 erfolgreich als Fluoreszenzmarker eingesetzt wurde [Chalfie 1994]. Mittlerweile ist eine Vielzahl weiterer GFP-Analoga verfügbar, die einen großen Teil des sichtbaren Spektralbereichs abdecken [Shaner 2005]. Der Hauptvorteil dieser Methode ist die problemlose *in vivo*-Markierung der Zielproteine. Nachteilig wirkt sich allerdings die bedeutende Größe dieser fluoreszenten Proteine aus, die üblicherweise im Bereich von 25 – 35 kDa liegt und damit die Struktur und Funktionalität der modifizierten Proteine beeinträchtigen kann [Dillingham 2008]. Außerdem weisen sie oftmals Tendenzen zur Oligomerisierung und Degradation auf und sind in punkto Photostabilität, schmalen Absorptions- und Emissionsbanden sowie Helligkeit mit organischen Chromophoren nicht vergleichbar.



Eine weitere Möglichkeit bietet die Markierung über **Peptid- oder Proteintags**, welche mit dem Zielprotein coexprimiert und im Anschluss enzymatisch modifiziert werden. Diese kleineren, um 10 kDa schweren Domänen, erlauben beispielsweise die Markierung mit Phosphopantethienylkonjugaten durch das Enzym Sfp-phosphopantethienyltransferase. Als weitere Alternative stellt hier die Anbindung von sogenannten Q-Tags durch Transglutaminase an die entsprechende Enzymbindedomäne dar. Das Enzym katalysiert hierbei die Ausbildung einer Amidbindung zwischen Glutamin und Lysinresten. Da die Spezifität der enzymatischen Umsetzung nicht sehr deutlich ausgeprägt ist, eignen sich diese Verfahren nur bedingt zur Anwendung in Proteinmischungen.

Weitere, mit den obigen Verfahren verwandte Methoden bedienen sich ebenfalls natürlicher enzymatischer Funktionen zur kovalenten **Automodifikation von Fusionsproteinen**. Beispielsweise kann sich das coexprimierte DNA-Reparaturenzym O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (hAGT) selbst mit einer Alkylgruppe seines natürlichen Substrats O<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA modifizieren, toleriert dabei anstelle dessen auch O<sup>6</sup>-Benzylguanine und verschiedene Fluoreszenzderivate [Keppler 2004]. Dieses Verfahren, erhältlich unter dem Namen *SnapTag* von *Covalys*, hat jedoch ebenfalls mit nicht spezifischem Markieren endogenen AGTs Probleme. Ein anderes, von *Promega* als *HaloTag* vertriebenes System bedient sich der Automarkierung einer mutanten Halogen-Dehalogenase mit Chloralkanderivaten als Substrate. Aufgrund der Abwesenheit des Enzyms in *E.coli* oder Säugerzellen verläuft die Reaktion sehr spezifisch. Beide Verfahren bieten die Möglichkeit einer *in vivo*-Fluoreszenzmarkierung mit zellpermeablen Substraten, leiden jedoch wie die traditionellen GFP-analogen Fusionsproteine unter ihrer beträchtlichen Größe von über 20 kDa und den damit verbundenen negativen Auswirkungen auf das Zielprotein [Dillingham 2008].

Unter Ausnutzung der **natürlichen chemischen Ligation** ist es ebenfalls möglich, kurze synthetische Peptidsequenzen kovalent an C- oder N-terminale Cysteine zu binden [Muralidharan 2006]. Diese sogenannte exprimierte Proteinligation bedient sich unterschiedlicher Enzyme, wie der V8-Protease oder der Sortase, um Bindungen zwischen definierten endständigen Aminosäuren des Zielproteins und bestimmten funktionellen Gruppen des Peptids aufzubauen [Machova 2003].

Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten kovalenten Markierungsmethoden bieten **nicht kovalente Anbindungen an Proteinmotive** die Möglichkeit, das Protein mehrmals frisch zu modifizieren, um beispielsweise photogebleichte Liganden zu ersetzen, was oftmals ein begrenzender Faktor in einzelmolekülspektroskopischen Anwendung darstellt. Als Beispiele seien Ni:NTA-Polyhistidin-Wechselwirkungen oder auch fluoreszenzmarkierte Antikörper aufgeführt. Die Toxizität von Nickel in Zellen sowie die enorme Größe von Antikörpern stellen hier die wichtigsten Einschränkungen dar.

Es stehen demnach viele verschiedene Modifikationsverfahren zur Verfügung, welche sich je nach Anwendungsgebiet besser oder schlechter für eine spezielle Anwendung eignen. Photobleichen stellt jedoch immer noch ein großes Problem dar, weshalb neue, photostabile Fluorophore die Zeitskalen von Einzelmolekül-experimenten erweitern und neue Anwendungsmöglichkeiten erschließen würden. Die seit einigen Jahren verfügbaren **Nanopartikel** (*Quantum Dots*) sind unter diesem Aspekt zwar ein Fortschritt, jedoch aufgrund ihrer enormen Größe und starker Emissionsfluktuationen in ihrem Einsatzspektrum sehr limitiert [Kuno 2000].

## 3 MATERIALIEN UND METHODEN

### 3.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle gängigen Reagenzien und Lösungsmittel von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, in p.a. Qualität bezogen. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen fand bidestilliertes Wasser Verwendung. Für Arbeiten in niedrigen Konzentrationsbereichen wurde auf oberflächenoptimierte Reaktionsgefäße (nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe) und Pipettenspitzen (TipOne RPT, STARLAB GmbH, Ahrensburg) zurückgegriffen. Das Detergenz Nonidet P-40 (NP-40) (Boehringer, Ingelheim) wurde zur Verhinderung von Adsorptionseffekten zugegeben.

### 3.2 Farbstoffe

Für die Markierung von Biomolekülen wurden organische Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, welche zur kovalenten Anbindung an die Zielmoleküle über funktionelle Gruppen verfügen. Diese bestehen entsprechend der gewünschten Reaktivität aus NHS-Estern (aminreaktiv) oder Maleimidgruppen (thiolreaktiv). Die verwendeten Fluorophore sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Sie wurden als Feststoffe bezogen und als 1 mM DMF-Lösung bei -20 °C über Trockenmittel gelagert.

**Tabelle 3-1:** Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Hersteller	Farbstoff
Atto-Tec GmbH, Siegen	Atto 520, Atto 532, Atto 550, Atto 565, Atto 633, Atto 655, Atto 647N
Dyomics GmbH, Jena	Dy-520XL, Dy-547, Dy-548, Dy-647
Invitrogen GmbH, Karlsruhe	TMR, Bodipy-TMR

### 3.3 Oligonukleotide

Die für die Markierung der Proteinsubstrate verwendeten DNA-Sequenzen synthetisierte die Firma Purimex GmbH, Grebenstein. Die übrigen Sequenzen zur Aufreinigung der Markierungsansätze wurden von biomers.net GmbH, Ulm bezogen. In Tabelle 3-2 sind die für diese Zwecke eingesetzten Sequenzen und gegebenenfalls eingeführte Modifikationen der Markierungssätze A und B aufgelistet.

**Tabelle 3-2:** Bezeichnung, Sequenzen, Länge (Basenanzahl, **Base Pair** – BP) und Modifikationen der für Markierungs- und Aufreinigungszwecke verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge (BP)	Modifikation
Festphase_A	AAA AAA AAA AAA AAA GGG ATC TTA TAT TTG TTG GTC ATG G	40	5': Biotin-2- Aminoethoxy- Ethoxyethanol-Linker
Substrat_A	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TCC C	25	5': C <sub>6</sub> -Amino-Linker 3': C <sub>3</sub> -Thiol-Linker
Verdrängung_A	CCA TGA CCA ACA AAT ATA AGA TCC C	25	-
Festphase_B	AAA AAA AAA AAA AAA CCC TAG CAT ATC AAC CAC CAG TAC C	40	5': Biotin-2- Aminoethoxy- Ethoxyethanol-Linker
Substrat_B	GGT ACT GGT TGT TTA TAT TCT AGG G	25	5': C <sub>6</sub> -Amino-Linker 3': C <sub>3</sub> -Thiol-Linker
Verdrängung_B	GGT ACT GGT GGT TGA TAT GCT AGG G	25	-
K1	AGC TTA CGG ATC AGT C	16	5': Cy3 3': C <sub>3</sub> -Thiol-Linker

Über die in die Substratsequenzen eingebauten Amino- und Thiollinker kann je nach Bedarf ein Farbstoff oder ein Crosslinker via NHS- oder Maleimidkopplung angebunden werden. Bei den beiden Substratsequenzen führte man einen maleimidaktivierten Farbstoff am 3'-Ende und einen NHS-Ester-aktivierten Crosslinker am 5'-Ende des Stranges ein. Aufgrund des hohen Arbeits- und Materialaufwandes zur Einführung des Farbstoffes wurden die Standardkombinationen DNA / Farbstoff von den Synthesefirmen bereits gekoppelt bezogen.

Die weiteren, für Hybridisierungsexperimente und Untersuchungen des Fluoreszenzverhaltens der Farbstoffe in Abhängigkeit der Position in DNA-Doppelsträngen benötigten, modifizierten Oligonukleotide listet Tabelle 3-3 auf. Zur Übertragbarkeit der Resultate und Kostenersparnis sind die Sequenzen soweit wie möglich aus identischen Basenabfolgen wie den in Tab. 3-2 aufgeführten DNAs aufgebaut. Die im weiteren Verlauf mit 3'FS bezeichnete Sequenz ist identisch mit Substrat\_A.

**Tabelle 3-3:** Oligonukleotide für Hybridisierungsversuche.

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge (BP)	Modifikation
5'FS	CCC CAA TTC CGA GGT AGA TAT ATA T	25	5': C <sub>6</sub> -Amino-Linker
Int	CAA ACT ACC GAG TCT GAT ACA GGC GC	26	Interner C <sub>6</sub> -Amino-Linker an Base 6
Alnt	GCG CCT GTA TCA GAC TCG GTA GTT TG	26	Interner C <sub>6</sub> -Amino-Linker an Base 6
XL-Oligo1	(A) <sub>63</sub> GGT ACT GGT TGT TTA TAT TCT AGG G	88	3': C <sub>6</sub> -Amino-Linker
XL-Oligo2	GAA TAT AAA CAA CCA GTA CC(T) <sub>60</sub>	80	3': C <sub>6</sub> -Amino-Linker

Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5 beinhalten die für Hybridisierungsversuche und Farbstoffcharakterisierungen benötigten nicht modifizierten DNA-Gegensequenzen.

**Tabelle 3-4:** Nicht modifizierte Gegensequenzen für Hybridisierungsexperimente mit 3'-farbstoff-markiertem Oligonukleotid Substrat\_A bzw. 3'FS.

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge (Basenzahl)
TeilHyb-3'	GGG ATC GTA TAG TTG GT	17
TeilHyb-5' bzw. A3'-5'	CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	20
A3'-3	ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G	22
A3'-2	GAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	23
A3'-1	GGA TCG TAT AGT TGG TGG TCA TGG	24
A3'	GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G	25
A3'-3+3W	AAA ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G	25
A3'+1A	AGG GAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	26
A3'+2A	AAG GGA TCG TAT AGT TGG TGG TCA TGG	27
A3'+2G	GGG GGA TCG TAT AGT TGG TGG TCA TGG	27
A3'+3A	AAA GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G	28
A3'+5A	AAA AAG GGA TCG TAT AGT TGG TGG TCA TGG	30

**Tabelle 3-5:** Nicht modifizierte Sequenzen zur Hybridisierung an Oligonukleotid 5'FS.

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge (BP)
A5'-7	ATA TAT ATC TAC CTC GGA	18
A5'-6	ATA TAT ATC TAC CTC GGA A	19
A5'-5	ATA TAT ATC TAC CTC GGA AT	20
A5'-4	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT	21
A5'-3	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT G	22
A5'-2	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GG	23
A5'-1	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG	24
A5'	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG G	25
A5'+1G	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GG	26
A5'+1A	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GA	26
A5'+2G	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG	27
A5'+2A	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GAA	27
A5'+3G	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG G	28
A5'+5G	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG GGG	30
A5'+7G	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG GGG GG	32
A5'-5+5W	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATC CCC C	25
A5'-3+3W	ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GCC C	25

Über die in Verbindung mit der *Smart Probe*-DNA-Sonde verwendeten Sequenzen gibt Tabelle 3-6 Auskunft.

**Tabelle 3-6:** In Zusammenhang mit den Experimenten zu *Smart Probes* eingesetzte Oligonukleotide.

Name	Sequenz 5' → 3'	Länge (BP)	Modifikation
<i>Smart Probe</i>	CCC TCT GGT CCA TGA ATT GAG GG	23	5': A 655 via C <sub>6</sub> -Amino-Linker
KO-A	CCC TCT GGA CCA TGA ATT GAG GG	23	
KO-G	CCC TCT GGG CCA TGA ATT GAG GG	23	
KO-C	CCC TCT GGC CCA TGA ATT GAG GG	23	
Ziel-A	CCC TCA ATT CAT GGA CCA	18	
Ziel-G	CCC TCA ATT CAT GGG CCA	18	
Ziel-C	CCC TCA ATT CAT GGC CCA	18	
Ziel-T	CCC TCA ATT CAT GGT CCA	18	



In Tabelle 3-7 sind die in Kombination mit der Dy-520XL-DNA-Sonde eingesetzten DNA-Sequenzen aufgelistet.

**Tabelle 3-7:** Zur Diskriminierung von Punktmutationen mittels Dy-520XL-DNA-Sonde eingesetzte Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Länge (BP)
XL-Sonde	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TCC C - Dy520XL	25
AXL-S	CTA TCA AGG GAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	32
MM2	CTA TCA AGA GAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	32
KO2	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TCT C	25
MM3	CTA TCA AGG AAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	32
KO3	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TTC C	25
MM7	CTA TCA AGG GAT CTT ATA GTT GGT GGT CAT GG	32
KO7	CCA TGA CCA CCA ACT ATA AGA TCC C	25
MM12	CTA TCA AGG GAT CGT ATA CTT GGT GGT CAT GG	32
KO12	CCA TGA CCA CCA AGT ATA CGA TCC C	25
MM17	CTA TCA AGG GAT CGT ATA GTT GGA GGT CAT GG	32
KO17	CCA TGA CCT CCA ACT ATA CGA TCC C	25

### 3.4 Crosslinker

**Tabelle 3-8:** Verwendete Crosslinker und deren Reaktivitäten.

Crosslinker	Firma	Reaktive Gruppen	Reaktion mit
BS <sup>3</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA	Zwei Sulfo-NHS-Ester	Zwei Aminogruppen
DMS	Sigma-Aldrich	Zwei Imidoester	Zwei Aminogruppen
EDC + Sulfo-NHS	Sigma-Aldrich	Carbodiimid Sulfo-NHS-Ester	Carboxy- und Aminogruppe
EMCS	Thermo Fisher	NHS-Ester Maleimid	Aminogruppe Thiolgruppe
Sulfo-KMUS	Thermo Fisher	Sulfo-NHS-Ester Maleimid	Aminogruppe Thiolgruppe
Sulfo-LC-SDA	Sigma-Aldrich	Sulfo-NHS-Ester Diazirin	Aminogruppe Unspezifisch nach UV-Lichtbestrahlung
Sulfo-SANPAH	Thermo Fisher	Sulfo-NHS-Ester Phenylazid	Aminogruppe Unspezifisch nach UV-Lichtbestrahlung
SFB	Thermo Fisher	NHS-Ester Benzaldehyd	Aminogruppe Hydrazinopyridin
SANH	Thermo Fisher	NHS-Ester Hydrazinopyridin	Aminogruppe Benzaldehyd

Zur Anbindung der farbstoffmarkierten DNA-Sequenzen an die Substratproteine wurden verschiedene, in Tabelle 3-6 aufgeführte Crosslinker auf ihre Eignung hin getestet. Weitere Informationen bezüglich der verwendeten Crosslinker sind im Anhang dieser Arbeit enthalten.

### 3.5 Festphasen

Zur Immobilisierung der Festphasenoligonukleotide fanden folgende Harze Verwendung: *Resin NovaSyn® TG Sieber* (NovaBiochem, Läuelfingen), *Rink Resin LS* (Advanced ChemTech, Louisville, USA) und *TentaGel™ S-NH<sub>2</sub>* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Neben der Erprobung dieser aus der Festphasenpeptidsynthese entlehnten funktionalisierten Polymersphären wurden die magnetischen streptavidinbeladenen Kügelchen *NanoLink Streptavidin Magnetic Beads* (SoluLink Inc., San Diego, USA) eingesetzt.

### 3.6 Peptide, Proteine und Enzyme

Mit Ausnahme von rekombinantem Protein G und ebenfalls rekombinantem Ubiquitin, (AXXORA Deutschland GmbH, Lörrach), wurden die eingesetzten Proteine und Enzyme von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, bezogen. Die in den Korrelationsmessungen verwendete DNase I stammt von Invitrogen GmbH, Karlsruhe. Das für die Markierungsexperimente benutzte 20-mer Peptid P1 wurde in unserem Labor von *Dauber* hergestellt. Es weist folgende Aminosäureabfolge auf, das x entspricht hierbei einem AEEA-Linker (2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy]ethoxyessigsäure):



## 3.7 Geräte

### 3.7.1 Aufreinigungsinstrumente

Zur Auftrennung der DNA-Farbstoffkopplungsgemische wurden die Ansätze zuerst via Gelfiltration unter Verwendung von *illustra NAP-5* Säulen (GE Healthcare, München) von überschüssigem freiem Farbstoff befreit. Diese Säulen sind mit Sephadex G-25 Harz (DNA-Güteklasse) gepackt, welches aus Granulatkugeln von 20 - 50 µm Durchmesser mit einem Größenausschlusswert von ungefähr 3000 g/mol besteht. Dadurch werden Salze, kleine Moleküle wie beispielsweise Farbstoffe und kurze DNA-Fragmente in den Poren des Harzes zurückgehalten, während Moleküle mit höherem Molekulargewicht ungehindert passieren können. Als mobile Phase dient PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4. Das applizierbare Volumen der Säulen beträgt 0,5 ml bei einer Maximalkonzentration der Probe von 1 mg/ml.

Nach gleichem Prinzip funktionieren die *Zeba Desalt Spin Columns* (Pierce, Rockford, USA), welche jedoch für kleinere Probenvolumina von 30 - 120 µl und die Verwendung in einer Zentrifuge konzipiert sind und einen höheren Größenausschlusskoeffizienten von etwa 7000 g/mol besitzen. Diese Säulen fanden vorwiegend für Umpufferungen und Entsalzen von Lösungen sowie ebenfalls für das Abtrennen von niedermolekularen Reaktionsnebenprodukten Verwendung. Hierzu werden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt, die Probe aufgebracht und für zwei Minuten bei 1500 G zentrifugiert.

Die *Microcons* (Millipore, Billerica, USA) sind für die gleichen Zwecke und für Volumina bis zu 0,5 ml geeignet, basieren jedoch auf einem anderen Funktionsprinzip. Hier hält ein Filtereinsatz, bestehend aus einer Celluloseregeneratmembran, die größeren Bestandteile im Überstand zurück und konzentriert sie dabei auf, während kleinere Moleküle nach mehrminütiger Zentrifugation bei maximal 14000 G im Filtrat wiederzufinden sind. Durch mehrmaliges Aufschlänmen des Überstands und Wiederholen der Trennung kann auch mit diesen *Microcons* eine effiziente Trennung von unerwünschten Bestandteilen erreicht werden. Durch Drehen des Filtereinsatzes, Aufstecken auf ein anderes 1,5 ml Reaktionsgefäß und Zentrifugation für drei Minuten bei 1000 G gewinnt man den Überstand zurück. Da von diesem Filtereinsatz mehrere Ausführungen mit unterschiedlichen Porengrößen erhältlich sind, ist eine Anpassung an unterschiedliche Molekulargewichte von Proben problemlos möglich.

### 3.7.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Für die weitergehende Reinigung der Farbstoff-DNA-Konjugate steht ein HPLC-System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) zur Verfügung. Die Trennung erfolgte durch die Umkehrphasenchromatographiesäule MultoHigh-Bio-300-C4 mit den Maßen 125 x 4 mm (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) welche mit C<sub>4</sub>-Ketten modifiziertem Kieselgel von 5 µm Partikeldurchmesser und 300 Å Porengröße gefüllt war. Als Laufmittel dienten triethylammoniumacetatgepufferte wässrige Lösungen (TEAA, 2 M, pH 7, HPLC-Gütegrad, BIOSOLVE B.V., Valkenswaard, Niederlande) mit unterschiedlichen Acetonitrilanteilen (ACN, Acetonitril E CHROMASOLV für HPLC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Puffer A bestand aus einer 0,1 M TEAA-Lösung mit 5 % ACN, wohingegen sich Puffer B aus 80 % ACN und 20 % einer 0,1 M TEAA-Lösung zusammensetzte. Der in Tabelle 3-9 beschriebene Laufmittelgradient diente bei einem Fluss von 1 ml/min zur Auftrennung der einzelnen Komponenten der Kopplungsansätze, deren Erscheinen durch Absorptionsmessung mit dem UV/Vis-Monitor Model 1706 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) bei 260 nm erfasst wurde.

**Tabelle 3-9:** Verwendeter Laufmittelgradient zur Auftrennung farbstoffmarkierter Oligonukleotide.

Zeit [min]	Anteil Laufmittel A	Anteil Laufmittel B
0	95 %	5 %
30	65 %	35 %
40	40 %	60 %
45	0 %	100 %
50	95 %	5 %

Das HPLC-System HP 1090 Series II Liquid Chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) wurde zur Reinigung der DNA-Protein-Kopplungsprodukte in Verbindung mit der Größenausschlusschromatographiesäule TSK gel G2000SWXL (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart) eingesetzt. Diese hat die Abmessungen 300 x 7,8 mm

und ist gepackt mit hochporösen Silikapartikeln, welche mit diolgruppentragenden Liganden funktionalisiert sind und Porengrößen von 125 Å bei einem Durchmesser von 5 µm aufweisen. Dadurch ist die Säule für die Größenauftrennung von Proteingemischen mit Molekulargewichten zwischen 5 und 150 kDa bei einem Druck von bis zu 70 bar geeignet. Als Laufmittel findet PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,1 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min Verwendung. Die Detektion erfolgt mittels eines in das System integrierten Diodenarraydetektor bei der Wellenlänge eines gegebenenfalls vorhandenen Farbstoffs oder alternativ bei 260 nm zur Messung der DNA-Absorption.

### **3.7.3 Absorptionsspektrometer**

Für Absorptionsmessungen stand ein Cary 4E UV-Visible Spektrophotometer (Varian, Mulgrave, Australien) in Kombination mit SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten (Hellma, Müllheim) zur Verfügung. Der angeschlossene Thermostat (Varian, Mulgrave, Australien) ermöglicht die Einstellung der Messlösungstemperatur bzw. variiert sie während der Messung nach zuvor eingegebenen Parametern.

### **3.7.4 Fluoreszenzspektrometer**

Fluoreszenzspektren wurden an einem SLM-AMINCO 8100 Fluoreszenzspektrometer (SLM, Urbana, USA) mit Anregung durch eine 150 Watt Xenonlampe aufgenommen. Sowohl für den Anregungs- als auch den Emissionslichtweg betragen die jeweiligen Monochromatorblendeneinstellungen 4 nm. Die Messungen erfolgten relativ zur Lampenintensität bei 25 °C in SUPRASIL-Quarzglas-Ultra-Mikro-Küvetten mit drei Millimeter Lichtweg (Hellma, Müllheim) gegen eine interne Referenz, unter einer Photomultiplervorspannung von 350 Volt. Die erhaltenen Daten erfuhren eine Korrektur bezüglich der spektralen Instrumentencharakteristik und der Pufferbeiträge.

### **3.7.5 Thermocycler**

Die Denaturierung von Proteinproben fand in einem Thermocycler PTC-200 (MJ Research, Waltham, USA) durch zehnmündige Erwärmung auf 95 °C statt.

Zur Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden wurde in einem T3-Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) ein Temperaturgradient beginnend von 85 °C auf 25 °C mit einer Abkühlrate von 1,2 °C/min angewendet.

### **3.7.6 (Fluoreszenz-)Scanner**

Zum Auslesen der Farbstofffluoreszenzintensitäten von Polyacrylamidgelen bietet sich die Verwendung von Flachbettscannern an.

In dieser Arbeit wurde der FLA-8000 Fluoreszenzscanner (FUJIFILM Corporation, Tokio, Japan) verwendet. Die in das Gerät integrierten Laser mit 532 nm bzw. 635 nm Wellenlänge regen die Farbstoffe an, deren Fluoreszenzsignale hinter den entsprechenden Emissionsfiltern 570DF20 und 650LP mit einer räumlichen Auflösung von 100 µm detektiert werden.

Nach der Coomassiproteinanfärbung der Gele erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit dem ScanJet 5370C (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA).

### **3.7.7. Weitere Geräte**

#### **UV-Lampe**

Die Photoaktivierung der betreffenden Crosslinker fand unter Verwendung einer 100 W Quecksilberdampflampe (Typ 307-072-057, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar) statt.

#### **Massenspektrometer**

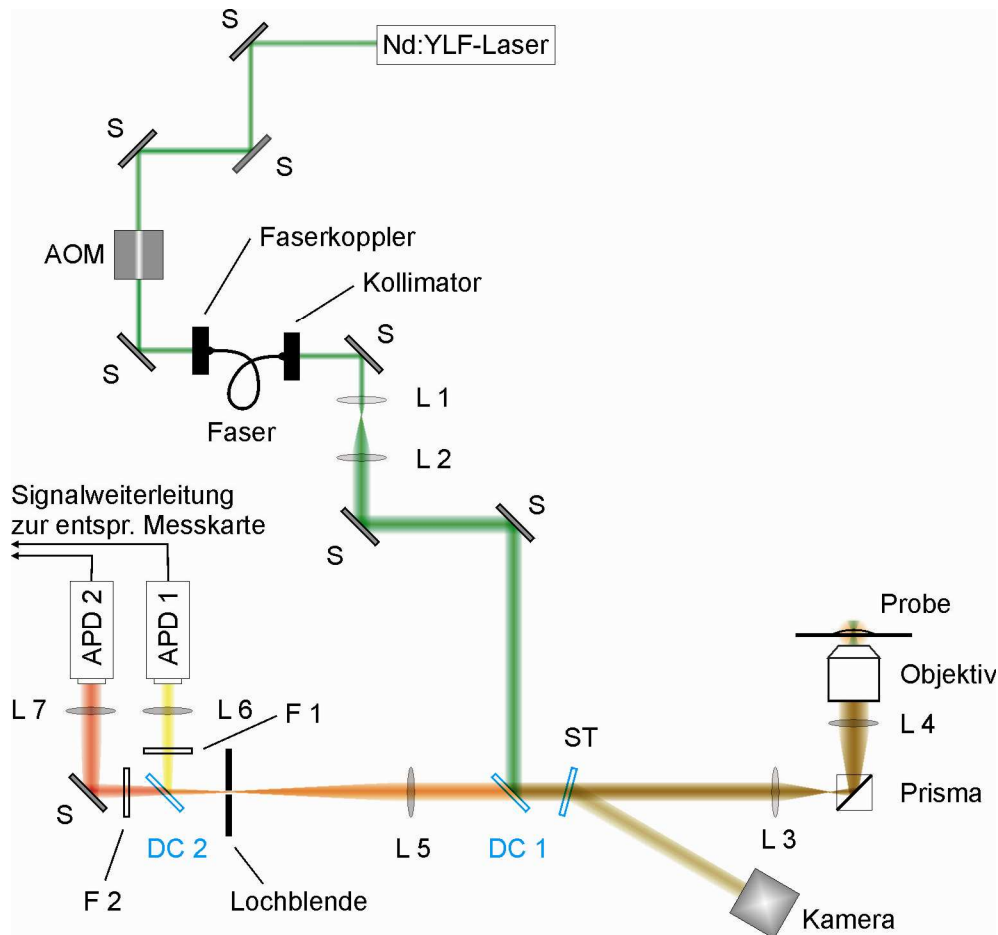
Die abgebildeten Massenspektren resultieren aus Messungen an einem MALDI-TOF-Massenspektrometer (Reflex II, Bruker, Darmstadt).

#### **Halterung zur magnetischen Festphasenseparierung**

Die magnetische Abscheidung der eingesetzten Festphasen wurde in dem zu diesem Zweck von Dynal (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) entwickelten Reagenzgefäßhalter MPC-S durchgeführt.

### 3.8 Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Der schematische Aufbau des verwendeten Einzelmolekülfluoreszenzspektroskops ist in Abbildung 3-1 dargestellt und basiert auf den Arbeiten von *Gansen* und *Kaudse* [Gansen 2008; Kaudse 2009].

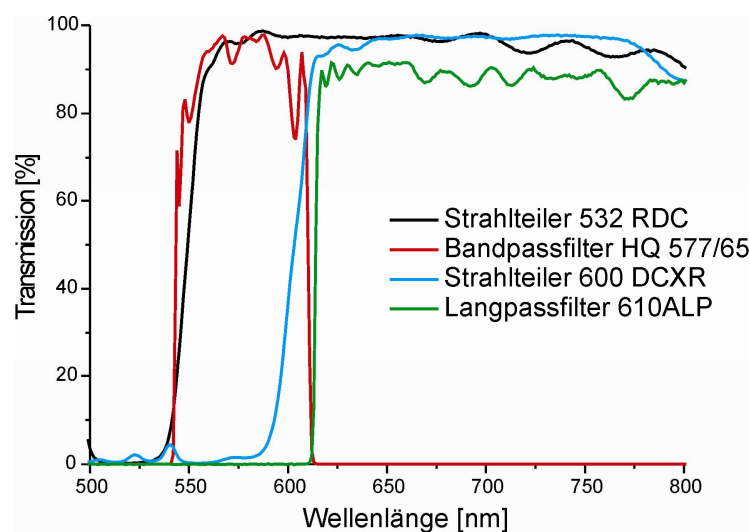


**Abbildung 3-1:** Schematische Darstellung der Mikroskopieeinheit. S: Spiegel, L: Linse, DC: dichroitischer Strahlteiler, ST: spektral flacher Strahlteiler, APD: Avalanche-Photodiode, F: Spektralfilter.

Zur Anregung der Fluorophore mit Licht der Wellenlänge 532 nm findet ein frequenzverdoppelter, gepulster, diodengepumpter Nd:YLF Feststofflaser GE-100 (Time-Bandwidth Products AG, Zürich, Schweiz) Verwendung. Der Lichtstrahl wird über einen **akusto-optischen Modulator** (AOM, Modell AOTFnC-VIS-TN 1001, A&A Optoelectronics Ltd., Markham, Kanada) in eine Einmodenglasfaser (3,5  $\mu\text{m}$  Kern-, 125  $\mu\text{m}$  Manteldurchmesser, 6 m Länge, mit zugehörigem Koppler und Kollimator, AMS Technologies AG, Martinsried) eingekoppelt. Danach erfolgt mit einer aus zwei

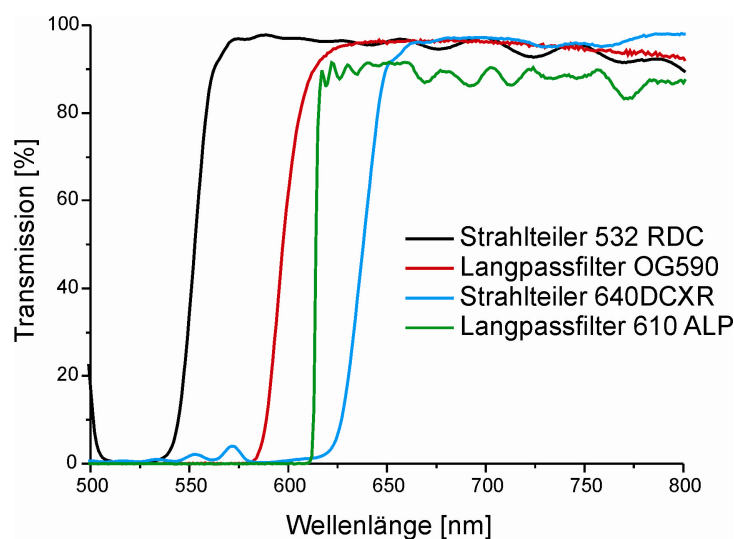


Linsen (L 1 und L 2) bestehenden Teleskopeinheit eine Aufweitung und Parallelisierung des Strahls, bevor er über den dichroitischen Spiegel DC 1 (532 RDC, AHF analysentechnik AG, Tübingen) in das im inversen Mikroskop Olympus IX70 verbaute Prisma trifft. Dieses lenkt ihn auf das Wasserimmersionsobjektiv Olympus UPlanApo 60x/1,2 W (Olympus, Tokio, Japan), wodurch er auf die auf einem Probenträger ( $\mu$ -Slide 18 well - flat, ibidi GmbH, Martinsried) positionierte Probe fokussiert wird. Die Messung erfolgt mit einer Fokustiefe von 50  $\mu\text{m}$  in z-Richtung. Dasselbe Objektiv sammelt das emittierte Fluoreszenzlicht und leitet es den Strahlengang zurück. Es trifft auf den Strahlteiler ST (BSF10-A1, Thorlabs, Newton, USA), welcher 3 % des Lichts im Winkel von 20° auslenkt und auf das Objektiv einer Kamera (Miniüberwachungskamera Color mit Knopfobjektiv und Ton, System-SicherheitsTechnik GmbH, Leipzig) lenkt, wodurch die Fokuseinstellung und -kontrolle erheblich vereinfacht wird. In Verbindung mit dem vollständig reflektierenden Prisma anstelle eines Prismas, welches 20 % des Lichts für die visuelle Inspektion in das Okular auskoppelt, erzielt dieser Aufbau eine ca. 17 % höhere Fluoreszenzlichtausbeute. Im Anschluss gelangt das Licht erneut auf den Strahlteiler DC 1, welchen es im Gegensatz zur *Rayleigh*-Streuung passieren kann. Die Sammellinse L 5 fokussiert das so gereinigte Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende von 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser, welche sämtliches ausserhalb der Fokusebene entstammende Licht blockt und somit das Detektionsvolumen begrenzt.



**Abbildung 3-2:** Transmission in Abhängigkeit der Wellenlänge der verwendeten Filter und Strahlteiler.

Danach separiert ein weiterer dichroitischer Spiegel (DC 2, 600 DCXR, AHF analysentechnik AG, Tübingen) das Emissionslicht in zwei spektrale Bereiche. Eine Übersicht über die optischen Eigenschaften der verwendeten Filter und Strahlteiler zeigt Abbildung 3-2. Die beiden Teile des Emissionssignals passieren jeweils einen auf die Farbstoffe abgestimmten Emissionsfilter (F 1, HQ 577/65, AHF analysentechnik AG, Tübingen, für den kurzwelligeren und F 2, 610 ALP, Omega Optical Inc., Brattleboro, USA für den langwelligeren Kanal), werden durch die Linsen L 6 und L 7 auf die aktiven Flächen der zwei Lawinenphotodioden (*Avalanche Photo Diode* - APD) des Typs SPCM-AQR (Perkin-Elmer Optoelectronics, Vaudreuil, Kanada) kollimiert und dort schließlich getrennt registriert. Bei den weitergehenden Experimenten bezüglich der Auswirkungen verschiedener Nukleobasen auf die Fluoreszenzemission des Dy520XL-Farbstoffs kommt die in Abbildung 3-3 dargestellte Filterkombination zum Einsatz.



**Abbildung 3-3:** Transmission in Abhängigkeit der Wellenlänge der verwendeten Filter und Strahlteiler bei den Dy520XL-Versuchen.

Als dichroitischer Spiegel DC 2 ist hier der 640DCXR (AHF analysentechnik AG, Tübingen) verbaut. Den Filter F 1 im kurzwelligeren Detektionskanal bildet der OG590 Emitter (Omega Optical Inc., Brattleboro, USA).

Zur weiteren Verarbeitung gelangen die Detektorsignale über einen Router (PRL400) an die zeitauflösende Einzelphotonenzählkarte (*Time Correlated Single Photon*

**Counting** - TCSPC) TimeHarp200, die über die zugehörige Software der Version 5.0 ansteuerbar ist (beides PicoQuant GmbH, Berlin).

Zusätzlich wird bei gepulstem Laserbetrieb ein 80 MHz-Synchronisationssignal (SYNC) von der Laserkontrolleinheit oder einem Diodenlasertreiber (Sepia PDL 808, PicoQuant GmbH, Berlin) von variabler Frequenz, meist jedoch von 5 MHz, eingespeist. Ein **Constant Fraction Discriminator (CFD)** filtert durch Anlegen eines Grenzwerts an die Pulsamplitude ungewollte Signale aus. Die TCSPC-Messkarte registriert neben dem zugehörigen Detektionskanal für jedes Photon auch jeweils die mikroskopische Ankunftszeit in Relation zum vorherigen SYNC-Puls und errechnet daraus zusätzlich die makroskopische Ankunftszeit seit Messbeginn. Der von der Karte verwendete TTTR-Modus (**Time Tagged Time Resolved**) erlaubt die direkte Speicherung aller Ereignisse ohne Datenkomprimierung. Aus diesen Dateien lassen sich für die spätere Analyse alle Informationen der Fluoreszenzsignale gewinnen. Für Fluoreszenzlebensdauermessungen ist anstelle des artifiziellen SYNC-Pulses direkt das SYNC-Signal des Nd:YLF-Lasers zu verwenden. Da dieser jedoch mit einer festen Repetitionsrate von 80 MHz betrieben wird und das SYNC-Signal keine ideal steilen Flanken aufweist, ist das zur Messung zur Verfügung stehende Detektionszeitfenster stark eingeschränkt, wodurch etwa 40 % der Fluoreszenzemission verloren gehen.

Alternativ kann die Fluoreszenzkorrelationsmesskarte ALV5000/E (ALV-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen) für entsprechende Korrelationsmessungen an die Ausgänge der APDs angeschlossen werden und ermöglicht die Analyse der Auto- bzw. Kreuzkorrelation der beiden Kanäle bei einer maximalen Zählrate von 125 MHz in Echtzeit. Unter Verwendung der auf die Messkarte abgestimmten Software (Version 3.0) wurden pro Probe fünf Datensätze bestehend aus dem Mittelwert von fünf Messungen von je zehn Sekunden Dauer aufgenommen. Die Berechnung basiert auf folgendem Prinzip [ALV Laser GmbH 1998]:

- Erfassen der ankommenden Impulse  $n_{k,i}, n_{l,i}$  der beiden Kanäle über  $N$  Zeitintervalle  $t_i$  mit  $t_{i+1} - t_i = t_s$
- Verschieben der Signale um das Zeitintervall  $\tau = jt_s$ ,
- Multiplizieren der gegeneinander verschobenen Signale
- Summation der Produkte

Multiplikation und Summation werden für die kleinen Zeitintervalle von der Hardwarekarte ausgeführt, wohingegen für große Intervalle die Berechnung softwareseitig erfolgt. Zur Ressourcenschonung vergrößern sich die Zeitintervalle mit zunehmender Verschiebung von 200 ns auf von der Gesamtmesszeit abhängige Werte. Daraus ergibt sich die diskrete Korrelationsfunktion  $g$  als

$$g_{kl}(j) = \sum_{i=1}^N n_{k,i} n_{l,i-j} \quad (3.1)$$

Zur Berechnung der normierten Korrelationsfunktion  $G$  wird die die Standardabweichung verringernde symmetrische Normierung eingesetzt:

$$G_{kl}(j) = \frac{Ng_{kl}(j)}{M_0 M_j} - 1 \quad \text{mit} \quad M_0 = \sum_{i=1}^N n_{k,i} \quad \text{und} \quad M_j = \sum_{i=1}^N n_{l,i} \quad (3.2)$$

Der implementierte Export der Korrelationsdaten als ASCII-Datei ermöglicht eine weitergehende Datenanalyse.

### 3.9 Software

Zur Analyse und graphischen Darstellung der erhaltenen Messdaten fanden die jeweils passenden Programme Verwendung. Im graphischen Programmiersystem LabVIEW (Version 7.1, National Instruments, Austin, USA) wurde das Programm zur Erfassung der Koinzidenz einzelner Fluoreszenzsignale entwickelt (siehe Kapitel 4.4.4). Die abschließende graphische Gestaltung der Diagramme fand in OriginPro 8 (OriginLab Corp., Northampton, USA) statt, wohingegen Schemazeichnungen in CorelDRAW 12 (Corel, Ottawa, Kanada) erstellt wurden.

### 3.9.1 QuickFit

Die Mittelung und Analyse der Korrelationsdatensätze erfolgte mit Hilfe des Programms *QuickFit*. Es wurde von *Tewes* im Rahmen seiner Dissertation erstellt und von *Wachsmuth* in seiner Arbeit erweitert [Tewes 1998; Wachsmuth 2001]. Dieses Programm bietet die Möglichkeit, über einen *Marquardt-Levenberg*-Algorithmus [Press 1992] verschiedene Modellfunktionen an die experimentellen Korrelationsdatensätze derart anzupassen, dass die Fehlerquadratsumme

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left( \frac{G_{theo}(\tau_i) - G_{exp}(\tau_i)}{\sigma_i} \right)^2 \quad (3.3)$$

minimiert wird. Die Art der verwendeten Modellfunktion ist u.a. abhängig von der Anzahl der zu berücksichtigenden Spezies und der Zahl der nichtstrahlenden Zustände. In einem iterativen Prozess können Parameter als Startwerte eingegeben oder bei der Angleichung festgehalten werden. Die so erhaltene Fitfunktion sowie deren Parameter sind als Textdateien exportierbar. Für weitergehende Informationen sei an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur verwiesen [Koppel 1974; Thompson 1991; Meseth 1999].

### 3.9.2 FRETtchen

Die aus Einzelmolekülmessungen resultierenden Dateien im binären \*.t3r-Format bestehen typischerweise aus mehreren Millionen registrierten Photonen, welche jedoch überwiegend der Hintergrundfluoreszenz zugeordnet werden können. Demzufolge müssen die Einzelmolekülereignisse (*Bursts*) vor der eigentlichen Datenanalyse extrahiert werden. Dies geschieht durch konsekutive Anwendung eines *Lee*-Filters [Enderlein 2002] und eines Bursterkennungsverfahrens [Eggeling 2001]. Beides leistet das von *Gansen* in seiner Arbeit entwickelte Analyseprogramm FRETtchen [Gansen 2008].

Der *Lee*-Filter ist ein gewichteter gleitender Durchschnittsfilter, welcher unter Erhaltung von Burstlänge und -höhe auf Basis der Interphotonzeit (Zeitspanne zwischen dem Eintreffen zweier Photonen) kleine Signalfluktuations eliminiert. Dies resultiert in einer effektiven Glättung des Hintergrunds und führt so zu einer deutlich

verbesserten Abgrenzung der echten Einzelmolekülbursts. Die Filterparameter sind ebenso wie die zur Analyse verwendeten Kriterien auf der Benutzeroberfläche einstellbar. Die Bursterkennung wird anhand der geforderten Mindestphotonenzahl und der maximal zu berücksichtigenden Interphotonzeit durchgeführt. Dieser Wert kann visuell über eine implementierte Grafik angepasst werden, um die Anzahl der detektierten Signale bei gleichzeitig effektiver Hintergrundunterdrückung zu maximieren.

Nach dem Auswahlprozess erfolgt die Berechnung der Signalbreite und der Photonenzahl für jedes Einzelsignal, womit sich potentielle Mehrpartikelereignisse, die entweder zu hell oder zu breit sind, ausgrenzen lassen. Die Resultate werden in Tabellen und Graphiken dargestellt und können abschließend im ASCII-Format exportiert werden. Diese Dateien beinhalten folgende Informationen: Detektionszeitpunkt, Burstlänge, Burstphotonenzahl in beiden Kanälen, Proximitätsmaß und Burstphotonenzahl.

### **3.9.3 *mFold***

Das Programm *mFold* wurde von *Zuker* am *Institute for Biomedical Computing* an der *Washington University School of Medicine* entwickelt [Mathews 1999; Zuker 2003]. *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 verschiedene Schleifenformen berücksichtigt, jedoch keine Pseudoknoten, da diese mit dem Algorithmus des Programms nicht vereinbar sind. Weiterhin können die Natrium- und Magnesiumionenkonzentrationen sowie die Temperatur variiert werden [Peyret 2000]. Die Ergebnisse der Berechnungen sind graphisch darstellbar und bieten damit die Möglichkeit, die Faltung von DNA-Sequenzen und die Sekundärstruktur von PCR-Produkten vorherzusagen [Markham 2005]. Außerdem gibt das Programm Auskunft über die Stabilität von Sekundärstrukturen im Allgemeinen, da es die Berechnung der Schmelztemperaturen erlaubt.

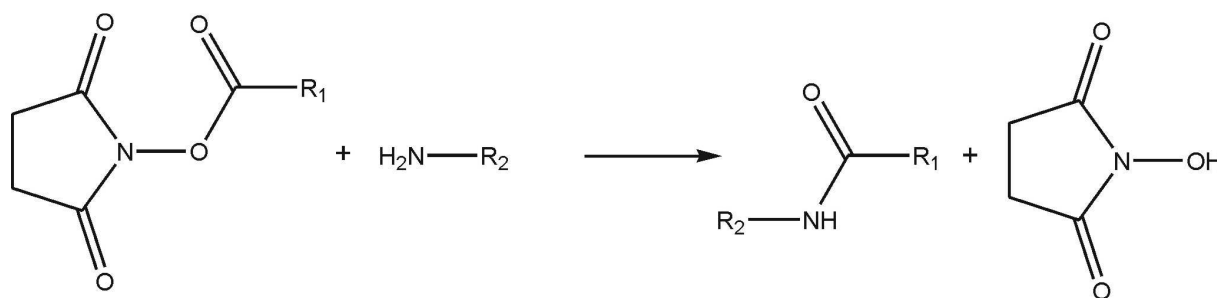
*mFold* fand in dieser Arbeit in der Version 3.2 Anwendung, um die optimalen und suboptimalen Sekundärstrukturen der eingesetzten Oligonukleotide und deren freie Energien zu berechnen [Markham 2008]. Mit Hilfe des Programms ist es zudem

möglich, die Struktur und Stabilität beliebiger hybridisierter DNA-Doppelstränge zu berechnen und darzustellen, weshalb es zur Erstellung und Abstimmung der in der Aufreinigung eingesetzten DNA-Sequenzen eingesetzt werden konnte. Weitere Informationen zu *mFold* sind auf der Webseite von *Zuker* unter <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/> zu finden.

### 3.10 Methoden

#### 3.10.1 Kopplung von Farbstoffen an Oligonukleotide

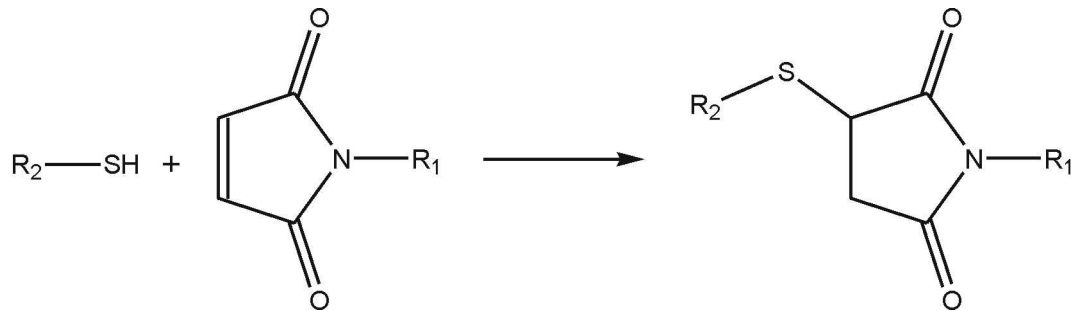
Zur kovalenten Anbindung der Fluorophore an DNA-Sequenzen wurden NHS- oder Maleimidderivate der Farbstoffe eingesetzt. Die Anbindung erfolgte an während der Oligonukleotidsynthese in den DNA-Strang eingeführten Amino- bzw. Thiolgruppen. Im Fall der NHS-Farbstoffe besteht die Reaktion, wie aus Abbildung 3-4 ersichtlich, aus einem nukleophilen Angriff des Stickstoffs der Aminogruppe auf die NHS-aktivierte Carbonsäurefunktion des Farbstoffs, woraus N-Hydroxysuccinimid und das Produkt in Form eines Carbonsäureamids hervorgehen.



**Abbildung 3-4:** Reaktionsschema der kovalenten Anbindung eines NHS-Esterderivats an ein aminogruppentragendes Biomolekül.

Anstelle eines Oligonukleotids kann nach identischer Methode ein Protein oder Peptid über die an den Lysinseitenketten oder am N-Terminus vorhandene freie Aminofunktion modifiziert werden. Die Reaktion erfolgte in 0,2 M Carbonatpuffer bei pH 8,6, um mit einem 40-fachen Überschuss des Fluorophors eine möglichst quantitative Umsetzung des Oligonukleotids zu erzielen. Die Reaktionszeit betrug vier Stunden unter Lichtausschluss.

Im Fall der Farbstoffanbindung via Maleimid an die Thiolgruppenmodifikation eines DNA-Strangs erstreckt sich die Reaktion ebenfalls über vier Stunden im Dunkeln, findet jedoch in PBS-Puffer pH 7,2 statt. Der Ablauf der Reaktion ist in Abbildung 3-5 dargestellt, es handelt sich auch hierbei um einen nukleophilen Angriff des Schwefels auf ein Kohlenstoffatom der Maleimiddoppelbindung, was zur Ausbildung eines stabilen Thioethers als Additionsprodukt führt.



**Abbildung 3-5:** Reaktionsmechanismus der Addition einer Thiolgruppe an ein Maleimid.

Wie bei der Farbstoffkopplung via Maleimid an Thiolgruppen beträgt das Farbstoff–DNA-Verhältnis 50:1, um die Ausbeute an markierter DNA zu maximieren, wobei diese Reaktion generell schlechtere Resultate als die zuvor beschriebene erzielt.

### 3.10.2 Polyacrylamidgele

Die elektrophoretische Trennung in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen wurde zur Etablierung der Markierungsmethode und Überprüfung der Aufreinigung eingesetzt. Die Polymerisierung des Gels (Abmessungen 8,3 x 7,3 x 0,075 cm) und die Auftrennung fanden in einer Minigelapparatur von Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA) statt. Die oberen zwei Zentimeter des Gels, in denen sich die Taschen und etwa ein Zentimeter Laufstrecke befinden, bestehen aus 5 %igem Sammelgel, die unteren fünf Zentimeter beherbergen das 8 %ige Trenngel. Über die Zusammensetzung der Polymerisationslösungen gibt Tabelle 3-10 Aufschluss. Nach dem Gießen des Sammelgels überschichtet man selbiges mit einem Milliliter Isopropanol, um eine glatte und waagrechte Oberfläche zu erzielen. Die Polymerisationszeit beträgt für beide Gelteile je 45 min. Eine Gesamtmenge von 5  $\mu$ g Proteingemisch wird in einem SDS-Ladepuffer (2x-Puffer: 10 ml 1,5 M Tris



pH 6,8, 6 ml 20 % SDS, 30 ml Glycerin, 15 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1,8 mg Bromphenolblau, mit H<sub>2</sub>O auf V = 100 ml auffüllen) nach zehnminütigem Denaturieren bei 95 °C und anschließendem Abkühlen auf Eis in eine Tasche gegeben.

**Tabelle 3-10:** Bestandteile der Reaktionslösungen zur Herstellung eines Polyacrylamidgels.

Reagenzien	8 %iges Trenngel	5 %iges Sammelgel
	V [ml]	V [ml]
H <sub>2</sub> O	2,3	1,4
30 % Acrylamid-Mix	1,3	0,33
1,5 M Tris pH 8,8	1,3	-
1,0 M Tris pH 6,8	-	0,25
10 % SDS-Lösung	0,05	0,02
10 % Ammoniumpersulfat-Lsg.	0,05	0,02
TEMED	0,003	0,002
V <sub>ges</sub>	5,003	2,022

Die Elektrophorese erfolgt durch Anlegen einer Spannung von 120 V für 90 min bei Raumtemperatur in einem SDS-Laufpuffer (10x-Puffer: 10 g SDS, 30,3 g Tris, 144,1 g Glycin, mit H<sub>2</sub>O auf V = 1 l auffüllen). Im Anschluss detektiert man die Fluoreszenzemission der angebundenen Fluorophore mittels Fluoreszenzscanner (siehe Kapitel 3.7.6), worauf die Anfärbung der Proteinbestandteile durch vierstündiges Einlegen in eine Coomassielösung (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas Inc., Burlington, Kanada) folgt. Zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung schwenkt man das Gel weitere vier Stunden in Wasser, das währenddessen mehrmals auszutauschen ist. Nach dem Waschen wird das Gel in Plastikfolie eingeschweißt und die Banden in einem Flachbettscanner eingelesen.

### 3.10.3 Bestimmung von Quantenausbeuten

Die Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten erfolgte nach Gleichung 3.4 bei 25 °C [Werner 1973; Song 2009], wobei als Referenz der Fluoreszenzfarbstoff Atto 590 in PBS pH 7,4 zugrunde lag. Dieser besitzt unter den Bedingungen eine Quantenausbeute von 0,80 [ATTO-TEC GmbH 2009].

$$\Phi_u = \Phi_s \frac{F_u A_s n_u^2}{F_s A_u n_s^2} \quad (3.4)$$

Hierbei repräsentiert F die Emissionsspektrenfläche, A den Absorptionswert bei der Anregungswellenlänge, n den Brechungsindex des verwendeten Lösungsmittels und  $\Phi$  die Fluoreszenzquantenausbeute, wobei die Indices s und u jeweils für den Standard und die unbekannte Probe stehen. Die Messungen erfolgten mit Lösungen gleicher optischer Dichte im Bereich der Anregungswellenlänge.

## 4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Die in den letzten Jahren im Bereich der Biologie erzielten zahlreichen Erkenntnisse haben beträchtlich zum Verständnis von fundamentalen Prozessen des mikroskopischen Lebens beigetragen. Nach dem qualitativen rückt nun vermehrt der quantitative Aspekt jener Vorgänge auf molekularer Ebene in den Fokus der Forschung. Dies zeichnet sich beispielsweise durch das schnelle Aufstreben der Systembiologie ab, deren Ziel darin besteht, durch mathematische Modelle die komplexen Zusammenhänge auf zellulärer Ebene zu beschreiben. Aufgrund dessen können vielfältige Faktoren und Änderungen miteinander in Beziehung gesetzt werden, die letztendlich zum Ausbruch von Krankheiten wie Krebs führen. Zur Validierung derartiger theoretischer Modelle bedarf es entsprechender experimenteller Fähigkeiten, die Vorgänge quantitativ zu beobachten und zu messen. Hierzu bieten sich vor allem fluoreszenzmikroskopische Verfahren an, welche in immer zahlreicheren Forschungsfeldern, aber auch in der Diagnostik, Anwendung finden. In diesem Zusammenhang müssen jedoch die zu untersuchenden Strukturen oder Moleküle eine quantitative Erfassung der Vorgänge ermöglichen.

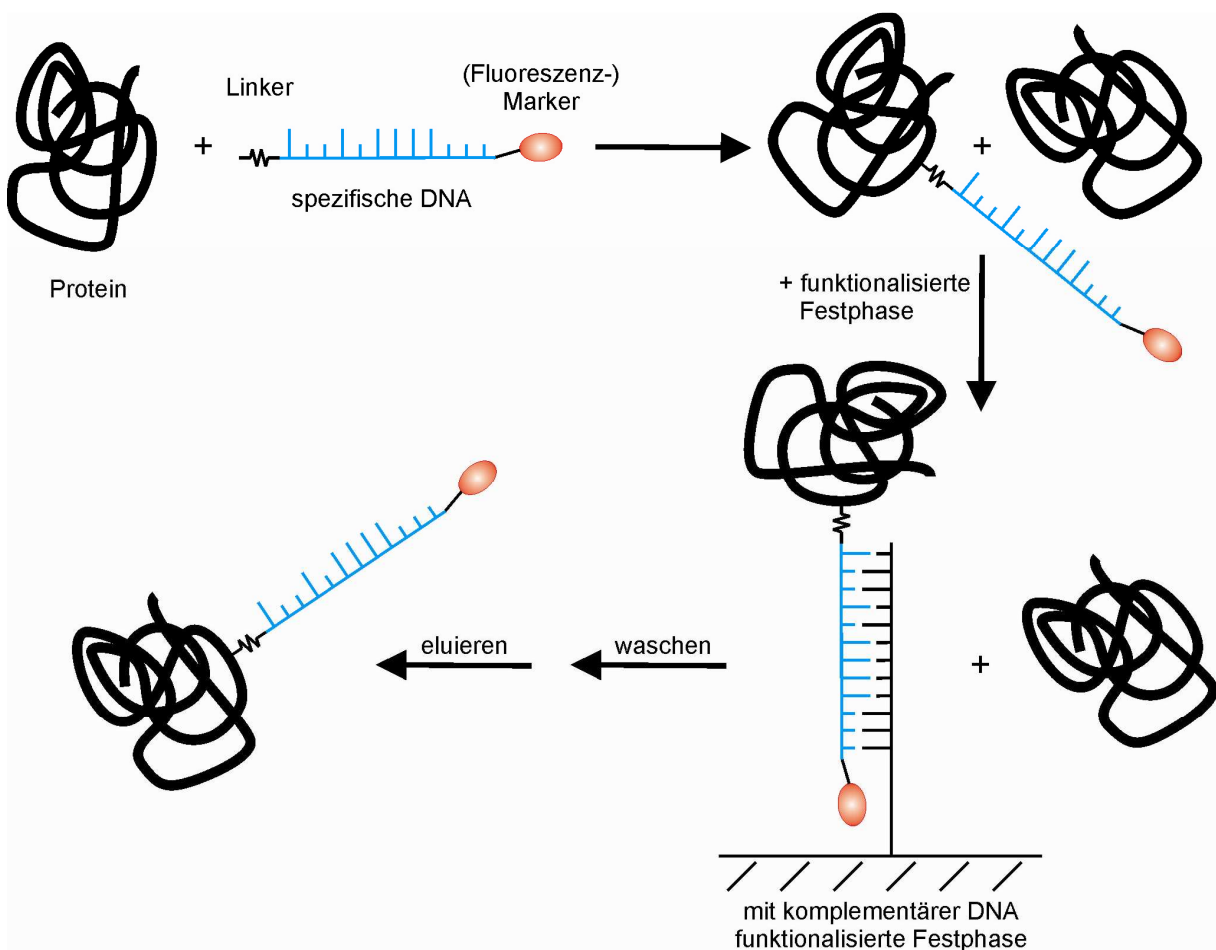
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein proteomweit anwendbares Verfahren zur stöchiometrischen Proteinmarkierung entwickelt werden, welches die Struktur und somit die biologische Aktivität der veränderten Proteine weitgehend erhält. Da speziell im Bereich der posttranslationalen Proteinmodifikation zurzeit noch keine ideale Lösung zur Fluoreszenzmarkierung vorhanden ist, muss mit unzureichend markierten Proben gearbeitet werden. Beispielsweise sind „Kontaminationen“ der Proben mit nicht fluoreszenzmarkierten Molekülen derselben Spezies oder heterogene bzw. unbekannte Markierungsgrade häufig beklagte Limitierungen für fluoreszenzspektroskopische Arbeiten [Hwang 2005; Dillingham 2008]. Es folgen Einschränkungen bei der Dateninterpretation, woraus lediglich grobe Abschätzungen anstelle exakt bestimmter Größen resultieren [Becker 2006; Kosturko 2006].

Des Weiteren ist darauf aufbauend die Anwendung derartig markierter Proteine als Substrate in einem neuartigen einzelmolekülsensitiven Proteasenachweis beschrieben.

Voruntersuchungen während der Entwicklung dieses Nachweisverfahrens offenbarten interessante Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs Dy-520XL, die ihn für die Verwendung in DNA-Sonden qualifizieren (siehe Kapitel 4.6.2).

#### 4.1 Konzept des Verfahrens zur stöchiometrischen Proteinmodifikation

Um das Verfahren zur Herstellung einfach markierter Proteine proteomweit anwendbar zu gestalten, musste die Fluoreszenzmodifikation posttranslational ohne zuvor in das Protein eingeführte Bindungsstellen ermöglicht werden.



**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung des Verfahrens zur stöchiometrischen Einfachmarkierung von Proteinen.

Zur kovalenten Molekülanbindung bietet sich der N-Terminus bzw. die  $\epsilon$ -Aminofunktion der Aminosäure Lysin an, welche wegen ihres hydrophilen Charakters auf der Oberfläche nahezu aller Proteine anzutreffen und damit für Reaktionen zugänglich ist. Da gleichzeitig jedoch mehrere Lysine und damit potentielle Kopplungsstellen vorhanden sind, muss durch eine entsprechende Umsetzungsstöchiometrie der Kopplungspartner - Protein und Modifikation - eine Vermeidung der Mehrfachmarkierung gewährleistet sein.

Daraus resultiert zwangsläufig, dass ein überwiegender Teil des Proteins nicht umgesetzt aus der Reaktion hervorgeht. Die Abtrennung dieser Komponente von den modifizierten Proteinen erfolgt über die simultan mit der Modifikation eingeführte spezifische DNA-Sequenz, welche mittels eines komplementären Stranges eine selektive Anbindung der markierten Proteine an eine Festphase erlaubt. Abbildung 4-1 verdeutlicht den beschriebenen Markierungs- und Aufreinigungsprozess.

Durch Variation der Basenabfolge des Oligonukleotids ist ein für jede Modifikation spezifischer Nukleotidcode erstellbar, der die sequenzielle Einführung und selektive Abtrennung mehrerer Markierungen unabhängig von zuvor eingeführten ermöglicht.

Im Folgenden soll auf die einzelnen Aspekte dieser Methode eingegangen werden.

## **4.2 Markierung von Proteinsubstraten**

### **4.2.1 Markierungsziele**

Im ersten Schritt wird die Markierung, bestehend aus der entsprechenden Modifikation und einer spezifischen DNA-Sequenz, kovalent mit dem Zielprotein verbunden. Die Auswahl der verwendeten Methode fand unter folgenden Gesichtspunkten statt:

- Ausbildung einer stabilen kovalenten Bindung zwischen Protein und Marker
- Reaktion ausführbar in wässriger Lösung mit einem pH-Wert von 5 – 7
- Keine Denaturierung oder Beeinträchtigung der biologischen Aktivität des Zielproteins

- Durchführung möglichst weniger Reaktionsschritte in Anwesenheit des Proteins

Unter den gegebenen Bedingungen stellt die Familie der sogenannten Crosslinker (engl.: Vernetzer) ideale molekulare Bausteine dar, welche speziell für derartige Anwendungen entwickelt wurden. Dies sind Moleküle mit reaktiven Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen Biomoleküle in der gewünschten Art und Weise miteinander verbinden.

#### **4.2.2 Evaluierete Kopplungsstrategien**

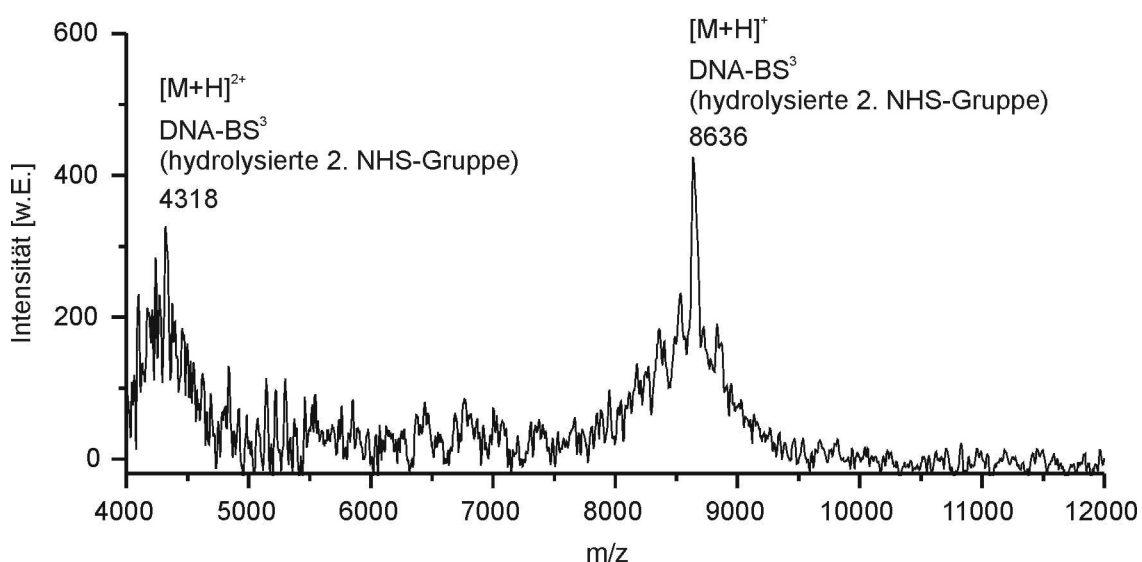
Die in Tabelle 3-8 aufgeführten Vertreter verschiedener Crosslinkerklassen wurden sukzessive auf ihre Eignung bezüglich der vorliegenden Problemstellung untersucht.

##### **Homobifunktionelle Crosslinker**

Die einfachsten Vertreter der Crosslinkerfamilie verfügen über zwei identische reaktive Gruppen, welche über eine als Abstandshalter fungierende Kohlenstoffkette verbunden sind [Hartman 1966]. Zur Anbindung an die Aminogruppen der Lysinseitenketten bzw. des N-Terminus stehen homobifunktionelle NHS-Ester seit Mitte der siebziger Jahre zur Verfügung [Bragg 1975; Lomant 1976; Staros 1982]. Ihr größter Nachteil besteht jedoch darin, dass es durch fortdauernde Proteinverknüpfungen zur Ausbildung von hochmolekularen undefinierten Netzwerken kommen kann [Avrameas 1969]. Zur Vermeidung dieser Art von Nebenreaktionen wurde die Kopplung in zwei Stufen ausgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Anbindung einer NHS-Estergruppe des Crosslinkers an die DNA-Farbstoffverbindung, welche lediglich über eine einzige Aminomodifikation am 5'-Ende der DNA verfügte, womit ein Polymerisieren unmöglich war. Der große molare 40-fache Überschuss von Crosslinker relativ zur DNA-Farbstoffkomponente verhinderte die Bildung verbrückter DNA-Dimere. Nach Abtrennung des nicht angebondenen Vernetzerüberschusses erfolgte im zweiten Schritt die Zugabe des zu markierenden Proteins, an dessen Aminogruppen die zweite NHS-Esterfunktion des Linkers anband.

Die Hydrolyserate des Aktivesters steigt in wässriger Lösung parallel zur Aminreaktivität der Verbindung mit zunehmendem pH-Wert an (bei pH 7,0 und 0 °C

beträgt die Halbwertszeit des NHS-Esters vier bis fünf Stunden [Lomant 1976], bei pH 8,0 und 25 °C eine Stunde [Staros 1988] und bei pH 8,6 und 4 °C nur noch zehn Minuten [Cuatrecasas 1972]). Ein Ausbeuteverlust ist unvermeidlich, da die für die Reaktion notwendigen nicht protonierten Aminogruppen erst im basischen pH-Bereich von 7 - 9 vorhanden sind. Durch die erforderliche zweistufige Reaktionsführung und die dadurch verlängerte Verweilzeit in wässriger Lösung konnte auch unter optimierten Reaktionsbedingungen kein Produkt isoliert werden, womit diese Art der Modifikationsanbindung nicht die erforderlichen Ausbeuten für eine Routineanwendung erbrachte. Abbildung 4-2 zeigt das Massenspektrum der Anbindung eines DNA-Farbstoffmarkers über den Crosslinker BS<sup>3</sup> (Bis[sulfosuccinimidyl]suberat) an das Peptid P1, welches als Modellverbindung für Proteine fungierte.



**Abbildung 4-2:** Massenspektrum des Reaktionsgemisches der Anbindung von farbstoffmarkierter DNA über BS<sup>3</sup> an das Peptid P1. Das Signal bei  $m/z = 8636$  resultiert aus dem an die DNA angebondenen Crosslinker mit hydrolysierte zweite Aktivesterfunktion.

Aus obiger Abbildung geht hervor, dass der erste Schritt der Anbindung des BS<sup>3</sup> an die Aminofunktion der DNA quantitativ verläuft (Masse der DNA  $m/z = 8482$ ), im zweiten Kopplungsschritt die Reaktion der noch vorhandenen NHS-Gruppe mit dem Peptid jedoch nicht erfolgt. Stattdessen hydrolysiert das Aktivesterintermediat zum Abbruchprodukt (Peak bei  $m/z = 8636$ ). Das Massensignal des Produkts DNA-BS<sup>3</sup>-Peptid wird bei  $m/z = 10933$  erwartet.

Die Verwendung von Imidoestern als reaktive Gruppen in homobifunktionellen Vernetzern (eingesetzt wurde **Dimethylsuberimidat** – DMS) anstelle von NHS-Estern erbrachte ebenfalls keine besseren Ausbeuten, da auch hier die Hydrolyse mit dem zweiten Kopplungsschritt konkurriert [Browne 1975].

In einem alternativen Ansatz wurde versucht, die in diesem Fall carboxymodifizierte DNA in wasserfreiem organischem Lösungsmittel zuerst mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid) und Sulfo-NHS zu aktivieren und im Anschluss an das Protein anzubinden [Staros 1986; Grabarek 1990]. Dies scheiterte an der Unlöslichkeit der DNA in sämtlichen organischen Lösungsmitteln, weshalb die Methode nicht weiter verfolgt werden konnte. In einem Lösungsmittelgemisch mit geringem Wasseranteil löste sich die DNA, der Wasseranteil resultierte aber in der zuvor beschriebenen Hydrolyse des aktiven Zwischenprodukts [Hoare 1967].

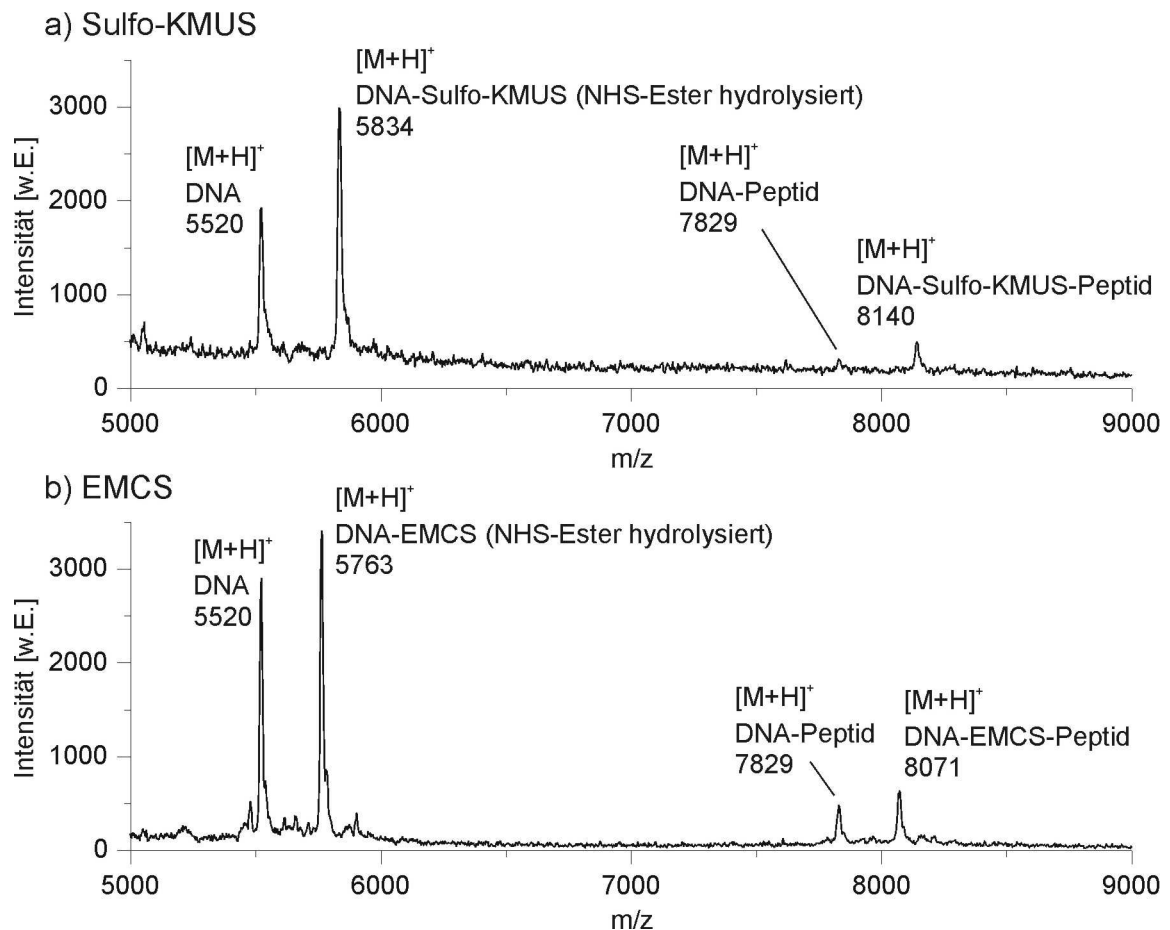
### **Heterobifunktionelle Crosslinker**

Um das Problem der vorzeitigen Hydrolyse der reaktiven Gruppen des verwendeten Vernetzers zu umgehen, wurden heterobifunktionelle Crosslinker mit einem NHS-Ester und einem Maleimid herangezogen. Durch die zwei verschiedenen funktionellen Gruppen ermöglichen sie eine kontrolliertere zweistufige Reaktionsführung verglichen mit den homobifunktionellen Vertretern [Hermanson 2008]. Außerdem können die Reaktionsparameter des ersten Reaktionsschritts derart gewählt werden, dass die andere reaktive Gruppe währenddessen nicht degeneriert. Entgegen der üblichen Vorgehensweise, zuerst den NHS-Ester und danach das Maleimid umzusetzen, wurde die umgekehrte Reihenfolge gewählt. Dies geschah aus mehreren Gründen: zur Anbindung an Proteine sollten weiterhin die Aminofunktionen der Lysinseitengruppen verwendet werden, da Thiole selten auf Proteinoberflächen präsent sind und oftmals fundamentale Bedeutung für deren Struktur und / oder biologische Funktion besitzen [Hermanson 2008]. Bei einer initialen Umsetzung der NHS-Funktion des Crosslinkers mit dem Protein und einer nachfolgenden Reaktion des Maleimids mit thioleffunktionalisierter DNA wäre das Protein zusätzlichen Aufreinigungsschritten zu unterziehen, was dessen Struktur bzw. Funktionalität beeinträchtigt (siehe hierzu Kapitel 4.3.7 Aktivität markierter Enzyme). Außerdem könnte man neben der ebenfalls bei Maleimiden auftretenden



Hydrolyse eine Proteinpolymerisation durch die freien Thiolgruppen nicht ausschließen.

Da Maleimide im pH-Bereich von 6,5 – 7,5 reagieren [Smyth 1964; Partis 1983], konnte durch Ausführen der Reaktion in leicht saurer Lösung bei pH 6,8 die Halbwertszeit der NHS-Funktion stark verlängert werden [Grumbach 1991]. Abbildung 4-3 a) zeigt das Massenspektrum des Rohprodukts der Umsetzung aminomodifizierter DNA mit Sulfo-KMUS (*N*-[**k**-Maleimidoundecanoyloxy]sulfo-succinimidester) bei pH 6,8 und nachfolgende Reaktion des via *Spin Column* aufgereinigten Addukts mit Peptid P1 bei pH 8,6.



**Abbildung 4-3:** Spektren der Umsetzung thiolmodifizierter DNA mit heterobifunktionellem Crosslinker EMCS (a) bzw. Sulfo-KMUS (b) und anschließende Anbindung an Peptid P1. Zuordnung der Signale: a) 5520: DNA; 5834: DNA-Sulfo-KMUS, NHS-Ester hydrolysiert; 7829: DNA-Peptid; 8140: DNA-Sulfo-KMUS-Peptid; b) 5520: DNA; 5763: DNA-EMCS, NHS-Ester hydrolysiert; 7829: DNA-Peptid; 8071: DNA-EMCS-Peptid.

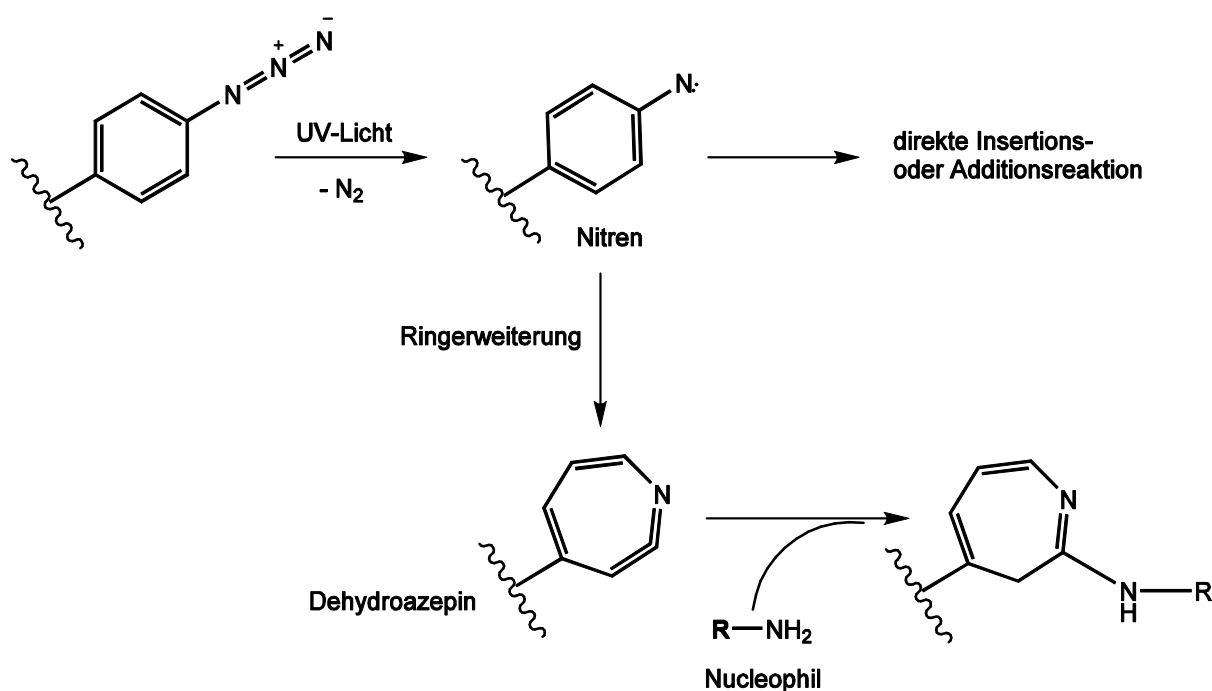
In Abbildung 4-3 b) ist die gleiche Reaktion mit dem Vernetzer EMCS ([N-**e**-Maleimidocaproyloxy]succinimidester) anstelle von Sulfo-KMUS dargestellt.

Wie aus dem Signal der nicht umgesetzten DNA bei  $m/z = 5520$  in den Maldispektren hervorgeht, erfolgt die initiale Maleimidanbindung nicht quantitativ, obwohl der jeweilige Crosslinker in 500-fachem molarem Überschuss bei 1,5 h Reaktionszeit zugesetzt wurde. Die Signale bei  $m/z = 5837$  bzw.  $5763$  sind dem jeweiligen DNA-Crosslinker-Addukt mit hydrolysierter NHS-Funktion zuzuordnen. Die Peaks bei  $m/z = 8140$  bzw.  $8071$  gehören zu den beabsichtigten Kopplungsprodukten aus DNA, Vernetzer und Peptid, wohingegen das in beiden Spektren vorkommende Signal von  $m/z = 7829$  aus einer direkten Verknüpfung der DNA mit dem Peptid resultiert. Zur Unterbindung derartiger Nebenreaktionen und zur Erhöhung der initialen Kopplungsausbeute wurde TCEP (Tris[2-**carboxyethyl**]-**p**hosphin-Hydrochlorid) als Disulfidreduktionsmittel zugesetzt. Dabei kam es neben der erwarteten Wirkung zu einer negativen Beeinflussung der Produktbildung. Durch Variation verschiedener Reaktionsparameter (pH-Wert, Reaktionszeit, Konzentrationen, Stöchiometrie, Methode der Zwischenaufreinigung) konnte ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Ausbeute bzw. Unterdrückung der erwähnten Nebenreaktionen erzielt werden.

### **Photoreaktive heterobifunktionelle Crosslinker**

Um die Hydrolyseprobleme, welche bei den Reaktionen der homo- und heterobifunktionellen Crosslinker auftraten, zu unterbinden, wurden mit UV-Licht aktivierbare heterobifunktionelle Crosslinker eingesetzt. Sie zeichnen sich neben einer konventionellen funktionellen Gruppe durch eine latent aktive Gruppe aus, welche erst durch Einwirkung von UV-Licht aktiviert wird und somit zuvor nicht abreagieren kann [Gilchrist 1969; Smith 1973]. Als herkömmliche reaktive Gruppe fanden NHS-Ester Verwendung, da diese in den zuvor durchgeführten Experimenten die besten Resultate erbrachten. Als photolabile Gruppen erwiesen sich Phenylazide (N-**S**uccinimidyl-6-(4'-**azido**-2'-**nitrophenylamino**)-**h**exanoat - SANPAH) als geeignet, da die Umsetzung bei Vorversuchen am Vielversprechendsten verlief. Sie sind unter wässrigen Bedingungen stabil und durch langwelliges UV-Licht jenseits von 300 nm aktivierbar [Wood 1985; Bomgarden 2008], womit Wechselwirkungen des Lichts mit im Spektralbereich von 250 - 300 nm absorbierenden Biomolekülen minimiert werden.

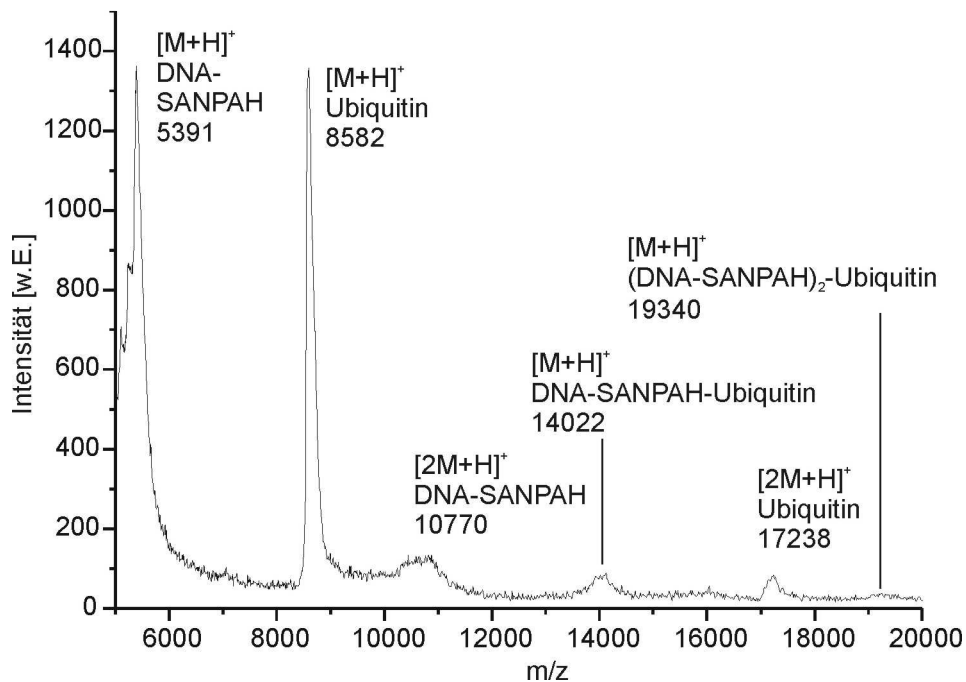
Nach quantitativer DNA-Umsetzung mit einem Vernetzerüberschuss und Abtrennung des überschüssigen Crosslinkers erfolgte durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 320 - 350 nm unter Stickstoffabspaltung die Bildung eines Nitrenintermediates [Schrock 1984]. Wie in Abbildung 4-4 dargestellt, vollzieht sich meist statt einer intermolekularen Reaktion unter Ringexpansion eine Umlagerung zum stabileren Dehydroazepin [Liang 1987; Li 1988]. Anstelle einer unselektiven Insertion in eine C-H-Bindung reagiert dieses nukleophile Intermediat bevorzugt mit Aminen [Buchmüller 2003].



**Abbildung 4-4:** Reaktionswege von Phenylaziden nach Photoaktivierung.

Abbildung 4-5 zeigt das Massenspektrum der SANPAH-verbrückten Anbindung aminomodifizierter DNA an Ubiquitin, einem globulären, aus lediglich 76 Aminosäuren bestehenden Protein. Durch seine geringe Masse von 8,5 kDa ist das Molekül mittels Maldi-Tof-Massenspektrometrie noch als Ganzes ionisier- und somit detektierbar. Das Kopplungsprodukt aus SANPAH-aktivierter DNA und Ubiquitin erzeugt ein Signal bei  $m/z = 14022$ . In geringem Maße wurde das zweifach markierte Ubiquitin bei  $m/z = 19340$  registriert, obwohl in dieser Reaktion das molare Verhältnis DNA:Protein nur bei zwei lag.

Im weiteren Verlauf der Experimente stellte sich heraus, dass einige Fluoreszenzfarbstoffe durch die UV-Lichtexposition zerstört werden. Zudem erwies sich die photoaktivierbare Kopplungsreaktion aufgrund der stark schwankenden Ausbeuten als eingeschränkt reproduzierbar, womit eine exakte Reaktionsführung und somit eine kontrollierte Produktstöchiometrie nicht zuverlässig zu generieren war. Da dies aber eine Grundvoraussetzung zur Herstellung einfach markierter Proteine ist, musste eine alternative Kopplungsmethode herangezogen werden.



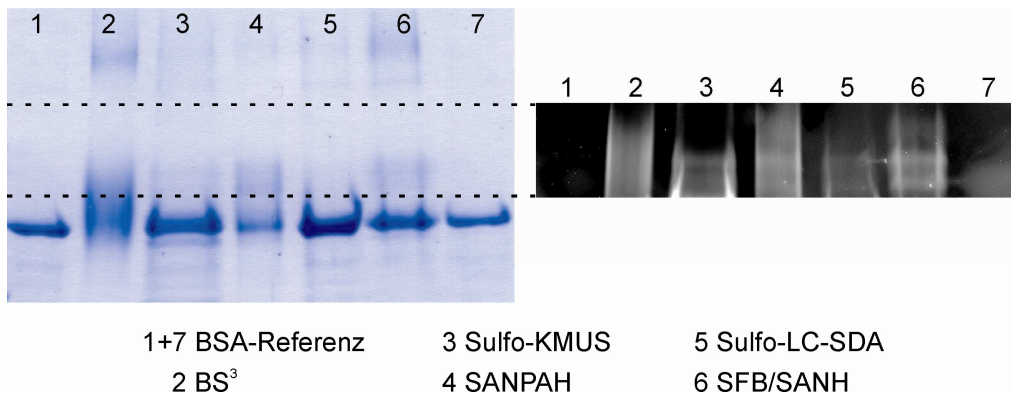
**Abbildung 4-5:** MALDI-Spektrum des Reaktionsgemisches der DNA-Anbindung an Ubiquitin via SANPAH. Neben den Molekülionenpeaks von DNA-SANPAH ( $m/z = 5391$ ), Ubiquitin ( $m/z = 8582$ ), DNA-SANPAH-Ubiquitin ( $m/z = 14022$ ) und dem zweifach DNA-markierten Ubiquitin ( $m/z = 19340$ ) sind die Dimersignale von DNA-SANPAH ( $m/z = 10770$ ) und Ubiquitin ( $m/z = 17238$ ) zu sehen. Aufgrund der hohen Massen und der vielfältigen Gegenionen werden die einzelnen Peaks nicht aufgelöst, sondern lediglich als breite Signale detektiert.

### **Chemoselektive heterobifunktionelle Crosslinker**

Normalerweise zielen die für Biokonjugationen entwickelten Reaktionen darauf ab, mit Biomolekülen und deren funktionellen Gruppen zu interagieren. In manchen Fällen ist es jedoch erwünscht, zwei spezifische Moleküle ohne potentielle Nebenreaktionen mit anderen Biomolekülen zu verknüpfen. Für derartige Reaktionen, in denen eine funktionelle Gruppe spezifisch mit einer anderen ohne Nebenreaktionen in wässriger Lösung oder in Gegenwart von Biomolekülen reagiert, hat sich der Begriff „chemoselektive Ligation“ etabliert [Lemieux 1998]. Obwohl die Vielfalt an biologischen Molekülen und Funktionalitäten naturgemäß wenige Möglichkeiten zur Realisierung derartiger Paare bioorthogonaler Reagenzien erlaubt, wurden einige Systeme entwickelt, für die die Begriffe chemoselektiv und bioorthogonal in unterschiedlichen Abstufungen zutreffen. Als prominente Vertreter seien hier Diels-Alder-Reaktionen [Hill 2001; de Araújo 2006], Staudingerligationen [Saxon 2000; 2006], (kupferkatalysierte) Azid-Alkin-[3+2]-Cycloadditionen [Rostovtsev 2002; Link 2004; Agard 2006] und Hydrazin-Aldehyd-Kopplungen [Schwartz 1993; Kozlov 2004] genannt.

In dieser Arbeit fand das eine Hydrazin-Aldehyd-Kopplung eingehende Vernetzerpaar SFB (**S**uccinimidyl-4-**f**ormyl**b**enzoat, Benzaldehydkomponente) und SANH (**S**uccinimidyl-4-**h**ydrazin**o**nicotinat **A**ceton **H**ydrazon; Hydrazinkomponente) Verwendung. Es ist im Gegensatz zu einigen anderen bioorthogonalen Crosslinkern unter physiologischen Bedingungen anwendbar und als NHS-Ester aktivierte Verbindungen kommerziell verfügbar. Bedingt durch die aromatische Konjugation der reaktiven Gruppen verläuft die Reaktion effizient und chemoselektiv ohne Nebenreaktionen mit anwesenden biologischen funktionellen Gruppen [Kozlov 2004].

Abbildung 4-6 zeigt den direkten Ausbeutevergleich der DNA-Proteinkonjugationen mit Verwendung unterschiedlicher Crosslinker. Die Reaktionen fanden unter den jeweils für die spezifische Umsetzung passendsten Bedingungen statt und stehen im Einklang mit den in vorherigen Kopplungsversuchen erzielten Ergebnissen. Als Substratprotein wurde in allen Ansätzen 0,1 nmol BSA verwendet. Die mit dem jeweiligen Verknüpfungsreagenz aktivierte DNA Substrat\_B-Atto 520 war in zehnfachem Überschuss relativ zur BSA-Menge vorhanden.

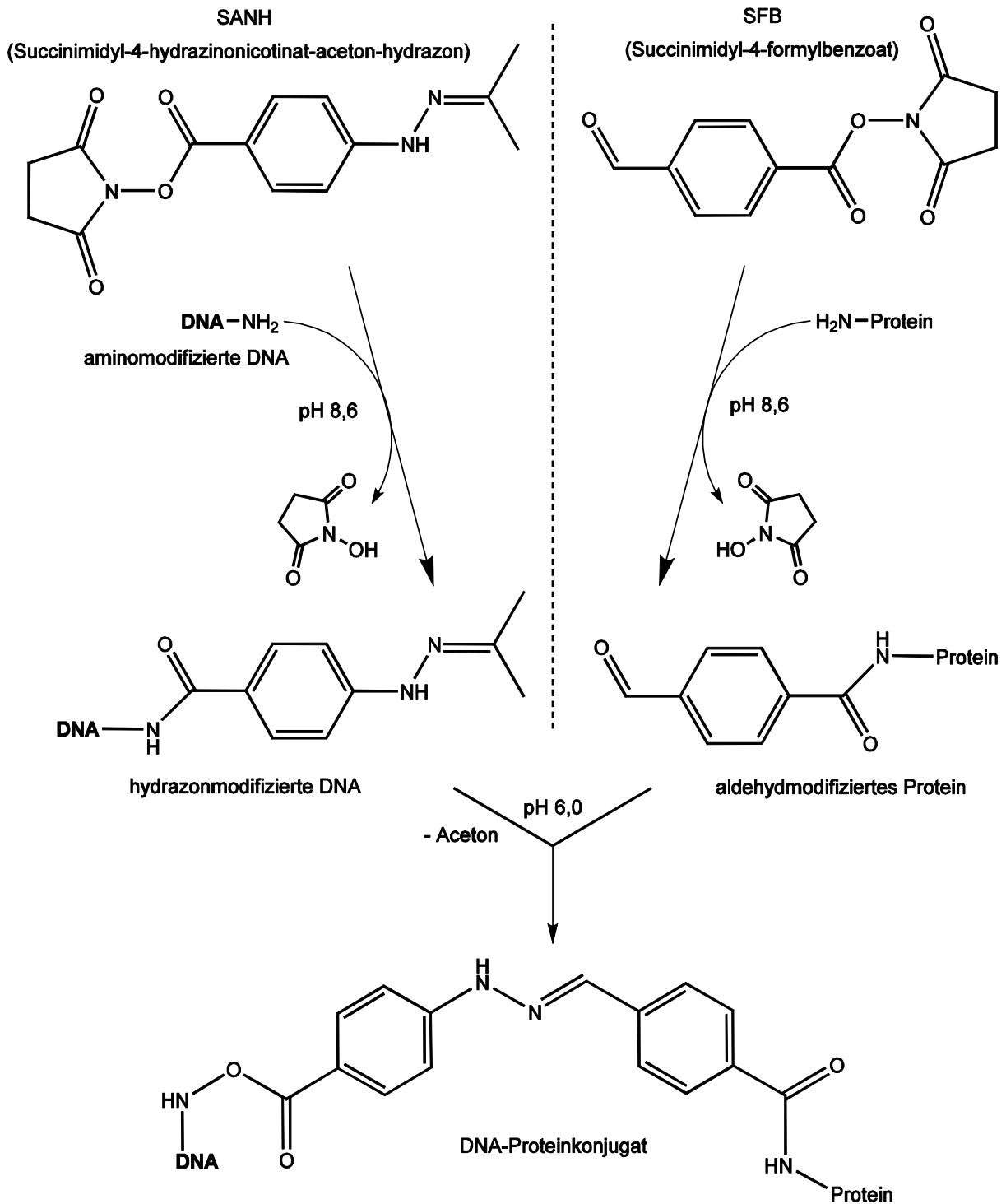


**Abbildung 4-6:** links Coomassianfärbung und rechts Fluoreszenzaufnahme in invertierter Farbdarstellung des SDS-PAGE-Gels der Reaktionsprodukte der DNA-BSA-Konjugation unter Verwendung verschiedener Crosslinker bei entsprechenden Reaktionsbedingungen und gleicher Stöchiometrie. Das Verhältnis aktivierter DNA:BSA betrug in allen Ansätzen zehn zu eins. Auf das Gel wurde jeweils die Hälfte der Ansätze aufgebracht.

Bei der SFB-SANH-Anbindung erfolgte im ersten Schritt die Umsetzung von SFB mit BSA ebenfalls in diesem molaren Verhältnis. Im Fall der Sulfo-KMUS-Aktivierung kam ein thiolmodifiziertes Analogon der DNA zum Einsatz. Über den Banden des unmarkierten BSA, die auf der Höhe der Referenzproben eins und sieben lokalisiert sind, liegen in der Spur der SFB-SANH-Kopplung die beiden klar umgrenzten Banden des einfach und doppelt markierten BSA. In den äquivalenten Bereichen der anderen Konjugationen sind zwar ebenfalls Fluoreszenzsignale detektiert, jedoch schwach ausgeprägt (drei und fünf) bzw. deutlich diffuser, was auf Nebenreaktionen hindeutet. Aus dem Vergleich der Coomassi- mit Fluoreszenzaufnahmen der Laufstrecken zwei und drei folgt, dass die hier ausgelesene Fluoreszenz unspezifischen Ursprungs sein muss, da die zugehörige Coomassianfärbung nicht mit ihr korreliert. Einzig die SANPAH-Markierung (vier) weist zwar diffuse, aber erkennbare Produktbanden auf, die mit denen der Spur sechs vergleichbare Intensitäten besitzen. Aus oben genannten Gründen ist die Kopplungsmethode via SFB und SANH dennoch überlegen und vorzuziehen.

### 4.2.3 SANH-SFB-Kopplung

Eine zur Durchführung von Kopplung und Aufreinigung praktikable Ansatzgröße liegt im Bereich von 0,1 bis fünf nmol Protein als Anfangsmenge. Abbildung 4-7 zeigt den Ablauf der Kopplung. Die Anbindung von SANH an die aminomodifizierte DNA und SFB an das Protein via NHS-Ester geschehen unabhängig voneinander in getrennten Reaktionen innerhalb von zwei Stunden in 0,2 molarem Carbonatpuffer bei pH 8,6. Bei der DNA-Modifikation wird SANH in 40-fachem Überschuss bezogen auf das Oligonukleotid eingesetzt, um eine quantitative Umsetzung zu erreichen. Im Fall der Proteinumsetzung ist das SFB-Protein-Verhältnis der entscheidende Parameter. Durch eine sorgfältige Einstellung lässt sich eine möglichst große Menge einfachmarkierter Proteine erzielen ohne jedoch mehrfach konjugierte Proteinspezies zu generieren (s.u.). Nach Abtrennung nicht umgesetzter Vernetzer mittels Gelfiltration erfolgt durch Vereinigung der Ansätze in 0,5 M Citratpuffer bei pH 6,0 die DNA-Proteinkonjugation durch Ausbildung des Hydrazons. Die Kopplungsreaktion läuft in zwölf Stunden bei Raumtemperatur ab. Zur vollständigen Absättigung aller Aldehydfunktionen erfolgt die Zugabe der DNA in fünffachem Überschuss. Eine alle Schritte abdeckende Versuchsvorschrift findet sich im Anhang dieser Arbeit.

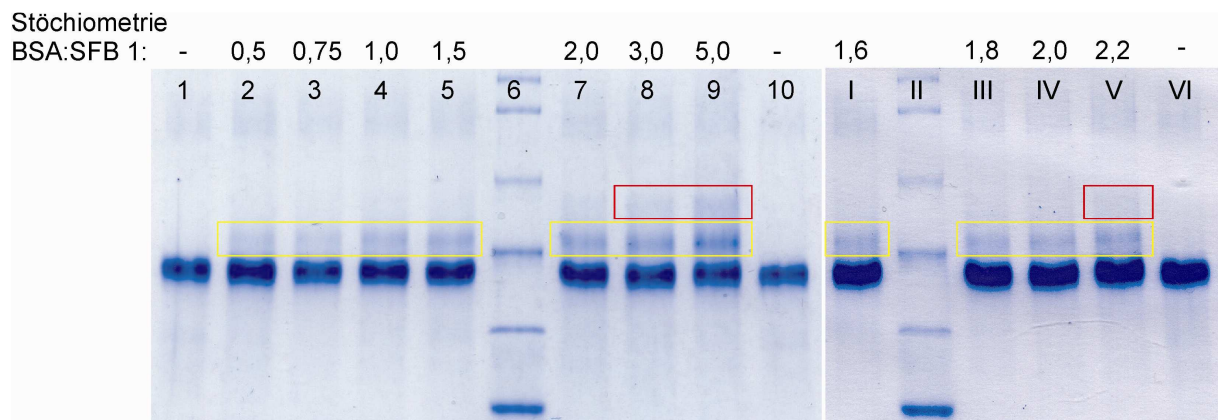


**Abbildung 4-7:** Mechanismus der DNA-Proteinkonjugation mittels Hydrazin-Aldehyd-Kopplung des Vernetzpaars SFB und SANH.



### Stöchiometrie der Protein-SFB-Umsetzung

Kopplungsausbeute und Markierungsgrad sind abhängig von der Umsetzungsstöchiometrie der SFB-Aktivierung des Proteinsubstrats und der nachfolgenden Reaktion mit der SANH-aktivierten DNA. Generell ließen sich diese Merkmale auch über den zweiten Schritt steuern, Ausbeute und Markierungsgrad wären dann allerdings von zwei Faktoren abhängig und demzufolge der Prozess entsprechend anfälliger. Zudem blieben nach erfolgter Auftrennung der nicht markierten Proteinfraktion SFB-modifizierte Proteine zurück, was für eine weitere Verwendung dieses Teils nachteilig wäre. Aus diesen Gründen fand die Einstellung der Stöchiometrie im ersten Kopplungsschritt und die zweite Umsetzung durch Zugabe eines fünffachen DNA-Überschusses quantitativ statt. Abbildung 4-8 stellt die Ergebnisse des entsprechenden Experimentes zur Ermittlung desjenigen Verhältnisses von SFB:Protein dar, welches eine maximale Ausbeute einfach DNA-markierter Proteinsubstrate hervorbringt ohne zusätzlich mehrfachmarkierte Proteine zu generieren.



**Abbildung 4-8:** Coomassiegefärbte SDS-PAGE-Gele für die Determinierung der geeignetsten SFB-Proteinkopplungsstöchiometrie zur Generierung eines Maximums einfach markierter Proteine am Beispiel von BSA. Nach Aktivierung wurde SANH-modifizierte DNA Substrat\_B in identischen Mengen und zehnfachem molaren Überschuss relativ zu BSA zugegeben, welche die Detektion des Produkts in einer aufgrund der größeren Masse verschobenen Bande ermöglicht. Damit erscheinen die Banden einfach markierten BSAs (gelbe Kästen) und mit zunehmender SFB-Menge auch Banden zweifach markierten Substrats (rote Kästen).

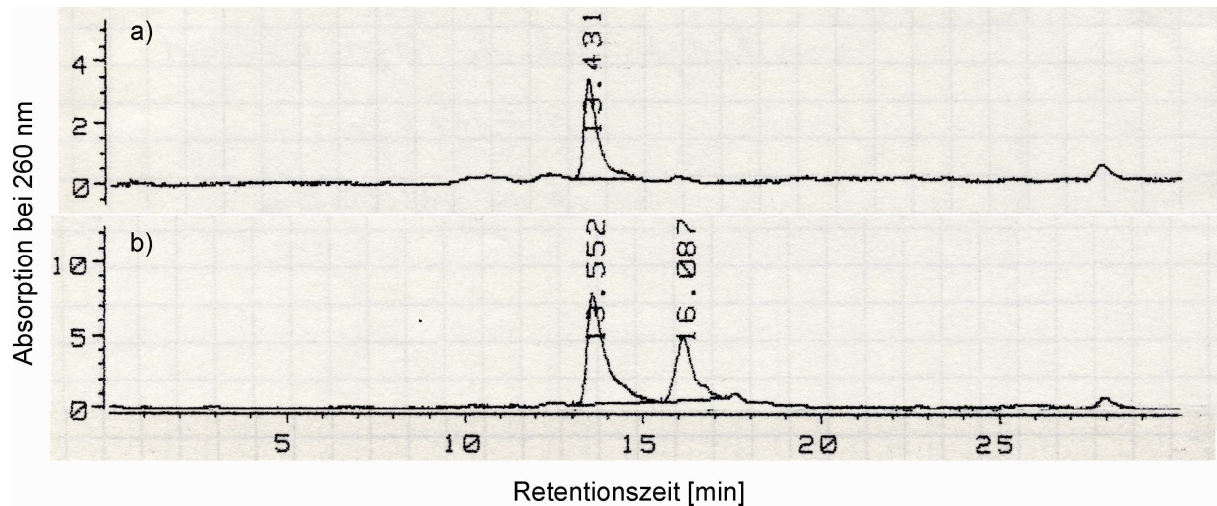
Wie aus Abbildung 4-8 hervorgeht, nimmt erwartungsgemäß die Kopplungsausbeute mit steigendem SFB:BSA-Verhältnis zu, wobei ab einem Wert von 2,2 auch zweifach markiertes BSA in einer darüber zu erkennenden Bande (rote Kästen) entsteht. Der hohe Wert von 2,0 für die Maximalumsetzung kann damit begründet werden, dass ein nicht unerheblicher Teil des SFB während der Kopplungsreaktion an das Proteinsubstrat durch Hydrolyse seines NHS-Esters nicht mehr an das Protein anbinden kann.

Aufgrund der geforderten Stöchiometrie bewegt sich die Ausbeute nach Kopplung und Aufreinigung in Abhängigkeit des verwendeten Substratproteins im Bereich von drei bis fünf Prozent. Da der Großteil unverändert aus der Reaktion hervorgeht, kann er für weitere Konjugationsreaktionen eingesetzt werden. Dies ist von Bedeutung, da das Protein in vielen Fällen nur in sehr begrenzten Mengen zur Verfügung steht, aufwändig zu isolieren oder teuer ist. Treffen diese Attribute auf das Protein nicht zu, so kann zur Steigerung der Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge farbstoffmarkierter DNA das Konzentrationsverhältnis während des zweiten Reaktionsschritts, der Hydrazonbildung, getauscht, das Protein also im Überschuss eingesetzt werden. Da die Hydrazingruppe des SANH im Vergleich zum Aldehyd des SFB-Linkers die instabilere Funktionalität darstellt, sind bei einem inversen Ansatz auch die Vernetzer zu tauschen. Deshalb versetzt man im ersten Schritt die DNA mit einem 40-fachen SFB-, das Protein mit einem zweifachen SANH-Überschuss und lässt im zweiten Schritt die aktivierte DNA mit der 20-fachen Menge SFB-modifizierten Substratproteins reagieren. Damit können bis zu 20 % der eingesetzten DNA-Menge umgesetzt werden.

### **Stabilität der kovalenten Anbindung**

Die Stabilität der nach obiger Methode erzeugten kovalent markierten Proteine ist ein wichtiger Faktor für die Anwendung derartiger Substrate in nachfolgenden Messungen. Um quantitative Aussagen treffen zu können, ist es unumgänglich, dass sich die aufgereinigten Konjugate nicht zersetzen. Zu diesem Zweck wurde derartig modifiziertes BSA für vier Monate in PBS pH 7,4 bei 4 °C gelagert. Nach dieser Frist erfolgte die HPLC-Auftrennung der Lösung via Größenausschlusschromatographie zur Detektion vorhandener degenerierter Proteinfragmente und freigesetzter DNA. In

Abbildung 4-9 ist das entsprechende Chromatogramm (a) zusammen mit dem Chromatogramm einer Vergleichsprobe (b) wiedergegeben.



**Abbildung 4-9:** a) Chromatogramm der Größenausschlussauftrennung von BSA-Substrat\_B-Atto 520 nach viermonatiger Lagerung in PBS pH 7,4 bei 4 °C und b) eines Vergleichslaufs. Dessen Signal bei der Retentionszeit von 16 min resultiert aus nicht angebundener DNA. Aufgrund der Trenncharakteristik der Größenausschlusssäule eluieren bei dieser Retentionszeit unter den gegebenen Bedingungen alle Stoffe mit einem Molekulargewicht kleiner als 15 kDa, das markierte BSA hingegen bei 13,5 min.

Die Vergleichsprobe enthielt neben dem konjugierten BSA zusätzlich freie DNA, welche aufgrund des effektiven Trennbereichs der verwendeten Größenausschlusssäule zusammen mit niedermolekularen Substanzen eluierte. Unter den gegebenen Bedingungen erzeugen sie ein Signal bei 16 min, wie aus Chromatogramm b) ersichtlich. Im Vergleich dazu weist die Lösung des vier Monate gelagerten BSA-Substrat\_B-Atto 520 lediglich den zugehörigen Peak bei 13,5 min auf, jedoch keinen bei 16 min. Das zeigt, dass die Markierung auch nach viermonatiger Verweilzeit in Lösung noch kovalent an das Substrat gebunden ist und keine Degeneration eingesetzt hat. Das Ergebnis steht in Einklang mit den in der Literatur beschriebenen entsprechenden Beobachtungen [Kozlov 2004; Hermanson 2008].

### Wechselwirkung der fluoreszenten DNA-Markierung mit dem Protein

Bedingt durch ihren Aufbau aus konjugierten Aromaten stellen organische Fluoreszenzfarbstoffe hydrophobe Moleküle dar, die bei Proteinanbindung mit deren teils ebenfalls hydrophoben Strukturen wechselwirken. Deutliche Anzeichen derartiger Vorgänge sind die verbreitet zu beobachtende Helligkeits- oder Rotationsfähigkeitsänderung von Fluorophoren bei Proteinanbindung bedingt durch die geänderte chemische Umgebung. Als unerwünschte Effekte können für das Protein lokale Strukturänderungen und folglich verminderte biologische Aktivität oder geändertes Bindungsverhalten auftreten. Die Anwesenheit hydrophiler DNA kann diesen Effekten entgegenwirken. Durch Verwendung eines DNA-Strangs im Zuge der Fluoreszenzmarkierung und die daraus resultierende räumliche Trennung von Fluorophor und Protein wurde als zusätzlicher positiver Nebeneffekt jener Markierungsmethode eine Minderung der Farbstoff-Protein-Interaktion erwartet.

Um einen diesbezüglichen Effekt nachzuweisen, eignen sich Fluoreszenzanisotropiemessungen. Die statische Anisotropie  $\bar{A}$  berechnet sich nach

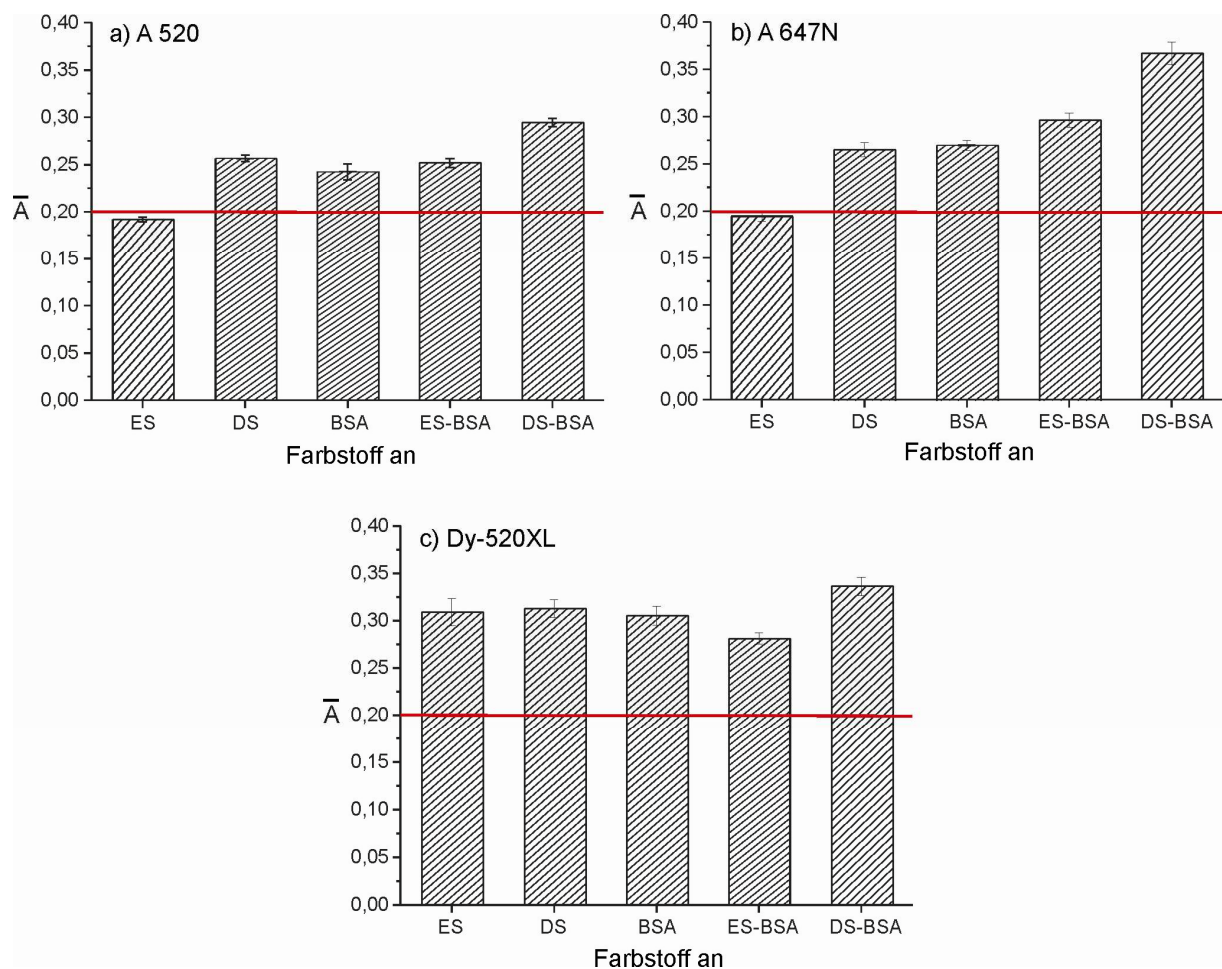
$$\bar{A} = \frac{\bar{I}_{\parallel} - \bar{I}_{\perp}}{\bar{I}_{\parallel} + 2\bar{I}_{\perp}} \quad (4.1)$$

und nimmt Werte zwischen null für völlig uneingeschränkt rotierbare und 0,4 für nicht rotierende Fluorophore an [Cantor 1980]. Da die theoretischen Extremwerte nicht gemessen werden, bezeichnet man Moleküle mit Anisotropiewerten kleiner als 0,2 als frei rotierbar, Stoffe mit Werten darüber entsprechend als rotatorisch gehindert. Hierbei symbolisieren  $\bar{I}_{\parallel}$  und  $\bar{I}_{\perp}$  die unter linear polarisierter Anregung gemessene Fluoreszenzintensität parallel bzw. orthogonal polarisiert zur Anregungsebene.

Somit lässt sich bestimmen, ob der Farbstoff des DNA-Farbstoffkonstrukts, welches kovalent an das Protein gebunden ist, wie erwartet solvatisiert und nicht an der Proteinoberfläche adsorbiert vorliegt. Bei vorhandenen Wechselwirkungen entspricht die Rotationsgeschwindigkeit des Farbstoffmoleküls der des um Größenordnungen voluminöseren Proteins und ergibt folglich einen Anisotropiewert über 0,2. Ohne derartige Interaktionen und bedingt durch die Anbindung über flexible Kohlenstoffketten ist die Drehbarkeit des Fluorophors hingegen nicht eingeschränkt, was sich

folglich in gesteigerter Rotationsgeschwindigkeit und kleineren Anisotropiewerten niederschlägt. Die inkorporierte DNA sollte diesen Effekt verstärken.

Entsprechenden Messungen, bei welchen der Fluorophor jeweils unterschiedlich gebunden vorlag, ergaben jedoch ein anderes Bild, wie aus Abbildung 4-10 hervorgeht. Um die Auswirkung der Proteinkonjugation erkennen zu können, wurden Proben miteinander verglichen, bei denen der Farbstoff nur an einzel- (ES) bzw. doppelsträngige (DS) DNA, direkt an das Protein und via einzel- oder doppelsträngige DNA an das Protein gekoppelt vorlag.



**Abbildung 4-10:** Anisotropiewerte der drei Fluoreszenzfarbstoffe **a)** A 520, **b)** A 647N und **c)** Dy-520XL, jeweils gebunden an einzel- (ES), doppelsträngige DNA (DS), BSA sowie über einzel- bzw. doppelsträngige DNA an BSA (ES-BSA bzw. DS-BSA). Anregung und Emissionsdetektion erfolgten an den Intensitätsmaxima.

Diese Messungen fanden jeweils mit den drei Farbstoffen Atto 520, Atto 647N und Dyomics 520XL statt, welche auch als Markierungsbestandteile eingesetzt wurden. Wie erwartet ergaben sich für direkt an das Protein gebundene Farbstoffe, resultierend aus den bestehenden Wechselwirkungen, Werte über 0,2. Im Fall von mit A 520 und A 647N markierter einzelsträngiger DNA lagen die Werte mit 0,192 für A 520 und 0,195 für A 647N etwas unter der Grenze von 0,2 und sprachen somit für frei bewegliche Farbstoffe, was sich jedoch bei Hybridisierung der DNA mit dem Gegenstrang änderte. Hier interagieren die beiden Fluorophore deutlich stärker mit dem Biomolekül. Im Gegensatz zu den Werten der Einzelstränge zeigte die Anisotropie auch via Oligonukleotide an BSA gebundene Farbstoffe mit 0,252 (A 520) und 0,296 (A 647N) Werte über 0,2, welche sich zudem in der Größenordnung der jeweils direkt farbstoffmarkierten Proben bewegten. Das sprach dafür, dass trotz der zur Anbindung verwendeten DNA die Farbstoffmoleküle dennoch auf der Proteinoberfläche adsorbierten. Andernfalls sollten die Anisotropien denen der Einzelstrangproben entsprechen. Durch Hybridisierung des protein-gebundenen Oligonukleotids mit dem Gegenstrang kam es in allen Fällen erneut zu einer deutlichen Erhöhung der Anisotropie. Als Ursache lässt sich der durch den rigiden Doppelstrang vergrößerte Durchmesser der Hydrathülle anführen, welcher die Rotationsbewegung zusätzlich verlangsamt.

Für die mit Dy-520XL markierten Proben ergaben sich in sämtlichen untersuchten Konfigurationen Anisotropien der Größenordnung von 0,3 und indizieren somit das Vorhandensein entsprechender Farbstoffadsorptionen auf den Biomolekülen. Die Ursache für die Wechselwirkungen liegt in der hydrophoben Molekülstruktur. Dementsprechend weist sein Löslichkeitsverhalten verglichen mit den anderen beiden Fluorophoren einen hydrophoberen Charakter auf.

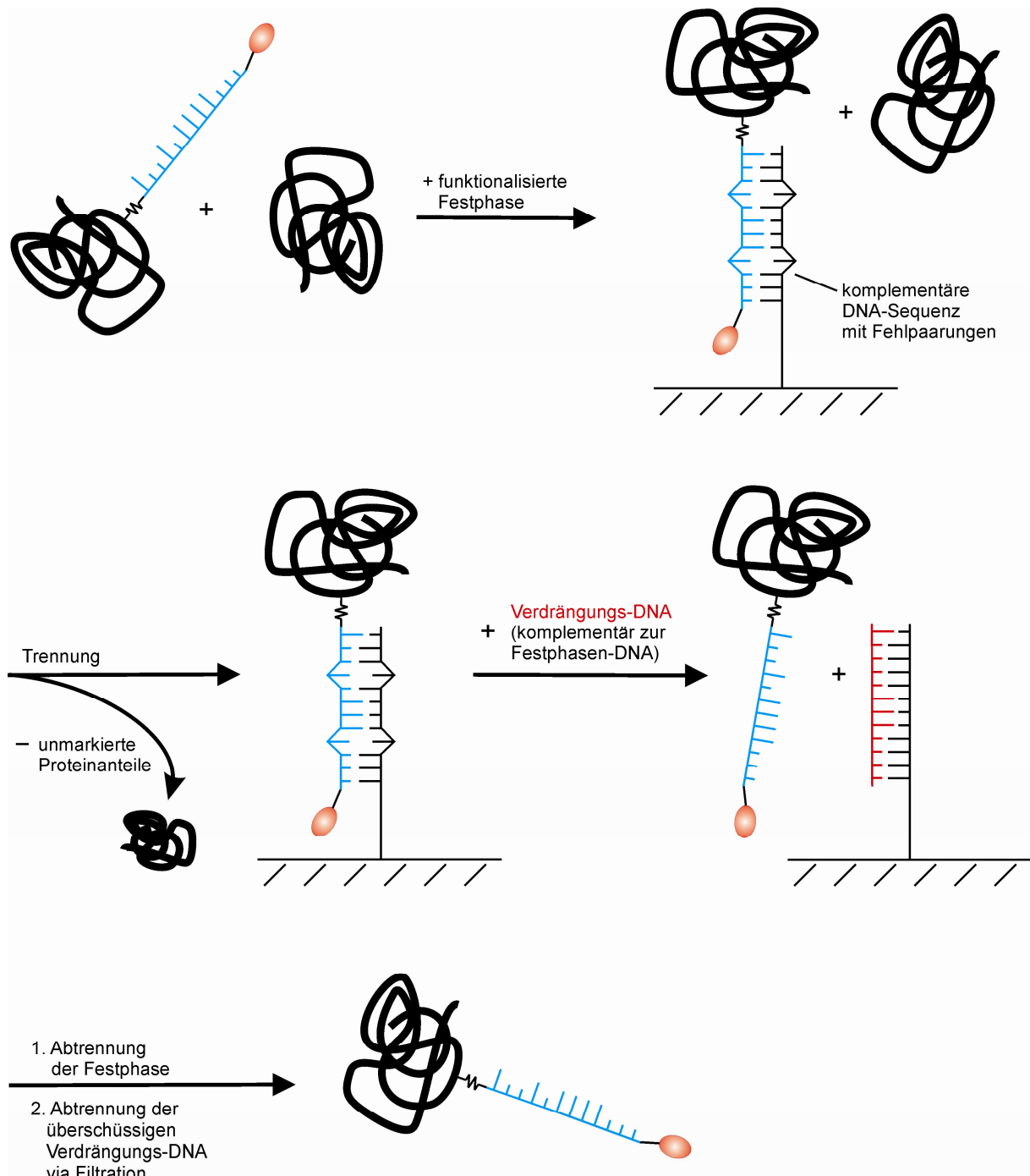
### 4.3 Aufreinigungssystem

Derzeit verfügbare Standardmethoden der Proteinaufreinigung bieten kein universell anwendbares Verfahren zur Trennung farbstoffmarkierter von nicht markierten Proteinen unter Erhalt ihrer nativen Struktur bzw. Funktionalität. Durch die im Vergleich zu Proteinen geringe Masse organischer Fluorophore ist eine Separation über Größenausschlusschromatographie nicht möglich. Trennmethode wie die **Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**, welche sich der durch Farbstoffmarkierung geänderten Proteinoberflächenpolarität zur Isolierung bedienen, können eine Abscheidung der markierten Bestandteile realisieren. Aufgrund der Vielfältigkeit und Heterogenität der vorhandenen Proteinstrukturen ist diese Technik jedoch nicht uniform anwendbar, sondern muss für jedes Substratprotein gezielt angepasst werden. HPLC-basierte Trennmethode, welche die benötigten Trennleistungen erbringen, zerstören hingegen die Proteinstruktur.

Im vorherigen Abschnitt 4.2 wurde eine Methode beschrieben, mit der beliebige Proteine mit Farbstoffen oder anderen Markierungen stöchiometrisch modifizierbar sind. Die hierbei simultan eingeführte Oligonukleotidsequenz erlaubt eine selektive Anbindung der markierten Proteine und ermöglicht somit die strukturkonservierende Abtrennung vom nicht markierten Proteinanteil. Aufgrund dessen eignen sich die erhaltenen Substratproteine für quantitative Messungen und Experimente, speziell in Konzentrationen auf Einzelmolekülniveau.

Aufbau und Funktionsweise sowie Charakterisierung der entwickelten Aufreinigungsmethode sind Inhalt der folgenden Abschnitte.

## 4.3.1 Funktionsweise



**Abbildung 4-11:** Schematischer Ablauf der Aufreinigung. Die DNA-markierten Proteine hybridisieren spezifisch an die oligonukleotidfunktionalisierte Festphase und können somit von nicht markierten abgetrennt werden. Durch Zusatz eines zur Festphasen-DNA exakt komplementären Verdrängungsoligonukleotids (rot) gehen die modifizierten Proteinsubstrate wieder in Lösung. Es folgt die Abtrennung der Festphase und der Verdrängungssequenz via Membranfiltration.



Abbildung 4-11 erläutert schematisch den Ablauf der Auftrennung des aus der bereits beschriebenen Markierungsreaktion hervorgegangenen Reaktionsgemisches. Ziel dieses Verfahrens ist die quantitative Abtrennung nicht markierter Bestandteile und Isolation der markierten Proteine. Zu diesem Zweck setzt man der Reaktionslösung eine DNA-funktionalisierte Festphase zu. Die Oligonukleotidsequenz („Festphasen-DNA“) hybridisiert an den DNA-Strang, welcher durch die Markierungsreaktion kovalent an die Substratproteine angebunden wurde. Der so entstehende Doppelstrang weist jedoch Fehlpaarungen auf, die für den weiteren Verlauf der Separation von Bedeutung sind. Nach Anbindung des modifizierten Teils der Proteine an die Festphase kann diese von der Reaktionslösung abgetrennt und somit von nicht markierten Proteinen befreit werden. Nach zweimaligem Waschen, zur Vervollständigung der Abtrennung, erfolgt die Zugabe eines weiteren DNA-Stranges im Überschuss. Letzterer ist nun im Gegensatz zur Substrat-DNA vollständig komplementär zur Festphasen-DNA und verdrängt demzufolge aufgrund der Ausbildung eines stabileren Doppelstrangs die Substrat-DNA. Somit gehen die markierten Proteine wieder in Lösung und sind durch Abnehmen des Überstands von der Festphase separierbar. Das nun in der Lösung vorhandene Verdrängungsoligonukleotid kann im Anschluss aufgrund der ausreichend großen Massendifferenz zu den markierten Proteinen durch Membranfiltration (*Microcon* Zentrifugenfilter) abgeschieden werden. Es besteht ferner die Möglichkeit, das zurückbleibende markierte Protein im Verlauf dieses Vorgangs in den für die weiteren Experimente oder Umsetzungen erforderlichen Puffer zu überführen.

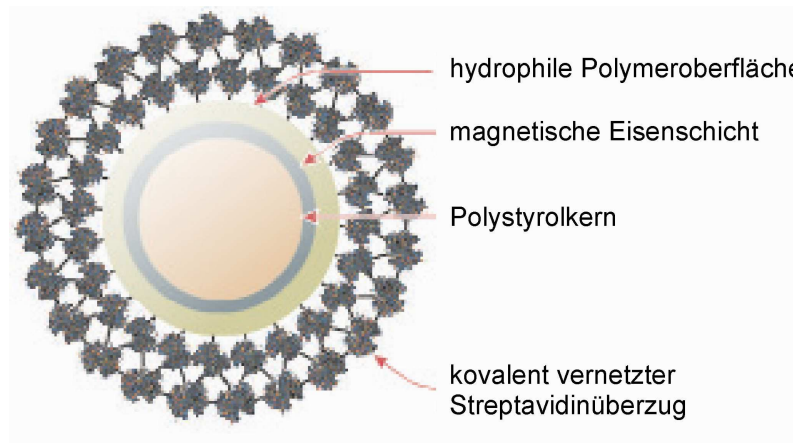
#### 4.3.2 Wahl der geeigneten Festphase

Der Festphase kommt bei dem Auftrennungsprozess eine zentrale Bedeutung zu. Sie muss folgenden Kriterien genügen:

- Hohe Beladungsdichte
- Geeignete Oberflächenderivatisierung für DNA-Konjugation
- Keine Neigung zu unspezifischer DNA- / Proteinadsorption
- In wässriger Lösung einsetzbar
- In gleichbleibender Qualität kommerziell verfügbar
- Einfach handhabbare Partikelgrößen

In ersten Funktionalisierungsversuchen fanden polymerbasierte Harzpartikel Verwendung, die als Festphasen in der Peptid- und Oligonukleotidsynthese eingesetzt werden. Im Einzelnen handelte es sich um aminomodifiziertes *TentaGel* [Bayer 1986], *Rink*- und *Sieber*-Harz [Rink 1987; Sieber 1987]. Letztere verfügen nach Abspaltung der Schutzgruppe ebenfalls über freie Aminogruppen auf der Oberfläche. Im Verlauf der Experimente erwiesen sich jedoch derartige Partikel als nicht geeignet für diese Art der Anwendung, da eine unspezifische DNA-Adsorption bei Anbindung der Festphasenoligonukleotidsequenz nicht unterbunden und im Anschluss nicht mehr quantitativ zu entfernen war. Außerdem gestaltete sich die praktische Handhabung der Partikel über die Aufreinigungsprozesse hinweg als schwierig und verlustreich.

Aus diesen Gründen wurden als Festphasen magnetische Partikel verwendet, welche über das Anlegen eines Magnetfeldes einfach und schonend ohne Filtration oder Zentrifugation aus der Lösung isolierbar sind. Es ergaben sich jedoch auch mit diesen vergleichbare Probleme bei der kovalenten DNA-Anbindung, welche jedoch durch Anwendung streptavidinummantelter magnetischer Mikrosphären erfolgreich umgangen werden konnten. Biotinylierte Oligonukleotide sind mittels starker Streptavidin-Biotin-Bindung auf der Festphasenoberfläche immobilisierbar. Ferner verhindert die Streptavidinbeschichtung unspezifische DNA- und Proteinadsorptionen auf der Festphase. Aufgrund der hohen Bindungskapazität von 2,5 nmol biotinylierter Oligonukleotide pro Milligramm Partikel wurden *NanoLink Streptavidin Microspheres* von *Solulink* mit einem Durchmesser von 788 nm verwendet [Solulink 2009]. Nachfolgende Abbildung illustriert und erläutert den Aufbau dieser superparamagnetischen Mikrosphären.

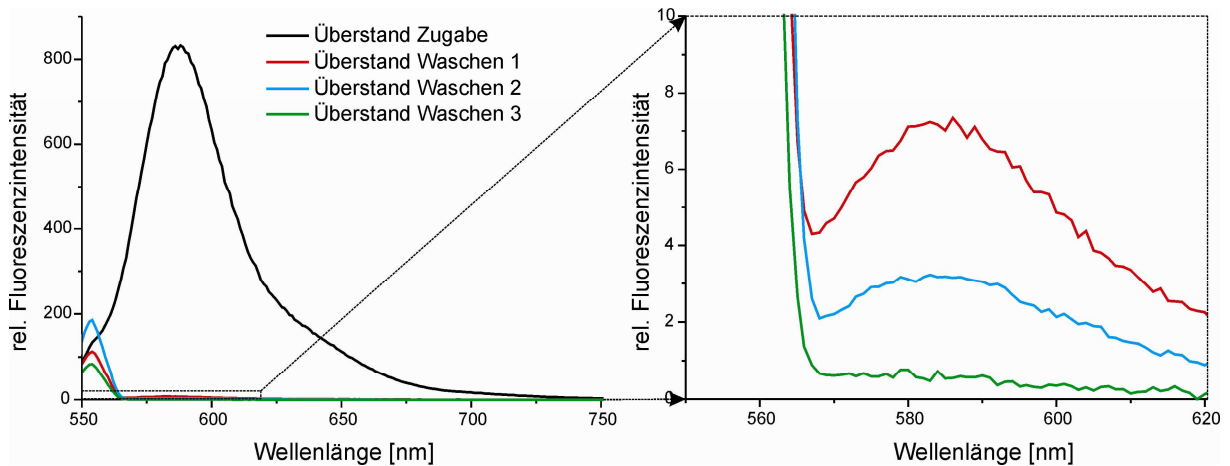


**Abbildung 4-12:** Schematischer Aufbau der *NanoLink Streptavidin Microspheres*. Ausgehend von einem Polystyrolkern, gefolgt von einer Lage magnetischen Eisens, bestehen die Partikel zusätzlich aus einer hydrophilen Polymerschicht, auf welcher die Streptavidinmoleküle kovalent und untereinander quervernetzt angebunden sind [Solulink 2009].

Basierend auf der innersten Schicht aus Polystyrol folgt eine Lage Eisen, welche wiederum von einer hydrophilen Polymerschicht bedeckt ist. Darauf sind schließlich die Streptavidinmoleküle aufgebracht, welche kovalent immobilisiert und untereinander quervernetzt vorliegen.

Experimentell konnte mittels Absorptionsmessung für die Bindungskapazität biotinylierter Oligonukleotide ein Wert von 2,75 nmol/mg Mikrosphäre ermittelt werden.

Zur Detektion unspezifischer Adsorption erfolgte die Zugabe farbstoffmarkierter DNA (Substrat\_A-TMR) direkt zu nicht DNA-funktionalisierten Partikeln. Die zugesetzte Menge entspricht der fünffachen Anbindungskapazität für biotinylierte DNA-Stränge und übersteigt somit die bei Anbindungen verwendete Oligonukleotidmenge um das Dreifache, um stattfindende Adsorptionen sicher zu detektieren. Sämtliche weiteren Inkubationsbedingungen entsprechen denen der Anbindung. Der nach magnetischer Abscheidung abgenommene Überstand sowie diejenigen dreier nachfolgender Waschschriffe wiesen die in Abbildung 4-13 dargestellten Fluoreszenzemissionen auf.



**Abbildung 4-13:** Fluoreszenzspektren der Überstände nach Zugabe von TMR-markierter DNA Substrat\_A zu nicht modifizierten Streptavidinpartikeln. Nach magnetischer Abtrennung der Kügelchen erfolgt die Abnahme des Überstands (schwarz). Die anschließenden Waschschrte eins und zwei (rot und blau) weisen noch 0,8 % und 0,3 % der DNA-Menge auf, im dritten Waschschrte (grün) ist keine DNA mehr enthalten.

Aus diesen geht hervor, dass das Oligonukleotid nicht unspezifisch an die Streptavidinteilchen bindet, da die gesamte eingesetzte DNA in den ersten drei Fraktionen wiedergefunden werden konnte. Die Verschleppung auf die Fraktionen zwei und drei, d.h. der ersten beiden Waschschrte, ergibt sich durch den Bruchteil der Lösung, welcher beim Abnehmen der wässrigen Phase zwischen den Mikrosphären zurückbleibt.

### 4.3.3 Konzeption der DNA-Systeme

Bei der Wahl der DNA-Sequenzen für die Aufreinigung sind mehrere Aspekte zu berücksichtigen.

- Jede Basenabfolge für sich darf unter Aufreinigungsbedingungen keine stabile Sekundärstruktur aufweisen, die eine Hybridisierung erschwert bzw. mit dieser in Konkurrenz steht.
- Die Länge der DNA-Sequenzen ist aus Kostengründen möglichst kurz zu halten.
- Der aus Substrat- und Festphasensequenz bestehende Doppelstrang muss stabil genug sein, um in akzeptabler Zeit eine annähernd quantitative

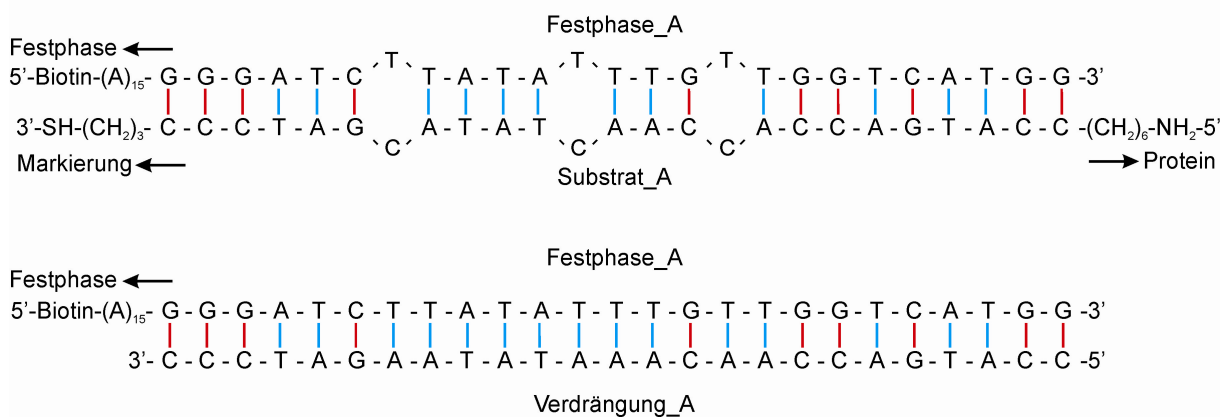
Anbindung der markierten Proteine an die Festphase bei Raumtemperatur zu erzielen, aber

- auch einen effektiven Austausch bei Zugabe der Verdrängungssequenz ohne übermäßige Temperaturerhöhung zu ermöglichen, um das Substratoligonukleotid wieder von den Mikrosphären lösen zu können.
- Im Falle einer Mehrfachmarkierung gelten obige Aspekte ebenfalls für die Sequenzen des zweiten Aufreinigungsschritts. Diese dürfen ferner keine Affinität für die in der ersten Markierung eingesetzten Oligonukleotide aufweisen, um Fehlhybridisierungen zwischen DNA-Strängen beider Systeme zu vermeiden.
- Gleichzeitig sollen die Schmelzpunkte der entsprechenden Doppelstränge möglichst denen der ersten Markierung ähneln, um ein identisches Verhalten zu gewährleisten.

Zur Entwicklung der DNA-Systeme wurde das Programm *mFold* verwendet, welches für vorgegebene Temperatur, DNA-, Natrium- sowie Magnesiumionenkonzentration eine Vorhersage der stabilsten Sekundärstrukturen bzw. Doppelstrangkongformationen ermöglicht. Der Parameterauswahl lagen folgende Überlegungen zugrunde: *Solulink* empfiehlt für die Streptavidinmikrosphären bei Verwendung in DNA-Hybridisierungen einen Tris- bzw. PBS-Puffer mit pH 7,4 und 1 M Na<sup>+</sup>-Konzentration. Die Umhybridisierung zur Ablösung der markierten Proteine durch Zugabe von komplementärer Verdrängungs-DNA muss bei maximal 40 °C ablaufen, um eine Proteindegradation bei höheren Temperaturen zu vermeiden. Da ein effektiver und optimal spezifischer Austausch von DNA-Sequenzen in Doppelsträngen bei Temperaturen von etwa 20 °C unter der Schmelztemperatur des Doppelstrangs abläuft, soll demzufolge der Schmelzpunkt von Substrat- mit Festphasensequenz bei höchstens 60 °C liegen [Marmur 1963; Britten 1968]. Er darf aber auch nicht zu niedrig sein, um im ersten Schritt eine vollständige, zügige Anbindung zu erreichen. Die Stabilität der Hybridisierung von Verdrängungs- und Festphasenoligonukleotid wiederum muss deutlich höher liegen, um nachfolgend eine effektive Verdrängung zu gewährleisten. Durch Stattfinden der Hybridisierungen an einer Festphase kann die effektive lokale DNA-Konzentration von derjenigen im restlichen Volumen deutlich abweichen, weshalb der für die Berechnungen verwendete Wert von 10<sup>-5</sup> M nur als grober Richtwert anzusehen ist. Da dieser Effekt jedoch alle Sequenzen gleichermaßen betrifft, kann davon ausgegangen werden,

dass er keine Auswirkungen auf die relative Stabilität der unterschiedlichen Doppelstränge hat. Die in Abbildung 4-14 dargestellten Sequenzen sind das Ergebnis dieser Berechnungen und erfüllen die obigen Forderungen. Sie bilden den sogenannten Aufreinigungssatz A.

Festphase\_A: 5'- AAA AAA AAA AAA AAA GGG ATC TTA TAT TTG TTG GTC ATG G -3'  
 Substrat\_A: 5'- CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TCC C -3'  
 Verdrängung\_A: 5'- CCA TGA CCA ACA AAT ATA AGA TCC C -3'



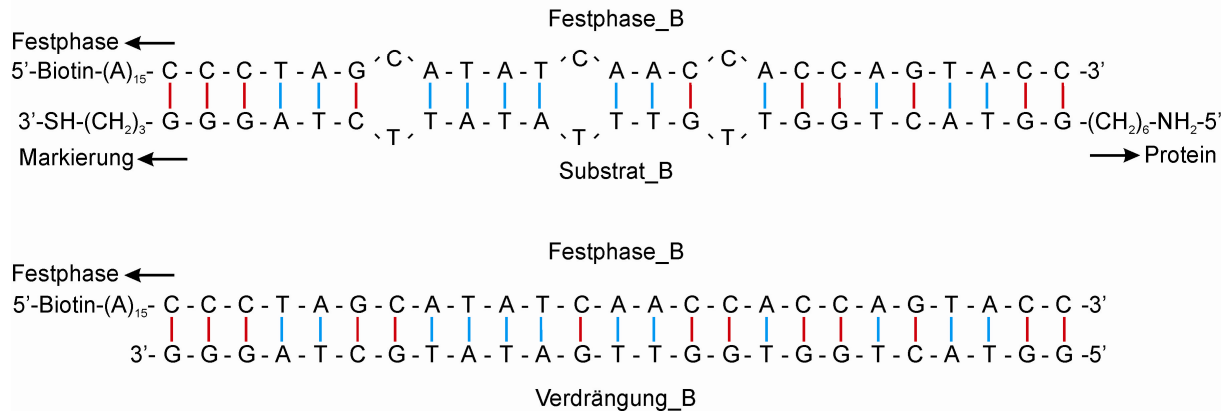
**Abbildung 4-14:** Sequenzen des Aufreinigungssatzes A bestehend aus Substrat\_A, Festphase\_A und Verdrängung\_A. Dargestellt sind außerdem die von *mFold* berechneten stabilsten Strukturen der beiden Doppelstränge, die für den Aufreinigungsprozess maßgeblich sind.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, bildet der Doppelstrang aus Festphase\_A und Substrat\_A im Gegensatz zur Hybridisierung aus Festphase\_A mit Verdrängung\_A drei Fehlpaarungen aus. Damit ergibt sich eine Schmelztemperatur von 60,4 °C im Vergleich zu 73,9 °C des vollständig komplementären Hybrids bei einer Konzentration von je 10<sup>-5</sup> M. Die Stabilitätsminderung kann alternativ auch über einen kürzeren Substrat\_A-Strang erreicht werden. Diese Variante erbrachte in vergleichenden Aufreinigungen jedoch deutlich schlechtere Ausbeuten als die Fehlpaarungsvariante.

Wie bereits erwähnt, soll der Aufreinigungssatz B keine Wechselwirkungen und stabilen Strukturen mit den Oligonukleotiden des Satzes A aufweisen. Zur Erstellung der Sequenzen des zweiten Satzes wurden daher die Basenabfolgen der jeweiligen Sequenzen aus Satz A invertiert und vertauscht, d.h. die Basenabfolge von

beispielsweise Substrat\_A entspricht der rückwärts abgelesenen Sequenz von Festphase\_B.

Festphase\_B: 5'- AAA AAA AAA AAA AAA CCC TAG CAT ATC AAC CAC CAG TAC C -3'  
 Substrat\_B: 5'- GGT ACT GGT TGT TTA TAT TCT AGG G -3'  
 Verdrängung\_B: 5'- GGT ACT GGT GGT TGA TAT GCT AGG G -3'



**Abbildung 4-15:** Sequenzen des Aufreinigungssatzes B bestehend aus Substrat\_B, Festphase\_B und Verdrängung\_B. Dargestellt sind außerdem die von *mFold* berechneten stabilsten Strukturen der beiden Doppelstränge, die für den Aufreinigungsprozess maßgeblich sind.

Durch diese Vorgehensweise verfügt der zweite Aufreinigungssatz über annähernd identische Eigenschaften, da die vorhandenen Basenpaarungen die gleichen sind. Zudem treten keine Wechselwirkungen zwischen den Sequenzen der beiden Aufreinigungssätze auf. Tabelle 4-1 beinhaltet die berechneten Eigenschaften der DNA-Systeme. Zur Verifizierung der theoretischen Schmelztemperaturen der vier verwendeten Hybridisierungspaare wurden entsprechende Schmelzkurven bei Oligonukleotidkonzentrationen von 0,5 µM aufgenommen. Die darüber bestimmten Schmelztemperaturen und entsprechende *mFold*-Vergleichswerte sind ebenfalls in Tabelle 4-1 angegeben.

**Tabelle 4-1:** Mittels *mFold* berechnete Schmelztemperaturen  $T_M$  für Doppelstränge und Sekundärstrukturen der gelisteten Oligonukleotide sowie experimentelle Vergleichswerte für die jeweiligen Konzentrationen und 1 M  $\text{Na}^+$ .

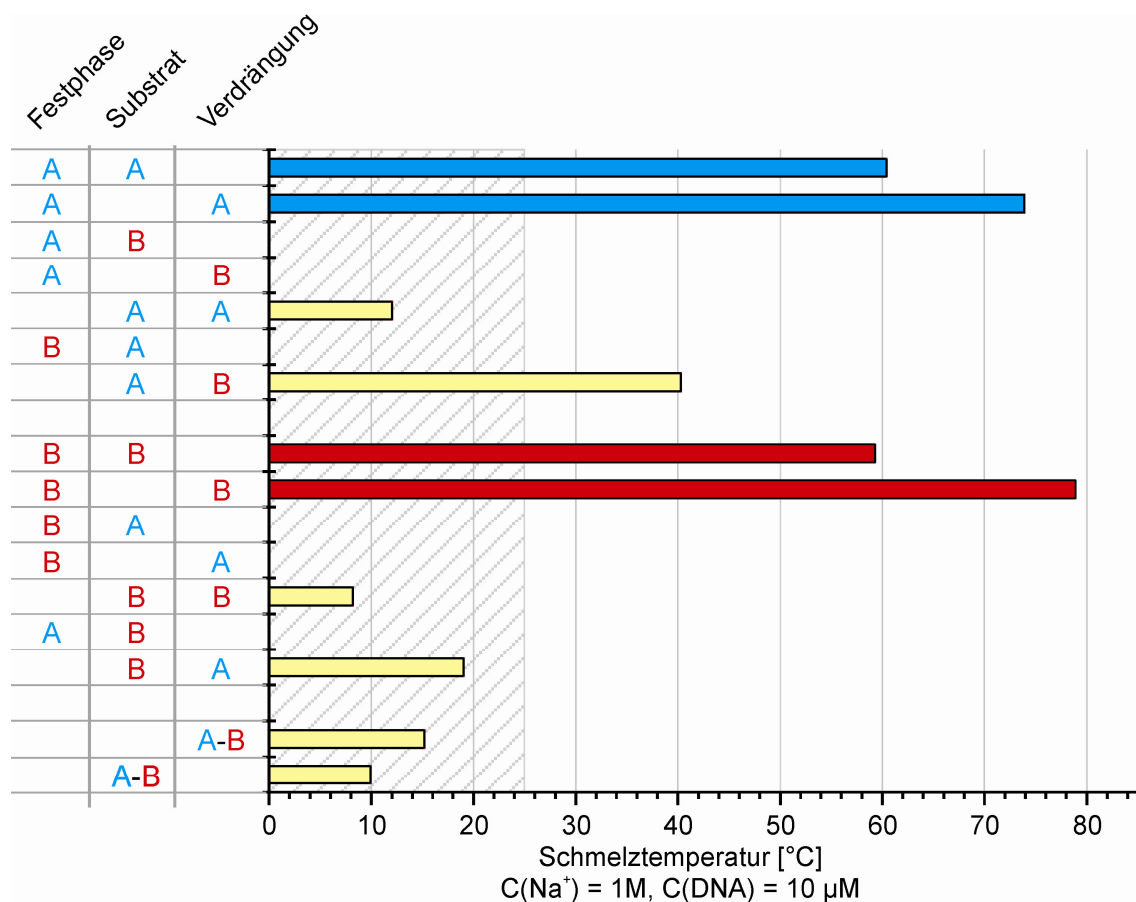
Sequenz	$T_{M \text{ theor}} [^\circ\text{C}]$ (Sekundärstruktur)	$T_{M \text{ theor}} [^\circ\text{C}]$ (Doppelstrang) $10^{-5} \text{ M}$	$T_{M \text{ theor}} [^\circ\text{C}]$ (Doppelstrang) $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$	$T_{M \text{ exp}} [^\circ\text{C}]$ (Doppelstrang) $5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
Substrat_A	24,4	60,4	55,8	$58,3 \pm 0,3$
Festphase_A	34,7	73,9	70,2	$74,0 \pm 0,1$
Verdrängung_A	31,6			
Substrat_B	36,8	59,3	54,7	$55,6 \pm 0,2$
Festphase_B	33,0	78,9	72,2	$77,9 \pm 0,2$
Verdrängung_B	36,8			

Der Vergleich der mittels *mFold* berechneten mit den experimentellen Schmelztemperaturen zeigt, dass die gemessenen etwas höher als die theoretischen Werte liegen. Diese Diskrepanz ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass der *mFold*-Algorithmus die Wechselwirkungen der DNA-Modifikationen – beispielsweise Farbstoff oder Biotin - mit dem jeweiligen Gegenstrang nicht berücksichtigt. Zudem beeinflussen weitere suboptimale Doppelstrangkongformationen die Schmelztemperatur und können somit zu Abweichungen nach oben führen, die jedoch zur Berechnung der Schmelztemperatur der stabilsten Anordnung nicht herangezogen werden.

Die modellierten Werte für die Schmelztemperaturen können also lediglich als Richtwert dienen, eine exakte Vorhersage ist nicht möglich. Da die einzelnen Abweichungen in dieselbe Richtung und in gleicher Größenordnung erfolgen und somit die relativen Stabilitätsunterschiede erhalten bleiben, ist die Funktionsweise der Aufreinigungssysteme dennoch gegeben. Zudem übersteigen die absoluten Differenzen die Abweichungen zwischen experimentellen und theoretischen Werten deutlich.



Starke Wechselwirkungen zwischen Sequenzen der beiden Oligonukleotidsysteme unterbleiben ebenfalls, wie Abbildung 4-16 belegt. Außer der Strangkombination Substrat\_A-Verdrängung\_B, deren Doppelstrang einen Schmelzpunkt von 40,3 °C aufweist, sind alle anderen Wechselwirkungen bei Raumtemperatur und darüber nicht relevant. Die genannte Paarung kann dadurch einfach vermieden werden, dass bei einer Mehrfachmodifikation zunächst Satz B verwendet wird, womit die beiden Oligonukleotide nicht gleichzeitig präsent sind. Die berechneten Werte basieren wieder auf denselben Bedingungen.



**Abbildung 4-16:** Modellierte Schmelztemperaturen der möglichen Hybridisierungskombinationen aller Sequenzen aus Satz A (blau) und B (rot). Bei Paarungen ohne angegebene Werte liegen diese unter null Grad Celsius.

Eine um 5 °C erhöhte Schmelztemperatur des DNA-Doppelstrangs aus Festphasen- und Verdrängungssequenz des Satzes B im Vergleich zum analogen des Satzes A beruht auf dem Stabilitätsunterschied zwischen G-C- und A-T-Hybridisierungen. Die drei zusätzlichen Basenpaarungen, welche in diesen Doppelsträngen die Fehl-

paarungen der Doppelstränge aus Festphasen- und Substratsequenzen ersetzen, bestehen bei Satz A aus A-T-, bei Satz B aus G-C-Paarungen.

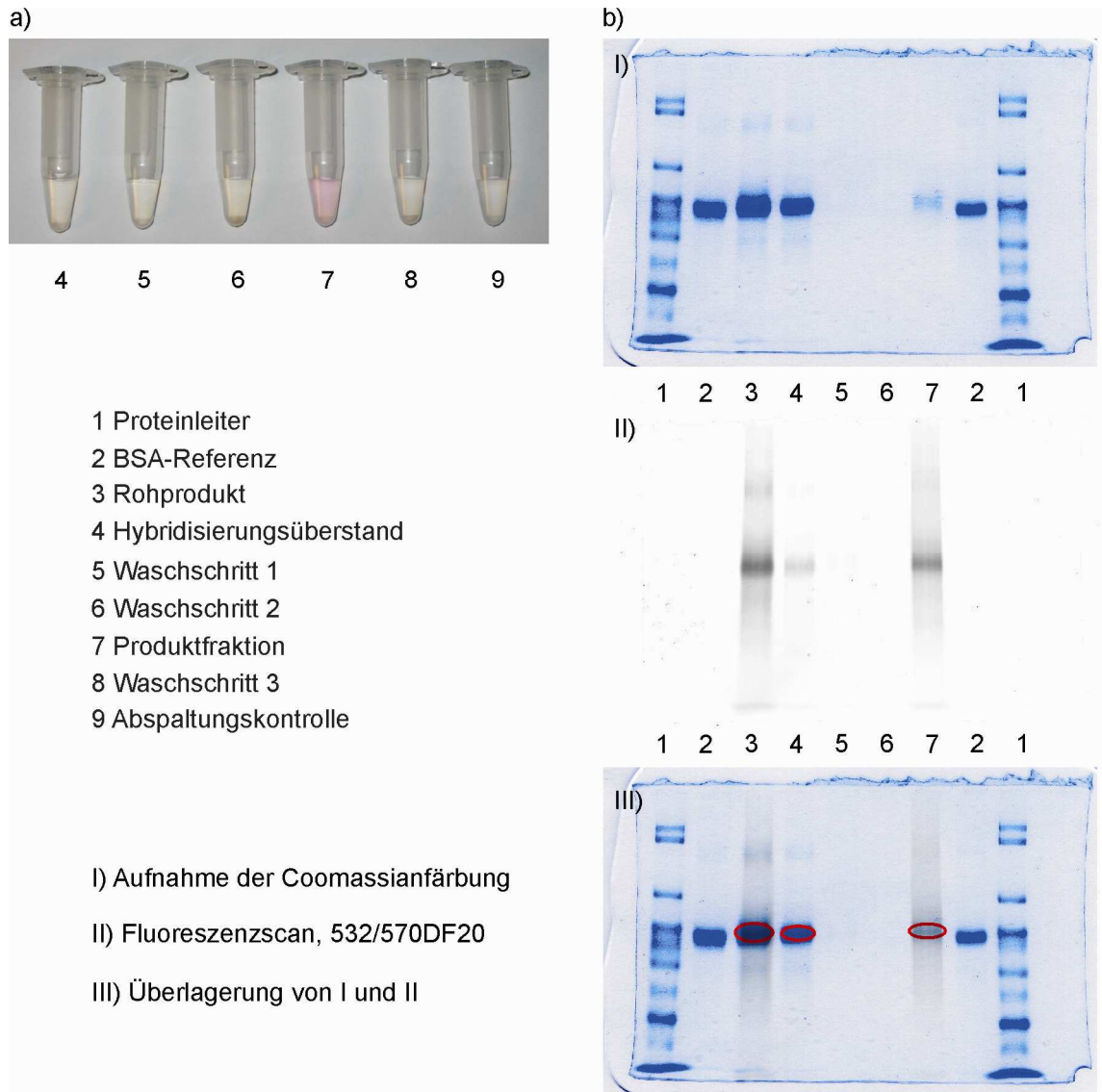
#### 4.3.4 Ablauf der Aufreinigung

Nach Durchführung der Markierungsreaktion müssen die nicht markierten Proteine durch den festphasengebundenen DNA-Aufreinigungsprozess abgeschieden werden. Zur Reduzierung der hierfür erforderlichen Mengen an Streptavidinpartikeln, Festphasen- und Verdrängungsoligonukleotiden erfolgt zunächst die Abtrennung der nicht angebondenen Substrat-DNA per 30 kDa-Größenausschlussfiltration mit *Microcon*-Zentrifugemembranen. Eine tabellarische Versuchsvorschrift der vollständigen Aufarbeitung findet sich im Anhang.

Im ersten Schritt des Prozesses erfolgt die Funktionalisierung der Streptavidinbeads mit der biotinylierten Festphasen-DNA, deren Durchführung die Anleitung von *Solulink* zu den entsprechenden Partikeln zugrundeliegt. Alle Vorgänge finden in Hybridisierungspuffer (PBS pH 7,4, 1 M Na<sup>+</sup>) statt, wobei die Beadkonzentration 5 mg/ml beträgt. Die Abscheidung der Mikrosphären vor dem Abnehmen des Überstands erfolgt stets durch dreiminütiges Anlegen eines Magneten an die Reaktionsgefäßwand, womit sich die magnetischen Bestandteile zu dieser bewegen und dort festgehalten werden. Hierfür nutzte man die Vorrichtung *MPC-S* von *Dynal*. Die Menge der einzusetzenden Partikel richtet sich nach derjenigen der aufzureinigenden markierten Proteine und wird so gewählt, dass die Bindungskapazität der Partikel 125 % der Menge dieser Proteine entspricht, um eine vollständige Anbindung zu gewährleisten. Die Festphasen-DNA wiederum wird relativ zur Bindungskapazität der Mikrosphären ebenfalls im Verhältnis 1,25:1 zugegeben, nachdem die Partikel zweimal mit Hybridisierungspuffer gewaschen und in diesem wieder aufgenommen wurden. Die Inkubationszeit beträgt 30 min bei Raumtemperatur, währenddessen das Reaktionsgefäß langsam um die Querachse rotiert, um eine Sedimentation der festen Bestandteile zu verhindern. Nach Abnahme des Überstandes und dreimaligem Waschen der Partikel erfolgt die Zugabe des aufzutrennenden Proteingemisches. Die Hybridisierung markierter Proteine an die Festphase läuft innerhalb von 60 min bei Raumtemperatur ab, woraufhin der nicht markierte Proteinanteil durch Abnehmen des Überstands entfernt werden kann. Auf zwei weitere Waschschrte zur Entfernung letzter Reste nicht markierten Substrats

erfolgt die Zugabe der Verdrängungs-DNA an. Da sie an die Festphasensequenz bindet, gewährleistet ein 1,5:1-Verhältnis von Verdrängungs-oligonukleotid zu Bindungskapazität der Beads die Absättigung aller vorhandenen Festphasensequenzen und somit die vollständige Ablösung der markierten Proteine von den Mikrosphären. Dies geschieht in 60 min bei 40 °C. Aufgrund der Überschusszugabe befindet sich im nachfolgend abgenommenen Überstand neben den modifizierten Substratproteinen zusätzlich ein Teil der Verdrängungssequenzen, welche durch 30 kDa-Größenausschlussfiltration mit *Microcon*-Zentrifugemembranen abgetrennt werden. Die hierbei auszuführenden fünf Waschschrte erlauben gleichzeitig eine Puffersubstitution entsprechend nachfolgender Erfordernisse. Die Ausbeute an markiertem Protein beträgt über alle Kopplungs- und Aufreinigungsschritte zwischen drei und fünf Prozent.

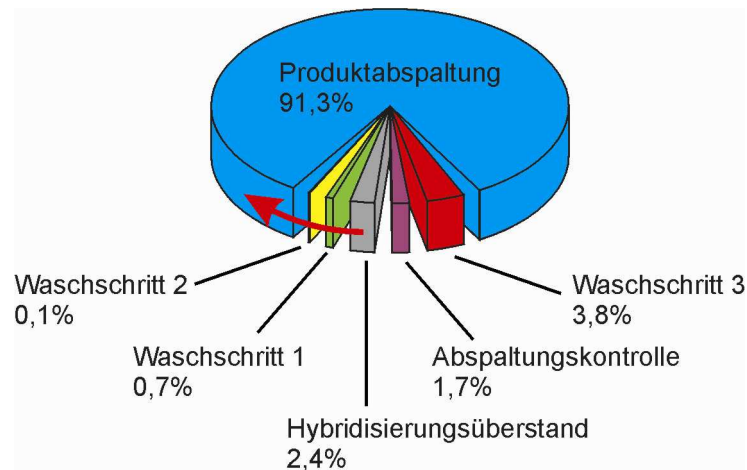
Abbildung 4-17 illustriert den Verlauf der Auftrennung. In Teil a) sind die abgenommenen Überstände der einzelnen Schritte dargestellt, Teil b) zeigt entsprechende Fluoreszenz- und Coomassiasorptionenaufnahmen eines SDS-PAGE-Gels mit Proben der Aufreinigungsschritte. In diesem Versuch war zuvor Substrat\_B-A 520 an BSA angebunden worden. Wie Abb. 4-17 verdeutlicht, erfolgt die Hybridisierung der Substrat-DNA an die Festphase annähernd quantitativ, wie die geringe Fluoreszenzintensität vom vierten Überstand zeigt. Der nicht markierte Proteinanteil verbleibt hingegen bei dem Vorgang in Lösung, wie die stark gefärbte Bande der Aufnahme der Coomassianfärbung desselben Überstands belegt. Im siebten Überstand befindet sich bedingt durch die hier erfolgte Umhybridisierung das markierte Protein, ersichtlich aus der Färbung der Lösung im zugehörigen Reaktionsgefäß sowie der entsprechenden starken Fluoreszenzbande. Durch Überlagerung der beiden Gelaufnahmen lässt sich ebenfalls die analoge Coomassiebande des siebten Überstands dem markierten BSA zuordnen. Die leichte Verschiebung der Bande zu höheren Massen im Vergleich zur Referenzprobe belegt diesen Zusammenhang ebenfalls.



**Abbildung 4-17:** a) Überstände der einzelnen Aufreinigungsschritte und b) Aufnahmen des entsprechenden SDS-PAGE-Gels der A 520-Emission bzw. der Coomassianfärbung. Auf das Gel wurden identische Volumina der Überstände geladen, weshalb die Bandenintensitäten die absoluten Konzentrationsverhältnisse widerspiegeln. Ausgenommen hiervon ist das Rohprodukt. Ausgangspunkt der Trennung stellte das Gemisch der Anbindung von Substrat\_B-A 520 an BSA dar.

#### 4.3.5 Quantifizierung der Auftrennung

Das Erfassen der Fluoreszenzemission des über die DNA an das Protein gebundenen Farbstoffs in den Überständen erlaubt die Quantifizierung der Aufreinigungsmethode. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 4-18 wiedergegeben.



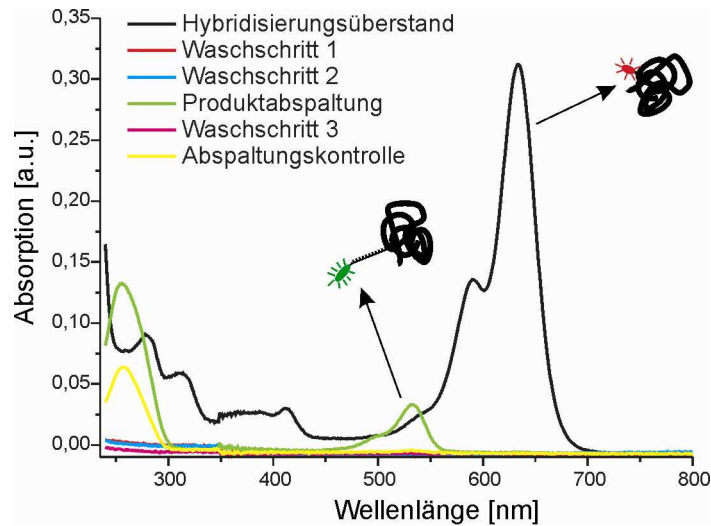
**Abbildung 4-18:** Prozentuale Verteilung des markierten Proteinanteils über die einzelnen Aufreinigungsschritte.

Da Hybridisierungen typische Gleichgewichtsreaktionen sind, ist es nicht zu verhindern, dass mit 2,4 % ein Teil der eingesetzten markierten Proteinmenge bei diesem Prozess im Überstand verbleibt. Die nachfolgenden Waschschriffe enthalten mit 0,7 % bzw. 0,1 % weitere Produktpuren. Aufgrund des Verdrängungsprozesses gelangen über 91 % der eingesetzten Menge wieder in Lösung und können gereinigt entnommen werden. Bedingt durch die Lösungsmittelrestmenge, die beim Abnehmen des vorherigen Überstands zwischen den Partikeln zurückgehalten wurde, finden sich im nachfolgenden Waschschrift noch 3,8 % des Produkts. Die Abspaltungskontrolle erfolgt durch Ersetzen des Puffers mit destilliertem Wasser, welches die Hybridisierungen durch Schmelzpunktherabsetzung löst und somit noch angebundene Proteine von der Festphase trennt. Die hier detektierten 1,7 % Restproduktpuren verdeutlichen die Effektivität der Verdrängungsreaktion.

#### 4.3.6 Selektivität der Aufreinigung

Zur Untersuchung der Anbindungsspezifität, welche die Selektivität der Aufreinigung bestimmt, wurde einem aufzutrennenden Kopplungsansatz aus Substrat\_B-A 520-BSA zusätzlich A 633-markiertes BSA zugesetzt. Die via Standard-NHS-Chemie markierten BSAs beliefen sich auf zehn Prozent der zur Kopplung eingesetzten Gesamtproteinmenge. Da der A 633-markierte Anteil über keine DNA-Sequenz zur Anbindung an die oligonukleotidfunktionalisierte Festphase verfügt, sollte er ebenso wie nicht umgesetztes BSA im Hybridisierungsüberstand der Aufreinigung

verbleiben. Abbildung 4-19 zeigt die aus den Überständen der Trennungsschritte hervorgegangenen Absorptionsspektren.

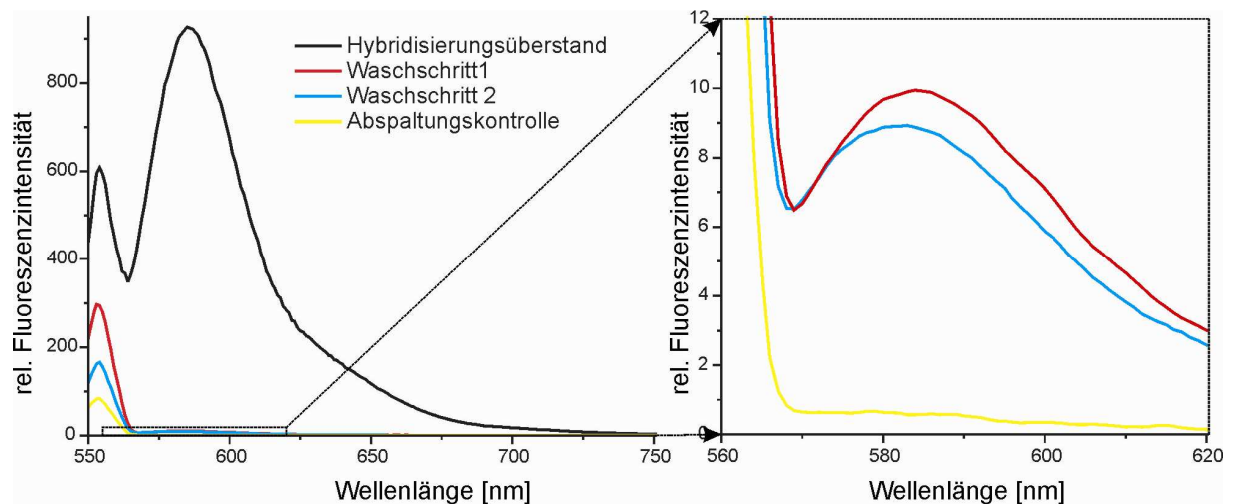


**Abbildung 4-19:** Absorptionsspektren der einzelnen Aufreinigungsfractionen einer Mischung aus BSA-A 633 und BSA-Substrat\_B-A 520 bei beadgebundener Trennung via Oligonukleotidsequenz Festphase\_B.

Wie hieraus ersichtlich, verbleibt das A 633-modifizierte BSA in vollem Umfang im Hybridisierungsüberstand, wohingegen das per Farbstoff-DNA-Konstrukt markierte Protein an die mit Festphase\_B-Oligonukleotid funktionalisierten Partikel bindet und durch Zugabe von Verdrängung\_B im vierten Schritt wieder vollständig eluiert werden kann. Daraus ist zu schließen, dass sich der nicht modifizierte Proteinanteil analog zu dem nach Standardverfahren markierten BSA verhält, da er im Hybridisierungsüberstand zurückbleibt und eine saubere Trennung stattfindet. Dieses Resultat bestätigt auch die Ergebnisse aus Abbildung 17-4 b), welche in der Gelspur der Produktfraktion auf Höhe des nicht markierten BSA-Substrats keine Coomassifärbung aufweist.

Bei einer zweifachen Substratmodifikation via DNA-Anbindung ist es von grundlegender Bedeutung, dass die verwendeten Substratsequenzen nicht an die falschen Festphasenoligonukleotide binden. Infolgedessen entstünde bei der zweiten Auftrennung eine Produktkontamination, bestehend aus einfach markiertem Protein der ersten Umsetzung. Die mittels *mFold* modellierten Schmelztemperaturen

derartiger Kreuzhybridisierungen lassen entsprechendes nicht erwarten (siehe Abbildung 4-16), ein experimenteller Nachweis wurde dennoch geführt: es erfolgte die Zugabe von Substrat\_B-TMR zu mit Festphase\_A funktionalisierten Mikrosphären, an welche keine Anbindung der DNA-Sequenz erfolgen sollte. Nach Abnahme des Hybridisierungsüberstands und zweimaligem Waschen wurde der Hybridisierungspuffer durch destilliertes Wasser ersetzt, was zu einer Trennung aller Doppelstränge und somit direkt zu einer Abspaltungskontrolle führte. Abbildung 4-20 enthält die zu den einzelnen abgenommenen Lösungen gehörenden Fluoreszenzspektren.



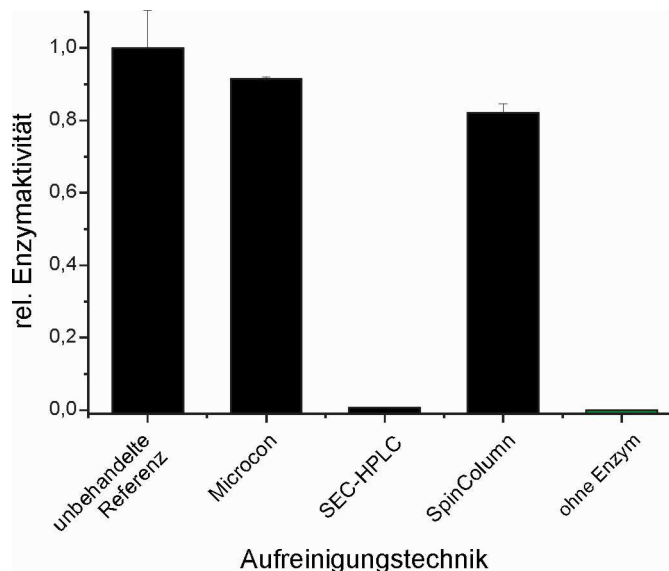
**Abbildung 4-20:** Fluoreszenzspektren der einzelnen Überstände bei Inkubation von BSA-Substrat\_B-TMR mit immobilisierter Oligonukleotidsequenz Festphase\_A.

Wie aus der Fluoreszenzintensitätsverteilung zwischen den Spektren ersichtlich, findet keine Hybridisierung statt. Das markierte Oligonukleotid verbleibt in Lösung und ist nach zwei Waschschriften in der Abspaltungskontrolle nicht mehr nachweisbar. Für eine Doppelmarkierung ist lediglich diese Kombination aus Substrat- und Festphasen-DNA relevant, da aufgrund der höheren Schmelztemperatur des Fehlpaarungsdoppelstrangs Substrat\_A-Verdrängung\_B (siehe Abbildung 4-16) die Doppelmarkierungsreihenfolge bezüglich der Substrat-DNA-Sequenzen festgelegt ist. Zur Vermeidung muss demnach die erste Modifikation mit Satz A erfolgen, wobei noch keine anderen Oligonukleotidsequenzen anwesend sind, welche die Auftrennung durch Fehlhybridisierungen beeinflussen könnten.

### 4.3.7 Aktivität markierter Enzyme

Ein Hauptmerkmal der nach dieser Methode modifizierten Proteasesubstrate soll neben der stöchiometrischen Einfachmarkierung der Erhalt der natürlichen Struktur und Funktionalität der Proteine sein. Zu deren Nachweis bediente man sich etablierter Methoden, die auf spektroskopisch verfolgbaren enzymatischen Substratumsetzungen basieren.

In einem ersten Schritt erfolgte die Überprüfung der Auswirkungen verschiedener Aufreinigungsmethoden und –geräte auf die Funktionalität von nicht modifizierter  $\beta$ -Galactosidase. Die untersuchten Verfahren sind alternative Methoden zur Abtrennung freier Oligonukleotide vor und nach der eigentlichen festphasengebundenen Separation und sollten die Proteinstruktur so wenig wie möglich negativ beeinflussen. Die hierzu verwendete enzymatische Spaltung von *ortho*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid zu *ortho*-Nitrophenyl und  $\beta$ -D-Galactose ist durch Anstieg der Produktabsorption bei 410 nm zu verfolgen. Abbildung 4-21 fasst die Ergebnisse dieser Messungen zusammen, die nach dem zugehörigen Protokoll EC 3.2.1.23 von *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* durchgeführt wurden [Craven 1965; Sigma-Aldrich Chemie GmbH 1999].

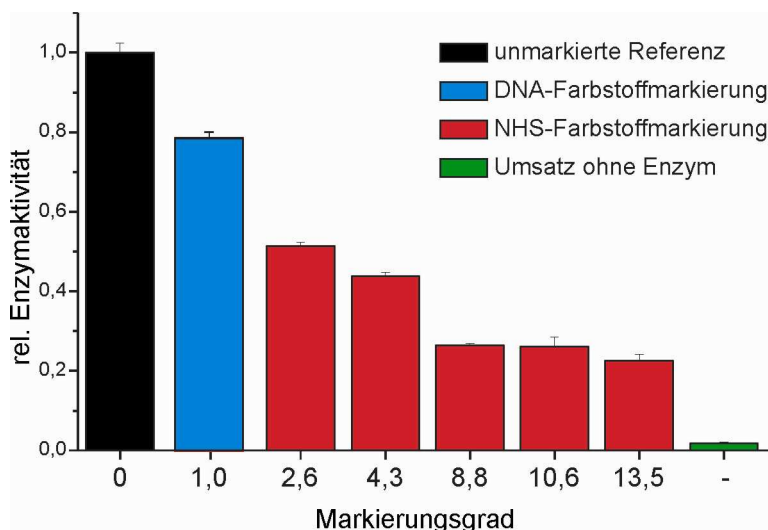


**Abbildung 4-21:** Katalytische Aktivität nicht modifizierter  $\beta$ -Galactosidase nach Durchführung verschiedener Aufreinigungsmethoden.



Während eine Bearbeitung der Enzymprobe mit *Microcon* oder *SpinColumn* die katalytische Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Referenz mit 91,5 % bzw. 82 % weitgehend konservieren, führt die Anwendung einer Größenausschlusschromatographie in einem HPLC-System zu einer vollständigen Degradation des Enzyms, lediglich eine Restaktivität von 0,7 % ist detektierbar. Damit ist diese Art der Aufreinigung für die benötigten Zwecke ungeeignet, *SpinColumns* und besonders *Microcons* sind dagegen verwendbar.

Weiterhin ist die eingeführte Modifikation in vielen Fällen die Ursache für verminderte Enzymaktivität bzw. eine Veränderung der Proteinstruktur. Aufgrund dessen fand ein Vergleich der katalytischen Aktivitäten von nicht modifizierter, mittels Farbstoff-DNA markierter und von mit herkömmlichem NHS-Farbstoff versehener **Carboxypeptidase A** (CPA) statt. Die Messungen erfolgten nach Vorschrift EC 3.4.17.1 von *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, wobei die Hydrolyse von Hippuryl-L-Phenylalanin zur Hippursäure und L-Phenylalanin durch Zunahme der Absorption bei 254 nm verfolgt werden konnte [Bergmeyer 1974; Sigma-Aldrich Chemie GmbH 2003]. Abbildung 4-22 gewährt einen Überblick über die erhaltenen Resultate.



**Abbildung 4-22:** Katalytische Aktivität von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Markierungsart (Substrat\_B-A 520 blau, bzw. NHS-A 520 rot) und des Markierungsgrads bei Farbstoffanbindung über NHS-Chemie (rot).

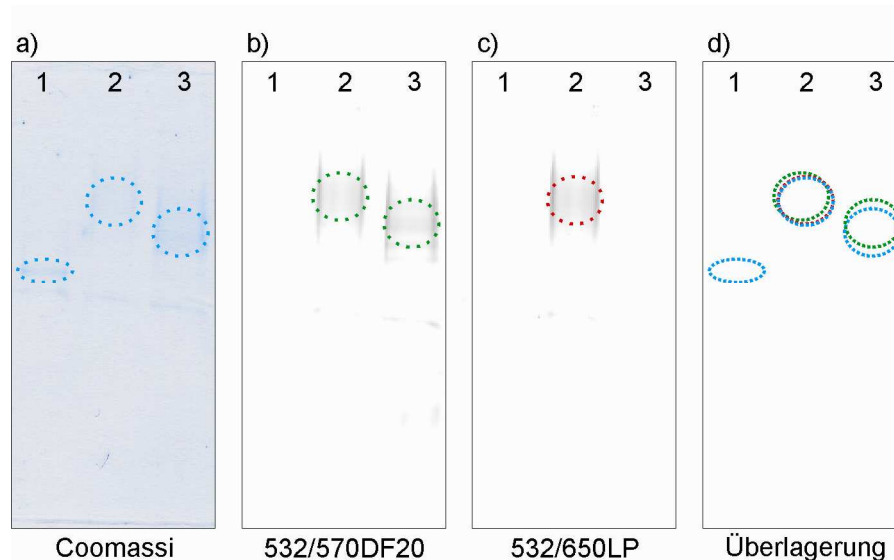
Der verwendete Farbstoff ist mit A 520 in allen Ansätzen, auch der DNA-modifizierten Carboxypeptidase A, identisch. Zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Markierungsgrade erfolgten entsprechende Messungen an Proben, welche zwischen 2,6 und 13,5 Farbstoffmolekülen pro CPA trugen. Wie erwartet, nimmt die relative Aktivität mit zunehmendem Markierungsgrad sukzessive von 51,4 % zu 22,5 % ab, da die Wahrscheinlichkeit zunimmt, ein in den katalytisch relevanten Bereichen lokalisiertes Lysin durch die Markierung zu blockieren. Markierungsgrade im Bereich von fünf bis zehn stellen jedoch gebräuchliche Werte dar, denn bei direkter Anbindung von Fluorophoren an Proteine ist ein nicht markierter Proteinanteil in Ermangelung einer Trennmethode nur durch einen hohen Markierungsgrad zu vermeiden. Demgegenüber weist die via Oligonukleotid farbstoffmarkierte Enzymprobe eine Aktivität von 78,8 % relativ zur nicht markierten Referenzprobe auf, womit der Vorteil dieser Modifikationsweise im Vergleich zur Standardmarkierung evident ist.

#### **4.3.8 Mehrfachmarkierung**

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, beeinträchtigt ein steigender Markierungsgrad zunehmend die enzymatische Aktivität. Demzufolge verstärkt die Einführung weiterer zusätzlicher Modifikationen diesen Effekt noch. Die Einfachmarkierung ist aufgrund dessen insbesondere bei Mehrfachmarkierungen vorteilhaft. Über die DNA-basierte Separation ist sichergestellt, nur jeweils umgesetzte Proteine erneut zu markieren, was zu deutlich niedrigeren Markierungsraten von im Extremfall jeweils eins führt. Die geringe Ausbeute von fünf Prozent pro Kopplung verkörpert den einzigen Nachteil, wodurch im Fall einer Zweifachmarkierung die Menge doppelt modifizierten Proteins nach beiden Umsetzungen bei 0,25 % liegt. Damit wird die potentielle Anwendungsbandbreite auf sensitive Methoden limitiert. Zur Verwendung in der Einzelmolekülspektroskopie sind die erhaltenen Mengen jedoch mehr als ausreichend.

Abbildung 4-23 beinhaltet verschiedene Aufnahmen eines SDS-PAGE-Gels, auf welchem nicht modifiziertes (1), Substrat\_B-A 520- (3) und Substrat\_B-A 520-Substrat\_A-Dy-520XL-markiertes BSA (2) aufgetragen sind. Zur Steigerung der Ausbeute betrug das BSA:SFB-Verhältnis im ersten Schritt 1:10, die BSA-Menge 1,6 nmol. Damit war es im Gegensatz zu vorangehenden Versuchen möglich, das

nochmals umgesetzte Produkt des zweiten Schritts mittels Fluoreszenzscan des Gels zu detektieren. Zugleich erzeugte der höhere SFB-Anteil in der ersten Stufe jedoch mehrfachmarkierte Anteile, wie in der jeweils dritten Probe zu erkennen ist. Die zweite Stufe fand mit 90 pmol Substrat\_B-A 520-BSA, dem Produkt der ersten Umsetzung, und einem fünffachen SFB-Überschuss statt.



**Abbildung 4-23:** SDS-PAGE-Gel von nicht modifiziertem BSA (1), doppelt markiertem BSA (2, Substrat\_A-Dy-520XL und Substrat\_B-A 520) und einfach Substrat\_B-A 520-markiertem BSA (3). Dabei zeigt Teil **a)** die Coomassianfärbung, **b)** die Aufnahme bei  $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$  und Detektion mit Filter 570DF20, **c)** bei  $\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$  und Detektion mit Filter 650LP und **d)** die Überlagerung der Bandenpositionen aller Scans und Bahnen.

Dargestellt sind die Coomassianfärbung (a), die Fluoreszenzaufnahmen bei 532 nm-Anregung und Detektion unter Verwendung des Emissionsfilters 570DF20 (b) bzw. 650LP (c) sowie der Überlagerung der drei Gelbanden (d). Dieser Vergleich belegt die erfolgreiche Abtrennung nicht markierten bzw. einfach markierten BSAs durch die erste bzw. zweite Aufreinigung, da sonst deren Banden zusätzlich in den Bahnen drei bzw. zwei vorhanden wären. Die Verschiebung zu höheren Massen von Bahn eins über zwei zu drei zeigt, ebenso wie die Fluoreszenzverteilung, das sukzessive Markieren mit den beiden DNA-gebundenen Fluorophoren.

## 4.4 Einzelmolekülspektroskopischer Proteasenachweis

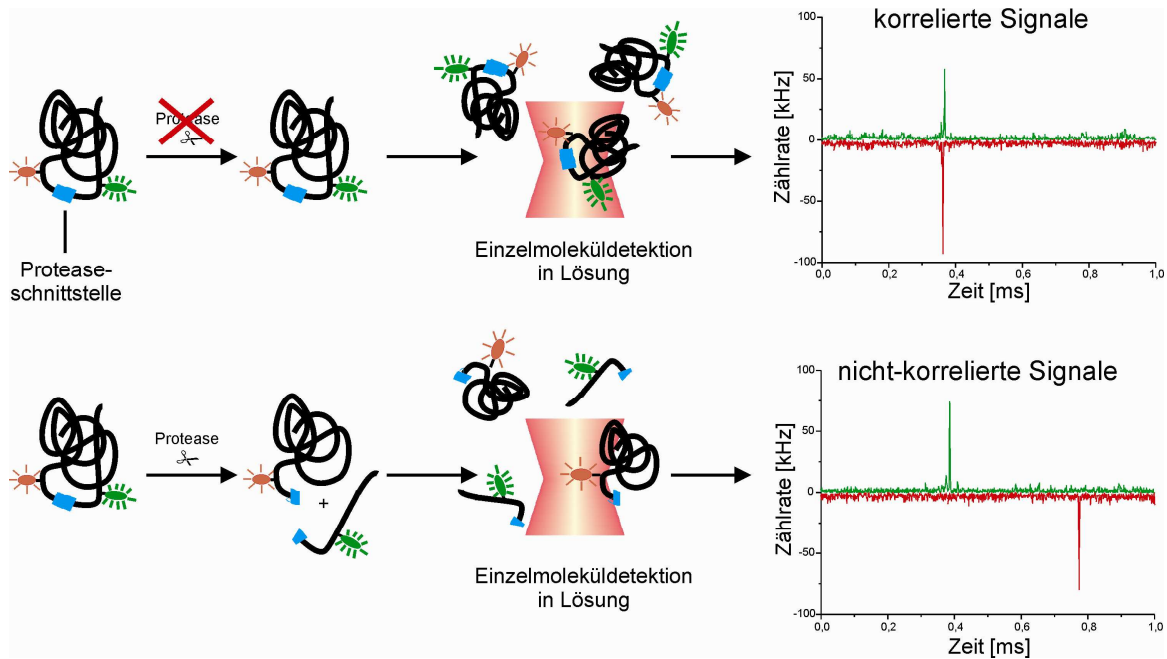
Natürliche Proteine, die nach den in Kapitel 4.2 und 4.3 vorgestellten Methoden mit zwei spektral unterscheidbaren Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, eignen sich als Substrate zur Verwendung in einem sensitiven einzelmolekülspektroskopischen Proteaseaktivitätsnachweis.

### 4.4.1 Prinzip

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System beruht auf der Detektion zeitlich korrelierter Fluoreszenzemissionen der verwendeten zwei spektral differenzierbaren Fluorophore (*Two Color Coincident Detection* - TCCD) [Castro 1997; Castro 2000; Li 2003; Nolan 2003; Orte 2006; Clarke 2007]. Das Prinzip ist mit dem der Zweifarbenfluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (*Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy* - FCCS) [Camacho 2004; Haustein 2007] vergleichbar, arbeitet jedoch mit um mehrere Größenordnungen geringeren Fluorophorkonzentrationen, da nicht das Gesamtsignal, sondern Einzelsignale zueinander in Beziehung gesetzt werden.

Grundlage des Konzepts bildet die Verwendung zweier Fluorophore mit separierbaren Emissionsspektren, sogenanntes Multiplexing. Abbildung 4-24 gewährt einen schematischen Überblick über das dem System zugrundeliegende Prinzip und dessen Applikation als Proteasenachweis.

Durch die kovalente Anbindung an ein Substratprotein und dessen spezifische Aufreinigung ist gegeben, dass eine Lösung desselben in den beiden auf die Farbstoffe abgestimmten Detektionskanälen zeitlich korrelierte Emissionssignale erzeugt, wie Abbildung 4-24 oben erläutert. Die räumliche Kolo-kalisation der beiden ange-bundenen Farbstoffe wird also in eine zeitliche Abhängigkeit überführt, da die Fluorophore bedingt durch die simultane Diffusion zeitgleich den Laserfokus passieren, angeregt werden und emittieren.



**Abbildung 4-24:** Schematischer Ablauf der Proteaseaktivitätsdetektion auf Einzelmolekülebene unter Verwendung zweifarbig stöchiometrisch markierter natürlicher Proteinsubstrate.

In Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms, für welches das angebotene Protein ein Substrat darstellt, erfolgt an einer oder mehreren Stellen des Proteins die Spaltung. Hervorgerufen durch Anbindung an die Lysinseitenketten sind die beiden Markierungen statistisch auf der Proteinoberfläche verteilt. Aufgrund dessen führt der enzymatische Proteinverdau nicht in jedem, aber in vielen Fällen zu einer Trennung von Substratteilen, die die beiden Fluorophore tragen (Abb. 4-24 unten). Demzufolge erlischt deren räumliche Bindung und mit dieser die zeitliche Korrelation der Emissionssignale. Die Abnahme der Zahl der korrelierten Signale ist also ein direktes Maß für den proteolytischen Verdau.

#### 4.4.2 Auswahl der Fluorophore

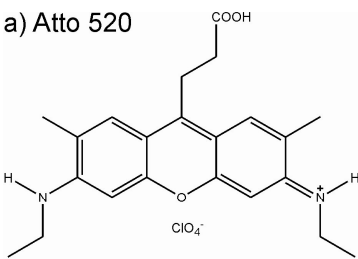
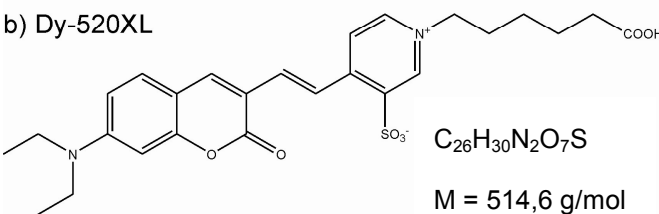
Grundlage der Chromophorauswahl bilden neben deren prinzipieller Eignung für eine Applikation in der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie mehrere weitere Aspekte. Wie bereits erwähnt, müssen die Emissionsbanden spektral separierbar sein, um Multiplexing und somit eine Korrelationserkennung zu ermöglichen. Zudem sollen die verwendeten Fluorophore die Substratproteine sowie deren Interaktion mit Proteasen nicht beeinflussen oder behindern. Bedingt durch ihre Größe sind daher *Quantum Dots* und GFP-analoge fluoreszente Proteine nicht einsetzbar [Sako 2006]. *Quantum Dots* lassen sich zudem schlecht kontrolliert mit biologischen Molekülen umsetzen, neigen zur Aggregation und zeigen starkes *Blinking*, womit ihre Eignung für viele Einzelmolekülexperimente begrenzt ist [Kuno 2000; Robelek 2006; Resch-Genger 2008]. Fusionsproteine haben außerdem den Nachteil, dass sie mit den Substraten koexprimiert werden müssen, was einer universellen Anwendbarkeit, wie bei einer posttranslationalen Modifikation gegeben, entgegensteht. Fluoreszierende Proteine weisen ferner oftmals schlechtere spektroskopische Eigenschaften auf als organische Fluoreszenzfarbstoffe [Dillingham 2008]. Diese sind unter den gegebenen Verhältnissen die beste Alternative, da sie neben ihrer geringen Größe, strukturellen Robustheit und im Allgemeinen sehr guten optischen Eigenschaften problemlos auf vielerlei Wegen kovalent mit biologischen Molekülen verknüpft werden können [Waggoner 2006; Hermanson 2008].

Fluorophore mit spektral nicht überlappenden Emissionsspektren haben zumeist auch unterschiedliche Absorptionsbereiche. Deshalb sind für derartige Messungen Aufbauten mit zwei Anregungslasern unterschiedlicher Wellenlänge nötig, womit ein erheblicher apparativer und experimenteller Mehraufwand verbunden ist [Heinze 2000]. Beispielsweise müssen die beiden Laserfoki exakt zur Deckung gebracht, bzw. das Überschneidungsvolumen bestimmt und in der Datenanalyse berücksichtigt werden [Dertinger 2007]. Durch die Verwendung von Fluoreszenzemittern, die bei spektral unterschiedlicher Emissionscharakteristik einen gemeinsamen Absorptionsbereich aufweisen, kann dieser Mehraufwand durch Einfarbenanregung umgangen werden. In diesem Fall muss einer der beiden Fluorophore über einen ungewöhnlich großen *Stokes-Shift* verfügen, eine Eigenschaft, welche in der Vergangenheit nur für *Quantum Dots* [Hwang 2004], sogenannte *Tandem Dyes* [Hwang 2006] oder bestimmte fluoreszierende (Fusions-)Proteine [Liu 2007] zutrif. Mit zwei organischen Fluoreszenzfarbstoffen

war eine Einfarbenanregung bisher nicht umsetzbar. Die von der Firma *Dyomics* hergestellte *MegaStokes*-Farbstoffklasse weist dagegen einen genügend großen *Stokes-Shift* von über 100 nm auf, womit eine Einfarbenanregung unter Verwendung zweier organischer Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht wird [Czerney 2003].

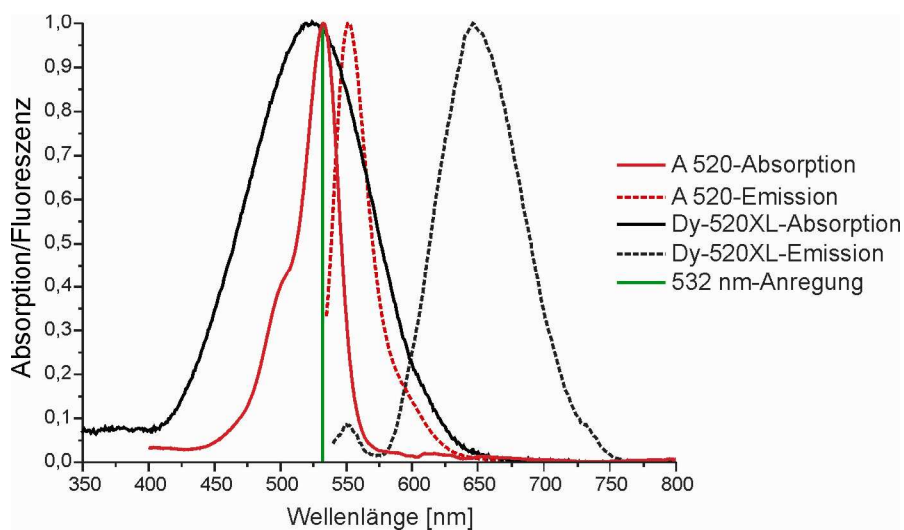
Daher sollte das hier entwickelte Proteasetestsystem mit Einfarbenanregung unter Verwendung eines *MegaStokes*-Farbstoffs funktionieren. Zur Minimierung von Lichtstreuung und Autofluoreszenz biologischer Moleküle erfolgt die Anregung bei 532 nm, die Detektion im Bereich ab 540 nm, womit sich die Verwendung des Farbstoffs Dy-520XL anbot. Als klassischer Fluoreszenzfarbstoff mit kleinerem *Stokes-Shift* wurde nun ein Vertreter gesucht, der ebenfalls bei 532 nm anregbar ist und dessen Emissionsspektrum so wenig wie möglich mit dem des Dy-520XL überlagert. Unter den zur Verfügung stehenden Alternativen stellte sich Atto 520 als der geeignetste Partner heraus.

Strukturformeln und optische Charakteristika sind Inhalt der Abbildung 4-25. A 520 weist demnach eine von Rhodamin 6G abgeleitete Struktur mit mäßiger Hydrophilie auf, wohingegen der hydrophobere Dy-520XL auf einer Coumarin-Polymethinstruktur basiert [Czerney 2003].

	a) A 520	b) Dy-520XL	
<p>a) Atto 520</p>  <p><math>C_{22}H_{27}ClN_2O_7</math> M = 466,9 g/mol</p>			
<p>b) Dy-520XL</p>  <p><math>C_{26}H_{30}N_2O_7S</math> M = 514,6 g/mol</p>			
	$\lambda_{abs}$	516	526
	$\lambda_{fl}$	538	661
	$\epsilon [M^{-1}cm^{-1}]$	110000	50000
	$\eta_{fl}$	90 %	n.a.
	$\tau_{fl}$	3,8 ns	n.a.
	CF <sub>260</sub>	0,13	0,24
	CF <sub>280</sub>	0,18	0,16

**Abbildung 4-25:** Strukturformeln und optische Eigenschaften von **a)** Atto 520 und **b)** Dy-520XL in wässriger Lösung.

Wie aus den Daten ersichtlich, stellen die Farbstoffe jeweils typische Vertreter ihrer Substanzklasse dar. A 520 gehört aufgrund seiner Struktur zu den sogenannten Resonanzfarbstoffen, die sich durch schmale, leicht strukturierte Absorptions- und Emissionsbanden auszeichnen [Mason 1999; Resch-Genger 2008]. Weitere Merkmale sind hohe Fluoreszenzquantenausbeuten, hohe molare Absorptionskoeffizienten sowie ein kleiner, gegenüber Lösungsmittelpolaritätsänderungen unempfindlicher *Stokes Shift*. Im Gegensatz dazu weisen Vertreter der *Charge-Transfer*-Farbstoffe, zu denen auch die Coumarine gehören, gut separierte Absorptions- und Emissionsbanden auf, die breit und wenig strukturiert sind [Resch-Genger 2008]. Die Größe der *Stokes-Verschiebung* und die spektroskopischen Eigenschaften sind von der (Lösungsmittel-)Polarität abhängig. Absorptionskoeffizienten und Fluoreszenzquantenausbeute fallen gewöhnlich niedriger aus als bei Resonanzfarbstoffen. Abbildung 4-26 zeigt die Absorptions- und Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe Atto 520 (blau) und Dy-520XL (rot), welche die jeweils charakteristischen Eigenschaften aufweisen.



**Abbildung 4-26:** Normierte Absorptions- und Emissionsspektren von Atto 520 (blau) und Dy-520XL (rot), jeweils als DNA-Konjugate in PBS pH 7,1. Der grüne Balken markiert die Anregungswellenlänge bei 532 nm.

Die Absorptionsmaxima der beiden Chromophore überlagern sich bei 530 nm. Die Anregung bei einer Wellenlänge von 532 nm ist somit für beide Farbstoffe geeignet. Die Absorptions- und Emissionsmaxima des A 520 verschieben sich durch Anbindung an das Oligonukleotid um 16 bzw. 12 nm zu 532 und 550 nm im Vergleich



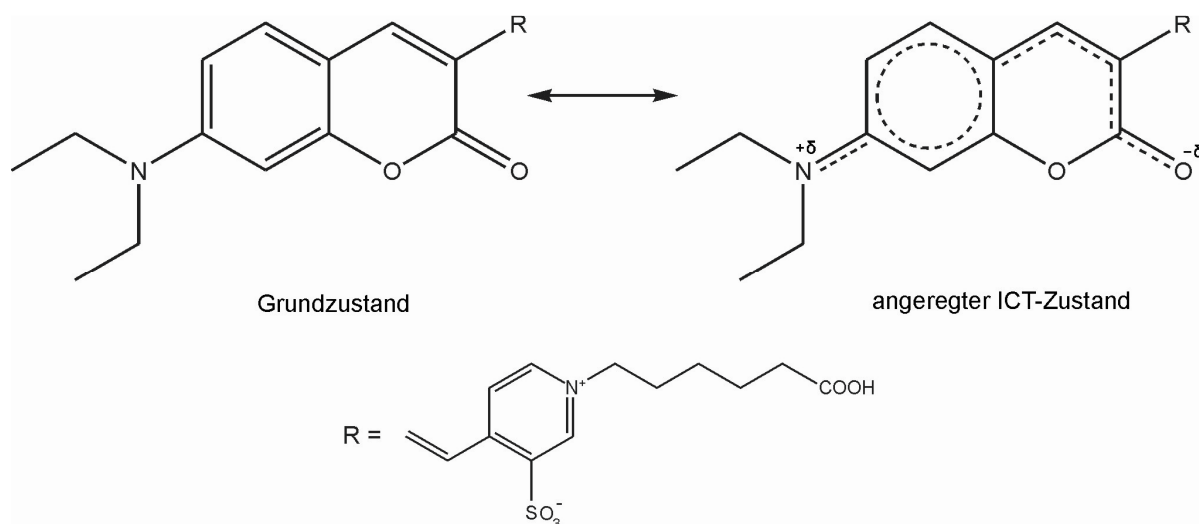
zum freien Fluorophor. Aufgrund der großen *Stokes-Verschiebung* des Dy-520XL sind die Emissionsbanden der beiden Farbstoffe gut separierbar.

Im Gegensatz zu Atto 520, einem gängigen und etablierten Fluoreszenzfarbstoff für den Einsatz in der Laserspektroskopie [Stöhr 2008], wurde Dy-520XL in einzelmolekülspektroskopischen Verfahren bisher noch nicht eingesetzt. Es fand daher zunächst dessen Charakterisierung im Hinblick auf den vorgesehenen Einsatzbereich statt.

#### 4.4.3 Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffs Dy-520XL

##### Struktur- Eigenschaftsbeziehung

Die optischen Eigenschaften organischer Farbstoffe sind von deren molekularen Strukturen und den beteiligten elektronischen Übergängen abhängig. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Dy-520XL um einen zu den *Charge-Transfer*-Farbstoffen gehörenden Fluorophor, bei welchen die Absorptions- und Emissionsprozesse auf intramolekularen Ladungsverschiebungsübergängen beruhen [Mason 1999].



**Abbildung 4-27:** Ladungsumverteilung im coumarinanalogen Teil des Dy-520XL beim Übergang zwischen Grund- und angeregtem Zustand.

Abbildung 4-27 zeigt die beiden am Übergang beteiligten mesomeren Grenzstrukturen. Im Gegensatz zu Resonanzfarbstoffen wie Fluoresceine, Rhodamine oder Cyanine reagieren Coumarine wie der Dy-520XL, deren Fluoreszenzemission aus einem angeregten Zustand mit beträchtlichem Dipolmoment erfolgt, daher mit signifikanten spektralen Änderungen auf Unterschiede der Mikroumgebungspolarität und Solvensprotizität [Resch-Genger 2008].

Die Auswirkungen sind in ihrem Zusammenspiel komplex und gründen auf mehreren Faktoren, welche Emissionsspektrum, Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer beeinflussen [Lakowicz 2006]:

- Allgemeine und spezifische Lösungsmittelleffekte
- Solvensrelaxationsrate
- Konformationsänderungen des Fluorophors
- Viskosität der lokalen Umgebung
- Intramolekularer Ladungstransfer (*Intramolecular Charge Transfer* – ICT)
- Änderungen der strahlenden und nicht strahlenden Abklingraten

Die Untersuchungen der Effekte hinsichtlich ihrer Bedeutung auf das Emissionsverhalten des Dy-520XL werden im Folgenden dargestellt.

### **Allgemeine Lösungsmittelleffekte**

Dieser Abschnitt beleuchtet die allgemeinen Lösungsmittelleinflüsse auf die Fluoreszenzcharakteristik des Dy-520XL. Sie bezeichnen die Auswirkungen der Gesamtheit der Lösungsmittelmoleküle, welche aus der elektronischen Polarisierbarkeit des Lösungsmittels, beschrieben durch den Brechungsindex, und der molekularen Polarisierbarkeit, die mit der Dielektrizitätskonstante und dem Dipolmoment der Solvensmoleküle in Verbindung steht, resultieren.

ICT-Moleküle sind gegenüber Umgebungsänderungen sensitiv und reagieren mit deutlichen spektralen Änderungen [Mazumdar 1992; Sire 1996]. Deshalb wurden die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Dy-520XL in verschiedenen Lösungsmitteln bei 25 °C bei einer Farbstoffkonzentration von 1 µM aufgenommen. Tabelle 4-2 listet die entsprechenden Absorptions- ( $\lambda_{abs}^{max}$ ) und Fluoreszenzmaxima ( $\lambda_{fl}^{max}$ ) sowie die Größe des *Stokes-Shifts*  $\Delta S$  des Farbstoffes neben den empirischen

Parametern der Lösungsmittelpolarität ( $E_T(30)$ , [Reichardt 1979]) und den *Lippert-Mataga*-Solvenspolaritätsparametern  $\Delta f$  der Lösungsmittel auf. Letztere berechnen sich nach

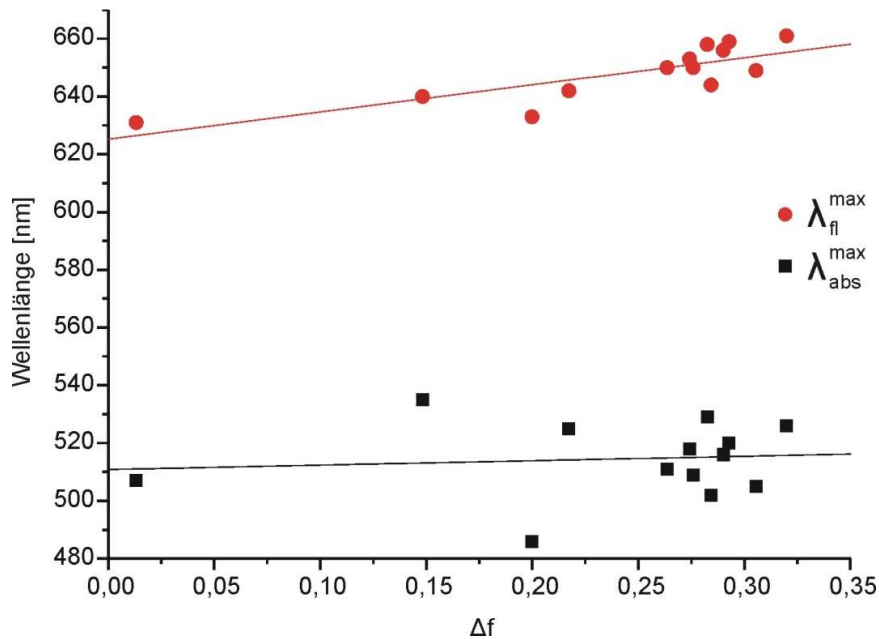
$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (4.2)$$

wobei  $\varepsilon$  die Dielektrizitätskonstante und  $n$  den Brechungsindex des jeweiligen Lösungsmittels symbolisieren [Mataga 1956; Lippert 1957; Lakowicz 2006].

**Tabelle 4-2:** Spektrale Absorptions- und Emissionscharakteristika des Farbstoffs Dy-520XL in verschiedenen Lösungsmitteln, sowie deren  $E_T(30)$ - und  $\Delta f$ -Parameter.

Lösungsmittel	$E_T(30)$ [kcal/mol]	$\Delta f$	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ [nm]	$\lambda_{\text{fl}}^{\text{max}}$ [nm]	$\Delta S$ [nm]
Toluol	33,9	0,013	507	631	124
Chloroform	39,1	0,148	535	640	105
Essigsäureethylester	38,1	0,200	486	633	147
Methylenchlorid	41,1	0,217	525	642	117
Dimethylsulfoxid	45,0	0,263	511	650	139
Propanol	48,6	0,274	518	653	135
Dimethylformamid	43,8	0,276	509	650	141
Formamid	56,6	0,282	529	658	129
Aceton	42,2	0,284	502	644	142
N-Methylformamid	54,1	0,290	516	656	140
Ethanol	51,9	0,293	520	659	139
Acetonitril	46,0	0,305	505	649	144
Wasser	63,1	0,320	526	661	135

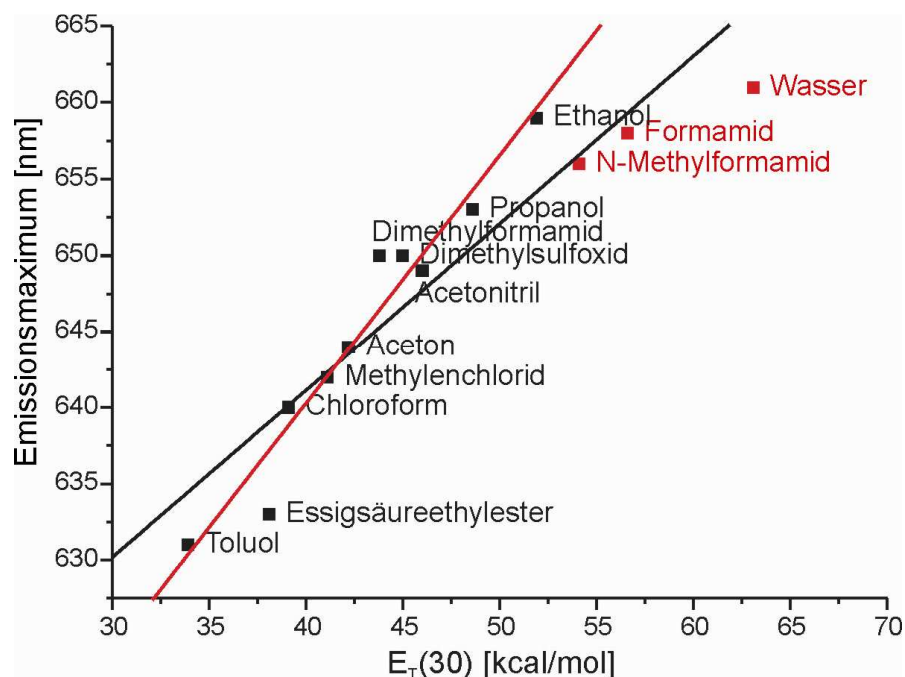
Aus den Daten geht hervor, dass mit zunehmender Lösungsmittelpolarität auch die Emissionswellenlänge zunimmt. Deutlicher zeigt dies Abbildung 4-28, in der Absorptions- und Emissionswellenlänge gegen die *Lippert-Mataga*-Parameter aufgetragen sind. Das Emissionsmaximum verschiebt sich mit zunehmenden Werten von  $\Delta f$  stärker bathochrom als das der Absorption.



**Abbildung 4-28:** Auftragung von  $\lambda_{abs}^{max}$  und  $\lambda_{fl}^{max}$  gegen  $\Delta f$  für 1  $\mu$ M Dy-520XL-Lösungen in verschiedenen Lösungsmitteln mit Darstellung der Trendlinien.

Der Effekt ist dadurch erklärbar, dass polare Solvensmoleküle den dipolbehafteten angeregten Zustand stärker beeinflussen und stabilisieren als den unpolaren Grundzustand (siehe dazu auch Kapitel 2.1.7). Daraus resultiert eine annähernd gleichbleibende Anregungsenergie-differenz, wohingegen die emittierten Photonen energieärmer, also langwelliger sind. Der Stabilisierungseffekt und damit die Absenkung des Energieniveaus des angeregten Zustands wird durch die innerhalb von 10 bis 100 ps erfolgende Solvensrelaxation hervorgerufen. Diese läuft demnach viel schneller ab als die nach einigen Nanosekunden stattfindende Deaktivierung des Farbstoffmoleküls. Die innerhalb von Femtosekunden und damit um Größenordnungen schneller erfolgende Lichtabsorption geht jedoch unbeeinflusst von Solvensrelaxationsprozessen vonstatten [Lakowicz 2006].

Einen weiteren Beleg für den Einfluss des Lösungsmittels auf die spektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors liefert Abbildung 4-29. Sie stellt die Abhängigkeit zwischen *Stokes*-Verschiebung und  $E_T(30)$ -Parametern dar. Der lineare Zusammenhang indiziert ebenfalls das Vorhandensein allgemeiner Lösungsmittelleffekte, welche die Fluoreszenzemission beeinflussen [Song 2009].

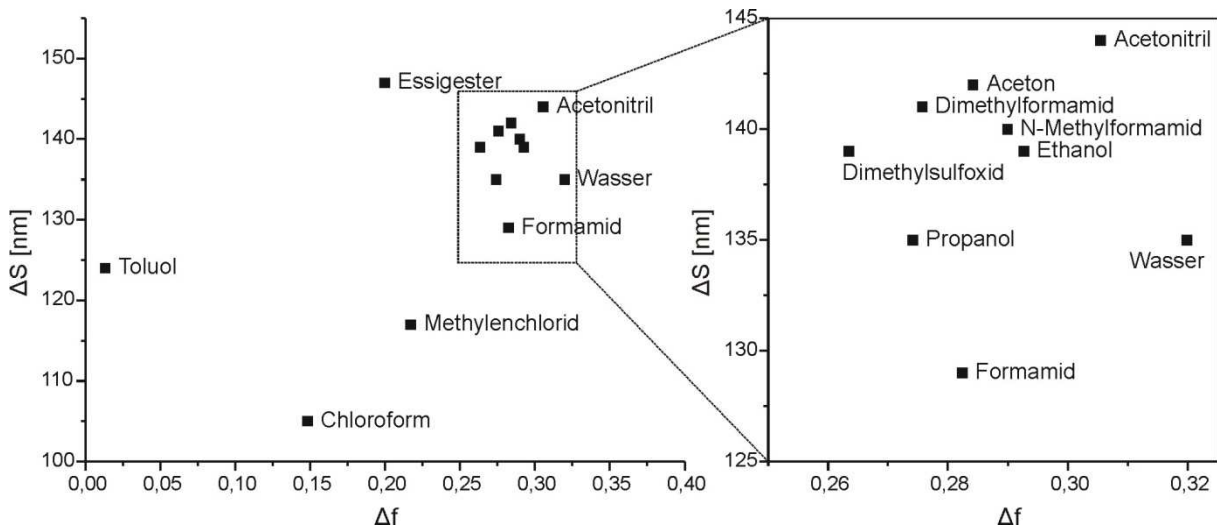


**Abbildung 4-29:**  $\Delta S$  versus  $E_T(30)$ -Graph von Dy-520XL 1  $\mu\text{M}$  in verschiedenen Lösungsmitteln. Die schwarze Trendlinie berücksichtigt alle Werte, wohingegen die rote die drei polarsten Lösungsmittel außer acht lässt.

Unter Nichtberücksichtigung der Werte für die drei polarsten Lösungsmittel N-Methylformamid, Formamid und Wasser mit  $E_T(30)$ -Werten von über 54 kcal/mol ergibt sich ein noch exakterer linearer Verlauf der bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums.

Für ein besseres Verständnis der Solvenspolaritätseffekte erfolgte die Anwendung der *Lippert-Mataga*-Beziehung, welche verbreitet Anwendung findet, um die *Stokes*-Verschiebung mit der Solvenspolarität  $\Delta f$  zu korrelieren. Da der Parameter  $\Delta f$ , auch Orientierungspolarisierbarkeit genannt, lediglich die Auswirkung der Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle auf die *Stokes*-Verschiebung berücksichtigt, ist er ein

Maß für den allgemeinen Lösungsmittelleffekt. Abbildung 4-30 stellt diesen Zusammenhang für Dy-520XL dar.

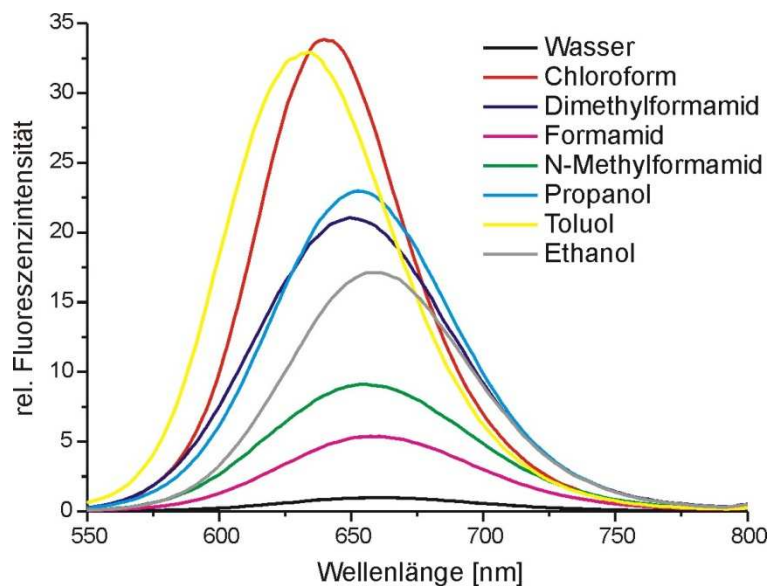


**Abbildung 4-30:** Lippert-Mataga-Diagramm von Stokes-Verschiebung  $\Delta S$  gegen Orientierungspolarisierbarkeit  $\Delta f$  für 1  $\mu\text{M}$  Dy-520XL-Lösungen.

Es ergibt sich kein linearer Anstieg des *Stokes-Shifts* mit zunehmender Solvenspolarität. Demzufolge beeinflussen neben allgemeinen Lösungsmittelleffekten zusätzlich spezifische Lösungsmittelleffekte die Emissionseigenschaften des Farbstoffs. Unter anderem können Wasserstoffbrückenbindungen, Säure-Base-Chemie oder Ladungstransferwechselwirkungen nichtlineare *Lippert-Mataga*-Graphen erzeugen.

### Fluoreszenzquantenausbeute und -lebensdauer

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, haben Lösungsmittelunterschiede zum Teil großen Einfluss auf die Emissionsmaxima. Neben diesen ist der Effekt auf die Quantenausbeute jedoch noch weit ausgeprägter, wie die ausgewählten Fluoreszenzspektren in Abbildung 4-31 belegen. In unpolaren Solventien steigt demnach die Emissionsintensität auf das über 30-fache des Werts in Wasser. Mit zunehmender Lösungsmittelpolarität sinkt die Intensität erheblich.



**Abbildung 4-31:** Fluoreszenzspektren einer 1 µM Dy-520XL-Lösung in den entsprechenden Lösungsmitteln, auf die Intensität des Fluoreszenzspektrums in Wasser normiert.

Zwischen Emissionsabnahme und bathochromer Verschiebung unter Zunahme der Solvenspolarität besteht ein Zusammenhang. Außerdem scheinen protische Lösungsmittel wie Alkohole, (N-Methyl-)Formamid und Wasser die Fluoreszenzemission stark herabzusetzen. Diese Effekte sind für *Charge-Transfer*-Farbstoffe bekannt [Song 2009].

Tabelle 4-3 beinhaltet die Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi$  und -lebensdauern  $\tau$ , welche für Dy-520XL in den verschiedenen Lösungsmitteln erhalten wurden. Die Fluoreszenzabklingkurven zeigten in allen Fällen einen exakt monoexponentiellen Verlauf.

**Tabelle 4-3:** Fluoreszenzquantenausbeuten  $\Phi$  und -lebensdauern  $\tau$  von Dy-520XL in den entsprechenden Lösungsmitteln.

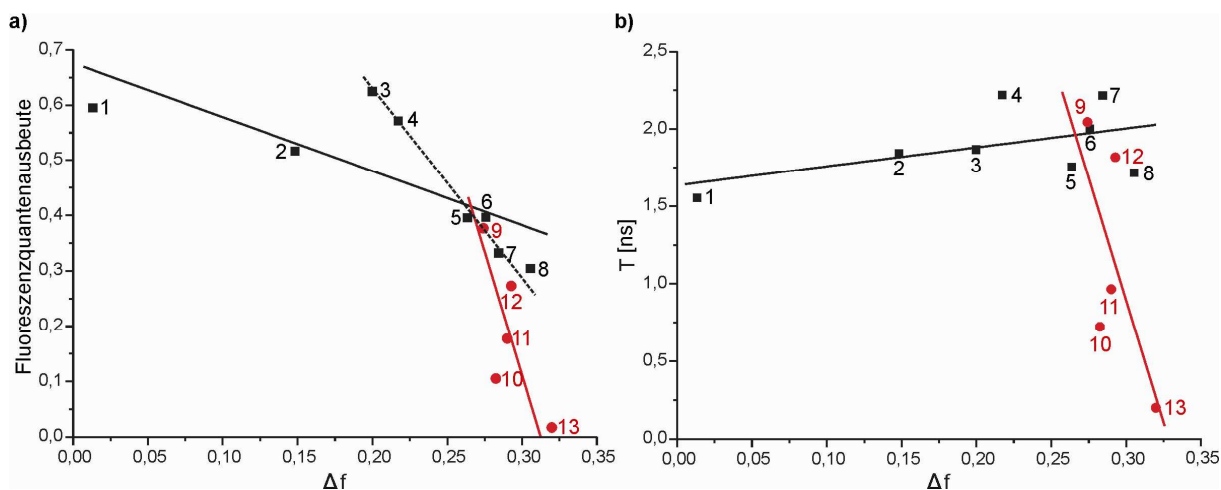
Lösungsmittel	Fluoreszenzquantenausbeute	Fluoreszenzlebensdauer $\tau$
	$\Phi$	[ns]
Methylenchlorid	0,57	2,22
Aceton	0,33	2,22
Propanol	0,38	2,05
Dimethylformamid	0,39	2,00
Essigsäureethylester	0,62	1,87
Chloroform	0,52	1,84
Ethanol	0,27	1,82
Dimethylsulfoxid	0,40	1,76
Acetonitril	0,30	1,72
Toluol	0,59	1,55
N-Methylformamid	0,18	0,97
Formamid	0,11	0,72
Wasser	0,02	0,20

Die Bestimmung der Quantenausbeuten erfolgte nach der unter 3.10.3 beschriebenen Vorgehensweise. Als Referenz wurde Atto 590 verwendet, welcher in wässriger Lösung eine Quantenausbeute von 0,80 besitzt [ATTO-TEC GmbH 2009]. Die Lebensdauerbestimmungen fanden mit  $10^{-8}$  M Lösungen statt.

Analog zum Verhalten der Fluoreszenzmaxima, welche mit bathochromer Verschiebung auf zunehmende Solvenspolaritäten reagierten, ändern sich hierbei konsistent sowohl Quantenausbeuten als auch Lebensdauern sehr stark in



Abhängigkeit des Lösungsmittels. Untenstehende Auftragungen von  $\Phi$  bzw.  $\tau$  gegen  $\Delta f$  verdeutlichen die Beziehungen.



**Abbildung 4-32:** a)  $\Phi$  gegen  $\Delta f$ - sowie b)  $\tau$  gegen  $\Delta f$ -Diagramm für Dy-520XL in verschiedenen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur. Die schwarzen Symbole kennzeichnen aprotische Lösungsmittel, die roten heben die protischen Solventien hervor. Dargestellt sind zusätzlich die Trendlinien, um die vorhandenen linearen Zusammenhänge zu verdeutlichen. Die Nummern bezeichnen die Lösungsmittel: 1 - Toluol, 2 - Chloroform, 3 - Essigsäureethylester, 4 - Methylenechlorid, 5 - Dimethylsulfoxid, 6 - Dimethylformamid, 7 - Aceton, 8 - Acetonitril, 9 - Propanol, 10 - Formamid, 11 - N-Methylformamid, 12 - Ethanol, 13 - Wasser.

Wie Abbildung 4-32 a) veranschaulicht, sinkt die Quantenausbeute für aprotische Lösungsmittel von 0,6 auf 0,3 bei Zunahme der Lösungsmittelpolarität von 0,01 auf 0,31. Vor allem für Solventien mit  $\Delta f$ -Werten zwischen 0,18 und 0,31 ist ein lineares Verhalten ersichtlich. Ebenfalls einen geradlinigen Zusammenhang zwischen  $\Phi$  und  $\Delta f$  weisen die protischen Lösungsmittel auf. Jedoch offenbaren sie im Gegensatz zu den aprotischen einen extremen Abfall der Quantenausbeute mit zunehmendem  $\Delta f$ . Sie fällt von 0,38 für Propanol auf 0,02 für Wasser. Diese Beobachtung belegt eindeutig, dass bei protischen Solventien dem angeregten Dy-520XL ein zusätzlicher nichtfluoreszenter Deaktivierungspfad zu Verfügung steht, welcher in aprotischen Lösungsmitteln nicht beschränkt werden kann.

Die Resultate werden von den Ergebnissen der Fluoreszenzlebensdauermessungen in den entsprechenden Lösungsmitteln untermauert (Abbildung 4-32 b). Es zeigt sich

einmal mehr der klare Unterschied zwischen protischen und aprotischen Lösungen. Während für aprotische Lösungsmittel die Lebensdauer bei zunehmendem  $\Delta f$  bei Werten um 2 ns konstant bleibt bzw. sogar leicht zunimmt, sinkt sie in protischen Solventien mit steigendem  $\Delta f$  rapide. Für Wasser beträgt  $\tau$  lediglich 0,2 ns.

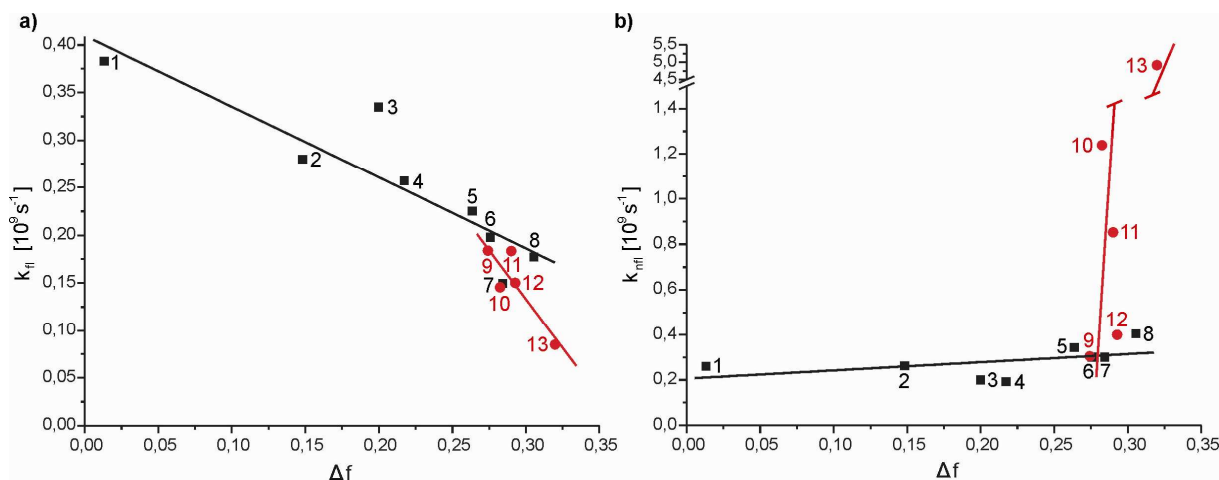
Um zu einem besseren Verständnis für die beteiligten Deaktivierungsprozesse zu gelangen, wurden die fluoreszenten ( $k_{fl}$ ) und nicht fluoreszenten ( $k_{nfl}$ ) Abklingraten für den angeregten Farbstoff in den verschiedenen Lösungsmitteln nach Gleichung 4.3 und 4.4 abgeschätzt [Lippert 1957; Satpati 2009].

$$k_{fl} = \frac{\Phi_{fl}}{\tau_{fl}} \quad (4.3)$$

$$k_{nfl} = \frac{1}{\tau_{fl}} - \frac{\Phi_{fl}}{\tau_{fl}} \quad (4.4)$$

Abbildung 4-33 a) stellt die Auftragung von  $k_{fl}$  gegen  $\Delta f$  dar. Es ergeben sich für die Auftragung ebenfalls lineare Gesetzmäßigkeiten, die Werte von  $k_{fl}$  nehmen über den aufgetragenen  $\Delta f$ -Bereich etwa von  $0,4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$  auf  $0,1 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$  ab. Die Unterschiede zwischen aprotischen und protischen Lösungsmitteln sind gleichfalls vorhanden, jedoch nicht so stark ausgeprägt. Da der Strahlungsprozess in direkter Beziehung zur Übergangswahrscheinlichkeit zwischen den im Emissionsvorgang beteiligten elektronischen Zuständen steht, impliziert die Änderung von  $k_{fl}$  in Abhängigkeit von  $\Delta f$  die Beeinflussung der beiden elektronischen Zustände durch die Lösungsmittelpolarität [Lakowicz 2006].

In Abbildung 4-33 b) sind die Werte von  $k_{nfl}$  gegen  $\Delta f$  aufgetragen, welche wiederum ein lineares Verhalten zeigen, indem sie für aprotische Solventien mit steigender Polarität leicht ansteigen. Für protische Solventien ist ein derartiger Zusammenhang ebenfalls vorhanden, jedoch in viel stärkerer Ausprägung. Diese Resultate belegen, wie die vorherigen, das Vorhandensein eines zusätzlichen Deaktivierungsmechanismus in protischen Lösungsmitteln.



**Abbildung 4-33:** a) Fluoreszente und b) nicht fluoreszente Abklingraten aufgetragen gegen  $\Delta f$  des jeweiligen Lösungsmittels. Fluorophorkonzentration, Farbkodierung und Nummernzuordnung entsprechen der von Abbildung 4-32.

Für viele Coumarinfarbstoffe ist im angeregten Zustand der Übergang vom ICT-Zustand zum sogenannten *Twisted Intramolecular Charge Transfer* (TICT)-Zustand die Ursache für eine schnelle aktivierungskontrollierte Deaktivierung des angeregten Zustands [Barik 2003; Senthilkumar 2004; Dahiya 2005]. Je nach Struktur des betreffenden Farbstoffs tritt der Übergang von ICT nach TICT bei anderen Werten von  $\Delta f$  ein. Polare Lösungsmittel stabilisieren den TICT-Zustand, da mit der Verdrehung des Moleküls eine vollständige Ladungstrennung einhergeht. Aus diesen Gründen wurde ein unterschiedliches Verhalten für protische und aprotische Solventien auf deren Stabilisierungsvermögen des TICT-Zustands zurückgeführt [Arbeloa 1993; Barik 2005]. Mit polaren Gruppen können protische Lösungsmittel durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen besser wechselwirken als es aprotisch-polare Solventien möglich ist. Aus dem Grund setzt für protische Lösungsmittel der Übergang zum TICT-Zustand bereits bei niedrigeren Solventpolaritäten ein als für aprotische.

Für Dy-520XL sind die signifikanten Änderungen der nicht fluoreszenten Abklingrate im untersuchten Polaritätsbereich auf protische Solventien beschränkt. Für polare aprotische Lösungsmittel wie Acetonitril lassen sich keine derartigen Tendenzen erkennen. Für noch polarere aprotische Lösungsmittel sollte der ICT-TICT-Übergang ebenfalls eintreten, da er letztendlich eine Folge steigender  $\Delta f$ -Werte darstellt [Barik 2005]. Aus Ermangelung derartiger Solventien konnte er jedoch nicht

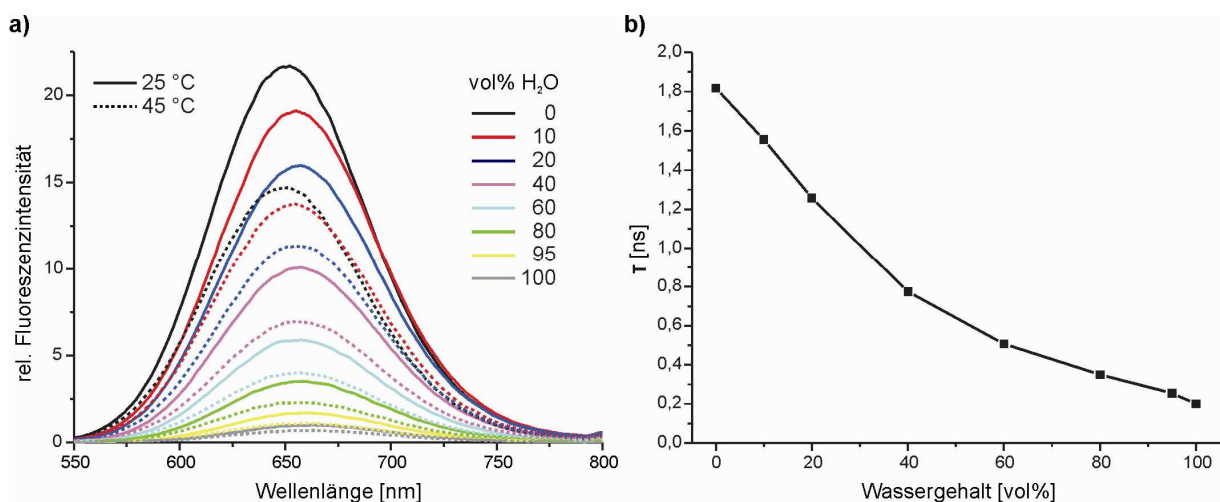
beobachtet werden. In protischen Lösungsmitteln liegt Dy-520XL demnach in der TICT-Konfiguration vor, womit ein zusätzlicher Deaktivierungsmechanismus ermöglicht wird und die nicht fluoreszenten Deaktivierungsraten stark ansteigen, wie Abbildung 4-33 b) eindeutig belegt.

Die aus Teil a) der Abbildung ersichtliche vergleichsweise geringe Änderung der fluoreszenten Abklingraten in Relation zu  $\Delta f$  stützt diese Schlussfolgerungen [Barik 2005].

### Löschen der ICT-Fluoreszenz durch protische Lösungsmittel

Um diesen Effekt detaillierter zu studieren, fanden Messungen in DMF-Wasser-Mischungen unterschiedlicher Zusammensetzungen statt. Obwohl sich die Polaritätswerte von DMF und Wasser nur wenig unterscheiden, sollte mit steigendem Wasseranteil aufgrund der zwischen Wasser und Dy-520XL vorhandenen Wasserstoffbrücken der TICT-Zustand stabilisiert und begünstigt werden und demzufolge die Fluoreszenzemission abnehmen.

Abbildung 4-34 gibt Aufschluss über die Auswirkung eines steigenden Wasseranteils einer DMF-Wasser-Lösung auf die Dy-520XL-Emissionseigenschaften. Diagramm a) stellt die Abnahme der Fluoreszenzintensität bei steigendem Wasseranteil dar.

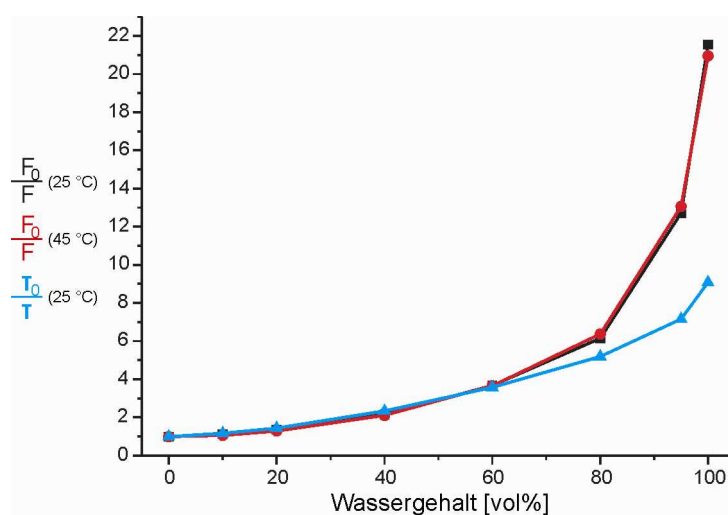


**Abbildung 4-34:** a) Fluoreszenzspektren in DMF mit steigendem Wassergehalt bei 25 °C und 45 °C, normiert auf die Intensität der 100 % wässrigen Lösung bei 25 °C.

b) Fluoreszenzlebensdauer in DMF in Abhängigkeit des Wassergehalts bei 25 °C.

Die sukzessive Verringerung der Fluoreszenzemission belegt die obigen Resultate. Parallel hierzu verkürzen sich erwartungsgemäß die Fluoreszenzlebensdauern, wie aus Teil b) der Abbildung hervorgeht.

Die *Stern-Volmer*-Auftragung des Dy-520XL in Relation zum Wassergehalt einer DMF-Farbstofflösung zeigt Abbildung 4-35. Demnach weisen beide Quotienten einen nicht linearen Verlauf auf. Im Falle der Emissionsintensität ist das gleichbedeutend mit dem Vorliegen einer sowohl statischen als auch dynamischen Fluoreszenzlöschung durch Wasser. Auch der Verlauf des  $\tau$ -Quotienten im Bereich zwischen 1 und  $F_0/F$  spricht für die kombinierte Löschung. Das ist dadurch zu begründen, dass der Farbstoff bereits im Grundzustand über die funktionellen Gruppen teilweise Wasserstoffbrückenbindungen zu den Wasserstoffatomen von Wasser aufbaut. Findet eine Photoabsorption statt, ist somit ein sofortiger ICT-TICT-Übergang möglich, der für die nachfolgende strahlungslose Deaktivierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [Chang 1990]. Der dynamische Anteil ist damit zu begründen, dass die Anzahl oder Art der Wasserstoffbrückenbindungen des unpolaren Farbstoffgrundzustands noch nicht genügt, um nach erfolgter Anregung und der Ausbildung des ICT-Zustandes die sofortige Verdrehung zum TICT-Zustand zu begünstigen.



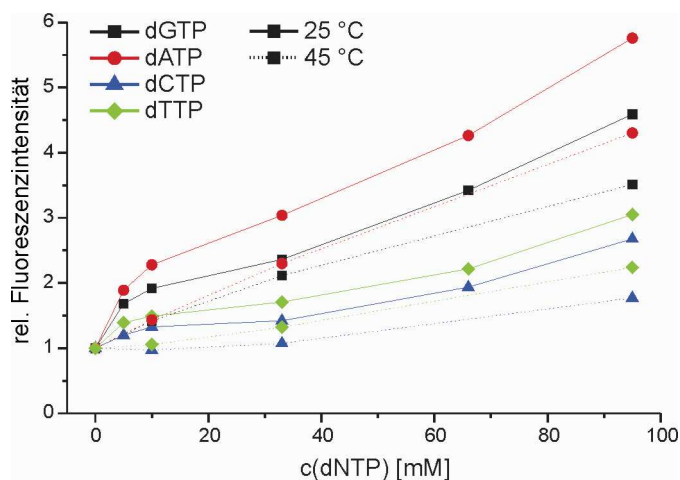
**Abbildung 4-35:** *Stern-Volmer*-Auftragung der Fluoreszenzintensitäten bei 25 °C und 45 °C sowie von  $\tau$  bei 25 °C in einer Wasser-DMF-Mischung.

Hierzu muss erst eine Umorientierung der den Farbstoff umgebenden Lösungsmittelmoleküle erfolgen [Lakowicz 2006]. Dass die Quotienten der Fluoreszenzintensitäten bei 25 °C und 45 °C identisch sind, spricht ebenfalls für eine kombinierte Löschung. Die Faktoren der statischen Löschung, welche bei steigender Temperatur durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken den Quotienten erniedrigen, halten sich mit den verstärkenden Einflüssen des dynamischen Anteils der Löschung, hervorgerufen durch eine erhöhte Beweglichkeit der Solvenshülle, die Waage.

### **Spezifische Lösungsmiteleinflüsse**

Nachfolgend soll der Einfluss spezifischer Lösungsmiteleffekte näher betrachtet werden. Im Gegensatz zu den allgemeinen Solvenseinflüssen versteht man hierunter Effekte, welche eine vergleichsweise kleine Anzahl von Molekülen hervorruft. Die Wechselwirkungen kommen durch Interaktion mit wenigen, den Fluorophor umgebenden Molekülen zustande, die aber nicht so zahlreich vorhanden sind, dass sie die globalen Lösungsmiteleigenschaften beeinflussen. Spezifische Solvenseinflüsse resultieren unter anderem aus Wasserstoffbrückenbindungen, Säure-Base-Chemie oder CT-Wechselwirkungen.

Im Folgenden werden die spezifischen Solvenseinflüsse vorgestellt, welche sich bei Zugabe von **Desoxynukleosidtriphosphaten** (dNTP) zu Dy-520XL-Lösungen ergeben. In Abbildung 4-36 sind die Resultate der entsprechenden Messungen zusammengefasst. Sie zeigen einen je nach Art des Nukleotids unterschiedlich starken Anstieg der Fluoreszenzemission mit zunehmenden Nukleotidkonzentrationen. Im Gegensatz zu den Messungen bei 25 °C weisen die Kurven der Messungen bei 45 °C einen flacheren Anstieg auf. Die Intensitätszunahme durch dNTP-Zugabe ist demnach bei erhöhten Temperaturen geringer. Den größten Einfluss, mit einem annähernd sechsfachen Anstieg bei einer Konzentration von 100 mM, erzeugt dGTP. Die Zugabe von 100 mM dATP generiert einen Intensitätszuwachs um den Faktor 4,5. Die Effekte von gleichen Konzentrationen dTTP und dCTP fallen mit einem 3- bzw. 2,5-fachen Anstieg etwas geringer aus.



**Abbildung 4-36:** Einfluss der dNTP-Zugabe auf die Fluoreszenzemission von Dy-520XL in 5  $\mu$ M wässriger Lösung bei 25 °C und 45 °C.

Damit ergibt sich für die purinbasenenthaltenden Nucleotidtriphosphate ein stärkerer Effekt als für die entsprechenden pyrimidinbasenhaltigen Analoga. Der fluoreszenzverstärkende Einfluss der Nucleotide kann demnach auf die elektronischen Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen aromatischen Systemen von Farbstoff und Nucleobase zurückgeführt werden. Die Interaktionen scheinen für die kleineren monozyklischen Pyrimidinbasen schwächer ausgeprägt als für die größeren bipyklischen Purinbasen. Damit können sie die den TICT-Zustand stabilisierenden Wassermoleküle effektiver vom Farbstoff verdrängen, begünstigen auf diese Weise den ICT-Zustand und mit ihm die fluoreszente Deaktivierung des Farbstoffs.

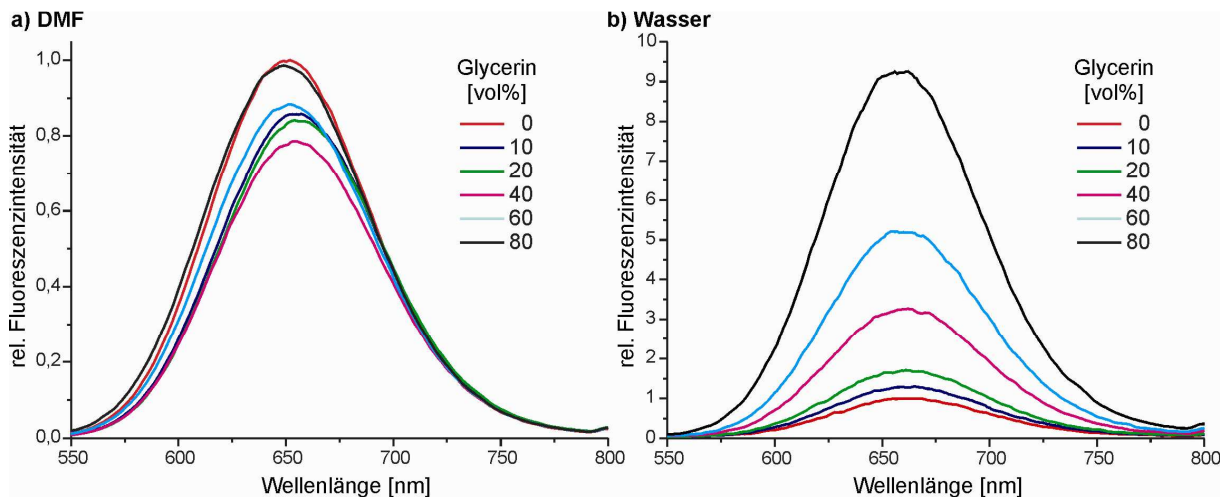
### Lösungsmittelviskosität

Die Viskosität eines Lösungsmittels kann ebenfalls bedeutenden Einfluss auf die Emissionseigenschaften eines Fluorophors haben. Beispielsweise wird durch erhöhte Viskosität die Rotation des Moleküls eingeschränkt, wodurch alternative Deaktivierungspfade nicht verfügbar sind [Rettig 1994]. Außerdem verlängert eine erhöhte Viskosität die Reorganisationszeit der umgebenden Lösungsmittelmoleküle, woraus ebenfalls Auswirkungen auf die Deaktivierung des angeregten Zustands eines Farbstoffs erwachsen können.

Im Allgemeinen begünstigen planare, starre Farbstoffstrukturen die Fluoreszenzemission [Förster 1948]. Hohe Viskosität kann dazu führen, dass nach erfolgter Farbstoffanregung die Reorganisation der Lösungsmittelhülle des angeregten Zustands verlangsamt, somit die planare Grundzustandsstruktur des Farbstoffs stabilisiert wird. Infolgedessen kommt es bevorzugt zu fluoreszenten Deaktivierungsprozessen [Drexhage 1973; Arbeloa 1993].

Auch bei Dy-520XL kann aufgrund seiner Struktur eine erhöhte Solvensviskosität zu Änderungen im Emissionsverhalten führen, denn der ICT-TICT-Übergang erfordert eine Bindungsrotation der 7-Aminogruppe (siehe Schema 4-1).

Um entsprechende Sachverhalte festzustellen, wurden Fluoreszenzmessungen in unterschiedlichen Glycerin-DMF- sowie Glycerin-Wasser-Mischungen durchgeführt. Bedingt durch die etwa 1800-fach erhöhte Viskosität von Glycerin im Vergleich zu DMF oder Wasser, konnten Messungen über einen weiten Bereich dieser Größe vorgenommen werden. Abbildung 4-37 zeigt links die Fluoreszenzspektren der Versuchsreihe in DMF, rechts entsprechende in Wasser.



**Abbildung 4-37:** a) Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit des Glyceringehalts einer Glycerin-DMF-Lösung. b) Abbildung der für entsprechend glycerinhaltige Lösungen bestimmten Fluoreszenzintensitäten. Die Farbstoffkonzentration betrug 1  $\mu\text{M}$ .

Wie den Graphen in Abbildung 4-37 zu entnehmen, übt der steigende Glyceringehalt in DMF keinen nennenswerten Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Dy-520XL aus. Beginnend mit einer reinen DMF-Lösung sinkt der Emissionswert mit

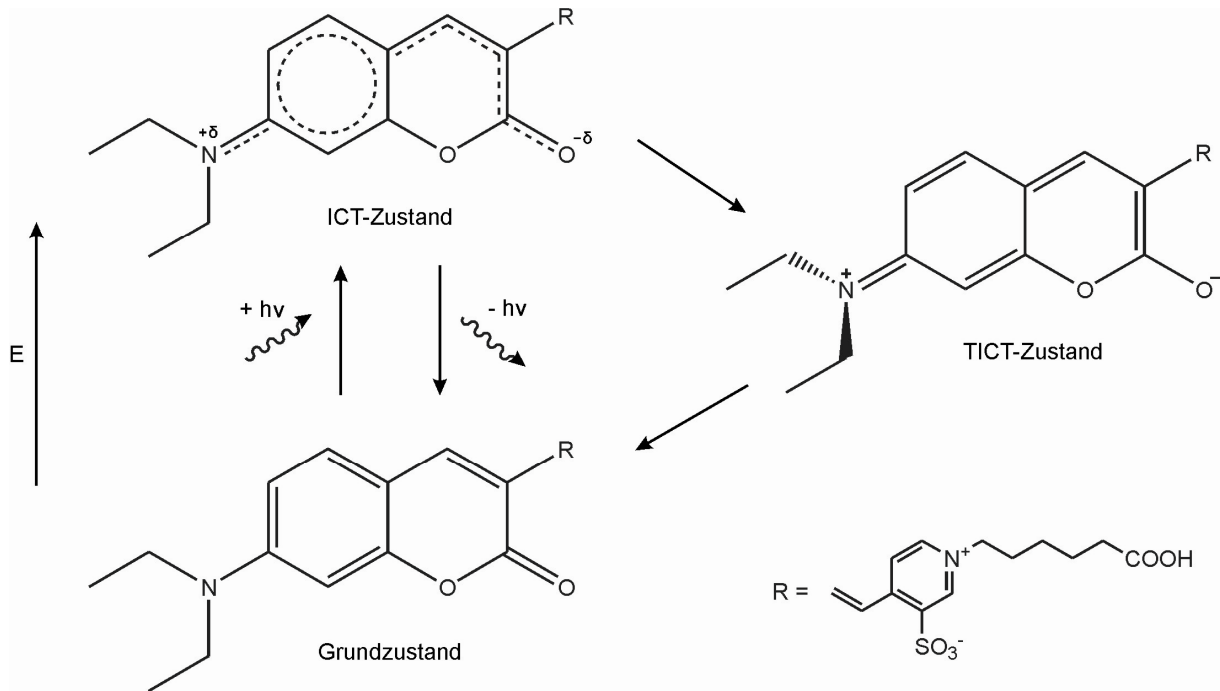


steigender Glycerinkonzentration bis auf 80 % seiner Anfangsintensität. Unter weiter steigendem Glyceringehalt nimmt ab 40 vol% Glycerin die Fluoreszenzemission wieder zu und erreicht das Ausgangsniveau.

Damit belegen die Messungen zuvor anhand der fluoreszenten und nicht fluoreszenten Abklingraten getroffene Schlussfolgerungen. D.h. dass für aprotische Lösungsmittel keine Konformationsänderung des Farbstoffs von ICT nach TICT im angeregten Zustand auftritt. Die Ergebnisse stimmen mit denen aus der Auftragung von  $k_{fl}$  bzw.  $k_{nfl}$  gegen  $\Delta f$  in Abbildung 4-33 überein, da auch diese für aprotische Lösungsmittel keine signifikanten Änderungen der Abklingraten mit steigender Solvenspolarität erkennen lassen.

Demgegenüber steht der signifikante Anstieg der Fluoreszenzemission bei steigender Glycerinkonzentration in Wasser, welcher ein weiterer Beleg für den Übergang zum TICT-Zustand des angeregten Dy-520XL in protisch-polaren Solventien darstellt. Wie bereits erwähnt und aus Schema 4-1 ersichtlich, ist mit dem ICT-TICT-Konformationswechsel neben der Ladungsseparation eine räumliche Strukturänderung verbunden. Die gesteigerte Viskosität durch Zusatz von Glycerin erschwert jedoch die Drehung der 7-Diethylaminogruppe und infolgedessen das Erreichen des TICT-Zustands, womit die Fluoreszenzemission durch Erhalt des ICT-Zustands und dessen fluoreszenter Deaktivierung zunimmt.

Die Fluoreszenzlebensdauern des Dy-520XL ändern sich in beiden Mischungen, wie in den vorherigen Experimenten und Auftragungen zu beobachten, synchron mit der Änderung der Fluoreszenzemission.



**Schema 4-1:** Strukturformeln der unterschiedlichen an Absorptions- und Emissionsprozessen beteiligten Zustände des Dy-520XL.

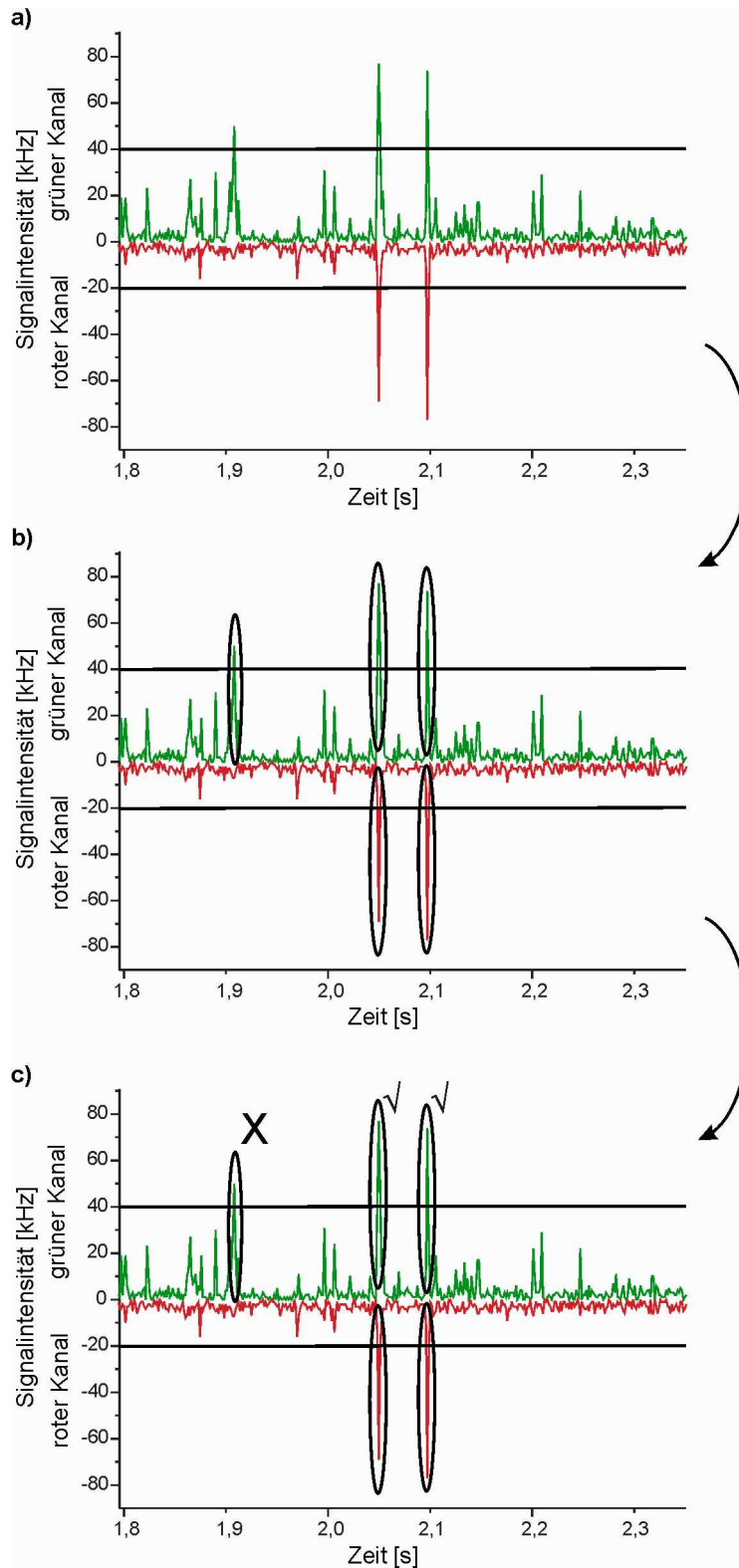
Zusammenfassend lässt sich für den Fluoreszenzfarbstoff Dy-520XL aufgrund der unter variierenden Bedingungen beobachteten spektralen Eigenschaften feststellen, dass er einen typischen Vertreter der Coumarinfarbstoffe, im speziellen der 7-Aminocoumarine, darstellt. Die breite Absorptions- und Emissionsbande sind ebenso wie der große *Stokes-Shift* charakteristische Merkmale dieser Farbstoffklasse. Unter Zunahme der Lösungsmittelpolarität erfährt das Emissionsmaximum eine stärkere bathochrome Verschiebung als die der Absorption, wofür der *Intramolecular Charge Transfer* als Folge der Farbstoffanregung verantwortlich ist. Die weiteren Untersuchungen belegen den Übergang vom ICT- zum TICT-Zustand unter Anwesenheit protisch-polarer Solventien, von welchem ein zusätzlicher strahlungsloser Übergang in den Grundzustand ermöglicht wird.

#### 4.4.4 Entwicklung eines Programms zur Signalkorrelationsdetektion auf Einzelmolekülebene

In Kapitel 4.4.1 wurde bereits die Funktionsweise des Proteasenachweissystems vorgestellt. Demnach geht die Proteaseaktivität direkt aus der Anzahl der korrelierten Signale pro Zeiteinheit hervor. Zur Auswertung der gemessenen Fluoreszenzdaten ist deshalb ein Computerprogramm nötig, welches die zwischen den beiden Detektionskanälen korrelierten Ereignisse erkennt und erfasst.

In Ermangelung eines derartigen kommerziellen Programms wurde in *LabView*, einem graphikbasierten Programmiersystem, für diesen Zweck ein Algorithmus entwickelt. Abbildung 4-38 skizziert dessen Funktionsweise. Da jeder Hersteller von Einzelmoleküldetektionskarten und -software seine eigenen Dateiformate verwendet, greift das Programm auf gebinnte Daten zurück und ermöglicht somit einen universellen Einsatz.

Wie unter Teil a) der Abbildung zu sehen, besteht der erste Schritt aus der Festlegung der Detektionsgrenzen. Dies geschieht manuell und für jeden Kanal individuell, um auf variierende Detektionseffizienzen, hervorgerufen durch leicht differierende Justagen oder erhöhte Untergrundsignale aufgrund „unsauberer“ Probenbestandteile reagieren zu können. Gerade Letzteres lässt sich bei Arbeiten mit Proteinen nicht immer gänzlich vermeiden. Zusätzlich bietet die Einstellung die Möglichkeit, die Anzahl der erfassten Signale der beiden Kanäle anzugleichen, um mit identischen Voraussetzungen arbeiten zu können.

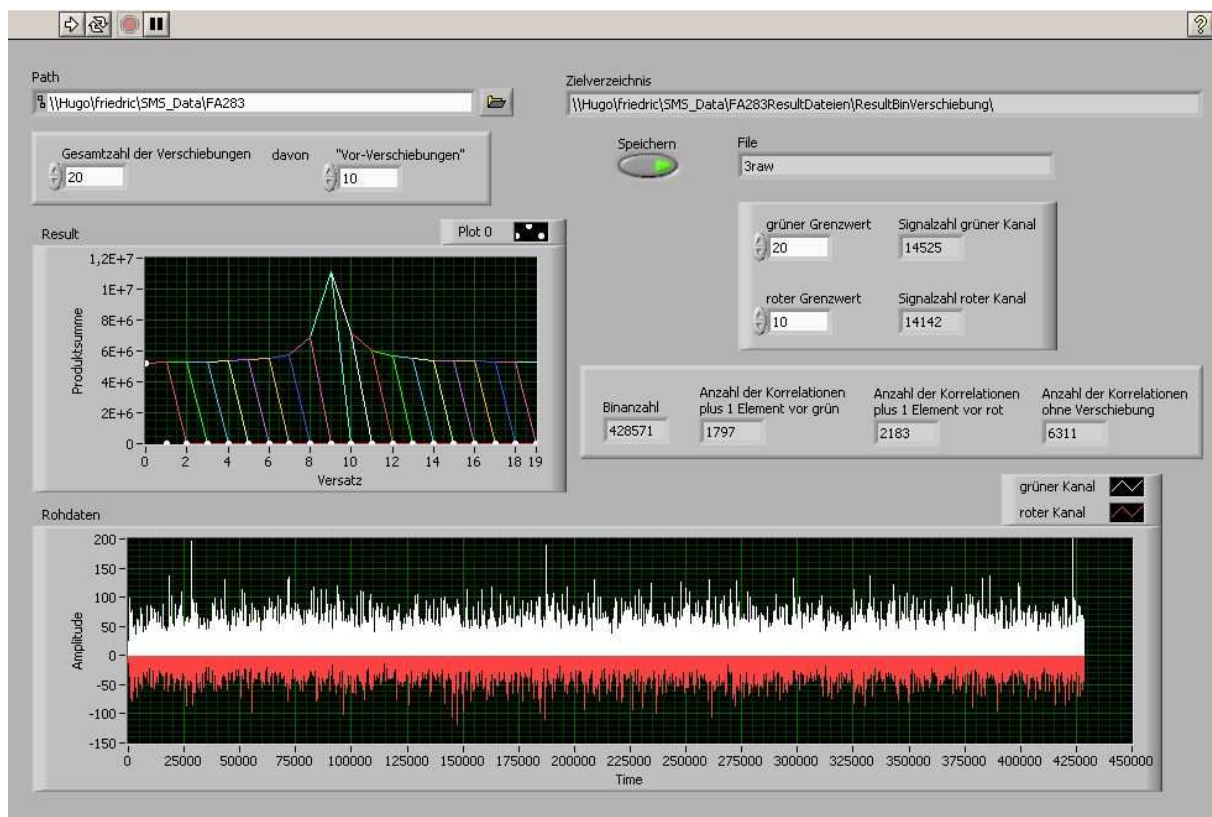


**Abbildung 4-38:** Graphische Darstellung der Funktionsweise des Algorithmus: **a)** Festlegung der Grenzen für die Signalerkennung, **b)** Signalidentifizierung und **c)** Erkennung der korrelierten Ereignisse.

Im nächsten Schritt, dargestellt in Teil b) von Abbildung 4-38, identifiziert der Algorithmus alle Signale, welche die gesetzten Grenzen übersteigen. Wie aus c) ersichtlich, erfolgt daran anschließend die Erkennung eines korrelierten Ereignisses durch Vergleich der jeweils zeitlich entsprechenden Intensitätswerte der beiden Kanäle.

Aufgrund der arbeitsspeicherintensiven Prozesse bei Verarbeitung der umfangreichen Einzelmolekülspektroskopiedateien stellte die Prozessoptimierung auf handelsüblichen Computern eine große Herausforderung dar. Schließlich konnten die Abläufe hinsichtlich der benötigten Berechnungszeit sowie des angeforderten Speicherplatzes derart gestaltet werden, dass die Ausführung in wenigen Sekunden bei unter 1 GB Arbeitsspeicherbedarf abläuft. Im Anhang sind die Ebenen des Blockdiagramms, welche den graphischen Programmcode enthalten, abgebildet.

Die Benutzeroberfläche zur Bedienung des Programms ist in Abbildung 4-39 wiedergegeben.



**Abbildung 4-39:** Ansicht der Benutzeroberfläche des Korrelationserfassungsprogramms.

Sie dient der Eingabe der zu analysierenden Datei, zur Festlegung der Detektionsgrenzen und zur Bestimmung des Speicherorts für die ausgegebenen Dateien. Diese enthalten die Ergebnisse unter Angabe der verwendeten Parameter und sind aufgrund ihres \*.txt-Formats problemlos zur weiteren Analyse in andere Programme importierbar. Die Routine ist derart gestaltet, dass sie per Stapelverarbeitung sämtliche in einem Ordner befindlichen Dateien nacheinander bearbeitet und automatisch separat speichert, ohne dass vom Nutzer weitere Eingaben nötig werden. Zur visuellen Kontrolle der eingelesenen Intensitätsspuren sind diese im unteren Teil der Oberfläche dargestellt. Darüber befindet sich auf der linken Seite ein weiteres Schaubild. Es dient der Erkennung technischer Artefakte. Inhalt des Diagramms ist die Summe des Produkts der beiden Intensitäten jedes Zeitintervalls, wobei der zweite Kanal vor Multiplikation jeweils um die in der Abszisse angegebenen Intervalle verschoben wird. Das Ergebnis ist ein Signal, dessen Maximum unter Verwendung der Standardwerte, abgebildet in der Mitte, liegen muss. Ist das nicht der Fall, wären die Kanäle zeitlich verschoben, wodurch nicht die reale Zahl von Korrelationsereignissen detektiert werden würde. Rechts neben diesem Graphen befindet sich die Anzeigetafel, welche über die pro Kanal mit den entsprechenden Grenzen detektierten Signale sowie über die Anzahl korrelierter Signale informiert.

#### **4.4.5 Charakterisierung des Messsystems**

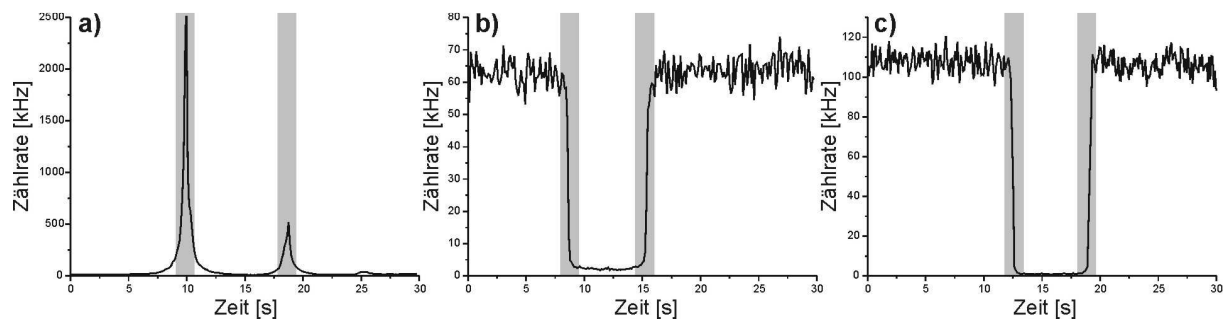
A 520, ein speziell für die Laserfluoreszenzspektroskopie entwickelter Farbstoff, zeigt unter physiologischen Bedingungen hohe Helligkeiten. Demgegenüber bieten die Fluoreszenzeigenschaften von Dy-520XL unter diesen Bedingungen Spielraum für Verbesserungen (siehe Kapitel 4.4.3). Daher konzentriert sich dieses Kapitel auf die Systemoptimierung hinsichtlich der Helligkeit des Dy-520XL.

#### **Oberflächenadsorptionseffekte der Messkammern**

Adsorption von Probenmaterial wie Proteinen oder DNA in Reaktionsgefäßen stellen eine bekannte und verbreitete Problematik im Laboralltag dar. Speziell in den niedrigen Konzentrationsbereichen, welche für einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen Verwendung finden, sind die sich daraus ergebenden Effekte gravierend. Deshalb ist es von großer Bedeutung, bei allen Arbeiten diesem

Sachverhalt Rechnung zu tragen und geeignete, aus nicht zur Adsorption neigenden Materialien bestehende Gefäße zu verwenden [Marmé 2008].

Auch bei der Durchführung der eigentlichen Messung sind Adsorptionseffekte zu berücksichtigen, indem die Oberflächenadsorption in den Messkammern unterbunden oder zumindest minimiert wird. Abbildung 4-40 zeigt Fluoreszenzintensitätsspur, aufgenommen beim Durchfahren der Probenlösung in z-Richtung. Die Lösung enthält farbstoffmarkierte Oligonukleotide in nanomolarer Konzentration.



**Abbildung 4-40:** Aufnahmen der Fluoreszenzintensitätsänderungen beim Durchfahren der Probenlösung und des Messkammerbodens in z-Richtung **a)** ohne Kammerbeschichtung und Zusatzstoffe, **b)** mit BSA-Beschichtung und **c)** mit Zusatz von 0,01 % NP-40 zur Probenlösung. Die Grenzschicht Probenlösung-Kammerboden ist jeweils grau hinterlegt.

Aus Abbildungsteil a) geht hervor, dass sich ein Großteil der fluoreszenzmarkierten DNA-Sequenzen auf den unbehandelten Messkammerboden absetzt, wie die starken Ausschläge der Intensitätswerte beim Passieren der Grenzschicht Lösung-Kammerboden verdeutlichen. Demgegenüber sind bei Verwendung BSA-beschichteter Kammern (b) bzw. unter Zusatz von 0,01 % NP-40 zur Probenlösung (c) derartige Adsorptionseffekte nicht zu beobachten. Die detektierte Fluoreszenzintensität fällt ohne Ausschlag beim Durchqueren des Bodens vom Wert der Lösung auf 0 ab. Die beiden Methoden zur Unterbindung der Adsorption sind somit für die weiteren Messungen zweckmäßig.

### **Auswirkung von Zusatzstoffen auf die Dy-520XL-Fluoreszenzemission**

Im Gegensatz zu A 520, der unter physiologischen Bedingungen eine hohe Helligkeit erbringt, ist dies für Dy-520XL nicht der Fall, wie bereits aus den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.3 hervorgeht. Um die Helligkeit des Farbstoffs zu steigern, wurden die Auswirkungen verschiedener Zusatzstoffe auf das Emissionsverhalten untersucht. Dass auf diese Weise die Bildung eines Triplettzustands oder die Zerstörung von Fluorophoren durch *Photobleaching* reduziert werden kann, ist für viele Farbstoffklassen bekannt [Vogelsang 2008].

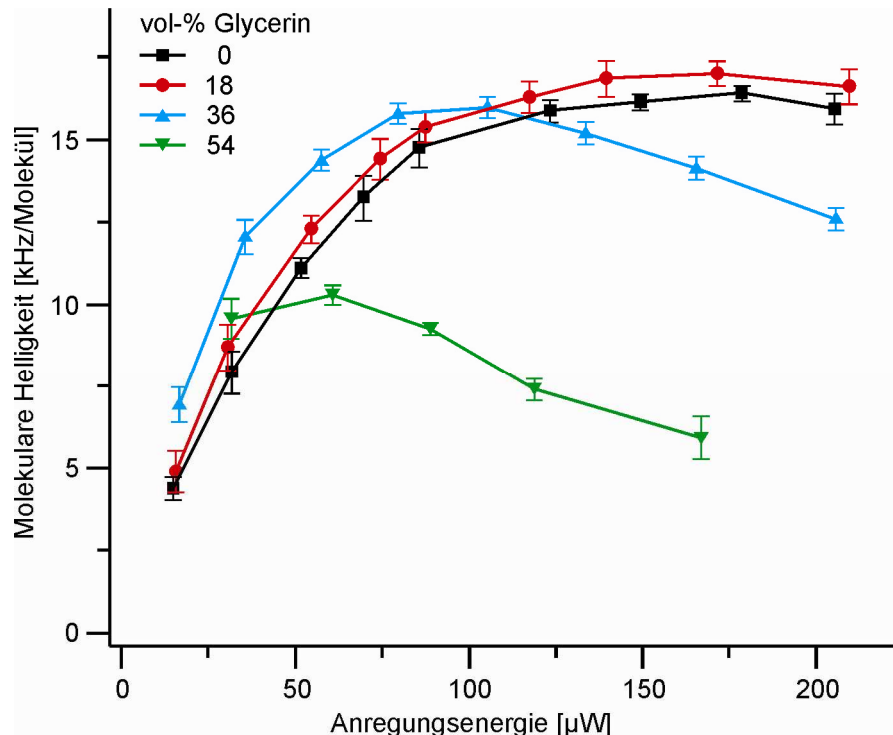
Die Zugabe derartiger Substanzen resultierte jedoch nicht in einer Steigerung der Fluoreszenzemission des Dy-520XL. Er verhält sich auch in dieser Beziehung analog zu den meisten Coumarinfarbstoffen, welche eine sehr geringe Neigung zur Ausbildung des Triplettzustands aufweisen [Jones 1980; 1985].

Ferner erbrachte die Variierung des Puffers durch Zusatz verschiedener Salze keine Intensitätssteigerungen. Lediglich eine hohe Konzentration von mehr als 1 M an Sulfatsalzen, vor allem Natriumsulfat, erhöhte die Fluoreszenzemission des Dy-520XL um etwa 40 %. Da eine derart hohe Salzkonzentration problematisch ist, wurde auf den Einsatz von Sulfaten verzichtet.

### **Dy-520XL-Fluoreszenzemission in Abhängigkeit der Anregungslaserenergie**

Die optimale Anregungsenergie des Lasers ist durch Aufnahme sogenannter Sättigungskurven ermittelbar. Hierzu regt man den Fluorophor mit unterschiedlichen Laserintensitäten an und errechnet aus den erhaltenen FCS-Daten die Helligkeit pro Farbstoffmolekül bei der entsprechenden Anregungsenergie. Abbildung 4-41 beinhaltet das Ergebnis der Messungen, bei welchen dem standardmäßig verwendeten PBS-Puffer zusätzlich unterschiedliche Glycerinkonzentrationen zugesetzt wurden. Der Dy-520XL war an ein 25-mer Oligonukleotid gekoppelt, wie es für die Markierung Verwendung findet. Die Konzentration betrug 5 nmol/l.





**Abbildung 4-41:** Sättigungskurven des Dy-520XL unter verschiedenen Glycerinkonzentrationen.

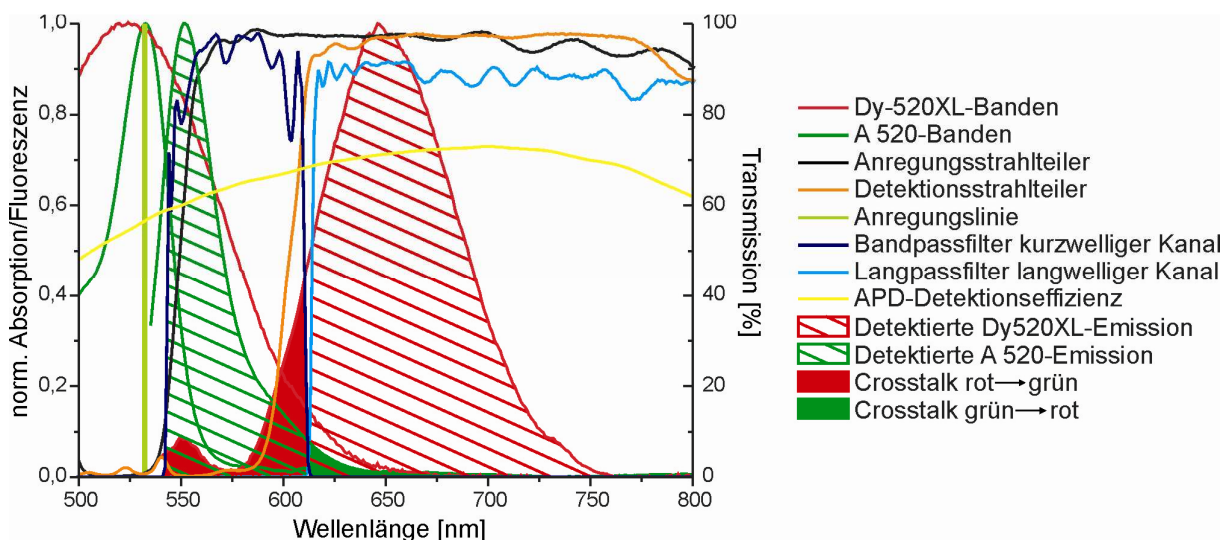
Aus dem Diagramm lässt sich entnehmen, dass die Helligkeit pro Farbstoff bis 80  $\mu\text{W}$  Laserleistung linear auf knapp 15 kHz/Molekül steigt. Unter fortdauernder Laserleistungssteigerung setzt ein Sättigungseffekt ein, d.h. die Emissionszunahme bleibt hinter den zuvor zu beobachtenden linear anwachsenden Werten zurück. Bei etwa 150  $\mu\text{W}$  Leistung erreicht die molekulare Helligkeit ihr Maximum und beginnt unter höheren Anregungsleistungen wieder zu sinken.

Dabei bewirkte, im Gegensatz zu den Resultaten aus Kapitel 4.4.3, ein Glycerinzusatz keinen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzemission. Im Gegenteil verminderte sich bei erhöhten Glycerinkonzentrationen die molekulare Helligkeit. Einzige Ursache hierfür kann die Anbindung des Farbstoffs an die DNA sein, wodurch der Emissionswert im Vergleich zum freien Fluorophor gesteigert wurde und eine Glycerinzugabe keine zusätzliche Verstärkung bewirkte, sondern durch Behinderung der Farbstoff-Nukleobasen-Wechselwirkung eine Verminderung der Emissionsintensität hervorrief.

Aus den Resultaten ergab sich eine optimale Anregungsleistung des Lasers von 70 bis 80  $\mu\text{W}$ , da höhere Leistungen in einem schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis resultiert hätten.

### Detektionseffizienz und *Crosstalk*

Das Übersprechen der Emissionssignale der beiden verwendeten Fluorophore in den jeweils anderen Detektionskanal lässt sich durch mehrere Faktoren beeinflussen. Bereits durch Auswahl geeigneter Fluorophore kann der *Crosstalk* eingeschränkt werden. In dieser Hinsicht stellen die Farbstoffe A 520 und Dy-520XL aufgrund der geringen spektralen Überlappung ihrer Emissionsbanden die beste Möglichkeit dar. Zusätzlich sind passend auf die Emissionsbanden abgestimmte Filter weitere Mittel den *Crosstalk* zu reduzieren. Demgegenüber steht das Ziel, einen größtmöglichen Teil der emittierten Fluoreszenz der Fluorophore zu detektieren. Somit muss ein sinnvoller Kompromiss zwischen *Crosstalk*-Minimierung und Detektionsmaximierung getroffen werden. In Abbildung 4-42 sind die Absorptions- und Emissionsbanden der beiden Farbstoffe in Kombination mit den verwendeten Strahlteilern und Filtern wiedergegeben. Die schraffierten Flächen symbolisieren die Detektionseffizienz bezüglich des Emissionsspektrums jedes Farbstoffs, während die ausgefüllten Zonen den auftretenden *Crosstalk* markieren.



**Abbildung 4-42:** Verwendete Filterkonfiguration für die A 520-Dy-520XL-Korrelationsmessungen. Eingezeichnet sind ferner die Absorptions- und Emissionsbanden von A 520 und Dy-520XL sowie deren jeweils detektierte bzw. *Crosstalk*-verursachende Bandenteile.

Unter Berücksichtigung der Transmissionswerte der einzelnen Filter bzw. Strahlteiler sowie der APD-Detektionsrate ergibt sich für Dy-520XL eine Detektionseffizienz von

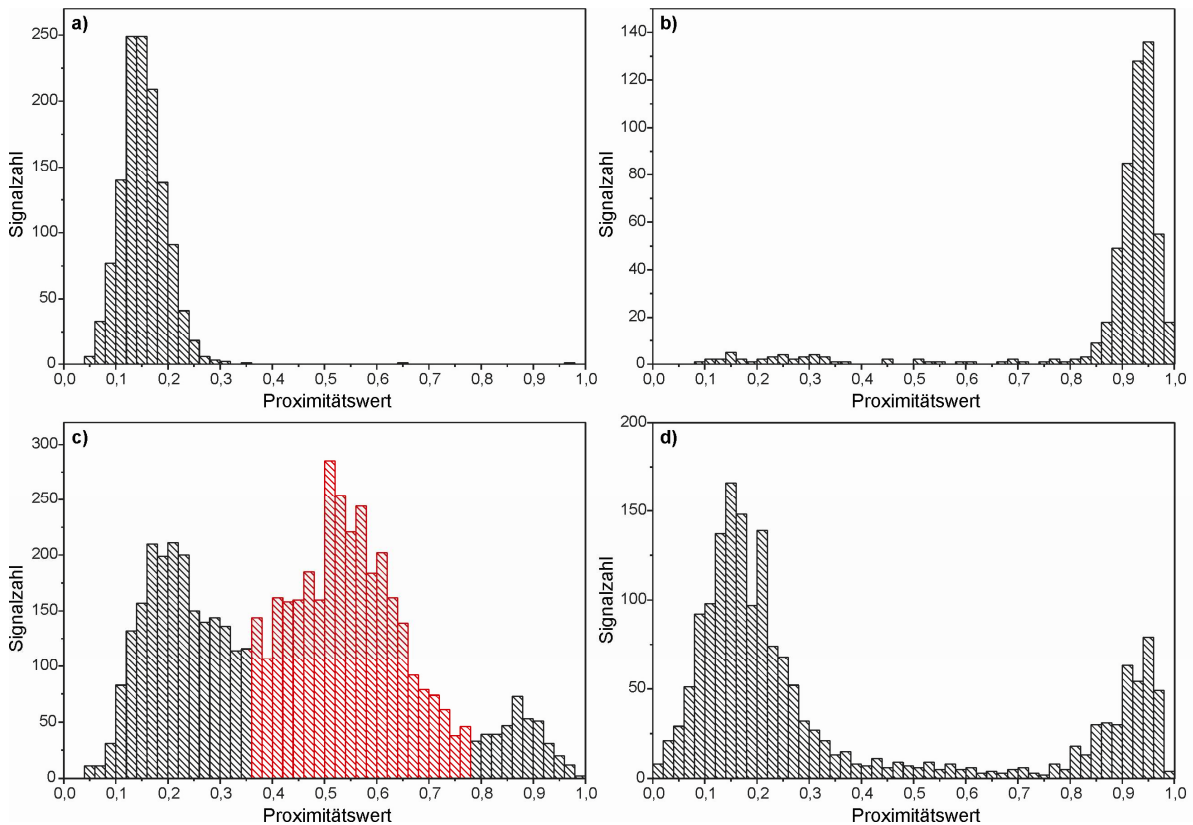
53 % und für A 520 eine von 41 %. Der *Crosstalk* beträgt im kurzwelligen Detektionskanal für Dy-520XL 2,3 %, A 520 verursacht im langwelligen Kanal ebenfalls 2,3 %.

In diesen ist zusätzlich noch eine leicht erhöhte Untergrundrate zu verzeichnen, da die erste *Raman*-Linie von Wasser bei 650 nm in den Detektionsbereich fällt [Gansen 2008]. Ein Blocken des Spektralbereichs mit einem schmalbandigen Filter erfolgte versuchsweise, führte jedoch zu einem zu starken Intensitätsverlust bezüglich der Dy-520XL-Emission und wurde infolgedessen nicht angewendet.

#### 4.4.6 Messungen mit Modellverbindungen

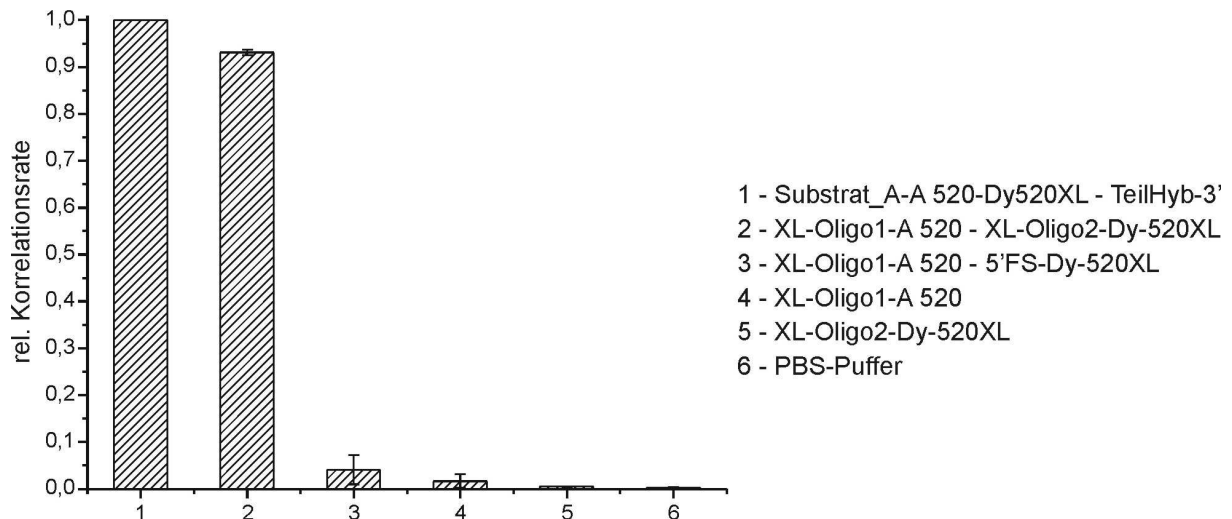
Zur Etablierung des Detektionssystems fanden farbstoffmarkierte Oligonukleotide Verwendung, welche die in späteren Untersuchungen eingesetzten A 520- und Dy-520XL-markierten Proteine simulierten. Durch gleichzeitige Anbindung von Atto 520 und Dy-520XL an einen DNA-Strang bzw. durch Hybridisierung jeweils mit einem unterschiedlichen Fluorophor markierten komplementären Sequenzen sind Proben zu erhalten, welche korrelierte Signale erzeugen.

Abbildung 4-43 gibt das Histogramm der Signalzahlen über den Proximitätswert wieder. Letzterer ist ein Maß für die Intensitätsverteilung eines Fluoreszenzsignals auf beide Detektionskanäle. Im Falle einer aus A 520 bestehenden Probe a), deren Emission nahezu ausschließlich im kurzwelligen Kanal detektiert wird, erhält man eine um 0,15 gruppierte Signalverteilung. Bei Dy-520XL-Lösungen b) verhält es sich entgegengesetzt: Das Maximum der Verteilung befindet sich bei 0,95. Nur wenn die Signale zeitgleich registriert werden, resultiert daraus eine Verteilung zwischen den Extremwerten null und eins, wie in c) für ein A 520- und Dy-520XL-markiertes Oligonukleotid dargestellt. Hingegen erhält man ohne eine zeitliche und demzufolge auch räumliche Korrelation ein wie unter d) abgebildetes Histogramm, welches aus der Überlagerung der beiden isolierten Signalverteilungen bei null und eins hervorgeht.



**Abbildung 4-43:** Histogramm der Signalverteilung über den Proximitätswert von **a)** A 520-, **b)** Dy-520XL-, **c)** A 520- und Dy-520XL-markierten Oligonukleotiden. Teil **d)** gibt die Signalverteilung einer Probe mit zwei nicht hybridisierten, A 520- bzw. Dy520XL-markierten Einzelsträngen wieder.

Die Signale, welche die mittlere Verteilung (rot) in Abbildung 4-43 c) erzeugen, registriert das in Kapitel 4.4.4 vorgestellte Programm, da sich ihre Fluoreszenz-emission auf beide Detektionskanäle verteilt. Demzufolge ist aus der Anzahl derartiger Ereignisse beispielsweise eine doppelt A 520- und Dy-520XL- von einer einfach markierten Probe unterscheidbar. Abbildung 4-44 belegt dies anhand der relativen korrelierten Signalzahlen von verschiedenen DNA-Sequenzen, welche nach den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.3 für bestmögliche Dy-520XL-Emissionsraten konzipiert wurden.



**Abbildung 4-44:** Relative Korrelationszahlen von (nicht) korrelierten DNA-Modellsystemen. Aufgetragen sind die aus jeweils drei Replikaten erhaltenen Mittelwerte der Korrelationszahlen unter Verwendung der verschiedenen Detektionsgrenzen (21, 28 und 42 kHz) bei Analyse der zehnmütigen Messungen. Die Konzentration farbstoffmarkierter DNA betrug in allen Proben 50 pM.

Die Proben 1 und 2, bei welchen die beiden Farbstoffe über Oligonukleotide miteinander verbunden sind, erzeugen deutlich mehr korrelierte Signale als Probe 3, bei welcher eine derartige Beziehung der Farbstoffe fehlt. Deren Korrelationswert relativ zur zweifach markierten Probe 1 beläuft sich auf 0,03. Auch die einen der beiden Farbstoffe beinhaltenden Proben 4 und 5 weisen mit 0,01 bzw. 0,001 vernachlässigbare Korrelationswerte auf. In Kombination mit dem nicht existenten Hintergrundwert des Puffers belegt dies die Spezifität der Methode, welche nicht durch korrelierte Artefakte aus statistisch zusammenfallenden Signalen beeinflusst wird.

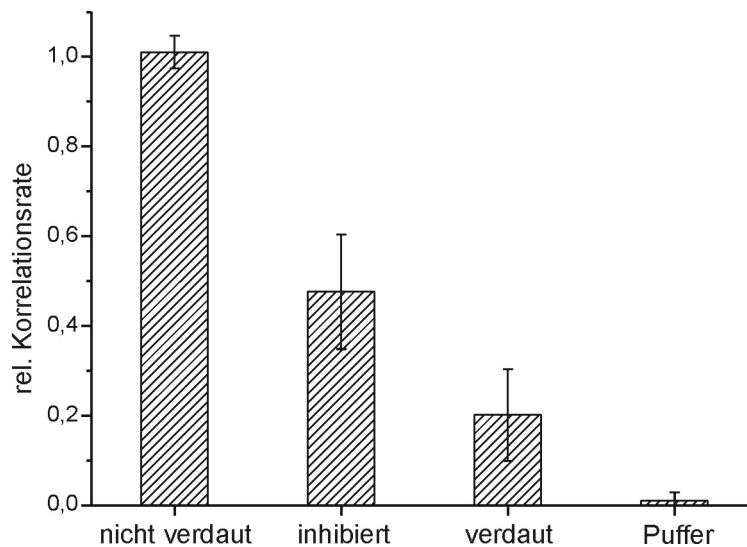
Die Werte für Abbildung 4-44 wurden erhalten, indem man für die verschiedenen Detektionsgrenzen und Proben mithilfe des Programms die jeweiligen korrelierten Signalzahlen ermittelte. Die dabei verwendeten Grenzen müssen drei Bedingungen erfüllen:

- Hoch genug für ein Herausfiltern der unspezifischen Untergrundsignale
- Vergleichbare Signalzahlen in beiden Kanälen
- Tief genug zur Registrierung einer für statistische Analysen ausreichenden Signalzahl

Wie Abbildung 4-44 belegt, führt eine Variierung der Detektionsgrenzen zu keinerlei Veränderungen der Ergebnisse, solange diese drei Kriterien Gültigkeit haben. Der Unterschied zwischen den einzelnen gemessenen Replikaten einer Probe erwies sich größer als der durch die Grenzenvariation hervorgerufene.

#### 4.4.7 Messung des proteolytischen Verdaus

Nach dem im voranstehenden Kapitel vorgestellten Prinzip fand die Detektion des proteolytischen Verdaus am Beispiel von Trypsin mit BSA als Substrat statt. Die Markierung mit A 520 und Dy-520XL erfolgte analog des unter Kapitel 4.1 bis 4.3 beschriebenen Verfahrens über Oligonukleotidsequenzen. Wie Abbildung 4-45 belegt, konnte der Verdau des Substrats anhand der Abnahme der Korrelationswerte der betreffenden Proben eindeutig nachgewiesen werden.

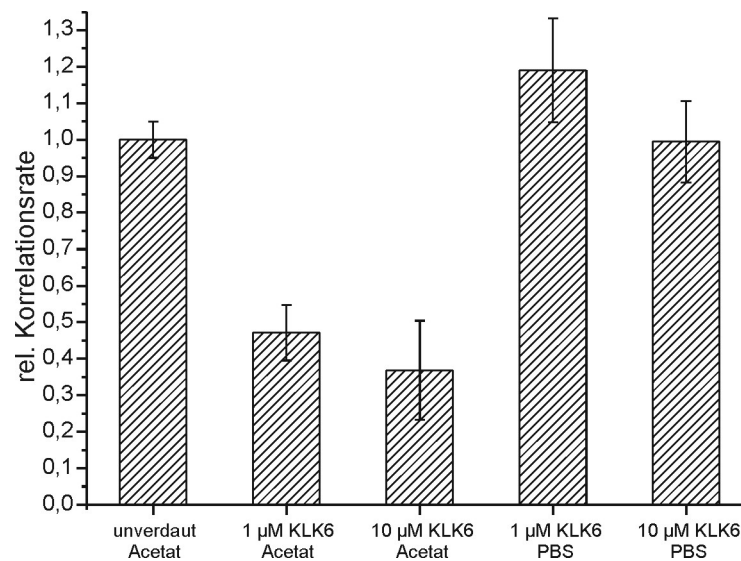


**Abbildung 4-45:** Relative Korrelationswerte von A 520- und Dy-520XL-markiertem BSA nach proteolytischem Verdau durch Trypsin, nach Inkubation mit AEBSF-inhibiertem Trypsin, ohne Trypsinzugabe und dem Korrelationswert aller Komponenten außer dem Substrat. Dargestellt sind die mittleren relativen Korrelationswerte dreier Replikate, welche jeweils unter Verwendung der drei Grenzen 42, 49 und 63 kHz analysiert wurden.

Der Verdau geschieht bei Raumtemperatur in 2,5 h bei 100 nM Substrat- und 1  $\mu$ M Trypsinkonzentration in 10  $\mu$ l PBS-Puffer. Zur Durchführung der zehnminütigen Messung wurden die Proben auf eine Substratkonzentration von 50 pM verdünnt,

wobei der PBS-Puffer zur Vermeidung von Adsorptionseffekten 0,01 % NP-40 enthielt. Der relative Korrelationswert sank in Anwesenheit von Trypsin auf einen Wert von 0,20. Die Zugabe eines 100-fachen Überschusses des irreversiblen Inhibitors AEBSF (4-[2-**Aminoethyl**]benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid) zur Trypsinlösung zehn Minuten vor Vermischen mit dem Substrat führte zu keiner vollständigen Hemmung der Protease. Es war noch eine erhaltene Restaktivität detektierbar, wie der entsprechende Korrelationswert von 0,48 belegt. Für die Pufferprobe, welche bis auf das Substrat alle Bestandteile enthielt, war ein Wert von 0,01 zu ermitteln.

Neben den Messungen mit Trypsin fanden Untersuchungen mit der tumorassoziierten Serinprotease Kallikrein 6 (KLK6), ebenfalls in Verbindung mit BSA als markiertem Substrat, statt. In Abbildung 4-46 sind die Ergebnisse der betreffenden Messungen dargestellt.



**Abbildung 4-46:** Auswirkung der Zugabe von KLK6 auf die relativen Korrelationswerte eines BSA-Substrats in Acetatpuffer pH 4,5 bzw. PBS pH 7,4. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Replikate, welche jeweils unter Verwendung der drei Grenzen 35, 42 und 56 kHz erhalten wurden. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur bei einer Substratkonzentration von 100 nM erfolgte vor der Durchführung der 30 min-Messung eine Verdünnung auf 50 pM Substratkonzentration.

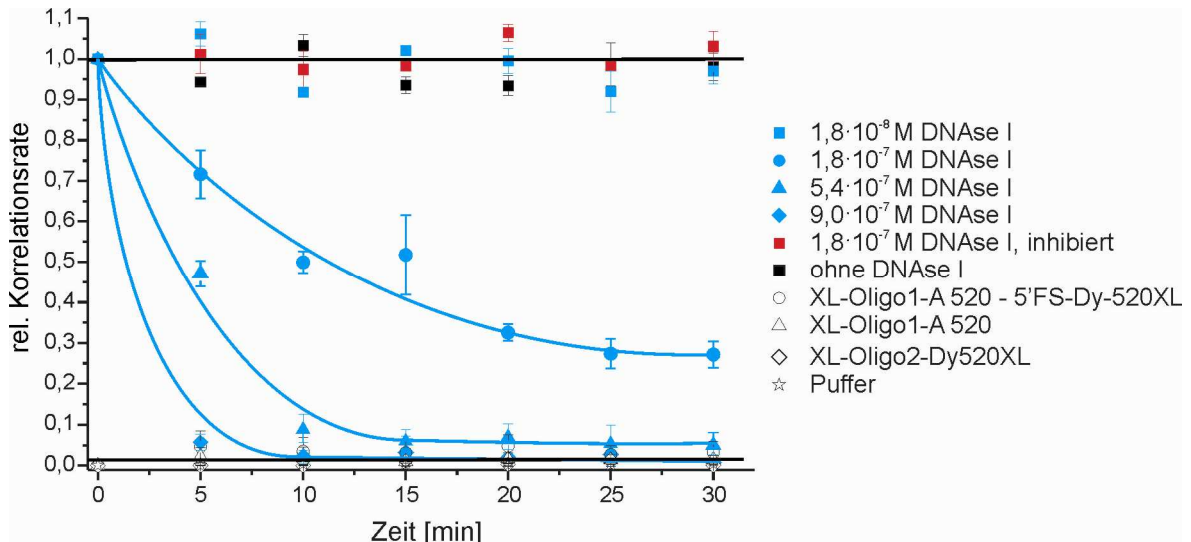
Wie bereits bei den vorhergehenden Analysen erwies sich die Auswertung gegenüber der exakten Wahl der Detektionsgrenzen als robust. Die sich hieraus ergebenden Unterschiede in den Korrelationswerten fielen geringer aus als diejenigen zwischen den einzelnen Replikaten. Augenscheinlich sind die beobachteten Proteolyseraten geringer als bei Trypsin. Nach zweistündiger Inkubation konnte für die verdauten Ansätze bei 1  $\mu\text{M}$  Proteasekonzentration noch eine mittlere Korrelationsrate von 0,47 festgestellt werden. Demgegenüber ergab der entsprechende Versuch mit Trypsin eine Korrelationsrate von 0,20. Die Probe mit 10  $\mu\text{M}$  KLK6-Konzentration wies noch einen Wert von 0,36 auf. Ferner war festzustellen, dass der verwendete Puffer bzw. dessen pH-Wert die KLK6-Aktivität maßgeblich beeinflusste. In PBS (pH 7,4) fand im Gegensatz zu Acetatpuffer (pH 4,5) kein Verdau statt.

#### **4.4.8 Zeitaufgelöste Verdaumessungen**

Auf Basis doppelt farbstoffmarkierter (Protein-)Substrate in Verbindung mit der Detektion korrelierter Signale konnte die Enzymaktivität direkt während der Messung beobachtet werden. Hierfür fanden 30-minütige Messungen mit 50  $\mu\text{M}$  Substratkonzentration statt.

Abbildung 4-47 stellt die Ergebnisse des enzymatischen Verdaus eines DNA-Doppelstranges dar. Er besteht aus den komplementären Sequenzen XL-Oligo1 und XL-Oligo2 und weist eine Länge von 80 Basenpaaren auf, was 27,2 nm und somit etwa der halben DNA-Persistenzlänge entspricht. Aufgrund dessen besitzt der Doppelstrang eine lineare Struktur, welche die beiden Farbstoffmoleküle außerhalb der Reichweite von FRET-Wechselwirkungen hält.



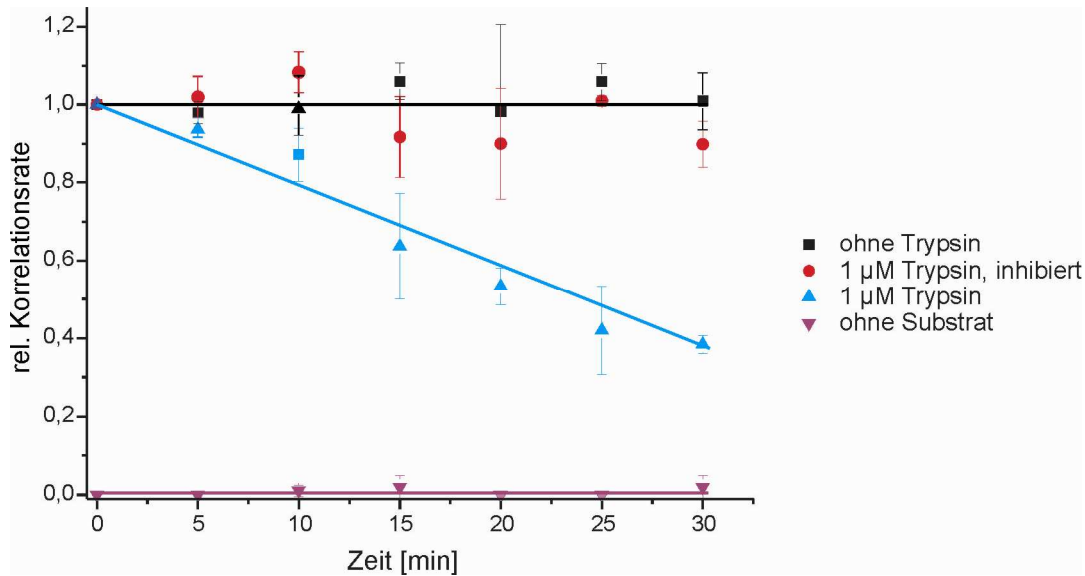


**Abbildung 4-47:** Zeitaufgelöste Detektion via Korrelationsmessung der DNA-Hydrolyse von DNase I.

In Gegenwart steigender DNase I-Konzentrationen (blau) beschleunigt sich der Verdau des DNA-Doppelstrangs (50 pM), ersichtlich aus den abnehmenden Korrelationswerten. Wird das Enzym inhibiert (rot), bleibt dieser Wert über die Messdauer konstant, ebenso wie in der Probe ohne Enzymzusatz (schwarz). Die nicht korrelierten Vergleichsproben (offene Symbole) erzeugen keine Korrelations-signale. Die Werte basieren auf der Analyse dreier Replikate unter Verwendung dreier Signaldetektionsgrenzen (21, 28 und 42 kHz).

Das verwendete Enzym DNase I hydrolysiert als Nuklease unspezifisch Oligonukleotide sowohl in Einzel-, als auch in Doppelsträngen. Es ist hierfür auf das Vorhandensein von Magnesiumionen angewiesen, weshalb durch EDTA-Zusatz das Enzym gehemmt werden kann. Wie aus dem Diagramm ersichtlich, führte eine 2,5 mM EDTA-Konzentration (rot) zur Hemmung des enzymatischen DNA-Verdau, abzuleiten aus den über den Zeitverlauf konstanten Korrelationsraten. Sie verliefen wie die Vergleichswerte ohne Enzymzusatz (schwarz) auf dem Anfangsniveau. Mit DNase I sanken diese Werte über den Messzeitraum von 30 min und zwar schneller mit zunehmender Enzymkonzentration. Für den Ansatz mit dem geringsten DNase I-Gehalt von  $1,8 \cdot 10^{-8}$  M konnte über den Beobachtungszeitraum keine Hydrolyse beobachtet werden. Die Vergleichsproben (offene Symbole), welche aus nicht hybridisierenden Sequenzen (Kreise) sowie den einzelnen markierten Proben (Dreiecke und Quadrate)bestanden, wiesen Korrelationsraten auf Pufferniveau von annähernd null auf.

Abbildung 4-48 stellt die Ergebnisse der entsprechenden Messungen mit Trypsin und BSA als Substrat dar. Demzufolge ist ebenfalls unter Verwendung von Trypsin der zeitaufgelöste Verlauf des proteolytischen Verdaus mit dem System zu verfolgen.



**Abbildung 4-48:** Resultat der zeitaufgelösten Korrelationsmessung des BSA-Verdaus durch 1 µM Trypsin (blau) und bei Inhibierung durch 1 mM AEBSF (rot). In schwarz sind die Werte der Vergleichsprobe ohne Trypsinzusatz dargestellt, in lila die für den blauen Ansatz ohne Substrat. Die Werte basieren auf der Analyse dreier Replikate unter Verwendung zweier Signaldetektionsgrenzen (28 und 42 kHz).

Im Gegensatz zum inhibierten Ansatz (rot) und dem ohne Enzymzusatz (schwarz), welche über den Zeitverlauf konstante Korrelationswerte um eins aufwiesen, verringerten sich die entsprechenden Werte bei Zugabe von 1 µM Trypsin innerhalb von 30 min annähernd linear auf 0,38. Der entsprechende Vergleich ohne Substrat lieferte vernachlässigbare Korrelationswerte, wie bereits in den vorherigen Versuchen zu beobachten war. Für geringere Konzentrationen waren keine sinkenden Korrelationswerte zu verzeichnen.

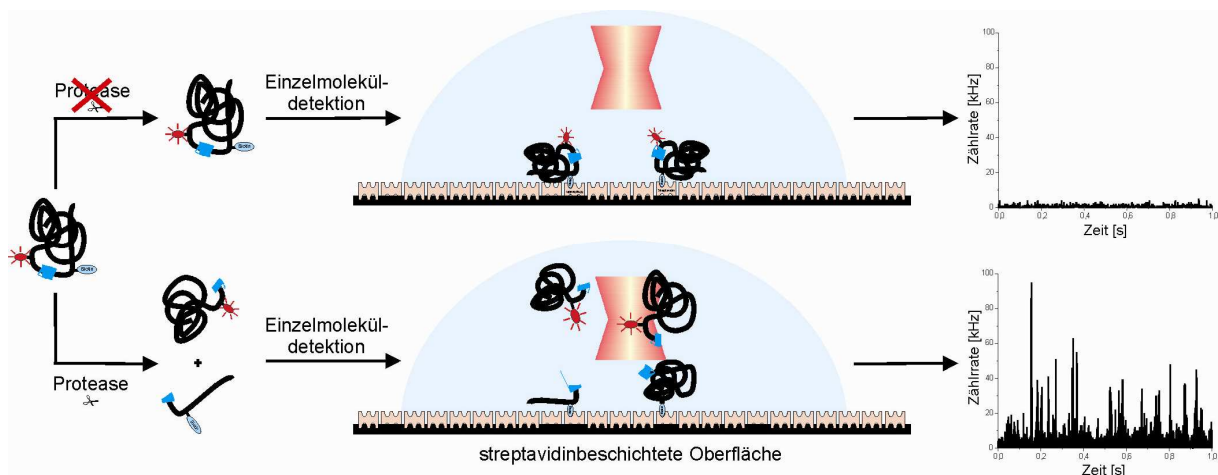
Für KLK6 konnte mit BSA als Substrat in den experimentell zugänglichen Konzentrationsbereichen für BSA bzw. KLK6 keine Änderung der Korrelationswerte registriert, der Verdau demnach nicht zeitaufgelöst verfolgt werden. Ein möglicher Grund hierfür war die im Vergleich zu Trypsin geringere Aktivität, was bereits aus den Ergebnissen des voranstehenden Kapitels hervorging.

## 4.5 Alternatives Detektionssystem

Aufgrund der universellen Anwendbarkeit des stöchiometrischen Proteinmarkierungs-verfahrens ist es neben dem Anbinden zweier Farbstoffe möglich, einen Fluorophor durch eine andere Modifikation zu ersetzen. Das eröffnet u.a. die Möglichkeit, den proteolytischen Verdau an derartig markierten Substraten mit weiteren Verfahren zu detektieren. Eine Alternative zum vorherigen, auf der Registrierung von Korrelationsereignissen beruhenden Ansatz, ist Inhalt der nächsten Abschnitte.

### 4.5.1 Funktionsweise

Anstelle zweier farbstoffmarkierter Oligonukleotide bestehen die eingeführten Modifikationen aus einer farbstoffmarkierten und einer biotinylierten DNA. Die Vorgehensweise in punkto Anbindung und Aufreinigung bleibt aufgrund der weiterhin inkorporierten DNA identisch. Lediglich die streptavidinbeladene Festphase muss nach der Funktionalisierung mit der entsprechenden Festphasen-DNA mit freiem Biotin abgesättigt werden, um das Anbinden der biotinylierten Substrat-DNA zu unterbinden.



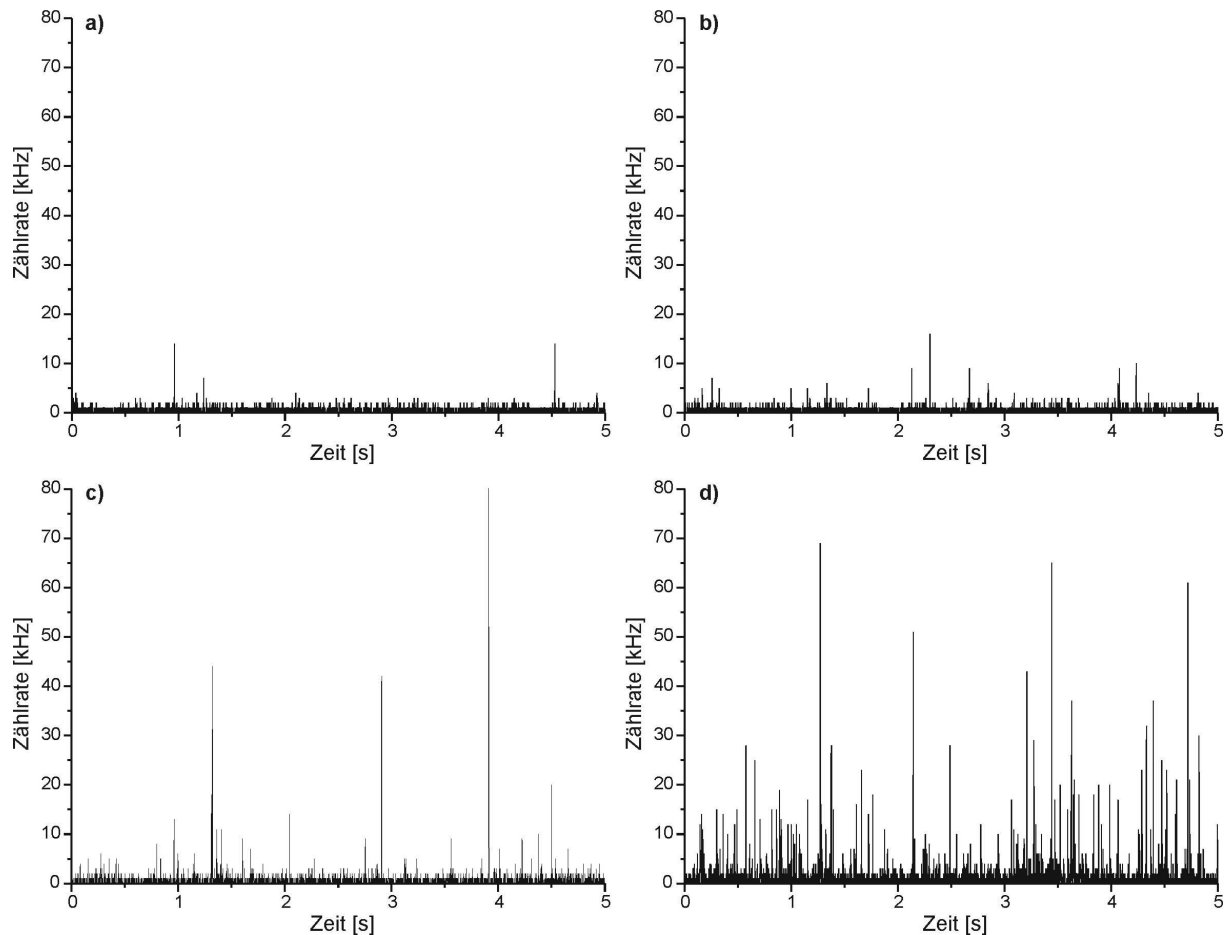
**Abbildung 4-49:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des auf farbstoff- und biotinmarkiertem Substrat basierenden Proteaseaktivitätsnachweises.

Die Detektion verläuft entsprechend dem im obigen Schema dargestellten Verfahren. Nach Inkubation mit dem Enzym erfolgt die Messung über streptavidinfunktionalisierten Oberflächen. Aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Streptavidin bindet das an das Substrat gekoppelte Biotin an die Oberfläche. Findet während der vorangehenden Inkubationsphase keine proteolytische Substratspaltung statt, wird somit auch der proteingebundene Farbstoff der Lösung entzogen und infolgedessen keine Fluoreszenz detektiert (oberer Abbildungsteil). Kommt es dagegen zum Verdau des Substrats, verbleiben die nicht biotinylierten Fragmente in Lösung und erzeugen Fluoreszenzsignale, sofern sie den Fluorophor tragen (unterer Teil).

Gegenüber der Korrelationsmethode zeichnet sich dieser Ansatz durch einen einfacheren apparativen Aufbau aus, da keine spektral getrennte Detektion erfolgt, sondern mit einer Photodiode das Gesamtfluoreszenzsignal registriert wird. Aufgrund dessen vereinfacht sich auch die anschließende Auswertung der aufgenommenen Daten. Zusätzlich steht bezüglich des Substrats ein größerer Konzentrationsbereich zur Verfügung, da bei höheren Konzentrationen keine falsch-positiven Signale zu erwarten sind, solange die Oberflächenbindungskapazität nicht überschritten wird. Nachteilig ist hingegen der vergleichsweise erhöhte Aufwand, welcher aus der Verwendung streptavidinfunktionalisierter Oberflächen hervorgeht. Zudem bietet diese Detektionsmethode nicht die Möglichkeit, zeitaufgelöste Verdaumessungen durchzuführen, sondern beschränkt sich auf Endpunktsbestimmungen.

#### **4.5.2 Messung des proteolytischen Verdaus**

Die mit diesem Nachweisverfahren erhaltenen Rohdaten lassen sich, wie in Abbildung 4-50 ausschnittsweise abgebildet, als einfache Intensität-Zeit-Diagramme darstellen. Die Daten resultieren aus dem Verdau von BSA durch Trypsin. Das Substrat wurde nach dem unter 4.1 bis 4.3 dargelegten Verfahren mit A 520 und Biotin über Oligonukleotide stöchiometrisch modifiziert.



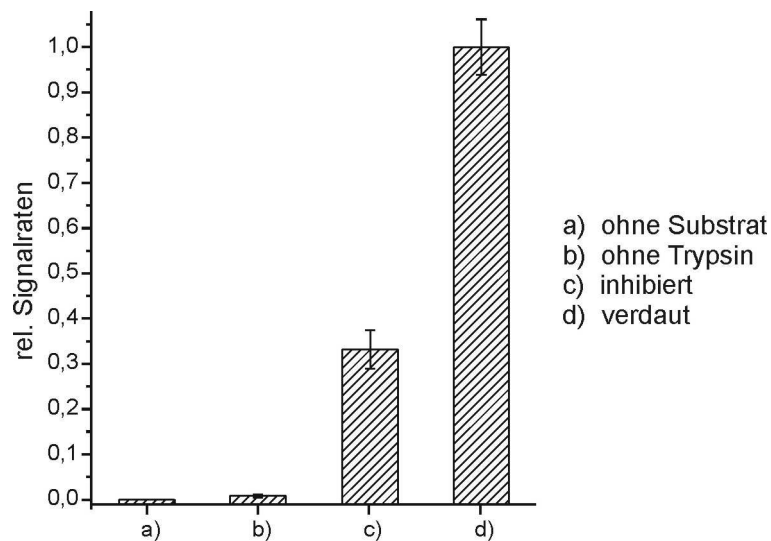
**Abbildung 4-50:** Ausschnitte aus Fluoreszenzintensitätsspuren des proteolytischen Verdaus des 1 nM A 520- und biotinmarkierten BSA-Substrats durch 1  $\mu$ M Trypsin. Ausschnitt a) zeigt die Fluoreszenzintensität einer Probe ohne Substrat, b) die des unverdauten Substrats, c) der mit 1 mM AEBSF inhibierten Probe und d) des verdauten Ansatzes.

Der Verdau erfolgte innerhalb von zwei Stunden in PBS-Puffer bei Raumtemperatur, einer 1 nM Substrat- und einer 1  $\mu$ M Trypsinkonzentration. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe von AEBSF zu einer Endkonzentration von 1 mM. Dieselbe Inhibitormenge setzte man dem Enzym der gehemmten Probe zehn Minuten vor Vermischung mit dem Substrat zu.

Wie aus Abbildung 4-50 ersichtlich, führt der Verdau des Substrats durch Trypsin zu einer stark gesteigerten Anzahl an Fluoreszenzereignissen d) im Vergleich zur nicht verdauten Probe b), deren Intensitätsspur mit derjenigen des substratfreien Kontrollansatzes a) vergleichbar ist. Die gehemmte Probe c) weist im Vergleich zu a) und b) ebenfalls eine erhöhte Signalzahl auf, demzufolge hemmt der Inhibitor trotz

des 1000-fachen Überschusses die Trypsinaktivität nicht quantitativ. Damit bestätigen sich die bereits mit dem korrelationszahlenbasierten Nachweisverfahren gemachten Beobachtungen.

Die Auswertung der Messungen bestätigt den Eindruck, den die obigen Intensitätsspuren vermitteln. Abbildung 4-51 fasst die Resultate graphisch zusammen. Die Zuordnungen sind mit denen aus Abbildung 4-50 identisch.



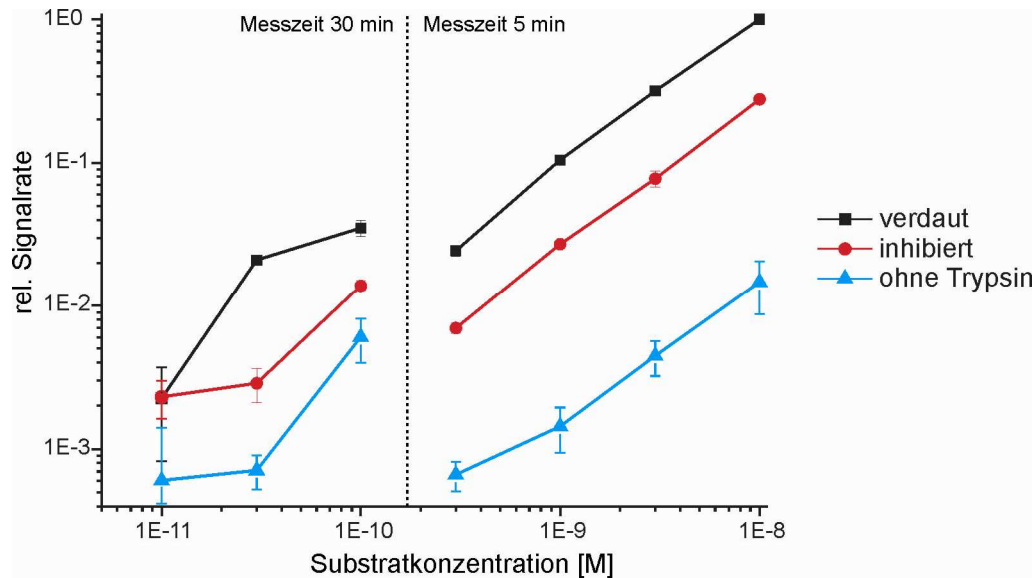
**Abbildung 4-51:** Resultat des enzymatischen BSA-Verdaus durch Trypsin. Zuordnung der Werte, Konzentrationen und Durchführung wie in Abbildung 4-50.

Da die trypsinfreie Probe b) Werte auf dem Niveau der substratlosen Probe a) aufweist, erfolgt die Anbindung der biotinylierten Proteine an die Oberfläche und das Abfangen nicht verdauter Substratmoleküle quantitativ. Die AEBSF-Zugabe zur Trypsinhemmung reduziert zwar dessen Aktivität, verhindert den proteolytischen Verdau jedoch nicht vollständig. Die Restaktivität beträgt etwa ein Drittel des ungehemmten Werts.

### 4.5.3 Konzentrationsreihen

Zur Evaluierung der möglichen Substratkonzentrationsbandbreite wurden entsprechende Messungen durchgeführt. Wie bereits in den vorherigen Messungen fand Trypsin als Enzym und BSA als markiertes Substrat Anwendung. Zur Inhibierung setzte man der Trypsinlösung der entsprechenden Proben zehn Minuten

vor Substratzugabe einen 1000-fachen AEBSF-Überschuss zu. Abbildung 4-52 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse.

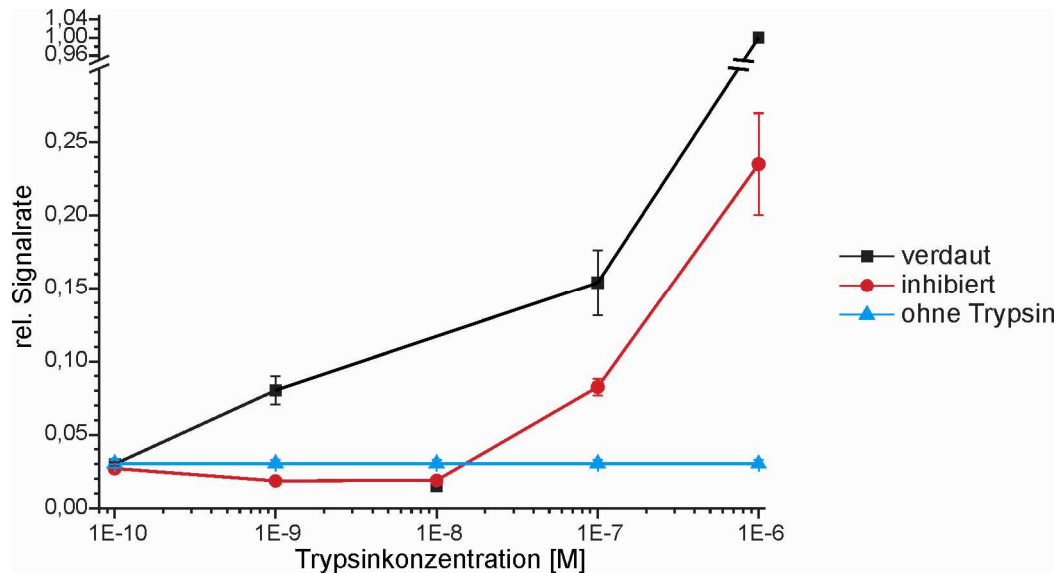


**Abbildung 4-52:** Auswirkungen des proteolytischen Verdauens auf die Signalrate bei Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen unter gleichbleibender Trypsinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Die schwarzen Symbole repräsentieren die Werte des Verdauens, in rot sind die der inhibierten Ansätze (1 mM AEBSF) aufgetragen und die nicht verdauten Proben ohne Enzymzusatz erbrachten die in blau dargestellten Werte. Ab einer Substratkonzentration von 100 pM wurde die Messzeit von fünf auf 30 min ausgedehnt.

Wie bereits in den vorangegangenen Graphen ist die beobachtete Signalrate relativ zur maximal detektierten aufgetragen. Diese Vorgehensweise ermöglicht den direkten Vergleich der einzelnen Proben untereinander und eliminiert Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsreihen aufgrund von Konzentrationsschwankungen.

Einmal mehr zeigte sich die unvollständige Hemmung durch AEBSF. Deutlich ist zudem der lineare Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Signalrate. Zur Detektion einer ausreichenden Signalzahl wurde die Messzeit für niedrige Substratkonzentrationen von fünf auf 30 min verlängert. Damit ist noch mit 30 pM Substratkonzentrationen die Unterscheidung zwischen verdauter, inhibierter und Vergleichsprobe möglich. In Verbindung mit dem geringen benötigten Mess- bzw. Ansatzvolumen von 15  $\mu\text{l}$  sind damit für eine Probe lediglich 0,45 fmol oder 30 pg Substrat erforderlich.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Signalraten von der Trypsinkonzentration bei gleichbleibender Substratmenge ermittelt.



**Abbildung 4-53:** Änderung der relativen Signalraten unter Verringerung der Trypsinkonzentration. Der Verdau erfolgte über 24 h mit 50 nM Substratkonzentration, welche zur Messung auf 1 nM verdünnt wurde. Neben den Werten der Proben mit aktivem Trypsin (schwarz) sind die der inhibierten Proben (rot, 1 mM AEBSF) und die der Proben ohne Trypsinzusatz (blau) aufgetragen.

Hierfür inkubierte man das Substrat in 50 nM Konzentration über 24 h mit den jeweiligen Enzymkonzentrationen und verdünnte die Ansätze vor der Messung 50-fach. Die verlängerte Reaktionszeit sowie eine erhöhte Substratkonzentration sind aufgrund der *Michaelis-Menten*-Kinetik erforderlich, um bei niedrigen Enzymkonzentrationen proteolytische Aktivität detektieren zu können. Wie aus Abbildung 4-53 ersichtlich, kann unter den genannten Bedingungen der Substratverdau durch Trypsin (schwarz) in 1 nM Konzentration nachgewiesen werden. Die nicht vollständige Hemmung durch AEBSF (rot) ist bis zu einer  $10^{-7}$  M Enzymkonzentration zu erkennen, für niedrigere Konzentrationen bewegt sich die Signalrate auf dem Niveau der enzymfreien Vergleichsproben (blau).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es mit den stöchiometrisch markierten Proteinsubstraten möglich ist, proteolytische Aktivität mit geringen Mengen Substrat eindeutig nachzuweisen. Technisch wären noch empfindlichere Messungen



machbar, jedoch können aufgrund der *Michaelis-Menten*-Beziehung die Substrat- bzw. Enzymkonzentrationen nicht beliebig verringert werden, ohne dass daraus sehr lange Reaktionszeiten bzw. geringe Umsatzraten resultieren.

Das auf der Detektion korrelierter Ereignisse basierende Nachweisverfahren bietet neben den statischen Messungen die Möglichkeit, den Prozess des proteolytischen Verdaus zeitaufgelöst zu verfolgen.

Beide vorgestellten Methoden erlauben es ferner, die Effizienz potentieller Enzyminhibitoren zu ermitteln. Aufgrund der sensitiven einzelmolekülspektroskopischen Detektion in kleinen Volumina erfordern die Verfahren lediglich geringe Mengen an Substrat und Enzym und qualifizieren sie somit für umfangreiche Testreihen.

#### 4.6 Nachweis von DNA-Punktmutationen

Neben der Entwicklung des Systems zur stöchiometrischen Proteinmodifikation und der Etablierung des darauf aufbauenden einzelmolekülspektroskopischen Proteasenachweissystems konnten im Rahmen dieser Arbeit neue fluoreszenzbasierte DNA-Sonden zur Erkennung von Punktmutationen entwickelt bzw. Anwendungsmöglichkeiten bestehender Verfahren erweitert werden.

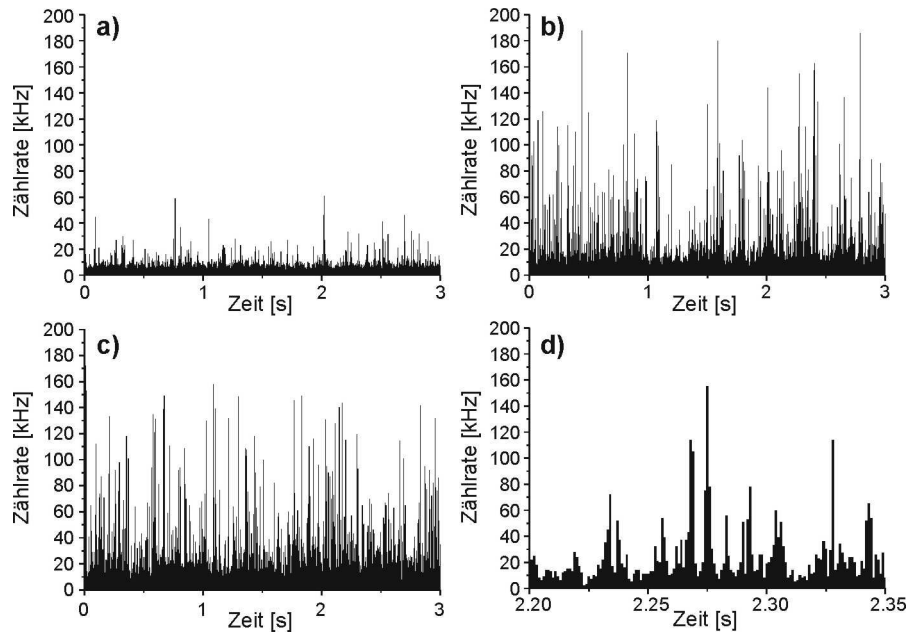
Der erste Teil dieses Kapitels stellt eine neue Methode vor, mithilfe guanosingelöschter DNA-Sonden Punktmutationen (***Single Nucleotide Polymorphism*** - SNP) in DNA-Sequenzen zu detektieren. Sie basiert auf zuvor in der Arbeitsgruppe erzielten Ergebnissen [Knemeyer 2000] Marmé 2006; Marmé 2006a; Friedrich 2007; Friedrich 2008]. Das Verfahren erweitert die Anwendungsmöglichkeiten dahingehend, dass durch Zusatz sogenannter **Konkurrenzoligonukleotide** (KO), welche zu den punktmultierten Sequenzen komplementär sind, die Diskriminierung von Punktmutationen verbessert wird, indem auch die Präsenz höherer Konzentrationen mutanter DNA-Stränge keine falsch-positiven Signalanstiege erzeugt.

Der zweite Teil beinhaltet eine Anwendung der in Kapitel 4.4.3 dargestellten Eigenschaften des Dy-520XL, speziell seiner Sensitivität gegenüber sich

verändernder Mikroumgebungspolaritätseigenschaften. Er behandelt die Entwicklung einer auf dem Coumarinfarbstoff Dy-520XL basierenden DNA-Sonde, mit welcher eine weitere Methode zur hochsensitiven Detektion von DNA-Punktmutationen zur Verfügung steht. Da die Sonde zur Fluoreszenzlöschung weder Moleküle wie beispielsweise Dabcyl noch die Ausbildung von speziellen Stamm-Schleifen-Strukturen benötigt, vereinfacht sich ihre Gestaltung grundlegend.

#### **4.6.1 *Smart Probes* mit Konkurrenzoligonukleotiden**

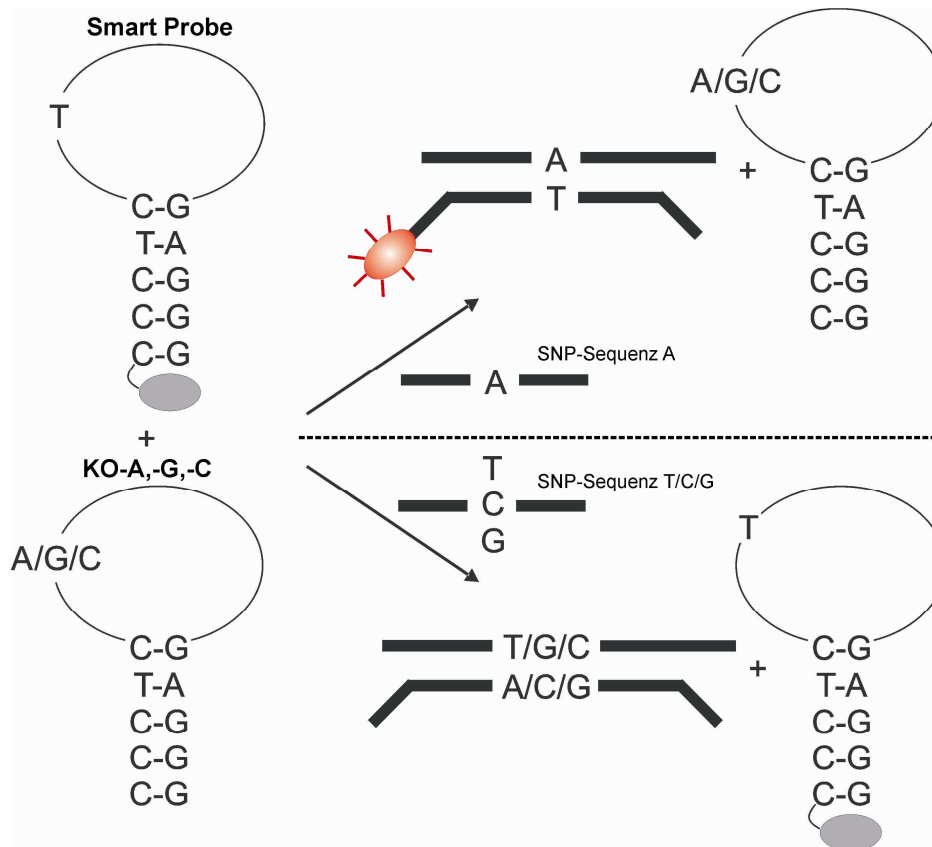
*Smart Probes* sind haarnadelförmige DNA-Sonden, deren Fluoreszenzlöschung in der geschlossenen Form auf dem Photoelektronentransfer vom Farbstoff auf die in nächster Nähe befindlichen Guanosine des gegenüberliegenden Stammbereichs basiert (siehe Abbildung 4-55). Durch Hybridisierung bricht die Stamm-Schleifen-Struktur auf und die räumliche Nähe von Fluorophor und Guanosinen geht verloren, woraus ein Anstieg der Fluoreszenzemission resultiert. Mit Standardspektrometern lässt sich durch Zugabe eines Überschusses an Gegensequenz ein sechsfacher Fluoreszenzanstieg verzeichnen. Unter Verwendung der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie lassen sich mit picomolaren *Smart Probe*-Konzentrationen Zielsequenzen im selben Konzentrationsbereich detektieren. Die Zunahme der Fluoreszenzsignale in Anzahl und Intensität ist eindeutig zu erkennen, wie die exemplarischen Graphen in Abbildung 4-54 zeigen.



**Abbildung 4-54:** Exemplarische Ausschnitte aus Fluoreszenzintensitätsspuren der  $5 \cdot 10^{-10}$  M *Smart Probe* **a)** in Abwesenheit und **b)** in Beisein eines Überschusses an Zielsequenz ( $1 \cdot 10^{-9}$  M). Das höhere Fluoreszenzsignal in Ausschnitt **c)** resultiert aus einer ebenfalls nanomolar vorhandenen und in einer Base differierenden Gegensequenz. Teil **d)** zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus **b)**.

Unter Verwendung von 500 pM Sonden ergibt sich bei Anwesenheit der komplementären Zielsequenz (1 nM) beispielsweise für die Fluoreszenzsignale über 30 kHz eine Zunahme von vier auf über 120 pro Sekunde. Jedoch ermöglicht die Sonde keine Unterscheidung zwischen nur in einer Punktmutation differierenden Zielsequenzen. Dies ist durch sorgfältiges Optimieren des Gefüges aus Stabilität der Sondenhaarnadelstruktur, des Doppelstrangschmelzpunkts, der Hybridisierungs- sowie der Messbedingungen möglich [Marmé 2006].

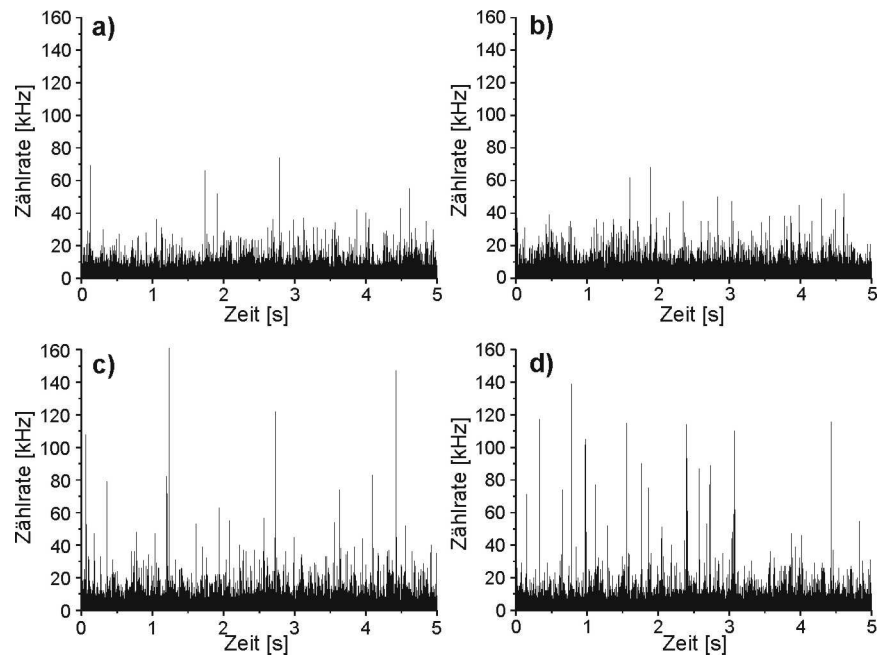
Mithilfe des nachfolgend in Abbildung 4-55 dargestellten Systems ist eine derartige Optimierung nicht notwendig. Die der *Smart Probe* zugesetzten nicht markierten Konkurrenzoligonukleotide unterscheiden sich in der Basenabfolge von ihr lediglich in der zu detektierenden SNP-Position und sind aufgrund dessen komplementär zu den mutierten Sequenzen. Dadurch bilden sie mit diesen stabilere Doppelstränge aus als es die *Smart Probe* täte, maskieren die Sequenzen und verhindern somit eine Fehlpaarung zwischen *Smart Probe* und mutierten Sequenzen. Infolgedessen tritt kein falsch-positives Fluoreszenzsignal auf und die Diskriminierung wird verbessert.



**Abbildung 4-55:** Schematische Darstellung der Wirkungsweise der zugesetzten Konkurrenzoligonukleotide, welche durch Hybridisierung an die SNP-behafteten Gegensequenzen die *Smart Probe* an der Generierung falsch-positiver Fluoreszenzanstiege durch Ausbildung von „Fehlybridisierungen“ hindern.

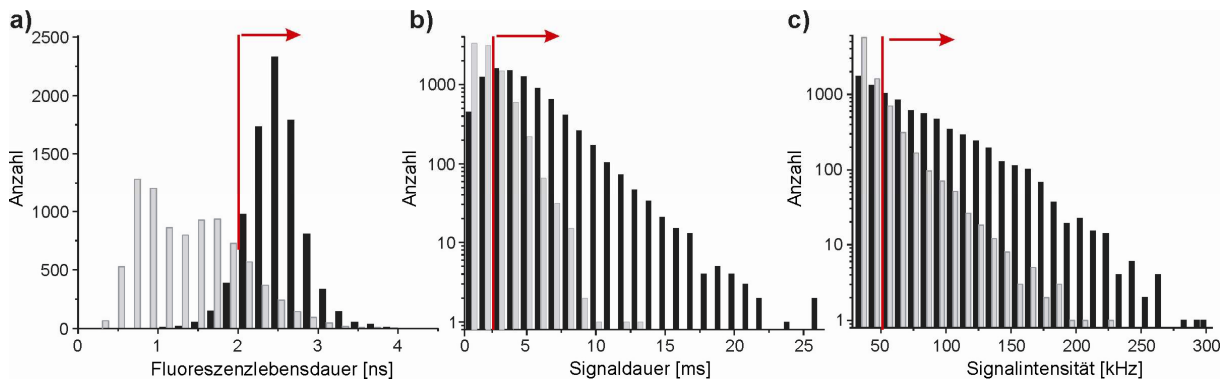
An der SNP-Position besitzen die KOs jeweils ein A, G oder C (KO-A, KO-G, KO-C), wohingegen die *Smart Probe* an selber Stelle ein T aufweist.

Abbildung 4-56 stellt Ausschnitte aus den Intensitätsspuren der *Smart Probe* (0,5 nM) mit einem je 2000-fachen Überschuss aller drei KOs (1 µM) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Gegensequenzen dar. Während die Zugabe aller drei mutanten Gegensequenzen in je 10 nM Konzentration b) keinen Anstieg im Vergleich zur Blindprobe ohne Gegensequenzen a) aufweist, steigt die Signalzahl und –intensität unter Zusatz einer Konzentration von c) fünf bzw. d) zehn nanomolarer Zielsequenz stark an.



**Abbildung 4-56:** Fluoreszenzintensitätsspuren der *Smart Probe* ( $5 \cdot 10^{-10}$  M) gemischt mit den drei Konkurrenzoligonukleotiden (je  $1 \cdot 10^{-6}$  M) **a)** ohne Gegensequenz, **b)** mit den drei mutanten Gegensequenzen Ziel-G, Ziel-C, Ziel-T (je  $1 \cdot 10^{-8}$  M) und in Anwesenheit der Zielsequenz Ziel-A **c)**  $5 \cdot 10^{-9}$  M, **d)**  $1 \cdot 10^{-8}$  M.

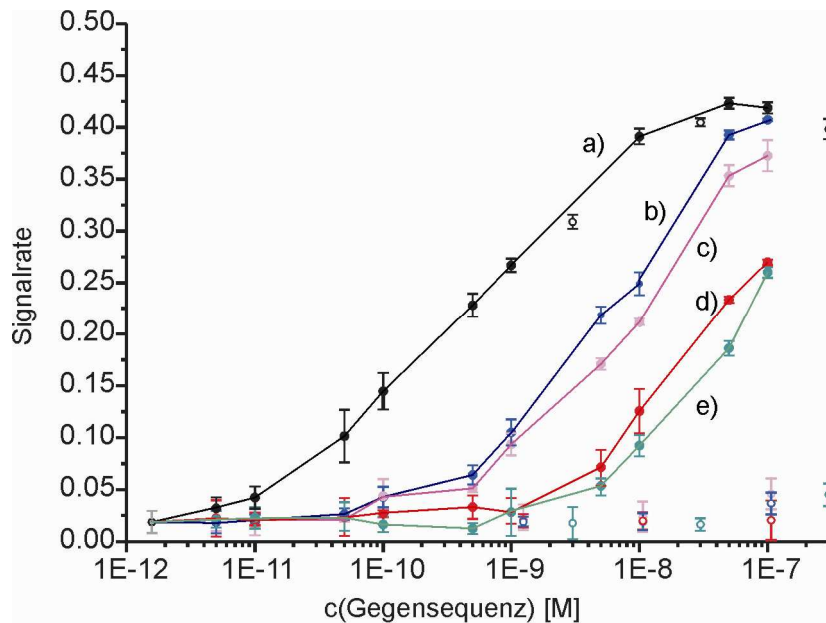
Zur Sensitivitätssteigerung kann man sich der Vorteile der Einzelmolekülspektroskopie bedienen und die detektierten Signale bezüglich der zusätzlich verfügbaren Größen weitergehend analysieren. Neben der Emissionsintensität stehen für diese Zwecke die Fluoreszenzlebensdauer und die Signalbreite zur Verfügung. Die Verteilung dieser Parameter ist in Abbildung 4-57 veranschaulicht, wobei die grauen Werte von einer *Smart Probe*-Blindprobe ohne Gegensequenz und die schwarzen von einer, durch Zugabe eines 200-fachen Überschusses Zielsequenz vollständig hybridisierten, *Smart Probe* erhalten wurden. Es ist zu erkennen, dass alle drei Parameter durch Öffnen und Hybridisieren der Sonde deutlich ansteigen.



**Abbildung 4-57:** Verteilung der einzelmolekülspezifischen Parameter **a)** Fluoreszenzlebensdauer, **b)** Signaldauer und **c)** Signalintensität für die geschlossene, nicht hybridisierte (grau) und offene, hybridisierte (schwarz) Sonde nach der Analyse von jeweils 8800 Signalen.

Grundlage dieser Verteilungen bilden in beiden Fällen die aus der Analyse von 8800 Signalen erhaltenen Daten. Betrachtet man für beide Proben die Signanzahl mit über 2 ns Lebensdauer, 50 kHz Fluoreszenzintensität und 2 ms Signaldauer, so erhält man für die geöffnete Sondenprobe deutlich mehr Signale als für die geschlossene. Verfährt man nach dieser Methode, ist die Detektion und Diskriminierung von Ziel- und SNP-Sequenzen im picomolaren Bereich möglich.

Da jedoch bei einzelmolekülspektroskopischen Messungen aufgrund von Adsorptionseffekten an Gefäße und Pipetten die effektive *Smart Probe*-Konzentration um bis zu 30 % schwanken kann, beeinflusst dies im gleichen Maß die Zahl detektierter Fluoreszenzereignisse. Setzt man indes die Zahl der nach obigem Verfahren erhaltenen Signale zur Gesamtsignanzahl ins Verhältnis, ergeben sich bezüglich *Smart Probes*-Konzentrationsschwankungen unempfindliche Werte, wie aus Abbildung 4-58 hervorgeht. Diese Analyse wurde für verschiedene Proben durchgeführt, welche die Sonde jeweils in 0,5 nM Konzentration enthielten. Die resultierenden Signalaraten der *Smart Probe* ohne KOs (schwarz) und in Anwesenheit aller KOs (grün) bei Zugabe verschiedener Konzentrationen der Zielsequenz (gefüllte Symbole) bzw. der SNP-Sequenz (leere Symbole) sind in Abbildung 4-58 dargestellt.



**Abbildung 4-58:** Verhältnis der Signale mit einer Fluoreszenzlebensdauer größer 2 ns, einer Signalbreite über 2 ms und einer Intensität von mehr als 50 kHz zu der Gesamtzahl detektierter Signale in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Zielsequenz Ziel-A (gefüllte Symbole) bzw. SNP-Gegensequenzen (leere Symbole). In schwarz sind die Werte für die  $5 \cdot 10^{-10}$  M *Smart Probe* ohne KOs dargestellt, wohingegen bei den farblich anderen Werten zusätzlich variierende KOs in je  $1 \cdot 10^{-6}$  M Konzentration präsent sind: grün – alle KOs, blau – KO-C, rosa – KO-A, rot – KO-G. Die grauen Symbole stehen für die Referenzmessungen ohne Zugabe von Gegensequenzen.

Die KO-Konzentrationen betragen in allen Ansätzen jeweils  $1 \mu\text{M}$ , was einem 2000-fachen Überschuss relativ zur Sondenkonzentration entspricht. Es ist deutlich zu erkennen, dass diese Vorgehensweise zum einen die Spezifität drastisch erhöht, zum anderen die Sensitivität jedoch um etwa zwei Größenordnungen senkt. D.h. die hohen KO-Überschüsse binden teilweise auch an die Zielsequenz und dämpfen somit den Signalanstieg.

Zusätzlich sind die Anstiege für Proben, welche jeweils nur eines der drei Konkurrenzoligonukleotide enthielten, in blau (KO-C), rosa (KO-A) und rot (KO-G) aufgeführt. Daraus ist ersichtlich, dass der sensitivitätssenkende Effekt in erster Linie auf KO-G zurückzuführen ist, wohingegen der Einfluss der anderen beiden KOs geringer ausfällt. Die Ausbildung schwacher A-G-Basenpaarung, welche zwar viel schwächer als diejenigen G-C- oder A-T-Bindungen sind, kann für das Verhalten des KO-G verantwortlich sein [Kan 1983; Ebel 1992]. Demgegenüber treten bei Fehlpaarungen von im Doppelstrang gegenüberliegenden A- und T- bzw. A- und C-

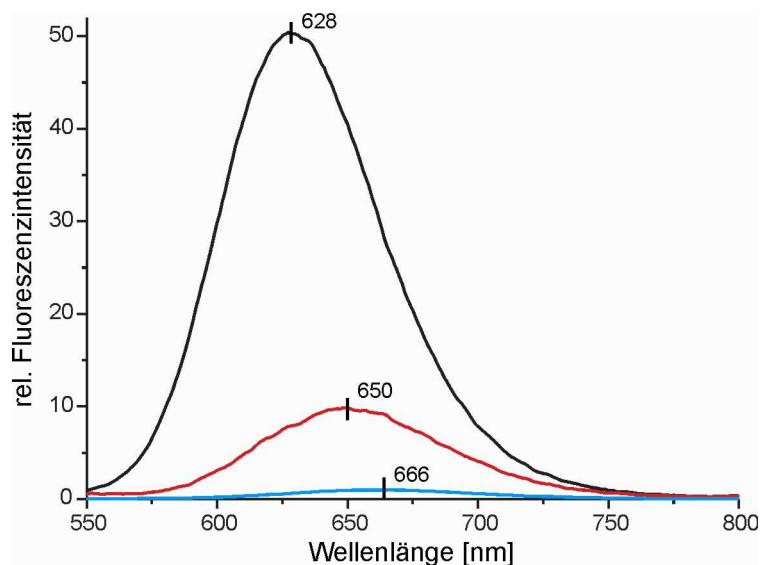
Basen keine solchen schwachen Bindungen auf. In vielen diagnostischen Anwendungen muss allerdings eher der definierte Austausch einer Base gegen eine andere nachgewiesen werden, als gegen alle drei Alternativen. Damit ergibt sich mit diesem System eine sehr hohe Spezifität bei subnanomolarer Sensitivität.

#### **4.6.2 Dy-520XL-basierte DNA-Sonde**

Der zu den 7-Aminocoumarinen gehörende Farbstoff Dy-520XL zeichnet sich durch eine ausgeprägte Sensitivität bezüglich seiner Mikroumgebungspolarität aus, wie in Kapitel 4.4.3 bereits dargelegt wurde. Der Einfluss der Zugabe von dNTP's zu einer wässrigen Dy-520XL-Lösung auf deren Fluoreszenzemission ist ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen gewesen (siehe Abbildung 4-36).

Die kovalente Anbindung des Farbstoffs an ein Oligonukleotid lässt die Fluoreszenzemissionswerte ansteigen. Durch Hybridisierung an die Gegensequenz und damit verbundene Doppelstrangbildung steigerte sich die Emission nochmals deutlich, wie in Abbildung 4-59 gezeigt wird. Relativ zum freien Farbstoff erhöht sich mit der Konjugation an eine DNA-Sequenz, in diesem Beispiel kovalent via C<sub>6</sub>-Aminolinker am 3'-Ende, die Fluoreszenzemission um den Faktor zehn. Nach erfolgter Doppelstrangausbildung steigt sie zusätzlich um den Faktor 50. Dies bedeutet für den hybridisierten Status eine Zunahme der Quantenausbeute auf über 70 %, für den Einzelstrang auf 17 % (freier Farbstoff  $\Phi = 1,7 \%$ ). Parallel zur Intensitätszunahme tritt eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums von 666 nm für den freien Farbstoff, über 650 nm für den kovalent an einen DNA-Einzelstrang gebundenen, zu 328 nm für den zusätzlich hybridisierten Zustand auf. Der Absorptionskoeffizient bleibt hingegen unverändert.





**Abbildung 4-59:** Fluoreszenzspektren von Dy-520XL als freiem Farbstoff (blau), kovalent verknüpft mit dem 3'-Ende eines DNA-Strangs (rot) und nach Hybridisierung desselben an eine komplementäre Gegensequenz (schwarz). Die Spektren sind auf die Emission des freien Farbstoffs normiert. Zusätzlich zur Intensitätszunahme erfolgt eine hypsochrome Verschiebung der Emissionsbande.

Dieser Effekt ist damit zu erklären, dass der Farbstoff aufgrund der DNA-Anbindung Wechselwirkungen mit den Nukleobasen eingeht, und zwar in viel stärkerem Maße als es für die Zugabe einzelner dNTP's zu beobachten ist. Es zur Behinderung des ICT-TICT-Übergangs durch Verdrängung des Wassers und durch von den Nukleobasen hervorgerufene sterische Einflüsse, womit die zusätzliche strahlungslose Deaktivierung des Farbstoffs aus dem TICT-Zustand unmöglich bleibt. Die Verstärkung dieses Effekts bei Ausbildung eines DNA-Doppelstrangs kann möglicherweise auf die Interkalation des Farbstoffs zwischen die DNA-Stränge zurückgeführt werden. Die hypsochrome Verschiebung ist ein zusätzliches Indiz für das Auftreten von elektronischen Farbstoff-Nukleobasenwechselwirkungen, da auch bei Dy-520XL-Lösungen in Toluol eine vergleichbare Verschiebung auftrat (vgl. Abbildung 4-31).

In demselben Maß wie sich die Fluoreszenzemission steigerte, verlängerte sich auch die Fluoreszenzlebensdauer von 0,2 ns im Fall des freien Farbstoffs über 1,2 ns für den konjugierten Einzelstrang zu über 2,2 ns für den Doppelstrang. Auch hier ergab sich jeweils ein streng monoexponentieller Verlauf der Fluoreszenzabklingkurven.

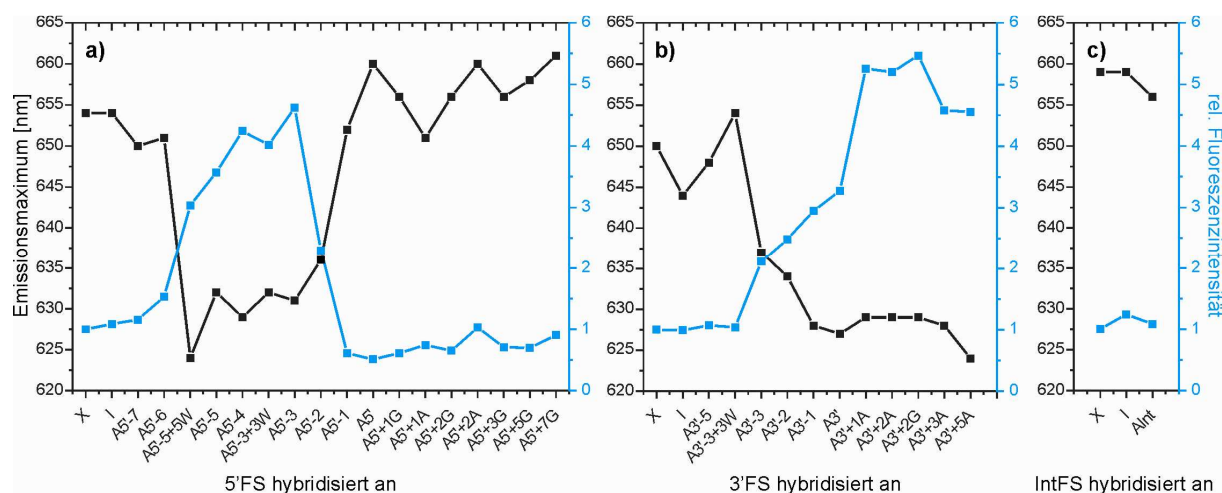
Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens fanden Messungen mit mehreren unterschiedlichen langen Gegensequenzen statt, wobei sowohl eine 5'-, eine 3'-, als auch eine interne Farbstoffmarkierung untersucht wurde. Tabelle 4-4 gibt Aufschluss über die Art der verwendeten Sequenzen.

**Tabelle 4-4:** Übersicht über die verwendeten Gegensequenzen unterschiedlicher Länge zur Etablierung eines Doppelstrangs mit der jeweils Dy-520XL-markierten Sequenz.

Bezeichnung	Sequenz	
3'FS	Dy520XL-3'-	CCC TAG CAT ATC AAC CAC CAG TAC C -5'
A3'-5	5'-	C GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'-3	5'-	ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'-2	5'-	G ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'-1	5'-	GG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'	5'-	GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'-3+3W	5'-	AAA ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'+1A	5'-	A GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'+2A	5'-	AA GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'+2G	5'-	GG GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'+3A	5'-	AAA GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
A3'+5A	5'-	AAAAA GGG ATC GTA TAG TTG GTG GTC ATG G -3'
5'FS	3'- TAT ATA TAG ATG GAG CCT TAA CCC C	-5'-Dy520XL
A5'-7	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA	-3'
A5'-6	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA A	-3'
A5'-5	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA AT	-3'
A5'-4	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT	-3'
A5'-3	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT G	-3'
A5'-2	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GG	-3'
A5'-1	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG	-3'
A5'	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG G	-3'
A5'-5+5W	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATC CCC C	-3'
A5'-3+3W	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GCC C	-3'
A5'+1G	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GG	-3'
A5'+1A	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GA	-3'
A5'+2G	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG	-3'
A5'+2A	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GAA	-3'
A5'+3G	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG G	-3'
A5'+5G	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG GGG	-3'
A5'+7G	5'- ATA TAT ATC TAC CTC GGA ATT GGG GGG GGG GG	-3'
IntFS	3'- CGC GGA CAT AGT CTG AGC CAT CAA AC -5'	Dy520XL
Alnt	5'- GCG CCT GTA TCA GAC TCG GTA GTT TG -3'	

Wie aus der Aufstellung hervorgeht, erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von sowohl der Markierungsstelle, als auch der Länge der hybridisierten Gegensequenz. Ihre Länge variierte zwischen einem Überhang von fünf (sieben) Basen und einem um fünf (sieben) Basen zurückbleibenden Ende relativ zum Ende des 3'- (5'-) endmarkierten DNA-Strangs.

Abbildung 4-60 gibt einen Überblick über das Verhalten der Fluoreszenzmaxima und –intensitäten, relativ zum nicht hybridisierten Einzelstrang, welches aus den Hybridisierungsexperimenten mit den unterschiedlichen Gegensequenzen hervorging. In Teil a) sind die Resultate der Hybridisierungen mit Sequenz 5'FS dargestellt, Teil b) zeigt entsprechendes mit 3'FS und Teil c) beinhaltet das Fluoreszenzverhalten der intern markierte Sequenz IntFS.



**Abbildung 4-60:** Verhalten von Fluoreszenzintensität (blau) und –maximum (schwarz) bei Hybridisierung einer Dy-520XL-markierten DNA an Gegensequenzen unterschiedlicher Länge. Der Farbstoff ist kovalent an **a)** das 5'-Ende, **b)** das 3'-Ende und **c)** intern angebunden. Die Konzentration der markierten Sequenzen beträgt stets  $10^{-6}$  M, der nicht markierten Gegensequenz jeweils  $10^{-5}$  M. Die Intensitätswerte sind relativ zum Wert ohne Gegensequenz (X) aufgetragen. I kennzeichnet die Zugabe der zur farbstoffmarkierten Sequenz identischen, nicht markierten Sequenz.

Erwartungsgemäß korreliert die Intensitätszunahme mit der hypsochromen Verschiebung der Fluoreszenzintensität, welche sich im Bereich von 660 bis 628 nm bewegt, was mit den Beobachtungen in Kapitel 4.4.3 bzgl. der allgemeinen Lösungsmittelleffekte auf Dy-520XL übereinstimmt. Darüber hinaus zeigte jedoch die

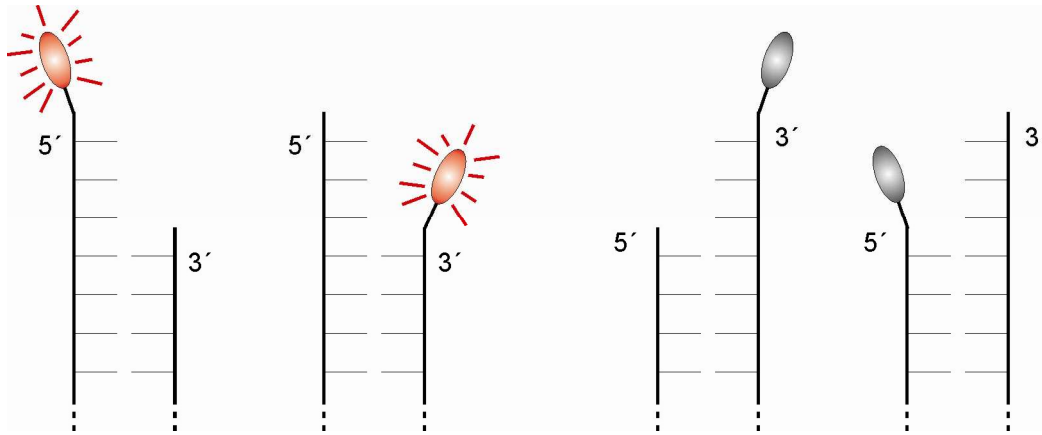
Länge der hybridisierten Gegensequenz einen deutlichen Einfluss auf die Fluoreszenzemission. Im Fall der 5'-Dy-520XL-Markierung eines DNA-Strangs stieg die Emissionsintensität um den Faktor vier relativ zum nicht hybridisierten Zustand an, wenn die Sequenz an einen Gegenstrang hybridisierte, der am farbstoffseitigen Ende des Doppelstrangs nicht an die letzten drei bis fünf Basen des markierten Oligonukleotids bindet. Hierbei war es unerheblich, ob der Gegenstrang an besagtem Ende um diese Basenzahl kürzer war oder ob er zusätzliche, nicht komplementäre Basen aufwies, wie aus den Werten für die Doppelstränge 5'FS – A5'-5 und – A5'-5+5W oder 5'FS – A5'-3 und – A5'-3+3W hervorgeht. Alle anderen betrachteten Kombinationen bzgl. des markierten 5'-Endes wiesen keinen derartigen Effekt auf.

Unter Verwendung des 3'-Dy-520XL-markierten Oligonukleotids verhielt es sich entgegengesetzt. Hier kam es zu einem fünffachen Anstieg der Fluoreszenzemission bei Hybridisierung mit einem den markierten Strang an dessen 3'-Ende um ein bis fünf Basen überragenden Gegenstrang. Bei gleich langen oder um bis zu drei Basen kürzeren Gegensequenzen ergaben sich geringere Anstiege um den Faktor zwei bis drei.

Für eine interne Farbstoffmarkierung, ebenfalls über einen C<sub>6</sub>-Aminolinker, führte die Hybridisierung an die Gegensequenz zu keinem derartigen Effekt. Da die Zugabe von nicht bindender DNA (jeweils die Werte für I) zwar dieselben Bedingungen hinsichtlich der Oligonukleotidkonzentration erzeugte wie die Zugabe bindender Gegenstränge, jedoch in keiner Änderung von Emissionsintensität oder -wellenlänge resultierte, können die Effekte auf die Ausbildung der Doppelstrangstruktur zurückgeführt werden. Ferner ist ein unterschiedlicher Einfluss der Sequenz des markierten Stranges unwahrscheinlich, da die drei farbstoffnächsten Basen identisch sind, welche den Fluorophor am stärksten beeinflussen [Harvey 2009].

Vereinfacht ergibt sich das in Schema 4-2 dargestellte Bild. Der als endständige Markierung an Oligonukleotide angebundene Farbstoff Dy-520XL zeigt eine gesteigerte hypsochrom verschobene Fluoreszenzemission, wenn an einem DNA-Doppelstrang das 5'-Ende eines der Stränge um einige Basen übersteht. Dabei ist es nicht von Bedeutung, an welchem Ende der Farbstoff lokalisiert ist, wie der Vergleich von 5'FS-A5'-3 mit 3'FS-A3'+3A in Abbildung 4-60 belegt.

Dementsprechend kommt es bei einem am Doppelstrang überhängenden 3'-Ende ebenfalls bei beiden Anbindungsmöglichkeiten zu keiner derart starken Intensitätszunahme.

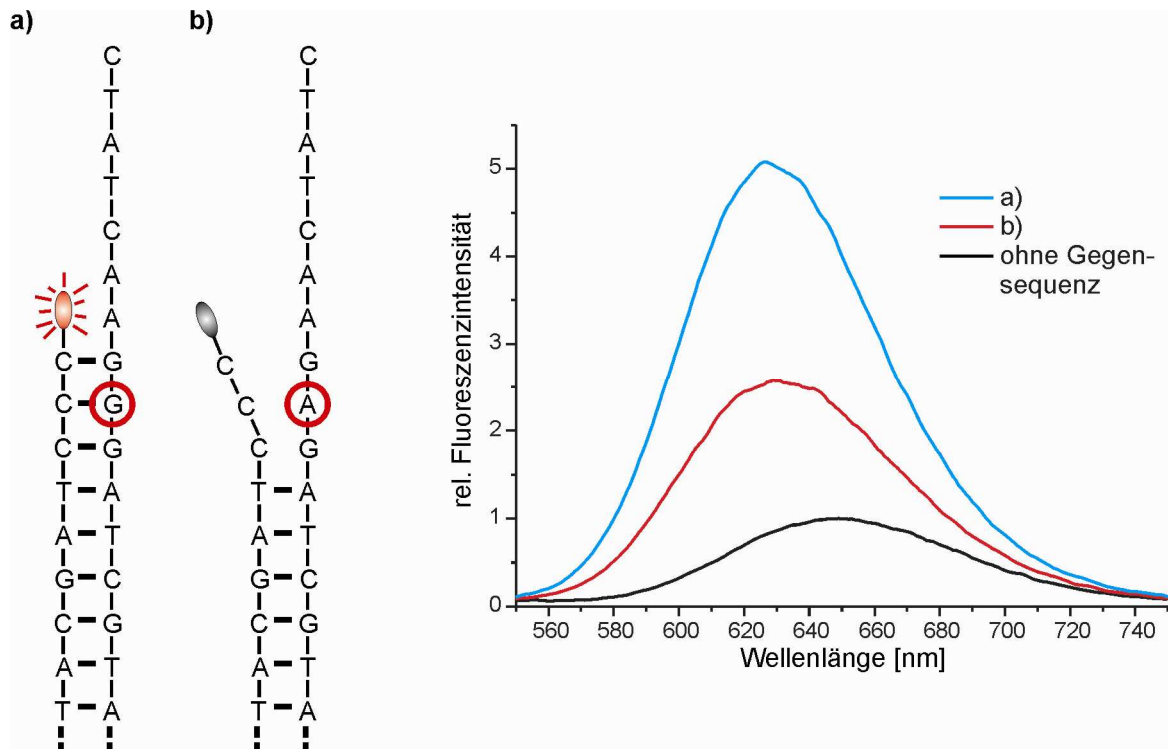


**Schema 4-2:** Fluoreszenzverhalten terminal 3'- oder 5'-Dy-520XL-markierter Oligonukleotide bei Hybridisierung an unterschiedliche Gegensequenzen.

Da die Intensitätszunahme wahrscheinlich auf eine Farbstoffinterkalation am Doppelstrang zurückzuführen ist, ließe sich dieses zwischen 3'- und 5'-Überhang differierende Verhalten durch sterische Effekte begründen, welche bei einem 3'-Überhang die Interkalation verhindern.

Die Doppelstrangsituation von überhängendem 5'-Ende bei markiertem 3'-Ende des Gegenstrangs entspricht der Situation bei Anbindung einer DNA-Sonde an deren Zielsequenz, denn in den meisten Fällen ist die zu detektierende Basenabfolge Teil eines längeren PCR-Fragments oder gar Gens. Aus diesem Grund sollte auch ein 3'-Dy-520XL-markiertes Oligonukleotid als DNA-Sonde einsetzbar sein, welches die Hybridisierung an die (längere) Gegensequenz durch einen hypsochrom verschobenen Fluoreszenzintensitätsanstieg anzeigt.

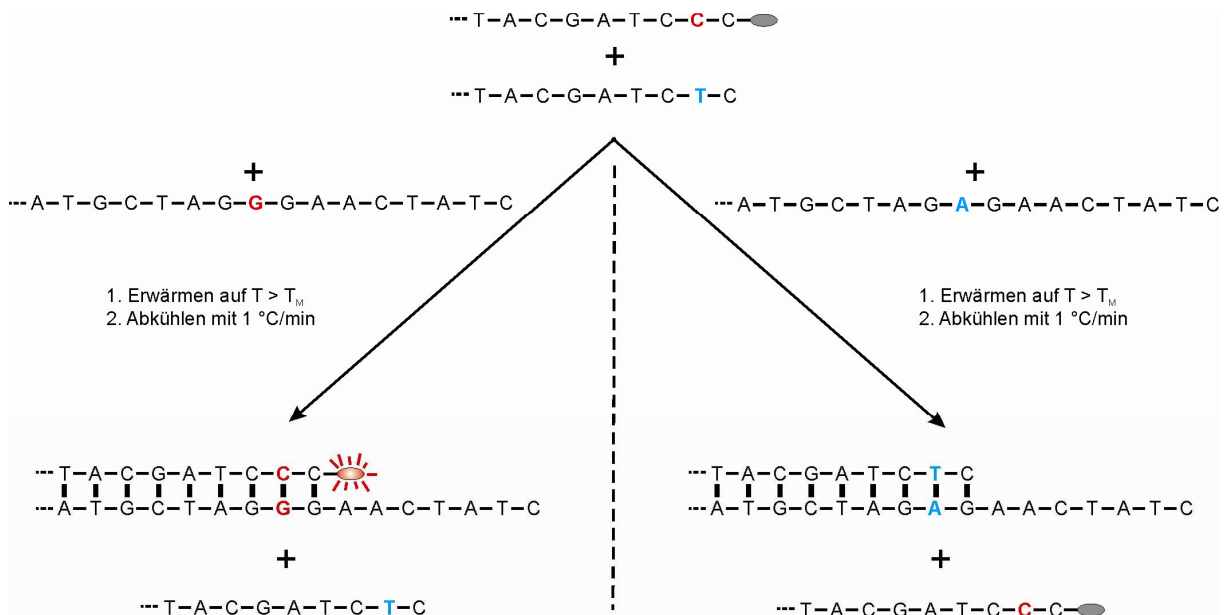
Die folgende Abbildung stellt links die von *mFold* prognostizierten Strukturen für die Hybridisierung der 3'-Dy-520XL-endmarkierten Sonde an a) eine längere Zielsequenz und sowie an b) den eine Punktmutation tragenden Gegenstrang dar. Der SNP befindet sich zwei Basen vom Farbstoff entfernt und führt zu einem nicht hybridisiert vorliegenden Ende des Doppelstrangs.



**Abbildung 4-61: links:** Schematische Darstellung der von *mFold* berechneten Strukturen bei Anbindung der Dy-520XL-markierten Sequenz an eine **a)** komplementäre und **b)** eine Punktmutation an der zwei Basen vom Farbstoffende entfernten Stelle aufweisenden Sequenz. **rechts:** a) und b) zugehörige Fluoreszenzspektren mit dem Spektrum der Sonde ohne Gegensequenz als Vergleich (schwarz). Die Sondenkonzentration beträgt jeweils  $5 \cdot 10^{-7}$  M, die der Gegenstränge  $1 \cdot 10^{-6}$  M.

Im rechten Teil sind die zugehörigen Fluoreszenzanstiege abgebildet. Die Intensität nimmt bei Zugabe des komplementären Stranges um den Faktor fünf im Vergleich zur nicht hybridisierten Probe ohne Gegensequenz zu. Jedoch ist auch bei Zugabe des die Mutation tragenden Oligonukleotids ein 2,5-facher Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen. Die Sonde ist demzufolge in der Lage, die Punktmutation der DNA-Sequenz zu erkennen, die Diskriminierung ist jedoch nicht sehr deutlich, da auch die Anwesenheit der mutanten Sequenz einen um die Hälfte geringeren Anstieg erzeugt.

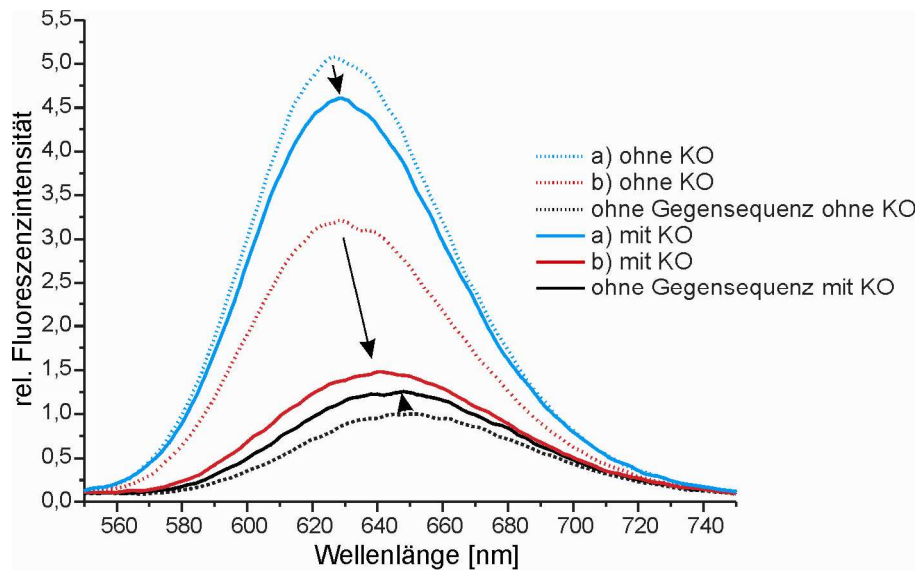
Zur Verbesserung der Diskriminierung kann nun analog der im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Methode auch hier das entsprechende nicht markierte Konkurrenzoligonukleotid zugesetzt werden, welches, wie in Schema 4-3 illustriert, zur mutanten Sequenz komplementär ist und diese somit maskiert.



**Schema 4-3:** Wirkungsweise der Konkurrenzoligonukleotidzugabe in Kombination mit einer Dy-520XL-Punktmutationssonde.

Durch Erhitzen der Lösung auf einen Wert jenseits der Schmelzpunkte aller möglichen Doppelstränge und anschließendem langsamen Abkühlen mit 1 °C/min können sich selektiv die stabilsten Doppelstränge ausbilden. Dies führt bei Anwesenheit der zur Sonde komplementären Sequenz zu einem Fluoreszenzanstieg. Das in der Mutationsstelle differierende Oligonukleotid hybridisiert hingegen mit dem zugegebenen KO und nicht mit der Sonde, wodurch es keinen Anstieg der Fluoreszenzemission erzeugt.

Die Anwendung des KO-Systems auf die in Abbildung 4-61 adressierte Punktmutation resultiert in den in Abbildung 4-62 dargestellten abweichenden Fluoreszenzintensitätsanstiegen. Das Konkurrenzoligonukleotid führt demnach zwar zu einem etwas reduzierten Anstieg der positiven Probe, verringert jedoch die Negativprobe in viel stärkerem Maße. Daraus folgt eine deutlich verbesserte Diskriminierung zwischen Ziel- und punktmutierter Gegensequenz. Zusätzlich zur verringerten Fluoreszenzintensität der Negativprobe verschiebt sich die Bande bathochrom.



**Abbildung 4-62:** Fluoreszenzspektren mit (durchgezogen) und ohne (gestrichelt) Konkurrenzoligonukleotide im Vergleich. Es handelt sich um die gleichen Sequenzen wie Abbildung 4-61, das Konkurrenzoligonukleotid unterscheidet sich von der Sonde durch einen T-C-Austausch an der Punktmutationsposition. Die Konzentrationen betragen für die Sonde jeweils  $5 \cdot 10^{-7}$  M, die Gegenstränge  $1 \cdot 10^{-6}$  M und das KO  $1 \cdot 10^{-5}$  M.

Durch Verwendung des KO zur Verbesserung der Diskriminierung sollte es zudem möglich sein, auch andere weiter vom farbstoffmarkierten Ende der DNA entfernt lokalisierte Punktmutationen zu erkennen, da die Unterscheidung auf der abweichenden Stabilität der ausgebildeten Doppelhelices beruht und nicht nur auf einer Fehlpaarung. Letzteres ergäbe für eher zentral gelegen Mutationen lediglich einen ungepaarten Abschnitt, das farbstoffmarkierte DNA-Ende könnte deswegen dennoch hybridisiert vorliegen.

Tabelle 4-5 beinhaltet alle hierzu untersuchten Sequenzen mit Punktmutationen samt zugehöriger Konkurrenzoligonukleotide. Die von der Zielsequenz abweichenden Basen sind rot hervorgehoben. Die Ziffer in der Sequenzbezeichnung entspricht dem Basenzahlabstand der Mutation ab dem farbstoffmarkierten Ende der Sonde gezählt. Gelb hinterlegt ist der hybridisierende Bereich der Sequenzen.

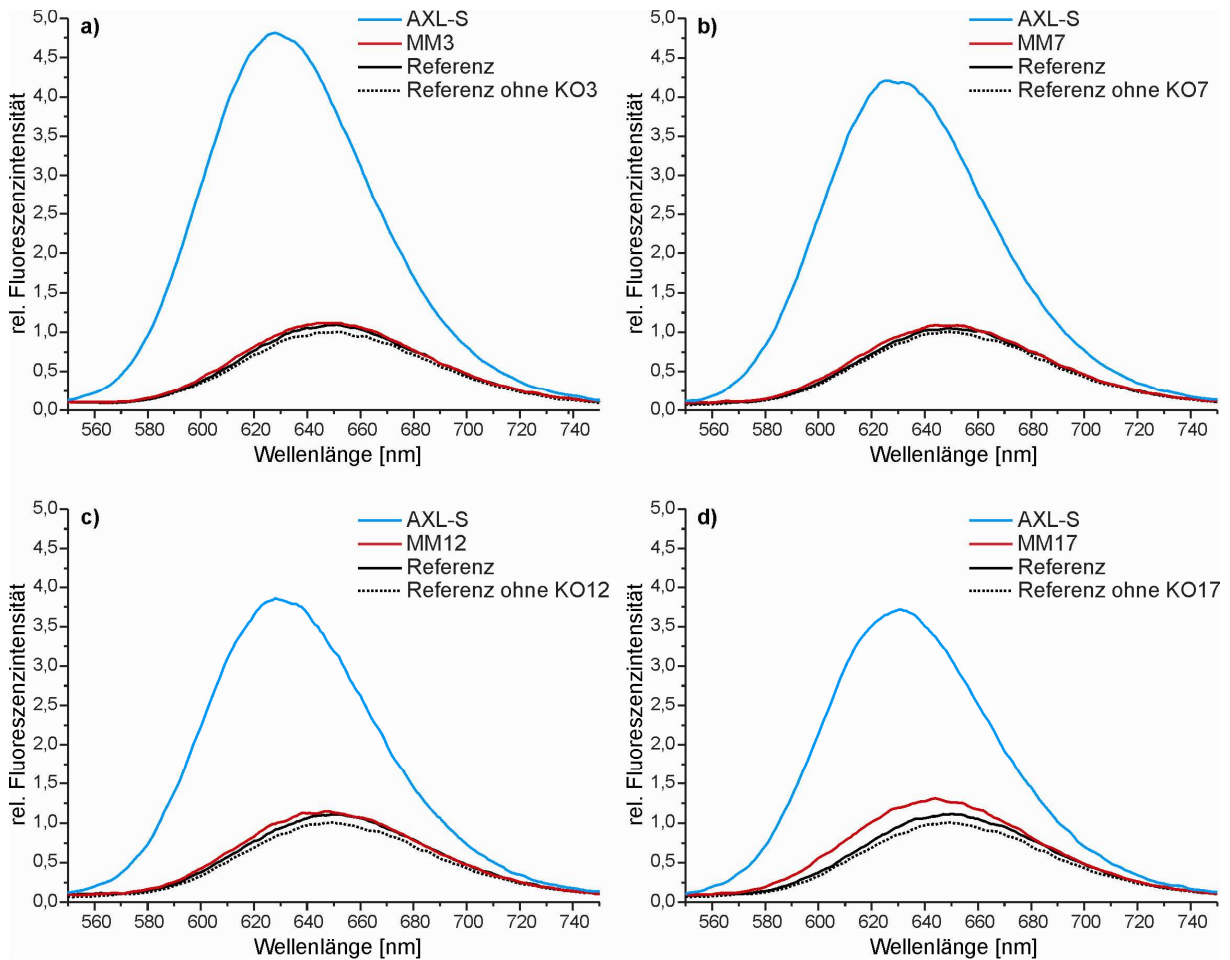


**Tabelle 4-5:** Zu Punktmutationsnachweisen anhand der Dy-520XL-markierten Sonde verwendete Gegensequenzen und Konkurrenzoligonukleotide mit Mutationsstelle (rot) und Hybridisierungsbereich (gelb)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Austausch
XL-Sonde	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TCC C - Dy520XL	
AXL-S	CTA TCA A GG GAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	
MM2	CTA TCA A GA GAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	G → A
KO2	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TCT C	
MM3	CTA TCA A GG AAT CGT ATA GTT GGT GGT CAT GG	G → A
KO3	CCA TGA CCA CCA ACT ATA CGA TTC C	
MM7	CTA TCA A GG GAT CTT ATA GTT GGT GGT CAT GG	G → T
KO7	CCA TGA CCA CCA ACT ATA AGA TCC C	
MM12	CTA TCA A GG GAT CGT ATA CTT GGT GGT CAT GG	G → C
KO12	CCA TGA CCA CCA AGT ATA CGA TCC C	
MM17	CTA TCA A GG GAT CGT ATA GTT GGA GGT CAT GG	T → A
KO17	CCA TGA CCT CCA ACT ATA CGA TCC C	

Wie aus den Sequenzen ersichtlich, wurden Mutationen gewählt, welche über die ganze Länge der Sonde verteilt sind. Außerdem resultieren die Punktmutationen aus verschiedenen Basenaustauschpaaren, um auch hier ein breites Spektrum an eventuell auftretenden Wechselwirkungen abdecken zu können.

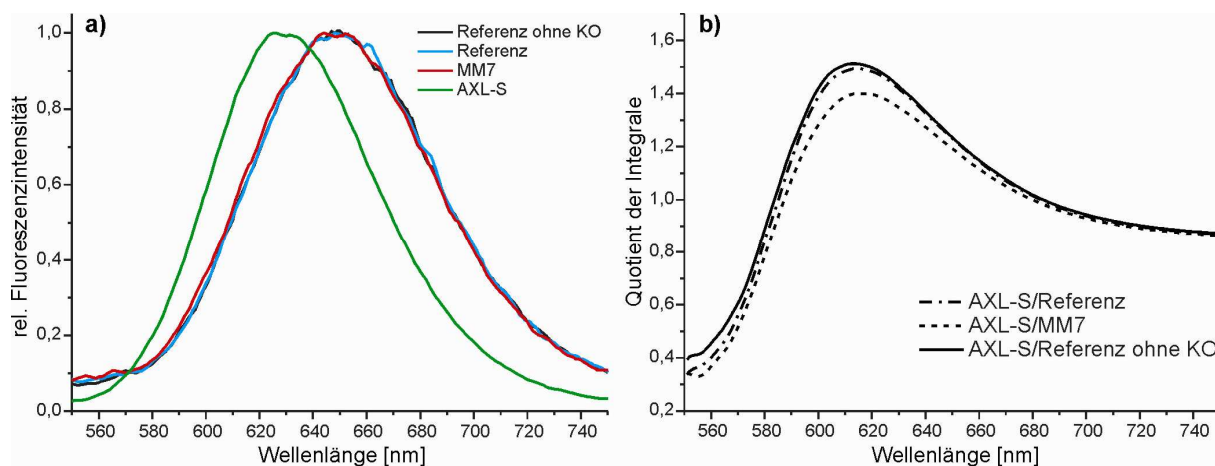
Abbildung 4-63 fasst die aus den Fluoreszenzmessungen erhaltenen Ergebnisse für die bisher nicht behandelten Punktmutationen zusammen. Die Konzentrationen und relativen Verhältnisse entsprechen denen aus den Experimenten mit MM2.



**Abbildung 4-63:** Fluoreszenzspektren der Punktmutationsdiskriminierung unter Verwendung von Konkurrenzoligonukleotiden bei **a)** MM3, **b)** MM7, **c)** MM12 und **d)** MM17. Dargestellt sind jeweils die Anstiege für die zur Sonde komplementären Sequenz AXL-S (blau), der Sequenz mit der jeweiligen Punktmutation (rot), der Referenz ohne Gegensequenz (schwarz) sowie der Referenzprobe ohne das jeweilige KO (gestrichelt). Die Konzentrationen betragen für die Sonde jeweils  $5 \cdot 10^{-7}$  M, die Gegenstränge  $1 \cdot 10^{-6}$  M und das KO  $1 \cdot 10^{-5}$  M.

Die punktmutationsspezifische Unterscheidung gelingt demnach mit allen untersuchten Sequenzen, unabhängig von Position oder Art des Austauschs. Das zugesetzte KO unterdrückt effektiv in allen Fällen einen falsch-positiven Fluoreszenzanstieg durch Maskieren der mutierten Gegensequenzen, womit ein Diskriminierungsfaktor je nach Mutation zwischen drei und fünf erreicht wird. Parallel zum wachsenden Abstand zwischen untersuchter Mutationsposition und Farbstoff nimmt der Fluoreszenzanstieg für die Positivprobe leicht ab.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Ensemblemessungen konnte nun die Verwendung der Dy-520XL-DNA-Sonde in einzelmolekülspektroskopischen Verfahren erprobt werden. Hierbei kann neben einer gesteigerten Sensitivität auch die parallel zum Anstieg der Fluoreszenzemission zu beobachtende hypsochrome Verschiebung der Emissionsbande zur Diskriminierung der Punktmutationen herangezogen werden.

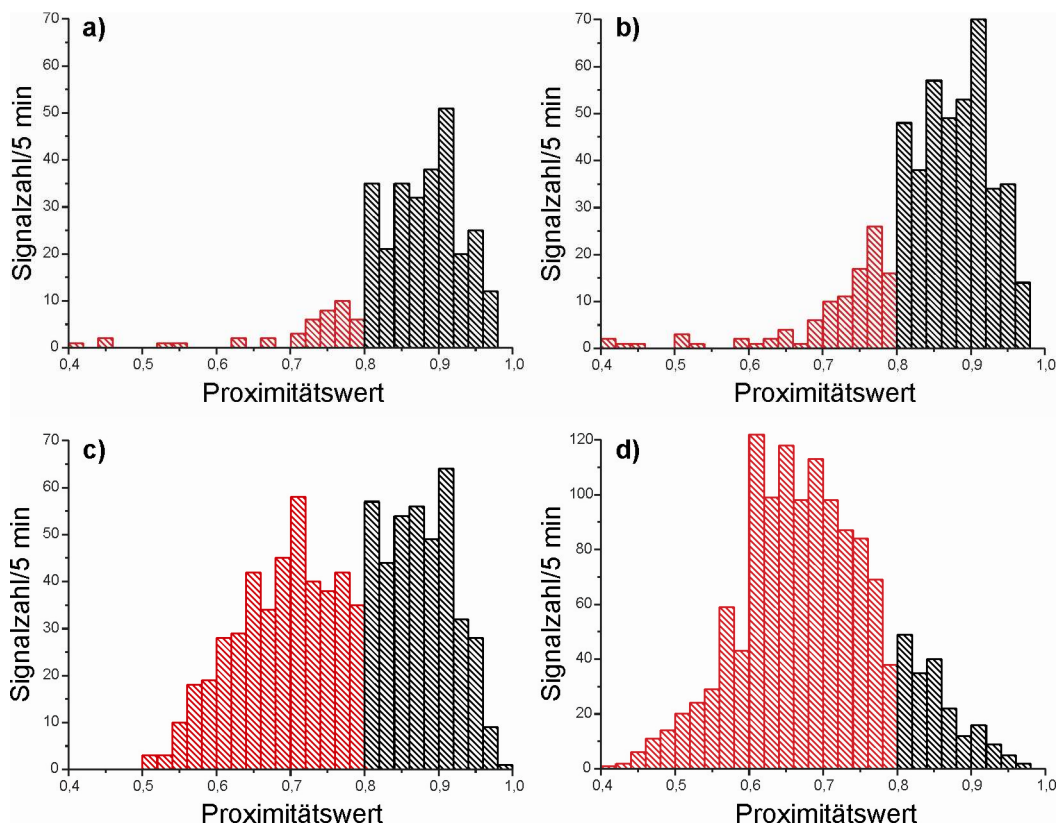


**Abbildung 4-64:** a) normierte Fluoreszenzspektren der Messungen um MM7 und b) Verlauf der Quotienten aus den Integralen der Banden in a).

Die in Abbildung 4-64 a) dargestellten normierten Emissionspektren werden über den Wellenlängenbereich integriert. Die Quotienten der Integrale sind in Teil b) der Abbildung aufgetragen. Sie bezeichnen mit ihrem Maximum die Wellenlänge der größten Intensitätsdifferenz zwischen dem Fluoreszenzanstieg der Positivprobe und dem der negativen Proben bzw. Referenzen. Somit sollte eine spektrale Separierung der Fluoreszenzemission in diesem Wellenlängenbereich die größten Effekte erzielen und eine Diskriminierung entsprechend fördern.

Aufgrund dessen fanden die nachfolgenden einzelmolekülspektroskopischen Messungen mit einem Strahlteiler bei 640 nm im Detektionsgang statt. Die Abweichung von 25 nm von den Kurvenmaxima bei 615 nm resultiert in einer deutlich gesteigerten Fluoreszenzintensität im kurzwelligen Detektionskanal und ermöglicht somit in diesem eine Registrierung höherer Signalzahlen, was sich in homgeneren Resultaten widerspiegelt.

Abbildung 4-65 zeigt Histogramme derartiger Messungen. Aufgetragen ist die Burstzahl in Abhängigkeit des Proximitätswerts, der Intensitätsverteilung eines Signals zwischen den beiden Detektionskanälen. Die Sondenkonzentration beträgt in allen Fällen  $5 \cdot 10^{-11}$  M, ist also 10000-fach geringer als in den obigen Ensemblemessungen.



**Abbildung 4-65:** Signalhistogramme aller Signale  $> 10$  kHz bezüglich des Proximitätswerts für **a)** Sonde ohne Gegensequenz, **b)** Sonde mit KO7 und MM7, **c)** Sonde mit KO7 und AXL-S und **d)** Sonde mit AXL-S, jedoch ohne KO. Die Sonde ist  $5 \cdot 10^{-11}$  M, die Gegensequenzen  $5 \cdot 10^{-10}$  M und KO7  $1 \cdot 10^{-8}$  M konzentriert.

Abbildung 4-65 a) zeigt die Resultate der DNA-Sonde ohne Gegensequenz, b) mit Zugabe der Sequenz MM7 ( $5 \cdot 10^{-10}$  M) und KO7 ( $1 \cdot 10^{-8}$  M), c) bei Anwesenheit von AXL-S ( $5 \cdot 10^{-10}$  M) und KO7 ( $1 \cdot 10^{-8}$  M) sowie d) mit AXL-S ( $5 \cdot 10^{-10}$  M), jedoch ohne Gegensequenz.

Den Histogrammen ist zu entnehmen, dass die Hybridisierung der Sonde eine Zunahme der Signalzahl unter einem Proximitätswert von 0,8 erzeugt, hervorgerufen durch die hypsochrome Verschiebung der Dy-520XL-Emissionsbande. Zusätzlich

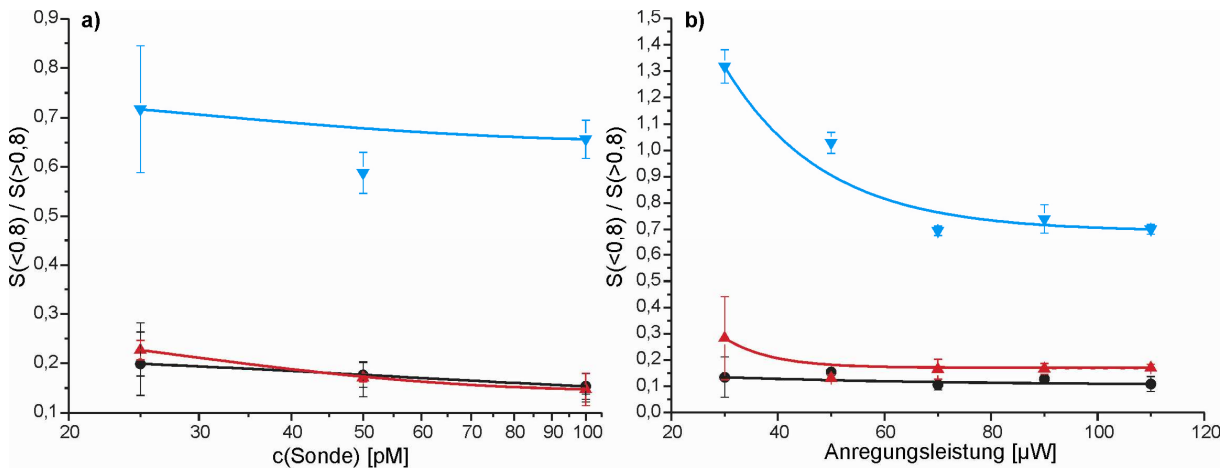
erhöht sich die Gesamtsignalzahl durch die Anbindung an eine Gegensequenz, wie der Vergleich zwischen a) und b) einerseits und c) bzw. d) andererseits belegt.

Die zusätzliche Berücksichtigung der Signalbreite und Fluoreszenzlebensdauer erbrachte in diesem Fall keine Verbesserung der Spezifität. Die Signalbreite ändert sich durch die Hybridisierung nicht und die Fluoreszenzlebensdauern ergeben bei den geringen Photonenzahlen pro Signal sehr uneinheitliche Werte.

Aufgrund von Konzentrationsabweichungen, Schwankungen der Laserleistung oder geringen Justagedifferenzen kann die absolute Anzahl detektierter Signale von Experiment zu Experiment schwanken, wie bereits im vorangehenden Kapitel 4.6.1 und früheren Arbeiten diskutiert wurde [Marmé 2006; Friedrich 2007]. Die relative Signalzahl ist aus diesen Gründen eine deutlich unempfindlichere Größe. Entsprechend verhält es sich mit den Resultaten der Dy-520XL-DNA-Sonde, welche daher ebenfalls als relative Werte analysiert werden. Betrachtet man das Verhältnis zwischen den Signalzahlen  $S$  unter dem Proximitätswert von 0,8 und denen darüber, so ergeben sich beispielsweise für a) und b) mit 0,22 bzw. 0,28 ähnliche Werte, obwohl die absoluten Signalzahlen kleiner als 0,8 mit 42 und 104 deutlich differieren. Grundlage aller nachfolgenden Diagramme bilden die Daten von jeweils drei unabhängigen fünfminütigen Messungen.

Abbildung 4-66 verdeutlicht die Widerstandsfähigkeit der relativen Auftragung gegenüber variierender Parameter. Sowohl die Änderung a) der Sondenkonzentration als auch b) der Anregungsleistung resultiert in keinen signifikanten Änderungen der Diskriminierung. Die Werte der Positivprobe bewegen sich für alle Proben im Bereich über 0,6, wohingegen sich die Negativ- und Referenzwerte stets unter 0,25 befinden.

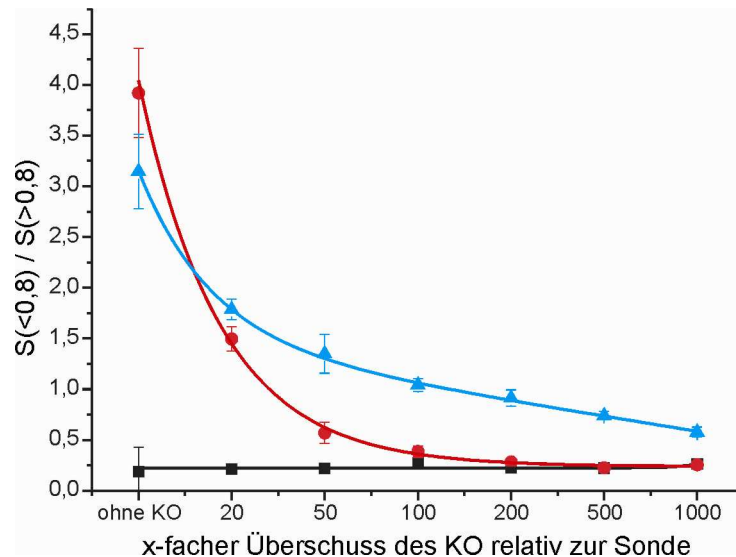
Somit ist die Sensitivität des Punktmutationsnachweises nicht von der absoluten Reproduzierbarkeit der Parameter abhängig, was die Anwendung erheblich vereinfacht. Durch die Betrachtung der relativen Werte kann zudem auf die Analyse einer Referenz- oder Vergleichsprobe verzichtet werden, da diese bereits auf dem internen Standard - der Signalzahlen über einem Proximitätswert von 0,8 - basieren.



**Abbildung 4-66:** Einfluss **a)** variierender Sondenkonzentration und **b)** unterschiedlicher Anregungsleistung auf die Signalraten der Proben. Die Gegensequenzen MM7 (rot) bzw. AXL-S (blau) sind  $5 \cdot 10^{-10}$  M, KO7  $1 \cdot 10^{-8}$  M konzentriert, in b) die Sonde  $5 \cdot 10^{-11}$  M. Die schwarzen Symbole markieren die Referenzwerte der Sonde ohne Gegensequenzen.

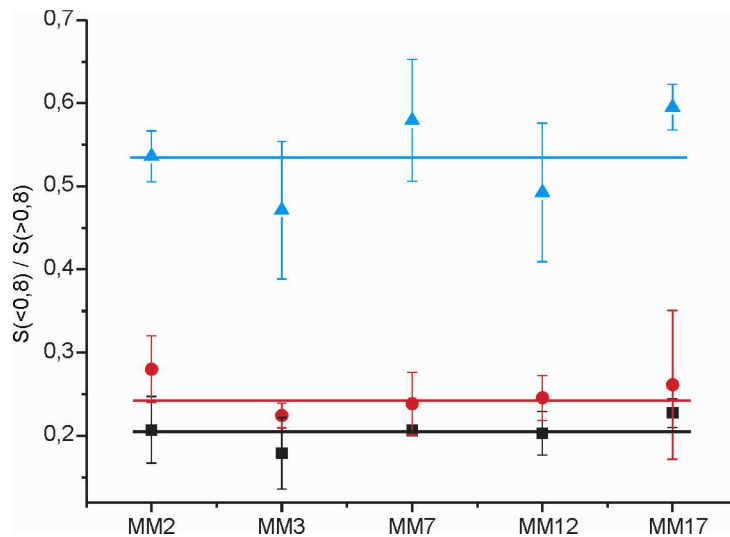
Ein wichtiger Faktor für sowohl Sensitivität als auch Spezifität des Nachweises stellt die Konzentration an Konkurrenzoligonukleotid dar. Ist der zugesetzte Überschuss relativ zur Sondenkonzentration zu gering, führt das zu falsch-positiven Signalen und somit reduzierter Spezifität, da hierdurch die Gegensequenzen mit Punktmutation nicht mehr effektiv maskiert werden. Andererseits verringert sich die Sensitivität des Nachweises durch einen zu großen Überschuss an Konkurrenzoligonukleotiden, da sie auch mit der Sonde bzgl. der Anbindung an die Zielsequenz konkurrieren. Ein hoher Überschuss maskiert demzufolge diese teilweise, wodurch sich der Anstieg der Signalzahlen reduziert.

Abbildung 4-67 stellt den Zusammenhang zwischen relativem KO-Überschuss und Sensitivität bzw. Spezifität graphisch dar. Demzufolge ist bei einer Sondenkonzentration von 50 pM mit 50- bis 500-fachen KO-Überschüssen ein spezifischer Nachweis möglich. Es ergeben sich daraus Signalraten von 1,34 bis 0,74 für die Positivproben, wohingegen die Referenz- bzw. Negativproben lediglich Raten von 0,3 – 0,2 aufweisen. Im Fall von 50-fachem KO-Überschuss ist die Negativprobe mit einem Verhältnis von 0,57 (Wert der Positivprobe = 1,34) noch leicht erhöht, mit Zunahme der KO-Konzentration sinken die entsprechenden Werte jedoch auf das Referenzniveau.



**Abbildung 4-67:** Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsverhältnis Sonde : KO7 und Sensitivität bzw. Spezifität des Nachweissystems. Die Sonde ist  $5 \cdot 10^{-11}$  M und die Gegensequenzen  $5 \cdot 10^{-10}$  M konzentriert, wobei die blauen (roten) Symbole die Werte unter Anwesenheit der Gegensequenz AXL-S (MM7) markieren. In schwarz sind die Referenzwerte der Sonde ohne Gegensequenzen eingezeichnet.

Abbildung 4-68 fasst die Ergebnisse für sämtliche untersuchten Punktmutationen zusammen. Die Gegensequenzen sind dabei zehnfach höher konzentriert als die Sonde (50 pM), das jeweilige KO 200-fach. Wie mit den Ensemblemessungen bereits gezeigt, erlauben auch einzelmolekülspektroskopische Methoden eine eindeutige Punktmutationsunterscheidung unter Verwendung der Dy-520XL-DNA-Sonde. Für alle Basenaustauschvarianten ergibt sich ein mittlerer positiver Anstieg von 0,54, wobei die Werte für MM3 und MM12 aufgrund der großen Streuung diese Schwelle herabsetzen. Dennoch ist ebenfalls für diese Mutationen eine eindeutige Unterscheidung möglich, da sich die Werte für alle Punktmutationssequenzen im Bereich um 0,25 bewegen.

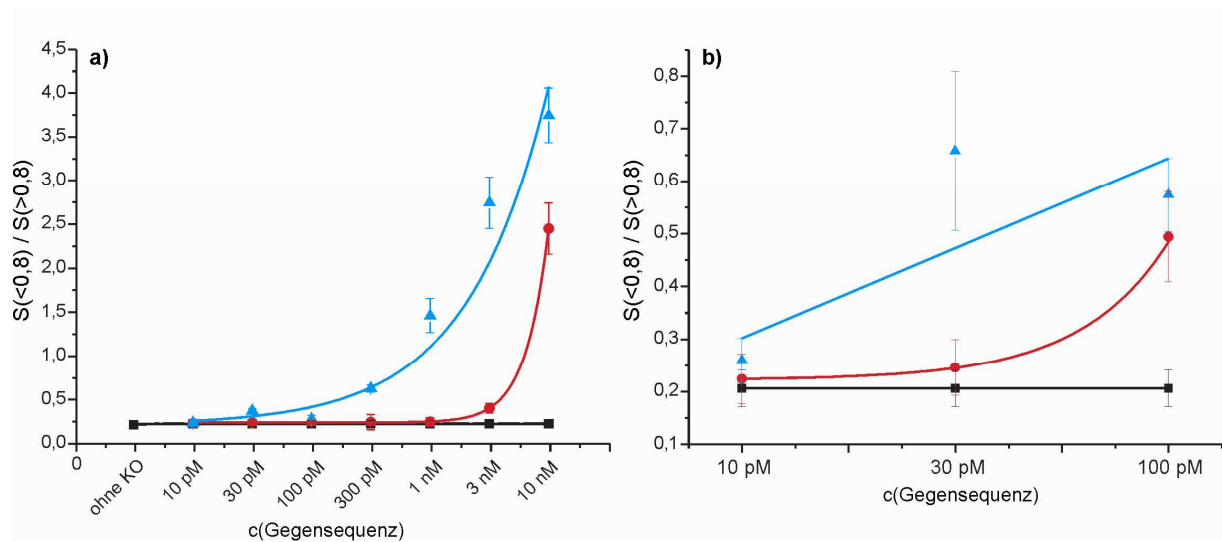


**Abbildung 4-68:** Ergebnisse der Messungen für die jeweiligen Punktmutationen mit 50 pM Sondenkonzentration. In blau gehalten sind Werte der Positivproben, in rot die der Mutationssequenzen und in schwarz die Referenzmessungen mit jeweiligem Konkurrenzoligonukleotid, jedoch ohne Gegensequenz. Die Konzentrationen entsprechen denen in Abb. 4-65.

Ein großer Vorteil der Sonden im Vergleich zu haarnadelbasierten Sonden ist die Variabilität von Sensitivität und Spezifität. Da diese Parameter lediglich von der Konzentration des zugesetzten Konkurrenzoligonukleotids abhängen, kann er je nach Bedarf den Erfordernissen angepasst werden, um die Sensitivität oder Spezifität zu erhöhen. Bei haarnadelbasierten Sonden resultieren die Größen aus dem Stabilitätsverhältnis zwischen geschlossener und hybridisierter Form der Sonde, was nur durch Variation der Sondensequenz und somit wesentlich schwieriger zu ändern ist.

Abbildung 4-69 gibt einen Überblick über die mit dem System zu erreichende Nachweisgrenze bei Anwendung unterschiedlicher Mengen KO unter gleichbleibender Sondenkonzentration von  $5 \cdot 10^{-11}$  M. Die Proben in Teil a) enthielten das Konkurrenzoligonukleotid in 200-fachem, diejenigen in Teil b) in zehnfachem Überschuss.





**Abbildung 4-69:** Konzentrationsreihen der Gegensequenzen AXL-S (blau) und MM7 (rot) bei Verwendung  $5 \cdot 10^{-11}$  M Sonde und Zusatz von **a)**  $1 \cdot 10^{-8}$  M bzw. **b)**  $5 \cdot 10^{-10}$  M KO7. Die Referenzwerte der Messungen ohne Gegensequenzen sind in schwarz dargestellt.

Mit der 200-fachen Menge an KO relativ zur Sonde ist die Punktmutation bis zu einer Konzentration von 300 pM eindeutig zu erkennen, bei Verwendung der zehnfachen Menge KO ist dies mit Konzentrationen von 30 pM möglich. Die gesteigerte Sensitivität geht allerdings zu Lasten der nachweisbaren Konzentrationsspanne, da mit dem geringeren Überschuss ein falsch-positiver Signalanstieg bereits bei geringeren Mengen vorhandener Gegensequenz zu verzeichnen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit der Dy-520XL-basierten DNA-Sonde eine weitere Möglichkeit verfügbar ist, Punktmutationen spezifisch und hochsensitiv zu diskriminieren. Gegenüber haarnadelbasierten Sondensystemen zeichnet sie sich vor allem durch einen wesentlich geringeren Konzeptionsaufwand, als auch durch erhöhte Flexibilität im Hinblick auf Variation der Sensitivität und Spezifität aus. Auch gegenüber anderen Punktmutationssonden erweist sich ihr simpler und günstiger Aufbau als vorteilhaft, da aufgrund der Fluoreszenzemissionscharakteristik des zu den Coumarinen gehörenden Farbstoffs auf die Verwendung eines fluoreszenzlöschenden Moleküls verzichtet werden kann. Des Weiteren ist durch interne Standardisierung über das Verhältnis der Burstzahlen eine Durchführung von Vergleichs- und Referenzmessungen nicht notwendig.



## 5 DISKUSSION UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurden Methoden zur Anwendung in Einzelmolekülspektroskopischen diagnostischen und analytischen Verfahren entwickelt.

Im ersten Teil konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung stöchiometrisch markierter nativer Proteinsubstrate ein sensitiver Nachweis von proteolytischer Aktivität auf Einzelmolekülniveau möglich ist. Dies geschah mithilfe zweier alternativer Detektionsverfahren.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem sensitiven und spezifischen Nachweis von Punktmutationen in DNA-Sequenzen. Dafür wurde zum Einen das *Smart Probe*-basierte Verfahren weiterentwickelt und zum Anderen ein neuartiger, außerordentlich einfach zu handhabender DNA-Sondentyp auf Basis des Coumarinfarbstoffs Dy-520XL aufgebaut.

### 5.1 Einzelmolekülspektroskopischer Proteasenachweis

Bei Krebserkrankungen, der zweithäufigsten Todesursache in Deutschland, stellen Metastasen das schwerwiegendste Problem für eine erfolgreiche Behandlung dar. Während Primärtumore operativ oder mittels Bestrahlung effektiv bekämpft werden können, führen Metastasen bei 90 % aller Patienten zum Tod. Da Proteasen entscheidend an den Prozessen der Metastasierung beteiligt sind, stehen sie schon lange im Fokus der Forschung. Dennoch sind die vielfältigen Aufgaben und Beziehungen der beteiligten Peptidasen noch nicht vollständig entschlüsselt, was eine zielgerichtete Medikamentenentwicklung bisher verhindert. Die zurzeit etablierten Methoden zur Charakterisierung von Proteasen basieren auf kurzen, synthetischen Peptiden, wobei die Proteaseaktivitätsdetektion mit unterschiedlichen Methoden erfolgt. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Bestimmung der von den Enzymen erkannten Aminosäuresequenz und die Schnittposition im Substrat. Jedoch sind Rückschlüsse auf die natürlichen *in vivo*-Substrate der betreffenden Enzyme nur sehr eingeschränkt zu ziehen, da die für die Enzym-Substrat-Wechselwirkung wichtige Sekundärstruktur eventueller Proteinsubstrate unter Verwendung synthetischer Peptide nicht berücksichtigt wird.

Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um unter Verwendung nativer Proteinsubstrate die Aktivität proteolytischer Enzyme sensitiv bestimmen zu können. Hiermit eröffnet sich die Möglichkeit, die nativen Ziele tumorrelevanter Proteasen zu bestimmen und somit die proteolytischen Prozesse der Metastasierung besser zu verstehen, was zur Entwicklung effizienter metastasenunterdrückender Medikamente wie selektiver Proteaseinhibitoren beitragen kann.

### **5.1.1 Stöchiometrische Einfachmarkierung nativer Proteine**

In Ermangelung vorhandener Verfahren zur stöchiometrischen posttranslationalen Proteinmodifikation unter Erhalt der biologischen Aktivität musste zunächst eine entsprechende Methode entwickelt werden. Dies konnte anhand farbstoffmarkierter und aminomodifizierter Oligonukleotidsequenzen, welche über die bioorthogonalen Click-Chemie-Crosslinker SFB und SANH kovalent an das Protein gebunden wurden, erzielt werden. Die inkorporierten Basensequenzen dienten als spezifische Kodierung für eingeführte Modifikationen und konnten über Festphasen, welche mit komplementären Gegensequenzen funktionalisiert wurden, effektiv und selektiv aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Ferner erlaubte die Variabilität der Oligonukleotidsequenz eine simultane oder sequenzielle Einführung mehrerer Modifikationen nach derselben Vorgehensweise.

Im Vergleich zu anderen Markierungsverfahren, welche entweder voluminöse Fusionsproteine mit weniger geeigneten spektroskopischen Eigenschaften verwenden oder heterogen modifizierte Gemische erzeugen, resultiert die in dieser Arbeit entwickelte Methode in stöchiometrisch einfach markierten Proteinen unter weitgehendem Erhalt ihrer biologischen Funktionalität. Aufgrund des stochastischen Markierungsverfahrens über die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinseitenketten muss das zu modifizierende Protein zur Unterbindung von Mehrfachmarkierungen in großem Überschuss eingesetzt werden. Die damit verbundenen geringen Ausbeuten von etwa fünf Prozent limitieren die potentiellen Anwendungen auf einzelmolekül-spektroskopische Verfahren. Nichtsdestotrotz hat die entwickelte Methode auch außerhalb der ursprünglich geplanten Anwendung erhebliches Interesse gefunden, weshalb diesbezügliche Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von *Prof. Schütz*, Universität Linz, *Prof. Stockinger*, Universität Wien und *Prof. Damjanovich*, Universität Debrecen, eingegangen wurden. Im Rahmen der Zusammenarbeit

erfolgte die stöchiometrische Fluoreszenzmarkierung verschiedener Antikörper, was aufgrund der universellen Ausrichtung des Systems keinerlei Anpassungen erforderte.

Die in der vorliegenden Arbeit zur Isolierung der markierten Proteine verwendete streptavidinfunktionalisierte Festphase zur Immobilisierung der biotinylierten Oligonukleotide kann in einem nächsten Schritt ersetzt werden, um die Gegensequenzen kovalent anzubinden. Damit wären stringenteren Waschprozeduren möglich, welche eine Wiederverwendung der funktionalisierten Festphasen erlauben würden. Erste diesbezügliche Versuche scheiterten jedoch an beträchtlichen unspezifischen Adsorptionseffekten der verwendeten Materialien bezüglich DNA als auch Protein.

Ferner könnte die Verwendung des neu von *Pierce* auf den Markt gebrachten Click-Chemie-Systems auf Basis einer *Staudinger*-Ligation die Kopplungsausbeute in Bezug auf die eingesetzte DNA-Menge erhöhen.

Die eingeführten DNA-Sequenzen können neben der Anwendung zur Aufreinigung auch zur spezifischen Anbindung der modifizierten Proteine an DNA-modifizierte Oberflächen verwendet werden. Somit eröffnen sie eine einfache Möglichkeit zur Verwendung derartig fluoreszenzmarkierter Proteine in oberflächenbasierten Systemen wie beispielsweise *Microarrays*.

### 5.1.2 Charakterisierung des Fluoreszenzfarbstoffs Dy-520XL

Zum Aufbau eines einzelmolekülbasierten Verfahrens, welches proteolytische Aktivität durch Zweikanaldetektion zeitlich korrelierter Fluoreszenzsignale bestimmt, wurde ein organisches Chromophorenpaar gesucht, deren Fluoreszenzemissionen bei Anregung mit einer Wellenlänge spektral getrennt zu registrieren ist. Mit dem Fluorophor Atto 520 und dem *MegaStokes*-Farbstoff Dy-520XL von *Dyomics* konnte eine derartige Konstellation erzielt werden. Im Zuge der Charakterisierung des bisher noch nicht in einzelmolekülspektroskopischen Applikationen eingesetzten Dy-520XL äußerte sich dessen strukturelle Zugehörigkeit zu den 7-Aminocoumarinen in entsprechenden spektroskopischen Eigenschaften. Er weist eine starke Sensitivität bezüglich der Lösungsmittelpolarität und seiner Mikroumgebung auf. Dabei ist beim Übergang zu polarerer Solventien neben einer bathochromen Verschiebung der Fluoreszenzemissionsbande von 625 bis zu 665 nm und einer starken Abnahme der

Fluoreszenzquantenausbeute von 0,6 auf 0,017, eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer von 2,2 auf 0,2 ns zu verzeichnen. Aus den errechneten fluoreszenten und nicht fluoreszenten Abklingraten ergab sich ferner eine deutliche Diskrepanz zwischen protischen und aprotischen Lösungsmitteln. In Übereinstimmung mit in der Literatur für andere Coumarine vorzufindenden Resultaten konnte dieses Verhalten auf den Übergang des angeregten intramolekularen *Charge-Transfer*-Zustands (ICT) in einen verdrehten ICT-Zustand in polaren protischen Solventien zurückgeführt werden. Dieser TICT-Zustand eröffnet einen zusätzlichen strahlungslosen Deaktivierungspfad, wodurch in entsprechenden Lösungsmitteln wie Wasser, Formamid oder DMF die Fluoreszenzquantenausbeute massiv abnimmt. Der Übergang in den TICT-Zustand erfordert eine Rotation der 7-Diethylaminogruppe, weshalb eine Erhöhung der Lösungsmittelviskosität oder eine Konjugation des Farbstoffs an sperrige Moleküle diesen erschwert. Entsprechende Beobachtungen in Wasser-Glycerin- oder Wasser-dNTP-Mischungen sind hierzu konsistent. Die Anbindung des Farbstoffs an Oligonukleotide resultierte im Vergleich zur wässrigen Farbstofflösung in einer zehnfachen Steigerung der Fluoreszenzemissionsintensität, welche durch Ausbildung bestimmter DNA-Doppelstrangkongformationen erneut um das Fünffache stieg. Dabei war es maßgeblich, an welchem Oligonukleotidende der Farbstoff lokalisiert war und an welchem Bereich der markierten Basenabfolge sich der Gegenstrang anlagerte. Bei einer 3'-Markierung erbrachte eine am Farbstoffende überstehende Gegensequenz einen fünffachen Fluoreszenzanstieg, wohingegen selbiges am 5'-Ende bei einem am Farbstoffende um drei bis fünf Basen kürzeren Gegenstrang auftrat. In der umgekehrten Kombination zeigte sich hingegen in beiden Fällen eine Fluoreszenzintensität der Stärke des markierten Einzelstrangs. Damit sind sterische Ursachen für das Auftreten dieser Unterschiede wahrscheinlich, da in beiden emissionsstarken Zuständen am markierten Ende jeweils das 5'-Ende übersteht, wohingegen es bei den emissionsschwachen Konstellationen zurück bleibt. Basierend auf den Erkenntnissen konnten unter Ausnutzung der Farbstoffcharakteristiken eine neuartige DNA-Sonde aufgebaut werden. In anderen biologischen Zusammenhängen, etwa als Mikroumgebungssonde zur Erkennung von Proteinfaltungsprozessen, gelang die Anwendung der speziellen Eigenschaften einiger Coumarin-farbstoffe bereits erfolgreich [Shobini 2001].

### 5.1.3 Verfahren zur korrelationsbasierten Detektion proteolytischer Aktivität

Das Verfahren wurde im Hinblick auf die Bestimmung der nativen Substrate tumorassoziiierter Proteasen entwickelt. Die Proteaseaktivitätsdetektion über zeitlich korrelierte Signale ist hier insofern von Vorteil, als dass ein erhöhter Fluoreszenzhintergrund aufgrund verunreinigter biologischer Extrakte statistisch nur sehr wenige positive Signale erzeugt [Orte 2006]. In diesem Zusammenhang ist es im Rahmen der Arbeit erstmals gelungen das Korrelationsdetektionsverfahren auf Einzelmolekülebene mit 50 pM Substratlösungen und zwei organischen Fluorophoren zu betreiben. Bisherige Anwendungen beschränkten sich entweder auf höher konzentrierte Proben (nanomolarer Bereich) für FCS-Anwendungen [Kosturko 2006] oder behelfen sich mit *Quantum Dots*, Tandemfarbstoffen oder Fusionsproteinen [Hwang 2004; 2005]. Nach erfolgreicher Etablierung der Methode unter Verwendung von DNA-Modellsystemen konnte der proteolytische Verdau von stöchiometrisch mit A 520 und Dy-520XL markiertem BSA durch Trypsin nachgewiesen werden. Dabei war auch der Effekt des Trypsininhibitors AEBSF nachzuweisen, welcher nicht in einer vollständigen Inhibierung, sondern lediglich in einer Herabsetzung auf ca. 30 % Restaktivität bestand.

In einem weiteren Schritt gelang darüber hinaus die Detektion der proteolytischen Aktivität von KLK6, einer trypsinähnlichen Serinprotease, ebenfalls in Verbindung mit dem zweifach markierten BSA-Substrat. Dabei zeigte KLK6 Aktivitätswerte, welche der Hälfte der von Trypsin entsprachen.

KLK6 ist seit einiger Zeit als potentieller Biomarker im Gespräch, da dessen Serumkonzentration bei einigen Krebsarten wie Nierenzellen- [Petraki 2006], Ovarialkarzinomen [Shan 2007] sowie Darmkrebs [Feng 2006] in klinischen Studien einen Zusammenhang mit den Prognosewerten offenbarte. Speziell bei Ovarialkarzinomen böte die Früherkennung über erhöhte KLK6-Serumwerte eine Möglichkeit, diese Krankheit in einem frühen, heilbaren Stadium zu diagnostizieren [Borgoño 2004]. Das in dieser Arbeit entwickelte System könnte hier zur sensitiven Diagnostik eingesetzt werden.

Ferner belegen neuere Forschungsergebnisse die Beteiligung von KLK6 in der Entwicklung von verschiedenen Hauttumorarten [Klucky 2007]. Aber auch viele weitere Vertreter der Kallikreine sind bei Tumorerkrankungen dereguliert und daher in den entsprechenden Prozessen involviert [Borgoño 2004]. Da jedoch speziell über

die *in vivo*-Substrate in den betreffenden Signalkaskaden noch wenig bekannt ist, bietet das vorgestellte System eine geeignete Möglichkeit diese Zusammenhänge zu untersuchen, indem es auf natürlichen, in ihrer biologischen Funktion weitgehend unbeeinflussten Proteinsubstraten basiert.

Speziell im Fall von KLK6 sind keine effizienten Inhibitoren bekannt, weshalb ein Projekt in Zusammenarbeit mit *Dr. Hess* in der Gruppe von *Prof. Angel*, DKFZ Heidelberg und *Prof. Efferth*, Universität Mainz, initiiert wurde, um nach Vorauswahl von Leitstrukturen mittels *in silico*-Verfahren geeignete Inhibitor Kandidaten *in vitro* mit dem System auf ihre tatsächliche Eignung zu testen. Eine derartige Substanz würde erstmals die Möglichkeit bieten, KLK6 effizient zu hemmen und damit die beteiligten *in vivo*-Prozesse exakt studieren zu können.

Neben statischen Messungen oder Endpunktsbestimmungen des proteolytischen Verdaus ermöglicht die korrelationsbasierte Detektion zeitaufgelöste Messungen des Verdaus über die Abnahme der Korrelationsereignisrate. Dies konnte anhand von entsprechenden Messungen am Modellsystem des DNA-Doppelstrangverdaus durch DNase I eindeutig belegt werden. Höhere Konzentrationen von DNase I führten zu einer schnelleren Abnahme der Korrelationsrate, wohingegen Proben ohne Enzym bzw. mit Enzym keine Wertänderung über die Messzeit von 30 min aufwiesen. Selbiges war auch bei der proteolytischen Spaltung von BSA durch Trypsin beobachtbar.

Einschränkungen des Systems ergeben sich hingegen durch den nicht sehr variablen Substratkonzentrationsbereich. Zur Detektion einer ausreichenden Ereigniszahl ist eine Absenkung unter Konzentrationen von 10 pM nicht sinnvoll, wohingegen eine Konzentrationserhöhung auf Werte des nanomolaren Bereichs durch statistische Kollokalisierung falsche Korrelationsereignisse erzeugen würde.

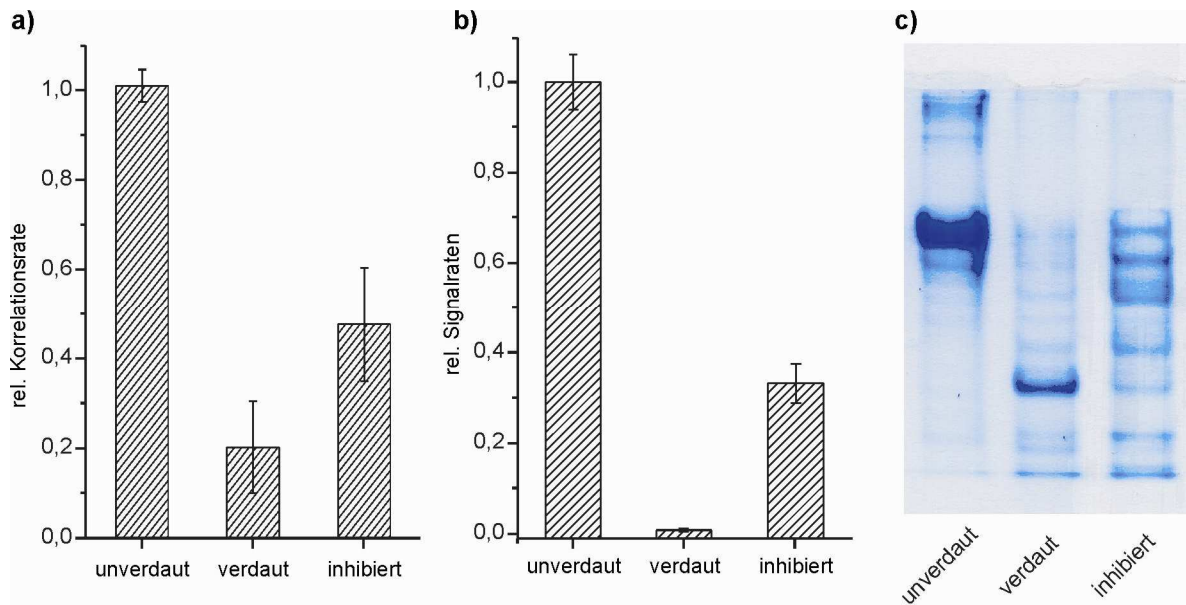
Das entwickelte und in der Analyse entsprechender Messdaten verwendete Programm zur Erfassung korrelierter Ereignisse hat sich in den Messreihen bewährt. Eine mögliche und sinnvolle Weiterentwicklung bestünde in der direkten Onlineerfassung der Signale bereits während der Messung. Da die verwendete Messsoftware von *Picoquant* die gesammelten Daten erst am Ende einer Messung als Datei speichert, erfordert eine Echtzeitauswertung einen erheblichen programmatischen Aufwand in Form von separater Messsoftware oder einen Eingriff in das *Picoquant*-Programm, was Inhalt eines eigenen Projekts wäre. In diesem



Zusammenhang böte sich eine Umstellung der grundlegenden Signalerkennung von Intervall- auf Ereignisregistrierung an, um die Detektionsmethode in Bezug auf unterschiedlich lange Diffusionszeiten flexibler zu gestalten.

### **Oberflächengestütztes alternatives Detektionssystem**

Als alternative Methode wurde die proteolytische Aktivität mit einem technisch und in der Analyse einfacheren einzelmolekülspektroskopischen Detektionssystem geführt. Es beruht auf streptavidinfunktionalisierten Oberflächen, an welche biotinylierte Protein(-fragmente) binden und somit in der Lösung nicht mehr zu detektieren sind. Da die nativen Substrate nach der in dieser Arbeit entwickelten Methode stöchiometrisch mit Biotin und einem Farbstoff modifiziert wurden, ist ein erhöhtes Fluoreszenzsignal einzig die Folge proteolytischer Substratzersetzung. Ein weiterer Vorteil dieses Detektionsverfahrens besteht in der größeren Flexibilität in Bezug auf die einsetzbaren Fluorophore sowie die verwendeten Substratkonzentrationen. Eine Unterscheidung zwischen unverdauter, inhibierter und proteolytisch zersetzter Probe konnte noch mit 50 pM Substrat- und 1 nM Trypsinkonzentrationen getroffen werden. Aus diesen Messreihen ergab sich ebenfalls die Erkenntnis, dass AEBSF Trypsin nicht quantitativ hemmt. In allen Konzentrationskombinationen konnte eine 30 %ige Restaktivität beobachtet werden. Abbildung 5-1 zeigt einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der a) korrelierten Detektion, b) der streptavidinoberflächenbasierten Detektion sowie c) einem äquivalenten Verdau und anschließender *SDS-PAGE*-Auftrennung der Probe. Demnach sind die durch die beiden einzelmolekülspektroskopischen Messmethoden erhaltenen Daten in sich konsistent und konnten durch die gelbasierte Auftrennung validiert werden. Ferner decken sie sich mit in der Literatur gemachten Angaben zum Ausmaß der Trypsininhibierung durch AEBSF [Rose 2003].



**Abbildung 5-1:** Vergleich der Resultate von **a)** der korrelationsbasierten und **b)** der streptavidinoberflächengebundenen Nachweismethode mit **c)** einem äquivalenten Verdauansatz nicht markierten BSAs durch Trypsin und anschließender *SDS-PAGE*-Auftrennung.

Nachteilig wirkt sich an dem streptavidinoberflächengestützten Verfahren der zusätzliche präparative Aufwand in Form der Herstellung der Oberflächen aus. Ferner ermöglicht die oberflächengebundene Methode im Gegensatz zum auf Korrelationserkennung basierenden Nachweis keine zeitaufgelöste Detektion. Des Weiteren ist ein erhöhter fluoreszierender Hintergrund aufgrund verunreinigter biologischer Materialien nicht zu kompensieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide entwickelten Methoden für sensitive *in vitro*-Messungen der Aktivität proteolytischer Enzyme geeignet sind. Insbesondere unter Verwendung stöchiometrisch markierter Substrate, welche ihre native Tertiärstruktur aufweisen, sollten diese Systeme effektiv zur Erforschung der proteolytischen Zusammenhänge in den verschiedenen Stadien der Tumorentstehung und zum Test selektiver Proteaseinhibitoren beitragen können sowie als sensitives Diagnosesystem für proteolytische Biomarker breite Anwendung finden.

## Nachweis von DNA-Punktmutationen

Mutationen des Erbguts stellen den ersten Schritt der Entwicklungsstufe von Krebs dar. Da über 90 % aller derartigen genetischen Veränderungen aus Punktmutationen bestehen, herrscht ein großes Interesse an deren sensitiver und spezifischer Erkennung. Aber auch bei vielen Infektionskrankheiten spielen Punktmutationen eine wichtige Rolle, da sie oftmals die Antibiotikaresistenz von Erregern bedingen. Demzufolge herrscht auch im Hinblick auf dieses Anwendungsfeld ein reges Interesse an schnellen, kostengünstigen und flexiblen Diagnosesystemen. Obwohl es auf Grundlage fluoreszierender Sonden bereits einige Nachweissysteme gibt, ist die Nachfrage nach sensitiveren und einfacher zu handhabenden Methoden groß. Die in dieser Arbeit vorgestellten DNA-Sondensysteme stellen Möglichkeiten dar, diesen Ansprüchen gerecht zu werden.

### Weiterentwicklung des *Smart Probes*-basierten Verfahrens zur sensitiven und spezifischen Erkennung von DNA-Punktmutationen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Fähigkeit der *Smart Probes*, kleine Mengen DNA mit Punktmutationen auch in Gegenwart großer Mengen Wildtyp-DNA zu erkennen, entscheidend verbessert werden. Durch Zusatz nicht farbstoffmarkierter Konkurrenzsonden wird ein falsch-positiver Signalanstieg, hervorgerufen durch Hybridisieren der *Smart Probe* mit nicht exakt komplementären Gegensequenzen, unterbunden. Dies geschieht durch langsames Abkühlen der Testlösungen in Gegenwart der Sonden, wobei sich selektiv die stabilsten Doppelstränge bilden und die Konkurrenzsonden die *Smart Probe* aus Hybriden mit nicht exakt komplementären Gegensequenzen verdrängen. Dies könnte nun den Einsatz der Sonde zur Krebsfrüherkennung erlauben, da hierzu in Körperflüssigkeiten kleinste Mengen veränderter DNA unter einem großen Überschuss Wildtyp-DNA nicht nur sensitiv, sondern auch hochspezifisch zu erkennen sein müssen [Sidransky 2002]. Andernfalls führen derartige Tests zu falsch-positiven Ergebnissen oder zu Nichterkennung einer Erkrankung, wie dies im Fall des Prostatatumormarkers PSA oftmals der Fall ist [Bok 2002]. Durch den Einsatz der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie zur Detektion und den damit zusätzlich zur Signalintensität zur Verfügung stehenden Parametern Fluoreszenzlebensdauer sowie Signalbreite gelingt die eindeutige Identifizierung von Punktmutationen noch bei Konzentrationen

von 30 pM, wohingegen tausendfach höhere Konzentrationen an Wildtyp-DNA keine Signale liefern.

### **Entwicklung einer neuartigen, auf dem Coumarinfarbstoff Dy-520XL basierenden DNA-Sonde zur Erkennung von Punktmutationen**

Basierend auf den Resultaten der Arbeiten mit den *Smart Probes* in Verbindung mit den über den Fluoreszenzfarbstoff Dy-520XL gewonnenen Erkenntnissen konnte eine neuartige DNA-Sonde entwickelt werden. Sie beruht auf der Tatsache, dass der an einen DNA-Strang gebundene Fluorophor bei Ausbildung eines DNA-Doppelstrangs unter bestimmten Bedingungen eine um 30 nm hypsochrom verschobene und fünffach stärkere Fluoreszenzbande als im einzelsträngigen Zustand zeigt. Die punktmutationsspezifische Diskriminierung wird durch Zugabe eines Überschusses nicht markierter Sonden (**Konkurrenzoligonukleotide** - KOs) erzielt, welche zu den anderen drei SNP-Sequenzen komplementär sind. Beim Durchlaufen eines flachen negativen Temperaturgradienten bilden sich somit gezielt die stabilsten Doppelstrangkonfigurationen aus, woraus bei Anwesenheit zur Dy-520XL-Sonde komplementärer Sequenzen ein Fluoreszenzanstieg resultiert. Sind hingegen an der SNP-Position differierende Sequenzen in der Lösung zugegen, werden sie von den Konkurrenzoligonukleotiden maskiert, womit ein falsch-positiver Fluoreszenzanstieg durch Fehlhybridisierung der DY-520XL-Sonde mit diesen Sequenzen effektiv zu unterdrücken ist. Neben eindeutigen Resultaten in Ensemblemessungen konnte die Sonde auch in einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen erfolgreich eingesetzt werden. Mit der Verwendung eines Strahlteilers bei 640 nm lässt sich eine effektive Trennung der kurzwelligen Sondersignale im hybridisierten Zustand von den langwelligeren im einzelsträngigen Zustand erreichen und eine eindeutige Aussage über die anwesende Gegensequenz treffen. Wird zur Auswertung das Verhältnis aus kurzwelliger zu langwelliger Signalzahl herangezogen, kann auf Messungen von Referenzproben verzichtet werden. Ferner ist dieser Quotient gegenüber Sondenkonzentrationsschwankungen und unterschiedlicher Anregungsleistungen unempfindlich, was einen unkomplizierten Vergleich der Ergebnisse verschiedener Messreihen ermöglicht. Während die einzelsträngige Dy-520XL-Sonde (Lösungen ohne Gegensequenzen oder mit im SNP differierenden Gegensequenzen) Quotienten in der Größenordnung von 0,2 bis

0,25 aufweisen, ergeben Positivproben Werte von ca. 0,6 und höher. Mit diesem Verfahren ist der Nachweis von Punktmutationen hochspezifisch noch bei Konzentrationen von 30 pM möglich.

Im Vergleich zu DNA-Sondensystemen, welche auf Stamm-Schleifen-förmigen Sonden basieren, zeichnet sich dieses System durch seinen einfachen Aufbau aus. Während die Sequenz und Stabilität von Haarnadelsonden exakt auf die zu untersuchende SNP-Position abgestimmt werden, konnten mit der in dieser Arbeit verwendeten Dy-520XL-Sonde (25-mer) durch einfachen Austausch der KOs fünf SNPs entlang der ganzen Sequenz diskriminiert werden. Ferner vereinfacht sich der Aufbau durch das Fehlen eines Löschmoleküls, da die Fluoreszenz des Dy-520XL im einzelsträngigen Zustand lediglich aufgrund der erhöhten Exposition gegenüber Wassermolekülen gelöscht wird.

Prinzipiell sollte der Farbstoff auch durch andere *Charge-Transfer*-Farbstoffe, speziell 7-Aminocoumarine mit vergleichbaren Eigenschaften bezüglich ihrer Mikroumgebung, ersetzbar sein, um andere Wellenlängenbereiche zu erschließen. Aufgrund seiner effizienten Anregung bei 532 nm, der großen *Stokes*-Verschiebung und der damit verbundenen unproblematischen Filterung von Streulicht sowie Hintergrundreduktion stellt Dy-520XL in der Hinsicht jedoch ein annähernd ideales Chromophor dar. In Anbetracht all dieser Vorteile empfiehlt sich die Dy-520XL-basierte DNA-Sonde als Alternative zu bisherigen DNA-Sonden.

Mit den beiden DNA-Sondensystemen konnten kostengünstige Verfahren bereitgestellt werden, wobei sich speziell die Dy-520XL-basierte Sonde durch ihre Flexibilität und ihren einfach zu handhabenden Aufbau auszeichnet. Sie ermöglichen den schnellen, spezifischen und hochsensitiven Nachweis von DNA-Punktmutationen und sind somit als Instrument für die PCR-freie Diagnose entsprechender Krankheiten ideal geeignet.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Acuff, H.B.; Sinnamon, M.; Fingleton, B.; Boone, B.; Levy, S.E.; Chen, X.; Pozzi, A.; Carbone, D.P.; Schwartz, D.R.; Moin, K.; Sloane, B.F.; Matrisian, L.M. - Analysis of host- and tumor-derived proteinases using a custom dual species microarray reveals a protective role for stromal matrix metalloproteinase-12 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.*, **2006**, 66 (16), 7968-7975.
- Agard, N.J.; Baskin, J.M.; Prescher, J.A.; Lo, A.; Bertozzi, C.R. - A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *ACS Chem. Biol.*, **2006**, 1 (10), 644-648.
- ALV Laser GmbH - ALV-500/E Reference Manual. **1998**.
- de Araújo, A.D.; Palomo, J.M.; Cramer, J.; Seitz, O.; Alexandrov, K.; Waldmann, H. - Diels-Alder ligation of peptides and proteins. *Chemistry*, **2006**, 12 (23), 6095-6109.
- Arbeloa, T.L.; Arbeloa, F.L.; Tapia, M.J.; Arbeloa, I.L. - Hydrogen-bonding effect on the photophysical properties of 7-aminocoumarin derivatives. *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97 (18), 4704-4707.
- ATTO-TEC GmbH - ATTO 590 AD 590: [https://www.atto-tec.com/attotecshop/product\\_info.php?info=p105\\_ATTO-590.html](https://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p105_ATTO-590.html).
- Avrameas, S. - Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, **1969**, 6 (1), 43-52.
- Balkwill, F.; Mantovani, A. - Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, **2001**, 357 (9255), 539-545.
- Baldino, F.; Chesselet, M.F.; Lewis, M.E. - High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Meth. Enzymol.*, **1989**, 168, 761-777.
- Barik, A.; Kumbhakar, M.; Nath, S.; Pal, H. - Evidence for the TICT mediated nonradiative deexcitation process for the excited coumarin-1 dye in high polarity protic solvents. *Chem. Phys.*, **2005**, 315 (3), 277-285.
- Barik, A.; Nath, S.; Pal, H. - Effect of solvent polarity on the photophysical properties of coumarin-1 dye. *J. Chem. Phys.*, **2003**, 119 (19), 10202-10208.
- Basbaum, C.B.; Werb, Z. - Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1996**, 8 (5), 731-738.
- Bayer, E.; Rapp, W. - New polymer supports for solid-liquid-phase peptide synthesis. *Chem. Pept. Prot.*, **1986**, 3, 3-8.
- Becker, C.F.W.; Seidel, R.; Jahnz, M.; Bacia, K.; Niederhausen, T.; Alexandrov, K.; Schwille, P.; Goody, R.S.; Engelhard, M. - C-terminal fluorescence labeling of proteins for interaction studies on the single-molecule level. *ChemBioChem*, **2006**, 7 (6), 891-895.
- Becker, H.G.O. - Einführung in die Photochemie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1983**.

- Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K.; Grassl, M. - Methods of Enzymatic Analysis. Seite 436-437, 2. Aufl., Hrsg. H U Bergmeyer, Academic Press Inc., New York, **1974**.
- Bernett, M.J.; Blaber, S.I.; Scarisbrick, I.A.; Dhanarajan, P.; Thompson, S.M.; Blaber, M. - Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277 (27), 24562-24570.
- Bharaj, B.B.; Luo, L.; Jung, K.; Stephan, C.; Diamandis, E.P. - Identification of single nucleotide polymorphisms in the human kallikrein 10 (KLK10) gene and their association with prostate, breast, testicular, and ovarian cancers. *Prostate*, **2002**, 51 (1), 35-41.
- Bok, R.A.; Small, E.J. - Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2 (12), 918-926.
- Bomgardner, R.D. - Studying Protein Interactions in Living Cells. *Genet. Eng. Biotechn. N.*, **2008**, 228 (7), 24-25.
- Borgoño, C.A.; Diamandis, E.P. - The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4 (11), 876-890.
- Bragg, P.D.; Hou, C. - Subunit composition, function, and spatial arrangement in the Ca<sup>2+</sup>-and Mg<sup>2+</sup>-activated adenosine triphosphatases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1975**, 167 (1), 311-321.
- Breslauer, K.J.; Frank, R.; Blöcker, H.; Marky, L.A. - Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1986**, 83 (11), 3746-3750.
- Brillard-Bourdet, M.; Moreau, T.; Gauthier, F. - Substrate specificity of tissue kallikreins: importance of an extended interaction site. *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, 1246 (1), 47-52.
- Britten, R.J.; Kohne, D.E. - Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science*, **1968**, 161 (841), 529-540.
- Browne, D.T.; Kent, S.B. - Formation of non-amidine products in the reaction of primary amines with imido esters. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1975**, 67 (1), 126-132.
- Buchmueller, K.L.; Hill, B.T.; Platz, M.S.; Weeks, K.M. - RNA-Tethered Phenyl Azide Photocrosslinking via a Short-Lived Indiscriminant Electrophile. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125 (36), 10850-10861.
- Cairns, R.A.; Khokha, R.; Hill, R.P. - Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view. *Curr. Mol. Med.*, **2003**, 3 (7), 659-671.
- Camacho, A.; Korn, K.; Damond, M.; Cajot, J.; Litborn, E.; Liao, B.; Thyberg, P.; Winter, H.; Honegger, A.; Gardellin, P.; Rigler, R. - Direct quantification of mRNA expression levels using single molecule detection. *J. Biotech.*, **2004**, 107 (2), 107-114.
- Cantor, C.R.; Schimmel, P.R. - Biophysical Chemistry. In : Techniques for the study of biological structure and function. W. H. Freeman and Company, New York, **1980**, 454-465.



- Carroll, C.D.; Patel, H.; Johnson, T.O.; Guo, T.; Orlowski, M.; He, Z.M.; Cavallaro, C.L.; Guo, J.; Oksman, A.; Gluzman, I.Y.; Connelly, J.; Chelsky, D.; Goldberg, D.E.; Dolle, R.E. - Identification of potent inhibitors of Plasmodium falciparum plasmepsin II from an encoded statine combinatorial library. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8 (17), 2315-2320.
- Caruthers, M.H.; Beaucage, S.L.; Becker, C.; Efcavitch, J.W.; Fisher, E.F.; Galluppi, G.; Goldman, R.; deHaseth, P.; Matteucci, M.; McBride, L. - Deoxyoligonucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gen. Amplif. Anal.*, **1983**, 3, 1-26.
- Castro, A.; Okinaka, R.T. - Ultrasensitive, direct detection of a specific DNA sequence of Bacillus anthracis in solution. *Analyst*, **2000**, 125 (1), 9-11.
- Castro, A.; Williams, J.G. - Single-molecule detection of specific nucleic acid sequences in unamplified genomic DNA. *Anal. Chem.*, **1997**, 69 (19), 3915-3920.
- Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W.; Prasher, D.C. - Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **1994**, 263 (5148), 802-805.
- Chang, T.; Cheung, H.C. - A model for molecules with twisted intramolecular charge transfer characteristics: solvent polarity effect on the nonradiative rates of dyes in a series of water-ethanol mixed solvents. *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, 173 (4), 343-348.
- Chargaff, E. - Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.*, **1951**, 10 (3), 654-659.
- Chargaff, E. - How genetics got a chemical education. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1979**, 325, 344-360.
- Clarke, R.W.; Orte, A.; Klenerman, D. - Optimized threshold selection for single-molecule two-color fluorescence coincidence spectroscopy. *Anal. Chem.*, **2007**, 79 (7), 2771-2777.
- Clements, J.A.; Willemsen, N.M.; Myers, S.A.; Dong, Y. - The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **2004**, 41 (3), 265-312.
- Cloutier, S.M.; Chagas, J.R.; Mach, J.; Gygi, C.M.; Leisinger, H.; Deperthes, D. - Substrate specificity of human kallikrein 2 (hK2) as determined by phage display technology. *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269 (11), 2747-2754.
- Coombs, G.S.; Bergstrom, R.C.; Pellequer, J.L.; Baker, S.I.; Navre, M.; Smith, M.M.; Tainer, J.A.; Madison, E.L.; Corey, D.R. - Substrate specificity of prostate-specific antigen (PSA). *Chem. Biol.*, **1998**, 5 (9), 475-488.
- Cotrin, S.S.; Puzer, L.; de Souza Judice, W.A.; Juliano, L.; Carmona, A.K.; Juliano, M.A. - Positional-scanning combinatorial libraries of fluorescence resonance energy transfer peptides to define substrate specificity of carboxydipeptidases: assays with human cathepsin B. *Anal. Biochem.*, **2004**, 335 (2), 244-252.
- Coussens, L.M.; Fingleton, B.; Matrisian, L.M. - Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, **2002**, 295 (5564), 2387-2392.
- Coussens, L.M.; Werb, Z. - Inflammation and cancer. *Nature*, **2002**, 420 (6917), 860-867.

- Craven, G.R.; Steers, E.; Anfinsen, C.B. - Purification, Composition, and Molecular Weight of the Beta-Galactosidase of Escherichia Coli K12. *J. Biol. Chem.*, **1965**, 240, 2468-2477.
- Cuatrecasas, P.; Parikh, I. - Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. *Biochemistry*, **1972**, 11 (12), 2291-2299.
- Czerney, P.D.; Wenzel, M.D.; Schweder, B.D.; Lehmann, F.D. - Compound, In Particular Marker-dye, Based On Polymethines. *Patent*, **2003**, EP1318177 (A2).
- Dahiya, P.; Kumbhakar, M.; Mukherjee, T.; Pal, H. - Effect of protic solvents on twisted intramolecular charge transfer state formation in coumarin-152 and coumarin-481 dyes. *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, 414 (1-3), 148-154.
- DeClerck, Y.A.; Mercurio, A.M.; Stack, M.S.; Chapman, H.A.; Zutter, M.M.; Muschel, R.J.; Raz, A.; Matrisian, L.M.; Sloane, B.F.; Noel, A.; Hendrix, M.J.; Coussens, L.; Padarathsingh, M. - Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am. J. Pathol.*, **2004**, 164 (4), 1131-1139.
- Deperthes, D. - Phage display substrate: a blind method for determining protease specificity. *Biol. Chem.*, **2002**, 383 (7-8), 1107-1112.
- Dertinger, T.; Pacheco, V.; Hocht, I.V.D.; Hartmann, R.; Gregor, I.; Enderlein, J. - Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem*, **2007**, 8 (3), 433-443.
- Dillingham, M.S.; Wallace, M.I. - Protein modification for single molecule fluorescence microscopy. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6 (17), 3031-3037.
- DKFZ Krebsatlas - Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ): Krebsatlas. **2007**, [http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort\\_2.html](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html).
- Drexhage, K.H. - Structure and Properties of Laser Dyes. In: Dye Lasers. Topics in Applied Physics, Springer-Verlag, Heidelberg, **1973**, 155-200.
- Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A.J. - Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19 (4), 365-370.
- Ebel, S.; Lane, A.N.; Brown, T. - Very stable mismatch duplexes: structural and thermodynamic studies on tandem G.A mismatches in DNA. *Biochemistry*, **1992**, 31 (48), 12083-12086.
- Egeblad, M.; Werb, Z. - New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2 (3), 161-174.
- Eggeling, C.; Berger, S.; Brand, L.; Fries, J.R.; Schaffer, J.; Volkmer, A.; Seidel, C.A.M. - Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *J. Biotech.*, **2001**, 86 (3), 163-180.
- Emami, N.; Diamandis, E.P. - Utility of kallikrein-related peptidases (KLKs) as cancer biomarkers. *Clin. Chem.*, **2008**, 54 (10), 1600-1607.
- Enderlein, J. - Single Molecule Detection in Solution - Methods and Applications. Seite 21-67, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.

- Fingleton, B. - Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2003**, 7 (3), 385-397.
- Fischer, A. - Mechanism of the Proteolytic Activity of Malignant Tissue Cells. *Nature*, **1946**, 157, 442-442.
- Feng, B.; Xu, W.; Zheng, M.; Ma, J.; Cai, Q.; Zhang, Y.; Ji, J.; Lu, A.; Qu, Y.; Li, J.; Wang, M.; Hu, W.; Liu, B.; Zhu, Z. - Clinical significance of human kallikrein 10 gene expression in colorectal cancer and gastric cancer. *J. Gastroent. Hep.*, **2006**, 21 (10), 1596-1603.
- Förster, T. - Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, **1948**, 2, 55-75.
- Friedrich, A.; Habl, G.; Sauer, M.; Wolfrum, J.; Hoheisel, J.; Marmé, N.; Knemeyer, J. - New hairpin-structured DNA probes: alternatives to classical molecular beacons. In: Ultrasensitive and Single-Molecule Detection Technologies II. *Proc. SPIE*, **2007**, 64440M-7.
- Friedrich, A.; Hoheisel, J.D.; Marmé, N.; Knemeyer, J. - DNA-probes for the highly sensitive identification of single nucleotide polymorphism using single-molecule spectroscopy. *FEBS Lett.*, **2007**, 581 (8), 1644-1648.
- Friedrich, A.; Müller, M.; Nolte, O.; Wolfrum, J.; Sauer, M.; Hoheisel, J.D.; Knemeyer, J.; Marmé, N. - Highly specific identification of single nucleic polymorphism in *M. tuberculosis* using smart probes and single-molecule fluorescence spectroscopy in combination with blocking oligonucleotides. In: Molecular Probes for Biomedical Applications II. *Proc. SPIE*, **2008**, 68670N-8.
- Gansen, A. - Chromatin at the Nanolevel - Development of a single molecule FRET experiment and analysis of the structure and stability of individual nucleosomes. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2008**.
- Gilchrist, T.L.; Rees, C.W. - Carbenes, nitrenes and arynes, Nelson, London Publishers, **1969**.
- Gomis-Rüth, F.X.; Bayés, A.; Sotiropoulou, G.; Pampalakis, G.; Tsetsenis, T.; Villegas, V.; Avilés, F.X.; Coll, M. - The structure of human prokallikrein 6 reveals a novel activation mechanism for the kallikrein family. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277 (30), 27273-27281.
- Grabarek, Z.; Gergely, J. - Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.*, **1990**, 185 (1), 131-135.
- Grumbach, I.M.; Veh, R.W. - Sulpho-N-hydroxysuccinimide activated long chain biotin: A new microtitre plate assay for the determination of its stability at different pH values and its reaction rate with protein bound amino groups. *J. Imm. Meth.*, **1991**, 140 (2), 205-210.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. - The hallmarks of cancer. *Cell*, **2000**, 100 (1), 57-70.
- Harris, J.L.; Backes, B.J.; Leonetti, F.; Mahrus, S.; Ellman, J.A.; Craik, C.S. - Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97 (14), 7754-7759.
- Hartman, F.C.; Wold, F. - Bifunctional Reagents. Cross-Linking of Pancreatic Ribonuclease with a Diimido Ester. *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88 (16), 3890-3891.

- Harvey, B.J.; Perez, C.; Levitus, M. - DNA sequence-dependent enhancement of Cy3 fluorescence. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2009**, 8 (8), 1105-1110.
- Haustein, E.; Schwille, P. - Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2007**, 36, 151-169.
- Heinlein, T.; Knemeyer, J.; Piestert, O.; Sauer, M. - Photoinduced electron transfer between fluorescent dyes and guanosine residues in DNA-hairpins. *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107 (31), 7957-7964.
- Heinze, K.G.; Koltermann, A.; Schwille, P. - Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, 97 (19), 10377-10382.
- Hemminki, K.; Li, X.; Czene, K. - Familial risk of cancer: data for clinical counseling and cancer genetics. *Int. J. Cancer*, **2004**, 108 (1), 109-114.
- Hermanson, G.T. - Bioconjugate Techniques. 2. Aufl., Elsevier, Heidelberg, **2008**.
- Hill, K.W.; Taunton-Rigby, J.; Carter, J.D.; Kropp, E.; Vagle, K.; Pieken, W.; McGee, D.P.; Husar, G.M.; Leuck, M.; Anziano, D.J.; Sebesta, D.P. - Diels-Alder bioconjugation of diene-modified oligonucleotides. *J. Org. Chem.*, **2001**, 66 (16), 5352-5358.
- Hiratsuka, S.; Nakamura, K.; Iwai, S.; Murakami, M.; Itoh, T.; Kijima, H.; Shipley, J.M.; Senior, R.M.; Shibuya, M. - MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell*, **2002**, 2 (4), 289-300.
- Hoare, D.G.; Koshland, D.E. - A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J. Biol. Chem.*, **1967**, 242 (10), 2447-2453.
- Hwang, L.C.; Wohland, T. - Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy using single laser wavelength excitation. *ChemPhysChem*, **2004**, 5 (4), 549-551.
- Hwang, L.C.; Wohland, T. - Single wavelength excitation fluorescence cross-correlation spectroscopy with spectrally similar fluorophores: resolution for binding studies. *J. Chem. Phys.*, **2005**, 122 (11), 114708.
- Hwang, L.C.; Gösch, M.; Lasser, T.; Wohland, T. - Simultaneous multicolor fluorescence cross-correlation spectroscopy to detect higher order molecular interactions using single wavelength laser excitation. *Biophys. J.*, **2006**, 91 (2), 715-727.
- Jablonski, A. - Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z. Phys.*, **1935**, 94, 38-46.
- Jones, G.; Jackson, W.R.; Choi, C.Y.; Bergmark, W.R. - Solvent effects on emission yield and lifetime for coumarin laser dyes. Requirements for a rotatory decay mechanism. *J. Phys. Chem.*, **1985**, 89 (2), 294-300.
- Jones, G.; Jackson, W.R.; Kanoktanaporn, S.; Halpern, A.M. - Solvent effects on photophysical parameters for coumarin laser dyes. *Optics Comm.*, **1980**, 33 (3), 315-320.
- Joyce, J.A.; Pollard, J.W. - Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, **2009**, 9 (4), 239-252.

- Kan, L.S.; Chandrasegaran, S.; Pulford, S.M.; Miller, P.S. - Detection of a guanine X adenine base pair in a decadeoxyribonucleotide by proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1983**, 80 (14), 4263-4265.
- Kan, Y.; Schuster, G.B. - Long-Range Guanine Damage in Single-Stranded DNA: Charge Transport through a Duplex Bridge and in a Single-Stranded Overhang. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121 (47), 10857-10864.
- Kaudse, T. - Erweiterung eines Einzelmolekül-FRET-Spektrometers um alternierende Laseranregung und Charakterisierung des Systems. *Diplomarbeit*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2009**.
- Katz, B.A.; Liu, B.; Barnes, M.; Springman, E.B. - Crystal structure of recombinant human tissue kallikrein at 2.0 Å resolution. *Protein Sci.*, **1998**, 7 (4), 875-885.
- van Kempen, L.C.L.; de Visser, K.E.; Coussens, L.M. - Inflammation, proteases and cancer. *Eur. J. Cancer*, **2006**, 42 (6), 728-734.
- Keppler, A.; Kindermann, M.; Gendreizig, S.; Pick, H.; Vogel, H.; Johnsson, K. - Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods*, **2004**, 32 (4), 437-444.
- Klucky, B.; Mueller, R.; Vogt, I.; Teurich, S.; Hartenstein, B.; Breuhahn, K.; Flechtenmacher, C.; Angel, P.; Hess, J. - Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer Res.*, **2007**, 67 (17), 8198-8206.
- Knemeyer, J.; Marmé, N.; Sauer, M. - Probes for Detection of Specific DNA Sequences at the Single-Molecule Level. *Anal. Chem.*, **2000**, 72 (16), 3717-3724.
- Koppel, D.E. - Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A*, **1974**, 10 (6), 1938.
- Kosturko, L.D.; Maggipinto, M.J.; Korza, G.; Lee, J.W.; Carson, J.H.; Barbarese, E. - Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Mol. Biol. Cell*, **2006**, 17 (8), 3521-3533.
- Kozlov, I.A.; Melnyk, P.C.; Stromborg, K.E.; Chee, M.S.; Barker, D.L.; Zhao, C. - Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to antibodies enabling highly sensitive protein detection. *Biopolymers*, **2004**, 73 (5), 621-630.
- Kuno, M.; Fromm, D.P.; Hamann, H.F.; Gallagher, A.; Nesbitt, D.J. - Nonexponential "blinking" kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behavior. *J. Chem. Phys.*, **2000**, 112 (7), 3117-3120.
- Lakowicz, J.R. - Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3. Aufl., Plenum Press, New York, **2006**.
- Lee, L.G.; Connell, C.R.; Bloch, W. - Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucl. Acids Res.*, **1993**, 21 (16), 3761-3766.
- Lee, M.; Fridman, R.; Mobashery, S. - Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33 (7), 401-409.
- Lemieux, G.A.; Bertozzi, C.R. - Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells. *Trends Biotechnol.*, **1998**, 16 (12), 506-513.

- Li, H.; Ying, L.; Green, J.J.; Balasubramanian, S.; Klenerman, D. - Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single DNA molecules. *Anal. Chem.*, **2003**, 75 (7), 1664-1670.
- Li, M.; Chen, D.; Shiloh, A.; Luo, J.; Nikolaev, A.Y.; Qin, J.; Gu, W. - Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature*, **2002**, 416 (6881), 648-653.
- Li, Y.Z.; Kirby, J.P.; George, M.W.; Poliakoff, M.; Schuster, G.B. - 1,2-Didehydroazepines from the photolysis of substituted aryl azides: analysis of their chemical and physical properties by time-resolved spectroscopic methods. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110 (24), 8092-8098.
- Liang, T.Y.; Schuster, G.B. - Photochemistry of 3- and 4-nitrophenyl azide: detection and characterization of reactive intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109 (25), 7803-7810.
- Lieberwirth, U.; Arden-Jacob, J.; Drexhage, K.; Hertel, D.; Müller, R.; Neumann, M.; Schulz, A.; Siebert, S.; Sagner, G.; Klingel, S.; Sauer, M.; Wolfrum, J. - Multiplex dye DNA sequencing in capillary gel electrophoresis by diode laser-based time-resolved fluorescence detection. *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (22), 4771-4779.
- Link, A.J.; Vink, M.K.S.; Tirrell, D.A. - Presentation and detection of azide functionality in bacterial cell surface proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126 (34), 10598-10602.
- Lippert, V.Z. - Dipole moment and electronic structure of excited molecules. *Z. Naturforsch.*, **1957**, 10a, 541.
- Liu, P.; Sudhakaran, T.; Koh, R.M.L.; Hwang, L.C.; Ahmed, S.; Maruyama, I.N.; Wohland, T. - Investigation of the dimerization of proteins from the epidermal growth factor receptor family by single wavelength fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, **2007**, 93 (2), 684-698.
- Lomant, A.J.; Fairbanks, G. - Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J. Mol. Biol.*, **1976**, 104 (1), 243-261.
- López-Otín, C.; Overall, C.M. - Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2002**, 3 (7), 509-519.
- López-Otín, C.; Matrisian, L.M. - Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7 (10), 800-808.
- Machova, Z.; von Eggelkraut-Gottanka, R.; Wehofsky, N.; Bordusa, F.; Beck-Sickinger, A.G. - Expressed enzymatic ligation for the semisynthesis of chemically modified proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42 (40), 4916-4918.
- Mahmood, U.; Weissleder, R. - Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol. Cancer Ther.*, **2003**, 2 (5), 489-496.
- Markham, N.R.; Zuker, M. - DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucl. Acids Res.*, **2005**, 33 (suppl\_2), W577-581.
- Markham, N.R.; Zuker, M. - UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol. Biol.*, **2008**, 453, 3-31.

- Marmé, N.; Friedrich, A.; Denapaite, D.; Hakenbeck, R.; Knemeyer, J. - Single nucleotide polymorphism analysis using different colored dye dimer probes. *Chem. Phys. Lett.*, **2006**, 428 (4-6), 440-445.
- Marmé, N.; Friedrich, A.; Müller, M.; Nolte, O.; Wolfrum, J.; Hoheisel, J.D.; Sauer, M.; Knemeyer, J. - Identification of single-point mutations in mycobacterial 16S rRNA sequences by confocal single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nucl. Acids Res.*, **2006**, 34 (13), e90.
- Marmé, N.; Lee, H.; Friedrich, A.; Park, C.W.; Fiore, J.; Nesbitt, D.J.; Knemeyer, J.P. - Suppressing nonspecific adsorption of proteins on the single-molecular level. *Proc. SPIE*, **2008**, 6867.
- Marmur, J.; Rownd, R.; Schildkraut, C.L. - Denaturation and Renaturation of Deoxyribonucleic Acid. *Progr. Nucl. Acid Res.*, **1963**, 1, 231.
- Mason, W.T. - Fluorescent and luminescent probes for biological activity. 2. Aufl., Academic Press Inc., London, **1999**.
- Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. - Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1956**, 29 (4), 465-470.
- Mathews, D.H.; Sabina, J.; Zuker, M.; Turner, D.H. - Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.*, **1999**, 288 (5), 911-940.
- Mazumdar, M.; Parrack, P.K.; Bhattacharyya, B. - Interaction of Prodan with tubulin. A fluorescence spectroscopic study. *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 204 (1), 127-132.
- McGrath, M.; Michaud, D.; De Vivo, I. - Polymorphisms in GSTT1, GSTM1, NAT1 and NAT2 genes and bladder cancer risk in men and women. *BMC Cancer*, **2006**, 6, 239.
- Medzhitov, R. - Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **2008**, 454 (7203), 428-435.
- Meldal, M. - Smart combinatorial assays for the determination of protease activity and inhibition. *QSAR & Comb. Sci.*, **2005**, 24 (10), 1141-1148.
- Meseth, U.; Wohland, T.; Rigler, R.; Vogel, H. - Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys. J.*, **1999**, 76 (3), 1619-1631.
- Miyoshi, K.; Arentzen, R.; Huang, T.; Itakura, K. - Solid-phase synthesis of polynucleotides. IV. Usage of polystyrene resins for the synthesis of polydeoxyribonucleotides by the phosphotriester method. *Nucl. Acids Res.*, **1980**, 8 (22), 5507-5517.
- Mohamed, M.M.; Sloane, B.F. - Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6 (10), 764-775.
- Muralidharan, V.; Muir, T.W. - Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat. Methods*, **2006**, 3 (6), 429-438.
- Murphy, G. - The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer*, **2008**, 8 (12), 929-941.

- Nolan, R.L.; Cai, H.; Nolan, J.P.; Goodwin, P.M. - A simple quenching method for fluorescence background reduction and its application to the direct, quantitative detection of specific mRNA. *Anal. Chem.*, **2003**, 75 (22), 6236-6243.
- Nöthlings, U.; Yamamoto, J.F.; Wilkens, L.R.; Murphy, S.P.; Park, S.; Henderson, B.E.; Kolonel, L.N.; Le Marchand, L. - Meat and heterocyclic amine intake, smoking, NAT1 and NAT2 polymorphisms, and colorectal cancer risk in the multiethnic cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2009**, 18 (7), 2098-2106.
- Nord, S. - Spektroskopische Untersuchung der inter- und intramolekularen Fluoreszenzlöschung von Rhodaminfarbstoffen durch Nukleotide und Nukleinsäuren. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **1998**.
- Oka, T.; Hakoshima, T.; Itakura, M.; Yamamori, S.; Takahashi, M.; Hashimoto, Y.; Shiosaka, S.; Kato, K. - Role of loop structures of neuropsin in the activity of serine protease and regulated secretion. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277 (17), 14724-14730.
- Olejnik, J.; Gite, S.; Mamaev, S.; Rothschild, K.J. - N-terminal labeling of proteins using initiator tRNA. *Methods*, **2005**, 36 (3), 252-260.
- Orte, A.; Clarke, R.; Balasubramanian, S.; Klenerman, D. - Determination of the fraction and stoichiometry of femtomolar levels of biomolecular complexes in an excess of monomer using single-molecule, two-color coincidence detection. *Anal. Chem.*, **2006**, 78 (22), 7707-7715.
- Overall, C.M.; López-Otín, C. - Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2 (9), 657-672.
- Partis, M.D.; Griffiths, D.G.; Roberts, G.C.; Beechey, R.B. - Cross-linking of protein by  $\omega$ -maleimido alkanoylN-hydroxysuccinimido esters. *J. Prot. Chem.*, **1983**, 2 (3), 263-277.
- Petraki, C.; Gregorakis, A.; Vaslamatzis, M.; Papanastasiou, P.; Yousef, G.; Levesque, M.; Diamandis, E. - Prognostic implications of the immunohistochemical expression of human kallikreins 5, 6, 10 and 11 in renal cell carcinoma. *Tum. Biol.*, **2006**, 27 (1), 1-7.
- Peyret, N. - Prediction of Nucleic Acid Hybridization: Parameters and Algorithms. *Dissertation*, Wayne State University, USA, **2000**.
- Press, W.H.; Teukolsky, W.T.; Vetterling, W.T.; Flannery, B.P. - Numerical Recipes in C - The Art of Scientific Computing. Cambridge University Press, Cambridge, **1992**.
- Quartin, R.S.; Wetmur, J.G. - Effect of ionic strength on the hybridization of oligodeoxynucleotides with reduced charge due to methylphosphonate linkages to unmodified oligodeoxynucleotides containing the complementary sequence. *Biochemistry*, **1989**, 28 (3), 1040-1047.
- Rao, J.S. - Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3 (7), 489-501.
- Rawlings, N.D.; Barrett, A.J.; Bateman, A. - MEROPS: the peptidase database. *Nucl. Acids Res.*, **2010**, 38 (Database issue), D227-233.



- Reichardt, C. - Empirische Parameter der Lösungsmittelpolarität als lineare "Freie Enthalpie"-Beziehung. *Angew. Chem.*, **1979**, 91, 119-131.
- Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. - Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods*, **2008**, 5 (9), 763-775.
- Rettig, W.; Lapouyade, R. - Fluorescence Probes based on twisted intramolecular charge transfer (TITC) states and other adiabatic photoreactions. In: Probe design and chemical sensing. Topics in fluorescence spectroscopy, Hrsg. Joseph R. Lakowicz. Plenum Press, New York, **1994**, 109-149.
- Rink, H. - Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28 (33), 3787-3790.
- Robelek, R.; Stefani, F.D.; Knoll, W. - Oligonucleotide hybridization monitored by surface plasmon enhanced fluorescence spectroscopy with bio-conjugated core/shell quantum dots. Influence of luminescence blinking. *Phys. Stat. Sol. (a)*, **2006**, 203 (14), 3468-3475.
- Rose, N.L.; Palcic, M.M.; Helms, L.M.H.; Lakey, J.R.T. - Evaluation of Pefabloc as a serine protease inhibitor during human-islet isolation. *Transplantation*, **2003**, 75 (4), 462-466.
- Rostovtsev, V.V.; Green, L.G.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. - A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41 (14), 2596-2599.
- Saenger, W. - Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, Heidelberg, **1983**.
- Sako, Y. - Imaging single molecules in living cells for systems biology. *Mol. Syst. Biol.*, **2006**, 2, 56.
- Sameni, M.; Dosescu, J.; Moin, K.; Sloane, B.F. - Functional imaging of proteolysis: stromal and inflammatory cells increase tumor proteolysis. *Mol. Imaging*, **2003**, 2 (3), 159-175.
- Satpati, A.K.; Kumbhakar, M.; Nath, S.; Pal, H. - Photophysical properties of coumarin-7 dye: role of twisted intramolecular charge transfer state in high polarity protic solvents. *Photochem. Photobiol.*, **2009**, 85 (1), 119-129.
- Sauer, M. - Entwicklung effizienter Fluoreszenzfarbstoffe für den hochempfindlichen Nachweis von Biomolekülen unter Einsatz zeitaufgelöster LIF-Spektroskopie. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **1995**.
- Sauer, M.; Drexhage, K.; Lieberwirth, U.; Müller, R.; Nord, S.; Zander, C. - Dynamics of the electron transfer reaction between an oxazine dye and DNA oligonucleotides monitored on the single-molecule level. *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 284 (3-4), 153-163.
- Saxon, E.; Bertozzi, C.R. - Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science*, **2000**, 287 (5460), 2007-2010.
- Saxon, E.; Bertozzi, C. - Chemoselective ligation. *Patent*, **2006**, US 7122703.
- Schechter, I.; Berger, A. - On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, 27 (2), 157-162.

- Schrock, A.K.; Schuster, G.B. - Photochemistry of phenyl azide: chemical properties of the transient intermediates. *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106 (18), 5228-5234.
- Schwartz, D.A.; Abrams, M.J.; Giadomenico, C.M.; Zubieta, J.A. - Certain pyridyl hydrazines and hydrazides useful for protein labeling. *Patent*, **1993**, US 5420285.
- Senthilkumar, S.; Nath, S.; Pal, H. - Photophysical Properties of Coumarin-30 Dye in Aprotic and Protic Solvents of Varying Polarities. *Photochem. Photobiol.*, **2004**, 80 (1), 104-111.
- Shan, S.J.C.; Scorilas, A.; Katsaros, D.; Diamandis, E.P. - Transcriptional upregulation of human tissue kallikrein 6 in ovarian cancer: clinical and mechanistic aspects. *Br. J. Cancer*, **2007**, 96 (2), 362-372.
- Shaner, N.C.; Steinbach, P.A.; Tsien, R.Y. - A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*, **2005**, 2 (12), 905-909.
- Shelat, S.G.; Ai, J.; Zheng, X.L. - Molecular biology of ADAMTS13 and diagnostic utility of ADAMTS13 proteolytic activity and inhibitor assays. *Semin. Thromb. Hemost.*, **2005**, 31 (6), 659-672.
- Shobini, J.; Mishra, A.K.; Sandhya, K.; Chandra, N. - Interaction of coumarin derivatives with human serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopic technique and modeling studies. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2001**, 57A (5), 1133-1147.
- Sidransky, D. - Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, 2 (3), 210-219.
- Sieber, P. - A new acid-labile anchor group for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides by the Fmoc method. *Tetrahedron Letters*, **1987**, 28 (19), 2107-2110.
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH - g5635enz.pdf (application/pdf-Objekt). **1999**, [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme\\_Assay/g5635enz.Par.0001.File.tmp/g5635enz.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/g5635enz.Par.0001.File.tmp/g5635enz.pdf).
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH - c6393enz.pdf (application/pdf-Objekt). **2003**, [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme\\_Assay/c6393enz.Par.0001.File.tmp/c6393enz.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/c6393enz.Par.0001.File.tmp/c6393enz.pdf).
- Singh, M.; Pal, H.; Bhasikuttan, A.; Sapre, A. - Dual solvatochromism of neutral red. *Photochem. Photobiol.*, **1998**, 68 (1), 32-38.
- Sire, O.; Alpert, B.; Royer, C.A. - Probing pH and pressure effects on the apomyoglobin heme pocket with the 2'-(N,N-dimethylamino)-6-naphthoyl-4-trans-cyclohexanoic acid fluorophore. *Biophys. J.*, **1996**, 70 (6), 2903-2914.
- Sloane, B.F.; Sameni, M.; Podgorski, I.; Cavallo-Medved, D.; Moin, K. - Functional imaging of tumor proteolysis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2006**, 46, 301-315.
- Smith, R.A.; Knowles, J.R. - Aryldiazirines. Potential reagents for photolabeling of biological receptor sites. *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95 (15), 5072-5073.
- Smyth, D.G.; Blumenfeld, O.O.; Konigsberg, W. - Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem. J.*, **1964**, 91 (3), 589-595.

- Solulink - Bioconjugation Reagents and Services. **2009**, <http://www.solulink.com/kit/nanolink.php>.
- Song, S.; Ju, D.; Li, J.; Li, D.; Wei, Y.; Dong, C.; Lin, P.; Shuang, S. - Synthesis and spectral characteristics of two novel intramolecular charge transfer fluorescent dyes. *Talanta*, **2009**, 77 (5), 1707-1714.
- Sporn, M.B. - The war on cancer. *Lancet*, **1996**, 347 (9012), 1377-1381.
- Staros, J.V. - N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers. *Biochemistry*, **1982**, 21 (17), 3950-3955.
- Staros, J.V.; Wright, R.W.; Swingle, D.M. - Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal. Biochem.*, **1986**, 156 (1), 220-222.
- Staros, J.V. - Membrane-impermeant crosslinking reagents: probes of the structure and dynamics of membrane proteins. *Acc. Chem. Res.*, **1988**, 21 (12), 435-441.
- Stöhr, K. - Fluoreszenzgelöschte Sonden für diagnostische und analytische Anwendungen. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2008**.
- Stokes, G.G. - On the Change of Refrangibility of Light. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1852**, 142, 463-562.
- Stryer, L. - Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.*, **1978**, 47, 819-846.
- Stupack, D.G.; Teitz, T.; Potter, M.D.; Mikolon, D.; Houghton, P.J.; Kidd, V.J.; Lahti, J.M.; Cheresch, D.A. - Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*, **2006**, 439 (7072), 95-99.
- Takayama, T.K.; McMullen, B.A.; Nelson, P.S.; Matsumura, M.; Fujikawa, K. - Characterization of hK4 (protease), a prostate-specific serine protease: activation of the precursor of prostate specific antigen (pro-PSA) and single-chain urokinase-type plasminogen activator and degradation of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry*, **2001**, 40 (50), 15341-15348.
- Tatham, M.H.; Hay, R.T. - FRET-based in vitro assays for the analysis of SUMO protease activities. *Methods Mol. Biol.*, **2009**, 497, 253-268.
- Tewes, M. - Aufbau eines Experiments zur Fluoreszenzkreuzkorrelationspektroskopie, Erweiterung der theoretischen Grundlagen und biologische Anwendungen. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **1998**.
- Thompson, N.L. - Fluorescence correlation spectroscopy. In: *Techniques. Topics in fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, **1991**, 337-378.
- Timofeeva, M.; Kropp, S.; Sauter, W.; Beckmann, L.; Rosenberger, A.; Illig, T.; Jäger, B.; Mittelstrass, K.; Dienemann, H.; Bartsch, H.; Bickeböller, H.; Chang-Claude, J.; Risch, A.; Wichmann, H. - Genetic polymorphisms of MPO, GSTT1, GSTM1, GSTP1, EPHX1 and NQO1 as risk factors of early-onset lung cancer. *Int. J. Cancer*, **2010**.
- Turk, B. - Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5 (9), 785-799.

- Tyagi, S.; Kramer, F.R. - Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotech.*, **1996**, 14 (3), 303-308.
- Vargo-Gogola, T.; Rosen, J.M. - Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, 7 (9), 659-672.
- Vogelsang, J.; Kasper, R.; Steinhauer, C.; Person, B.; Heilemann, M.; Sauer, M.; Tinnefeld, P. - A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47 (29), 5465-5469.
- Wachsmuth, M. - Fluoreszenzfluktationsmikroskopie: Entwicklung eines Prototyps, Theorie und Messung der Beweglichkeit von Biomolekülen im Zellkern. *Dissertation*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2001**.
- Waggoner, A. - Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, 10 (1), 62-66.
- Wang, L.; Xie, J.; Schultz, P.G. - Expanding the genetic code. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2006**, 35, 225-249.
- Watson, J.D.; Crick, F.H. - Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **1953**, 171 (4356), 737-738.
- Werner, T.C.; Hoffman, R.M. - Relation between an excited state geometry change and the solvent dependence of 9-methyl anthroate fluorescence. *J. Phys. Chem.*, **1973**, 77 (13), 1611-1615.
- Wood, C.L.; O'Dorisio, M.S. - Covalent cross-linking of vasoactive intestinal polypeptide to its receptors on intact human lymphoblasts. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260 (2), 1243-1247.
- Yao, G.; Tan, W. - Molecular-beacon-based array for sensitive DNA analysis. *Anal. Biochem.*, **2004**, 331 (2), 216-223.
- Yousef, G.M.; Diamandis, E.P. - The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr. Rev.*, **2001**, 22 (2), 184-204.
- Zuker, M. - Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.*, **2003**, 31 (13), 3406-3415.
- www1 - [http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap\\_III/franck\\_1.gif](http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap_III/franck_1.gif).
- www2 - <http://writersforensicsblog.files.wordpress.com/2009/11/dnastructure.jpg>.
- www3 - <http://www.guidobauersachs.de/genetik/translation2.jpg>.
- www4 - <http://www.vetmed.uni-giessen.de/biochem/start.html>.

## 7 ANHANG

### I Publikationen

Friedrich, A.; Gansen, A.; Hoheisel, J.D.; Marmé, N.; Knemeyer, J.P.; - Protease activity detection by single-molecule coincidence spectroscopy using single wavelength laser excitation with standard fluorophores. in Vorbereitung.

Friedrich, A.; Gansen, A.; Hoheisel, J.D.; Marmé, N.; Knemeyer, J.P.; - Mono-labeled DNA-probes for sensitive and specific detection of single nucleotide polymorphisms. in Vorbereitung für *Nucl. Acids Res.*

Friedrich, A.; Hoheisel, J.D.; Marmé, N.; Knemeyer, J.P.; - A universal method for generating stoichiometrically 1:1 labeled functional proteins. in Vorbereitung für *J. Am. Chem. Soc.*

Friedrich, A.; Müller, M.; Nolte, O.; Wolfrum, J.; Sauer, M.; Hoheisel, J.D.; Knemeyer, J.P.; Marmé, N.; - Highly specific identification of single nucleic polymorphism in *M. tuberculosis* using smart probes and single-molecule fluorescence spectroscopy in combination with blocking oligonucleotides. *Proc. SPIE*, **2008**, 6867.

Marmé, N.; Lee, H.; Friedrich, A.; Park, C.W.; Fiore, J.; Nesbitt, D.J.; Knemeyer, J.P.; - Suppressing nonspecific adsorption of proteins on the single-molecular level. *Proc. SPIE*, **2008**, 6862.

Friedrich, A.; Hoheisel, J.D.; Marmé, N.; Knemeyer, J.P.; - DNA-probes for the highly sensitive identification of single-nucleotide-polymorphism using single-molecule-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **2007**, 581, 1644-1648.

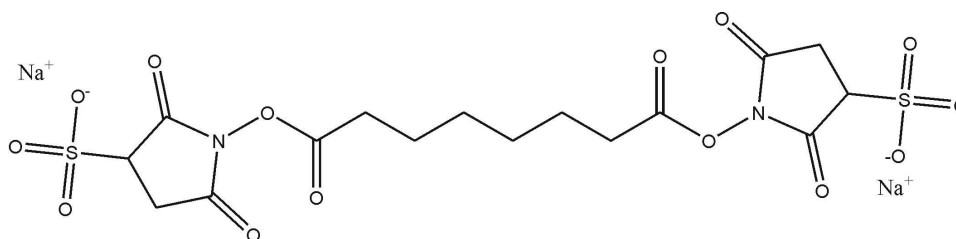
Friedrich, A.; Hoheisel, J.D.; Marmé, N.; Knemeyer, J.P.; - New hairpin-structured DNA probes: alternatives to classical molecular beacons. *Proc. SPIE*, **2007**, 6444.

Marmé, N.; Friedrich, A.; Denapaite, D.; Hakenbeck, R.; Knemeyer, J.P.; - Single nucleotide polymorphism analysis using different colored dye dimer probes. *Chem. Phys. Lett.*, **2006**, 428, 440-445.

Marmé, N.; Friedrich, A.; Müller, M.; Nolte, O.; Wolfrum, J.; Hoheisel, J.D.; Sauer, M.; Knemeyer, J.P.; - Identification of single-point mutations in mycobacterial 16S rRNA sequences by confocal single-molecule fluorescence spectroscopy. *Nucl. Acids Res.*, **2006**; 34 (13), e90.

## II Crosslinker

### BS<sup>3</sup> – Bis[sulfosuccinimidyl]suberat

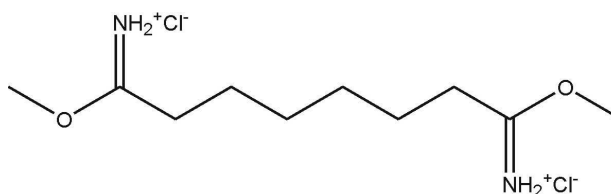


Summenformel:  $C_{16}H_{18}N_2O_{14}S_2Na_2$

Molekulargewicht: 572,4 g/mol

Abstandshalterlänge: 11,4 Å

### DMS – Dimethylsuberimidat · 2 HCl

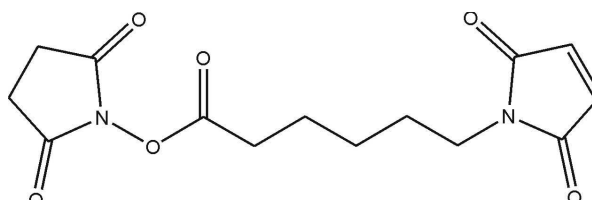


Summenformel:  $C_{10}H_{22}N_2O_2Cl_2$

Molekulargewicht: 273,0 g/mol

Abstandshalterlänge: 11,0 Å

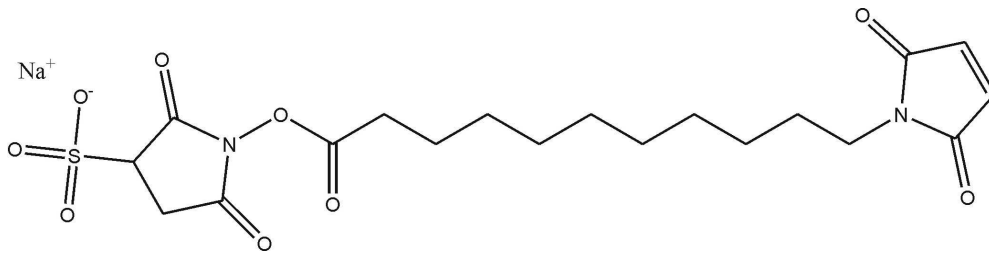
### EMCS – [N-e-Maleimidocaproyloxy]succinimidester



Summenformel:  $C_{14}H_{16}N_2O_5$

Molekulargewicht: 308,0 g/mol

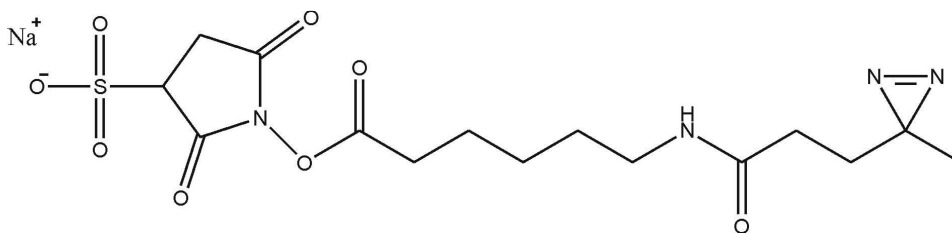
Abstandshalterlänge: 9,4 Å

**Sulfo-KMUS – N-[k-Maleimidoundecanoyloxy]sulfosuccinimidester**

Summenformel:  $C_{19}H_{25}N_2O_9SNa$

Molekulargewicht: 480,5 g/mol

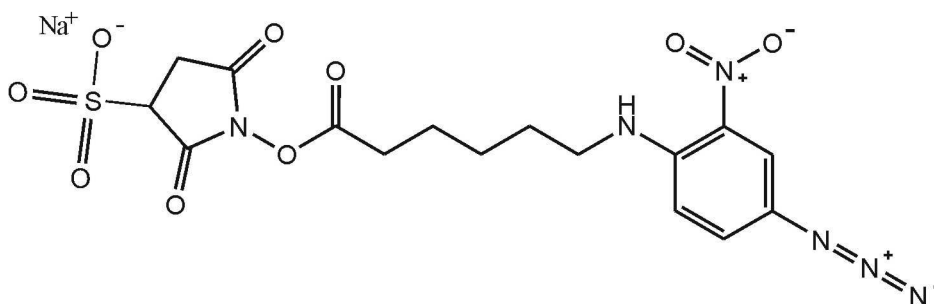
Abstandshalterlänge: 16,3 Å

**Sulfo-LC-SDA – Sulfo-NHS-LC-Diazirin****Sulfosuccinimidyl-6-(4-4'-azipentanamido)hexanoat**

Summenformel:  $C_{15}H_{21}N_4O_8SNa$

Molekulargewicht: 440,4 g/mol

Abstandshalterlänge: 12,5 Å

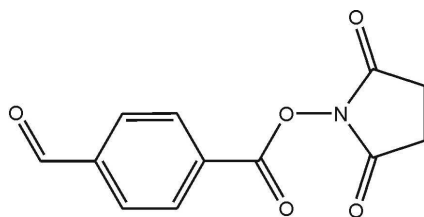
**Sulfo-SANPAH – N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat**

Summenformel:  $C_{16}H_{17}N_6O_9SNa$

Molekulargewicht: 390,4 g/mol

Abstandshalterlänge: 18,2 Å

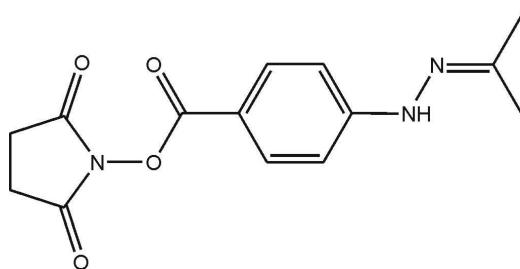


**SFB – Succinimidyl-4-formylbenzoat**

Summenformel:  $C_{12}H_9NO_5$

Molekulargewicht: 247,2 g/mol

Abstandshalterlänge: 5,8 Å

**SANH – Succinimidyl-4-hydrazinonicotinat Aceton Hydrazon**

Summenformel:  $C_{13}H_{14}N_4O_4$

Molekulargewicht: 290,3 g/mol

Abstandshalterlänge: 6,7 Å

### III Kopplungsvorschrift 1

Anbindung farbstoffmarkierter und aminomodifizierter DNA an 1 nmol Protein in der Form DNA-SANH-SFB-Protein.

**Ansatz: Protein-SFB-Umsetzung**

1 nmol Protein

2 nmol SFB, gelöst in DMF

0,2 M Carbonatpuffer pH 8,6

**DNA-SANH-Umsetzung**

5 nmol DNA, farbstoff- und aminomodifiziert,

200 nmol SANH, gelöst in DMF

0,2 M Carbonatpuffer pH 8,6

**Durchführung:**

- der DMF-Anteil der Proteinreaktionslösung sollte 10 vol% nicht übersteigen
- das Gesamtvolumen gering halten
- jeweils 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss reagieren lassen
- jeweils Abtrennung überschüssigen Crosslinkers und Nebenprodukten durch Zentrifugation mit *Zeba Desalt Spin Columns*, 0,5 ml, (*Pierce*) nach Herstellerangaben
- jeweils Aufkonzentration mittels *Microcon* Zentrifugeneinsätzen (*Millipore*) (DNA: 3 kDa MWCO, Protein: zur Molmasse passender MWCO) nach Herstellerangaben, zweimal mit je 50 µl PBS pH 7,1 aufschlämmen und erneut zentrifugieren
- die erhaltenen Eluate mit 0,5 M Citratpuffer, pH 6,0 vereinigen. Das Volumen des Citratpuffers entspricht dabei der Hälfte des Gesamtvolumens der Eluate.
- über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss reagieren lassen.
- Aufarbeitung des Rohprodukts entsprechend der Aufreinigungsvorschrift.

## IV Kopplungsvorschrift 2

Anbindung von 1 nmol farbstoffmarkierter und aminomodifizierter DNA an Protein in der Form DNA-SFB-SANH-Protein bei Verfügbarkeit großer und günstiger Proteinmengen.

### **Ansatz: Protein-SANH-Umsetzung**

20 nmol Protein

40 nmol SANH, gelöst in DMF

0,2 M Carbonatpuffer pH 8,6

### **DNA-SFB-Umsetzung**

1 nmol DNA, farbstoff- und aminomodifiziert,

40 nmol SFB, gelöst in DMF

0,2 M Carbonatpuffer pH 8,6

### **Durchführung:**

- der DMF-Anteil der Proteinreaktionslösung sollte 10 vol% nicht übersteigen
- das Gesamtvolumen der beiden Ansätze gering halten
- jeweils 2 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss reagieren lassen
- jeweils Abtrennung überschüssigen Crosslinkers und Nebenprodukten durch Zentrifugation mit *Zeba Desalt Spin Columns*, 0,5 ml, (*Pierce*) nach Herstellerangaben
- jeweils Aufkonzentration mittels *Microcon* Zentrifugeneinsätzen (*Millipore*) (DNA: 3 kDa MWCO, Protein: zur Molmasse passender MWCO) nach Herstellerangaben, zweimal mit je 50 µl PBS pH 7,1 aufschlämmen und erneut zentrifugieren
- die erhaltenen Überstände mit 0,5 M Citratpuffer, pH 6,0 vereinigen. Das Volumen des Citratpuffers entspricht dabei der Hälfte des Gesamtvolumens der beiden Überstände.
- über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss reagieren lassen.
- Aufarbeitung des Rohprodukts entsprechend der Aufreinigungsvorschrift.

## V **Aufreinigungsvorschrift**

Zur Abtrennung nicht angebundener DNA sowie nicht markierter Proteine und Isolierung des markierten Proteinanteils nach Durchführung einer der voranstehenden Kopplungsvorschriften.

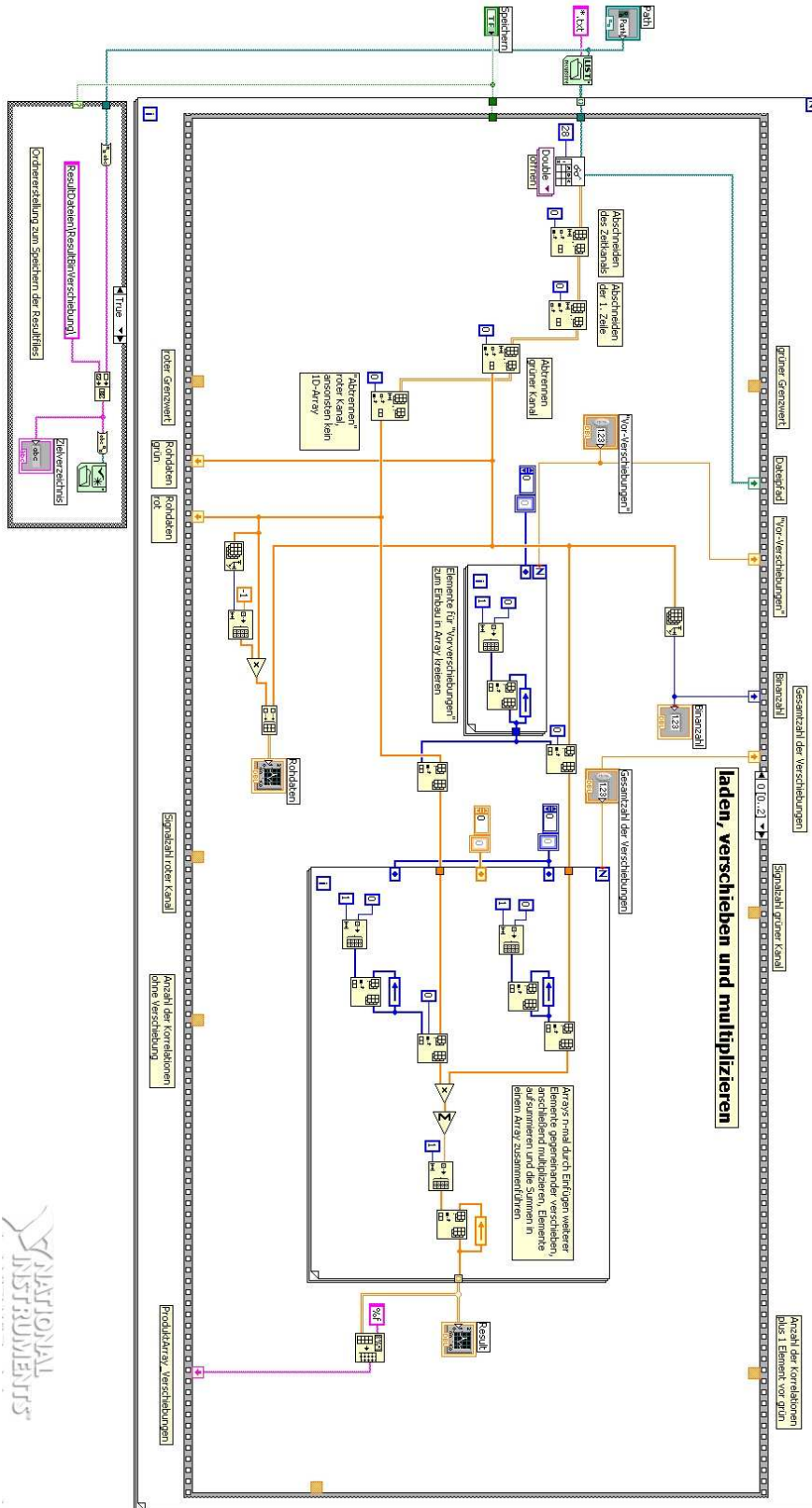
### **Durchführung:**

- Abtrennung nicht angebundener DNA mittels *Microcon* Zentrifugeneinsätzen (*Millipore*) (30 kDa MWCO) nach Herstellerangaben, fünfmal mit je 100 µl PBS pH 7,4 aufschlämmen und erneut zentrifugieren
- Bestimmung der Menge farbstoffmarkierter DNA im Überstand via Absorptionsmessung (Absorptionsmaximum des Farbstoffs)
- Festphase: Streptavidinpartikeln *Nanolink<sup>TM</sup> Streptavidin Magnetic Microspheres (Solulink)*, gelieferte Konzentration 10 mg/ml, Bindekapazität für biotinylierte Oligonukleotide: 2,5 nmol/mg; Verwendung eines Äquivalents mit 125 % Bindekapazität bzgl. der zuvor bestimmten DNA-Stoffmenge.
- Überführung des entsprechenden Festphasenvolumens in ein oberflächenoptimiertes 1,5 ml Reagiergefäß und magnetische Abtrennung der Partikel, z.B. 3 min Anlegen des Magneten in Halterung *MPC-S (Dyna)*.
- Überstand ohne Berührung der Partikel langsam abnehmen
- 2x: Aufnehmen der Partikel im doppelten Volumen B+W-Puffer (PBS pH 7,4, 1 M NaCl), leicht vortexen, erneut magnetisch abtrennen, Überstand abnehmen
- Partikel im gleichen Volumen B+W-P. aufnehmen, Zugabe von biotinylierter Festphasen-DNA (Menge: 125 % der Partikelkapazität)
- 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Partikelsedimentation durch langsames Drehen oder gelegentliches Schütteln verhindern.
- funktionalisierte Partikel magnetisch abtrennen, Überstand abnehmen
- 2x: Aufnehmen der Partikel in B+W-Puffer (Volumen wie zuvor), leicht vortexen, erneut magnetisch abtrennen, Überstand abnehmen
- Aufnehmen der Partikel in gleichem Volumen B+W-Puffer
- Zugabe des aufzutrennenden Gemisches, 60 min bei Raumtemperatur inkubieren, Partikelsedimentation durch langsames Drehen oder gelegentliches Schütteln verhindern.

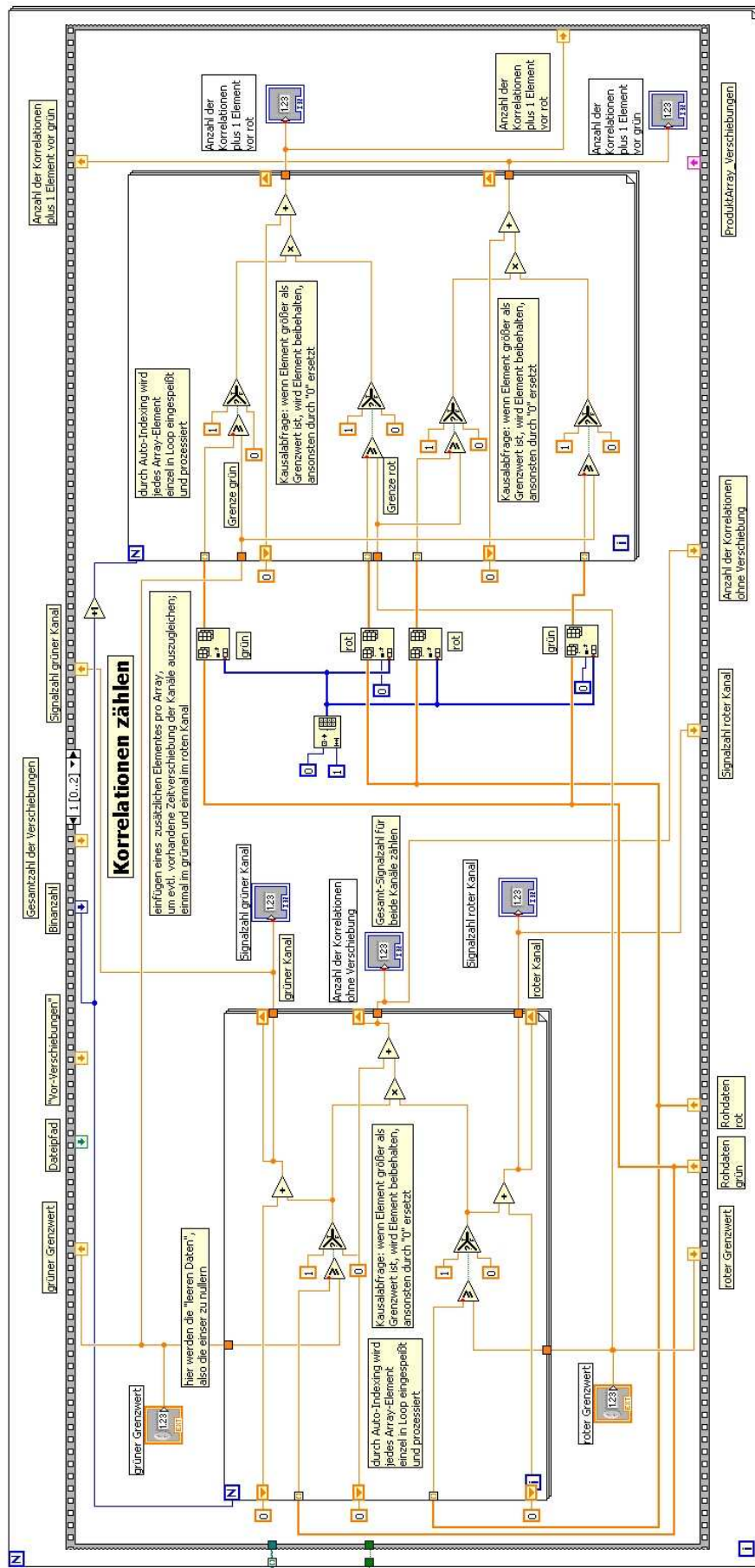
- 
- beladene Partikel magnetisch abtrennen, Überstand abnehmen
  - 2x: Aufnehmen der Partikel in B+W-Puffer (Volumen wie zuvor), leicht vortexen, erneut magnetisch abtrennen, Überstand abnehmen
  - Aufnehmen der Partikel in gleichem Volumen B+W-Puffer
  - Zugabe der Verdrängungs-DNA (Menge: 150 % der Partikelkapazität), 60 min bei 40 °C inkubieren, Partikelsedimentation durch langsames Drehen oder gelegentliches Schütteln verhindern.
  - Partikel magnetisch abtrennen, den die markierten Proteine enthaltenden Überstand abnehmen
  - Abtrennung überschüssiger Verdrängungs-DNA im Überstand mittels *Microcon* Zentrifugeneinsätzen (*Millipore*) (30 kDa MWCO) nach Herstellerangaben, fünfmal mit je 100 µl PBS pH 7,4 (oder anderem Puffer passend zur weiteren Verwendung der Proteine) aufschlämmen und erneut zentrifugieren
  - Im Überstand sind die markierten Proteine mit Ausbeuten von 3 – 5 % bzgl. der eingesetzten Proteinmenge (nach Kopplungsvorschrift 1) bzw. etwa 20 % bzgl. der eingesetzten DNA-Menge (nach Kopplungsvorschrift 2) enthalten.

# VI Blockdiagramme des Analyseprogramms

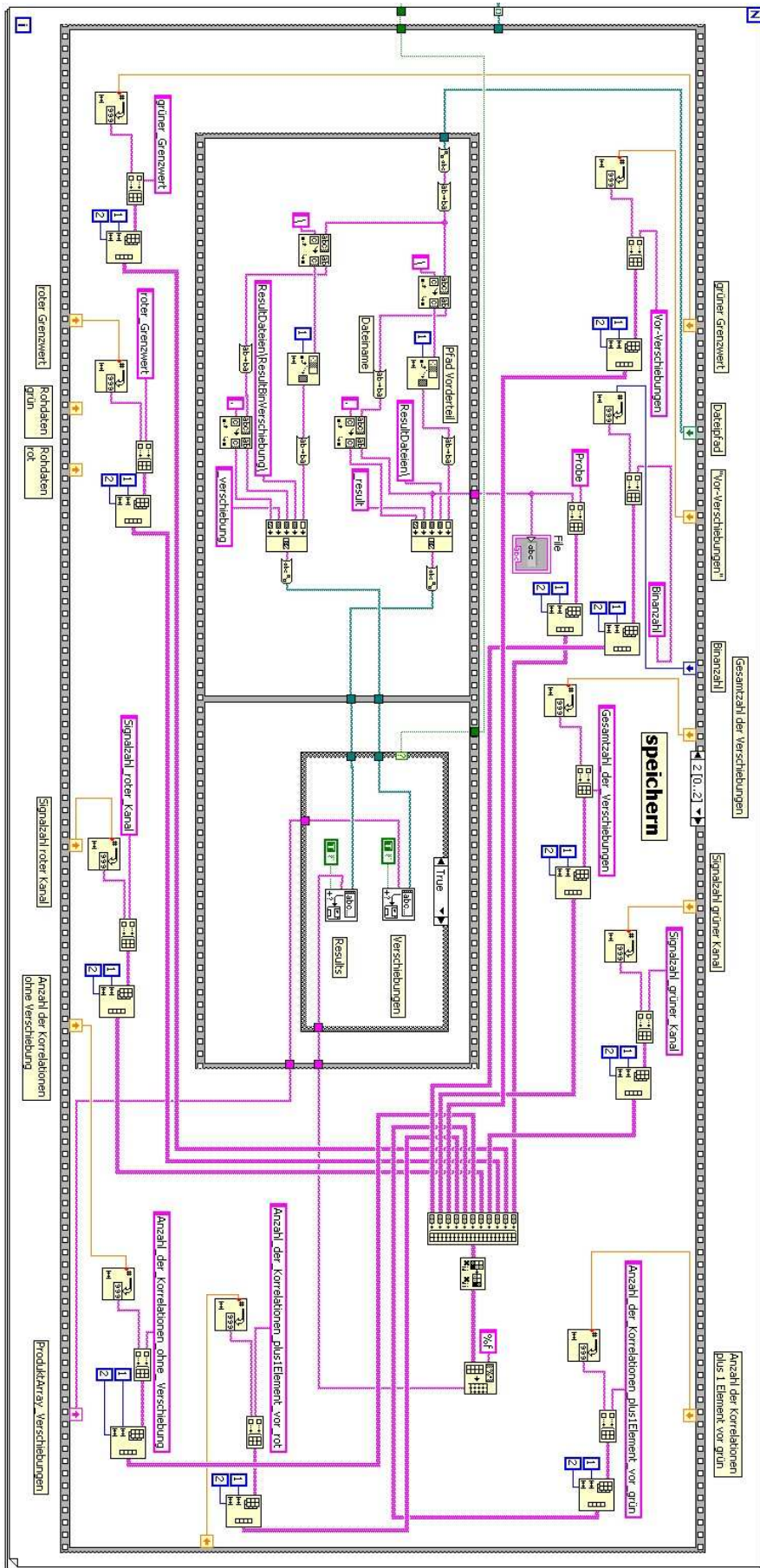
Phase 1: File öffnen, Daten kanalweise separieren, Kontrolle der Kanalsynchronität



Phase 2: Korrelierte Ereignisse erfassen und zählen



Phase 3: Daten und Parameter in Ausgabedatei zusammenführen, speichern





## VII Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AEBSF	4-[2-Aminoethyl]benzensulfonylfluorid-Hydrochlorid
ADAM	Disintegrin und Metalloprotease ( <i>a Disintegrin and Metalloprotease</i> )
ADAMTS	<b>ADAM</b> mit <b>Thrombospondin</b> domäne
APD	Lawinen-Photodiode ( <i>Avalanche Photo Diode</i> )
BP	Basenanzahl ( <i>Base Pair</i> )
BS <sup>3</sup>	<b>Bis</b> [sulfosuccinimidyl]suberat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovin Serum Albumine</i> )
C	Cytosin
dATP	<b>Desoxyadenosin</b> triphosphat
dCTP	<b>Desoxycytidin</b> triphosphat
dGMP	<b>Desoxyguanosin</b> monophosphat
dGTP	<b>Desoxyguanosin</b> triphosphat
dNTP	<b>Desoxynukleosid</b> triphosphat
dTTP	<b>Desoxythymidin</b> triphosphat
DMF	<b>Dimethyl</b> formamid
DMS	<b>Dimethyl</b> suberimidat · 2 HCl
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
ECM	extrazelluläre Matrix ( <i>Extra Cellular Matrix</i> )
EDTA	<b>Ethylendiamin</b> tetraacetat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EMCS	[N- <b>e-Maleimidocaproyloxy</b> ]succinimidester
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ( <i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> )

---

FCCS	Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie ( <i>Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy</i> )
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
G	Guanin
GB	Gigabyte
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IC	interne Konversion ( <i>Internal Conversion</i> )
ICT	intramolekularer Ladungstransfer ( <i>Intramolecular Charge Transfer</i> )
ISC	Übergang vom Singulett- in den Triplettzustand ( <i>Intersystem Crossing</i> )
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
KLK	Kallikrein
KO	Konkurrenzoligonukleotid
LE	lokal angeregt ( <i>Locally Excited</i> )
MALDI	matrixunterstützte Laserdesorptionsionisierung ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i> )
MEROPS	Peptidase-Datenbank mit eigener Proteasenomenklatur, benannt nach einer Vogelgattung aus der Familie der Bienenfresser (lat.: <i>Merops bullockoides</i> )
MMP	Matrixmetalloproteinase
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgrenze ( <i>Molecular Weight Cut-Off</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>Messenger-RNA</i> )
Nd:YLF	Neodym:Yttrium-Lithium-Fluorid
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
Ni:NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure ( <i>Nickel Nitrilotriacetic Acid</i> )
PBS	Phosphatpuffer ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )

PET	photoinduzierter <b>E</b> lektronen <b>t</b> ransfer
pH	„Kraft des Wasserstoffs“ (lat.: <i>potentia Hydrogenii</i> )
PSA	prostata <b>s</b> pezifisches <b>A</b> ntigen (auch: Kallikrein 3)
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
SANH	<b>S</b> uccinimidyl-4-hydrazinonicotinat <b>a</b> ceton <b>h</b> ydrazon
SDS-PAGE	<b>S</b> odium <b>d</b> odecylsulfat- <b>P</b> olyacrylamid <b>g</b> elelektrophorese
SFB	<b>S</b> uccinimidyl-4- <b>f</b> ormyl <b>b</b> enzoat
SNP	DNA-Punktmutation ( <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> )
Sulfo-KMUS	N-[ <b>k</b> - <b>M</b> aleimidoundecanoyloxy]sulfo <b>s</b> uccinimidester
Sulfo-LC-	
SDA	Sulfo <b>s</b> uccinimidyl-LC- <b>D</b> iazirin (auch Sulfosuccinimidyl-6-[4-4'-azipentanamido]hexanoat)
Sulfo-	
SANPAH	N-Sulfo <b>s</b> uccinimidyl-6-(4'- <b>a</b> zido-2'- <b>n</b> itrophenylamino) <b>h</b> exanoat
T	<b>T</b> hymine
Tris	<b>T</b> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTTR	zeitgebunden und zeitaufgelöst ( <i>Time Tagged Time Resolved</i> )
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphotonzählung ( <i>Time Correlated Single Photon Counting</i> )
TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor $\beta$ ( <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> )
TICT	verdrehter intramolekularen Ladungstransfer(zustand) ( <i>Twisted Intramolecular Charge Transfer (State)</i> )
TNF	<b>T</b> umornekrosefaktor
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
uPA	<b>U</b> rokinase-Typ <b>P</b> lasminogen <b>A</b> ktivator
USP7	<b>u</b> biquitin <b>s</b> pezifische <b>P</b> rotease 7

UV/Vis      den **UV** und sichtbaren (*visible*) Spektralbereich betreffend

wt            **Wildtyp**

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während der letzten Jahre, besonders in den zurückliegenden Monaten, unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum danke ich herzlichst für die akademische Betreuung der Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und vielfältigen daraus erwachsenen Anregungen.

Bei Herrn Dr. Jörg Hoheisel möchte ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen anzufertigen, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeiten sowie für seine stete Gesprächsbereitschaft bedanken.

Frau Dr. Nicole Marmé und Herrn Dr. Jens-Peter Knemeyer danke ich für die interessante Themenstellung, manch wertvolle Anregung und ihren Glauben an das Gelingen dieser Arbeit.

Für die kritische Hinterfragung der Ergebnisse und hilfreichen Anregungen als Betreuer im Rahmen des PhD-Programms danke ich Prof. Dr. Peter Angel ebenfalls recht herzlich.

Ein riesiges Dankeschön gebührt der gesamten Gruppe „Biophysik der Makromoleküle“ um Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski. Ohne die häufige Benutzung ihrer spektroskopischen Geräte wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Für die Einführung in die Eigenheiten ihrer Spektrometer danke ich Dr. Kathalin Toth. Dr. Alexander Gansen gebührt mein tiefster Dank für die Unterstützung bei unzähligen Einzelmolekülmessungen, für wertvolle Diskussionen, Ratschläge zur Zählung der Farbstoffe und nicht zuletzt für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Stefanie Krenzer und Dr. Jochen Hess möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und das Überlassen der KLK6-Proben bedanken.

Dem gesamten Arbeitskreis „Funktionelle Genomanalyse“ sei für die freundliche Aufnahme, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft, die mir von jedem entgegengebracht wurde, gedankt.

Marc Dauber und Wolfgang Weinig möchte ich auf diesem Wege für viele praktische Labortipps und unzählige gemeinsame Stunden im Labor danken, die wir manchmal gemeinsam durchgestanden, aber meist doch genossen haben. In diesem Zusammenhang danke ich Dr. Anette Jacob, nicht nur für die Messung herausfordernder Maldipproben, sondern vor allem für die vielen kritischen Fragen und analysierenden Gespräche.

Meinen guten Freunden Anne, Melanie und Nils danke ich sehr für das gewissenhafte Korrekturlesen der Arbeit sowie die zahlreichen Unternehmungen sportlicher, geistiger und kulinarischer Natur in den vergangenen Jahren.

Ein großes Dankeschön schulde ich Andrea, die neben dem Korrekturlesen dieser Arbeit auch die undankbare Aufgabe hatte, mich nach so manch fehlgeschlagenem Experiment wieder aufzurichten und daran zu erinnern, dass es auch ein Leben neben der Arbeit gibt. Danke!

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie und speziell meinen Eltern, die mich in allen Belangen vorbehaltlos unterstützt haben.

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

- a) ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe,
- b) ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, im Februar 2010

Achim Friedrich