

INAUGURAL DISSERTATION

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

vorgelegt von
Dipl. Chem. Andreas Haderspeck
aus Hüffenhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 2017

Chemisch schaltbare Fluoreszenzsonden für die optische Nanoskopie

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

„Good judgement is the result of experience and experience the result
of bad judgement.“

Mulla Nasrudin

Zusammenfassung

Die Fluoreszenzmikroskopie hat sich als leistungsstarke Technik in allen Bereichen der Naturwissenschaften zur Untersuchung von Strukturen und dynamischen Prozessen etabliert. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden Techniken entwickelt, deren Möglichkeiten weit über die herkömmlicher Mikroskopie hinaus reichen und nicht nur das Beobachten kleinster Objekte erlauben, sondern selbst die beugungsbedingte Auflösungsgrenze optischer Systeme überwinden. Mikroskopie im Allgemeinen und hochauflösende Methoden im Speziellen sind jedoch nur so gut wie die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. Während modernste Technik in der Lage ist, dreidimensionale Aufnahmen kleinster Strukturen bis hin zu einzelnen Emittieren abzubilden, richtet sich nun der Fokus auf die Entwicklung neuer, leistungsfähiger Fluoreszenzsonden, deren Fähigkeit sich nicht alleine auf das Emittieren von Fluoreszenz beschränkt. Durch geschicktes Design können nicht nur elementare Eigenschaften wie molekulare Helligkeit und Photostabilität optimiert werden. Vielmehr kann eine maßgeschneiderte Funktionalisierung völlig neue Anwendungsmöglichkeiten eröffnen.

In dieser Arbeit wurden neue Fluoreszenzsonden auf Basis einer unnatürlichen Aminosäure entwickelt, charakterisiert und in unterschiedlichen Methoden eingesetzt. Der modulare Aufbau ermöglicht das einfache Kombinieren unterschiedlicher Fluorophore mit einem Bipyridin-Liganden zu kompakten Fluoreszenzsonden, die aufgrund der Komplexbildung von Metallionen zwischen einem hellen, stark fluoreszierenden und einem dunklen Zustand geschaltet werden können und daher den Einsatz lichtgetriebener Prozesse überflüssig machen. Eine Vielzahl an Farbstoffkonjugaten konnte erfolgreich dargestellt werden, die sowohl in Ensemble- als auch in Einzelmolekülmessungen untersucht und anschließend zur Markierung geeigneter Zielstrukturen in fixierten Zellen eingesetzt wurden. Die überzeugendsten Ergebnisse wurden mit dem Atto633-Derivat erzielt, das eine Restfluoreszenz von etwa 11 % zeigt sowie eine Komplexbildungskonstante für Cu(II) von $(8.11 \pm 0.24) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, die aus der Schaltkinetik einzelner Emitter bestimmt wurde. Das Potential der chemischen Schalter wurde durch die Anwendung in der Lokalisationsmikroskopie demonstriert, aus der Halbwertsbreiten der markierten Filamente bestimmt wurden, die mit etwa 70 nm deutlich unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen. Die Vielseitigkeit wurde durch den Einsatz im chemischen Multiplexing gezeigt, das zudem noch mit der STED-Mikroskopie kombiniert wurde, um hochaufgelöste, mehrfarbige Bilder aus einem einzigen spektralen Kanal zu erzeugen.

Abstract

Fluorescence microscopy is an established, powerful tool to investigate structures and dynamic processes in all major fields of life sciences. Recently, technological progress has not only improved existing methods and their abilities in imaging microscopic objects but also overcome the diffraction limit of optical systems. However, microscopy and especially super resolving methods are only as good as the fluorescence dye employed. While modern instrumentation is able to perform three-dimensional imaging of nanoscopic structures down to the size of single emitters, the focus of development has shifted to sophisticated fluorescent probes that are more than sheer emitters of detectable radiation. Through smart design, basic performance parameters like quantum yield and photostability are highly improved. In addition, the incorporation of tailored attributes opens up new fields of application.

Synthesis, characterisation and application of new fluorescent probes based on an artificial amino acid are presented in this work. The modular composition allows facile combination of different dyes with a bipyridine ligand. This forms a compact probe that can be switched from a bright, strongly fluorescent to a dark state by coordination of metal ions. Control over this two-state system by micromolar concentrations of Cu(II) ions makes it a versatile tool and a powerful competitor to methods based on light-driven mechanics. A variety of different dye conjugates was successfully synthesized, their fluorescent properties explored in ensemble as well as in single molecule experiments, and finally deployed in the labelling of target structures in fixed cells. The most compelling results were obtained from the Atto633 derivative, with a remaining fluorescence of about 11 % in the dark state and a complexation constant for Cu(II) of $(8.11 \pm 0.24) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, which was determined through the switching kinetics of single emitters. Application of these chemical switches in a localisation microscopy based approach provided super resolved images with numbers for full width at half maximum of labelled filaments in the range of 70 nm and thereby well below the diffraction limit. Their performance was also demonstrated through application in chemical multiplexing combined with STED microscopy to obtain super resolved multi-colour images from a single spectral channel.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Abstract

I. Einleitung und Grundlagen	1
1 Einleitung und Grundlagen	3
1.1 Mikroskopie und ihre Grenzen	3
1.2 Fluoreszenz	6
1.3 Fluoreszenzlöschung	8
1.4 Schaltmechanismen	10
1.5 Lokalisationsmikroskopie	13
1.6 Markierungsstrategien	14
1.7 Zielsetzung	17
II. Experimente und Ergebnisse	19
2 Sondendesign	21
3 Synthese und Charakterisierung	25
3.1 Synthese Bodipy-Farbstoffe	25
3.2 Synthese Bispidin-Liganden	34
3.3 Synthese Bpy-Ala: Modulares System für Fluoreszenzsonden	36
4 Einzelmolekülexperimente	48
4.1 Immobilisierung	48
4.2 Einzelmolekülspuren – Kinetische Parameter	49
5 Zellexperimente	58
5.1 Markierung	58
5.2 Charakterisierung des Schaltprozesses	62

5.3	Lokalisationsmikroskopie: CHIRON – Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy	66
5.4	Chemisches Multiplexing	69
III.	Diskussion und Ausblick	81
6	Diskussion und Ausblick	83
IV.	Materialien, Methoden und Synthesevorschriften	89
7	Materialien, Methoden und Synthesevorschriften	91
7.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	91
7.2	Aufreinigung und Analytik	93
7.3	Mikroskopie	96
7.4	Probenvorbereitung	98
7.5	Datenauswertung	102
7.6	Synthesevorschriften	103
V.	Anhang	127
A.	Kristallstrukturdaten	129
B.	Literaturverzeichnis	131
C.	Danksagung	138
D.	Eidesstattliche Erklärung	140

Teil I.

Einleitung und Grundlagen

1 Einleitung und Grundlagen

1.1 Mikroskopie und ihre Grenzen

Die Mikroskopie ist eine leistungsstarke Technik zum Betrachten kleinster Objekte, die dem Beobachter mit bloßem Auge verborgen blieben. Bereits im 17. Jahrhundert wurden durch geschickte Kombination von Linsen gleichermaßen das Betrachten weit entfernter Objekte im makroskopischen Kosmos und mikroskopischer Gebilde wie Zellen ermöglicht.^[1] Seit der Entwicklung dieser ersten optischen Systeme wurden enorme, technische Fortschritte erzielt, die weit über das Leistungsvermögen herkömmlicher Lichtmikroskopie hinausgehen. So ist es gelungen, Abbildungsfehler auszugleichen,^[2] die Ausleuchtung durch Optimierung von Lichtquelle und Strahlengang zu verbessern,^[3] sowie Empfindlichkeit und Kontrast durch geeignete Detektoren deutlich zu steigern. Eine nützliche Erweiterung besteht in der Epifluoreszenzmikroskopie, die in vielen Bereichen einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung komplexer Zusammenhänge leistet und im Jahr 2008 zur Verleihung des Chemie-Nobelpreises an M. Chalfie, O. Shimomura und R. Tsien für Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), führte.^[4] Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen dient jedoch nicht nur der selektiven Markierung von Zielstrukturen und erlaubt das Beobachten dynamischer Prozesse in lebenden Zellen, die in der reinen Lichtmikroskopie nur als farblose Gebilde mit wenig Kontrast abgebildet werden.^[5] Spezielle Fluoreszenzsonden können mit maßgeschneiderten Eigenschaften unterschiedlichste Funktionen übernehmen und zur Analyse von Eigenschaften genutzt werden, die ansonsten nicht direkt messbar sind.^[6] Dazu gehören sowohl die Anwendung in biologischen Zellen, um etwa die lokale Konzentration von Metallionen^[7] oder den pH-Wert^[8] in einzelnen Kompartimenten zu bestimmen,^[9] als auch die Funktionalisierung von Oberflächen^[10] sowie die Aufklärung von Reaktionsmechanismen.^[11]

Einen weiteren Fortschritt stellt die Entwicklung von konfokalen Mikroskopen dar, die das Anregungslicht in einen Punkt fokussieren und damit die Probe abrastern.^[12] Durch das kleine Anregungsvolumen und eine zusätzliche Lochblende im Strahlengang wird der Hintergrund stark reduziert und selbst das Abbilden einzelner Moleküle ermöglicht.^[13] Eine ähnliche Verbesserung ergibt sich aus der TIRF-Mikroskopie

(Total Internal Reflection Fluorescence), die nur eine sehr dünne Schicht der Probe ausleuchtet und dadurch die Hintergrundfluoreszenz minimiert.^[14] Dazu wird die Totalreflexion des Anregungslichtes an der Phasengrenze zur Probe ausgenutzt, die aufgrund der Wellennatur elektromagnetischer Strahlung, ein evaneszentes Feld mit geringer Eindringtiefe erzeugt. Dadurch wird lediglich eine Schicht mit einer Dicke von etwa 200 nm zur Emission angeregt, wodurch ebenfalls einzelmolekül-empfindliche Aufnahmen möglich werden. Allerdings ist die Beobachtung auch auf diesen Bereich beschränkt. Im Gegensatz zu abrasternden Methoden kann hier das gesamte Blickfeld, bestehend aus vielen Einzelpunkten, simultan aufgenommen werden.

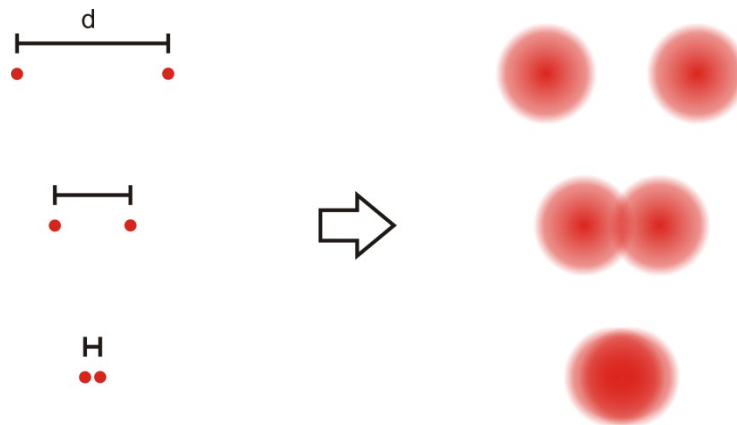


Abbildung 1.1: Punktförmige, klar definierte Lichtquellen erzeugen beim Durchlaufen einer kreisförmigen Apertur (Objektiv) ein Beugungsmuster. Bei dicht nebeneinander liegenden Punkten, verschmimmen diese zu einer nicht auflösbaren Überlagerung.

Trotz der ständigen Weiterentwicklung ist es mit konventionellen Mikroskopen nicht möglich, die beugungsbedingte Auflösungsgrenze optischer Systeme zu überwinden.^[15] Bereits im Jahr 1883 beschrieb Ernst Abbe diese physikalische Grenze, als Folge der Interaktion von Licht als elektromagnetische Welle, mit optischen Elementen des abbildenden Systems.^[16] Wie in Abbildung 1.1 dargestellt, entseht beim Durchlaufen einer kreisförmigen Apertur ein Beugungsmuster, das als Beugungsscheibchen (airy disc), umgeben von konzentrischen Ringen, abgebildet wird. Die Überlagerung dieser Abbildungsfunktionen führt zu einem verschwommenen Bild, das auch durch weitere Vergrößerung keinen zusätzlichen Informationsgewinn bietet. Die

maximal erreichbare Auflösung ist definiert als der Mindestabstand zwischen zwei Punkten, deren Abbildungsfunktionen gerade noch getrennt betrachtet werden können.^[17]

$$d_{\min} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} = \frac{0.61 \cdot \lambda}{n \sin \theta} \quad (1.1)$$

Formel (1.1) beschreibt den Zusammenhang von minimalem Abstand d_{\min} , der Wellenlänge λ des betrachteten Lichts und der numerischen Apertur NA des Objektivs, die sich aus dem Produkt von Öffnungswinkel θ und Brechungsindex n ergibt. Dementsprechend lässt sich die mögliche Auflösung durch anpassen dieser Parameter steigern. Die Grenze für technisch umsetzbare Werte liegt für blaues Licht, das sich mit einer Wellenlänge von 400 nm am Rand des sichtbaren Spektrums befindet und dem Einsatz hochwertiger Objektive, die Werte für NA von 1.49 erreichen, bei einer maximalen Auflösung von etwa 200 nm.^[18] Eine weitere Steigerung lässt sich zwar durch noch kleinere Wellenlängen realisieren, der sich anschließende UV-Bereich entfaltet jedoch eine destruktive Wirkung auf die Probe, die mit noch kleineren Wellenlängen weiter zunimmt.^[19] Alternative Techniken, wie z. B. die Elektronenmikroskopie, erzielen mit den hier eingesetzten, sehr kurzen Wellenlängen inzwischen Auflösungen von wenigen Ångström.^[20] Dafür sind jedoch eine spezielle Probenpräparation, Färbung mit Kontrastmitteln und kontrollierte Aufnahmebedingungen notwendig, die das Beobachten von lebenden Proben ausschließen und zudem eine hohe Belastung für organische Gewebe darstellen, die zu Beschädigung und Artefakten in der Abbildung führen kann.^[21] Nahfeldmethoden, wie die Rastertunnel- oder Rasterkraftmikroskopie, benötigen keine optischen Elemente und sind daher auch nicht von beugungsbedingten Einschränkung betroffen. Sie erreichen eine Auflösung mit der selbst einzelne Atome abgebildet werden können, benötigen jedoch einen aufwendigen Aufbau und sind zudem auf die Analyse der Probenoberfläche beschränkt.^[22]

Um die Vorteile der optischen Mikroskopie mit einer höheren Auflösung zu verbinden, wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Techniken entwickelt, die bestimmte Eigenschaften der Fluoreszenz ausnutzen, um bestehende Limitierungen zu überwinden.^[23] Die daraus entstandene, hochauflösende Mikroskopie wurde 2014 mit Verleihung des Nobelpreises für Chemie an E. Betzig, S. Hell und W. Moerner, ausgezeichnet.^[24] Zu den bekanntesten Vertretern zählen sowohl Nahfeldmethoden wie die optische Rasternahfeldmikroskopie^[22] als auch deterministische Techniken wie

die STED-Mikroskopie^[25] und stochastische Methoden wie die Lokalisationsmikroskopie.^[26] Grundlage dieser Methoden ist das Vorhandensein eines Zweizustands-systems, das ein Schalten der Fluorophore von einem stark emittierenden An- in einen dunklen Aus-Zustand ermöglicht.^[27] Notwendige Mechanismen, die zur Kontrolle der Fluoreszenz eingesetzt werden können, basieren auf intramolekularen Vorgängen, die an der Entstehung der Emission beteiligt sind und diese beeinflussen können.

1.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz selbst ist ein Spezialfall der Lumineszenz, die zunächst nur das Abgeben von Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung beschreibt.^[28] Dafür muss das System durch Aufnahme von Energie in einen angeregten Zustand überführt werden. Je nach Energiequelle wird dann die auftretende Lumineszenz in unterschiedliche Kategorien eingeteilt. Dazu gehören alltägliche Phänomene wie die Kathodolumineszenz, die in Braun'schen Röhren durch einen Elektronenstrahl ausgelöst wird und aus veralteten Röhrenfernsehern bekannt ist, oder die Chemolumineszenz, bei der eine chemische Reaktion die benötigte Energie liefert und in Form von Knicklichtern den Weg in das alltägliche Leben gefunden hat, bis hin zu kaum bekannten Kuriositäten wie die Schrimpolumineszenz,^[29] die von Knallkrebse praktiziert wird. Die in der Fluoreszenzmikroskopie gebräuchliche Anregung nutzt Licht als Energiequelle und wird dementsprechend als Photolumineszenz bezeichnet. Zum Einsatz kommen hier vor allem Laser, da sich ihre optischen Eigenschaften sehr präzise kontrollieren lassen. Nachdem das Molekül durch Absorption eines Photons passender Energie in einen angeregten Zustand überführt wurde, gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten durch Energieabgabe wieder in den Grundzustand zurückzukehren. Das in Abbildung 1.2 dargestellte Jablonski-Diagramm zeigt die wichtigsten und für diese Arbeit notwendigen Vorgänge, erhebt dabei aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit.^[30]

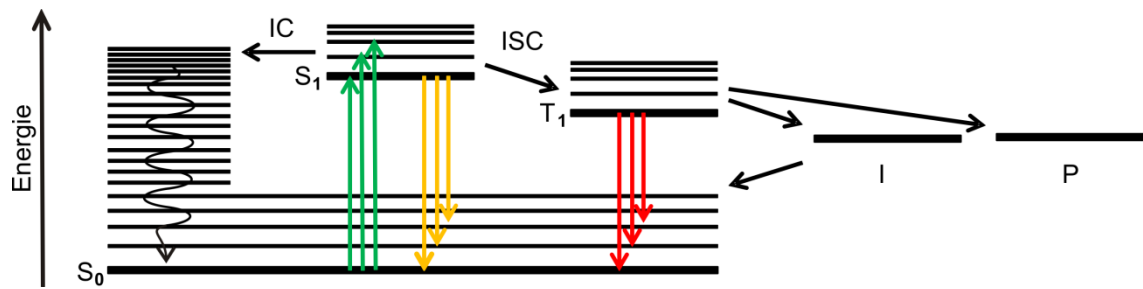


Abbildung 1.2: einfaches Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung elementarer Prozesse der Lumineszenz; S_0 = elektronischer Grundzustand, S_1 = erster elektronisch angeregter Zustand, T_1 = Tripletzustand, I = Intermediat, P = Produkt aus photochemischer Umsetzung, grüne Pfeile = Anregung, gelbe Pfeile = Fluoreszenz, rote Pfeile = Phosphoreszenz, geschwungener Pfeil = interne Relaxation, IC = Internal Conversion, ISC = Inter System Crossing

Bei Raumtemperatur befindet sich das System sowohl im elektronischen als auch Schwingungs- und Rotations Grundzustand S_0 . Die Anregung erfolgt aufgrund des Franck-Condon Prinzips und der damit verbundenen Born-Oppenheimer Näherung in ein höheres vibronisches Niveau (grüne Pfeile) und führt durch schnelle Relaxation in den vibronischen Grundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustandes S_1 .^[31] Aus diesem erfolgt dann die als Fluoreszenz bezeichnete Emission eines Photons (gelbe Pfeile), die in verschiedene vibronische Zustände des elektronischen Grundzustandes führt. Die auftretende Relaxation erzeugt eine Energiedifferenz zwischen absorbiertes und emittierter Strahlung, die in einer Rotverschiebung der Wellenlänge resultiert und nach ihrem Entdecker als Stokes-Verschiebung bezeichnet wird.^[32] Dieser Effekt erweist sich in der Fluoreszenzmikroskopie als besonders nützlich, da er die Separation von Anregungs- und Emissionsstrahlung, aufgrund der unterschiedlichen Wellenlänge, durch optische Filter ermöglicht. Aus dem S_1 -Zustand kann es durch Spinumkehr (ISC) zu einem Übergang in den Triplet-Zustand T_1 kommen, aus dem dann durch Emission eines Photons die noch weiter rotverschobene Phosphoreszenz entsteht. Neben diesen Mechanismen gibt es auch emissionslose Vorgänge, die zurück in den Grundzustand führen. Dazu gehören die innere Konversion (IC) in ein hochgelegenes, vibronisches Niveau gefolgt, von Relaxation und Abgabe der überschüssigen Energie in Form von Wärme sowie die Deaktivierung durch Stöße mit anderen Molekülen. Besonders aus dem langlebigen und gleichzeitig energetisch hoch liegenden T_1 -Zustand können chemische Reaktionen auftreten, die reversibel über ein Intermediat I zurück in den Grundzustand führen oder irreversibel

zur Zerstörung des Fluorophors (Photozerstörung) beziehungsweise zu einem neuen Produkt (Photochemische Reaktion)^[33] führen.

Alle alternativen Mechanismen stehen in Konkurrenz zur Fluoreszenz und haben daher einen direkten Einfluss auf die Fluoreszenzquantenausbeute. Diese ist ein Maß für die Effektivität der Umwandlung von absorbierter Strahlung zu emittierter Fluoreszenz und ist proportional zur Helligkeit des Emitters. Durch das Beeinflussen alternativer Abregungsmechanismen kann somit die Fluoreszenzintensität gesteuert und ein Schalten zwischen hellem und dunklem Zustand, kontrolliert werden.

1.3 Fluoreszenzlöschung

Wie bereits angedeutet, können parallel zur Fluoreszenz auch strahlungsfreie Effekte zurück in den Grundzustand führen, die zum Teil durch gezielte Wahl der Umgebungsbedingungen kontrolliert und somit zur Steuerung der Fluoreszenz genutzt werden können. Das hierdurch zugängliche Schalten zwischen einem hellen und einem dunklen Zustand bildet die Grundlage heutiger Methoden zur hochauflösenden Lokalisationsmikroskopie.

Neben der schnell auftretenden Fluoreszenz, die innerhalb weniger Nanosekunden abläuft, kann ein Übergang in einen langlebigen Zustand erfolgen, aus dem der Fluorophor auf anderem Weg seine Energie abgibt. Ein solcher Prozess ist der Übergang in den angeregten Triplet-Zustand, der zwar quantenmechanisch verboten und daher unwahrscheinlich ist aber dennoch auftreten kann. Er wird durch bestimmte Molekülgruppen, besonders durch schwere Atome (Heavy Atom Effect),^[34] begünstigt und kann die Fluoreszenz deutlich reduzieren. Die so entstehenden, temporären Dunkelzustände werden auch als Triplet-Blinken bezeichnet und können wiederum durch spezielle Triplet-Quencher reduziert werden.^[35] Ein bekanntes Beispiel ist molekularer Sauerstoff, der praktisch überall vorhanden ist und durch einen effektiven Abbau dieser Zustände, das Tripletblinken weitestgehend unterbindet.^[36] Nachteilig ist hier jedoch die starke Tendenz der energiereichen Zwischenstufen zu unerwünschten Nebenreaktionen, die häufig zu frühzeitiger Photozerstörung führt. Moderne Puffersysteme nutzen daher eine Kombination aus „Sauerstoff-Fängern“ und speziellen Reduktions- und Oxidationsmitteln (ROX-Puffer), um das Tripletblinken zu vermeiden.^[37]

Auch die Übertragung der Energie auf ein anderes Molekül, das sich in unmittelbarer Nähe zum angeregten Fluorophor befindet, ist möglich. Dies geschieht einerseits durch direkte Stöße und Übertragung von kinetischer Energie oder Auslösen einer chemischen Reaktion, aber auch durch unterschiedliche Wechselwirkung mit anderen Molekülen ohne die Notwendigkeit eines tatsächlichen Kontaktes. Stoffe, die in der Lage sind, eine effektive Reduktion der Fluoreszenzintensität zu erzeugen, werden als Fluoreszenzlöschler (engl. Quencher) bezeichnet. Dabei wird zwischen zwei Arten der Löschung unterschieden. Die dynamische Löschung wird durch zufälliges Aufeinandertreffen frei beweglicher Teilchen verursacht und reduziert sowohl Intensität als auch Lebensdauer der Fluoreszenz.^[38] Sie ist linear von der Konzentration des Löschers abhängig und zeigt daher erst bei recht hohen Konzentrationen einen deutlichen Effekt. Ein anschauliches Beispiel ist hier die wohlbekannte Löschung von Chinin durch Chlorid Ionen.^[39] Bei der statischen Löschung wird aus Fluorophor und Fluoreszenzlöschler vorübergehend ein stabiler, nicht fluoreszierender Komplex gebildet und somit die Konzentration aktiver Emitter reduziert. Abhängig von der Bindungsstärke kann hier schon bei geringen Konzentrationen eine effektive Reduzierung der Fluoreszenzintensität erzeugt werden, wobei in diesem Fall die Fluoreszenzlebensdauer unverändert bleibt. Der Zusammenhang von Intensität und Konzentration des Quenchers wird dann durch die Stern-Volmer-Gleichung für statische Fluoreszenzlöschung beschrieben.^[28]

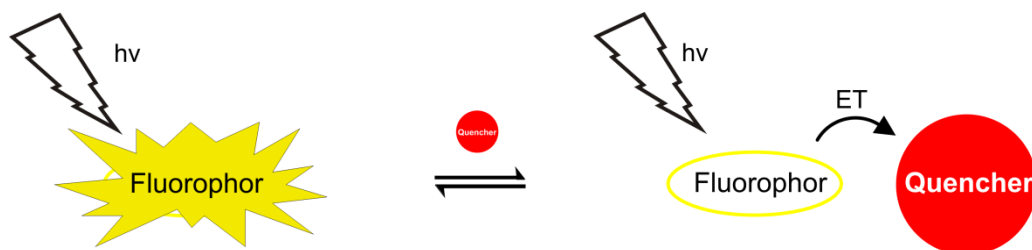


Abbildung 1.3: Fluoreszenzlöschung durch Energietransfer (ET) auf einen Quencher.

Eine Auswahl an bekannten Prozessen, die eine löschende Wirkung zeigen, soll an dieser Stelle kurz beschrieben werden. Die strahlungsfreie Energieübertragung durch FRET (Förster Resonanz Energie Transfer)^[40] setzt eine Überlappung von Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors voraus und lässt sich aufgrund der abstandsabhängigen Effizienz auch zur Bestimmung von Entfernungen im Nanometerbereich (Molecular Ruler) einsetzen.^[41] Bei ausreichend

geringem Abstand kann dieser Effekt zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz führen und findet auch Anwendung als Black-Hole-Quencher oder AttoQ-Dyes.^[42] Ein weiterer, wirkungsvoller Mechanismus ist PET (Photo Elektronen Transfer), bei dem die Anregung durch Photonen zur Übertragung von Elektronen führt. Formal entspricht das einer lichtinduzierten Redox-Reaktion, wobei der Fluorophor im angeregten Zustand, je nach Reaktionspartner, als Elektronen-Donor oder Akzeptor dienen kann, solange das Redoxpotential des Reaktionspartners in einem geeigneten Bereich liegt.^[43] Sowohl Bildung als auch Abbau der intermediär gebildeten Radikal-Ionen sind sehr schnelle Prozesse und führen zu einer effizienten Fluoreszenzlöschung, die jedoch auf eine äußerst kurze Distanz von etwa einem Nanometer begrenzt ist. Dieser Effekt wird unter anderem in Fluoreszenzsonden, die an Amino-Phenyl-Liganden konjugiert sind, zur Detektion von Metallionen genutzt.^[44] Ein Sonderfall des Photoelektronentransfers ist ICT/TICT (Internal Charge Transfer, Twisted), der intramolekular zwischen benachbarten Molekülgruppen stattfindet und dabei auch eine Drehung (twist) auslösen kann.^[45] Ein weniger gut untersuchter Mechanismus ist TBET (Trough Bond Energy Transfer), der meist dann zur Diskussion kommt, wenn Alternativen wie FRET und PET ausgeschlossen sind.^[46] Dabei wird die überschüssige Energie aus der Anregung, über σ -Bindungen des Molekülgerüsts zu einer Akzeptorgruppe geleitet und anschließend über alternative Mechanismen abgegeben.

1.4 Schaltmechanismen

Eine notwendige Voraussetzung für die Lokalisationsmikroskopie ist ein Zweizustandssystem, das von einem hellen in einen dunklen Zustand geschaltet werden kann. Um nun das Schalten zwischen den zwei Zuständen steuern zu können, muss einer oder mehrere der zuvor genannten Löschemechanismen durch Einwirkung äußerer Effekte kontrolliert werden können.

In der STED-Mikroskopie wird hierzu die stimulierte Emission ausgenutzt, um die Fläche der angeregten Fluorophore auf einen Bereich unterhalb des Beugungslimits zu reduzieren. Die erreichbare Auflösung ist hier proportional zur Intensität des STED-Lasers und erreicht Werte bis zu wenigen Nanometern. Die dafür notwendige, extrem hohe Strahlungsintensität stellt jedoch eine hohe Belastung für Farbstoff und Probe dar. Zusammen mit den hohen, technischen Anforderungen an den Mikroskopaufbau

wird dadurch der Einsatzbereich dieser Methode eingeschränkt. Andere etablierte Methoden wie STORM und PALM basieren auf photoschaltbaren Fluoreszenzfarbstoffen, die durch Einstrahlen einer bestimmten Wellenlänge mit hoher Intensität in einen langlebigen Dunkelzustand gebracht werden und dann stochastisch in einen emittierenden An-Zustand wechseln.^[47] Der dunkle Zustand wird dabei, je nach verwendetem Farbstoff, durch Isomerisierung,^[48] langlebige Dunkelzustände^[49] oder Bildung von Addukten mit Bestandteilen des Puffers,^[50] erzeugt. Um Bilder mit akzeptabler Qualität zu erzeugen, ist man hier jedoch auf eine überschaubare Anzahl an Farbstoffen beschränkt, die zudem ein spezielles Puffersystem voraussetzen.^[51] So können z.B. Cyaninderivate in Thiol-haltiger Umgebung effizient in einen dunklen Zustand geschaltet werden.^[52] Diese Aufnahmebedingungen in Kombination mit der hohen Anregungsleistung, die für das Schalten benötigt wird, mag für die Arbeit an fixierten Proben geeignet sein, ist für die Aufnahmen von lebenden Zellen jedoch bedenklich.^[53]

Abgesehen von diesen photoinduzierten Prozessen kann jede chemische Reaktion genutzt werden, die in der Lage ist, die spektroskopischen Eigenschaften des Fluorophors zu beeinflussen. Hierzu wurde bereits eine Reihe von Mechanismen untersucht, die durch eine chemische Reaktion den Schaltvorgang auslösen. Dazu gehören die intramolekulare Zyklisierung von Rhodaminderivaten,^[54] Hybridisierung von DNA (DNA-Paint),^[55] Protonierung,^[56] Imin-Tautomerisierung von Photosäuren,^[57] reversible Redox-Reaktionen,^[58] enzymatische Spaltung^[59] und viele mehr.^[60] Von diesen zeigen zwar viele ein schaltbares Emissionsverhalten, welches aber oft nur unter speziellen Bedingungen oder mit ungeeigneter Kinetik realisiert werden kann.

Eine weitere Möglichkeit liegt in der reversiblen Koordination von Metallionen durch einen am Fluorophor angebrachten Liganden, der durch Fixierung des Fluoreszenzlöschers in räumlicher Nähe einen temporären Dunkelzustand erzeugt.^[61] Durch anschließende Dissoziation wird die Fluoreszenz wiederhergestellt und kann als Blinken beobachtet werden. Untersuchungen zu einem entsprechenden System auf Basis einer DNA-Sonde, in Kombination mit Cu(II) Ionen wurden bereits in der Arbeitsgruppe Herten durchgeführt.^[62] Die daraus entwickelte Methode CHIRON (Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy) bildet die Grundlage der hier durchgeführten Arbeit.^[63] Hier gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Modelle zur Realisierung einer schaltbaren Fluoreszenzsonde. Zum einen die „Turn-On“ Sonde, die im metallfreien Zustand keine oder nur sehr geringe Fluoreszenz zeigt. Dazu wird eine fluoreszenzlöschende Gruppe in den Liganden integriert, die durch Koordination eines Metallions deaktiviert und somit die Fluoreszenz eingeschaltet wird.^[64] Hier lassen sich nur Metallionen einsetzen, die selbst keinen Einfluss auf die Fluoreszenz ausüben, da

sonst zwei gegenläufige Effekte auftreten, die sich gegenseitig kompensieren. Dies sind vorwiegend redox inerte Metallionen wie Zn^{2+} , Ca^{2+} und Mg^{2+} , die in der Lage sind, mit vielen Liganden ausreichend stabile Komplexe zu bilden, aber auch Alkalimetalle, die durch aufwendigere, cyclische Liganden gebunden werden können.^[65] Die alternative Variante ist eine „Turn-Off“ Sonde, die aus einer Kombination von Fluorophor und herkömmlichem Ligand besteht, der durch Koordination eines fluoreszenzlöschenden Metallions die Deaktivierung der Emission auslöst. Daraus folgt, dass die zuvor genannten Metallionen für dieses System nicht geeignet sind und eine Orthogonalität in der Anwendung vorliegt. Da die Bildung des Komplexes von der Metallionenkonzentration abhängt, lässt sich hierdurch sowohl die Lage des Gleichgewichtes als auch die Kinetik kontrollieren und macht diese Methode zu einem vielversprechenden Ansatz für die Lokalisationsmikroskopie.

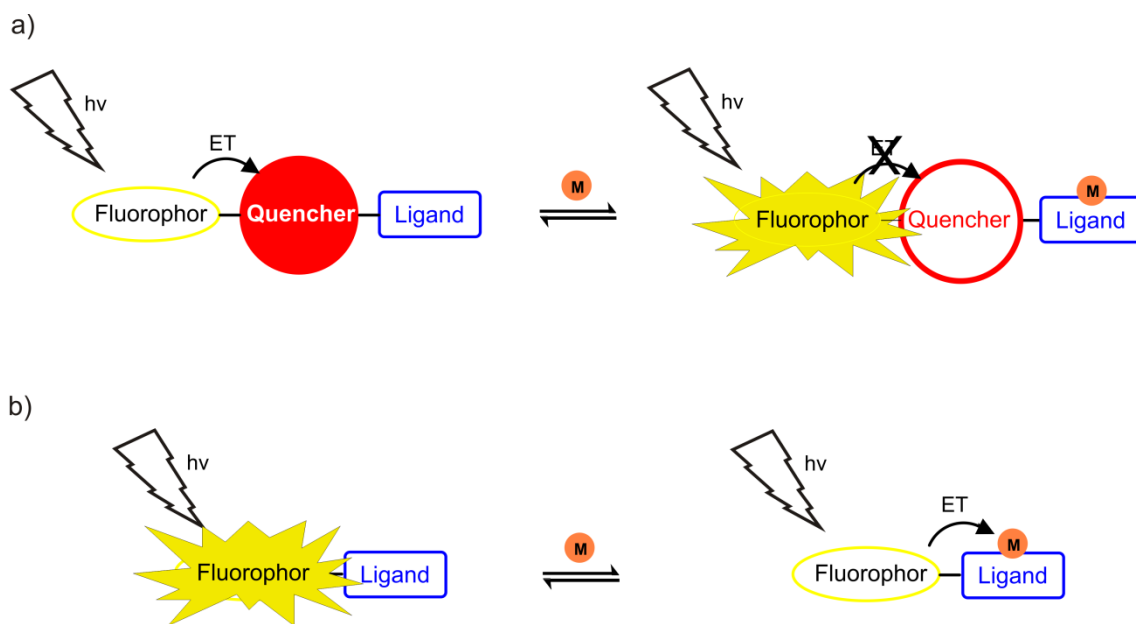


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung durch die Komplexierung von Metallionen; **a)** „Turn-On“ Sonde; **b)** „Turn-Off“ Sonde.

1.5 Lokalisationsmikroskopie

Der kontrollierbare Übergang zwischen dem Zweizustandssystem kann schließlich zum Überwinden der beugungsbedingten Auflösungsgrenze ausgenutzt werden. Hierzu werden die Umgebungsbedingungen der Probe so eingestellt, dass nur ein kleiner Bruchteil der Fluorophore einer dicht markierten Zielstruktur in einem emittierenden An-Zustand vorliegt. Entscheidend ist, dass die Anzahl dieser Emitter so gering ist, dass der Abstand zwischen ihnen ausreicht, um ein Überlappen der Beugungsmuster zu vermeiden. Durch Anpassen einer Punktabbildungsfunktion, die das Intensitätsprofil der räumlich separierten Emitter beschreibt, wird es möglich, jeden Einzelnen mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern zu lokalisieren.^[66] Wegen des dynamischen Gleichgewichts des zugrundeliegenden Schaltprozesses entsteht ein permanenter Wechsel zwischen den beiden Zuständen, der zu einem stochastischen Blinken der einzelnen Fluorophore führt. Aus einer Zeitserie lässt sich dann ein hochaufgelöstes Gesamtbild aus allen Einzelpunkten, die während der Aufnahme lokalisiert wurden, rekonstruieren.

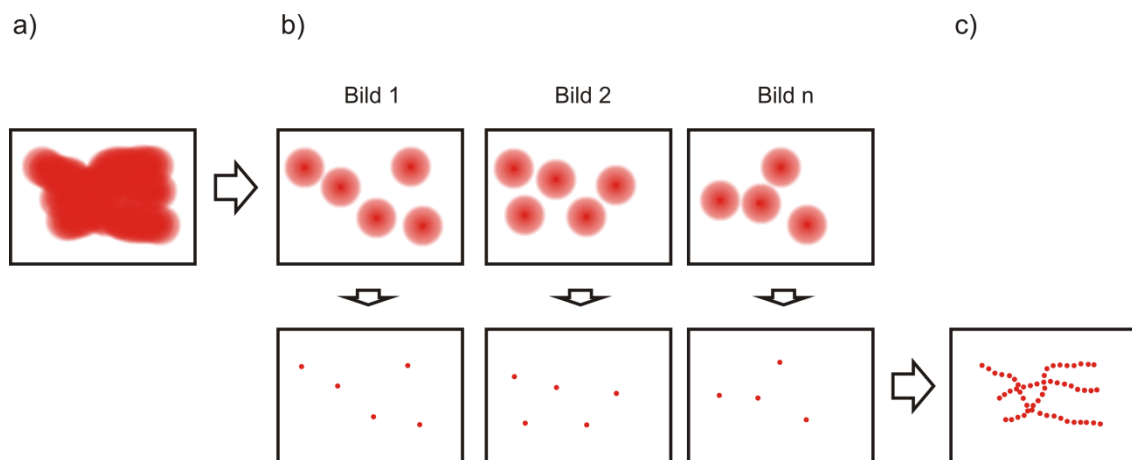


Abbildung 1.5: Funktionsprinzip der Lokalisationsmikroskopie; **a)** direkt beobachtbares Fluoreszenzbild aus der Überlagerung vieler Emitter einer dicht markierten Struktur. Wegen der beugungsbegrenzten Auflösung ist es nicht möglich die tatsächliche Gestalt zu beobachten; **b)** die Aufnahmebedingungen werden so eingestellt, dass nur ein Bruchteil der Farbstoffe im fluoreszierenden An-Zustand vorliegt. Dadurch können die Beugungsscheibchen einzelner Emitter durch einen Gauß-Fit beschrieben und ihre exakte Position lokalisiert werden. Durch Aufnahme einer Bilderserie werden unterschiedliche Subpopulationen abgebildet; **c)** Aus den Lokalisationen wird dann die vollständige Struktur rekonstruiert.

Die erreichbare Auflösung dieser Methode hängt von mehreren Faktoren ab. Dazu gehören die Markierungsdichte, die maßgeblich von der eingesetzten Markierungsstrategie abhängt, sowie die Restfluoreszenz und das Verhältnis von An- zu Aus-Zustand. Letzteres wird durch die Kinetik des Schaltvorganges bestimmt, der im Fall der Komplexierungsreaktion, wie sie in CHIRON vorliegt, durch den verwendeten Liganden und die Konzentration der Metallionen gesteuert werden kann. Durch Verschieben des Gleichgewichtes zur komplexierten, nicht fluoreszierenden Spezies wird die Anzahl der gleichzeitig aktiven Emitter reduziert. Je mehr Emitter sich im dunklen Zustand befinden, desto dichter können diese beieinander liegen, ohne überlappende Signale zu erzeugen, und umso höher wird die erreichbare Auflösung.^[67]

1.6 Markierungsstrategien

Da biologische Zellen und ihre Bestandteile für gewöhnlich keine ausgeprägten Farben oder spezifische Fluoreszenz aufweisen, ist eine direkte Untersuchung mit optischen Verfahren nur wenig aufschlussreich. Um gezielt bestimmte Strukturen beobachten zu können, ist deshalb eine Färbung mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen notwendig. Dabei bringt die Detektion der Fluoreszenz einige Vorteile mit sich, wie z.B. die hohe Empfindlichkeit der Detektoren und das Herausfiltern des Emissionssignals durch geeignete optische Elemente, das zu einem guten Signal-Rausch-Verhältnis führt. Wichtig für die Färbung sind sowohl die Selektivität als auch eine hohe Affinität gegenüber der Zielstruktur. Dies stellt sicher, dass keine anderen Elemente markiert werden und das Signal verfälscht oder durch unspezifische Bindung die Hintergrundfluoreszenz erhöht wird. Hierfür wurden unterschiedliche Techniken entwickelt, von denen die Immunfluoreszenzfärbung (IF) wohl die am weitest verbreitete ist. Sie basiert auf der Bindung von Antikörpern an ihr jeweiliges Antigen.

Der schematische Aufbau eines Antikörpers ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Dieser besteht aus je zwei identischen, schweren und leichten Ketten, die über Disulfidbrücken Y-förmig miteinander verknüpft sind. Durch enzymatische Spaltung kann der obere Teil, auch Fab (engl. antigen binding fragment) genannt, abgetrennt werden. Die so erhaltenen Fab-Fragmente sind deutlich kleiner, besitzen aber durch Erhaltung der Bindungsstellen die gleiche Affinität gegenüber ihrem Antigen. Noch kleiner sind Einzeldomänantikörper, auch Nanobodies genannt, die nur noch aus der

Antigen bindenden Domäne des Antikörpers bestehen und aus bestimmten Tieren gewonnen werden können.

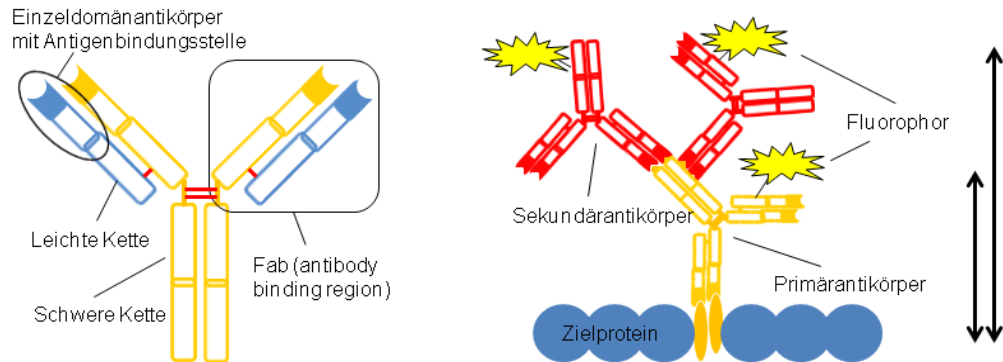


Abbildung 1.6: Aufbau eines Antikörpers und schematische Darstellung einer Markierung durch Farbstoffkonjugate von Primär- und Sekundärantikörpern; angedeuteter Abstand von Fluorophor zu Zielprotein.

Da Antikörper für nahezu jedes Zielmolekül verfügbar sind und sich dazu leicht als Farbstoffkonjugat darstellen lassen, sind sie vielseitig und mit recht geringem Aufwand einsetzbar. Zu unterscheiden sind hier die direkte Markierung, bei der Farbstoffkonjugate von Primärantikörpern direkt an das Zielproteinen binden und die indirekte Markierung, bei der farbstoffmarkierte Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden, der wiederum an das Zielprotein gebunden ist. Der Vorteil der indirekten Markierung ist die Signalverstärkung, die sich aus der Bindung mehrerer Sekundärantikörper an jeden Primärantikörper ergibt. Dies ist vor allem für Mikroskopie-Techniken entscheidend, die auf hohe Anregungsleistungen angewiesen sind, wie es z.B. bei STED der Fall ist, um das starke Photobleichen zu kompensieren. Hierbei ist zu beachten, dass durch die indirekte Messung nicht die tatsächliche Position des Zielproteins bestimmt wird, sondern die des gefärbten Antikörpers und somit gerade bei hochauflösenden Methoden die Auflösungsgrenze durch die Ausdehnung des Gesamtkonstruktes aus Antikörpern und Protein bestimmt wird. Außerdem kann dadurch die Position des detektierten Signals von der tatsächlichen Lage des Proteins abweichen. Ein weiterer Faktor, der zur Unsicherheit beiträgt, ist die Markierungseffizienz (engl. degree of labelling, DOL), die angibt, wie viele Farbstoffe an einen Antikörper gebunden sind. Davon abgesehen, dass dieser Wert schon mit

einem recht großen Fehler behaftet sein kann, gibt er nur den Mittelwert einer Verteilung an, so dass erhebliche Abweichungen für einzelne Antikörper auftreten können. Besonders quantitative Techniken sind hiervon betroffen. Da Antikörper nicht synthetisch hergestellt sondern aus Organismen gewonnen werden, liegt hier stets eine Varianz vor, die sich auf Bindungseigenschaften auswirken und die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen kann. Des Weiteren müssen Kreuzreaktivitäten berücksichtigt werden, die beim Einsatz mehrerer Antikörper auftreten können und besonders das Anfärben unterschiedlicher Strukturen zu einer anspruchsvollen Aufgabe werden kann.

Als Alternative haben sich in den letzten Jahren verschiedene Proteintags zur Markierung von Zielstrukturen etabliert. Diese können in vitro, durch enzymatische Umsetzung eines Substrat-Farbstoff-Konjugats, eine kovalente Bindung zum Farbstoff ausbilden. Eine notwendige Voraussetzung ist das Erzeugen einer stabilen Zelllinie, die das funktionsfähige Fusionsprotein exprimiert.

Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Färbung von Proteinen besteht im Einsatz von Aptameren. Dies sind kleine künstliche Polymere aus Aminosäuren oder Nukleotide, deren räumliche Struktur so gut an die Oberfläche des Zielproteins angepasst ist, dass daraus eine hohe Bindungsaffinität resultiert. Sie lassen sich ähnlich wie Antikörper leicht zu Farbstoffkonjugaten umsetzen. Im Gegensatz zu Antikörpern kann hier durch gezielte chemische Synthese eine kontrolliert einheitliche Struktur erzeugt und auch reproduziert werden. Da diese Verbindungsklasse recht neu ist, sind nur wenige Varianten erhältlich und der Einsatz daher auf sehr wenige Zielproteine begrenzt.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese, Charakterisierung und Anwendung von Fluoreszenzsonden, die durch eine chemische Reaktion zwischen einem hellen, stark fluoreszierenden und einem dunklen Zustand geschaltet werden können. Grundlage des Schaltvorgangs ist die Komplexbildung von Metallionen durch einen am Fluorophor angebrachten Liganden und die damit verbundene Löschung der Fluoreszenz. Die so erhaltene Kontrolle über die Fluoreszenz macht den Einsatz zusätzlicher, lichtgetriebener Effekte überflüssig und bildet die Basis für eine schonende alternative zu etablierten, hochauflösenden Verfahren. Dazu gehört die Identifizierung von geeigneten Molekülgruppen, die alle notwendigen Eigenschaften besitzen, sowie die Kombination dieser, zu einer kompakten funktionsfähigen Verbindung, die sich durch möglichst einfache Mittel darstellen lässt. Ein modulares System sollte den Einsatz unterschiedlicher Gruppen erleichtern, um möglichst viele Varianten auf ihre Eigenschaften zu untersuchen. Dadurch können wichtige Informationen über den zugrundeliegenden Lösmechanismus sowie den Einfluss von farbstoffspezifischen Eigenschaften wie Wellenlänge und Molekülstruktur gewonnen werden. Das Schaltverhalten der erfolgreich synthetisierten Sonden sollte zunächst unter Ensemble-Bedingungen durch Titration mit Metallionen analysiert und quantitativ beschrieben werden. In nachfolgenden Einzelmolekülmessungen an einem TIRF-Mikroskop sollten die erhaltenen Werte bestätigt und zudem kinetische Parameter der Komplexbildung aus zeitlichen Intensitätsverläufen einzelner Emitter bestimmt werden. Voraussetzung hierfür ist die Anwendung einer geeigneten Methode zur Immobilisierung auf Glasoberflächen, die schließlich auch in den Zellexperimenten eingesetzt werden kann. Hier sollte die Funktionsfähigkeit in biologischen Proben durch erfolgreiche Markierung geeigneter Zielstrukturen, unter Erhalt der Schaltfähigkeit bewiesen werden. Die Anwendung in unterschiedlichen Methoden wie der Lokalisations- und STED-Mikroskopie sollte dann die Leistungsfähigkeit, der hier entwickelten Fluoreszenzsonden, demonstrieren.

Teil II.

Experimente und Ergebnisse

2 Sondendesign

Da keine kommerziell erhältlichen Verbindungen zur Verfügung stehen, die sich für den Einsatz als chemisch schaltbare Sonde eignen, müssen diese selbst hergestellt werden. Noch vor der eigentlichen Planung und Durchführung der Synthese ist es notwendig, die Anforderungen an die Sonde festzustellen und entsprechende funktionelle Gruppen zu identifizieren, die diese erfüllen. Im Wesentlichen werden drei Komponenten benötigt, die hier ausführlich charakterisiert werden sollen: Ein Fluorophor für die Färbung, ein Ligand der als Schalter fungiert sowie eine Linker-Gruppe für die Immobilisierung,. Obwohl die meisten Angaben allgemeingültig sind, beziehen sich manche speziell auf die hier untersuchten Systeme, bei denen es sich um wässrige Puffer und biologische Zellen handelt.

Fluoreszenzfarbstoff

Eine bedeutende Rolle kommt dem Farbstoff zu, der später durch das Aufnahmesystem detektiert werden kann und dadurch die Beobachtung der Zielstruktur ermöglicht. Da es um die Lokalisation einzelner Fluorophore geht, ist es von außerordentlicher Wichtigkeit, dass möglichst viele Photonen von jedem einzelnen Molekül gesammelt werden, um diese ausreichend präzise lokalisieren zu können. Entscheidende Parameter sind hier die molekulare Helligkeit sowie die Photostabilität des betrachteten Farbstoffes. Die molekulare Helligkeit ist definiert als das Produkt aus Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient. Die Quantenausbeute wiederum ist ein Maß für die Effizienz der Umwandlung von absorbierter Strahlung in Fluoreszenzphotonen. Sie macht jedoch keine Aussage, wie effektiv die Absorption erfolgt und eignet sich dadurch nur in Kombination mit dem Extinktionskoeffizienten zur Beschreibung der Helligkeit. Dementsprechend sind nur Farbstoffe mit möglichst hohen Werten, Quantenausbeute nahe 90% und Extinktionskoeffizienten von 100.000 L/Mol*cm oder höher, gut geeignet. Eine Voraussetzung für hohe Quantenausbeuten ist die Abwesenheit alternativer Abregungsmechanismen, die es dem Fluorophor erlauben, aus dem angeregten Zustand, strahlungsfrei in den Grundzustand zurückzukehren. So lässt sich die Innere Konversion und Relaxation reduzieren, indem starre Strukturen wie z. B. konjugierte Ringsysteme ohne

bewegliche Seitengruppen eingesetzt werden, die keine Schwingungs- oder Rotationsübergänge zulassen.^[68] Außerdem werden so Isomerisierungsreaktionen wie z.B. cis-trans-Isomerisierung von Doppelbindungen unterbunden, die oft für langlebige Dunkelzustände verantwortlich sind.^[69] Ein weiterer, störender Effekt ist der Übergang in einen Triplet-Zustand, der zwar quantenmechanisch verboten aber trotzdem möglich ist und durch die Anwesenheit schwerer Atome (heavy atom effect) begünstigt wird. Besonders Halogensubstituenten am Chromophor werden gerne eingesetzt, um die elektronische Struktur des konjugierten π -Systems und damit die spektralen Eigenschaften zu modifizieren. Dabei können Brom- und Iod-Substituenten schon einen spürbaren Einfluss auf die Quantenausbeute ausüben.^[70] Ebenso problematisch ist das Auftreten von Fluoreszenzlöschern in hoher Konzentration, da sie unter Umständen Bestandteil des Probenmediums sind und nicht vermieden werden können. So besitzt etwa Wasser eine Absorptionsbande im nahen Infrarotbereich, die durch einen FRET Mechanismus die Quantenausbeute von rot emittierenden Farbstoffen reduziert. Neben der molekularen Helligkeit wird die Anzahl der detektierbaren Photonen noch durch die Zeitspanne begrenzt, für die ein Fluorophor in der Lage ist zu emittieren, bevor er durch irreversible Prozesse in einen dunklen Zustand überführt wird. Dieser auch als Photozerstörung oder Photobleichen bezeichnete Prozess wird durch die Photostabilität als Maß für die durchschnittliche Überlebensdauer quantifiziert. In Ensemblemessungen oft nicht berücksichtigt, da wegen der hohen Konzentration nicht unmittelbar zu beobachten, macht sich dieser Effekt unter Einzelmolekülbedingungen durch das Wegbleichen der Fluorophore bemerkbar.

Die Gesamtmenge an detektierbaren Photonen ergibt sich also aus den drei farbstoffspezifischen Größen der Quantenausbeute, Extinktionskoeffizient und Photostabilität, die für geeignete Farbstoffe einen möglichst hohen Wert annehmen sollten.

Hinsichtlich der Anregungswellenlänge ist die Wahl des Fluorophors auf einen kleinen Bereich des elektromagnetischen Spektrums eingeschränkt, der sich in etwa mit dem sichtbaren Bereich deckt. Zu kleineren Wellenlängen wird dieser Bereich durch den Übergang zur UV-Strahlung begrenzt, in dem die Autofluoreszenz aus aromatischen Systemen nativer Proteine dominiert und die Emission der Farbstoffe überlagert.^[71] Ebenso problematisch ist die hohe Energiemenge der kurzwelligen Strahlung, die erheblichen Schaden in der Zelle anrichten kann und zum schnellen Ausbleichen der Farbstoffe führt. Am anderen Ende des Spektrums liegt der IR-Bereich in dem die Fluoreszenz durch die Eigenabsorption der Wassermoleküle aufgenommen wird und somit die zweite Grenze des nutzbaren Spektralbereichs festlegt.

Weitere hilfreiche Eigenschaften sind ein genügend großer Stokes-Shift, der die Abtrennung des Anregungslichtes von der Emission der Fluorophore vereinfacht, sowie eine schmale Emissionsbande, die das Separieren unterschiedlicher Farbstoffe mit ähnlichen spektralen Eigenschaften erleichtert.

Ligand

Der Ligand fungiert im Wesentlichen als Schalter, der durch Koordination von Metallionen und die dadurch erzeugte Nähe zum Fluorophor die Löschung der Fluoreszenz steuert und somit für den Übergang zwischen dunklem Aus- und hellem An-Zustand verantwortlich ist. Wichtige Größen, die diesen Vorgang charakterisieren sind zum einen die kinetischen Parameter k_{off} und k_{on} , die sich aus der Assoziations- bzw. Dissoziationsgeschwindigkeit des entsprechenden Metallkomplexes ergeben, sowie die Restfluoreszenz, die im gelöschten Zustand noch vorhanden ist. Die Kinetik des Schaltprozesses wirkt sich direkt auf die Dauer der Zustände aus, die wiederum in einem für das Aufnahmesystem geeigneten Bereich liegen muss. Dieser wird begrenzt durch die minimale Belichtungszeit der Kamera, bei der noch Aufnahmen mit genügend hoher Intensität möglich sind. Schnellere Vorgänge können zeitlich nicht aufgelöst werden und führen zu einem zeitlich gemittelten Signal ohne erkennbare Dynamik. Trotzdem sollten die An-Zustände möglichst kurz sein, da die mögliche Markierungsdichte in der Lokalisationsmikroskopie proportional zum Verhältnis von An- zu Aus- Zuständen ist. Je kürzer die An-Zustände sind desto mehr Fluorophore sind gleichzeitig im Aus-Zustand und desto dichter können diese zusammen liegen, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen. Einen ähnlichen Effekt hat die Restfluoreszenz auf die Markierungsdichte. Je heller ein Fluorophor im gelöschten Zustand ist, desto weniger können sich innerhalb eines beugungsbegrenzten Bereichs befinden ohne die Fluoreszenz eines Fluorophors im An-Zustand zu überdecken. Für eine Restfluoreszenz von 10% wären 10 Fluorophore im Aus-Zustand, die sich in einem beugungsbegrenzten Bereich befinden genauso hell wie ein Fluorophor im An-Zustand und eine Unterscheidung somit unmöglich. Diese Eigenschaften werden direkt durch den Liganden bestimmt und sind von essentieller Bedeutung für die Eignung als Fluoreszenzsonde in der Lokalisationsmikroskopie.

Linker-Gruppe

Um die Fluoreszenzsonde zu immobilisieren, bedarf es schließlich noch einer funktionellen Gruppe, die eine Bindungsstelle bereitstellt. Diese sollte selektiv umgesetzt werden können, um andere Bestandteile der Sonde nicht zu beeinflussen. Besonders die koordinierenden Gruppen des Liganden bestehen oft ebenfalls aus reaktiven Einheiten wie Carboxyl- oder Aminogruppen und müssen daher gegebenenfalls geschützt werden oder in ihrer Reaktivität orthogonal zueinander stehen. Des Weiteren sollte die Immobilisierung unter milden Bedingungen in biologischen Systemen durchführbar sein und zu einer stabilen, permanenten Bindung führen.

Gesamtsystem

Das Gesamtsystem sollte neben der Summe der Eigenschaften aus den Einzelkomponenten, die idealerweise erhalten bleiben, noch zusätzliche Bedingungen erfüllen. Dazu gehören eine niedrige Toxizität und Zellpermeabilität für den Einsatz in lebenden Zellen, sowie eine gute Löslichkeit in wässrigen Puffern. Fluoreszenzfarbstoffe, die üblicherweise aus konjugierten Ringsystemen aufgebaut und daher nur bedingt wasserlöslich sind, neigen zur Adsorption an Oberflächen wie der Glaswand des Probengefäßes oder auch an Zellmembran, Vesikeln und Zellorganellen. Ein nicht zu unterschätzendes Problem ist daher die Hintergrundfluoreszenz, die durch eine solche unspezifische Bindung in Zellen entstehen kann. Um z.B. markierte Filamente abzubilden, die sich deutlich vom Hintergrund abheben und kontrastreiche Bilder erzeugen, ist es deshalb notwendig, nicht spezifisch gebundenen Farbstoff möglichst vollständig aus den zu untersuchenden Proben herauswaschen zu können. Vorteilhaft sind in solchen Fällen vor allem geladene Substituenten wie Sulfon- oder Phosphonsäuregruppen, die die Wasserlöslichkeit deutlich erhöhen können. Des Weiteren sollte die Größe des Gesamtsystems so gering wie möglich gehalten werden, da sie letztendlich die erreichbare Auflösung limitiert. Diese kann nie kleiner sein als das zur Visualisierung eingesetzte Markierungsreagenz.

Nur wenige dieser Eigenschaften lassen sich tatsächlich aus den einzelnen Bestandteilen ableiten, sondern können oft nur grob abgeschätzt werden. Daher ist die Synthese vieler Variationen notwendig, um geeignete Kombinationen zu identifizieren und ein modulares System, das den einfachen Austausch von Gruppen unterstützt, vorteilhaft.

3 Synthese und Charakterisierung

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit bestand darin neue Fluoreszenzsonden zu synthetisieren, die sich durch eine chemische Reaktion zwischen zwei Zuständen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität schalten lassen und aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften für die Lokalisationsmikroskopie eignen. Um dieser Anforderung gerecht zu werden, gilt es, eine Vielzahl an Bedingungen zu erfüllen, die im vorangegangenen Abschnitt bereits ausführlich dargelegt wurden.

Zur Umsetzung wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt, angefangen bei der Synthese von Fluoreszenzfarbstoffen, die über zwei unterschiedliche in ihrer Reaktivität orthogonale Gruppen zur selektiven Kopplung verfügen, über bifunktionalisierte Liganden bis hin zu unnatürlichen Aminosäuren, die als Grundgerüst dienen. Die dargestellten Verbindungen wurden in Ensemble-Messungen hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften charakterisiert und in Titrations mit Metallionen auf ihr Schaltvermögen untersucht.

3.1 Synthese Bodipy-Farbstoffe

Bodipy-Farbstoffe (bor-dipyrrromethylen) zeichnen sich durch eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute und Extinktionskoeffizienten mit scharfen Absorptionsbanden aus, die sie in Verbindung mit der meist hohen Photostabilität zu interessanten Farbstoffen für die Einzelmolekülspektroskopie macht.^[72] Dazu kommt eine recht einfache Synthese, die sich in kurzer Zeit umsetzen lässt und zudem mehrere Ansatzpunkte für die Modifikation der Farbstoff-Grundgerüste bietet.

Ausgangsverbindung für die in Abbildung 3.1 gezeigte Synthese von symmetrischen Bodipy Farbstoffe sind substituierte Pyrrole, die durch Kondensation mit einem Aldehyd zu Dipyrrromethan reagieren. Anschließend Oxidation mit einem Chinon wie DDQ und Umsetzung mit Bortrifluorid-Etherat ergibt dann den fertigen Fluoreszenzfarbstoff. Die hierbei gebildeten Zwischenstufen können isoliert und charakterisiert werden. Dabei zeigt sich, dass das durch Oxidation gebildete Dipyrrromethen bereits ein kräftiger

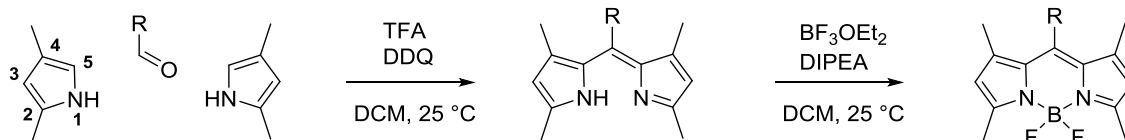


Abbildung 3.1: Reaktionsschema zur Darstellung symmetrischer, an der Methylenbrücke substituierter Bodipy Farbstoffe.

Farbstoff mit hohem Extinktionskoeffizient ist, der die gesamte Reaktionslösung schwarz färbt und erst durch starkes Verdünnen als rot wahrgenommen werden kann. Wie bereits in Kapitel 0 erläutert, führt die fehlende Fixierung der zwei Pyrrolringe zu einer sehr geringen Fluoreszenzquantenausbeute im gelösten Zustand. Erst durch Antrocknen einer dünnen Schicht aus Farbstoff auf einer Oberfläche wie z.B. einer DC-Folie ist eine Fluoreszenz zu beobachten. Die Einführung der BF_2 -Brücke im nächsten Reaktionsschritt führt dann zu einem stark fluoreszierenden Farbstoff.

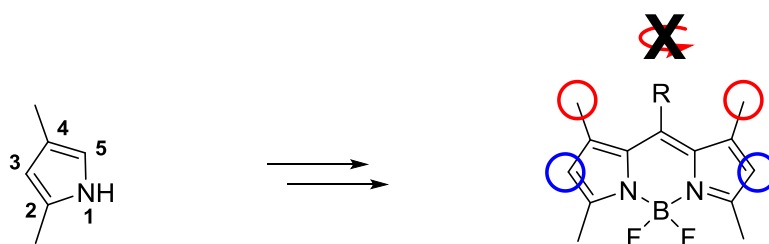


Abbildung 3.2: Die Substituenten der Ausgangsverbindung bestimmen die Eigenschaften der Farbstoffe; Position (3) kann für weitere Funktionalisierung genutzt werden; Position (5) muss für die Kondensationsreaktion unbesetzt sein; Substituenten in Position (4) verhindern die Rotation von R und erhöhen die Quantenausbeute.

Bei der Wahl der Substituenten ist zu beachten, dass an Position 2 und 4 des Pyrrolrings zumindest Methylgruppen angebracht sind, die durch ihre Sterik verhindern, dass der über den Aldehyd eingeführte Rest an der Methylenbrücke frei rotieren kann. Dies führt für gewöhnlich zu einer drastisch reduzierten Quantenausbeute und ist in der Literatur gut beschrieben.^[68] Des Weiteren muss Position 5 unsubstituiert sein, da hier die Kondensation erfolgt. Position 4 ist dagegen variabel und erlaubt das Einbringen unterschiedlicher Substituenten, sowohl vor als auch nach Synthese des Farbstoffes.

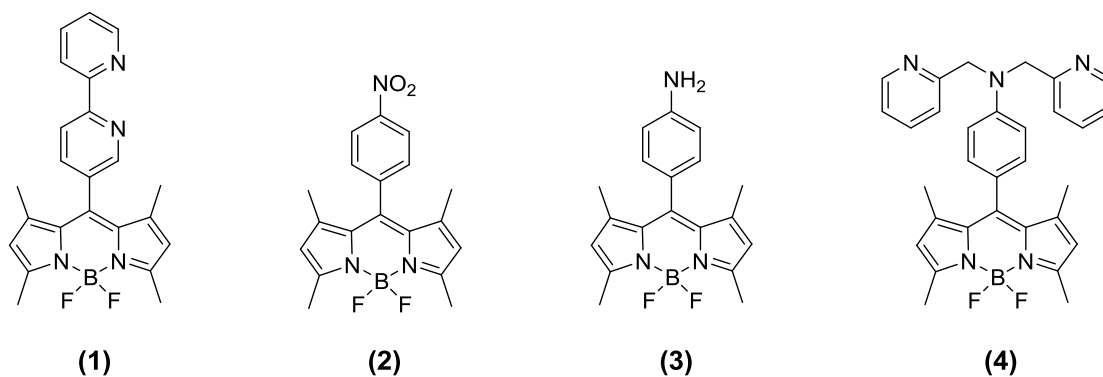


Abbildung 3.3: Strukturformeln der dargestellten Bodipy Farbstoffe.

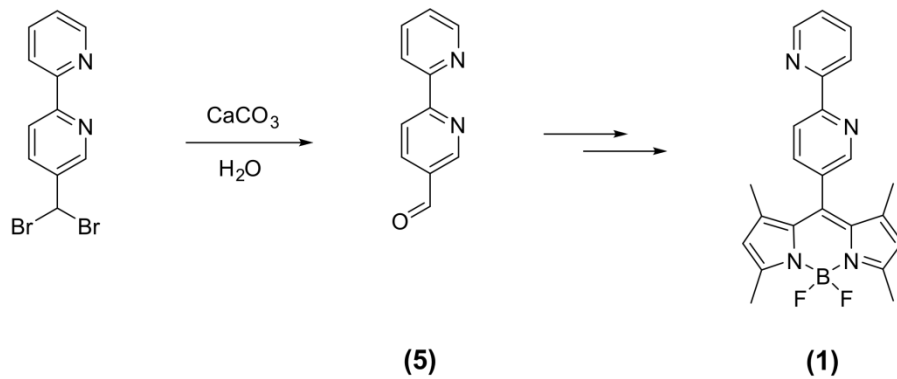
Auf dieser Basis wurden zwei Farbstoffe hergestellt, die über die Methylengruppe an unterschiedliche Liganden gekoppelt sind und dadurch Metallionen binden können, die ihre spektralen Eigenschaften beeinflussen. Abbildung 3.3 zeigt die synthetisierten Verbindungen: BDP-Bpy (1) trägt einen Bipyridin-Liganden, der in der Lage ist, fluoreszenzlöschende Metallionen zu komplexieren. Verbindung BDP-DPA (4) trägt einen Dipicolylamin-Liganden, der selbst als effektiver Fluoreszenzlöcher fungiert und durch die Koordination von redox-inerten Metallionen deaktiviert werden kann. Bei der Synthese von (4) wurden Verbindung (2) und (3) als Zwischenstufen synthetisiert, die ebenfalls Fluoreszenzfarbstoffe darstellen, wobei BDP-APh (3) eine protonierbare Aminophenyl-Gruppe trägt und daher eine pH-sensitive Fluoreszenz aufweist.

BDP-Bpy

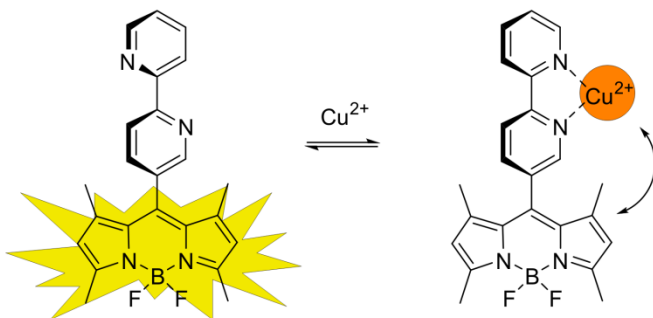
Die Bipyridingruppe ist als zweizähniger Ligand in der Lage, ausreichend stabile Komplexe mit unterschiedlichen Metallionen zu bilden und wurde bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Herten eingesetzt.^[62] Dabei konnte gezeigt werden, dass die kinetischen Parameter der Komplexbildungsreaktion in einem für CHIRON geeigneten Bereich liegen und sie damit als Kandidat für die hier durchgeführten Experimente qualifiziert.

Abbildung 3.4 a) zeigt schematisch die Synthese des dargestellten Bipyridin-Bodipy-Konjugats. Ausgehend von 4-(dibrommethyl)-2,2'-bipyridin wird durch alkalische Hydrolyse der Aldehyd erhalten, der anschließend durch die bereits vorgestellte Syntheseroute zum Farbstoff BDP-Bpy (1) umgesetzt werden kann. Verbindung (1) ist ein Beispiel für eine Turn-Off Sonde, die hier den kürzest möglichen Abstand, genau

a)



b)



c)

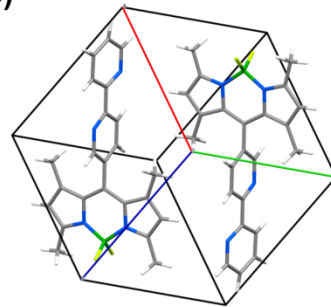


Abbildung 3.4: a) Reaktionsschema zur Darstellung des BDP-Bpy Farbstoffes; b) Schaltvorgang durch reversible Koordination von Cu(II) Ionen; c) Kristallstruktur der Verbindung BDP-Bpy.

eine Kohlenstoff-Einfachbindung, zwischen Ligand und Chromophor aufweist, ohne diesen direkt in das konjugierte System zu integrieren. Abbildung 3.4 b) zeigt das Gleichgewicht aus freier und an Cu(II) koordinierter Sonde, sowie das damit verbundene „Ausschalten“ der Fluoreszenz. Außerdem wird die räumliche Struktur verdeutlicht, bei der die Ebene des Bipyridinliganden, durch die zwei Methylgruppen, senkrecht zum Chromophor fixiert ist und deshalb nicht in Konjugation treten kann. Die räumliche Struktur von BDP-Bpy wurde durch Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt und ist in Abbildung 3.4 c) zu sehen. Im nicht koordinierenden Zustand ist die entgegengesetzte Ausrichtung der Stickstoffatome durch die starke Abstoßung der freien Elektronenpaare begünstigt. Erst mit der Koordination von Metallionen richten sich diese parallel aus und ermöglichen durch Fixierung in räumlicher Nähe eine starke Interaktion zwischen Fluorophor und Fluoreszenzlöscher.

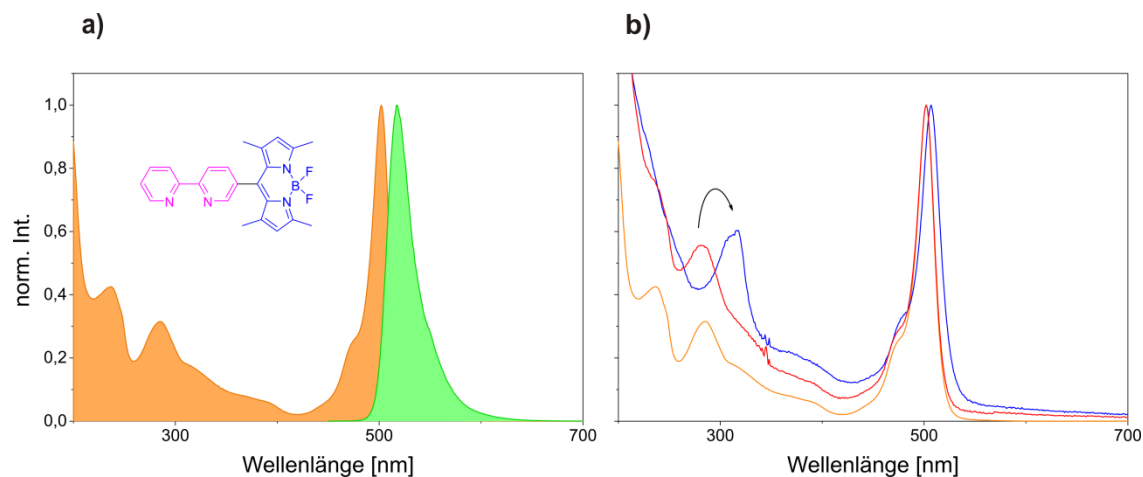


Abbildung 3.5: Spektrale Eigenschaften von BDP-Bpy; **a)** Absorptions- und Emissionsspektrum; **b)** Absorptionsspektrum in Abwesenheit von Cu(II) Ionen (orange), reversible Rotverschiebung der Absorptionsbanden durch Koordination von Cu(II) Ionen (blau), die durch Zugabe von EDTA (rot) wieder aufgehoben wird.

Zur weiteren Charakterisierung der spektralen Eigenschaften wurden Absorptions- und Emissionsspektren aufgenommen sowie das Verhalten gegenüber Metallionen untersucht. Das Absorptionsspektrum in Abbildung 3.5 a) zeigt die für Bodipy-Farbstoffe mit diesem Substitutionsmuster typische Absorption^[73] im blauen Bereich, die für die gelbe Farbe entsprechender Lösungen verantwortlich ist und eine scharfe Bande mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 502 nm zeigt. Außerdem treten zwei weitere Banden mit niedrigerem Extinktionskoeffizienten im UV-Bereich auf, die für Bipyridine typische Maxima bei 236 nm und 285 nm aufweisen.^[74] Das Emissionsspektrum zeigt die intensiv grüne Fluoreszenz der Bodipy-Gruppe mit einem Maximum bei 517 nm. Die Fluoreszenzlöschung wurde durch Titration einer Farbstoff-lösung mit Metallionen durchgeführt und die Änderung der Fluoreszenzintensität aufgenommen. Dabei konnten bereits im Absorptionsspektrum deutliche Auswirkungen der Komplexbildung beobachtet werden. Abbildung 3.5 b) zeigt eine starke Rotverschiebung der Bipyridinbande, die durch die Komplexbildung von Cu(II) Ionen verursacht wird. Dieser Effekt ist in der Literatur bekannt und lässt sich auf die Wechselwirkung zwischen Metall- und Ligand-Orbitalen zurückführen, die sowohl Elektronenverteilung als auch Mesomerie und damit die elektronischen Übergänge beeinflussen. Der induktive Effekt des Metallions wirkt sich auch auf das direkt an den Liganden gebundene chromophore System aus, sodass dessen Absorptionsbande ebenfalls leicht rotverschoben ist.

Der typische Verlauf einer solchen Messung ist anhand der Emissionsspektren in

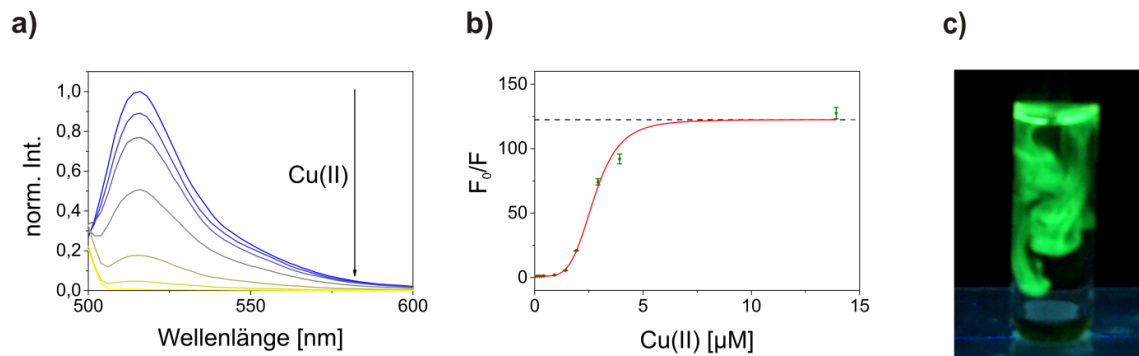


Abbildung 3.6: Titrationsverlauf einer Lösung aus BDP-Bpy mit Cu(II) Ionen; **a)** Fluoreszenzspektrum; **b)** relative Intensitätsabnahmen mit steigender Cu(II) Konzentration; **c)** EDTA Lösung die in eine mit Cu(II) gesättigte BDP-Bpy Lösung diffundiert und dadurch die zuvor gelöschte, grüne Fluoreszenz wiederherstellt.

Abbildung 3.6 dargestellt. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Metallionenkonzentration folgt einem sigmoidalen Verlauf, der einem Plateau bei maximaler Löschung entgegenstrebt. Aufgetragen ist das Verhältnis von Anfangsintensität F_0 ohne Metallionen zur Intensität F im gelöschten Zustand. In diesem Fall wurde eine Kupfersulfat Lösung eingesetzt, mit der ein Verhältnis F_0/F von etwa 125 bzw. eine Restfluoreszenz von 0,8 % erreicht werden konnte. Die Bildung des Komplexes erfolgt instantan, sodass der geänderte Intensitätswert unmittelbar nach Zugabe und Durchmischen anliegt. Die Bipyridingruppe weist, wegen der freien Rotation um die Einfachbindung, in Lösung keine messbare Fluoreszenz auf. Auch die Koordination von Cu(II) Ionen und die damit verbundene Fixierung in planarer Ausrichtung, führt nicht zur Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute, wie sie von anderen Metallionen bekannt ist.^[75] Dies ist ebenfalls auf die fluoreszenzlöschende Wirkung der Cu(II) Ionen zurückzuführen. Fluoreszenzlöschung und Rotverschiebung sind entsprechend dem zugrundeliegenden Komplexbildungsgleichgewicht reversible Prozesse. Zugabe eines starken Komplexbildners wie in diesem Fall EDTA, reduziert die Konzentration an freien Metallionen und führt zur vollständigen Wiederherstellung der Ausgangswerte. Dadurch lässt sich die Reversibilität des beobachteten Prozesses demonstrieren, die eine notwendige Voraussetzung für den späteren Einsatz in der Lokalisationsmikroskopie darstellt.

Der makroskopisch beobachtbare Effekt des Schaltprozesses ist in Abbildung 3.6 c) dargestellt. Hier wurde eine mit Cu(II) gesättigte BDP-Bpy Lösung mit einem Tropfen einer konzentrierten EDTA Lösung versetzt. Der im Aus-Zustand vorliegende Farbstoff wird durch die allmähliche Diffusion des Komplexbildners wieder in den kräftig grün fluoreszierenden Zustand überführt.

BDP-DPA

Der DPA-Ligand koordiniert Metallionen über drei Stickstoffatome, von denen eines zu einer Phenylamino-Gruppe gehört. Die Besonderheit liegt hier in der fluoreszenzlöschenden Wirkung dieser Gruppe, sodass Farbstoffkonjugate nur noch eine sehr geringe Restfluoreszenz aufweisen.^[76] Die Komplexbildung von Metallionen führt dann durch Wechselwirkung der beteiligten Orbitale zu einer Deaktivierung dieses Effektes. Durch die „Turn-On“-Charakteristik sind diese Verbindungen interessante Schaltelemente, die das Anwendungsspektrum der Fluoreszenzsonden erweitern.

Bei der Synthese des Dipycolylamin-substituierten Farbstoffes wurde, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, zunächst eine Nitro-Phenylgruppe (2) in den Farbstoff eingebaut, die dann unter entsprechenden Bedingungen selektiv zum Amin (3) reduziert werden kann. Beim Aufbau des Liganden durch Substitution mit einem halogenierten Picolin zeigte sich, dass die Reaktivität des Amins stark vermindert ist und keine Umsetzung erfolgte oder die stark basischen Reaktionsbedingungen zur Zerstörung des Chromophors führten. Verantwortlich sind hier möglicherweise der Elektronenabzug des aromatischen Systems sowie sterische Hinderung durch das Farbstoffgerüst. Durch

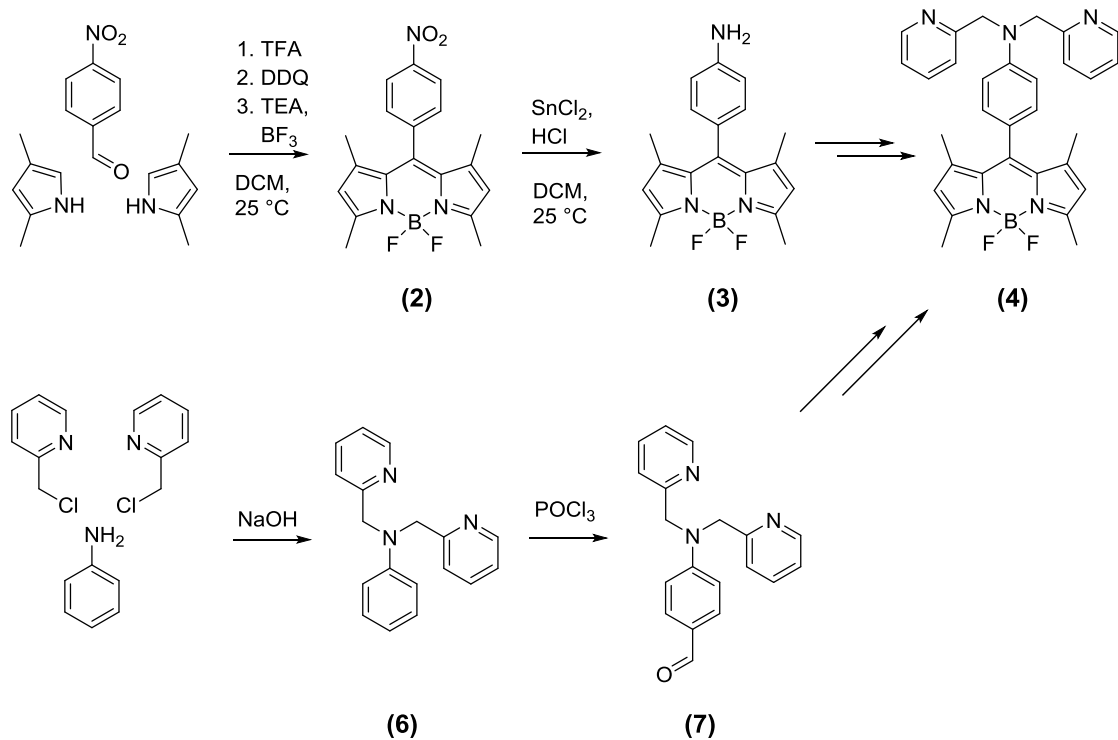


Abbildung 3.7: Reaktionsschema zur Synthese des DPA substituierten Bodipy Farbstoffes durch zwei unterschiedliche Syntheserouten.

Variation der Reaktionsbedingungen konnte letztendlich eine geeignete Methode gefunden werden, mit der die Substitution in Anwesenheit eines Protonenschwamms durchführbar ist. Parallel wurde eine alternative Syntheseroute entwickelt, bei der zuerst der Ligand aufgebaut wird, der dann nach Formylierung direkt in den Farbstoff eingebaut werden kann. Auch diese Vorgehensweise führte zum gewünschten Produkt (4).

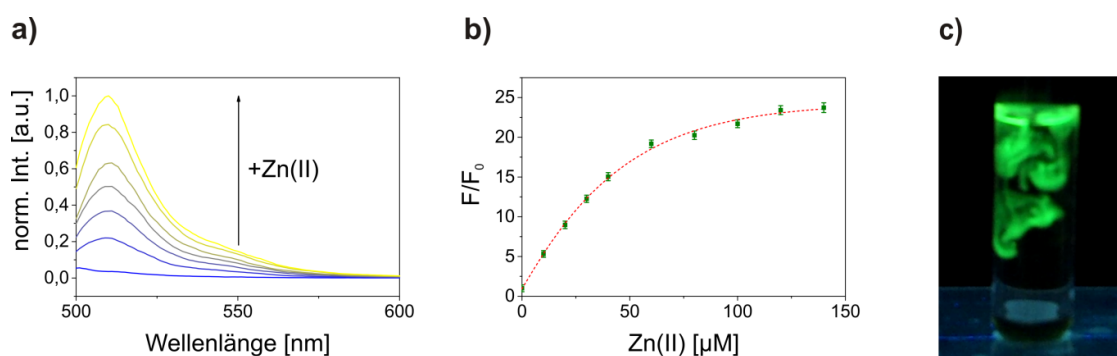


Abbildung 3.8: Einfluss von Zn(II) auf die Fluoreszenz von BDP-DPA; **a)** Fluoreszenzspektrum und **b)** relative Intensitätszunahme mit steigender Zn(II) Konzentration; **c)** Zn(II) Lösung die in eine BDP-DPA Lösung diffundiert und dabei die charakteristisch grüne Fluoreszenz einschaltet.

Wie erwartet zeigt die Kombination aus DPA-Ligand und Bodipy Farbstoff eine sehr geringe Fluoreszenz, die in Anwesenheit von Redox-inerten Metallionen gesteigert werden kann. In Abbildung 3.8 ist der Verlauf einer Titration mit Zn(II) Ionen gezeigt. In a) ist das Fluoreszenzspektrum mit Emissionsmaximum bei 512 nm zu sehen. Die Fluoreszenzintensität zeigt eine sigmoideal verlaufende Abhängigkeit von der Zn(II) Ionen Konzentration, die bei einem Verhältnis F/F_0 von 24 entgegenstrebt. Das entspricht einer Restfluoreszenz von 4,2 % im gelöschten Zustand. Auch in diesem System lässt sich die Reversibilität durch Zugabe eines starken Komplexbildners und Wiederherstellung des Ausgangszustands demonstrieren. In Abbildung 3.8 c) ist die Aktivierung der Fluoreszenz durch Zutropfen einer Zn(II) Lösung gezeigt. Die im nativen Zustand fast vollständig gelöschte Fluoreszenz wird durch die langsame Diffusion der Metallionen in einen stark grün emittierenden Zustand überführt. Prinzipiell sollten auch andere redox-inerte Metallionen diesen Effekt erzeugen. Vergleichbare Titrations mit Ca(II) und Mg(II) Ionen zeigten jedoch keinen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten der Sonde. Hier muss berücksichtigt werden, dass diese aufgrund der unbesetzten d-Orbitale und dadurch fehlender Stabilisierung nur eine

schwache Tendenz zur Komplexbildung zeigen und nach dem HSAB Prinzip bevorzugt von Sauerstoff-Liganden koordiniert werden. Für eine effektive Komplexbildung sind daher Chelatliganden mit einer größeren Anzahl an geeigneten Bindungsstellen notwendig. Dadurch erhält der DPA-Ligand eine gewisse Spezifität gegenüber den Zn(II) Ionen.

Funktionalisierung

Nachdem in Ensemble-Messungen gezeigt wurde, dass die Fluoreszenz der synthetisierten Farbstoffe durch geeignete Metallionen gesteuert werden kann, wurde versucht eine weitere funktionelle Gruppe einzuführen, die für eine Immobilisierung genutzt werden kann. Hierfür eignen sich Position 2 und 6 des Indacen-Grundgerüsts, die durch Halogenierungsmittel substituiert werden können. Die so erhaltenen Halogenderivate können anschließend durch Kreuzkupplungen weiter funktionalisiert werden.

Abbildung 3.9 zeigt die Umsetzung des zuvor synthetisierten Farbstoffes BDP-Bpy mit Iodmonochlorid zur entsprechenden Iodverbindung (**8**). Diese ist ebenfalls ein intensiv gelber Farbstoff, der jedoch aufgrund des schon zuvor beschriebenen heavy-atom-Effektes nur noch eine schwache Fluoreszenz aufweist. Die chemische Struktur der Verbindung konnte durch Röntgenkristallstrukturanalyse nachgewiesen werden. Zur weiteren Funktionalisierung wurden dann drei unterschiedliche Varianten von Pd-katalysierten Kreuzkupplungsreaktionen durchgeführt. Wie in Abbildung 3.9 gezeigt, wurden Heck-, Suzuki- und Sonogashira-Reaktionen mit jeweils kompatiblen Kupplungspartner getestet, die auch nach ausführlicher Variation der eingesetzten Reaktionsbedingungen nicht zur gesuchten Zielverbindung führten.

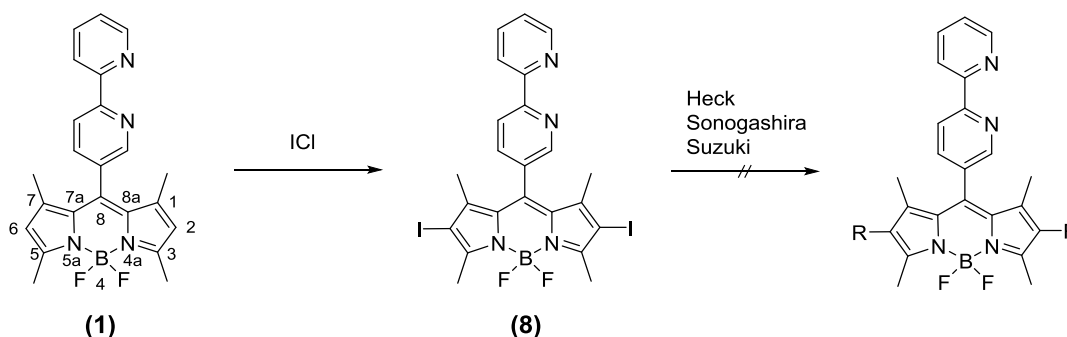


Abbildung 3.9: Reaktionsschema zur Funktionalisierung der Bodipy-Farbstoffe durch unterschiedliche Kreuzkupplungsreaktionen.

3.2 Synthese Bispidin-Liganden

Eine andere Möglichkeit alle benötigten Komponenten zu verbinden ist ein bifunktionaler Ligand, an den Fluorophor und Linker gekoppelt werden können. Hierzu wurde in Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. Peter Comba an der Synthese eines Bispidin-Liganden gearbeitet, der diese Bedingung erfüllt. Abbildung 3.10 zeigt die gängige Syntheseroute, bestehend aus zwei aufeinander folgenden Mannich-Reaktionen, durch die unterschiedlich substituierte Amine in das Molekülgerüst eingeführt werden können.^[77] Durch geeignete Wahl dieser Substituenten ist es möglich, zwei zueinander in ihrer Reaktivität orthogonale Gruppen anzubringen, die dann selektiv für die Kopplung mit Fluorophor und Linker genutzt werden können.

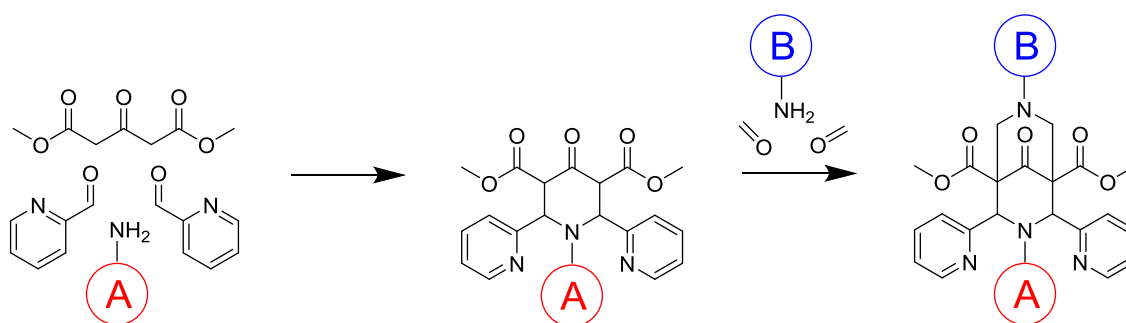


Abbildung 3.10: Allgemeine Syntheseroute zur Darstellung von Bispidinen, die den gezielten Einbau zweier unterschiedlicher, funktioneller Gruppen erlaubt.

Zunächst wurde an Farbstoffkonjugaten, die aus bereits vorhanden Bispidinen mit nur einer funktionellen Gruppe hergestellt wurden, gezeigt, dass die Fluoreszenz durch die vorliegende Konzentration an Cu(II) Ionen gesteuert werden kann. Die einfach funktionalisierten Bispidine wurden von Dr. Michael Morgen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Comba bereitgestellt und durch einfache Peptidchemie an den Farbstoff gekoppelt. Die Strukturformel eines Bispidinkonjugats mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto532 und der Verlauf einer Titration mit Cu(II) Ionen werden in Abbildung 3.11 gezeigt. Der Farbverlauf von blau nach gelb verdeutlicht die abnehmende Fluoreszenzintensität bei zunehmender Kupferkonzentration und belegt die Eignung des Systems als schaltbare Fluoreszenzsonde.

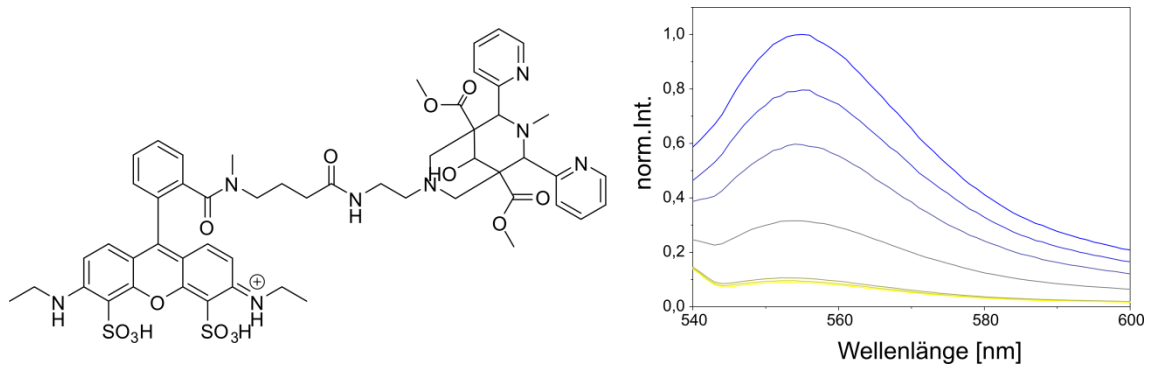


Abbildung 3.11: Strukturformel eines Atto532-Bispidinkonjugates und der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz bei einer Titration mit Cu(II) Ionen.

Da für eine funktionsfähige Sonde jedoch eine weitere funktionelle Gruppe zur Immobilisierung erforderlich ist, wurde an der Herstellung weiterer Derivate gearbeitet. Hierzu konnten unterschiedlich substituierte Amine in einer ersten Mannich-Reaktion erfolgreich zu den Verbindungen (12) und (13) in Abbildung 3.12 umgesetzt werden. Die zweite Mannich-Reaktion benötigt wegen der reduzierten Reaktivität der Carbonylgruppe und der anspruchsvolleren Sterik deutlich härtere Reaktionsbedingungen. Dies und die fehlende Stabilität der Endprodukte, bedingt durch mögliche Retro-Mannich-Reaktionen, machen sowohl die Synthese als auch die Aufreinigung zu einem anspruchsvollen und mitunter langwierigen Vorhaben, das auch nach mehreren Ansätzen nicht zum gesuchten Produkt (14) führte und daher eingestellt wurde. Neben den aufgezählten Schwierigkeiten wurde diese Entscheidung durch das Bestehen alternativer Strategien und besonders durch den schnellen Fortschritt in der Synthese der unnatürlichen Aminosäure, die im nächsten Kapitel vorgestellt wird, begründet.

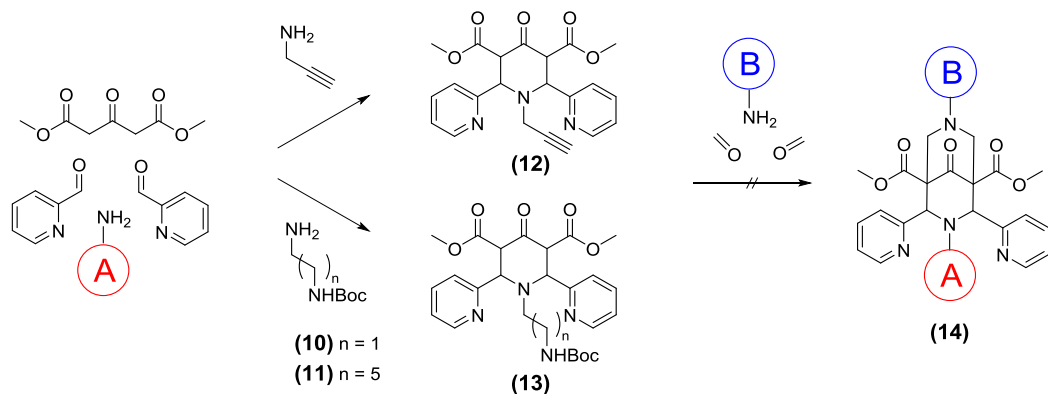


Abbildung 3.12: Reaktionsschema zur Synthese doppelt funktionalisierter Bispidine. Verbindung (12) und (13) konnten isoliert werden; (14) wurde nicht erhalten.

3.3 Synthese Bpy-Ala

Modulares System für Fluoreszenzsonden

Als weitere Variante wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thorben Cordes und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerard Roelfes am Stratingh Institut für Chemie der Universität Groningen, die unnatürliche Aminosäure Bpy-Ala synthetisiert. In Abbildung 3.13 ist die sechsstufige Syntheseroute dargestellt.^[78] Sie beginnt mit der Lithiierung von Brompyridin und führt durch Negishi-Kupplung an ein weiteres substituiertes Halogenpyridin zu einem unsymmetrisch substituierten Bipyridin. Anschließende Reduktion, Substitution mittels Appel-Reaktion und Kondensation mit einem Malonsäurederivat, gefolgt von Decarboxylierung ergeben dann die unnatürliche Aminosäure Bpy-Ala. Der zweizählige Bipyridinligand ist über die Methylengruppe an ein Alanin gebunden und mit seinem geringen Molekulgewicht von 243 g/Mol in der Lage, alle benötigten Funktionalitäten zu vereinen. Die zwei reaktiven Gruppen der Aminosäure eignen sich für einfache Kopplungsreaktionen und stellen somit die Basis für ein modulares System bereit, in dem die gewünschte Kombination aus Fluorophor und Linker frei wählbar ist.

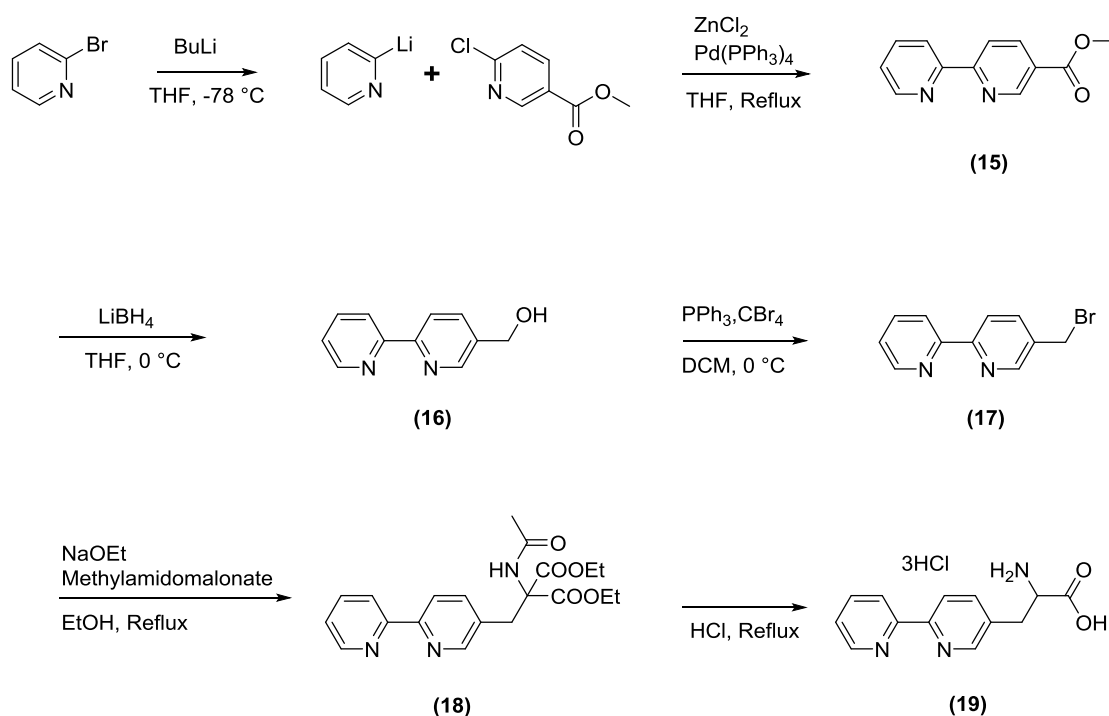


Abbildung 3.13: Reaktionsschema zur Synthese der unnatürlichen Aminosäure Bpy-Ala.

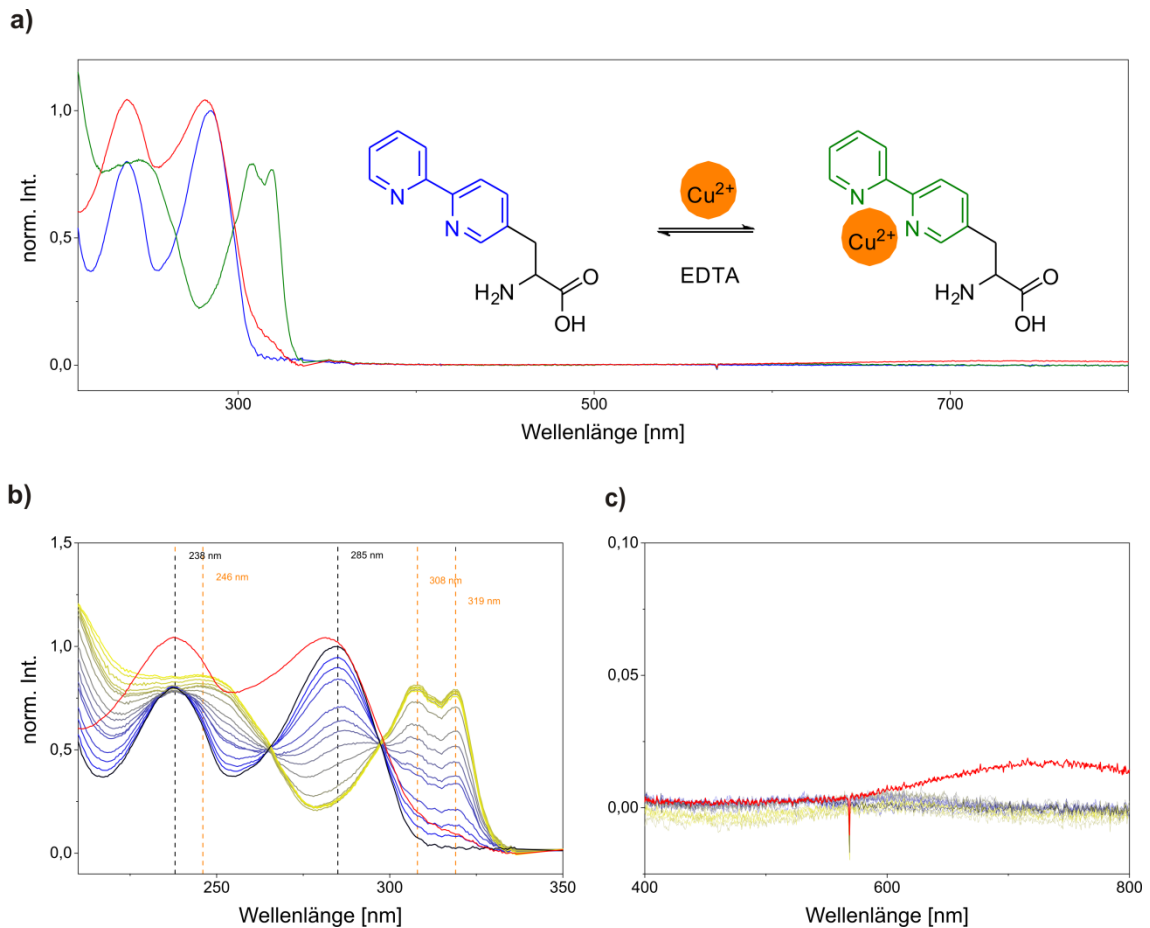


Abbildung 3.14: Spektrale Eigenschaften der unnatürlichen Aminosäure Bpy-Ala; **a)** das Absorptionsspektrum zeigt die beiden charakteristischen Bipyridinbanden (blau) und die reversible Rotverschiebung in Anwesenheit von Cu(II) Ionen (grün) bzw. EDTA (rot); Verlauf einer Titration mit Cu(II) Ionen (blau nach gelb) und abschließender Zugabe von EDTA (rot) im **b)** UV-Bereich und **c)** sichtbaren Bereich, vergrößert dargestellt.

Abbildung 3.14 zeigt das Absorptionsspektrum von Bpy-Ala (blau) mit den für Bipyridine üblichen Banden bei 238 nm und 285 nm. Wie bereits für Verbindung Bpy-BDP erläutert, verursacht die Koordination von Metallionen eine Rotverschiebung, die durch Zugabe eines starken Komplexbildners wieder aufgehoben wird. Für die hier gezeigte Komplexierung von Cu(II) Ionen (grün) ergeben sich Absorptionsmaxima bei 246 nm und 308 nm, die durch Zugabe von EDTA (rot) wieder in ihre Ausgangswerte überführt werden und somit die Reversibilität des Vorgangs demonstrieren. Die Detailansicht zeigt den Verlauf der Rotverschiebung während einer Titration, verdeutlicht durch den farblichen Übergang von blau nach gelb. Dabei entstehen zwei isosbestische Punkte, die für eine direkte Umwandlung ohne Zwischenstufen

charakteristisch sind. Während im UV-Bereich die Komplexierungsreaktion beobachtet werden kann, ist im sichtbaren Bereich auch bei starker Vergrößerung keine Absorptionsbande zu erkennen. Dies gilt sowohl für den freien Liganden als auch für den gebildeten Kupferkomplex. Erst durch Zugabe von EDTA wird die ursprüngliche Absorption regeneriert sowie eine neue extrem breite Bande im roten Bereich des Spektrums bei 700 nm, durch Bildung des Cu(II)-EDTA-Komplexes, erzeugt.

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Farbstoff-Ligand-Konjugaten lassen sich hier einige nützliche Rückschlüsse auf den Lösmechanismus ziehen. Da der Bereich des sichtbaren Spektrums nicht durch die Absorptionsbande des Farbstoffes verdeckt wird, kann eindeutig bestimmt werden, dass die Bpy-Ala-Komponente lediglich im UV-Bereich absorbiert. Dadurch kann FRET als Lösmechanismus ausgeschlossen werden, da dieser nur bei überlappenden Absorptions- und Emissionsspektren auftreten kann, die hier nicht vorliegen. Das unterstützt die bereits publizierte Annahme, dass es sich um einen PET-Mechanismus handelt, die bei vergleichbaren Verbindungen FRET aufgrund der Försterradien ausschließt.^[79] Gerade bei Xanthenfarbstoffen sind photoinduzierte Elektronentransfermechanismen bekannt und dokumentiert.^[80] Dies gilt insbesondere auch in Kombination mit Übergangsmetallkationen, die als potente Akzeptoren dienen.

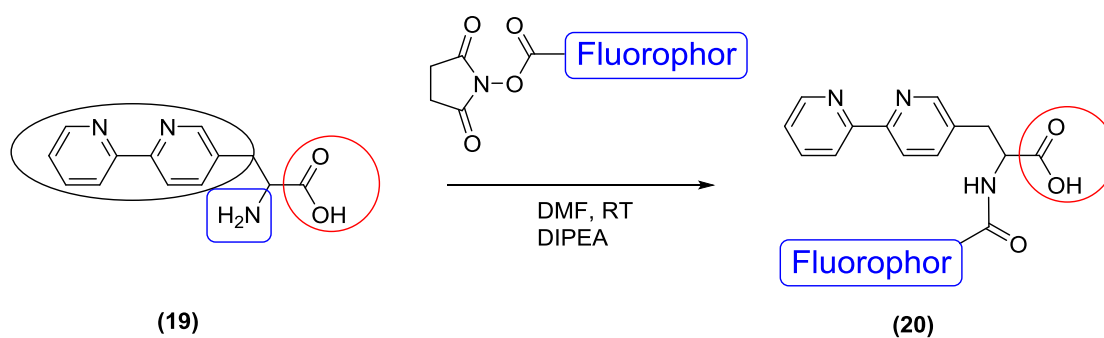



Abbildung 3.15: Reaktionsschema zur Synthese der Bpy-Ala-Farbstoffkonjugate; Kopplung der Farbstoff-Aktivester an die Aminogruppe unter Ausbildung einer stabilen Peptidbindung.

Die weitere Funktionalisierung des Bpy-Ala Grundgerüsts erfolgt zunächst durch Umsetzung des entsprechenden Farbstoff-NHS-Esters mit der Aminogruppe der Aminocarbonsäure unter basischen Bedingungen und ist in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt.

Tabelle 3.1: Auflistung der zur Kopplung eingesetzten Farbstoffe und Vermerk für erfolgreiche Kopplung.

	Farbstoff	λ_{Em} [nm]	Kopplung
	Atto488	500	+
	Atto532	552	+
	Atto542	562	+
	Cy3B	571	+
	Atto550	576	+
	TMR	576	+
	Atto565	590	+
	Atto590	622	+
	Atto610	633	-
	AZ481	635	+
	Atto633	651	+
	STAR635	654	-
	Atto647N	664	-
	Alexa647	665	-
	AZ474	672	+
	Atto655	680	-
	Atto665	680	+
	AttoOxa12	681	-
	Atto680	698	+
	Cy5.5	707	-

Das so erhaltene Farbstoffkonjugat lässt sich durch die charakteristischen Absorptionsbanden von Farbstoff und Ligand identifizieren und säulenchromatographisch mittels HPLC isolieren. Auf diesem Weg wurde eine Reihe von kupfersensitiven Verbindungen synthetisiert, die das gesamte sichtbare Spektrum und unterschiedliche Farbstofftypen, von Rhodaminen über Carbo- und Silizium-Derivate zu Oxazinen und Cyaninen abdeckt. Eine Auflistung der eingesetzten Farbstoffe ist in Tabelle 3.1 abgebildet.

Dabei brachten die vermeintlich einfache Synthese und Aufreinigung unerwartet viele Komplikationen mit sich, sodass oft nur geringe oder in manchen Fällen keine Ausbeuten erhalten werden konnten. Ein wesentliches Problem bestand darin, das gewünschte Produkt zu isolieren. Dabei ist die saubere Abtrennung der Nebenprodukte von entscheidender Bedeutung, da Reste des hydrolysierten Farbstoffes die Ergebnisse verfälschen und bei der weiteren Umsetzung stören würden. Durch die überschaubare Anzahl an Reaktionspartnern sind für die Reaktion des Farbstoff-NHS-Esters lediglich drei mögliche Ausgänge denkbar. Dazu gehören die Hydrolyse sowie Erhaltung des Aktivesters und natürlich das gesuchte Kopplungsprodukt mit Bpy-Ala. Das entspräche drei Fraktionen mit charakteristischer Farbstoffbande. Diese Anzahl verdoppelt sich noch, wenn der eingesetzte Farbstoff als Isomergemisch vorliegt, wie es oft bei Rhodaminderivaten der Fall ist. Erschwerend kommt hinzu, dass die einzelnen Fraktionen oft zu einem ausgeprägten Tailing neigen und daher ineinander laufen. Das macht es notwendig, die Säulenbedingungen so lange zu variieren, bis eine ausreichende Trennung erzielt wird. Neben dem hierdurch entstehenden enormen Zeitaufwand, ist vor allem auch die geringe Produktmenge, als Resultat kleiner Ansatzgrößen in Kombination mit schlechten Ausbeuten, ein limitierender Faktor.

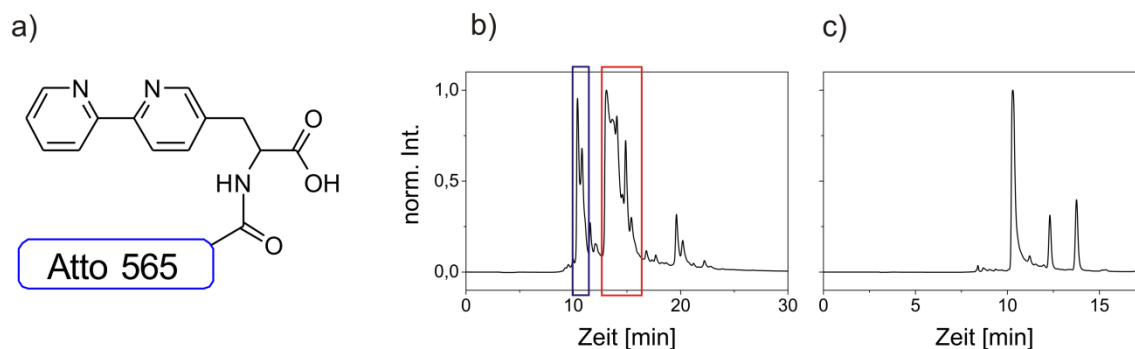


Abbildung 3.16: Aufreinigung (HPLC) des Kopplungsproduktes am Beispiel von Atto565-Bpy-Ala; **a)** Strukturformel der Verbindung; Chromatogramm (Absorption bei 560 nm) eines Aufreinigungslaufs unter **b)** Standardbedingungen und **c)** auf das Produkt abgestimmte Bedingungen (siehe Methodenteil, 7.2).

Beim Laufverhalten der einzelnen Fraktionen konnten einige Charakteristika beobachtet werden, die eine Zuordnung vereinfachen aber nicht immer zutreffend sind und daher nicht als alleiniges Identifikationsmerkmal herangezogen werden können. So ist etwa das Hydrolyseprodukt, durch die freie Carbonsäure, meist hydrophiler und

zeigt eine kürzere Retentionszeit als der NHS-Ester. Das Kopplungsprodukt weist dagegen ein gesteigertes Tailing auf, wodurch die Identifikation oft vereinfacht, die Abtrennung jedoch deutlich anspruchsvoller wird. Dies wird in Abbildung 3.16 am Beispiel von Atto565-Bpy-Ala verdeutlicht, dessen Chromatogramm im ersten Aufreinigungslauf unter Standardbedingungen eine Anhäufung von nicht trennbaren Fraktionen zeigt. Die blau markierte, schneller eluierende Fraktion konnte dem Hydrolyseprodukt des Farbstoffes zugeordnet werden, während die rot markierte Fraktion aufgefangen und erneut unter angepassten Laufbedingungen aufgetrennt wurde. Das nun erhaltene Chromatogramm zeigt drei deutlich voneinander abgetrennte Fraktionen, von denen die erste dem gesuchten Kopplungsprodukt zugeordnet werden konnte.

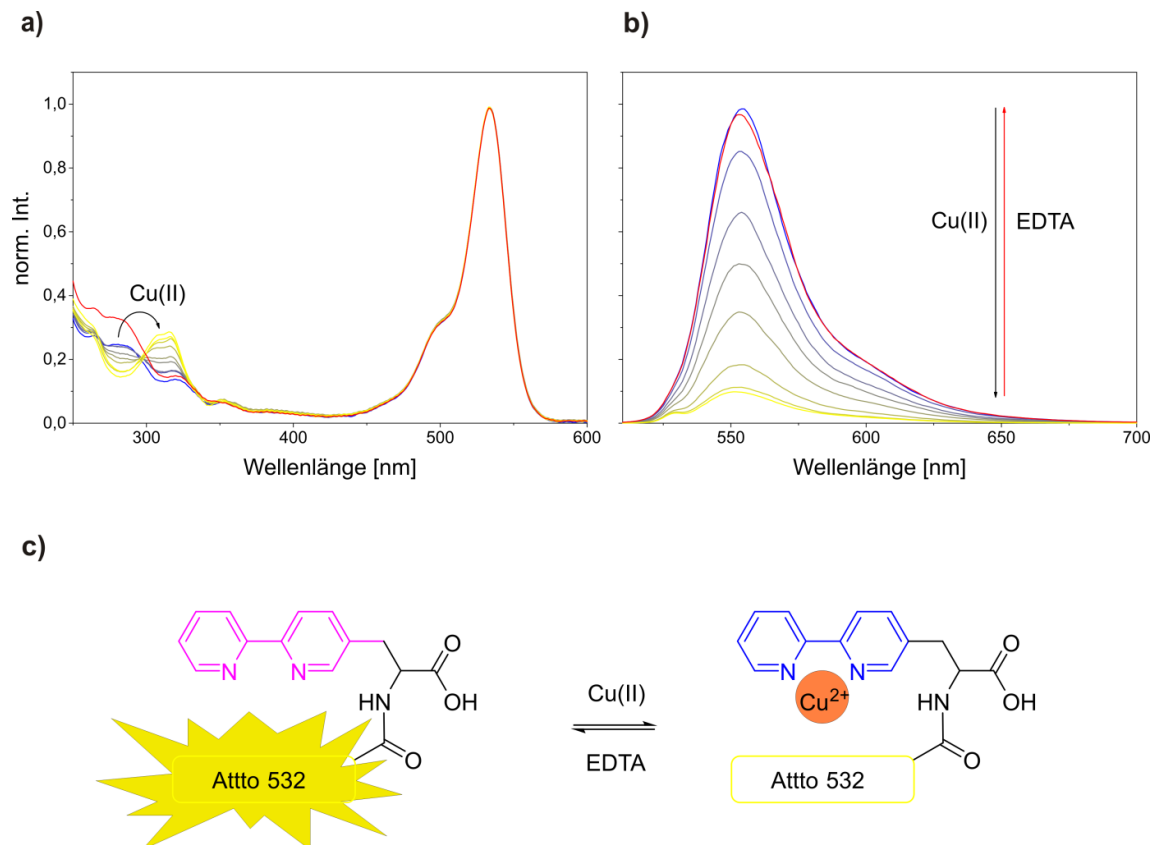


Abbildung 3.17: Spektrale Eigenschaften von Atto532-Bpy-Ala im Verlauf einer Titration mit Cu(II) Ionen; **a)** Absorptionsspektrum mit Rotverschiebung der Bipyridinbande; **b)** Emissionsspektrum mit abnehmender Fluoreszenzintensität; **c)** schematische Darstellung der Komplexbildungsreaktion.

Die dargestellten Farbstoff-Bpy-Ala Konjugate wurden durch Titration mit Cu(II) Ionen auf ihr Lösungsverhalten untersucht und die spektralen Eigenschaften charakterisiert. Abbildung 3.17 zeigt am Beispiel der Verbindung Atto532-Bpy-Ala den typischen Verlauf einer Titration. Im Absorptionsspektrum sind sowohl die Farbstoffbande mit konstant bleibender Extinktion bei 532 nm, als auch die Bpy-Bande bei 285 nm, die eine kupferabhängige Rotverschiebung erfährt, zu erkennen. Im Fluoreszenzspektrum ist die Emission des Farbstoffes mit einem Maximum bei 552 nm zu sehen, deren Intensität mit steigender Kupferkonzentration abnimmt. Sowohl Rotverschiebung als auch Fluoreszenzlöschung sind reversible Prozesse und können durch Zugabe von EDTA wieder in die Ausgangslage überführt werden.

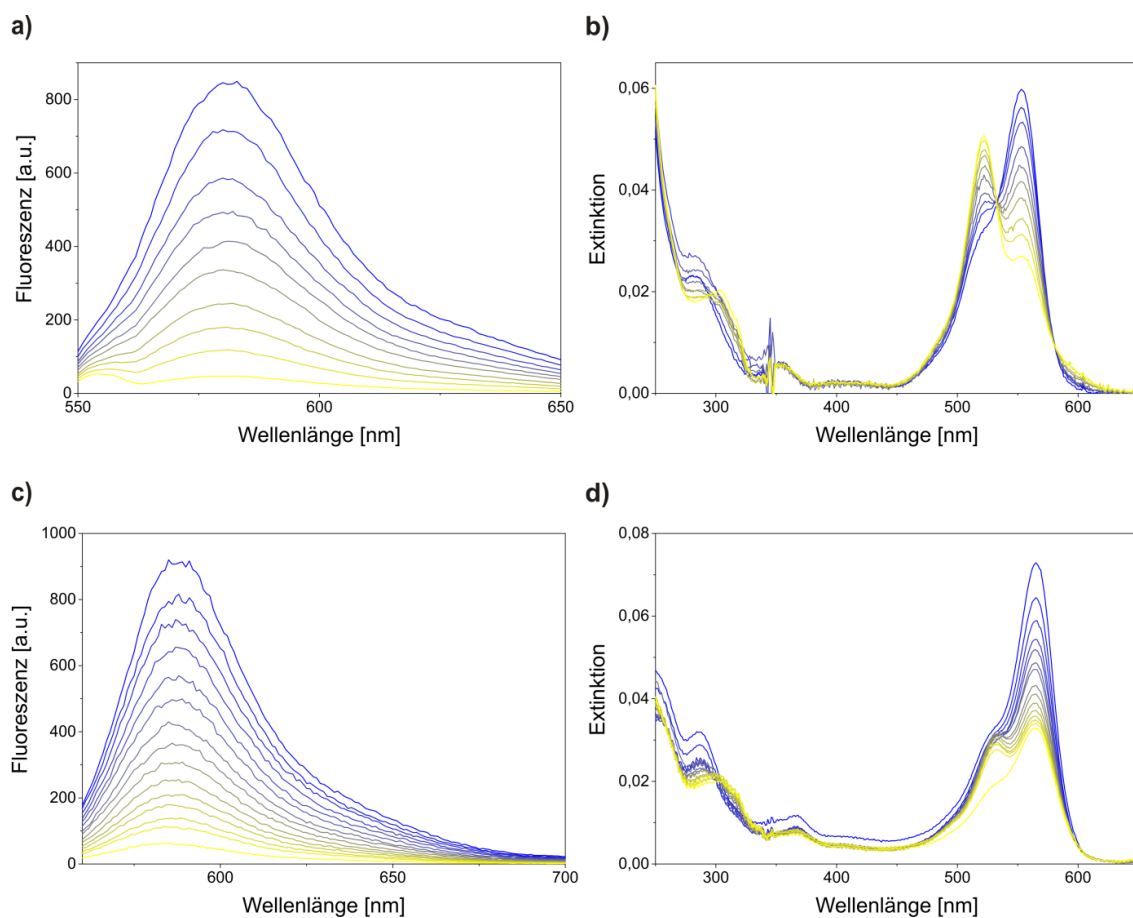


Abbildung 3.18: Verlauf einer Titration mit Cu(II) Ionen; **a)** Emissions- und **b)** Absorptionsspektren von TMR; **c)** Emissions- und **d)** Absorptionsspektren von Atto565; Die Emissionsspektren zeigen jeweils die erwartete Abhängigkeit von der Kupferkonzentration, wohingegen die Absorption eine deutliche Abweichung vom idealen Verhalten zeigt und auf zusätzliche Effekte hinweist.

Neben den bereits beschriebenen Schwierigkeiten durch die Synthese, konnten auch bei den erfolgreich isolierten Kopplungsprodukten nicht immer die gewünschten Eigenschaften nachgewiesen werden. Abbildung 3.18 zeigt beispielhaft das Verhalten zweier Farbstoff-Bpy-Ala Konjugate, deren Reaktion auf Cu(II) Ionen stark vom idealen Verlauf einer Titration abweichen. Während die Fluoreszenzintensität (a und c) zunächst die gewohnte Abnahme zeigt, fällt beim Betrachten der Absorptionsspektren (b und d) ein unerwarteter Verlauf auf, der durch den farblichen Übergang von blau nach gelb hervorgehoben wird. Im Falle des TMR-Derivates (b) erfolgt eine Verschiebung des Hauptmaximums über einen isosbestischen Punkt auf die ursprüngliche Lage des Nebenmaximums, das für gewöhnlich nur durch eine flache Schulter zum Absorptionsspektrum beiträgt. Die Ursache dieses Effektes könnte in der Ausbildung von H-Aggregaten liegen, die eine entsprechende spektrale Verschiebung zeigen und in kleinen Mengen neben der monomeren Form existieren.^[81] Die stärkste Ausprägung tritt bei einem Cu(II)-zu-Ligand-Verhältnis von 2:1 auf und legt daher die Koordination von zwei Ligandmolekülen nahe. Diese Dimerisierung begünstigt eine Aggregatbildung über π -Stacking durch die Fixierung der beiden Farbstoffmoleküle in räumlicher Nähe zueinander. In diesem Fall scheint die Aggregatbildung der dominierende Effekt zu sein, da Stöchiometrie und der Verlauf über den isosbestischen Punkt die ausschließliche Bildung des Dimers zeigen. Ein anderer Effekt wird im Absorptionsspektrum des Atto565-Konjugates deutlich. Hier tritt eine drastische Verminderung der Extinktion auf, die auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen ist. Eine Möglichkeit wäre die Beeinflussung des Extinktionskoeffizienten durch die Nähe des Metallions, wodurch die tatsächliche Farbstoffkonzentration konstant bleibt. Alternativ ist auch die Bildung von Aggregaten oder Kolloiden denkbar, sowie die Ausfällung oder Adsorption an Oberflächen. Die dadurch verminderte Farbstoffkonzentration ist eine ebenfalls berechnete Annahme, besonders im Hinblick auf die bereits mäßige Löslichkeit der Farbstoffe und den Verlust zweier polarer Gruppen bei der Kopplungsreaktion. Dieser Effekt tritt, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, bei fast allen Farbstoffkonjugaten auf und konnte auch durch unterschiedliche Puffer, Lösungsmittelgemische, Variation der Ionenstärke und Passivierung der Küvettenoberfläche nicht verhindert werden.^[82] Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die beobachteten Intensitätsabnahmen in der Fluoreszenz nicht ausschließlich der Koordination des Fluoreszenzlösers Cu(II) zugeschrieben werden kann, sondern vielmehr eine Kombination unterschiedlicher Effekte ist, die nicht voneinander getrennt werden können. Daher ist es auch nicht möglich, quantitative Aussagen über den Lösungsprozess zu treffen, die vorliegenden Daten lassen lediglich die qualitative Aussage zu, dass die Cu(II) Ionen einen Beitrag zur Fluoreszenzlöschung leisten, der durch die

Verschiebung der Liganden Absorptionsbande und teilweise Wiederherstellung der Fluoreszenz mit dem Komplexbildner EDTA gezeigt werden kann. Die einzige Ausnahme bildet das Atto532-Konjugat (Abbildung 3.17), das wegen seiner zusätzlichen Sulfonsäuregruppen vermutlich eine ausreichend hohe Löslichkeit in wässrigen Medien besitzt und im Verlauf einer Titration keine Veränderung der Absorption aufweist. Auch bei Farbstoffen mit konstanter oder nur leicht schwankender Extinktion konnte das Fluoreszenzverhalten nicht durch die Stern-Volmer-Gleichung für statische Fluoreszenzlöschung beschrieben werden. Vermutlich spielen hier weitere Effekte wie Photodissoziation, Konformationsänderung und Ausbildung von Zwischenstufen eine Rolle, die zur Abweichung vom idealen Verlauf einer Komplexierung führen und die Bestimmung der Komplexbildungskonstanten nicht zulassen.

Tabelle 3.2: Liste der Farbstoffkonjugate mit zugehöriger Restfluoreszenz

Farbstoff-Bpy-Ala	Restfluoreszenz [%]
Atto488	39 ± 15
Atto532	11 ± 3
Atto542	38 ± 16
Atto550	41 ± 17
TMR	45 ± 17
Atto565	46 ± 16
Cy3B	22 ± 14
AZ474	36 ± 14
Atto633	29 ± 13
AZ481	33 ± 14
Atto665	37 ± 15
Cy5.5	36 ± 16

Ein weiteres Problem ist die vorhandene Restfluoreszenz, die bei allen untersuchten Fluoreszenzsonden bei einem Wert von über 10% der Ausgangsintensität liegt. Unabhängig von Farbstofftyp und spektralem Bereich der Emission scheint dies eine Grenze zu sein, die mit dem vorliegenden System nicht überwunden werden kann. Allerdings ist hier noch zu erwähnen, dass trotz der intensiven Bemühungen bei der

Aufreinigung, noch vorhandene Reste an nicht gekoppeltem Farbstoff gerade diese Werte beeinflussen können. In Betracht auf den Einsatz in der Lokalisationsmikroskopie stellt dieser hohe Wert eine Limitierung der Markierungsdichte dar und wirkt sich damit auch auf die erreichbare Auflösung aus. Eine Auflistung der untersuchten Farbstoffe und ihrer Restfluoreszenz ist in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Für die Farbstoffkonjugate mit nicht konstanter Extinktion wurde die Fluoreszenzabnahme entsprechend korrigiert, dies führt zu einer hohen Unsicherheit und zeigt sich in den hohen Standardabweichungen.

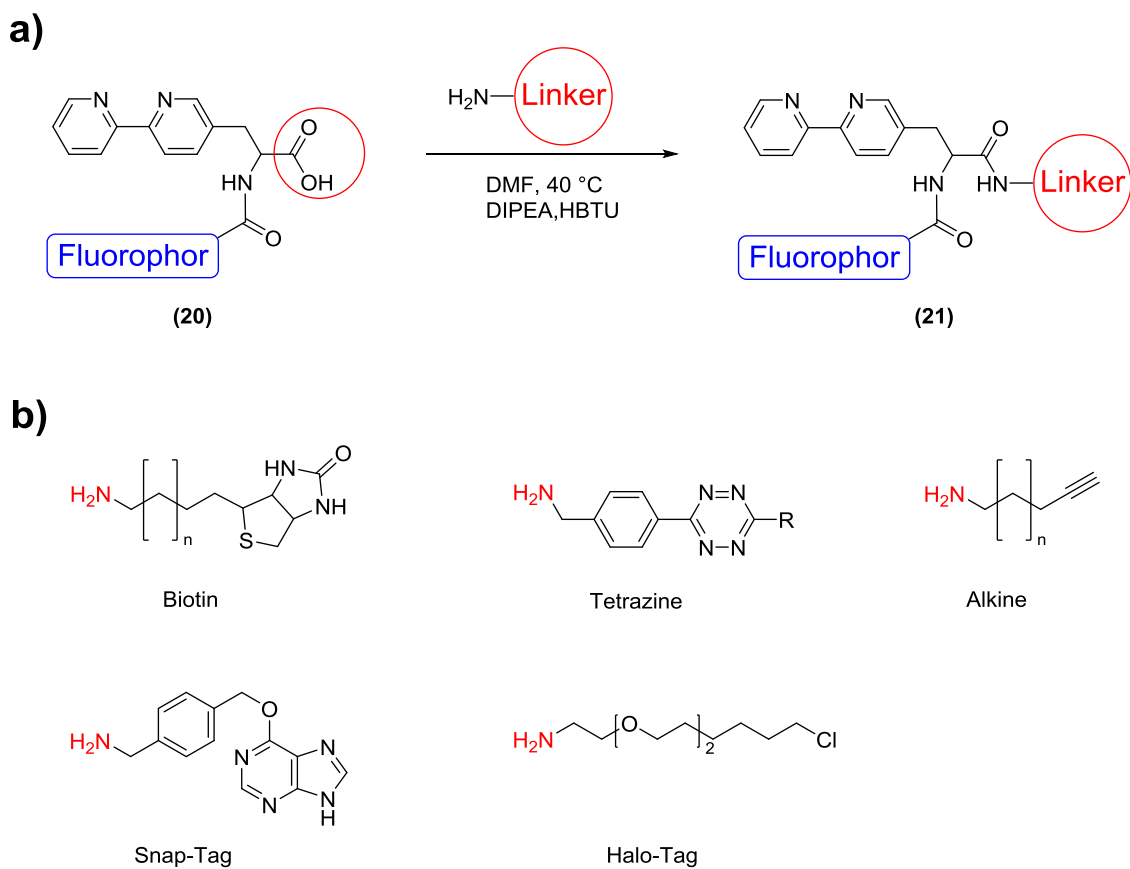


Abbildung 3.19: Funktionalisierung der unnatürlichen Aminosäure; **a)** Reaktionsschema zur Kopplung der Linker-Gruppe an das Bpy-Ala-Farbstoffkonjugat; **b)** Auflistung der eingesetzten Linker-Gruppen.

Zur abschließenden Funktionalisierung wird das Farbstoffkonjugat über die noch freie Carboxylgruppe an eine Linker-Gruppe gekoppelt, die zur Immobilisierung an einer Zielstruktur dient. Die Bildung der Peptidbindung erfolgt mit Hilfe von Aktivierungsreagenzien unter milden Reaktionsbedingungen, die eine Vielzahl von funktionellen Gruppen toleriert. Abbildung 3.19 zeigt den schematischen Ablauf der Kopplungsreaktion sowie eine Auswahl möglicher Linker-Gruppen, die in etablierten Markierungsreagenzien zum Einsatz kommen. Darunter befinden sich Tetrazin- und Alkin-Derivate für den Einsatz in Click-Reaktionen, Proteintags für enzymatische Umsetzung sowie Biotin für Affinitätsbindungen über Streptavidin. Zusätzlich ist die Länge der Verbindungsstücke variabel, sodass die Eigenschaften individuell angepasst werden können. Auch bei dieser Kopplungsreaktion bestehen die zuvor angesprochenen Probleme hinsichtlich Synthese, Aufreinigung, Ausbeute und Funktionsfähigkeit der Produkte. Als Standard-Linker wurde eine Biotin-Gruppe gewählt, die über eine Amino-Polyethylenglycol-Kette (PEG₈) an das Farbstoffkonjugat gekoppelt wird. Dadurch lässt sich die hohe Affinität zu Streptavidin ausnutzen, um Immobilisierungen an biotinylierten Oberflächen oder Zielstrukturen in fixierten Zellen umzusetzen.^[83] Dabei soll die PEG-Einheit die Löslichkeit der Verbindung erhöhen und zugleich einen Abstand vom Streptavidin gewährleisten, um mögliche Interaktionen gering zu halten. In Abbildung 3.20 ist mit der Verbindung Atto633-Bpy-Ala-Biotin beispielhaft die Strukturformel eines Vertreters der vollständigen Fluoreszenzsonden dargestellt. Der ebenfalls abgebildete Verlauf einer Titration mit Cu(II) Ionen zeigt im Absorptionsspektrum die bekannte Rotverschiebung der Ligandenbande, ausgelöst durch die Koordination der Metallionen, sowie eine leichte Abnahme der Farbstoffbande, die auch hier der Aggregatbildung zugeschrieben wird. Im Emissionsspektrum ist eine deutliche Fluoreszenzlöschung auf einen Restwert von 14 % zu beobachten. Alle auftretenden Effekte sind reversibel und werden durch Zugabe von EDTA (rote Linie) im Überschuss wieder in den Ausgangszustand versetzt.

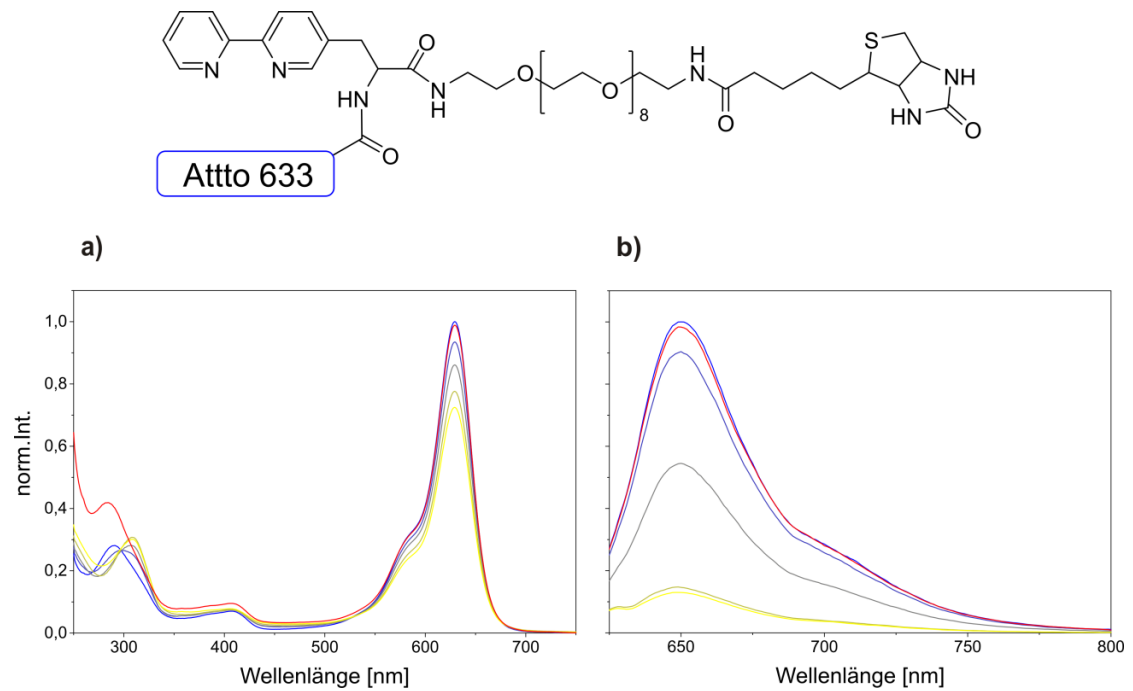


Abbildung 3.20: Strukturformel der Fluoreszenzsonde Atto633-Bpy-Ala-Biotin und Verlauf einer Titration mit Cu(II) Ionen von blau (kein Cu(II)) nach gelb (Cu(II) Überschuss); **a)** Absorptionsspektrum mit leicht abnehmender Farbstoffbande und Rotverschiebung der Ligandenbande; **b)** Emissionsspektrum mit deutlicher Abnahme der Fluoreszenzintensität; durch Zugabe von EDTA (rot) wird der Ausgangszustand wiederhergestellt.

4 Einzelmolekülexperimente

Zur weiteren Charakterisierung der Fluoreszenzsonden wurden deren Eigenschaften unter Einzelmolekülbedingungen untersucht. Durch eine Immobilisierung auf Glasoberflächen mit Hilfe des Biotin-Streptavidin-Systems konnte das Schaltverhalten einzelner Fluorophore beobachtet und daraus nützliche Rückschlüsse auf die Kinetik der zugrundeliegenden Komplexierungsreaktion gezogen werden.

4.1 Immobilisierung

Für eine Charakterisierung der Fluoreszenzsonde auf Einzelmolekülebene ist eine Immobilisierung auf einer geeigneten Oberfläche erforderlich. Dadurch wird die freie Diffusion der Teilchen unterbunden und das Beobachten der Fluoreszenz eines einzelnen Emitters über einen langen Zeitraum ermöglicht. Dabei sind mehrere Faktoren zu beachten: Zum einen die Teilchendichte, die durch starke Verdünnung der Farbstofflösung möglichst gering gehalten wird, üblicherweise im pikomolaren Bereich, sodass eine Überlagerung mehrerer Signale ausgeschlossen werden kann. Daraus ergibt sich auch die Notwendigkeit, störende Stoffe möglichst vollständig zu entfernen, da bei den beobachteten Teilchenzahlen schon kleinste Mengen an fluoreszierenden Fremdstoffen die Messung beeinträchtigen. Zum anderen sollte eine möglichst vollständige Solvatisierung des Fluorophors gewährleistet sein, um Interaktionen mit der Oberfläche und die damit verbundene Beeinträchtigung der Fluoreszenzeigenschaften auszuschließen. Außerdem muss die Bindung dauerhaft stabil sein um eine Verfälschung des beobachteten Blinkverhaltens durch Dissoziation zu vermeiden. Dies wird durch ein in der Arbeitsgruppe Hertzen etabliertes Protokoll zur Präparation von einzelmolekülauglichen Glasoberflächen sichergestellt. Dabei wird die Oberfläche durch kurzzeitiges Anätzen mit Fluorwasserstoff zunächst gründlich von Verunreinigungen befreit und anschließend mit BSA passiviert, um unspezifische Adsorption der Farbstoffe auf der Oberfläche zu unterdrücken. Wie in Abbildung 4.1 gezeigt, ist ein Teil der BSA-Moleküle mit einer Biotin-Gruppe funktionalisiert, über die

dann durch Ausnutzen der hohen Affinität zu Streptavidin eine biotinylierte Fluoreszenzsonde gebunden werden kann. Durch Einstellen des Verhältnisses von biotinyliertem zu nicht biotinyliertem BSA kann der Bedeckungsgrad so gewählt werden, dass der Abstand zwischen den Fluorophoren genügend groß ist, um ein Überlappen zu verhindern. Die so präparierten Oberflächen können dann mit der Farbstofflösung inkubiert werden, wobei die Zunahme des Bedeckungsgrades direkt am Mikroskop beobachtet werden kann, da die Moleküle nur vereinzelt zur Oberfläche diffundieren und dort binden. Dieser Vorgang kann durch Waschen der Probe zu jedem beliebigen Zeitpunkt abgebrochen und somit die gewünschte Dichte gezielt eingestellt werden. Die so erhaltenen Einzelmoleküloberflächen können mehrere Tage bei 4 °C in PBS-Puffer gelagert werden.

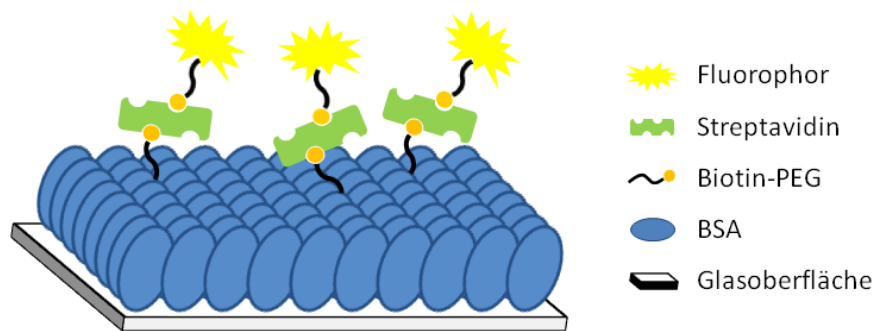


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer Glasoberfläche, die mit BSA passiviert wurde und die Immobilisierung der Fluoreszenzsonde über das Biotin/Streptavidin-System ermöglicht.

4.2 Einzelmolekülspuren – Kinetische Parameter

Aus den Ensemble-Experimenten kann nur der gemittelte Wert über alle Fluorophore bestimmt werden, der sich aus der Lage des thermodynamischen Gleichgewichtes ergibt. Mit Hilfe der einzelmolekülempfindlichen Fluoreszenzmikroskopie ist es jedoch möglich, den Assoziations- und Dissoziations-Prozess einzelner Moleküle anhand der

Intensitätsfluktuationen zu verfolgen und daraus die kinetischen Parameter der Komplexbildung abzuleiten.

Für die folgenden Experimente wurden Oberflächen mit einem Bedeckungsgrad von etwa einem Fluorophor pro $4 \mu\text{m}^2$ präpariert und an einem kommerziellen Fluoreszenzmikroskop im TIRF-Modus beobachtet. Zur Aufnahme wurde das Blickfeld auf einen zentralen Bereich von 256×256 Bildpunkten beschränkt, um die inhomogene Ausleuchtung des Randbereichs zu umgehen. Bei einer Pixelgröße von 104 nm ergibt das eine Fläche von $709 \mu\text{m}^2$ und eine durchschnittliche Anzahl an Fluorophoren von etwa 177 pro Bildausschnitt. Die Anregung erfolgt mit einem Laser bei 488 nm , 561 nm oder 640 nm , passend zur Absorptionsbande des eingesetzten Farbstoffes. Um das Bleichen durch Photozerstörung und eventuell auftretendes Triplet-Blinken gering zu halten, wurden möglichst niedrige Anregungsleistungen gewählt, die mit $0,6 \text{ mW}$ (561 nm) und $1,1 \text{ mW}$ (640 nm) noch in der Lage sind, eine gute Signalstärke zu erzeugen. Es wurden Bildserien mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Länge von bis zu 10.000 Bildern aufgenommen. Auch hier gilt es, einen Kompromiss zwischen Zeitauflösung und Intensität zu finden, die beide durch die Belichtungszeit bestimmt werden.

Die Aufnahme einer so präparierten Oberfläche zeigt die konstante Fluoreszenz der immobilisierten Farbstoffe als einzelne helle Punkte, die durch Einstellen einer geeigneten Kupferkonzentration in eine zeitlich fluktuierende Intensität überführt und in den Videos als Blinken wahrgenommen wird. Auch unter diesen Bedingungen kann durch Zugaben von EDTA die Konzentration an freien Cu(II) Ionen so weit gesenkt werden, dass die ursprünglich konstante Fluoreszenz wiederhergestellt wird. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden Videos bei unterschiedlichen Kupferkonzentrationen aufgenommen und ausgewertet.

Abbildung 4.2 zeigt die Maxima-Projektion einer typischen Oberfläche bei einer Cu(II) Konzentration von $4 \mu\text{M}$, bedeckt mit einzelnen nicht überlappenden Emittern. Aus dieser Darstellung lässt sich die Position jedes Farbstoffes bestimmen, der während der Aufnahme mindestens für die Dauer eines Einzelbildes, im hellen, emittierenden Zustand vorliegt. Von dieser Lokalisation wurde dann mit Hilfe einer auf Matlab basierenden Software der zeitliche Intensitätsverlauf extrahiert. Das kurze Aufblinken von Fluorophoren im Video wird dann in der Intensitätsspur als Abschnitt mit hoher Fluoreszenzintensität dargestellt.

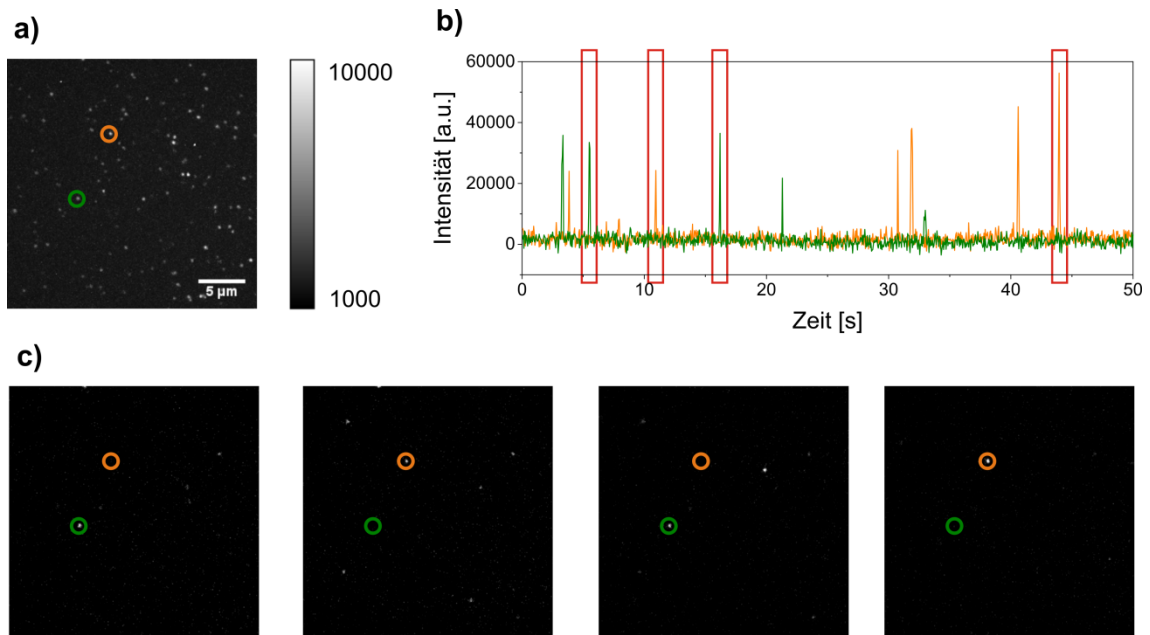


Abbildung 4.2: **a)** Maxima-Projektion einer Serie von 2000 Bildern aus der die Fluorophore für die weitere Auswertung lokalisiert werden können. **b)** Überlagerung aus zwei typischen Intensitätsspuren einzelner Fluorophore, die bei der eingestellten Kupferkonzentration ($4 \mu\text{M}$) vorwiegend im dunklen Zustand vorliegen und spontan in einen hellen Zustand wechseln. Vier dieser Ereignisse sind rot hervorgehoben und die zugehörigen Aufnahmen der beobachteten Einzelmoleküloberfläche in **c)** dargestellt.

Die Abhängigkeit des Blinkverhaltens von der eingestellten Cu(II) Konzentration ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Auswahl an repräsentativen Intensitätsspuren zeigt den Unterschied zwischen der weitestgehend konstanten Fluoreszenz in Abwesenheit von Cu(II) Ionen sowie die abnehmende Dauer der An-Zustände proportional zur steigenden Konzentration der Cu(II) Ionen. Dieser eher subjektive Eindruck deckt sich mit der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Dauer der Zustände $P(\Delta t)$ durch die Exponentialfunktionen (4.1) und (4.2) beschrieben werden kann und wird durch die folgenden Ergebnisse gestützt.

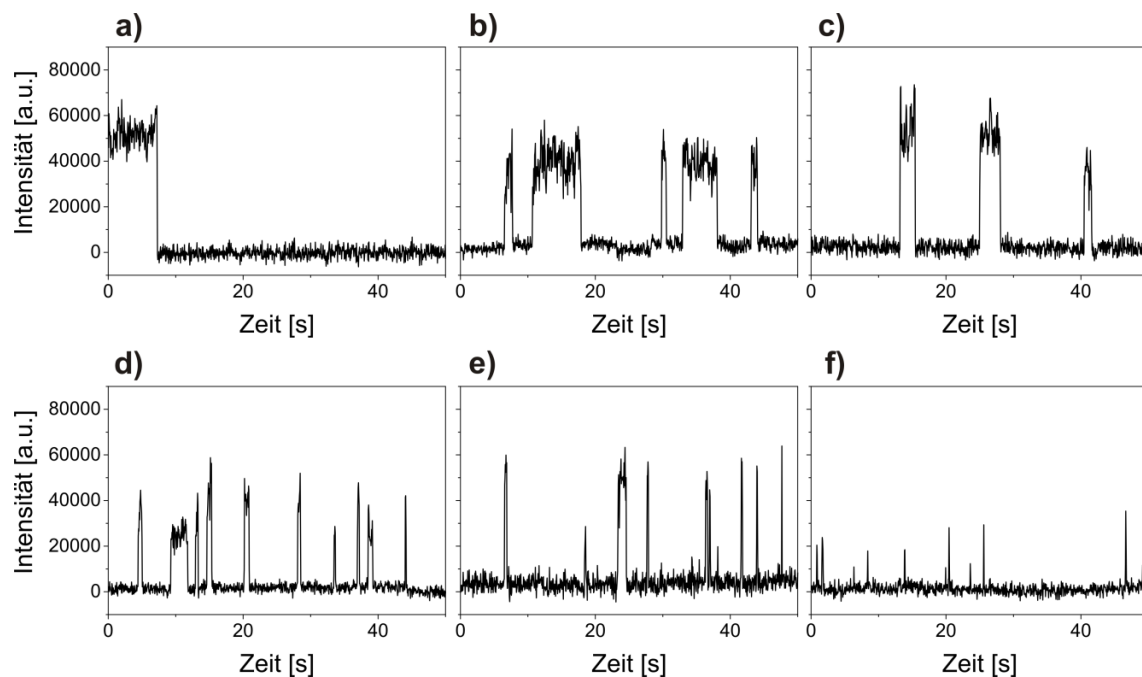


Abbildung 4.3: Intensitätsverlauf einzelner Fluorophore in 10 mM MOPS-Puffer bei unterschiedlichen Cu(II) Konzentrationen; **a)** ohne Cu(II) Ionen; **b)** 100 nM; **c)** 500 nM; **d)** 1 µM; **e)** 2 µM; **f)** 4 µM; mit steigender Konzentration der Cu(II) Ionen nimmt die Dauer der An-Zustände ab.

$$P_{\text{On}} = \exp(-k_{\text{on}}[\text{Cu(II)}]\Delta t_{\text{on}}) \quad (4.1)$$

$$P_{\text{Off}} = \exp(-k_{\text{off}}\Delta t_{\text{off}}) \quad (4.2)$$

Dieser Term lässt sich aus dem Massenwirkungsgesetz der zugrundeliegenden Komplexierungsreaktion, durch Substitution der Konzentrationen gegen Wahrscheinlichkeiten, ableiten und wurde bereits an anderer Stelle beschrieben.^[84] Gemäß dieser Gleichung lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation des Metallkomplexes aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Zustandsdauer bestimmen. Um zuverlässige Werte zu erhalten, ist es zunächst notwendig, die extrahierten Intensitätsspektren in diskrete Zustände einzuteilen.

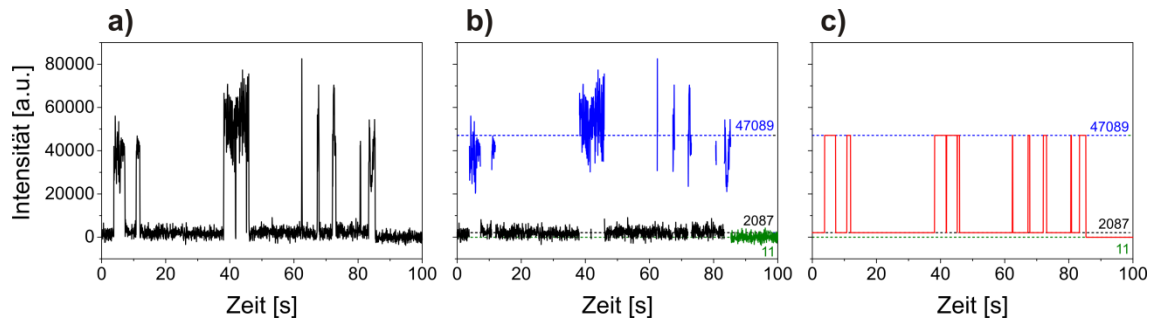


Abbildung 4.4: Typischer Intensitätsverlauf eines Fluorophores bei einer Cu(II) Konzentration von 500 nM und Einteilung in diskrete Niveaus; **a)** Rohdaten des Intensitätsverlaufs; **b)** Einteilung in „An“ (blau), „Aus“ (schwarz) und gebleicht (grün), gestrichelte Linien entsprechen dem jeweiligen Mittelwert; **c)** idealisierter Verlauf, dargestellt als Drei-Zustands-Diagramm

Abbildung 4.4 zeigt den zeitlichen Intensitätsverlauf der Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls mit ausgeprägtem Blinken, ausgelöst durch die eingestellte Kupfer-Konzentration. Deutlich zu erkennen ist der Übergang zwischen unterschiedlich hellen Zuständen, die einem hellen An-Zustand (blau) und einem dunklen Aus-Zustand (schwarz), dessen Intensität jedoch über dem Hintergrund liegt, zugeordnet werden. Außerdem kann ein dritter Zustand (grün) beobachtet werden, der nach etwa 85 Sekunden auftritt, einen Intensitätswert von annähernd Null annimmt und für den restlichen Verlauf nicht wieder in einen höheren Zustand übergeht. Dies wird der endgültigen Photozerstörung des Farbstoffes mit einhergehender Reduzierung der Fluoreszenzintensität auf das Hintergrundniveau zugeschrieben. Abbildung 4.5 zeigt zwei weitere Spuren, in denen ein Bleichschritt auf das Hintergrundniveau (rote Linie) zu erkennen ist und demonstriert durch die gute Übereinstimmung der Intensitätswerte für gebleichten Zustand und Hintergrund, dass die Hintergrundkorrektur der Software sehr effektiv arbeitet. Aus den Mittelwerten der beobachteten Intensitätsniveaus lässt sich dann die Einteilung in ein Drei-Zustands-Diagramm (rot) vornehmen, aus dem Werte für Dauer und Häufigkeit von Aus- und An-Zuständen sowie die Restfluoreszenz bestimmt werden können. Ein erhebliches Problem für die Auswertung der Daten sind die zum Teil enormen Schwankungen in der Intensität der Fluoreszenz. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, sind manche Spuren, trotz identischer Aufnahmebedingungen und intaktem Blinkverhalten, insgesamt dunkler als andere. Ursache dafür sind permanente Effekte, wie die inhomogene Ausleuchtung oder Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche, die über die gesamte Beobachtungszeit bestehen und auch durch sorgfältige Probenpräparation nicht völlig verhindert werden können.

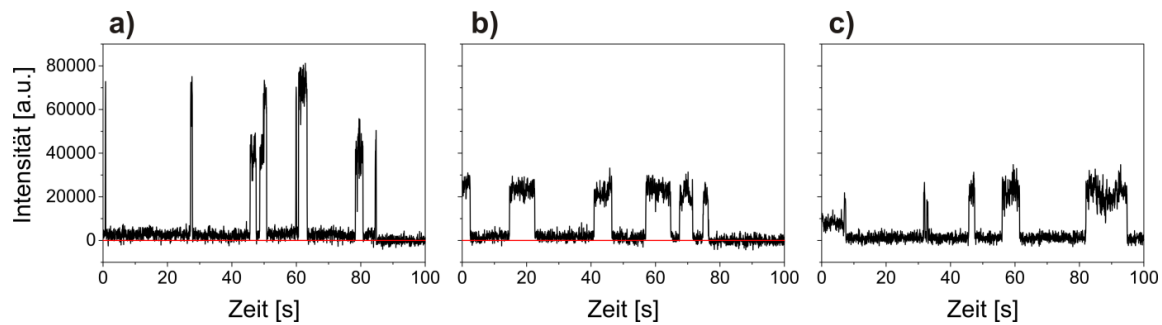


Abbildung 4.5: Intensitätsspurverläufe unterschiedlicher Emitter, extrahiert aus einem gemeinsamen Video. Deutlich zu erkennen sind die unterschiedlichen Intensitätsniveaus der An-Zustände, trotz identischer Aufnahmebedingungen.

Ebenfalls zu beobachten sind unterschiedliche Helligkeitsniveaus innerhalb einer Spur, zwischen denen der Fluorophor wechseln kann. Diese werden durch dynamische Prozesse verursacht, wie z.B. der Übergang zwischen unterschiedlichen Konformationen mit Lebenszeiten im Bereich der Beobachtungsdauer, Interaktion mit der Oberfläche, bei der die Ausrichtung des Dipolmomentes vorübergehend fixiert und dadurch für die Detektion besonders günstig oder ungünstig steht, Änderung der Distanz zur Oberfläche, die durch den PEG-Linker variabel ist und wegen des exponentiell abfallenden, evaneszenten Feldes einen großen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität hat, sowie der thermische Drift durch den die Position des Emitters verschoben werden kann. Eine andere denkbare Ursache wäre das Beobachten mehrerer dicht nebeneinander liegender Emitter, die dann entsprechend ihrer Anzahl, Vielfache der Fluoreszenzintensität eines einzelnen Fluorophores annehmen könnten. Dies ist jedoch schon wegen der hohen Verdünnung der Farbstoffsonden, die für das Experiment eingesetzt wurden, unwahrscheinlich und würde außerdem zu einem stufenweisen Anstieg der Intensität führen, da es ebenfalls sehr unwahrscheinlich ist, dass alle Emitter gleichzeitig an bzw. aus gehen und somit direkt in die hohen Intensitätsniveaus wechseln, wie es überwiegend beobachtet wurde. So zeigt Abbildung 4.5 a) einen Intensitätsverlauf mit einem mittelhellen Niveau bei etwa 45, 50 und 80 Sekunden sowie ein deutlich helleres Niveau, das bei 25 und 60 Sekunden ohne Zwischenstufen eingenommen wird. Die daraus resultierende Inhomogenität der Intensitätsspurverläufe macht es unmöglich, eine automatisierte, grenzwertbasierte Analyse durchzuführen, so dass die Auswertung der Daten zu einer zeitintensiven Aufgabe wird. Folglich konnten in der zur Verfügung stehenden Zeit, nicht alle dargestellten Fluoreszenzsonden mit der gleichen Ausgiebigkeit untersucht und somit nur eine Auswahl genauer charakterisiert werden.

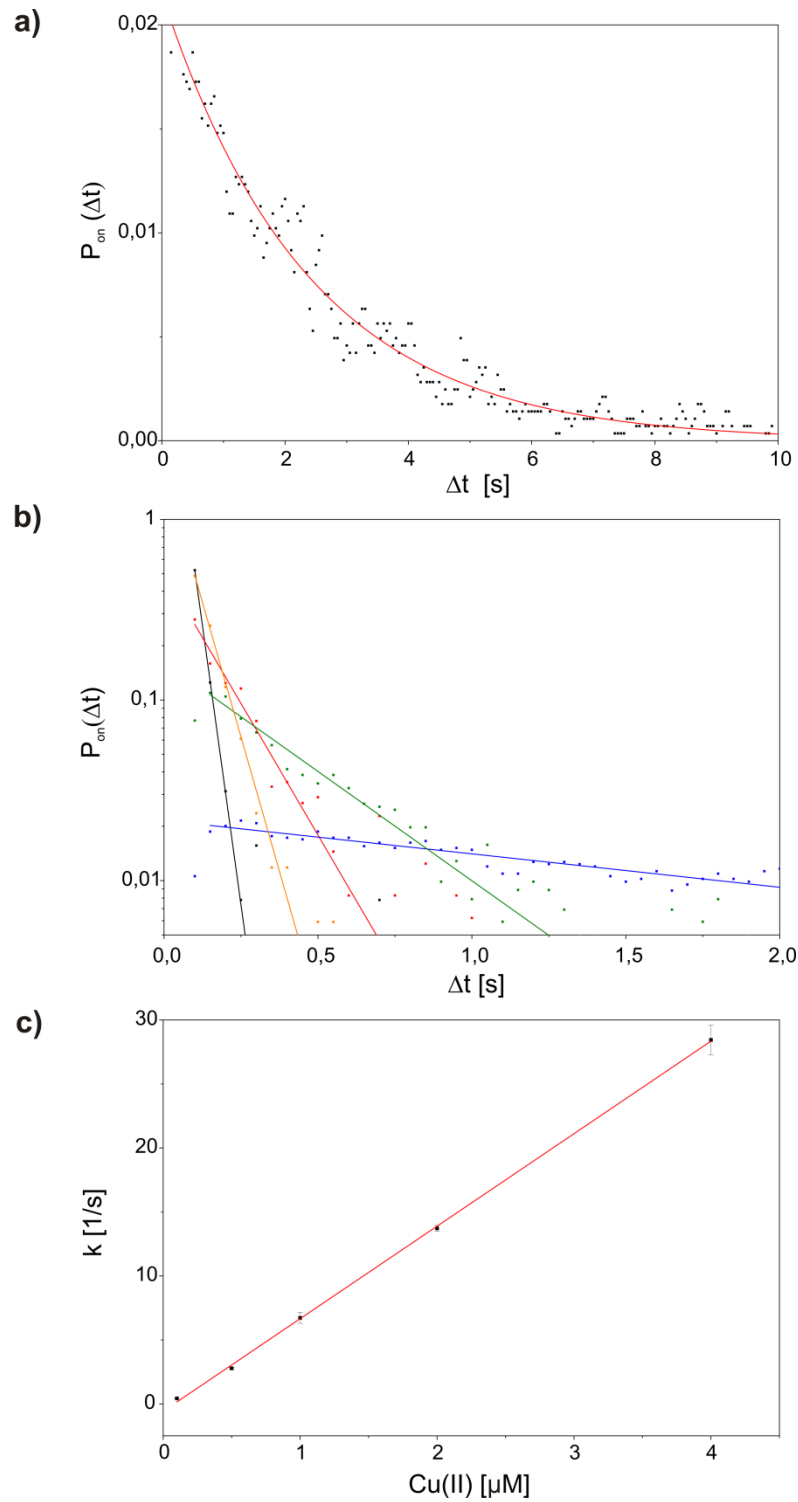


Abbildung 4.6: Bestimmung der kinetischen Parameter für Atto633-Bpy-Ala-Biotin; **a)** exponentieller Verlauf der Wahrscheinlichkeitsverteilung der An-Zeiten für eine Cu(II) Konzentration von 100 nM; **b)** Wahrscheinlichkeitsverteilung der An-Zeiten für unterschiedliche Cu(II) Konzentrationen, 100 nM (blau), 500 nM (grün), 1 μ M (rot), 2 μ M (orange), 4 μ M (schwarz) und exponentielle Näherungsfunktionen; **c)** Auftragung der Zerfallskonstanten gegen die Kupferkonzentration und linearer Fit zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} .

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter ist es notwendig, eine Wahrscheinlichkeitsverteilung der Zustandsdauern anzufertigen. Aufgrund der großen Menge an Daten, die für eine belastbare Aussage benötigt werden, wurde die Auswertung auf Ergebnisse der Fluoreszenzsonde Atto633-Bpy-Ala-Biotin beschränkt. Diese zeichnete sich in den Experimenten durch hohe Photostabilität, Helligkeit und gute Reproduzierbarkeit aus. Es wurden für fünf unterschiedliche Kupferkonzentrationen je 10 Videos mit einer Länge von 4.000 Bildern aufgenommen und daraus jeweils 600 bis 800 Werte extrahiert. Abbildung 4.6 a) zeigt die Wahrscheinlichkeitsverteilung der An-Zustände für eine Kupferkonzentration von 100 nM und den Verlauf der Näherungsfunktion (4.1), die den exponentiellen Abfall beschreibt. Aus diesem kann die Zerfallskonstante und bei bekannter Kupferkonzentration die Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung k_{On} bestimmt werden. In b) sind die Wahrscheinlichkeitsverteilungen für fünf unterschiedliche Kupferkonzentrationen in einem gemeinsamen Diagramm aufgetragen. Die logarithmische Skalierung erleichtert den direkten Vergleich der ansonsten um Größenordnungen auseinander liegenden Werte und verdeutlicht die Proportionalität der Zerfallskonstanten, die hier der Steigung entspricht, zur Kupferkonzentration. Durch Auftragen der hieraus bestimmten Zerfallskonstanten gegen die jeweilige Kupferkonzentration ergibt sich, im Einklang mit der theoretischen Beschreibung, ein linearer Verlauf, dessen Steigung der Assoziationskonstanten k_{On} entspricht und mit einem Wert von $k_{On} = (7.22 \pm 0.08) 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt wurde. Durch analoges Vorgehen kann aus der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Aus-Zustände die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation des Komplexes k_{Off} bestimmt werden. Da der Zerfall des Komplexes unabhängig von der Kupferkonzentration ist, entspricht k_{Off} direkt der Zerfallskonstanten der exponentiellen Näherungsfunktion und wurde mit einem Wert von $k_{Off} = (0.89 \pm 0.11) \text{ s}^{-1}$ bestimmt. Aus den bekannten Geschwindigkeitskonstanten für Hin- und Rückreaktion kann schließlich die Gleichgewichtskonstante K der Komplexbildung ermittelt werden. Im hier untersuchten Fall ergibt sich ein Wert von $K = (8.11 \pm 0.24) 10^6 \text{ M}^{-1}$, dies entspricht einem Wert von $\log(K) = 6.91$ und liegt damit etwas unter dem Literaturwert, der für unsubstituierte Bipyridene bei $\log(K) = 8.10$ liegt.^[85] Abweichungen ergeben sich hier aus der Substitution am Liganden selbst, die einen Einfluss auf die elektronische Struktur ausübt, sowie der sterischen Wechselwirkung durch das Farbstoffmolekül.

Obwohl Thermodynamik und Kinetik generell keine Rückschlüsse auf den jeweils anderen erlauben, lässt sich hier der Zusammenhang dieser Größen veranschaulichen.

Tabelle 4.1: Auflistung der Farbstoffe mit Restfluoreszenz im Ensemble- und Einzelmolekül-Experiment.

Farbstoff	Restfluoreszenz [%]	
	Ensemble	Einzelmolekül
Atto532	11 ± 3	12 ± 4
Cy3B	22 ± 14	14 ± 5
Atto633	29 ± 13	11 ± 6
Atto665	37 ± 15	10 ± 4

Aus den Intensitätsspuren lässt sich ebenfalls die Restfluoreszenz im dunklen Auszustand der Fluoreszenzsonde bestimmen. Tabelle 4.1 **Error! Reference source not found.** zeigt die ermittelten Werte, die in einem Bereich von 10 % bis 15 % liegen und damit deutlich niedriger ausfallen als die Ergebnisse der Ensemble-Messungen. Da in den Einzelmolekülmessungen eine Verfälschung durch Aggregation und Ausfällung ausgeschlossen werden kann und die Ensemble-Messungen durch genau diese Effekte beeinträchtigt werden, liegt darin vermutlich die Ursache der großen Abweichung. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung, dass das Atto532-Derivat mit beiden Methoden vergleichbare Werte liefert, da es auch in den Ensemblemessungen nicht von den genannten Effekten betroffen war.

Die so bestimmten Parameter geben nicht nur Aufschluss über kinetische und thermodynamische Größen der Komplexbildungsreaktion, die sonst nur schwer oder überhaupt nicht zugänglich sind. Sie ermöglichen auch eine Abschätzung über die Tauglichkeit der Verbindung für den Einsatz als Fluoreszenzsonde in der Lokalisationsmikroskopie. Denn sowohl Kinetik als auch Dynamik des Schaltprozesses spielen eine wichtige Rolle für Anwendbarkeit und erreichbare Auflösung.

5 Zellexperimente

Nachdem die synthetisierten Fluoreszenzsonden sowohl in den Ensemblemessungen als auch unter Einzelmolekülbedingungen ein ausgeprägtes Schaltverhalten zeigen, das durch die Konzentration an Cu(II) Ionen gesteuert werden kann, wurden ausgewählte Zielstrukturen in fixierten Zellen markiert und die Fluoreszenzsonden auf ihre Funktionsfähigkeit in dieser Umgebung untersucht. Dazu wurde die maximale Intensitätsänderung bestimmt, sowie die Anwendung in der Lokalisationsmikroskopie und dem chemischen Multiplexing getestet. Die tatsächliche Durchführung der Experimente gestaltet sich dabei denkbar einfach. Es müssen lediglich kleine Volumina der Schaltreagenzien der Probe zugeführt und Aufnahmen im entsprechenden Schritt gemacht werden. Dies lässt sich durch vorsichtiges Pipettieren direkt am Mikroskop bewerkstelligen. Die wahre Herausforderung liegt einerseits in der Probenvorbereitung mit Präparation und Färbung der Zellen, um nur einige Schritte zu nennen. Aber vor allem ist es das Ausarbeiten eines geeigneten Protokolls zur Probenvorbereitung, das den umfangreichsten Arbeitsaufwand darstellt. Angefangen bei der Kultivierung von Zelllinien und der Wahl geeigneter Antikörper über die Färbebedingungen und Einstellen der Konzentration aller beteiligter Reagenzien über viele Arbeitsschritte hinweg bis hin zu den Aufnahmeparametern am Mikroskop. Diese Vielzahl an Variablen ist im Vorfeld nur sehr grob einschätzbar und lässt sich letztendlich nur durch Austesten unter realen Bedingungen bestimmen.

5.1 Markierung

Für die folgenden Experimente wurden humane HeLa-Zellen sowie 3T3 Maus-Fibroblasten eingesetzt, die sich als standard Zelltypen durch ihre Robustheit und damit weitestgehend unkomplizierte Handhabung auszeichnen. Vorteilhaft für die Messungen am TIRF-Mikroskop ist die flache Form der Fibroblasten, die sich stark auf der Oberfläche ausbreiten und damit ein Großteil der Zellbestandteile im Bereich des evaneszenten Feldes liegt. Die HeLa-Zellen hingegen besitzen eine deutlich größere Ausdehnung in z-Richtung, wodurch es schwerer fällt, bestimmte Strukturen zu

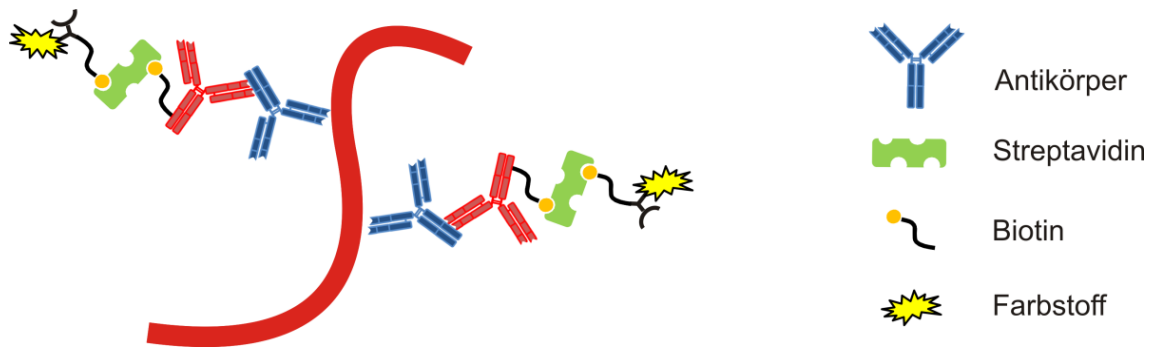


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Markierung über Primär- und Sekundärantikörper, Biotin und Streptavidin.

beobachten und diese oft nur teilweise im Sichtfeld liegen. Noch stärker macht sich dies beim Versuch, mehrere unterschiedliche Strukturen gleichzeitig zu beobachten, bemerkbar. Für die Mikroskopie wurden auf einer Glasoberfläche einer LabTek™-Kammer adhärenzte Zellen genutzt, die durch eine Paraformaldehydlösung fixiert, mit einem Tensid permeabilisiert und anschließend gründlich mit Puffer gewaschen wurden. Durch Quervernetzung der Proteine bleibt ein Großteil der zellulären Struktur erhalten und wird den Markierungsreagenzien zugänglich gemacht.

Als Zielstruktur wurde Tubulin gewählt, das über biotinylierte Antikörper oder eine Kombination aus Primärantikörper und biotinyliertem Sekundärantikörper mit den ebenfalls biotinylierten Sonden eingefärbt wurde. Das in der Arbeitsgruppe Herten ausgearbeitetes Protokoll nutzt dabei die hohe Affinität zwischen Streptavidin und Biotin, um eine spezifische Färbung zu erzeugen. Abbildung 5.1 zeigt eine schematische Darstellung der Markierung. Die Mikrotubuli bilden ein Netzwerk aus verzweigten, dünnen Fasern, das sich über die gesamte Zelle ausdehnt und auch nach der Fixierung erhalten bleibt. Dadurch sind sie leicht zu finden und eine gelungene Färbung schnell zu erkennen. Zudem liegt der Durchmesser der Fasern unter der optischen Auflösungsgrenze und bietet sich daher als geeignetes Ziel für hochauflösende Mikroskopie an. Abbildung 5.2 zeigt das Mikrotubulin Netzwerk einer Fibroblastenzelle, die mit der Fluoreszenzsonde Atto633-Bpy-Ala-Biotin eingefärbt wurde. Die feinen Fasern sind deutlich zu erkennen und zeigen einen starken Kontrast zum Hintergrund. Besonders der runde Bereich unterhalb des Zellkerns enthält einzelne, gut abgegrenzte Filamente mit durchgängig intensiver Fluoreszenzintensität. Dieses Beispiel demonstriert die Funktionsfähigkeit der Sonde als Fluoreszenzmarker mit hoher Spezifität und geringer Hintergrundfluoreszenz. Entsprechende Sonden wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen dargestellt und umfassen mit



Abbildung 5.2: Mikrotubulin in einer Fibroblasten-Zelle, gefärbt mit Atto633-Bpy-Ala-Biotin.

Anregungswellenlängen von 500 nm bis 662 nm für die Atto488- und Atto665-Derivate annähernd das gesamte sichtbare Spektrum. Abbildung 5.3 zeigt eine Auswahl an markierten HeLa-Zellen, deren Farbe entsprechend dem spektralen Bereich des verwendeten Farbstoffes gewählt wurde. Trotz vieler Ansätze konnte nicht mit jeder Sonde eine erfolgreiche Färbung erzeugt werden, wobei oft unklar ist, ob die Ursache bei den Sonden oder der Probenpräparation liegt. Die Menge an Arbeitsschritten und die große Anzahl an eingesetzten Reagenzien erschweren das Feststellen der Ursache, sodass eine Aufklärung mit annehmbarem Arbeitsaufwand oft nicht realisiert werden kann und nach einer gewissen Anzahl von Versuchen die Sonde verworfen wurde. Insbesondere der Nachweis von funktionierenden Antikörpern ist ein aufwendiger Prozess und bedarf einiger Kontrollexperimente und Wiederholungen, um wirklich sicher gehen zu können.

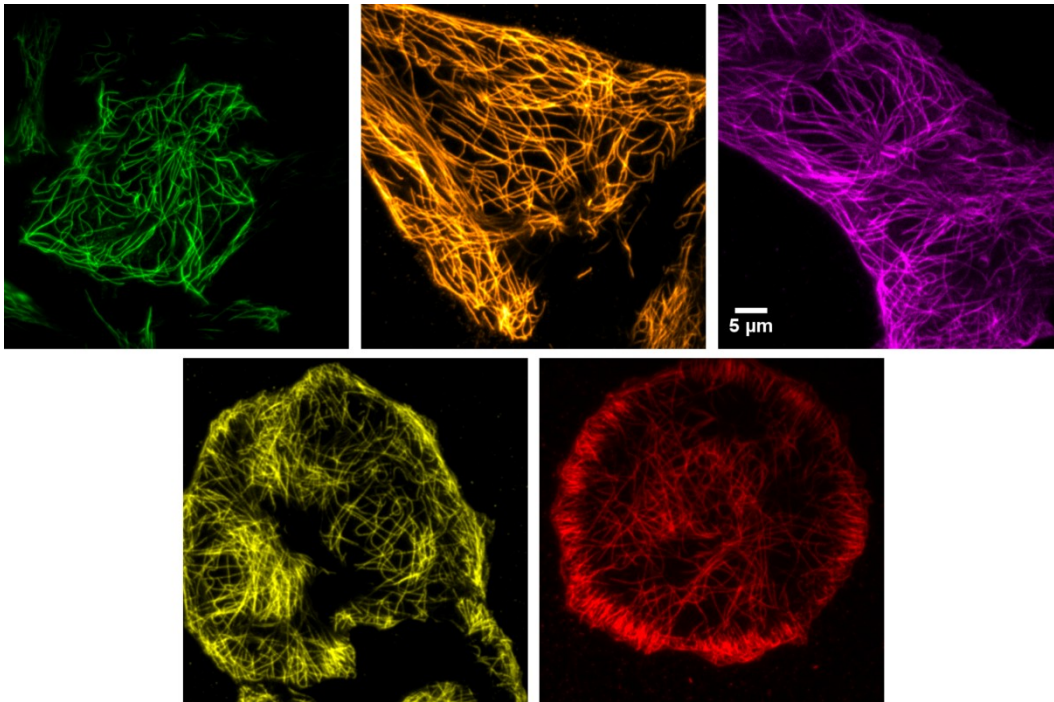


Abbildung 5.3: Mikrotubuli in HeLa-Zellen, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzsonden markiert wurden; Atto488 (grün), Atto532 (gelb), Atto565 (orange), Atto633 (rot), Atto665 (magenta).

Durch die Markierung über das Biotin-Streptavidin-System entstehen zwei Nachteile mit nicht vernachlässigbaren Konsequenzen, die bei den folgenden Ergebnissen berücksichtigt werden müssen. Zum einen wird durch die enorme Größe der Markierungsreagenzien, die eine maximale Ausdehnung von etwa 40 nm erlaubt, die tatsächliche Größe der Zielstruktur verfälscht. Für konventionelle Mikroskopie ist dieser Wert vernachlässigbar, da er unterhalb der Auflösungsgrenze liegt, für hochauflösende Methoden wird dadurch jedoch die erreichbare Auflösung limitiert. Ein weiteres Problem ist die uneinheitliche und nur bedingt kontrollierbare Stöchiometrie der Markierung.^[86] Hier sind mehrere Parameter zu beachten, die für eine gewisse Unsicherheit in der Markierungsdichte sorgen. Es ist z.B. nicht bekannt, wie viele Antikörper und an welcher Position der Zielstruktur diese binden. Dazu kommt eine schwankende Biotinylierung von ein bis vier Einheiten pro Antikörper, die jeweils ein Streptavidinmolekül binden können. Diese wiederum können bis zu drei biotinylierte Fluoreszenzsonden aufnehmen. Schon alleine daraus ergibt sich ein Markierungsgrad von ein bis 12 Farbstoffen pro Antikörper. Geht man jedoch von einer Sekundärantikörperfärbung aus, so vervielfacht sich dieser Wert noch, da mehrere Sekundär- an einen Primärantikörper binden können. Auch dieser Effekt kann in der

konventionellen Mikroskopie vernachlässigt werden, da die beobachtete Fluoreszenz über alle Antikörper, die sich in einem beugungsbegrenzten Bereich befinden, gemittelt wird. Im Gegensatz dazu machen sich diese Effekte bei den hochauflösenden Techniken bemerkbar und können besonders bei der Lokalisationsmikroskopie die erreichbare Auflösung verringern oder sogar schwerwiegende Komplikationen erzeugen.

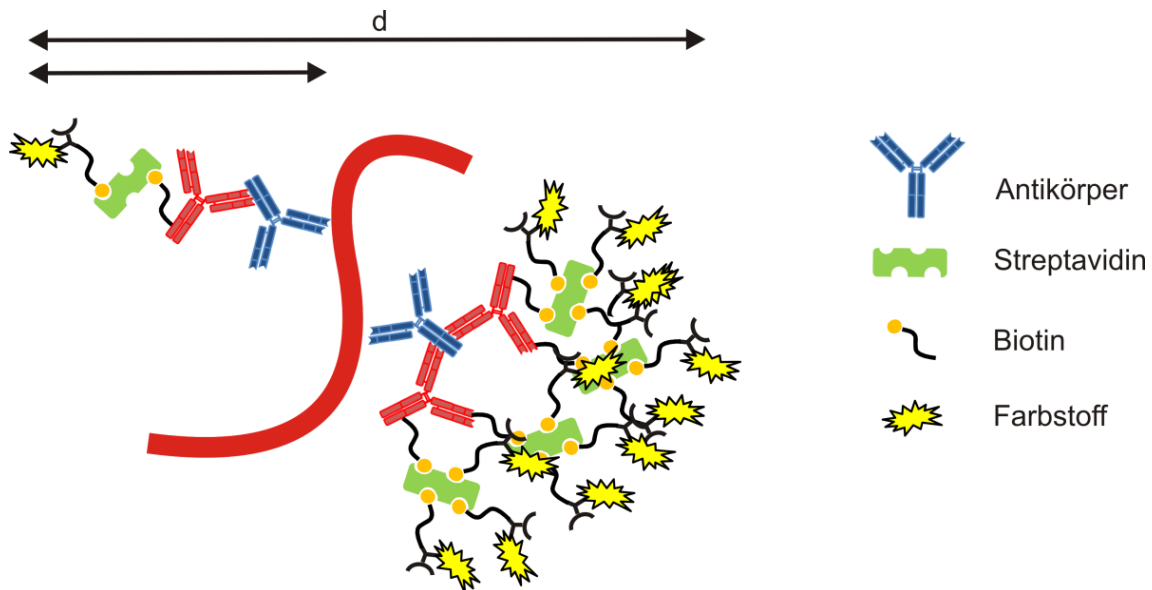


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Markierung; tatsächliche Ausdehnung **d** der sichtbaren Struktur und Verdeutlichung der uneinheitlichen Stöchiometrie.

5.2 Charakterisierung des Schaltprozesses

Analog zu den Löschexperimenten im Ensemble wurden präparierte Zellen mit Cu(II) Lösungen titriert und Auswirkungen auf die Fluoreszenz untersucht. Bei Zugabe von Cu(II) Ionen im Überschuss erfolgt eine instantane Löschung der Fluoreszenz, die durch EDTA vollständig regeneriert werden kann. Wird jedoch eine kleine Menge an konzentrierter Cu(II) Lösung in den vorliegenden Puffer gegeben, führt dies zur allmählichen Ausbreitung der Ionen durch Diffusion, die an den markierten Zellen beobachtet werden kann.

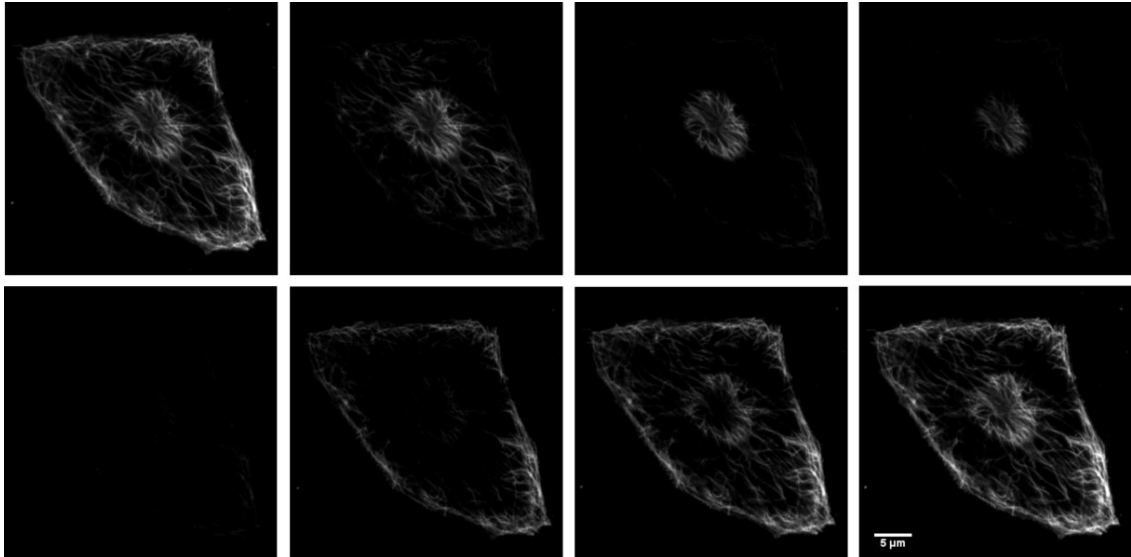


Abbildung 5.5: Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität von AZ481-Bpy-Ala-Biotin in HeLa-Zelle, 10 mM MOPS Puffer, nach Zugabe von 20 μM Cu(II) Ionen (obere Reihe) und anschließend 200 μM EDTA (untere Reihe).

Abbildung 5.5 zeigt eine Zeitserie des Löschvorgangs anhand einer mit AZ481-Bpy-Ala-Biotin gefärbten HeLa-Zelle. Die ursprünglich stark fluoreszierenden Fasern werden vom Rand der Zelle beginnend zum Zentrum hin „ausgeschaltet“, während Cu(II) Ionen ins Innere der permeabilisierten Zelle einströmen. Der zuletzt noch sichtbare kreisförmige Bereich befindet sich unterhalb des Zellkerns, da hier vermutlich die Durchlässigkeit verringert ist. Die vollständig gelöschte Fluoreszenz lässt sich dann durch Zugabe von EDTA wieder herstellen. Auch hier kann der Einschaltprozess an dem von außen nach innen fortschreitenden Aktivieren der Fluoreszenz beobachtet werden. Dieser Vorgang ist mehrfach wiederholbar durch alternierende Zugabe der Schaltreagenzien mit jeweils ansteigender Konzentration. Es tritt lediglich eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität auf, die durch permanentes Bleichen der Fluorophore ausgelöst wird. Somit wird die Anzahl der Schaltzyklen nur durch die Photostabilität der Farbstoffe begrenzt.

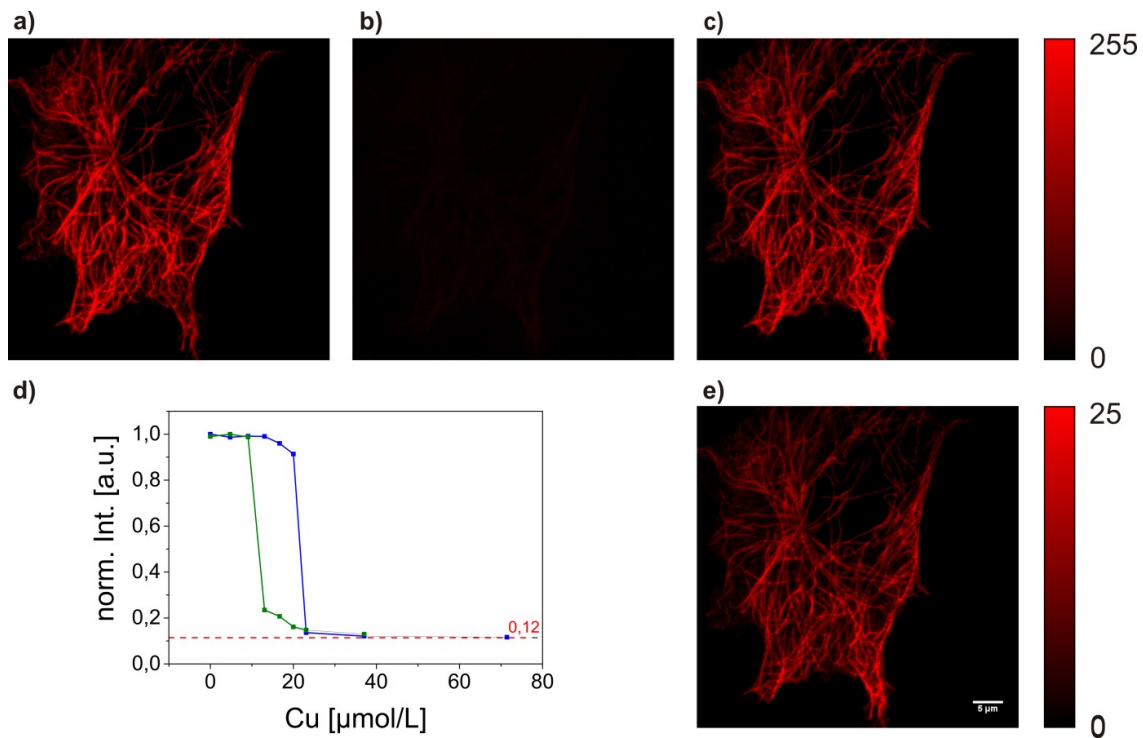


Abbildung 5.6: Immunfluoreszenzmarkierte Mikrotubuli (Atto665-Bpy-Ala-Biotin) in einer fixierten Fibroblastenzelle; **a)** vor Zugabe von Cu(II); **b)** stark reduzierte Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Cu(II); **c)** wiederhergestellte Fluoreszenz nach Zugabe von EDTA; **d)** Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die zugesetzte Cu(II) Konzentration für zwei Sonden mit den Farbstoffen Atto665 (blau) und AZ481 (grün); **e)** die angepasste Skalierung zeigt die Restfluoreszenz im gelöschten Zustand aus Abbildung b).

Um die Dynamik des Schaltvorgangs in fixierten Zellen zu bestimmen, wurde die Intensitätsänderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Cu(II) Ionenkonzentration beobachtet. Dazu wurde die Fluoreszenzintensität in gefärbten Bereichen der fixierten Zellen integriert und auf die Fläche normiert. Abbildung 5.6 zeigt den Verlauf eines solchen Experimentes anhand der aufgenommenen Fluoreszenzbilder sowie den daraus bestimmten Intensitätsverlauf. Die zuvor gut sichtbaren Filamente werden bereits durch eine Konzentration von wenigen μM Cu(II) in einen Zustand maximaler Löschung überführt. Der steil abfallende Intensitätsverlauf verdeutlicht eine Art Schwellenwert, ab dem die Löschung unmittelbar eintritt und das kontrollierte Einstellen eines Wertes, in dem sich die Fluorophore in einem Gleichgewicht zwischen „An“- und „Aus“-Zustand befinden, nahezu unmöglich macht. Dies wird zusätzlich erschwert, durch die langsame Diffusion der Ionen, die zu einer verzögerten Auslösung des Effektes führt. Auch das bereits angesprochene Problem der Restfluoreszenz bleibt hier bestehen und liegt in einem Bereich von etwa 10 % bis 15 %. Wie in Tabelle 5.1 gezeigt, liegt

dieser Wert in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Einzelmolekülmessungen. Auch in den Zellexperimenten ist nicht mit einer Verfälschung durch Aggregation oder Ausfällung zu rechnen, sodass hier die tatsächliche Löschung durch Koordination der Kupferionen betrachtet werden kann.

Tabelle 5.1: Auflistung der Farbstoffe mit Restfluoreszenz im Ensemble-, Einzelmolekül- und Zellexperiment.

Farbstoff	Restfluoreszenz [%]		
	Ensemble	Einzelmolekül	Zelle
Atto532	11 ± 3	12 ± 4	13 ± 5
Atto542	38 ± 16		18 ± 6
Atto565	46 ± 16		12 ± 6
Cy3B	22 ± 14	14 ± 5	14 ± 5
AZ474	36 ± 14		16 ± 6
Atto633	29 ± 13	11 ± 6	13 ± 5
AZ481	33 ± 14		13 ± 5
Atto665	37 ± 15	10 ± 4	12 ± 4

5.3 Lokalisationsmikroskopie: CHIRON

Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy

Nachdem die Sonden sowohl unter Ensemble- als auch Einzelmolekülbedingungen und in fixierten Zellen ein kupferabhängiges Schaltverhalten zeigen, sollte nun ihre Eignung für die Lokalisationsmikroskopie untersucht werden.

In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits auf beobachtete Effekte wie Restfluoreszenz, uneinheitliche Stöchiometrie der Markierung und Kontrolle der Schaltkinetik durch Einstellen der Kupferkonzentration eingegangen. Diese sind wichtige Parameter für die Lokalisationsmikroskopie und wirken sich direkt auf die Durchführbarkeit und die erreichbare Auflösung aus. Um geeignete Bedingungen zu finden, wurde daher die Konzentration der Markierungsreagenzien schrittweise reduziert mit dem Ziel, eine gerade noch durchgängige Markierung zu erzeugen, die aber gleichzeitig dünn genug ist, um einzelne Lokalisationen zu ermöglichen. Die fixierten und markierten Zellen wurden dann am Mikroskop unter TIRF-Bedingungen betrachtet, Zeitserien mit einer Belichtungszeit von 50 ms und einer Länge von bis zu 10.000 Bildern aufgenommen und anschließend mit der Analysesoftware ausgewertet. Für die Messungen befanden sich die Zellen in einem 10 mM MOPS-Puffer mit einer Cu(II) Konzentration von 20 μ M und wurden entsprechend ihrer Absorptionsbande mit einem passenden Laser bei 488 nm (0,6 mW), 561 nm (0,6 mW) oder 640 nm (1,1 mW) angeregt. Zusätzlich wurde vor Zugabe der Kupferlösung ein Fluoreszenzbild der beobachteten Zelle aufgenommen, um später die Ergebnisse vergleichen zu können.

Abbildung 5.7 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung am Beispiel einer Fibroblastenzelle, deren Mikrotubuli mit der Fluoreszenzsonde Atto633-Bpy-Ala-Biotin markiert wurde. Dazu wurde eine Kombination aus Primär-, biotinyliertem Sekundärantikörper und Streptavidin eingesetzt. Es wurden 4.000 Einzelbilder aufgenommen, die einen Bereich von 256 x 256 Bildpunkten umfassen. Das hochaufgelöste Bild wurde mit der Analysesoftware RapidSTORM (Version 2.21) aus den Einzelaufnahmen der Bildserie rekonstruiert und für die Abbildung rot eingefärbt. Die Überlagerung mit dem herkömmlichen Fluoreszenzbild verdeutlicht die geringere Ausdehnung der Filamente, die nun nicht mehr durch das beugungsbegrenzte Auflösungsvermögen bestimmt wird. Dies geht auch aus den abgebildeten Intensitätsprofilen einzelner Fasern hervor. Diese zeigen im Fluoreszenzbild eine Halbwertsbreite von etwa 370 nm und liegen damit knapp über der theoretisch erreichbaren

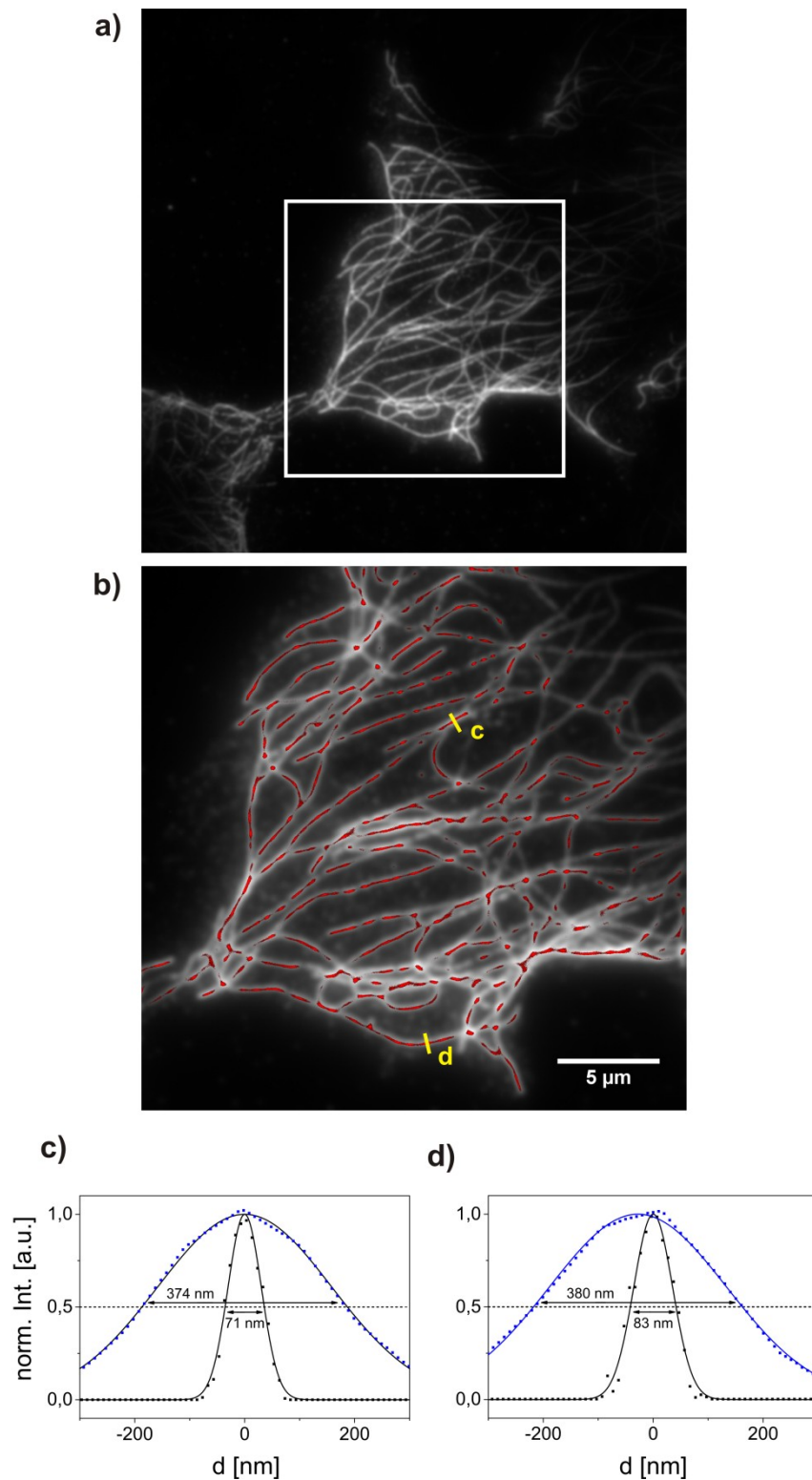


Abbildung 5.7: Ergebnis der Rekonstruktion einer Fibroblastenzelle, Mikrotubuli markiert mit Atto633-Bpy-Ala-Biotin; **a)** konventionelles Fluoreszenzbild; **b)** Überlagerung aus Fluoreszenzbild (Graustufen) und hochauflöstem Bild (rot); **c)** und **d)** Intensitätsprofil einer Mikrotubulinfaser, Vergleich von Fluoreszenzbild (blau) und Rekonstruktion (schwarz).

halben Wellenlänge der emittierten Strahlung, wohingegen die rekonstruierten Fasern mit einer Halbwertsbreite von etwa 70 nm deutlich unterhalb der Auflösungsgrenze liegen.

Zu beachten ist hierbei, dass die bestimmte Halbwertsbreite nicht dem tatsächlichen Auflösungsvermögen des optischen Systems gleichzusetzen ist, sondern lediglich eine Art Referenzwert darstellt, der es ermöglicht, die Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Methoden durch recht einfache Mittel zu vergleichen. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass die hier betrachteten Mikrotubuli, bedingt durch die Markierungsstrategie, eine Ausdehnung von etwa 80 nm besitzen, da sich die Kombination von Primär-, Sekundär-Antikörper, Biotin-PEG-Linker und Streptavidin zu einer Länge von 30 bis 40 nm addieren und somit den Durchmesser der beobachteten Struktur auf eine entsprechende Breite ausweiten. Daraus lässt sich ableiten, dass die hier erreichten Werte nicht durch das Auflösungsvermögen der Methode begrenzt werden, sondern die tatsächliche Größe der Struktur wiedergeben und letztendlich durch die verwendete Markierungsstrategie limitiert werden. Folglich könnte mit dieser Methode unter Verwendung einer alternativen Färbung, z.B. die direkte Kopplung der Fluoreszenzsonde an die Zielstruktur, auch eine höhere Auflösung erzielt werden.

Bei genauer Betrachtung der Rekonstruktion fällt auf, dass die Filamente nicht durchgehend, sondern nur als Fragmente der eigentlichen Fasern abgebildet werden. Eine mögliche Ursache ist die ungenügende Markierungsdichte, ausgelöst durch die starke Reduktion der Markierungsreagenzien, die keine durchgängige Markierung sicherstellt. Auch denkbar ist eine Beschädigung der Proteinstruktur durch die vorangegangene Probenpräparation, so dass tatsächlich nur noch Bruchstücke der Fasern vorliegen. Da bevorzugt Kreuzungspunkte nicht abgebildet werden, in denen die Farbstoffdichte aufgrund der übereinander liegenden Fasern besonders hoch sein sollte, wird auch davon ausgegangen, dass die Markierungsdichte an diesen Stellen zu hoch ist. Dies führt zur Überlagerung von einzelnen Emittern im An-Zustand und macht eine Lokalisation in diesem Bereich unmöglich.

5.4 Chemisches Multiplexing

Zur Aufklärung von Aufbau und Abläufen auf zellulärer Ebene ist es von großem Interesse, mehrere Strukturen gleichzeitig beobachten zu können und so ihre räumliche Lage zueinander und mögliche Interaktionen untereinander, untersuchen zu können.^[87] Um die jeweiligen Strukturen zu unterscheiden können unterschiedliche Eigenschaften der zur Markierung eingesetzten Sonden ausgenutzt werden. In der Lichtmikroskopie etablierte Methoden nutzen hierzu Farbstoffe mit spektral weit auseinander liegenden Emissionsbanden (spektrales Multiplexing)^[88] oder unterschiedlichen Fluoreszenzlebensdauern (FLIM, Pattern-Matching)^[89] aber auch hierzu völlig orthogonale Effekte, wie die Emission von Positronen (PET),^[90] Wechselwirkung mit Elektronen (Elektronenmikroskopie)^[91] oder die Emission außerhalb des sichtbaren Spektrums (MRI)^[92] können hierfür eingesetzt werden. All diese Methoden haben ihre Grenzen und es ist daher auch nicht möglich, unendlich viele Strukturen gleichzeitig aufzunehmen, vielmehr wird es mit steigender Anzahl zunehmend schwieriger, und besonders die Kombination unterschiedlicher Methoden ist mit erheblichem Aufwand verbunden. So können etwa durch spektrale Separation maximal drei Kanäle voneinander getrennt werden, ohne signifikante Überlagerung zu erzeugen. Um weitere Strukturen gleichzeitig betrachten zu können, müssen zusätzliche Parameter zur Unterscheidung herangezogen werden. Eine Möglichkeit ist, weitere Farbstoffe aufgrund ihrer Fluoreszenzlebensdauer voneinander zu trennen. Dazu ist jedoch ein erheblicher Mehraufwand bezüglich der eingesetzten Elektronik notwendig, da zusätzlich zur Fluoreszenzintensität, die in Standardfluoreszenzmikroskopen durch eine CCD oder CMOS basierte Kamera ausgewertet wird, noch eine zeitkorrelierte Einzelphotonenstatistik bestimmt werden muss. Dies geschieht mittels einzelphotonenempfindlicher Detektoren (Lawinen-Photo-Dioden, APD) und entsprechender Signalverarbeitung mit zeitlicher Auflösung im Pikosekunden-Bereich (Time-Correlated-Single-Photon-Counting, TCSPC). Ein weiterer Nachteil ist die längere Messzeit, da die Probe Punkt für Punkt abgerastert werden muss. Diese Technik wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Sauer noch erweitert, indem nicht nur die Fluoreszenzlebenszeit sondern auch noch das Emissionsspektrum zur Analyse herangezogen wird.^[93] Das ermöglicht zwar die zuverlässige Unterscheidung von bis zu neun Farbstoffen mit nahezu identischen spektralen Eigenschaften, führt aber auch zu einem komplexen Analyseverfahren, das unter anderem die Aufnahme von Referenzspektren der untersuchten Probe voraussetzt.

Basierend auf dem chemischen Schalten lassen sich die hier vorgestellten Fluoreszenzsonden für ein chemisches Multiplexing einsetzen, das einen zusätzlichen Kanal bereitstellt.^[94] Durch die völlige Orthogonalität ist dieser Ansatz mit allen zuvor beschriebenen Methoden kompatibel, wodurch sich effektiv eine Verdopplung der beobachtbaren Kanäle erreichen lässt. Da nur ein einziger spektraler Kanal notwendig ist, tritt keine chromatische Aberration auf, und entsprechende Korrekturen werden überflüssig. Zudem wird nur eine Anregungsquelle sowie alle optischen Elemente nur für diesen Wellenlängenbereich benötigt. Wegen dieser geringen Anforderungen eignet sich die Methode besonders gut für Systeme, bei denen das Implementieren zusätzlicher Wellenlängenbereiche nur unter enormem technischem Aufwand realisiert werden kann, wie z.B. der STED-Mikroskopie.

Zur Anwendung der Methode ist lediglich die Färbung der beiden Zielstrukturen mit je einem Fluoreszenzfarbstoff und einer Sonde, gekoppelt an einen beliebigen Farbstoff, erforderlich. Da die Trennung der beiden Kanäle ausschließlich über das chemische Schalten erfolgt, gibt es in der Wahl des Farbstoffpaares keine Einschränkung. Somit kann zweimal der gleiche oder auch völlig unterschiedliche Farbstoffe eingesetzt werden, ausschlaggebend ist nur eine möglichst starke Fluoreszenzlöschung der Sonde. Da das Ergebnis maßgeblich durch die Qualität der Färbung beeinflusst wird, sollte hier auf eine durchgängig hohe Markierungsdichte und wenig Hintergrund geachtet werden. Dementsprechend besteht der größte Aufwand in der Ausarbeitung eines geeigneten Färbeprotokolls, der jedoch für jede Art von Fluoreszenzmikroskopie anfällt. Für die folgenden Ergebnisse wurde zur Färbung der Zielstrukturen das zuvor beschriebene System aus biotinyliertem Antikörper, Streptavidin und biotinylierter Sonde eingesetzt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, müssen zusätzlich zu den in Kapitel 1.6 (Markierungsstrategien) aufgeführten Anforderungen noch weitere Punkte beachtet werden. So ist es hier notwendig, dass beide Strukturen in etwa gleich dicht markiert sind und eine vergleichbare Helligkeit aufweisen. Damit wird sichergestellt, dass beide Strukturen erkennbar sind und ermöglicht das Auswählen eines geeigneten Bereiches für die Aufnahme. Außerdem ist die Fluoreszenzsonde im An-Zustand etwa um den Faktor 10 heller als im Aus-Zustand. Folglich sollte die mit der Sonde markierte Struktur nicht deutlich heller sein als die zweite Struktur, da sie sonst auch im Aus-Zustand noch zu sehen sein wird. Zudem muss die mit dem herkömmlichen Farbstoff markierte Struktur möglichst vollständig gebleicht werden. Je dichter die Markierung, desto länger muss mit hoher Leistung auf die Probe eingestrahlt werden. Die Fluoreszenzsonde besitzt zwar im Aus-Zustand eine deutlich erhöhte Photostabilität, wird aber mit der Zeit auch gebleicht. Im Extremfall werden so beide Strukturen völlig zerstört.

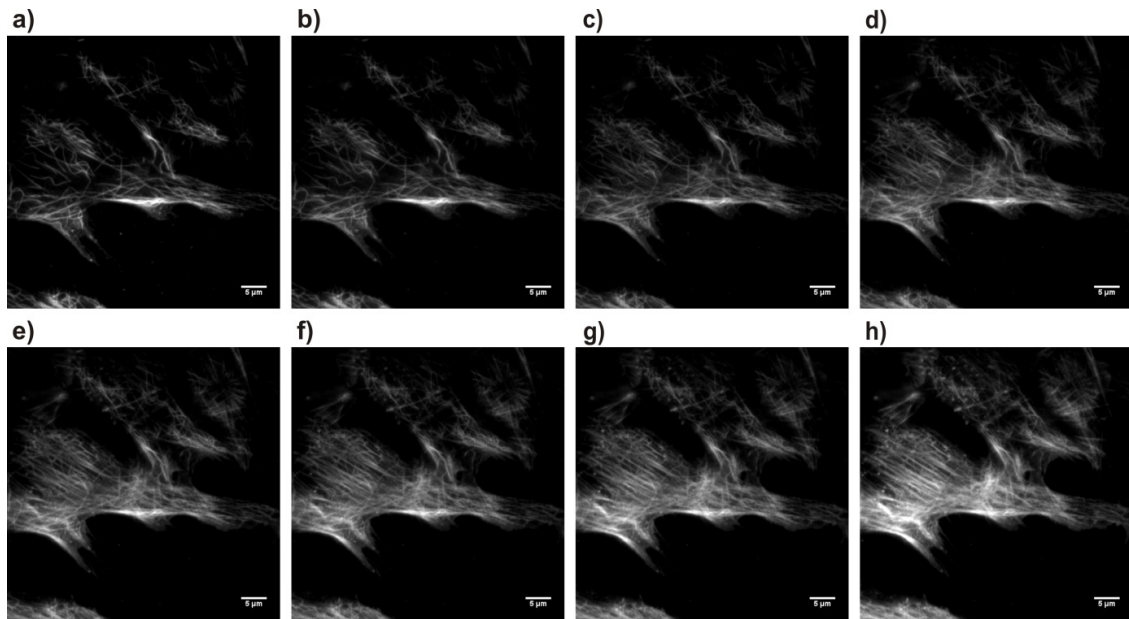


Abbildung 5.8: TIRF-Aufnahmen einer Fibroblastenzelle mit markierten Aktin-Filamenten (Atto633-Phalloidin) und Mikrotubuli (Atto633-Bpy-Ala-Biotin); die Zeitserie zeigt die zunehmende Markierungsdichte der Aktinfilamente, ausgehend von **a)** kein Aktin markiert, bis **h)** hohe Markierungsdichte.

Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurde eine Markierungsstrategie entwickelt, die durch einfache Mittel zu einem verwertbaren Ergebnis führt. Wie in Abbildung 5.8 gezeigt, wird zunächst die filigrane Struktur, in diesem Beispiel die Mikrotubuli, durch Einsatz eines Überschusses an Markierungsreagenzien mit maximaler Dichte markiert. Dies ist notwendig, da die zweite Struktur, hier Aktin, deutlich dickere Faserbündel ausbildet, die auch entsprechend mehr Farbstoff aufnehmen können. Im nächsten Schritt wurde dann durch eine niedrige Konzentration der Markierungsreagenzien eine langsame, zeitlich verfolgbare Zunahme der Farbstoffdichte erzeugt. Dadurch kann ein geeigneter Zeitpunkt ausgewählt werden, zu dem die zweite Struktur ausreichend stark gefärbt ist aber noch nicht die erste Struktur überdeckt, wie es am Ende der Zeitserie zu sehen ist. Die so präparierten Zellen können nun für das chemische Multiplexing eingesetzt werden.

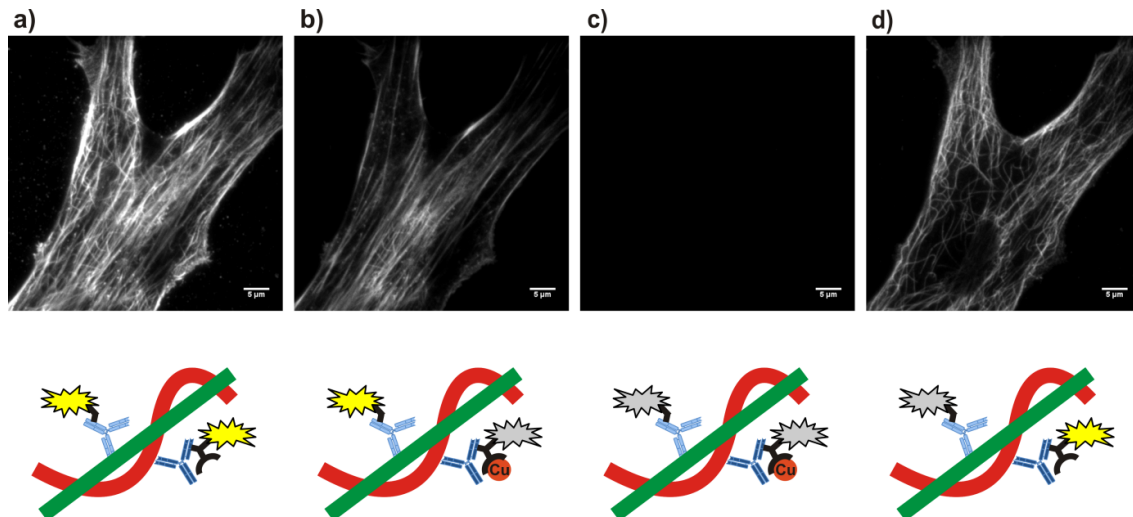


Abbildung 5.9: Die obere Reihe zeigt TIRF-Aufnahmen einer Fibroblastenzelle mit immunofluoreszenzmarkierten Aktin-Filamenten (Atto633-Phalloidin) und Mikrotubuli (Atto633-Bpy-Ala-Biotin); die untere Reihe zeigt die schematische Darstellung der Markierung **a)** beide Strukturen sichtbar; **b)** nach Zugabe von Cu(II) ist nur noch eine Struktur sichtbar; **c)** nach Bleichen der ersten Struktur ist keine Struktur sichtbar; **d)** nach Zugabe von EDTA wird die zweite Struktur sichtbar.

Die Durchführung der Messung ist in Abbildung 5.9 durch TIRF-Aufnahmen der einzelnen Arbeitsschritte und der zugehörigen schematischen Darstellung der Markierung gezeigt. Die fixierte Fibroblastenzelle enthält zwei Strukturen, die jeweils mit dem gleichen Farbstoff (Atto633) markiert wurden, wobei die Aktinfilamente mit dem herkömmlichen Farbstoff, die Mikrotubuli dagegen mit der schaltbaren Fluoreszenzsonde gefärbt wurden. Aufnahme a) zeigt beide Filamente, da sich wie in der schematischen Darstellung erkennbar, beide Farbstoffe in einem fluoreszenten Zustand befinden. Durch Zugabe von Cu(II) wird die Sonde in einen dunklen Zustand geschaltet, mit dem Ergebnis, dass in b) nur noch Aktin zu erkennen ist, das sich in Form von langen, geraden Fasern über die gesamte Zelle spannt. Nach Aufnahme dieser Struktur wird der Farbstoff mit Hilfe des Anregungslasers gebleicht, bis die in c) gezeigte Fluoreszenz deutlich reduziert wurde. Im letzten Schritt wird durch Zugabe von EDTA das vorhandene Kupfer gebunden und somit die Fluoreszenz der Sonde wiederhergestellt. Aufnahme d) zeigt die jetzt sichtbaren Mikrotubuli, die sich in ihrer Form deutlich von den Aktinfilamenten unterscheiden. Auf diese Weise werden zwei Bilder aufgenommen, die jeweils nur eine der beiden Strukturen zeigen und somit die Trennung zweier mit identischen Farbstoffen markierter Strukturen demonstrieren. Das eindrucksvolle Ergebnis dieser Methode ist in Abbildung 5.10 zu sehen, in der das

konventionelle TIRF-Bild und die Überlagerung der beiden unabhängigen „Farbkanäle“, gegenüber stehen. Das TIRF-Bild erlaubt lediglich das Auslesen unterschiedlicher Intensitätswerte, ohne die Möglichkeit sie einer bestimmten Struktur zuzuordnen. In der Überlagerung hingegen, sind die beiden Strukturen deutlich voneinander getrennt.

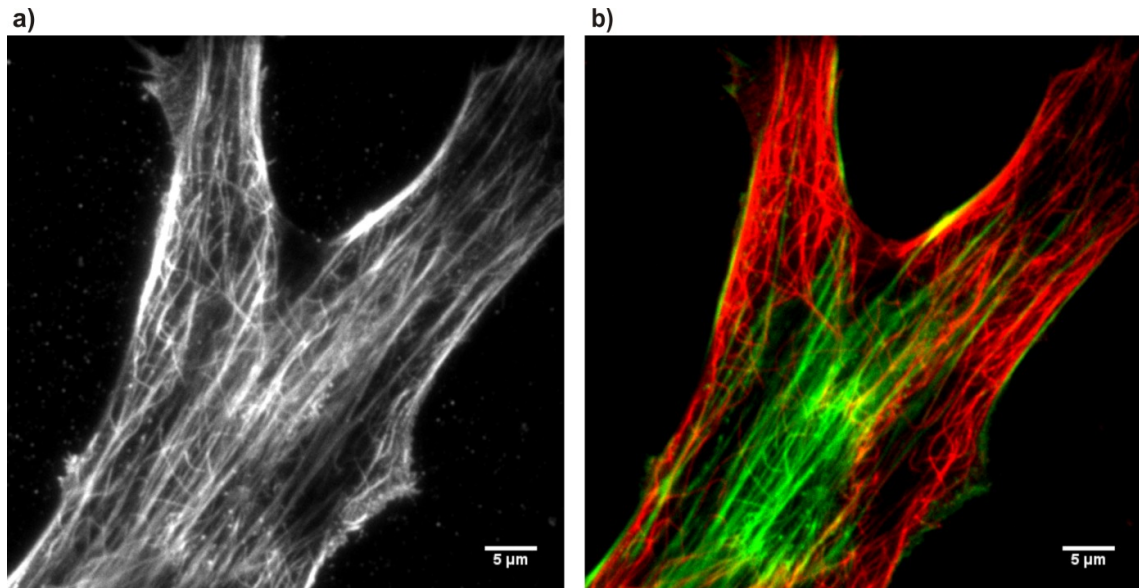


Abbildung 5.10: Immunofluoreszenzmarkierte Filamente (Atto633-Bpy) einer Fibroblastenzelle, Aktin (grün) und Mikrotubuli (rot); **a)** konventionelle TIRF-Aufnahme **b)** Überlagerung der beiden Einzelbilder aus Abbildung 5.9 b) und d).

STED-Multiplexing

Nachdem aussagekräftige und reproduzierbar gute Ergebnisse erzielt werden konnten, sollte die Vielseitigkeit der Methode durch Anwendung in Kombination mit etablierten Techniken demonstriert werden. Hierzu wurden in einer Kooperation mit der Firma PicoQuant aus Berlin Messungen an einer modifizierten Microtime 200 STED durchgeführt und anhand der erhaltenen, mehrfarbigen und hochauflösten Bilder das Potenzial der Methode gezeigt. Durch die zuvor beschriebene, einfache Anwendbarkeit lässt sich diese Methode problemlos mit der STED-Mikroskopie kombinieren. Dabei bietet sich diese Methode besonders an, da weitere spektrale Kanäle für ein Multiplexing an einem STED-Setup nur mit enormem technischem Aufwand realisiert werden können. Zu beachten sind hier jedoch die weitaus höheren Ansprüche an die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe besonders hinsichtlich ihrer Photostabilität, da der STED-Laser mit sehr hoher Leistung arbeitet und daher eine hohe Belastung für die Farbstoffe darstellt. Diese ist notwendig, da die erreichbare Auflösung proportional zur Intensität des STED-Lasers ist und somit indirekt durch die Photostabilität des eingesetzten Farbstoffes bestimmt wird. Neben der direkten Photozerstörung durch die hohe Anregungsleistung können zusätzliche Absorptionsbanden im Wellenlängenbereich des STED-Laser dazu führen, dass Farbstoffe, die unter gewöhnlichen Bedingungen eine gute Photostabilität zeigen, hier versagen. Speziell im Rahmen dieser Arbeit kam hinzu, dass das Mikroskop nur mit einer Anregungswellenlänge bei 640 nm arbeitet und daher die Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe auf diesen Bereich beschränkt war, wodurch eben auch die Synthese entsprechender Sonden notwendig wurde. Hier zeigte sich bei Vorversuchen, dass sowohl Sonden mit Atto633 als auch Atto665 die notwendigen Bedingungen erfüllen und konkurrenzfähige STED-Aufnahmen lieferten, wobei Atto665 wegen der geringfügig niedrigeren Photostabilität etwas weniger gut geeignet ist und daher Atto633 für die Messungen favorisiert wurde. Die Durchführung der Messung entspricht im wesentlichen dem bereits beschriebenen Vorgehen. Die Zellen wurden nach dem etablierten Protokoll fixiert, permeabilisiert, mit schaltbaren Fluoreszenzsonden eingefärbt und für die Dauer der Experimente in PBS-Puffer aufbewahrt. Als Mikroskop kommt nun ein konfokaler Aufbau zum Einsatz, der für die Hochauflösung um einen STED-Laser ergänzt ist. Dadurch ist man nicht mehr, wie bei den TIRF-Aufnahmen, auf die unterste Zellschicht, nahe der Glasoberfläche beschränkt, muss dafür aber mehr Hintergrundfluoreszenz in Kauf nehmen. Durch das

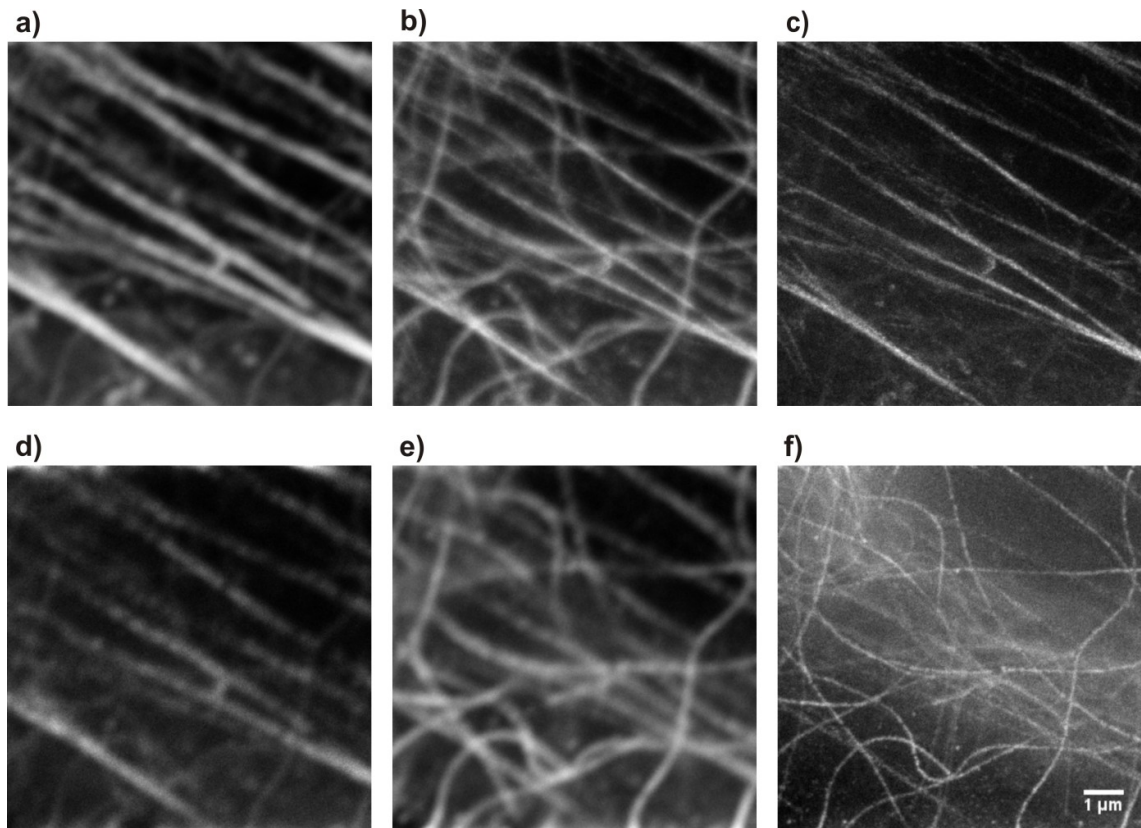


Abbildung 5.11: Ausschnitte einer Fibroblastenzelle, fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente (Atto647N) und Mikrotubuli (Atto633-Bpy-Ala-Biotin); nach Zugabe von Cu(II) ist nur Aktin sichtbar, **a)** konfokale Aufnahme; **b)** STED-Aufnahme; **c)** STED-Aufnahme mit time-gate, **d)** nach dem Bleichen deutliche Intensitätsabnahme; nach Zugabe von EDTA wird die Fluoreszenz der Mikrotubuli wieder hergestellt, **e)** konfokale Aufnahme, **f)** STED-Aufnahme mit time-gate.

Abrastern der Probe wird zusätzlich die Zeitauflösung reduziert, sodass je nach Größe des betrachteten Bildausschnittes und Belichtungszeit, die Erzeugung eines Bildes mehrere Minuten in Anspruch nehmen kann. Zudem entsteht eine starke Belastung der Farbstoffe durch die hohe Anregungsleistung des STED-Lasers, die zu vorzeitigem Bleichen führt. Deshalb wurde zunächst bei hoher Abtastrate mit niedriger Verweildauer ein großer Bereich im rein konfokalen Modus aufgenommen, um eine geeignete Stelle für die eigentliche Messung zu identifizieren. An dieser wurden dann schrittweise die in Abbildung 5.11 gezeigten, für das Multiplexing notwendigen Aufnahmen gemacht. Der sichtbare Bereich besteht aus 300 x 300 Bildpunkten mit einer Punktgröße von jeweils 30 nm. Zunächst wurde eine konfokale Aufnahme von beiden Strukturen im hellen An-Zustand durchgeführt. Nach Zugabe einer Cu(II) Lösung wurde im Probenvolumen eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt und

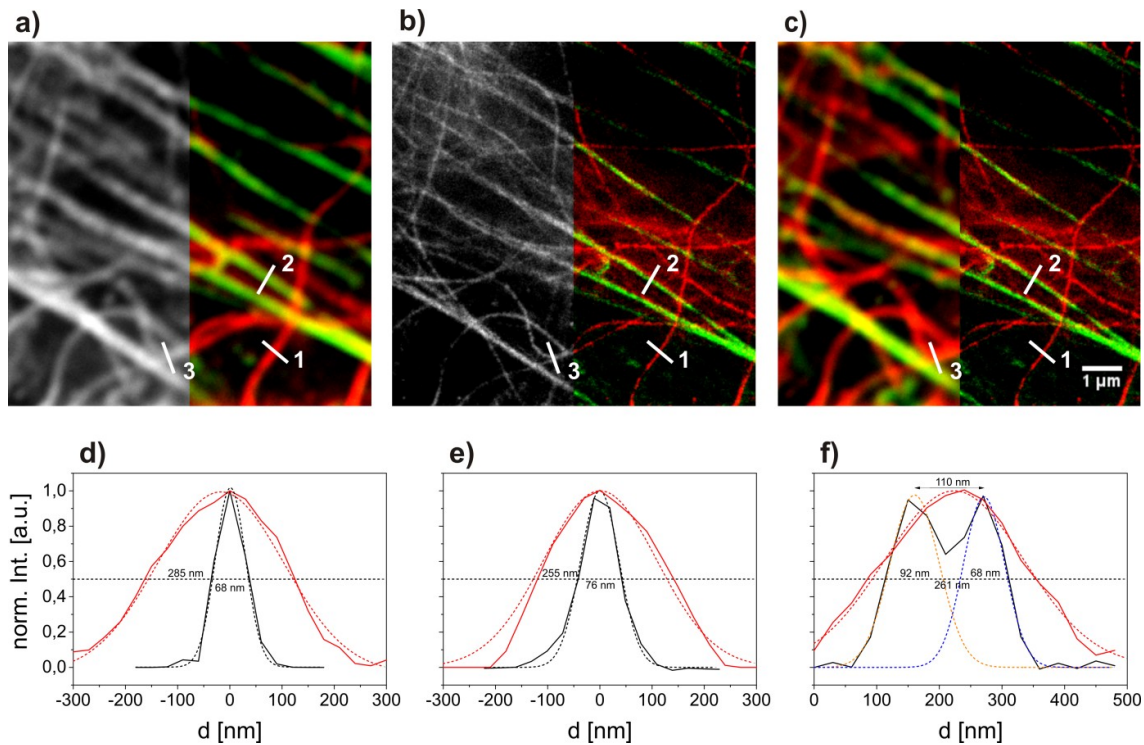


Abbildung 5.12: Ausschnitt einer Fibroblastenzelle und Intensitätsprofile der eingezeichneten Querschnitte. Die rechte Bildhälfte zeigt jeweils eine Überlagerung der zwei einzelnen Aufnahmen von Aktin (grün) und Mikrotubulin (rot). **a)** Konfokales Bild, Überlagerung aus 5.11 a) und e); **b)** STED-Bild, Überlagerung aus 5.11 c) und f); **c)** Vergleich von konfokalem und STED-Bild; **d)** Querschnitt (1), Mikrotubulin; **e)** Querschnitt (2), Aktin; **f)** Querschnitt (3), zwei dicht nebeneinander liegende Mikrotubuli.

dadurch die Fluoreszenz der Sonde „ausgeschaltet“. Daraufhin wurde eine konfokale, gefolgt von einer STED-Aufnahme durchgeführt, die jeweils nur noch die mit konventionellem Farbstoff markierte Struktur zeigen. Dabei dient erstere zur Quantifizierung des Intensitätsunterschiedes durch den Schaltvorgang, wohingegen die zweite zur Erzeugung des hochauflösten Bildes genutzt wird. Zusätzlich kann später durch Vergleich der beiden Bilder der Unterschied im Auflösungsvermögen der unterschiedlichen Methoden demonstriert werden. Im nächsten Schritt wurde der Farbstoff durch Abrastern der Probe mit aktiviertem STED-Laser ausgebleicht und anschließend durch Zugabe von EDTA im Überschuss die Fluoreszenz der zweiten Struktur „eingeschaltet“. Diese wurde nun ebenfalls im konfokalen und STED-Modus aufgenommen. Aus den so erhaltenen Daten, lassen sich dann die in Abbildung 5.12 dargestellten zweifarbigen Bilder generieren. In a) sind das konfokale Bild (links), das keinerlei Unterscheidung der beiden Strukturen erlaubt und die Überlagerung der

beiden einzelnen Bilder, die durch das Schalten der Fluoreszenzsonden eine scharfe Abgrenzung der beiden Filamente ermöglicht, gegenübergestellt. In b) ist eine äquivalente Darstellung der hochaufgelösten STED-Aufnahmen zu sehen und c) zeigt schließlich den Vergleich von konfokaler und STED-Aufnahme. Das Ergebnis der Analyse zeigt nicht nur die scharf voneinander abgegrenzten Strukturen, sondern auch die verbesserte Auflösung anhand der deutlich feiner abgebildeten Filamente. Dieser erste Eindruck wird auch durch Intensitätsprofile, die den Querschnitt einzelner Filamente zeigen, bestätigt. Hier ist eine deutliche Reduzierung der Halbwertsbreite zu sehen, die mit etwa 70 nm weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegt. Auch hier gilt es zu beachten, dass die eingesetzte Markierungsstrategie, die Ausdehnung der Fasern auf etwa 70 nm ausweitet. Deshalb liegt es nahe, dass die Auflösung auch in diesem Fall nicht durch die Mikroskopie limitiert wird und durch alternative Markierungsansätze weiter gesteigert werden kann. Selbst Filamente, die im konfokalen Bild nur als einzelner dicker Strang abgebildet werden, lassen sich als zwei separate Fasern auflösen.

Bei der späteren Auswertung der Daten zeigte sich, dass durch das Bleichen mit dem STED-Laser auch die Fluoreszenzintensität der ausgeschalteten Sonde deutlich reduziert und somit das Intensitätsverhältnis der beiden Strukturen negativ beeinflusst wurde. Durch Zugabe der Kupferlösung wurde die Fluoreszenzintensität etwa um einen Faktor von 9 verringert, wohingegen die Wiederherstellung durch EDTA nach dem Bleichen lediglich einen Faktor von 3 regenerieren konnte. Besonders mit Blick auf die vorangegangenen Experimente im TIRF-Modus, bei denen das Bleichen mit dem Anregungslaser vorgenommen wurde und nahezu keinen Einfluss auf die Sonde im ausgeschalteten Zustand zeigte, lässt sich daraus folgern, dass entweder die hohe Anregungsleistung oder die rotverschobene Anregungswellenlänge des STED-Lasers, zu einem verstärkten Bleichen der „ausgeschalteten“ Fluoreszenzsonde beitragen. Dieses Problem kann umgangen werden, indem auch im konfokalen Mikroskop nur der Anregungs- anstelle des STED-Lasers zum Bleichen eingesetzt wird, wodurch hier ein enormes Verbesserungspotential besteht.

3-Farben-STED-Messungen

Prinzipiell ist es möglich, das chemische Multiplexing auch mit anderen Methoden zu kombinieren, um noch mehr unabhängige Kanäle zu erzeugen. Das von PicoQuant entwickelte Verfahren Pattern-Matching nutzt hierzu den Unterschied in der Fluoreszenzlebensdauer von Farbstoffen, die im gleichen spektralen Bereich emittieren. Es wurde bereits gezeigt, dass mit dieser Methode bis zu drei unterschiedliche Strukturen in STED-Aufnahmen unterschieden werden können.^[93]

Durch Kombination mit dem chemischen Multiplexing könnte diese Anzahl, mit geringem Aufwand, um eine zusätzliche Struktur erweitert werden. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden entsprechend präparierte Zellen hergestellt, in denen drei Strukturen durch Farbstoffe markiert wurden, die nicht aufgrund ihrer Emissionswellenlänge unterschieden werden können. Zwei dieser Farbstoffe können dann durch ihre unterschiedliche Fluoreszenzlebensdauer getrennt werden, der Dritte ist Bestandteil einer Fluoreszenzsonde und wird über das chemische Schalten abgetrennt.

Als Zielsystem wurden T-Zellen gewählt, die im Rahmen des Switch-Click Verbundes auf ihre Rolle bei der Ausbreitung von HI-Viren untersucht werden sollen. Von besonderem Interesse sind hierbei Rezeptorcluster, die aufgrund ihrer geringen Größe unterhalb der Auflösungsgrenze konventioneller Mikroskope liegen und daher nur ungenügend untersucht sind. Die Aufnahme hochaufgelöster, mehrfarbiger Bilder verspricht daher, wichtige Erkenntnisse über Größe, Zusammensetzung und Interaktion der Proteincluster mit anderen Proteinen zu liefern und somit einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der intrazellulären Abläufe bei Infektion mit HIV zu leisten. Neben den Rezeptorclustern wurden Mikrotubuli und Aktin als weitere Strukturen gewählt, da sie sich in den vorangegangenen Experimenten bewährt haben.

Auch hier ist die Färbung der Zielstrukturen eine der aufwendigsten Aufgaben. Wie zuvor wird Aktin über fluoreszenzmarkiertes Phalloidin gefärbt. Die beiden anderen Strukturen wurden jeweils über Primär- und Sekundärantikörper markiert, um auch hier die Markierungsdichte möglichst hoch zu halten. Besonders die kleinen Rezeptorcluster, die nur wenige Farbstoffmoleküle tragen, sollten damit vor zu schnellem Ausbleichen geschützt werden. Auch zu beachten ist, dass beim Einsatz von vier Antikörpern die Auswahl durch Kreuzreaktivitäten merklich eingeschränkt wird und die Spezifität kontrolliert werden muss.

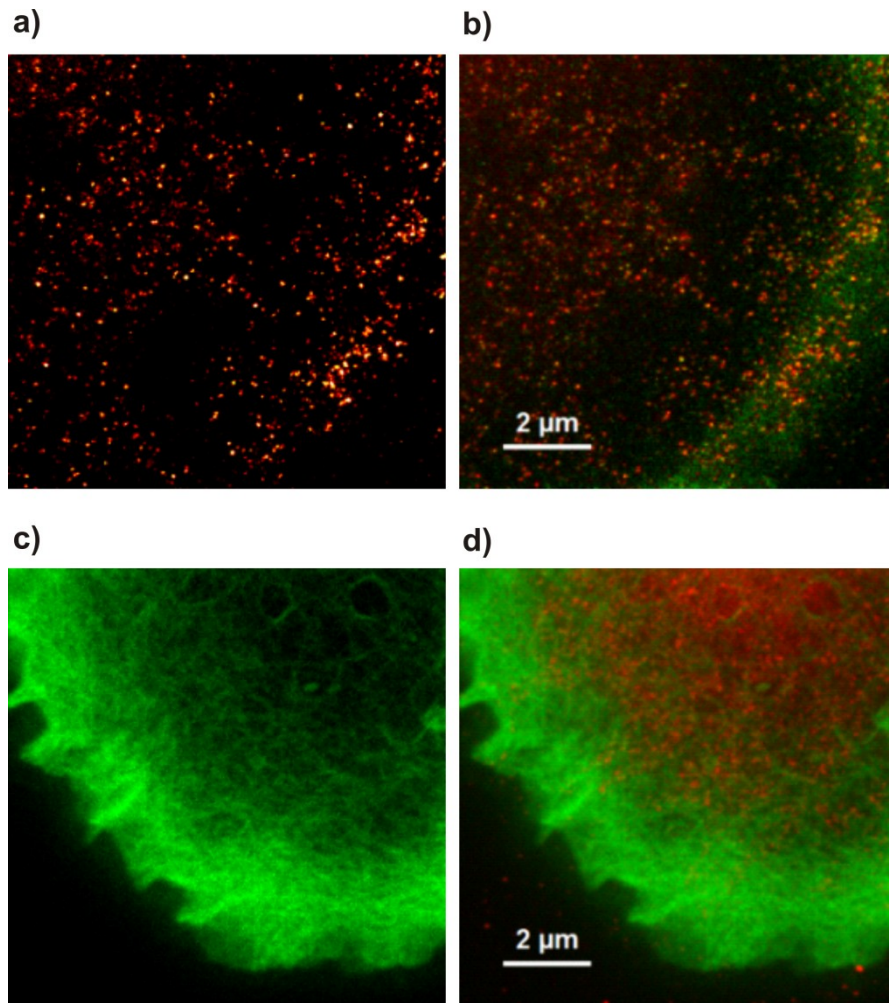


Abbildung 5.13: STED-Aufnahmen markierter Rezeptorcluster (Atto647N) und Aktinfilamente (Atto633) in T-Zellen, Trennung durch Pattern-Matching; **a)** Rezeptorcluster; **b)** Rezeptorcluster und Aktinring; **c)** Aktinfilamente; **d)** Aktinfilamente und Rezeptorcluster.

Abbildung 5.13 zeigt Aufnahmen einer dreifach markierten T-Zelle, in der Aktinfilamente mit Atto633, Rezeptorcluster mit Atto647N und Mikrotubuli mit der Fluoreszenzsonde Atto633-Bpy-Ala-Biotin eingefärbt wurden. In a) sind die Cluster als scharf abgegrenzte, punktförmige Objekte zu sehen, während c) das filigrane Aktinnetzwerk, mit hoher Dichte im Randbereich der Zelle zeigt. Die beobachteten Formen sind typisch für die untersuchten Strukturen und sprechen für eine erfolgreiche Probenpräparation und Färbung. In b) und d) sind jeweils die entsprechenden Ergebnisse des Pattern-Matching abgebildet, das eine Unterscheidung der beiden Strukturen ermöglicht. In Abbildung 5.14 sind zudem die mit der Fluoreszenzsonde

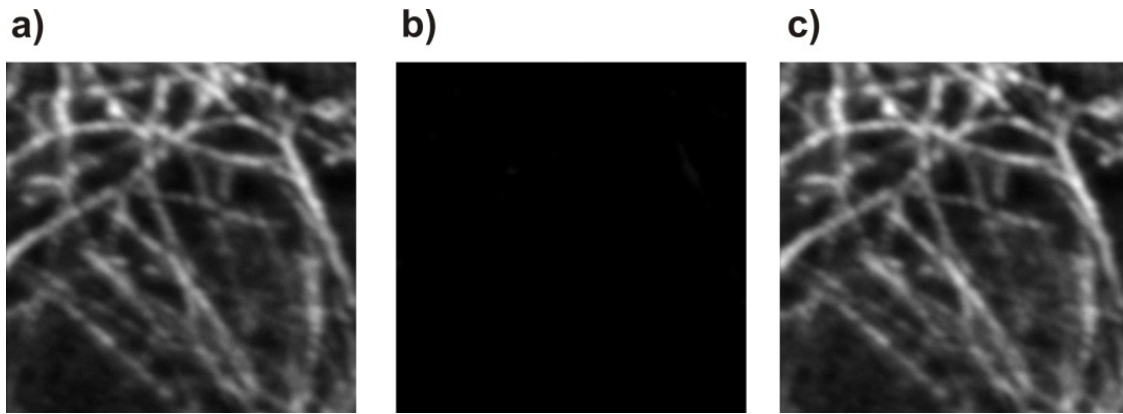


Abbildung 5.14: Mikrotubuli in T-Zelle, markiert mit Atto633-Bpy-Ala-Biotin; **a)** ohne Cu(II), deutlich sichtbare Filamente; **b)** nach Zugabe von 20 μM Cu(II), Löschung der Fluoreszenz; **c)** Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenz durch Zugabe von 100 μM EDTA.

markierten Mikrotubuli abgebildet, deren Fluoreszenz durch Zugabe von Cu(II) Ionen ausgeschaltet und mit EDTA wiederhergestellt werden kann.

Aus den Ergebnissen der Messung geht hervor, dass alle Zielstrukturen erfolgreich markiert wurden und sich für die Aufnahme hochauflöster STED-Bilder eignen. Die beiden herkömmlichen Farbstoffe Atto647N und Atto633 konnten durch das Pattern-Matching voneinander abgetrennt und parallel beobachtet werden. Auch die Funktionsfähigkeit der Fluoreszenzsonde konnte durch das reversible Schalten nachgewiesen werden. Lediglich die kombinierte Darstellung der drei Strukturen war nicht möglich, da kein Bereich gefunden wurde, in dem alle Strukturen gleichzeitig sichtbar sind. Ein großes Problem ist hierbei die kugelförmige Gestalt der T-Zellen mit großer Ausdehnung entlang der z-Achse. Zellbestandteile im Inneren, wie das Mikrotubulin, verteilen sich über das gesamte Volumen, wohingegen die membrangebundenen Rezeptorcluster nur in einem dünnen Bereich direkt an der Oberfläche vorliegen. Dadurch wird es nahezu unmöglich, geeignete Bereiche zu finden, in denen alle drei Strukturen beobachtet werden können. Dieses Problem kann durch die Wahl besser geeigneter Proben umgangen werden und macht die untersuchte Methode zu einem vielversprechenden Ansatz.

Teil III.

Diskussion und Ausblick

6 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Anforderungen an eine funktionsfähige, für die Lokalisationsmikroskopie nutzbare Fluoreszenzsonde ermittelt und zur Umsetzung notwendige Molekülgruppen identifiziert. Basierend darauf, wurden unterschiedlich Strategien zur Synthese einer solchen verfolgt, mehrere chemisch schaltbare Fluoreszenzfarbstoffe dargestellt und bezüglich ihrer spektralen Eigenschaften charakterisiert. Letztendlich konnte ein modulares Design, basierend auf einer unnatürlichen Aminosäure, durch seine überlegenen Eigenschaften überzeugen und für die weiteren Experimente eingesetzt werden. Dieses System zeichnet sich unter anderem durch seine geringe Größe, chemische Stabilität und leichte Handhabbarkeit aus, aber vor allem auch durch seine Vielseitigkeit, da individuell angepasste Kombinationen aus den einzelnen Gruppen einfach zugänglich sind. In Ensemble-Messungen wurde gezeigt, dass die synthetisierten Fluoreszenzsonden durch Koordination von Cu(II) Ionen effizient und reversibel in einen dunklen Zustand geschaltet werden können. Problematisch war hier die nicht konstante Extinktion, ausgelöst durch Effekte wie Aggregatbildung und Adsorption, die nicht verhindert werden konnten. Diese Überlagerung unterschiedlicher Prozesse mit Auswirkung auf die Fluoreszenz, erschwert die Quantifizierung der Löschung durch die Metallionen. Einige der hier eingesetzten Farbstoffe bestechen durch ihre herausragenden Eigenschaften hinsichtlich Photostabilität und Helligkeit. Dennoch ist eine Verbesserung dieser immer ein wünschenswertes Ziel. Eine interessante Entwicklung auf diesem Gebiet sind die zyklisch substituierten Rhodaminderivate von Prof. Luke Lavis^[95] sowie die fluorierten Bodipy-Farbstoffen aus der Gruppe von Prof. G. Jung^[96] aber auch stabilisierend wirkende Zusätze, die im Fall der Self-Healing-Dyes aus der Gruppe von Prof. T. Cordes^[97] direkt in den Farbstoff integriert sind, tragen zur Verbesserung der Eigenschaften bei. Ebenso die Optimierung der Löslichkeit, die besonders bei Zellexperimenten ein entscheidender Faktor ist, um die Hintergrundfluoreszenz, ausgelöst durch unspezifische Bindung, gering zu halten und damit einen hohen Kontrast zu erreichen. Alternative Ansätze, wie der Einbau von Phosphonsäuregruppen oder der Einsatz von fluorogenen Farbstoffen, die erst nach erfolgreicher Bindung an die Zielstruktur fluoreszent werden, spielen hier eine wichtige Rolle.^[98]

Nicht alle Verbindungen konnten durch eine Linker-Gruppe so funktionalisiert werden, dass sie sich für eine Immobilisierung eignen und als Markierungsreagenz eingesetzt werden können. Diese können trotzdem, aufgrund ihres hohen An/Aus-Verhältnisses, als Indikator zum Nachweis eines entsprechenden Analyten (Zn(II), Cu(II), H⁺) eingesetzt werden. Ähnliche Verbindungen werden in wässrigen Systemen oder biologischen Zellen als Metallionen-Sensor oder pH-Indikator eingesetzt und sind Bestandteil aktueller Forschung. Weiterhin leisten sie einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der Prozesse, die an der Fluoreszenzlöschung beteiligt sind. Die hier zugrundeliegenden Elektronentransfermechanismen sind ein weit verbreiteter Effekt bei der Umwandlung von Lichtenergie in elektrische Energie und findet vielfache Anwendung, sei es bei der Photosynthese in komplexen, biologischen Systemen oder synthetisch erzeugten Farbstoffsolarzellen (Grätzel-Zelle). In diesem Zusammenhang bietet der hier synthetisierte Farbstoff BDP-Bpy interessante Eigenschaften und könnte als nützlicher Ligand für die typischerweise verwendeten Ruthenium-Komplexe dienen.

Durch Immobilisierung der vollständig funktionalisierten Fluoreszenzsonden über das Biotin-Streptavidin-System wurden Einzelmoleküloberflächen hergestellt, die eine Charakterisierung des Blinkverhaltens einzelner Emitter ermöglicht. Die extrahierten Intensitätsspektren wurden in diskrete Niveaus eingeteilt, die den Zuständen „An“, „Aus“ und „Gebleicht“ entsprechen. Aus diesen wurden dann Werte für Restfluoreszenz sowie Dauer und Häufigkeit der Zustände entnommen. Die erhaltenen Wahrscheinlichkeitsverteilungen folgen dem erwarteten Verlauf, der aus dem Gleichgewicht der zugrundeliegenden Komplexbildungsreaktion abgeleitet werden kann. Daraus lassen sich Werte für die kinetischen Parameter der Assoziation k_{On} und Dissoziation k_{Off} sowie die Gleichgewichtskonstante K bestimmen. Für die Fluoreszenzsonde Atto633-Bpy-Ala-Biotin ergaben sich die Werte $k_{\text{On}} = (7.22 \pm 0.08) 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{Off}} = (0.89 \pm 0.11) \text{ s}^{-1}$ und $K = (8.11 \pm 0.24) 10^6 \text{ M}^{-1}$, die gut mit bekannten Literaturwerten^[85] übereinstimmen. Die Werte der Restfluoreszenz liegen in einem Bereich von 10 % bis 15 % und sind in Tabelle 6.1 aufgelistet. Die gewonnenen Werte dienen nicht der detaillierten Charakterisierung der Sonden, sondern erlauben zudem das Abschätzen der Eignung für die Lokalisations-mikroskopie. Erschwert wurde die Auswertung durch die Inhomogenität der Daten, die eine automatisierte Analyse unmöglich machte und somit die Einteilung manuell durchgeführt werden musste. Eine softwarebasierte Erkennung der unterschiedlichen Zustände würde den benötigten Zeitaufwand enorm reduzieren und eine Verfälschung durch die subjektive Wahrnehmung der auswertenden Person vermeiden.

Tabelle 6.1: Fluoreszenzsonden mit Werten für Restfluoreszenz im Ensemble-, Einzelmolekül- und Zellexperiment.

Farbstoff	Restfluoreszenz [%]		
	Ensemble	Einzelmolekül	Zelle
Atto532	11 ± 3	12 ± 4	13 ± 5
Atto542	38 ± 16		18 ± 6
Atto565	46 ± 16		12 ± 6
Cy3B	22 ± 14	14 ± 5	14 ± 5
AZ474	36 ± 14		16 ± 6
Atto633	29 ± 13	11 ± 6	13 ± 5
AZ481	33 ± 14		13 ± 5
Atto665	37 ± 15	10 ± 4	12 ± 4

Die Fluoreszenzsonden wurden zur Markierung ausgewählter Zielstrukturen in fixierten Zellen eingesetzt. Hier konnte eine spezifische, durchgängige und kontrastreiche Färbung der Filamente mit niedriger Hintergrundfluoreszenz beobachtet werden. Auch der Schaltvorgang konnte durch geringe Mengen an Cu(II) Ionen ausgelöst und die Reversibilität nachgewiesen werden. Die Titrations zeigen eine sprunghafte Löschung, die bei Überschreiten eines Schwellenwertes erfolgt und erschwert damit die Kontrolle des Gleichgewichtes durch Einstellen einer bestimmten Kupferkonzentration. Die hier bestimmte Restfluoreszenz liegt im gleichen Bereich wie die Ergebnisse der Einzelmolekülexperimente und ist in Tabelle 6.1 aufgelistet.

Die gefärbten Zellen wurden für die Lokalisationsmikroskopie eingesetzt und mit Hilfe der Software RapidSTORM hochaufgelöste Bilder erzeugt. Aus den abgebildeten Filamenten konnten Halbwertsbreiten bestimmt werden, die mit einem Durchmesser von etwa 70 nm deutlich unter der Auflösungsgrenze konventioneller Mikroskopie liegt. Durch die eingesetzte Markierungsstrategie liegt die tatsächliche Ausdehnung der beobachteten Filamente in der gleichen Größenordnung und limitiert damit die maximal erreichbare Auflösung. Diese könnte durch alternative Markierungsmethoden, wie zum Beispiel der direkte Einbau von unnatürlichen, „click“-baren Aminosäuren in das Zielprotein, weiter gesteigert werden.^[99] Entsprechende Verbindungen sind Bestandteil

der laufenden Entwicklung im Rahmen des Switch-Click Projektes. Weiterhin wird die Qualität der Ergebnisse durch die nur mäßig kontrollierbare Kinetik und die im Vergleich zu den etablierten, lichtgetriebenen Methoden hohen Restfluoreszenz begrenzt. Um diese Werte zu verbessern sind unterschiedliche Ansatzpunkte denkbar: Durch alternative Liganden können Art und Anzahl der koordinierenden Atome variiert und dadurch die Kinetik des Schaltprozesses sowie die elektronische Struktur des gebildeten Komplexes und somit auch die Effizienz des Löschvorgangs beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang könnte auch die Wirksamkeit anderer Metallionen zunehmen und geeignete Werte erreichen. Des Weiteren können Lage und Ausrichtung von Fluorophor und Löscher zueinander durch geschickte Platzierung von starren Zwischenstücken im Molekülgerüst gesteuert werden und einen entscheidenden Einfluss auf die Löschung ausüben. Auch der Einsatz effizienterer Fluoreszenzlöscher, wie dem BAPTA-Liganden,^[100] der häufig in Metallsonden zum Einsatz kommt, oder alternative Schaltmechanismen wie z. B. die intramolekulare Zyklisierung von Rhodaminderivaten, die bereits für hochauflösende Mikroskopie eingesetzt wurden,^[101] bieten interessante Perspektiven und sind Bestandteil laufender Forschungsarbeiten in der Arbeitsgruppe Herten.

Mit dem chemischen Multiplexing wurde eine weitere Anwendungsmöglichkeit der schaltbaren Fluoreszenzsonden demonstriert, die nach Entwicklung einer geeigneten Strategie zur Markierung zweier unterschiedlicher Zielstrukturen überzeugende Ergebnisse lieferte. Dabei handelt es sich um eine einfach anwendbare Methode, die selbständig eingesetzt das Betrachten zweier unabhängiger Strukturen durch nur einen spektralen Kanal ermöglicht oder in Kombination mit anderen Techniken die Anzahl an gleichzeitig beobachtbaren Strukturen erweitert. Insbesondere die einfache Anwendung, die keinerlei zusätzliche Ansprüche an den Mikroskop-Aufbau stellt, erlaubt eine mühelose Implementierung in bereits bestehende Systeme. Zur Demonstration dieser Vielseitigkeit wurden, in Kooperation mit der Firma PicoQuant aus Berlin, an einem STED-Mikroskop zweifarbige, hochaufgelöste Bilder erzeugt. Die Trennung der beiden Zielstrukturen erfolgte ausschließlich über das chemische Multiplexing, wodurch ein spektraler Kanal völlig ausreichend ist. Gerade die STED-Mikroskopie profitiert von dieser Technik, da bedingt durch die anspruchsvolle Optik, die Ergänzung um einen weiteren optischen Kanal mit einem hohen Aufwand verbunden ist. Die hierfür synthetisierten Fluoreszenzsonden zeigen eine ausreichend hohe Photostabilität, um hochaufgelöste Bilder zu erzeugen. Die beobachtete Halbwertsbreite markierter Filamente wird auch hier durch die Markierungsstrategie begrenzt, liegt aber mit einem Wert von etwa 70 nm auch hier deutlich unterhalb der

Auflösungsgrenze konventioneller Mikroskopie. Wie zuvor beschrieben, könnten durch Optimierung des Bleichprozesses noch bessere Ergebnisse bezüglich Trennschärfe und Auflösung erzielt werden. Eine weitere Anwendung in Kombination mit STED und Pattern-Matching, zur Aufnahme von dreifarbigem, hochaufgelösten Bildern, scheiterte lediglich an ungeeigneten Proben. Die gewonnenen Erkenntnisse deuten aber auf eine generelle Durchführbarkeit hin und eine Umsetzung ist Bestandteil der laufenden Arbeiten in der Arbeitsgruppe.

Die hier erzielten Ergebnisse demonstrieren das Potential der chemisch schaltbaren Fluoreszenzsonden, sind jedoch nur ein Schritt zur hochaufgelösten dreidimensionalen Bildgebung, mit dem ultimativen Ziel, der Anwendung in lebenden Zellen. Die Entwicklung alternativer Methoden ist hier von besonderem Interesse, da etablierte Techniken, die auf lichtinduzierten Schaltmechanismen beruhen, nur bedingt für die Aufnahme lebendiger Zellen geeignet sind.

Die Anwendung der schaltbaren Farbstoffe ist auch nicht auf die optische Mikro- und Nanoskopie beschränkt. Durch den Einsatz molekularer Sensoren zum spezifischen Nachweis von Analyten, können Oberflächen so funktionalisiert werden, dass ein gesamtes analytisches Labor auf einem einzelnen Chip (lab on a chip) untergebracht werden kann. In einem nächsten Schritt könnte dann das Signal aus dem Schaltprozess nicht nur für die Analyse ausgenutzt sondern auch zur Weiterleitung von Daten oder Reizen eingesetzt werden. In der Informationstechnik ist die permanente Verkleinerung von elektronischen Schaltkreisen eine Voraussetzung zur weiteren Leistungssteigerung. Auch Kabel und Drähte werden in absehbarer Zeit nicht mehr mit der vorschreitenden Miniaturisierung elektronischer Vorrichtungen kompatibel sein. Die schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffe stellen mit dem kontrollierbaren Übergang zwischen einem hellen An- und einem dunklen Aus-Zustand ein binäres System auf molekularer Ebene dar. Geschicktes Design der chemischen Struktur und geeignete Anordnung dieser molekularen Schalter, könnte zur Basis kleinster Prozessoren und Maschinen werden.

Teil IV.

Materialien und Methoden

7 Materialien, Methoden und Synthesevorschriften

7.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, wie vom Hersteller bezogen, verwendet. Für die Synthese wurden Chemikalien mit einer Reinheit von mindestens 98 %, für die spektroskopische Analyse 99 % und für Lösungsmittel zumindest „HPLC grade“ eingesetzt. Das verwendete Wasser stammte aus einer Reinstwasseranlage „TKA GenPure“ der Firma ThermoScientific.

Eingesetzte Farbstoff-Aktiverter wurden von der Firma AttoTec, GEHealthcare und Abberior GmbH bezogen und zu einer Konzentration von 2 mg/mL in trockenem DMF gelöst, bei -20 °C aufbewahrt.

Der für die Messungen verwendete MOPS-Puffer wurde in Reinstwasser zu einer Konzentration von 10 mM gelöst, mit Natriumhydroxid-Lösung auf den gewünschten pH-Wert (7,0) eingestellt, filtriert und bei 4 °C gelagert.

Chemikalie	Hersteller
Acetamidomalonsäurediethylester	Sigma-Aldrich
Aceton	Sigma-Aldrich
Acetondicarbonsäuredimethylester	Sigma-Aldrich
Acetonitril	Acros Organics
Anilin	Sigma-Aldrich
Bortriflourid-Etherat	Sigma-Aldrich
O-(Benzotriazole-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)	Sigma-Aldrich
2-(Brommethyl)pyridin hydrobromid	Sigma-Aldrich
2-Brompyridin	Sigma-Aldrich
Calcium(II)-Carbonat	Sigma-Aldrich
Calcium(II)-Chlorid	Sigma-Aldrich
1,6-Diaminohexan	Sigma-Aldrich
2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzochinon	Sigma-Aldrich
Dichlormethan (DCM)	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Dimethylether	Sigma-Aldrich
2,4-Dimethylpyrrol	Sigma-Aldrich
Di-tert-butylidicarbonat	Sigma-Aldrich
N,N-Diisopropylethylamin	Acros Organics
Dimethylsulfoxid	Acros Organics
Di-(2-picoly) amine	Sigma-Aldrich

Eisenspäne	
Eisen(II)-sulfat-heptahydrat	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethyl-6-chlorpyridin-3-carboxylate	Sigma-Aldrich
Ethylendiamin	Sigma-Aldrich
Flusssäure 0,1 M	Fluka
Hexan	Sigma-Aldrich
1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)	Sigma-Aldrich
Kupfer(II)-sulfat-pentahydrat	Sigma-Aldrich
Iodmonochlorid	Sigma-Aldrich
Lithiumborhydrid	Sigma-Aldrich
Magnesium(II)-chlorid	Sigma-Aldrich
Methanol	Sigma-Aldrich
Methylamin	Sigma-Aldrich
Natriumethanolat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid-Lösung	Fluka
4-Nitrobenzaldehyd	Sigma-Aldrich
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH = 7,4	Sigma-Aldrich
Phosphoroxychlorid	Sigma-Aldrich
Propargylamin	Sigma-Aldrich
2-Pyridincarboxaldehyd	Sigma-Aldrich
Rhodamin 6G	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Sigma-Aldrich
Rhodamin B	Sigma-Aldrich
tert-Butyllithium (1.5M/Pentan)	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-tetramethylnaphthalen-1,8-diamin	Sigma-Aldrich
Tetrabrommethan	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma-Aldrich
Toluol	Sigma-Aldrich
Triethylamin	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich
Triphenylphosphan	Sigma-Aldrich
Triton-X100	Sigma-Aldrich
Zink(II)-Chlorid	Sigma-Aldrich
Zink(II)-Chlorid-Lösung 0,1 M	Sigma-Aldrich

7.2 Aufreinigung und Analytik

Aufreinigung mittels HPLC

Zur Aufreinigung kleiner Mengen an Reaktionsprodukt, wie z.B. nach Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen, kam eine „HP Series 1100“ HPLC-Anlage der Firma HP/Agilent zum Einsatz, die mit einem Absorptions- und Fluoreszenzdetektor ausgestattet ist. Als stationäre Phase kam eine C18 Umkerphasensäule „Hypersil ODS“ von Säulentechnik Knauer mit einer Korngröße von 5 μm zum Einsatz. Als mobile Phase dienten die Pufferlösungen: Laufmittel A (95 % Reinstwasser, 5 % Triethylammoniumacetat) und Laufmittel B (75 % Acetonitril, 20 % Reinstwasser, 5 % Triethylammoniumacetat), bei einer Flussrate von 3 mL/min. Als Standardgradient wurde kontinuierlich über 40 Minuten von 100 % A auf 100 % B gewechselt. Die aufgefangenen Fraktionen wurden in einer „Speedvac“ Vakuumzentrifuge der Firma Eppendorf eingedampft und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte in der NMR-Abteilung des Anorganisch-Chemischen Institutes der Universität Heidelberg. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an den Geräten „Avance II 400“ (400 MHz) und „Avance III 600“ (600 MHz) der Firma Bruker, soweit nicht zusätzlich angegeben, bei Raumtemperatur aufgenommen. Als interner Standard diente das Lösungsmittelrestsignal bzw. TMS. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ sind in parts per million (ppm), die aufgeführten Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben und beziehen sich auf ^1H - ^1H -Kopplungen. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett. Zur Auswertung der NMR-Spektren kam die Software „Topspin“ (Version 3.1) der Firma Bruker zum Einsatz.

Massenspektrometrie

Massenspektren und hochaufgelöste Massenspektren wurden von der Analytikabteilung für Massenspektrometrie am Organisch-Chemischen Institut der Universität Heidelberg erstellt. Dabei kam das Gerät „ApexQe hybrid 9.4 T FT-ICR“ von Bruker zum Einsatz. Für Messungen mit der Methode MALDI wurde DCTB als Matrix verwendet.

Kristallstrukturanalyse

Die Daten der röntgenkristallographischen Bestimmung sowie die Einzelheiten der jeweiligen Messungen sind im Anhang gelistet. Die Messungen wurden an einem STOE IPDS I bzw. Bruker AXS Smart 1000 CCD Diffraktometer (Mo-K α Strahlung mit versiegelter Röhre und einem Graphit-Monochromator) oder mit einem Agilent Technologies Supernova E CCD Diffraktometer (Mo- oder Cu-K α Strahlung mit einer Mikrofokus-Röhre und einem mehrschichtigen optischen Spiegelsystem) durchgeführt. Es wurden Korrekturen für Absorption durch Luft und durch den Detektor durchgeführt, sowie für Lorenz- und Polarisierungseffekte.^[102] Zur Korrektur der Kristallabsorption wurden entweder semiempirische Multiscan Methoden,^[102a, 103] analytische Methoden,^[102a, 104] oder numerische Methoden eingesetzt.^[102a, 103a, 104] Das Lösen und Verfeinern der Strukturen wurde mit dem Olex2 Programmpaket durchgeführt.^[105] Zum Lösen wurden entweder Charge-Flipping Methoden^[106] oder konventionelle, direkte Methoden^[107] herangezogen. Die Verfeinerung fand über die Methode des kleinsten Fehlerquadrates basierend auf F^2 und über die ganze Matrix gegen einzelne Reflexe statt.^[107] Alle Nichtwasserstoffatome wurden an die berechnete Stelle gesetzt und mit einem Ridging-Modell verfeinert.

Ensemble-Messungen

Alle Messungen am Ensemble wurden in Ultra-Mikro-Quarzglasküvetten (105.251-QS) der Firma Hellma Analytics (Müllheim) durchgeführt, die eine Schichtdicke von 3 mm und ein minimales Füllvolumen von 45 μL besitzen. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden dabei in Konzentrationen von etwa 10^{-6} M eingesetzt, das Probenvolumen betrug 100 μL .

Absorption

Für die Absorptionsmessung kam das Spektrometer „Cary 500 Scan“ der Firma Varian/Agilent Technologies zum Einsatz. Die Spektren wurden jeweils gegen Luft gemessen, alle Spektren wurden um die Absorption der Küvette und des reinen Lösungsmittels korrigiert. Die Konzentrationen wurden aus den Spektren der Proben mit der Absorption am Maximum $A_{\lambda_{max}}$, dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\lambda_{max}}$ und der Schichtdicke d nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt:

$$A_{\lambda_{max}} = c \cdot d \cdot \epsilon_{\lambda_{max}}$$

Die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe wurden den Datenblättern der Hersteller entnommen.

Fluoreszenz

Die Messung der Fluoreszenzemission der Proben wurde mit einem „Cary Eclipse 500“ Spektrometer der Firma Varian/Agilent Technologies durchgeführt. Die Anregung der Fluorophore erfolgte etwas unterhalb des Absorptionsmaximums des Farbstoffs um Streulicht zu vermeiden.

Titrationen

Die Titration der Fluoreszenzsonden mit den Metall(II)-Salzen erfolgte durch schrittweise Zugabe von je 1 μL einer Me(II)-Stammlösung, wonach die Lösung mit der Pipettenspitze gut durchmischt wurde. Nach Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichtes wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Konzentrationen wurde jeweils um die Verdünnung durch Volumenzunahme während der Titration korrigiert. Für die Auswertung der Fluoreszenzintensität wurde ein Bereich von ± 10 nm um das Maximum der Fluoreszenz integriert um Schwankungen der Messungen auszugleichen.

7.3 Mikroskopie

Epifluoreszenz und TIRF

Selbstbau-TIRF-Mikroskop

Als Grundlage diente das inverse Mikroskop „Axiovert 200M“ der Firma Zeiss. Als Anregungslichtquelle können drei verschiedene Laserdioden verwendet werden:

1. 488 nm, 40 mW Dauerstrichlaser „Cyan 488“ der Firma Spectra-Physics
2. 532 nm, 30 mW Dauerstrichlaser „TECGL-30“ der Firma World Star Tech (Toronto, ON, Canada),
3. 635 nm, 25 mW Dauerstrichlaser „TECRL-25G-635“ der Firma World Star Tech (Toronto, ON, Canada).

Der Laserstrahl passiert einen Aufreinigungsfilter und wird in eine Glasfaser eingekoppelt. Danach folgt ein akustooptischer Modulator „AOTF.nCVIS“ der Firma AA Optoelectronic (Orsay Cedex, Frankreich), mit dessen Hilfe die Laserlinien geschaltet und in der Intensität moduliert werden können. Durch zwei Linsen wird der Laserstrahl aufgeweitet und über einen dichroitischen Spiegel „HC Quadband Laser-Strahlenteiler R405/488/532/635“ der Firma AHF Analysentechnik (Tübingen) in das Mikroskop eingekoppelt. Für Einzelmolekülmessungen kam das Öl-Immersionsobjektiv „CFI Achromat TIRF 100x“ der Firma Nikon (Tokyo) mit einer numerischen Apertur von 1,49 zum Einsatz. Als Immersionsmedium wurde ein Nikon Immersionsöl (Brechungsindex $n = 1,515$) verwendet.

Das emittierte Licht wird vom Objektiv gesammelt und passiert den dichroitischen Spiegel und einen dreifachen Kerbfilter „Triple-Notch Filter 488\532\631-640 nm“ der Firma AHF Analysentechnik, der gestreutes Laserlicht reflektiert. Der Strahlengang wird durch einen „Strahlteiler 640DCXR“ der Firma AHF Analysentechnik) in einen roten und einen blauen Kanal geteilt (nicht in Abb. 5.4 dargestellt). Jeder Strahl durchläuft einen eigenen Bandpassfilter („Sperrfilter HQ 542\27“ und „HQ 685\70“ der Firma AHF Analysentechnik), um Hintergrundfluoreszenz zu unterdrücken. Ein Teleskope fokussiert die Bilder auf verschiedene Stellen des CCD-Sensors (512 x 512 Pixel) der Kamera „Andor iXonEM+ 897 CCD“ der Firma Andor (Dublin). Die Aufnahme erfolgte mit dem Programm „Andor Solis for Imaging“ Version 4.12.3 der Firma Andor.

Nikon TiE TIRF-Mikroskop

Der kommerzielle Aufbau basiert auf einem „TiE“ Mikroskopstativ von Nikon, das mit einem Autofokussystem „PFS 2“ ausgerüstet ist. Zur Anregung wurde die Vier-Farben-Laserquelle „iChrome MLE-LFA“ der Firma TOPTICA Photonics eingesetzt (505 nm @ 50 mW, 488 nm @ 40 mW, 561 nm @ 30 mW, 640 nm @ 50 mW). Diese wurde über Faser an den „TIRF-Illuminator“ von Nikon gekoppelt. Als Objektiv dient das Apo TIRF 100x 1.49 oil“ von Nikon (NA: 1.49, Immersionsöl: Nikon, $n = 1.515$). Die emittierte Fluoreszenz wurde auf einen „OptoSplit III“ Bildverteiler der Firma Cairn Research geleitet, der bis zu drei Kanäle erzeugen kann. Zur Detektion kommt eine „iXon+ 897 Ultra“ Kamera der Firma Andor zum Einsatz. Die eingesetzten Filter und Dichroiten von AHF Analystechnik, sind in Tabelle 7.1 aufgelistet.

Tabelle 7.1: Im Nikon TiE verwendete Filter und Dichroiten

Bezeichnung	Typ
Laser-Dichroit	R405/488/561/635
Laser-Sperrfilter	ZET405/488/561/640
Laser-Strahlenteiler	HC BS R561
Laser-Strahlenteiler	H 643 LPXR superflat
Bandpassfilter	605/70 ET
Bandpassfilter	525/50 ET
Bandpassfilter	647 LP Edge Basic

STED-Mikroskopie

Die in Kapitel 5.4 beschriebenen STED-Messungen wurden bei der Firma PicoQuant in Berlin durchgeführt. Hierfür wurde ein „Microtime 200 STED“ Mikroskop, ausgestattet mit einem Strahlscanner, von PicoQuant eingesetzt. Die Anregung erfolgte mittels eines gepulsten Lasers „LDH-D-C-640“ (640 nm, 20 Mhz, 1.3 μ W konfokal, 10 μ W STED) von PicoQuant. Die stimulierte Emission wurde durch einen „VisIR-765 STED“ von PicoQuant bei 765 nm erzeugt. Die Laser wurden in einer Single-Mode-Faser vereint, der Sted-Laser zudem noch durch eine Phasenplatte „EASYDOnut640/765“ von Abberior vor dem Objektiv in seine Donut-Form gebracht. Als Objektiv wurde das UPlanSAPO 100x/1.4 oil“ von Olympus verwendet. Die emmitierte Fluoreszenz wurde durch einen dichroitischen Spiegel „zt640/752rpc“ von AHF Analysentechnik vom Anregungslicht getrennt, durch einen Detektionsfilter „HQ690/70“ von AHF Analysentechnik aufgereinigt, auf ein Pinhole mit 100 μ m Durchmesser fokussiert und mit einer „SPCM-SPAD“ von Excelitas detektiert. Das Detektionssignal wurde mit einem „HydraHarp 400 TCSPC System“ und der Software „Symphotime 64“, beides von PicoQuant, verarbeitet. Für die Aufnahmen wurde ein Bereich von 300 x 300 Bildpunkten mit einer Punktgröße von 30 nm und einer Verweildauer von 1.7 μ s abgerastert. Zur besseren Abtrennung des STED-Signals wurde ein Time-Gate eingestellt, das nur Photonen 2.24 μ s nach jedem Anregungspuls, zulässt. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Aufnahmen als 32 bit Tiff exportiert und mit ImageJ 1.48v bearbeitet.

7.4 Probenvorbereitung

Einzelmoleküloberflächen

Zur Untersuchung der Fluoreszenzsonden auf Einzelmolekülebene wurden diese auf Glasoberflächen immobilisiert. Zum Einsatz kamen LabTek™ Kammerdeckgläser (8 Kammern, Borosilikat-Deckglas 0.15 mm bzw. 0.17 für STED-Messungen) der Firma Nunc/Fisher Scientific. Diese wurden viermal, abwechselnd mit 0.1 M Flusssäure für je 20 Sekunden gereinigt und gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in jede Kammer 200 μ L einer Mischung aus BSA und biotinyliertem BSA für 30 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde aus den Stammlösungen von BSA in PBS (5 mg/L) und biotinyliertem BSA in PBS (2 mg/L) im Verhältnis 8:1 hergestellt (Stoffmengenverhältnis BSA/bioBSA 20:1). Die Oberflächen wurden erneut viermal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde Streptavidin in PBS (100 µg/L) für 30 Minuten inkubiert und wieder viermal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Fluoreszenzsonden in PBS (etwa 10^{-9} M) so lange inkubiert bis am Mikroskop eine ausreichende Oberflächenbedeckung beobachtet wurde (etwa 10 Minuten). Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde das Messmedium, PBS-Puffer mit definierter Me(II)-Konzentration zugegeben und die Oberflächen am TIRF-Mikroskop untersucht oder in PBS bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

Zellkultur

Für die Zellexperimente wurden zwei unterschiedliche Zelllinien kultiviert und eingesetzt. Die menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, entstammen der HeLa-Zelllinie, die 1951 Henrietta Lacks entnommen wurden. Alternativ wurden auch NIH 3T3 – embrionale Mausfibroblasten – eingesetzt. Beide Zelltypen waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 Vol.-% CO₂ in der Atmosphäre kultiviert. Als Medium kam Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) zum Einsatz, dem noch fötales Kälberserum zugesetzt wurde.

Die Zellen wurden ungefähr alle drei Tage vereinzelt. Dazu wurde das Medium entfernt, einmal für 5 Minuten mit PBS (10 mL) gewaschen und die Zellen schließlich mit Trypsinähnlichem Enzym (TrypLE, 2 mL) für fünf Minuten inkubiert, wobei sich die Zellen von der Oberfläche ablösten. Nach Zugabe von 8 mL DMEM zur Neutralisation des TrypLE wurde die Zellsuspension gut durchmischt und die Zellzahl bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden 2 bis 5 Tropfen der Zellsuspension mit 10 mL DMEM gemischt und in einer Zellkulturschale bei 37 °C kultiviert.

Tabelle 7.2: Zellkulturmaterialien

Artikel	Hersteller
DMEM mit Phenolrot	ThermoFischer
DMEM ohne Phenolrot	ThermoFischer
GlutaMAX	ThermoFischer
FBS	Biochrom AG
Natriumpyruvat	ThermoFischer
TrypLE	ThermoFischer

Immunofluoreszenz

Für die Experimente wurden die Zellen in LabTek™ Kammerdeckgläsern, die zuvor analog zur Reinigung der Einzelmoleküloberflächen mit 0.1 M Flusssäure und PBS gewaschen wurden, zu je 15000 Zellen pro Kammer in DMEM über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung folgt einem, in der Arbeitsgruppe Hertzen, von Klaus Yserentant erarbeiteten Protokoll. Die adherenten Zellen wurden vorsichtig vom Medium befreit zweimal mit vorgewärmtem MTSB-Puffer gewaschen und anschließend mit vorgewärmtem Fixierpuffer bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Dadurch erfolgt gleichzeitig Permeabilisierung und Fixierung der Zellen, somit können folgende Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Danach wurden die Zellen viermal für je 5 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Passivierung der Oberfläche wurde für 60 Minuten mit der Blockierlösung inkubiert und erneut viermal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden der Antikörper, gelöst in AI-Puffer für 60 Minuten inkubiert und gründlich viermal mit AI-Puffer gewaschen. Bei Bedarf wird dieser Schritt mit Sekundärantikörper wiederholt. Danach wurde Streptavidin (10 µg/mL in AI-Puffer) für 30 Minuten inkubiert und viermal mit AI-Puffer gewaschen. Abschließend wird die biotinylierte Fluoreszenzsonde, gelöst in AI-Puffer, für 60 Minuten inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit AI-Puffer kann die präparierte Probe für Experimente eingesetzt oder mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 7.3: Reagenzien für die Immunofluoreszenz

Reagenz	Inhalt
MTSB-Puffer	100 mM PIPES, 2 mM MgCl ₂ , 5 mM EGTA, gelöst in H ₂ O, pH 6.8.
Fixierpuffer	3.7 % PFA, 0.2 % Triton X-100, gelöst in MTSB-Puffer.
Blockierlösung	3 % BSA in PBS.
AI-Puffer	0.05 % Triton X-100, 1 % BSA in PBS.

Tabelle 7.4: In dieser Arbeit eingesetzte Antikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Anti- α -Tubulin, monoclonal	Maus	Sigma-Aldrich
Anti- α -Tubulin-Biotin, monoclonal	Maus	ThermoFischer
Anti-Maus-Biotin, polyclonal	Ziege	Sigma-Aldrich
Phalloidin-Atto633		Atto-TEC
Phalloidin-Atto647N		Atto-TEC

7.5 Datenauswertung

Einzelmolekül-Experimente

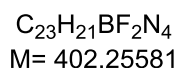
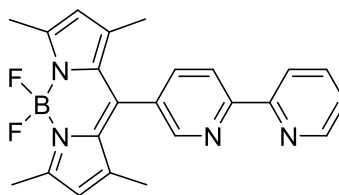
Aus den Aufnahmen der Einzelmoleküloberflächen wurden mit einer in der Arbeitsgruppe vorhandenen, von Kristin Grussmayer und Anton Kurz geschriebenen, MATLAB-basierten Software, Intensitätsspuren extrahiert. Dazu wird zuerst eine Maxima-Projektion über die ersten 1000 Bilder dargestellt, die eine Lokalisierung der blinkenden Emitter ermöglicht. Diese werden anhand eines Intensitätsschwellenwertes, sowie der runden Form, automatisch ausgewählt. Abweichende oder Überlappende Maxima werden dabei ausgeschlossen. Aus den bestimmten Bereichen wird, in einem Umkreis von 3 Bildpunkten, der Intensitätsverlauf über die Zeit ausgelesen. Zur lokalen Hintergrundkorrektur wird, mit einem Abstand von einem Bildpunkt, eine Scheibe mit einer Breite von zwei Bildpunkten genutzt. Die Daten werden als txt-Dateien ausgegeben und können zur weiteren Bearbeitung in Origin geladen werden. Zur Bestimmung der An- und Aus- Zustandsdauern wurde eine in der Arbeitsgruppe vorhandene, von Felix Braun geschriebene MATLAB-basierte Software genutzt. Die erhaltenen Werte wurden dann in Origin Pro 9.1G 32 Bit geladen und zur Visualisierung weiter bearbeitet.

Hochaufgelöste Mikroskopie - CHIRON

Zur Auswertung der Einzelmolekül-Lokalisationen wurde die Software RapidSTORM von Steve Wolters in der Version 2.21 eingesetzt.^[108] Diese erkennt lokale Maxima und bestimmt über einen Intensitätsschwellenwert und Anpassen einer zweidimensionalen Gauss-Funktion, die Position des Emitters auf subpixel Genauigkeit. Aus den so erhaltenen Lokalisationsdaten wird dann das Gesamtbild rekonstruiert.

7.6 Synthesevorschriften

6-(2,2'-Bipyridin(5)yl)-3,3',5,5'-tetramethylpyrromethan (1)



Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
2,4-Dimethylpyrrol (97%)	95.14	1.38	1.5	14.4	2
(5)	184.19	1.34		7.3	1
2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzochinon (98%)	227.00	1.65		7.3	1
DIPEA	129.24		30	176.4	exc.
Trifluoressigsäure	114.02				kat.
Bortrifluorid-Etherat	141,93		10	79.0	exc.

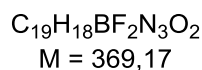
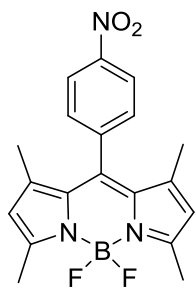
Pyrrrol und Aldehyd werden in 150 mL DCM (absolut) bei Raumtemperatur unter Argon gelöst. Dann wird ein Tropfen TFA zugegeben und die Lösung gerührt bis auf einer DC kein Edukt mehr zu sehen ist. Nun wird DDQ, gelöst in DCM zugegeben, für weiter 10 Minuten gerührt und anschließend DIPEA und BF_3OEt_2 zugegeben. Nach zwei weiteren Stunden wird die Reaktionslösung mit Wasser gewaschen, die organische Phase mit NaSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Aufreinigung über Säulenchromatographie (SiO_2 , DCM/EtOAc) und Umkristallisieren (DCM/EtOAc) liefern das Produkt als rote Kristalle.

Ausbeute: 700 mg; 1.7 mmol (24 %).

MS (ESI pos): $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 403.19; gef. 403.30.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.44 (s, 6 H), 2.55 (s, 6 H), 7.44 (m, 1 H), 7.24 (s, 2 H), 7.39 (m, 1 H), 7.78 (d, $^3\text{J}(\text{H}) = 8$ Hz, 1 H), 7.89 (m, 1 H), 8.49 (d, $^3\text{J}(\text{H}) = 8$ Hz, 1 H), 8.62 (m, 2 H). 8.72 (d, $^3\text{J}(\text{H}) = 4$ Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 14.69, 15.27, 121.20, 121.58, 121.78, 124.47, 131.50, 137.20, 137.42, 142.85, 148.00, 149.07, 154.92, 156.39.

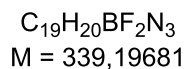
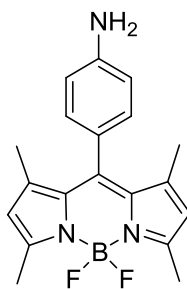
6-(4-Nitrophenyl)-3,3',5,5'-tetramethylpyrromethan (2)**Ansatz:**

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
2,4-Dimethylpyrrol (97%)	95.14	1.84	2.0	18.8	2
4-Nitrobenzaldehyd	151.12	1.46		9.4	1
2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzochinon (98%)	227.00	2.18		9.4	1
DIPEA	129.24		30	176.4	exc.
Trifluoressigsäure	114.02				kat.
Bortrifluorid-Etherat	141,93		10	79.0	exc.

Pyrrol und Aldehyd werden in 150 mL DCM (absolut) bei Raumtemperatur unter Argon gelöst. Dann wird ein Tropfen TFA zugegeben und die Lösung gerührt bis auf einer DC kein Edukt mehr zu sehen ist. Nun wird DDQ, gelöst in DCM zugegeben, für weiter 10 Minuten gerührt und anschließend DIPEA und BF_3OEt_2 zugegeben. Nach zwei weiteren Stunden wird die Reaktionslösung mit Wasser gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Aufreinigung über Säulenchromatographie (SiO_2 , PE/EtOAc) liefern das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute: 1.06 g; 3.3 mmol (35 %).

MS (EI pos): $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 369.15; gef. 369.21.

6-(4-Aminophenyl)-3,3',5,5'-tetramethylpyrromethan (3)

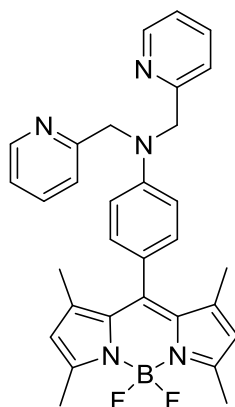
Ansatz:

	M [g/mol]	m [mg]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(2)	369.17	80		0.22	1
Eisen	55.85	300		5.40	exc.
HCl (0.5 M in MeOH)	36.46		2.0	1.00	exc.

Die Nitro-Verbindung wurde in 20 mL MeOH und 4 mL H₂O gelöst, zum Sieden (85 °C) erhitzt und über 1 Stunde die Säure zugetropft. Anschließend wurde weitere 2 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand dreimal mit 100 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden zweimal mit je 100 mL H₂O gewaschen. Entfernen des Lösungsmittels ergab das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute: 40 mg; 0,18 mmol (83 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 340.18; gef. 340.30.

6-(4-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)aminophenyl)-3,3',5,5'-tetramethylpyrromethan (4a)

$C_{31}H_{30}BF_2N_5$
 $M = 521,411$

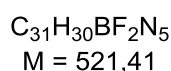
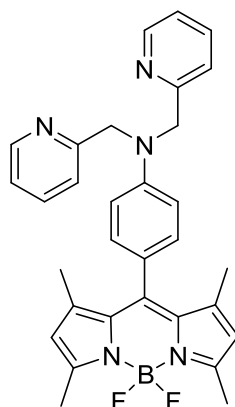
Ansatz:

	M [g/mol]	m [mg]	V [mL]	n [μmol]	eq.
(3)	339.19	12.6		37	1
N,N,N',N'-tetramethylnaphthalene- 1,8-diamine	214.31	39.6		185	5
2-(Brommethyl)pyridin hydrobromid	252.93	20.7	2.0	82	2.2

In einem Rundkolben unter Argon werden Amin, Bromid und Protonenschwamm in 30 mL Acetonitril (absolut) gelöst und 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird über DC verfolgt, es bilden sich zwei Produktfraktionen, die dem mono- und bisubstituierten Produkt entsprechen. Nach vollständiger Umsetzung wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt Säulenchromatografisch aufgereinigt (SiO₂, PE/EtOAc).

Ausbeute: 1.54 mg; 2.96 mmol (8 %).

MS (ESI pos): [M+Na]⁺: ber. 544.25; gef. 544.39.

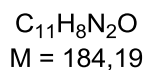
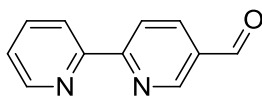
6-(4-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)aminophenyl)-3,3',5,5'-tetramethylpyrromethan (4a)**Ansatz:**

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
2,4-Dimethylpyrrol (97%)	95.14	0.65	0.89	0.68	2
(7)	303.37	0.10		0.34	1
2,3-Dichloro-5,6-dicyano-p-benzochinon (98%)	227.00	0.08		0.34	1
Trifluoressigsäure	114.02				kat.
DIPEA	129.24		2		exc.
Bortrifluorid-Etherat	141,93		0.40	2.8	exc.

Pyrrrol und Aldehyd werden in 40 mL DCM (absolut) bei Raumtemperatur unter Argon gelöst. Dann wird ein Tropfen TFA zugegeben und die Lösung gerührt bis auf einer DC kein Edukt mehr zu sehen ist. Nun wird DDQ, gelöst in DCM zugegeben, für weiter 10 Minuten gerührt und anschließend DIPEA und BF_3OEt_2 zugegeben. Nach zwei weiteren Stunden wird die Reaktionslösung mit Wasser gewaschen, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Aufreinigung über Säulenchromatographie (SiO_2 , PE/EtOAc) liefern das Produkt als roten Feststoff.

Ausbeute: 40 mg; 0,18 mmol (29 %).

MS (ESI pos): $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 522.26; gef. 522.30.

(2,2'-Bipyridin)-5-carbaldehyd (5)

Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
5-(dibrommethyl)-2,2'-bipyridin	328.00	3.0		9.2	1
CaCO ₃	100.09	2.0	0.42	20.1	2.2

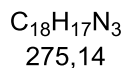
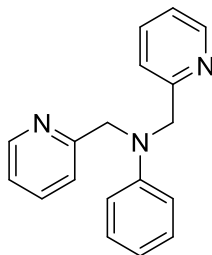
Das Bromid wird zusammen mit CaCO₃ in 100 mL H₂O vorgelegt und für 6 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wird die Reaktionslösung dreimal mit 100 mL DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen über NaSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wird Säulenchromatografisch aufgereinigt (SiO₂, PE/EtOAc).

Ausbeute: 1.44 g; 7.82 mmol (85 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 184.06; gef. 184.10.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.38 (t, ¹J(H) = 12 Hz, 1 H), 7.86 (t, ¹J(H) = 7 Hz, 1 H), 8.27 (d, ¹J(H) = 8 Hz, 1 H), 8.49 (d, ¹J(H) = 8 Hz, 1 H), 8.60 (d, ¹J(H) = 8 Hz, 1 H), 8.71 (d, ¹J(H) = 4 Hz, 1 H), 9.11 (s, 1 H), 10.15 (s, 1 H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 121.35, 122.28, 124.85, 131.11, 136.97, 137.25, 149.47, 151.69, 154.71, 160.61, 190.64.

N,N-Bis(pyridin-2-ylmethyl)phenylamin (6a)

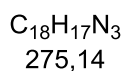
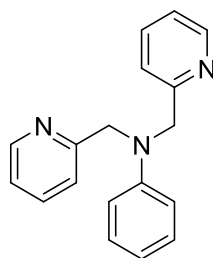
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
2-(Brommethyl)pyridin hydrobromid	252.93	2.12		8.4	2.2
Anilin	93.13	0.37	0.40	4.0	1
N,N,N',N'-tetramethylnaphthalene-1,8-diamine	214.31	3.60		16.8	4.4

In einem Rundkolben unter Argon werden Amin, Bromid und Protonenschwamm in 50 mL Acetonitril (absolut) gelöst und 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird über DC verfolgt, es bilden sich zwei Produktfraktionen, die dem mono- und bissubstituierten Produkt entsprechen. Nach vollständiger Umsetzung wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt Säulenchromatografisch aufgereinigt (SiO₂, EtOAc/DCM).

Ausbeute : 210 mg; 0.76 mmol (19 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 276.15; gef. 276.20.

N,N-Bis(pyridin-2-ylmethyl)phenylamin (6b)

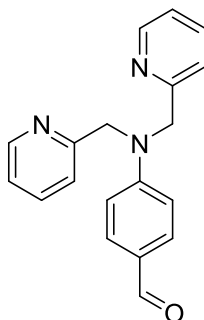
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
2-(Brommethyl)pyridin hydrobromid	250.89	5.00		19.8	2,2
Anilin	93.13	0.86		9.2	1

In einem Rundkolben werden Amin und Bromid in 50 mL 5N Natronlauge gelöst und für 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird dreimal mit 100 mL DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen über NaSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wird Säulenchromatografisch aufgereinigt (SiO₂, PE/DCM), Umkristallisieren (DCM/EtOAc) ergibt das Produkt als farblose, klare Kristalle.

Ausbeute : 2,4 g; 8,7 mmol (94 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 276.15; gef. 276.18.

4-(Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)benzaldehyd (7)

$C_{19}H_{17}N_3O$
M = 303,37

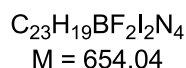
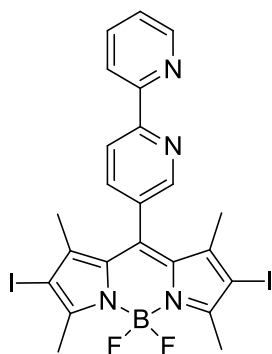
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(5b)	275.14	1.00		3.6	1
DMF			2		exc.
POCl ₃	153.33	0.83		5.4	1.5

Verbindung 5b wird durch leichtes Erwärmen in 2 mL DMF gelöst und anschließend im Eisbad auf 0 °C abgekühlt, dabei entsteht eine weiße Suspension. POCl₃ wird tropfenweise so zugegeben, dass die Temperatur nie über 10 °C steigt. Farbe wechselt über grün/schwarz nach dunkel orange/braun. Nach Beenden der Zugabe wird noch 20 Minuten im Eisbad, dann 50 Minuten bei Raumtemperatur und anschließen 3 Stunden bei 95 °C gerührt. Dann wird mit 10 mL Wasser gequench und mit 5 N Natronlauge ein pH-Wert von etwa 9 eingestellt. Die Reaktionslösung wird dreimal mit 30 mL DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wird Säulenchromatografisch aufgereinigt (SiO₂, PE/Aceton).

Ausbeute 413 mg; 1.36 mmol (38 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 304.15; gef. 304.19.

6-(2,2'-Bipyridin(5)yl)-3,3',5,5'-tetramethylpyrromethan (8)

Ansatz:

	M [g/mol]	m [mg]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(1)	402.25	200		0.50	1
Iodmonochlorid	162.36	160		0.99	2

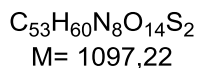
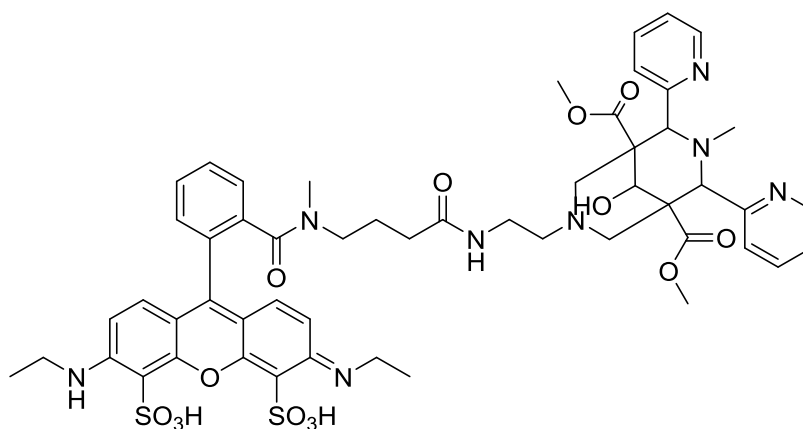
Verbindung (1) wird in einer Mischung aus 4 mL Methanol und 2 mL DCM vorgelegt und das Iodmonochlorid, gelöst in 2 mL Methanol, tropfenweise zugegeben. Die Reaktionlösung wird 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und die Umsetzung der Edukte über DC kontrolliert. Anschließend werden 30 mL H₂O zugegeben und dreimal mit 50 mL DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wird Säulenchromatografisch aufgereinigt (SiO₂, PE/EtOAc).

Ausbeute: 214.6 mg 0.11 mmol (22 %).

MS (ESI pos): [M+H]⁺: ber. 654.98; gef. 655.00.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.45 (s, 6 H), 2.65 (s, 6 H), 7.44 (m, 1 H), 7.76 (d, ³J(H) = 8 Hz, 1 H), 7.95 (m, 1 H), 8.53 (d, ³J(H) = 7 Hz, 1 H), 8.58 (d, ⁴J(H) = 2 Hz, 1 H), 8.71 (m, 1 H), 8.75 (m, ³J(H) = 4 Hz, 1 H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 16.19, 17.87, 121.57, 121.97, 124.77, 131.35, 136.98, 137.11, 145.00, 147.81, 154.33, 156.76.

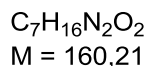
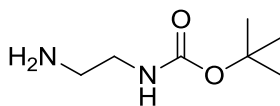
Atto532-Bispidin (9)

	M [g/mol]	m [mg]	V [mL]	n [μmol]	eq.
Dimethyl-3-(2-aminoethyl)-7-Methyl-9-oxo-2,4-di(pyridine-2-yl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-1,5-dicarboxylat (Bispidin)		0.1			exc.
Farbstoff-NHS-Ester			0.03		1
DIPEA	40.0		0.03		exc.

Die Amin-Komponente wird unter Vakuum (30 min, 10 mbar, Speedvac) getrocknet und anschließend mit 30 μL DIPEA und 30 μL der Farbstoff-Stammlösung (2 mg/mL in DMF) in 200 μL trockenem DMF gelöst und bei 35 °C für 2 Stunden kräftig geschüttelt. Die Reaktionslösung wird über Nacht unter Vacuum trocken gezogen, der erhaltene Rückstand in 100 μL DMSO gelöst und über HPLC aufgereinigt. Lösungsmittelgradienten wurden an das Laufverhalten der einzelnen Verbindungen angepasst, Puffer A: 5 % TEAA in H₂O, Puffer B: 5 % TEAA in MeCN/H₂O 70/20. Bestimmung der Ausbeute über Extinktion einer verdünnten Stammlösung.

Ausbeute: 22 μg; 24 nmol (22 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 1097.37; gef. 1097.45.

N-Boc-Ethylendiamin (AHS-10)

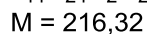
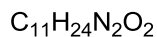
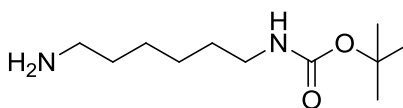
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
Ethyldiamin	60.10	28.77	32.00	478.70	10
Di-tert-butyl dicarbonat	218.25	10.02		45.91	1

Das Diamin wurde in 400 ml DCM vorgelegt und das Di-tert-butyl dicarbonate, gelöst in weiteren 200 ml DCM, bei 0 °C über 4 Stunden zugetropft. Die dabei entstandene weiße Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser (1 x 150 ml) und gesättigter Kochsalzlösung (5 x 150 ml) gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als klare, leicht grüne Flüssigkeit zu erhalten.

Ausbeute: 5.78 g; 36.08 mmol (79 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 161.12; gef. 160.90.

N-Boc-1,6-diaminohexan (AHS-11)

Ansatz:

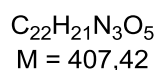
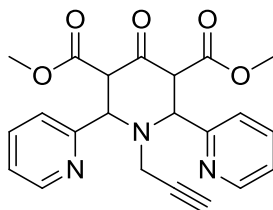
	M [g/mol]	m [g]	n [mmol]	eq.
Diaminohexan	116.20	38.90	334.77	10
Di-tert-butyl-dicarbonate	218.25	7.29	33.40	1

Das Diamin wurde in 400 ml DCM vorgelegt und das Di-tert-butyl dicarbonate, gelöst in weiteren 200 ml DCM, bei 0 °C über 4 Stunden zugetropft. Die entstandene weiße Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser (1 x 150 mL) und gesättigter Kochsalzlösung (5 x 150 mL) gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, um das Produkt als klare, leicht grün-gelbe Flüssigkeit zu erhalten.

Ausbeute: 9.40 g; 43.45 mmol (95 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 217.18; gef. 217.20.

1-Propinyl-4-oxo-2,6-di(pyridin-2-yl)piperidin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (12)



Ansatz:

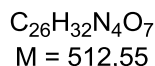
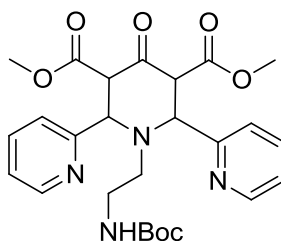
	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
Acetondicarbonsäuredimethylester	174.15	9.11	7.62	52.29	1
Propargylamin	55.08	2.88	3.35	52.29	1
2-Pyridincarboxaldehyd	107.11	11.20	10.00	104.57	2

Der Aldehyd wurde bei 0 °C in 40 mL Methanol vorgelegt und zuerst das Amin, dann die Carbonylverbindung, jeweils in 20 mL Methanol gelöst, langsam zugetropft. Danach wurde noch 10 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Von der entstandenen rotbraunen Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene braune Rückstand in 30 mL Ethanol im Ultraschallbad gelöst. Durch Behandlung im Ultraschallbad für weiter 3 Stunden wurde das Volumen auf die Hälfte eingengt und anschließend über Nacht bei -20 °C gelagert. Erneute Behandlung im Ultraschallbad brachte einen weißen Niederschlag hervor, der abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen wurde.

Ausbeute: 9.50 g; 23.32 mmol (45 %).

MS (ESI pos): [M+H]⁺; ber. 408.15; gef. 408.20.

1-(*N*-Boc-aminoethyl)-4-oxo-2,6-di(pyridin-2-yl)piperidin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (13)



Ansatz:

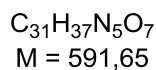
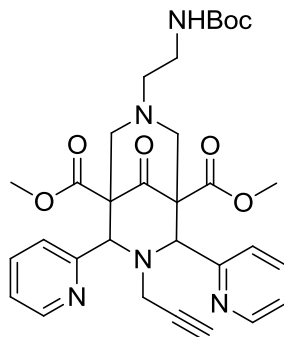
	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
Acetondicarbonsäuredimethylester	174.15	2.16	1.82	12.48	1
<i>N</i> -Boc-Ethylendiamin	160.21	2.00		12.48	1
2-Pyridincarboxaldehyd	107.11	2.68	2.39	24.96	2

Der Aldehyd wurde bei 0 °C in 10 mL Methanol vorgelegt und zuerst das Amin, dann die Carbonylverbindung, jeweils in 10 mL Methanol gelöst, langsam zugetropft. Danach wurde noch 10 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Von der entstandenen rotbraunen Reaktionslösung wurde das Lösungsmittel entfernt und der erhaltene braune Rückstand zur Umkristallisation in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst. Das Produkt wurde Massenspektrometrie nachgewiesen .

Ausbeute: 2.36 g; 4.62 mmol (37 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺; ber. 513.23; gef. 513.10.

Dimethyl-7-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-3-propinyl-9-oxo-2,4-di(pyridine-2-yl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-1,5-dicarboxylat (14a)

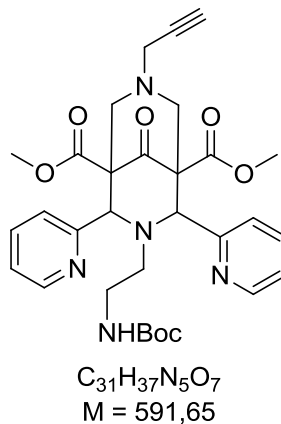


Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(12)	407.4	3.94		9.67	1
N-Boc-Ethylendiamin	160.21	1.55		9.67	1
Formaldehyd (37 wt%)	30.03	1.57	1.44	19.34	2

Das Piperidon wurde in 20 mL THF vorgelegt und auf 60 °C erhitzt, bis der weiße Feststoff vollständig in Lösung ging. Dann wurden das Amin und der Aldehyd, jeweils in 10 mL THF gelöst, zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und danach über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der erhaltene braune Rückstand zur Umkristallisation in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

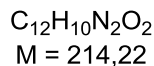
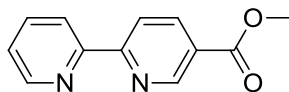
Dimethyl-3-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-7-propinyl-9-oxo-2,4-di(pyridine-2-yl)-3,7-diazabicyclo[3.3.1]nonan-1,5-dicarboxylat (14b)



Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(13)	512.55	0.5		0.98	1
Propargylamin	55.08	2.00		0.98	1
Formaldehyd (37 wt%)	30.03	2.03	1.86	1.95	2

Das Piperidon (13) wurde in 30 mL THF vorgelegt und auf 60 °C erhitzt, bis der weiße Feststoff vollständig in Lösung ging. Dann wurden das Amin und der Aldehyd, jeweils in 10 mL THF gelöst, zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und danach über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der erhaltene braune Rückstand zur Umkristallisation in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst. Das Produkt konnte nicht isoliert werden.

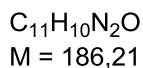
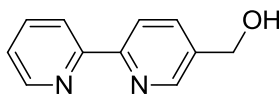
Methyl 2,2'-bipyridin-5-carboxylat (15)**Ansatz:**

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
2-Brompyridin	158.00		2.19	22.9	1.2
Ethyl-6-chlorpyridin-3-carboxylate	171.58	3.28		19.1	1.0
tert-Butyllithium (1.5 M in Pentan)			27.34	47.5	2.5
ZnCl ₂	136.29	7.16		52.5	2.7
Pd(PPh ₃) ₄	1155.60	0.66		0.6	kat.
THF (absolut)			200		

100 mL THF (absolut) werden unter Stickstoff auf -78 °C (Aceton/Flüssigstickstoff) abgekühlt und das tert-Butyllithium zugegeben. Zu der gelben Lösung wird langsam das 2-Brompyridin zugetropft, diese färbt sich dabei dunkelbraun, und weitere 30 min bei -78 °C gerührt. Jetzt wird das ZnCl₂ gelöst in 80 mL THF zugegeben. Die rote Lösung wird 2.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das 6-Chlornikotinat wird, zusammen mit Pd(PPh₃)₄, in 20 mL THF gelöst (gelb) und zur Reaktionslösung gegeben. Anschließend 18 Stunden zum Sieden erhitzen. Beim Erwärmen wird die orangebraune Lösung dann dunkelbraun/schwarz. Danach Zugabe von 26 g EDTA in 100 mL H₂O (susp.). Die erhaltene orange Suspension wird mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung auf einen pH-Wert von 8 bis 9 gebracht und am Rotations-verdampfer vom THF befreit. Die verbleibende wässrige Phase wird 4 mal mit DCM extrahiert, die vereinten organischen Phasen (orange) mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der gelbe Feststoff wird durch Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, Hept/EtOAc, 3.5 % Et₃N).

Ausbeute: 2.86 g; 13.35 mmol (70 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺; ber. 214.17; gef. 214.23.

5-Hydroxymethyl-2,2'-bipyridin (16)

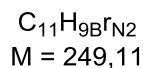
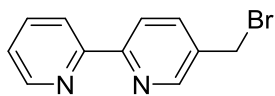
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(15)	214.22	2.86		13.4	1.0
LiBH ₄	22.06	1.49		67.5	5.0
THF (absolut)			70		

Der Ester wird in 70 mL THF unter Stickstoff vorgelegt (gelbe Lsg.) und bei 0 °C das LiBH₄ langsam zugegeben. Die jetzt orange-braune Lösung wird 18 Stunden gerührt. Anschließend wird mit 100 mL H₂O gequencht, das THF entfernt und mit (3 x 100 mL) DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen werden mit 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rottationsverdampfer entfernt. Das Produkt, orange-gelbes Öl, wird ohne weitere Aufreinigung für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Ausbeute: 2.44 g; 13.10 mmol (98 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 187.08; gef. 187.14.

5-Brommethyl-2,2'-bipyridin (17)

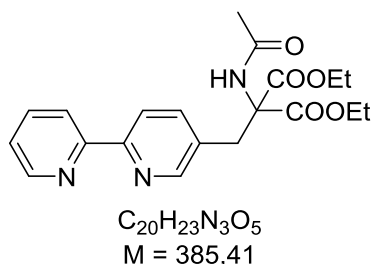
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(16)	186.21	2.44		13.1	1.0
PPh ₃	262.29	4.74		18.0	1.2
CBr ₄	331.63	5.97	70	18.0	1.2

Der Alkohol wird in 40 mL DCM gelöst und bei 0 °C zuerst das PPh₃ und dann langsam das CBr₄ zugegeben. Bei 0 °C 18 Stunden lang rühren. Die Reaktionslösung wird auf etwa 10 mL reduziert und direkt auf die Chromatographiesäule aufgetragen (SiO₂, Hep/EtOAc 1:1). Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.91 g; 3.65 mmol (28 %).

MS (ESI pos): [M+H]⁺: ber. 248.99; gef. 248.93.

2-(2,2'-Bipyridin-5-ylmethyl)-2-acetamidomalonat (18)

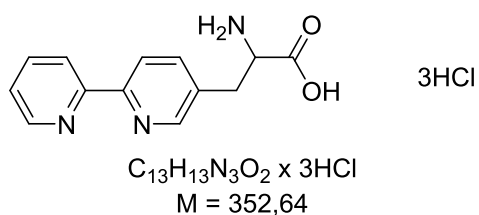
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(17)	249.11	0.91		3.7	1.0
NaOEt	68.05	0.37		5.5	1.5
Acetamidomalonsäurediethylester	217.22	1.19		5.5	1.5

Ethanolat und Malonat werden in 20 mL EtOH (abs.) unter Stickstoffatmosphäre vorgelegt und das Bromid langsam zugegeben. Die Reaktionslösung wird für 12 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Danach wird das Lösungsmittel entfernt und das Produkt durch Säulenchromatographie aufgereinigt (SiO₂ a: Pentan/EtOAc 1:1, b: DCM/MeOH 10:1). Das Produkt wird als leicht oranger Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.80 g; 2.00 mmol (54 %).

MS (ESI pos):[M+H]⁺: ber. 386.16; gef. 386.21.

2-(2,2'-Bipyridin-5-yl)-2-aminopropansäure (19)

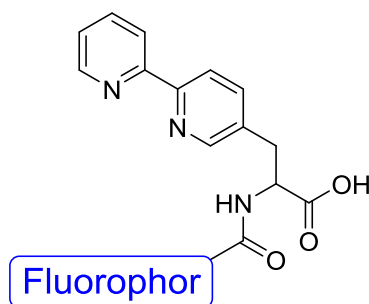
Ansatz:

	M [g/mol]	m [g]	V [mL]	n [mmol]	eq.
(18)	399.44	0.80		2.0	1.0
HCl (37%)	36.46		5.5		ex.

Verbindung (18) wird in 5.5 mL HCl (37 %) gelöst, für 12 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt wird als leicht brauner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0.70 g; 1.96 mmol (98 %)

MS (ESI pos): $[M+H]^+$: ber. 244.10; gef. 244.16.

Darstellung der Bpy-Ala-Farbstoff-Konjugate (20)

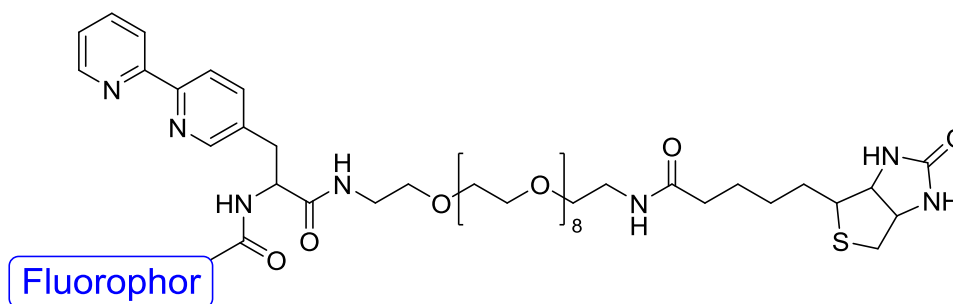
Ansatz:

	M [g/mol]	m [mg]	V [mL]	n [μ mol]	eq.
Bpy-Ala	243.26	0,1		0.4	2
Farbstoff-NHS-Ester			0.03		1
DIPEA	40.0		0.03		exc.

Bezogen auf die eingesetzte Farbstoffmenge werden 2 eq. der Aminosäure unter Vakuum (30 min, 10 mbar, Speedvac) getrocknet und anschließend mit 30 μ L DIPEA und 30 μ L der Farbstoff-Stammlösung (2 mg/mL in DMF) in 200 μ L trockenem DMF gelöst und bei 35 °C für 2 Stunden kräftig geschüttelt. Die Reaktionslösung wird über Nacht unter Vacuum trocken gezogen, der erhaltene Rückstand in 100 μ L DMSO gelöst und über HPLC aufgereinigt. Lösungsmittelgradienten wurden an das Laufverhalten der einzelnen Verbindungen angepasst, Puffer A: 5 % TEAA in H₂O, Puffer B: 5 % TEAA in MeCN/H₂O 70/20. Bestimmung der Ausbeute aus Extinktionswerten einer verdünnten Stammlösung.

Farbstoff	Ausbeute [%]	Farbstoff	Ausbeute [%]
Atto488	26	Atto590	28
Atto532	54	AZ474	44
Atto542	46	Atto633	49
Atto550	39	AZ481	46
TMR	42	Atto665	45
Atto565	39	Atto680	32
Cy3B	43		

Biotinylierung der Bpy-Ala-Farbstoff-Konjugate (21)



Ansatz:

	M [g/mol]	m [mg]	V [mL]	n [mmol]	eq.
Farbstoff-Bpy-Ala		0.01			1
Biotin-PEG ₈ -Amin	682.87				2
DIPEA	40.0				exc.
HBTU					10

Farbstoff-Bpy-Ala, HBTU und Biotin-PEG₈-Amin werden, in separaten Reaktionsgefäßen, unter Vakuum (30 min, 10 mbar, Speedvac) getrocknet und anschließend in je 50 µL trockenem DMF gelöst. Farbstoff- und HBTU-Lösung werden vereint und 30 µL DIPEA zugegeben. Nach 5 Minuten kräftigem Durchmischen wird die Amin-Komponente hinzugefügt. Danach bei 35 °C für 2 Stunden kräftig geschüttelt. Die Reaktionslösung wird über Nacht unter Vacuum trocken gezogen, der erhaltene Rückstand in 100 µL DMSO gelöst und über HPLC aufgereinigt. Lösungsmittelgradienten wurden an das Laufverhalten der einzelnen Verbindungen angepasst, Puffer A: 5 % TEAA in H₂O, Puffer B: 5 % TEAA in MeCN/H₂O 70/20. Bestimmung der Ausbeute aus Extinktionswerten einer verdünnten Stammlösung.

Farbstoff-Bpy-Ala	Ausbeute [%]
Atto532	34
Atto542	31
Atto565	29
Cy3B	33
AZ474	41
Atto633	39
AZ481	37
Atto665	30

Teil V.

Anhang

A. Kristallstrukturdaten

Bpy-BDP (1)

Revision date	Thu May 22 12:17:05 CEST 2014
Identification code	hr_ah1
Empirical formula	C23 H21 B F2 N4
Formula weight	402.25
Temperature	120(1) K
Wavelength	1.54184 Å
Crystal system	triclinic
Space group	P -1 (IT Nr. 2)
Unit cell dimensions	$a = 9.3868(2)$ Å $a = 92.910(2)$ ° $b = 9.7303(3)$ Å $b = 96.618(2)$ ° $c = 10.8644(3)$ Å $g = 103.217(3)$ °
Volume	$956.54(5)$ Å ³
Z	2
Density (calculated)	1.397 Mg·m ⁻³
Absorption coefficient	0.797 mm ⁻¹
F_{000}	420
Crystal size	$0.2392 \cdot 0.1290 \cdot 0.1199$ mm ³
θ range for data collection	4.110 to 70.628 °
Reflections collected	76817
Independent reflections [R_{int}]	3580 [0.0456]
Observed reflections [$I > 2s(I)$]	3472
Index ranges ^s h, k, l	-11 ... 11, -11 ... 11, -13 ... 13
Completeness to $\theta = 67.684$ °	98.3 %
Absorption correction	Gaussian
Transmission factors: max, min	0.919, 0.862
Structure solution	iterative (SUPERFLIP (Palatinus, 2007-2009))
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2 (ShelXL (Sheldrick, 2008) Vers. 2014-3)
Data / restraints / parameters	3580 / 0 / 303
Goodness-of-fit on F^2	1.098
Final R indices [$F_o > 4s(F_o)$] $R(F)$, $wR(F^2)$	0.0460, 0.1195
Final R indices (all data) $R(F)$, $wR(F^2)$	0.0472, 0.1204
Difference density: rms, max, min	0.043, 0.267, -0.296 e·Å ⁻³

4-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)benzaldehyd (7)

Revision date	31.10.2014 10:52:44 CET UTC+01:00	
encif 1.26		
Identification code	hr_ah2a	
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₇ N ₃	
Formula weight	275.34	
Temperature	100(1) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system	monoclinic	
Space group	P 21/c (IT Nr. 14)	
Space group (Hall symbol)	-P 2ybc	
Unit cell dimensions	<i>a</i> = 11.333(5) Å	<i>a</i> = 90 °
	<i>b</i> = 16.594(7) Å	<i>b</i> = 101.866(9) °
	<i>c</i> = 7.692(3) Å	<i>c</i> = 90 °
Volume	1415.7(10) Å ³	
<i>Z</i>	4	
Density (calculated)	1.292 Mg·m ⁻³	
Absorption coefficient	0.078 mm ⁻¹	
<i>F</i> ₀₀₀	584	
Crystal size	0.45 · 0.3 · 0.26 mm ³	
<i>q</i> range for data collection	1.836 to 32.454 °	
Reflections collected	36078	
Independent reflections [<i>R</i> _{int}]	4893 [0.0342]	
Observed reflections [<i>I</i> > 2 <i>s</i> (<i>I</i>)]	4160	
Index ranges ^s <i>h</i> , <i>k</i> , <i>l</i>	-16 ... 15, -24 ... 24, -11 ... 11	
Completeness to <i>q</i> = 25.242 °	100.0 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Transmission factors: max, min	0.8623, 0.8255	
Structure solution	iterative (SUPERFLIP (Palatinus, 2007-2009))	
Refinement method	Full-matrix least-squares on <i>F</i> ² (ShelXL (Sheldrick, 2008) Vers. 2014/6)	
Data / restraints / parameters	4893 / 0 / 241	
Goodness-of-fit on <i>F</i> ²	1.034	
Final <i>R</i> indices [<i>F</i> _o > 4 <i>s</i> (<i>F</i> _o)] <i>R</i> (<i>F</i>), <i>wR</i> (<i>F</i> ²)	0.0439, 0.1139	
Final <i>R</i> indices (all data) <i>R</i> (<i>F</i>), <i>wR</i> (<i>F</i> ²)	0.0529, 0.1221	
Difference density: rms, max, min	0.056, 0.490, -0.202 e·Å ⁻³	

B. Literaturverzeichnis

- [1] M. Leewenhoek, *Philosophical Transaction of the Royal Society of London* **1673**, 6037-6038.
- [2] E. Hecht, *Optik*, 4., überarb. Aufl. ed., Oldenbourg, München ; Wien, **2005**.
- [3] D. B. Murphy, M. W. Davidson, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*, 2. ed. ed., Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, **2013**.
- [4] R. Y. Tsien, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 5612-5626.
- [5] aJ. W. Lichtman, J.-A. Conchello, *Nat Meth* **2005**, *2*, 910-919; bM. J. Sanderson, I. Smith, I. Parker, M. D. Bootman, *Cold Spring Harb Protoc* **2014**, *2014*, pdb top071795.
- [6] aM. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 2410-2433; bN. Niamnont, N. Kimpitak, K. Wongravee, P. Rashatasakhon, K. K. Baldrige, J. S. Siegel, M. Sukwattanasinitt, *Chem Commun (Camb)* **2013**, *49*, 780-782; cY. Gabe, Y. Urano, K. Kikuchi, H. Kojima, T. Nagano, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 3357-3367.
- [7] M. Best, I. Porth, S. Hauke, F. Braun, D. P. Herten, R. Wombacher, *Org Biomol Chem* **2016**, *14*, 5606-5611.
- [8] aY. Urano, D. Asanuma, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamiya, T. Nagano, T. Watanabe, A. Hasegawa, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Nat Med* **2009**, *15*, 104-109; bY. Urano, *Curr Opin Chem Biol* **2012**, *16*, 602-608.
- [9] aC. C. Woodroffe, R. Masalha, K. R. Barnes, C. J. Frederickson, S. J. Lippard, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 1659-1666; bD. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang, *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 168-175; cN. M. Mishina, A. S. Mishin, Y. Belyaev, E. A. Bogdanova, S. Lukyanov, C. Schultz, V. V. Belousov, *Nano Lett* **2015**, *15*, 2928-2932.
- [10] V. Aggarwal, T. Ha, *Bioessays* **2014**, *36*, 1109-1119.
- [11] aA. Rybina, C. Lang, M. Wirtz, K. Größmayer, A. Kurz, F. Maier, A. Schmitt, O. Trapp, G. Jung, D.-P. Herten, *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 6322-6325; bA. Rybina, M. Wirtz, D. Brox, R. Krämer, G. Jung, D.-P. Herten, in *Molecular Catalysts*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2014**, pp. 53-80.
- [12] J. B. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, 3rd ed., Springer, New York, NY, **2006**.
- [13] aA. Gust, A. Zander, A. Gietl, P. Holzmeister, S. Schulz, B. Lalkens, P. Tinnefeld, D. Grohmann, *Molecules* **2014**, *19*, 15824; bW. E. Moerner, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 12596-12602; cW. E. Moerner, D. P. Fromm, *Review of Scientific Instruments* **2003**, *74*, 3597-3619.
- [14] D. Axelrod, *Traffic* **2001**, *2*, 764-774.

- [15] M. Born, E. Wolf, *Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, 6th (corrected) ed. ed., Cambridge University Press, 1997, Cambridge, **1980**.
- [16] E. Abbe, *Archiv für mikroskopische Anatomie* **1873**, *9*, 413-418.
- [17] L. Rayleigh, *Phil. Mag.* **1896**, *XLII*, 167-195.
- [18] S. G. Lipson, H. Lipson, D. S. Tannhauser, *Optical physics*, 3rd ed. / S.G. Lipson, H. Lipson and D.S. Tannhauser. ed., Cambridge University Press, Cambridge, **1995**.
- [19] *Nat Meth* **2013**, *10*, 1135-1135.
- [20] aA. Bartesaghi, A. Merk, S. Banerjee, D. Matthies, X. Wu, J. L. S. Milne, S. Subramaniam, *Science* **2015**, *348*, 1147-1151; bO. L. Krivanek, M. F. Chisholm, V. Nicolosi, T. J. Pennycook, G. J. Corbin, N. Dellby, M. F. Murfitt, C. S. Own, Z. S. Szilagy, M. P. Oxley, S. T. Pantelides, S. J. Pennycook, *Nature* **2010**, *464*, 571-574.
- [21] L. Reimer, H. Kohl, in *Springer series in optical sciences 36*, 5th ed ed., Springer., New York, NY, **2008**, pp. xvi, 587 p.
- [22] L. Novotny, B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, Cambridge University Press, Cambridge, **2006**.
- [23] M. Yamanaka, N. I. Smith, K. Fujita, *Microscopy* **2014**, *63*, 177-192.
- [24] aE. Betzig, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 8034-8053; bS. W. Hell, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 8054-8066; cW. E. Moerner, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 8067-8093.
- [25] S. W. Hell, *Science* **2007**, *316*, 1153-1158.
- [26] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, *313*, 1642-1645.
- [27] S. W. Hell, *Nat Methods* **2009**, *6*, 24-32.
- [28] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed., Springer, New York, **2006**.
- [29] D. Lohse, B. Schmitz, M. Versluis, *Nature* **2001**, *413*, 477-478.
- [30] A. Jabłoński, *Zeitschrift für Physik* **1935**, *94*, 38-46.
- [31] aE. U. Condon, *Physical Review* **1928**, *32*, 858-872; bJ. Franck, E. G. Dymond, *Transactions of the Faraday Society* **1926**, *21*, 536-542.
- [32] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, *142*, 463-562.
- [33] A. Albini, M. Fagnoni, *Handbook of synthetic photochemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.
- [34] aS. P. McGlynn, J. Daigre, F. J. Smith, *The Journal of Chemical Physics* **1963**, *39*, 675-679; bX. Sun, B. Zhang, X. Li, C. O. Trindle, G. Zhang, *The Journal of Physical Chemistry A* **2016**, *120*, 5791-5797.

- [35] D. R. Kearns, A. J. Stone, *The Journal of Chemical Physics* **1971**, *55*, 3383-3389.
- [36] aH. Kautsky, *Transactions of the Faraday Society* **1939**, *35*, 216-219; bX.-d. Wang, O. S. Wolfbeis, *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 3666-3761; cK. Kawaoka, A. U. Khan, D. R. Kearns, *The Journal of Chemical Physics* **1967**, *46*, 1842-1853.
- [37] aJ. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Person, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 5465-5469; bP. Holzmeister, A. Gietl, P. Tinnefeld, *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*, 5685-5688.
- [38] M. Kasha, *The Journal of Chemical Physics* **1952**, *20*, 71-74.
- [39] A. S. Verkman, *The American journal of physiology* **1990**, *259*, C375-388.
- [40] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, Ohio Library and Information Network, Wiley Online Library (Online service), *Molecular fluorescence : principles and applications*, Second edition / ed.
- [41] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1967**, *58*, 719-726.
- [42] T. Kokko, L. Kokko, T. Soukka, T. Lovgren, *Anal Chim Acta* **2007**, *585*, 120-125.
- [43] aA. Weller, *Pure and Applied Chemistry* **1968**, *16*; bT. Ueno, Y. Urano, K. Setsukinai, H. Takakusa, H. Kojima, K. Kikuchi, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, T. Nagano, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 14079-14085.
- [44] O. Tour, S. R. Adams, R. A. Kerr, R. M. Meijer, T. J. Sejnowski, R. W. Tsien, R. Y. Tsien, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 423-431.
- [45] K. Rotkiewicz, K. H. Grellmann, Z. R. Grabowski, *Chemical Physics Letters* **1973**, *19*, 315-318.
- [46] J. W. Verhoeven, *Pure and Applied Chemistry* **1986**, *58*.
- [47] M. Heilemann, S. van de Linde, A. Mukherjee, M. Sauer, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6903-6908.
- [48] H. Hwang, H. Kim, S. Myong, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 7414-7418.
- [49] C. Steinhauer, C. Forthmann, J. Vogelsang, P. Tinnefeld, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 16840-16841.
- [50] Y. C. Liang, A. S. Dvornikov, P. M. Rentzepis, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100*, 8109-8112.
- [51] G. T. Dempsey, J. C. Vaughan, K. H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, *Nat Methods* **2011**, *8*, 1027-1036.
- [52] G. T. Dempsey, M. Bates, W. E. Kowtoniuk, D. R. Liu, R. Y. Tsien, X. Zhuang, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 18192-18193.

- [53] aA. Burgert, S. Letschert, S. Doose, M. Sauer, *Histochemistry and Cell Biology* **2015**, *144*, 123-131; bS. Wäldchen, J. Lehmann, T. Klein, S. van de Linde, M. Sauer, *Scientific Reports* **2015**, *5*, 15348.
- [54] aX. Zhang, Y. Shiraishi, T. Hirai, *Organic Letters* **2007**, *9*, 5039-5042; bH. N. Kim, M. H. Lee, H. J. Kim, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem Soc Rev* **2008**, *37*, 1465-1472.
- [55] R. Jungmann, C. Steinhauer, M. Scheible, A. Kuzyk, P. Tinnefeld, F. C. Simmel, *Nano Letters* **2010**, *10*, 4756-4761.
- [56] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem Rev* **2010**, *110*, 2620-2640.
- [57] Y. Xu, Y. Pang, *Chem Commun (Camb)* **2010**, *46*, 4070-4072.
- [58] A. Rybina, B. Thaler, R. Kramer, D. P. Herten, *Phys Chem Chem Phys* **2014**, *16*, 19550-19555.
- [59] M. K. Lee, J. Williams, R. J. Twieg, J. Rao, W. E. Moerner, *Chem Sci* **2013**, *42*, 220-225.
- [60] aJ. Wu, W. Liu, J. Ge, H. Zhang, P. Wang, *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 3483-3495; bJ. Hu, X. Zhang, D. Wang, X. Hu, T. Liu, G. Zhang, S. Liu, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 19030.
- [61] aA. Mokhir, A. Kiel, D.-P. Herten, R. Kraemer, *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 5661-5666; bD. Brox, P. Comba, D. P. Herten, E. Kimmle, M. Morgen, C. L. Ruhl, A. Rybina, H. Stephan, G. Storch, H. Wadepohl, *J Inorg Biochem* **2015**, *148*, 78-83.
- [62] A. Sprödefeld, A. Kiel, D.-P. Herten, R. Krämer, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* **2013**, *639*, 1636-1639.
- [63] M. Schwering, A. Kiel, A. Kurz, K. Lympelopoulos, A. Sprödefeld, R. Krämer, D.-P. Herten, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 2940-2945.
- [64] B. Valeur, I. Leray, *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, *205*, 3-40.
- [65] N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 1130-1172.
- [66] R. E. Thompson, D. R. Larson, W. W. Webb, *Biophysical Journal* **2002**, *82*, 2775-2783.
- [67] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, M. D. Mason, *Biophysical Journal* **2006**, *91*, 4258-4272.
- [68] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 1184-1201.
- [69] P. F. Aramendia, R. M. Negri, E. S. Roman, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 3165-3173.
- [70] aG. Duran-Sampedro, A. R. Agarrabeitia, I. Garcia-Moreno, A. Costela, J. Bañuelos, T. Arbeloa, I. López Arbeloa, J. L. Chiara, M. J. Ortiz, *European Journal of Organic Chemistry* **2012**, *2012*, 6335-6350; bL. Jiao, W. Pang, J. Zhou, Y. Wei, X. Mu, G. Bai, E. Hao, *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 9988-9996.

- [71] N. Billinton, A. W. Knight, *Analytical Biochemistry* **2001**, *291*, 175-197.
- [72] A. Loudet, K. Burgess, *Chemical Reviews* **2007**, *107*, 4891-4932.
- [73] A. Loudet, K. Burgess, *Chem Rev* **2007**, *107*, 4891-4932.
- [74] A. E. Gillam, D. H. Hey, A. Lambert, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1941**, 364.
- [75] S. Dhanya, P. K. Bhattacharyya, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1992**, *63*, 179-185.
- [76] aG. K. Walkup, S. C. Burdette, S. J. Lippard, R. Y. Tsien, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 5644-5645; bH. Koutaka, J.-i. Kosuge, N. Fukasaku, T. Hirano, K. Kikuchi, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52*, 700-703.
- [77] aP. Comba, M. Kerscher, W. Schiek, in *Progress in Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., **2008**, pp. 613-704; bP. Comba, H. Rudolf, H. Wadepl, *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 2724-2736; cC. Mannich, P. Mohs, *Berichte* **1930**, *63B*, 564.
- [78] aC. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu Rev Biochem* **2010**, *79*, 413-444; bC. A. Panetta, H. J. Kumpaty, N. E. Heimer, M. C. Leavy, C. L. Hussey, *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, *64*, 1015-1021; cJ. Xie, W. Liu, P. G. Schultz, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46*, 9239-9242.
- [79] D. Brox, A. Kiel, S. J. Wörner, M. Pernpointner, P. Comba, B. Martin, D.-P. Herten, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e58049.
- [80] aA. P. de Silva, T. S. Moody, G. D. Wright, *Analyst* **2009**, *134*, 2385-2393; bT. Miura, Y. Urano, K. Tanaka, T. Nagano, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 8666-8671.
- [81] aI. López Arbeloa, P. Ruiz Ojeda, *Chemical Physics Letters* **1982**, *87*, 556-560; bS. S. Rosenfeld, J. Xing, G. M. Jefferson, H. C. Cheung, P. H. King, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 36731-36739; cA. Einfeld, J. S. Briggs, *Chemical Physics* **2006**, *324*, 376-384.
- [82] R. Lamichhane, A. Solem, W. Black, D. Rueda, *Methods* **2010**, *52*, 192-200.
- [83] N. Michael Green, in *Methods in Enzymology, Vol. Volume 184* (Eds.: W. Meir, A. B. Edward), Academic Press, **1990**, pp. 51-67.
- [84] A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Kramer, D. P. Herten, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46*, 3363-3366.
- [85] R. L. Davies, K. W. Dunning, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1965**, 4168.
- [86] R. P. Nieuwenhuizen, M. Bates, A. Szymborska, K. A. Lidke, B. Rieger, S. Stallinga, *PLoS One* **2015**, *10*, e0127989.
- [87] K. Chung, J. Wallace, S.-Y. Kim, S. Kalyanasundaram, A. S. Andelman, T. J. Davidson, J. J. Mirzabekov, K. A. Zalocusky, J. Mattis, A. K. Denisin, S. Pak, H. Bernstein, C. Ramakrishnan, L. Grosenick, V. Gradinaru, K. Deisseroth, *Nature* **2013**, *497*, 332-337.

- [88] aC. Lin, R. Jungmann, A. M. Leifer, C. Li, D. Levner, G. M. Church, W. M. Shih, P. Yin, *Nat Chem* **2012**, *4*, 832-839; bR. Jungmann, M. S. Avendano, J. B. Woehrstein, M. Dai, W. M. Shih, P. Yin, *Nat Meth* **2014**, *11*, 313-318.
- [89] M. Heilemann, D. P. Herten, R. Heintzmann, C. Cremer, C. Müller, P. Tinnefeld, K. D. Weston, J. Wolfrum, M. Sauer, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 3511-3517.
- [90] H. Stephan, M. Walther, S. Fähnemann, P. Ceroni, J. K. Molloy, G. Bergamini, F. Heisig, C. E. Müller, W. Kraus, P. Comba, *Chemistry – A European Journal* **2014**, *20*, 17011-17018.
- [91] aA. Löschberger, C. Franke, G. Krohne, S. van de Linde, M. Sauer, *Journal of Cell Science* **2014**, *127*, 4351-4355; bP. de Boer, J. P. Hoogenboom, B. N. G. Giepmans, *Nat Meth* **2015**, *12*, 503-513.
- [92] aS. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, M. Shirakawa, K. Kikuchi, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 3641-3643; bS. Kucher, S. Korneev, S. Tyagi, R. Apfelbaum, D. Grohmann, E. A. Lemke, J. P. Klare, H. J. Steinhoff, D. Klose, *J Magn Reson* **2017**, *275*, 38-45.
- [93] T. Niehorster, A. Loschberger, I. Gregor, B. Kramer, H.-J. Rahn, M. Patting, F. Koberling, J. Enderlein, M. Sauer, *Nat Meth* **2016**, *13*, 257-262.
- [94] D. Brox, M. Schwering, J. Engelhardt, D. P. Herten, *Chemphyschem* **2014**, *15*, 2331-2336.
- [95] aJ. B. Grimm, B. P. English, J. Chen, J. P. Slaughter, Z. Zhang, A. Revyakin, R. Patel, J. J. Macklin, D. Normanno, R. H. Singer, T. Lionnet, L. D. Lavis, *Nat Methods* **2015**, *12*, 244-250, 243 p following 250; bJ. B. Grimm, T. Klein, B. G. Kopek, G. Shtengel, H. F. Hess, M. Sauer, L. D. Lavis, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 1723-1727.
- [96] A. M. Huynh, J. Menges, M. Vester, T. Dier, V. Huch, D. A. Volmer, G. Jung, *ChemPhysChem* **2016**, *17*, 433-442.
- [97] aP. Tinnefeld, T. Cordes, *Nat Methods* **2012**, *9*, 426-427; author reply 427-428; bJ. H. van der Velde, J. Oelerich, J. Huang, J. H. Smit, A. Aminian Jazi, S. Galiani, K. Kolmakov, G. Guoridis, C. Eggeling, A. Herrmann, G. Roelfes, T. Cordes, *Nat Commun* **2016**, *7*, 10144.
- [98] aA. Herner, G. Estrada Girona, I. Nikic, M. Kallay, E. A. Lemke, P. Kele, *Bioconjug Chem* **2014**, *25*, 1370-1374; bG. Knorr, E. Kozma, A. Herner, E. A. Lemke, P. Kele, *Chemistry* **2016**, *22*, 8972-8979; cG. Lukinavicius, K. Umezawa, N. Olivier, A. Honigmann, G. Yang, T. Plass, V. Mueller, L. Reymond, I. R. Correa, Jr., Z. G. Luo, C. Schultz, E. A. Lemke, P. Heppenstall, C. Eggeling, S. Manley, K. Johnsson, *Nat Chem* **2013**, *5*, 132-139.
- [99] aJ. E. Hoffmann, T. Plass, I. Nikic, I. V. Aramburu, C. Koehler, H. Gillandt, E. A. Lemke, C. Schultz, *Chemistry* **2015**, *21*, 12266-12270; bl. Nikic, J. H. Kang, G. E. Girona, I. V. Aramburu, E. A. Lemke, *Nat Protoc* **2015**, *10*, 780-791; cl. Nikic, T. Plass, O. Schraidt, J. Szymanski, J. A. Briggs, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53*, 2245-2249.
- [100] A. Minta, J. P. Kao, R. Y. Tsien, *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264*, 8171-8178.

- [101] S. N. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarhan, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita, Y. Urano, *Nat Chem* **2014**, *6*, 681-689.
- [102] a, Agilent Technologies, XRD Products, Yarton, UK, **2011**; b, 1997-2008, Madison, Wisconsin.
- [103] aG. M. Sheldrick, Bruker AXS, Karlsruhe, **2004-2008**; bG. M. Sheldrick, Bruker AXS, Karlsruhe, **2004-2008**; cR. H. Blessing, *Acta Cryst.* **1995**, *A51*.
- [104] R. C. Clark, J. S. Reid, *Acta Cryst.* **1995**, *A51*, 887-897.
- [105] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. App. Cryst.* **2009**, *42*, 339-341.
- [106] L. Palatinus, EPF Lausanne, Switzerland, **2007**.
- [107] aG. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2008**, *A64*, 112-122; bG. M. Sheldrick, Universität Göttingen, Göttingen, **1997**; cG. M. Sheldrick, Universität Göttingen, Göttingen, **2012**.
- [108] S. Wolter, A. Loschberger, T. Holm, S. Aufmkolk, M. C. Dabauvalle, S. van de Linde, M. Sauer, *Nat Methods* **2012**, *9*, 1040-1041.

C. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen an all die Menschen, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen oder auch einfach mit ihrer guten Laune, die Zeit meiner Promotion angenehmer gestaltet haben. Dies sind:

mein Doktorvater Dirk-Peter Herten, durch den die Arbeit auf diesem spannenden Gebiet überhaupt erst möglich wurde. Vielen Dank für die motivierenden Gespräche, fachlichen Diskussionen und das Eröffnen eines Fachgebietes das weit über die chemische Synthese hinausgeht. Die Arbeit mit hochentwickelten Techniken und modernsten Geräten brachte mich buchstäblich an die Grenze des (optisch) Möglichen

Dominik Box der mir stets hilfsbereit zur Seite stand, mit offenem Ohr für streng wissenschaftliche Diskussionen und in unterhaltsamen Kaffeepausen

Kristin Grußmayer, Anton Kurz und Felix Braun für das Anpassen der Analyse-Software

Klaus Yserentant, Siegfried Hänselmann, Martin Seefeld und Wioleta Chmielewicz für die Unterstützung bei biologischen Belangen

Sebastian Bierbaum, Arina Rybina, Daniel Barzan und alle übrigen Mitglieder der Arbeitsgruppe Herten für die schöne Zeit, die ich Dank euch hatte

Prof. Thorben Cordes, der den Aufenthalt in Groning ermöglichte und dadurch einen wesentlichen Beitrag zum erfolgreichen Ausgang dieser Arbeit beigesteuert hat

Ana Rios und Ruben Maaskant für die nette Betreuung in der ungewohnten Umgebung von Groningen

Prof. Peter Comba für das Bereitstellen von Laborplatz und Materialien zur Synthese der Bispidine

Arkadius Waleska, Michael Westphal, Michael Morgen, Marion Kerscher und allen anderen aus dem Arbeitskreis Comba, für die manchmal auch hilfreichen Tips bei der Synthese und die angenehme Atmosphäre

Paja Reisch, Ben Krämer und Felix Koberling von PicoQuant, für die Hilfe bei der Umsetzung der STED-Messungen

Alexander Zilles und Jutta Arden-Jacob von Atto-Tec, für hilfreiche Tipps zur Synthese und das bereitstellen unzähliger Farbstoffe

alle Partner aus dem Projekt Switch-Click-Microscopy für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung mit Materialien und Wissen

Susanne Vischer und Philipp Biegger für das Korrekturlesen dieser Arbeit

meine Forschungspraktikanten Milena Stephan, Miriam Knopf, Roman Spilger und Nathalie Klein, die mit ihrer durchgehend motivierten Einstellung, großes Durchhaltevermögen bewiesen haben

Prof. Hubert Wadepohl für das Lösen der Kristallstrukturen sowie allen Mitarbeitern der Massenspektrometrie-Abteilung des OCI, und der NMR-Abteilung des ACI

Ein ganz besonderes Dank gilt meiner Familie, die mich auch in dieser Zeit unterstützte, meinen Eltern und meiner Tochter, deren fröhliches Lachen ein unermüdlicher Quell an Motivation ist

und meiner Freundin Rebekka Haffner, die immer für mich da ist und auch nach einem frustrierenden Tag im Dunkellabor, die Sonne für mich aufgehen lässt.

D. Eidesstattliche Erklärung

gemäß § 8 der Promotionsordnung der
Naturwissenschaftlich- Mathematischen Gesamtfakultät der
Universität Heidelberg

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema:

„Chemisch schaltbare Fluoreszenzsonden für die optische Nanoskopie“

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

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

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg den 15. März 2017

Andreas Haderspeck