

In-vitro-Untersuchung einzelner  
fluoreszierender Proteine mit spektral  
und zeitlich aufgelöster  
Fluoreszenzspektroskopie

DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Dipl. Chem. Christian Blum  
geb. am 14.7.1969 in Fulda

eingereicht beim Fachbereich 8  
der Universität Siegen  
Siegen 2004

urn:nbn:de:hbz:467-633

---

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften an der Universität Siegen:

Gutachter: Prof. Dr. A. J. Meixner  
Prof. Dr. H. J. Butt  
Prof. Dr. V. Subramaniam

Tag der mündlichen Prüfung: 10.5.2004

---

## Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurden die Varianten EYFP und EGFP des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*, sowie das aus der Steinkoralle *Discosoma* stammende rot fluoreszierende Protein DsRed und weitere vier DsRed Varianten mit spektroskopischen Methoden untersucht. Neben einigen ensemblespektroskopischen Untersuchungen wurde die Fluoreszenz einer großen Anzahl einzelner fluoreszierender Proteine und Proteinoligomere, zeitlich und spektral aufgelöst, auf Einzelmolekülebene bei Raumtemperatur *in-vitro* untersucht.

Bei Beobachtung auf Einzelmolekülebene zeigen die Proteine eine erstaunliche intrinsische Vielgestaltigkeit und Dynamik der Fluoreszenz. Es wurde gezeigt, dass die Breite der Verteilung der Lage des Emissionsmaximums eine für jede Variante spezifische Größe ist, die sich direkt aus der Einbettung des Chromophors in die charakteristische Proteinumgebung ergibt. Außerdem konnten zum Teil bisher unbekannte, sich in ihrer Fluoreszenz unterscheidende Formen der Proteine identifiziert und Übergänge zwischen verschiedenen Formen spektral verfolgt werden.

Für DsRed und alle DsRed Varianten wurde unter den typischen Bedingungen der Einzelmolekülspektroskopie bei Beobachtung des gereiften Chromophors fast ausschließlich die sog. super rote Form des Chromophors detektiert, die sich durch die hohen Anregungsleistungen schnell bildet. Außerdem wurden bei allen DsRed Varianten gemischte Oligomere aus Proteinen mit ungereiftem und gereiftem Chromophor beobachtet, und es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Chromophore innerhalb eines Oligomers kein hocheffizientes FRET System bilden.

## Abstract

This work presents spectroscopic analyses of the EGFP and EYFP variants of the *Aequorea* green fluorescent protein (GFP) and of the red fluorescing protein DsRed and four of its variants from the coral *Discosoma*. In addition to ensemble spectroscopy, the fluorescence of a large number of single fluorescing proteins and protein oligomers was temporally- and spectrally-resolved at the single molecule level *in vitro* at room temperature.

These analyses reveal that at the single molecule level these proteins exhibit a striking intrinsic versatility and dynamics of the emission. It was shown that the spread of the distribution of the emission maximum positions is characteristic for each variant and directly reflects the specific nature of the embedding of the chromophore into its neighbouring protein environment. It was further possible to identify different emitting forms of the proteins, some not observed until now, and to follow transitions between the forms by spectrally resolving the single molecule emission.

The typical conditions for single molecule detection employed in these experiments, especially the high excitation power, caused an extremely rapid transition of the matured chromophore of DsRed and all of the tested variants into a 'super-red' emitting form. Mixed fluorescence of the immature and the mature chromophore was detected for all DsRed variants, yielding evidence of the existence of mixed oligomers of proteins with mature and immature chromophores. Finally it was possible to show that the different chromophores within an oligomer do not form an efficient FRET system.



---

1	EINLEITUNG .....	5
1.1	Ziele .....	8
2	GRUNDLAGEN.....	9
2.1	Das Prinzip der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie.....	9
2.2	Lichtabsorption und -emission von Molekülen.....	10
2.3	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer .....	11
2.4	Fluoreszenzdynamik und Streuung spektraler Parameter .....	14
2.5	Fluoreszierende Proteine .....	17
2.5.1	Proteinstruktur .....	17
2.5.2	Der Chromophor und dessen Bildung .....	19
3	METHODEN .....	22
3.1	Experimenteller Aufbau zur Einzelmolekülspektroskopie.....	22
3.1.1	Messparameter.....	24
3.2	Datenaufnahme und Datenverarbeitung .....	25
3.2.1	Datenaufnahme .....	25
3.2.2	Verarbeitung der Rohdaten .....	25
3.2.3	Das Hintergrundsignal .....	28
3.2.4	Sichtung der Spektren .....	29
3.2.5	Erstellen von Histogrammen und Korrelationsdiagrammen verschiedener spektraler Parameter .....	30
3.3	Probenpräparation .....	32
3.4	Ensemblespektroskopie .....	33
4	SPEKTRALE EIGENSCHAFTEN DER FLUORESZIERENDEN PROTEINE .....	34
4.1	Aequorea GFP und dessen Varianten.....	34

4.1.1	Aequorea GFP .....	35
4.1.2	EGFP .....	37
4.1.3	EYFP .....	39
4.1.4	Bekanntes Fluoreszenzverhalten einzelner Proteine von Aequorea GFP und dessen Varianten .....	40
4.2	DsRed und dessen Varianten .....	42
4.2.1	DsRed .....	42
4.2.2	DsRed-2 und E5 .....	46
4.2.3	AG4 .....	48
4.2.4	E8 .....	49
4.2.5	Bekanntes Fluoreszenzverhalten einzelner DsRed Oligomere .....	52
<b>5 FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE</b>		
<b>UNTERSUCHUNGEN AUF EINZELMOLEKÜLEBENE .....</b>		<b>54</b>
5.1	Einzelmolekül Fluoreszenzspektroskopie an EYFP und EGFP .....	55
5.1.1	Quantenausbeuten des Photobleichens von EYFP und EGFP .....	55
5.1.2	EYFP - Verteilung der Einzelmolekülfluoreszenz Maximumlagen und Identifizierung von Subensembles .....	57
5.1.3	EGFP- Verteilung der Einzelmolekülfluoreszenz Maximumlagen und Identifizierung von Subensembles .....	62
5.1.4	Einzelmolekül-Fluoreszenzdynamik .....	66
5.1.5	Die langwellig fluoreszierenden Formen von EYFP und EGFP – Folgerungen .....	75
5.1.6	Spektrale Verteilung und Diffusion ohne Formumwandlung bei EYFP und EGFP .....	82
5.1.7	Intensitätsfluktuationen der Emission .....	89
5.2	DsRed und Varianten .....	97
5.2.1	Anzahl der emittierten Photonen pro Oligomer für DsRed und seine Varianten .....	97
5.2.2	Einzelmolekülspektren und deren Verteilung der spektralen Lagen des Fluoreszenzmaximums .....	100
5.2.3	Spektrale Diffusion von DsRed und dessen Varianten .....	117
5.2.4	Abschätzung der Auswirkung spektraler Verschiebung auf das spektrale Überlappungsintegral zweier FRET Partner .....	122

---

5.2.5	Fluktuationen der Fluoreszenzintensität.....	124
5.2.6	Kopplung unterschiedlicher Chromophore via FRET .....	126
5.2.7	Untersuchungen zum Anzahlverhältnis zwischen gereiftem und ungereiftem Chromophor bei verschiedenen DsRed Varianten .....	145
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	152
7	LITERATUR.....	158





# 1 Einleitung

Innerhalb der letzten 10 Jahre wurde aus dem bis dahin weitgehend unbekanntem und wenig beachtetem grün fluoreszierendem Protein (GFP) ein in der Molekularbiologie, Medizin und Zellbiologie vielfältig eingesetztes Werkzeug. Durch Einschleusung des GFP Gens in Zellen wird GFP von der Zelle selbst hergestellt, die grüne Fluoreszenz entsteht durch eine autokatalytische Reaktion innerhalb des Proteins, zu der keine weiteren Reaktionspartner benötigt werden. Man verfügt somit über eine Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung innerhalb von Zellen, die keine weiteren Eingriffe von außen benötigt und zudem nur in Ausnahmefällen für die Zelle toxisch ist, was das Protein zu einem gefragten in vivo Fluoreszenzmarker macht. Das ursprüngliche grün fluoreszierende Protein wurde inzwischen so verändert, dass andersfarbige fluoreszierende Varianten erhalten wurden, außerdem wurden einige weitere fluoreszierende Proteine gefunden, so dass heute Proteine, die Fluoreszenz von blau bis rot zeigen, zur Verfügung stehen.

Das grün fluoreszierende Protein wurde 1962 von Shimomura et al. in der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und in einer Veröffentlichung, die sich eigentlich mit der Reinigung des Proteins Aequorin beschäftigte, erwähnt [1]. In den folgenden Jahren erschienen nur eine Handvoll Veröffentlichungen, die sich mit dem grün fluoreszierenden Protein beschäftigten. So dauerte es bis 1979, bis die Struktur des fluoreszierenden Chromophors aufgeklärt wurde [2] und erst 1992 wurde die Sequenz des Proteins bestimmt [3]. Die Literaturlatenbank „PubMed“ verzeichnet bis Anfang 1994 insgesamt nur 82 Publikationen, die „GFP“ im Titel oder der Zusammenfassung führen. Erst als es 1994 gelang, die für GFP kodierende DNA in andere Organismen und Zellen einzuschleusen, in denen dann das grün fluoreszierende Protein gebildet wurde [4], rückte GFP ins Blickfeld vieler Forscher. Die Literaturlatenbank „PubMed“ weist dementsprechend das Erscheinen von über 6300 Veröffentlichungen, die „GFP“ im Titel oder der Zusammenfassung führen, zwischen Anfang 1994 und heute (Anfang 2004) aus.

Inzwischen sind fluoreszierende Proteine bis in die Kunst und damit in die öffentliche Diskussion und ins Bewusstsein einer breiten Öffentlichkeit vorgedrungen. Der Künstler Eduardo Kac erfand den Begriff der „Transgenen Kunst“ und gab im Jahr 2000 die Schaffung des transgenetischen Hasen „Alba“ als Kunstobjekt bekannt [5]. Er präsentierte hierzu Bilder von Alba, die einen grünen Hasen zeigten. Das öffentliche Echo war veritabel, auf einmal schien die Gentechnik die Laboratorien verlassen zu haben und deutlich, nämlich grün, sichtbar zu werden. Es kam zu einer breit

angelegten Diskussion über Moral, Gentechnik und Kunst, wobei nie zweifelsfrei die physische Existenz von Alba belegt wurde.

Auch falls es Alba nicht gab, so gibt es inzwischen transgene höhere Tiere wie Mäuse und Affen [6, 7]. Anwendungen im ganzen höheren Organismus sind jedoch selten, die meisten Anwendungen liegen auf zellulärer und molekularer Ebene [8]. Die erste Anwendung von GFP war die Verwendung als Reporter Gen. Hierbei wird das Niveau der Genexpression beobachtet, indem das GFP Gen von einem interessierenden Promotor kontrolliert wird. Die Messung der GFP Fluoreszenz zeigt direkt das Niveau der Genexpression an [4, 9]. Eine weitere Anwendung ist als „Fusion Tag“, wobei ein Gen mit dem GFP Gen verschmolzen wird, so dass in der Zelle ein chimäres Protein exprimiert wird. In den meisten Fällen unterscheiden sich die entstandenen Chimären nicht in der Funktion und Lokalisation des ursprünglichen Proteins, so dass durch die Verfolgung der GFP Fluoreszenz das Zielprotein lokalisiert werden kann [10, 11]. Durch Bleichexperimente an Zellen, die GFP Chimäre enthalten, kann zudem die Mobilität der Chimären bestimmt werden [12]. Da einige GFP Varianten Veränderungen der Fluoreszenz abhängig von verschiedenen Salzkonzentrationen und pH Werten zeigen, wurden diese als Biosensoren innerhalb von Zellen eingesetzt, um pH Unterschiede und Konzentrationsunterschiede bestimmter Anionen und Kationen innerhalb von Zellen zu zeigen [13, 14].

Eine weitere Gruppe von Anwendungen von fluoreszierenden Proteinen, die ständig an Bedeutung gewinnt, beruht auf dem Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) zwischen Chromophoren. FRET ist ein nichtstrahlender Transfer von Energie vom angeregten Donorchromophor zu einem geeigneten Akzeptorchromophor, wobei eine starke Abhängigkeit der Transfereffizienz von der Entfernung der FRET Partner voneinander besteht, so dass durch FRET Messungen Abstandsänderungen im Angströmbereich detektiert werden können. Aus verschiedenen GFP Varianten können sog. FRET Paare konstruiert werden, die wiederum von den Zellen selbst synthetisiert werden. FRET Paare kommen bei verschiedensten Anwendungen zum Einsatz, z.B. wurden Konstrukte geschaffen, bei denen durch ein FRET Paar Konformationsveränderungen durch die Veränderung der Energietransfereffizienz sichtbar gemacht wurden [15]. FRET Techniken können auch verwendet werden, um Protein-Protein Wechselwirkungen zu studieren, wobei verschiedene Ansätze verwendet werden, die alle darauf beruhen die Veränderung der FRET Wechselwirkungen bei Annähern oder Entfernen der FRET Partner voneinander zu beobachten [16-18].

Die Entwicklung von Methoden und hochsensiblen Detektoren zur Beobachtung einzelner fluoreszierender Moleküle machte es möglich, die Fluoreszenz einzelner,

zunächst synthetischer Fluoreszenzfarbstoffe zu untersuchen [19-21]. Inzwischen ist die Beobachtung von FRET Wechselwirkungen einzelner FRET Paare aus synthetischen Farbstoffen mit denen Biomoleküle markiert wurden ein oft benutztes Verfahren, um molekulare Dynamik sichtbar zu machen [22, 23].

Der Einsatz der Einzelmolekülspektroskopie zur Untersuchung von fluoreszierenden Proteinen ist eine naheliegende Konsequenz dieser Entwicklung. Seit einigen Jahren werden verschiedene fluoreszierende Proteine, meist *in vitro*, auf Einzelmolekülebene untersucht [24-28]. Auch die Untersuchung von einzelnen FRET Paaren aus verschiedenen GFP Varianten hat inzwischen begonnen [29].

Bei der Beobachtung einzelner Moleküle werden Eigenschaften sichtbar, die sich mit klassischen Ensemble-Experimenten nicht messen lassen, da es bei der Untersuchung eines Ensembles zur Ausmittlung der Messwerte kommt. Der Untersuchung einzelner FRET Paare aus fluoreszierenden Proteinen, z.B. zur Aufklärung molekularer Dynamik, sollte konsequenterweise die genaue Analyse des Einzelmolekülverhaltens der fluoreszierenden Proteine vorausgehen. So ist inzwischen einiges über das Auftreten von nicht strahlenden Zuständen, die im Ensemble naturgemäß nicht beobachtet werden können, durch Beobachtung des Verlaufs der Gesamtfluoreszenzintensität einzelner fluoreszierender Proteine bekannt. Arbeiten, bei denen die Fluoreszenz einzelner Proteine spektral aufgelöst detektiert wurden, sind äußerst rar [30, 31], was hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass die spektral aufgelöste Detektion der Fluoreszenz einzelner Moleküle experimentell deutlich anspruchsvoller ist als die Detektion des Verlaufs der Gesamtfluoreszenzintensität. Aus den Fluoreszenzspektren und Spektrenserien einzelner Moleküle können jedoch Informationen über spektrale Verteilungen und das Auftreten von Subensembeln, spektrale Dynamik, Zusammenhänge zwischen spektraler Dynamik und Intensitätsdynamik, usw. gewonnen werden, die bei allen Anwendungen, bei denen einzelne fluoreszierende Proteine als Fluoreszenzsonden verwendet werden, speziell bei FRET Anwendungen, von Interesse sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb mit Hilfe von spektral aufgelöster *in vitro* Einzelmolekülspektroskopie einzelner Proteine die Verteilungen spektraler Parameter bestimmt, spektrale Dynamik analysiert und spektral unterschiedliche Subensembeln gefunden werden.

### 1.1 Ziele

Die photophysikalischen Daten zu Fluoreszenzquantenausbeute und Resistenz gegen Photobleichen zeigen, dass die spektral aufgelöste Fluoreszenzspektroskopie einzelner fluoreszierender Proteine an die Grenzen des heute möglichen stößt. Es wurde sogar die Meinung vertreten, dass jegliche Auflösung von Heterogenitäten bei fluoreszierenden Proteinen aufgrund des schnellen Photobleichens und der geringen Fluoreszenzquantenausbeute unmöglich sei [27].

Ziel der hier vorgelegten Arbeit ist die *in vitro* Beobachtung und Charakterisierung der Fluoreszenz einzelner fluoreszierender Proteine mit Methoden der spektral aufgelösten Fluoreszenzspektroskopie. In einem ersten Schritt sollten geeignete Präparationsmethoden und Versuchsparameter gefunden werden, die die Aufnahme von zunächst einzelnen Fluoreszenzspektren und danach von Spektrenserien einzelner fluoreszierender Proteine erlauben. Anschließend sollten fluoreszierende Proteine verschiedenen Ursprungs, nämlich Varianten des Aequorea GFP und Varianten des DsRed, untersucht werden. Die ausgewählten Varianten zeigen Fluoreszenz in unterschiedlichen spektralen Bereichen zwischen grün und rot, wobei Fluoreszenz Resonanz Energietransfer Paare denkbar sind. Die Verteilungen spektraler Parameter und die Fluoreszenzdynamik der Varianten werden charakterisiert und Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem spektralen Verhalten der verschiedenen Varianten und Stämme werden herausgearbeitet. Hierzu ist es notwendig, von jeder Variante eine statistisch relevante Anzahl einzelner Proteine zu untersuchen, woraus die Notwendigkeit der Auswertung tausender Spektrenserien folgt. Rohdatenmengen in diesem Ausmaß können nur unzureichend und mit hohem Aufwand ohne Softwareunterstützung ausgewertet werden, weshalb die notwendige Software konzipiert und geschrieben wurde.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Das Prinzip der Einzelmolekül- Fluoreszenzmikroskopie

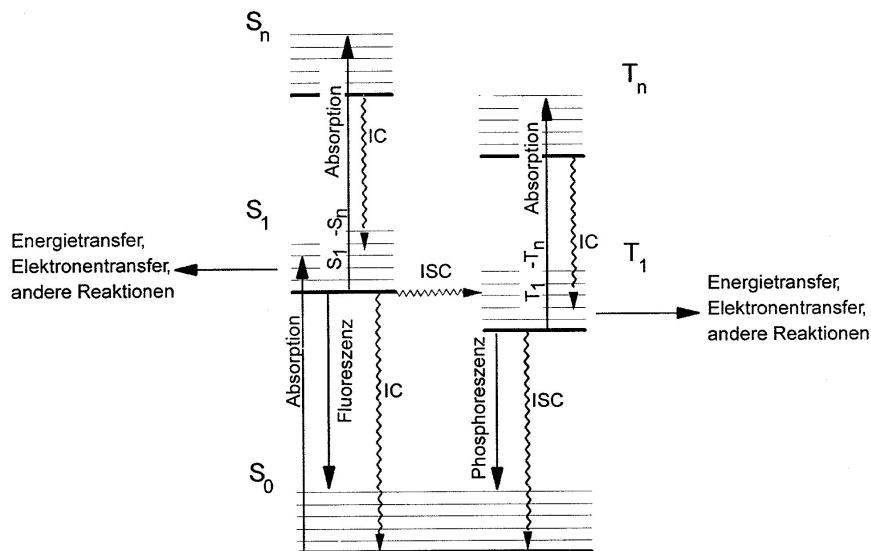
Die Hauptschwierigkeiten bei der Einzelmolekülmikroskopie liegen darin, sicherzustellen, dass man nur ein Molekül untersucht und nicht viele, und in der Detektion des naturgemäß sehr schwachen Signals eines einzelnen Moleküls. Um zu gewährleisten, dass man nur ein einzelnes Molekül untersucht, können nur solche Eigenschaften des Moleküls untersucht werden, die die umgebenden Moleküle nicht aufweisen. Die Fluoreszenz kann eine solche Eigenschaft sein. Wird die zu untersuchende fluoreszierende Substanz in eine unter den gewählten Bedingungen nicht fluoreszierende Umgebung gebracht, und wird weiterhin die Verdünnung der zu untersuchenden Substanz so gewählt, dass sich jeweils nur ein Probenmolekül im Detektionsvolumen befindet, stammt die bei der Untersuchung der Probe gemessene Fluoreszenz von einem einzelnen Molekül. Im hier benutzten Aufbau wird zur Anregung der Fluoreszenz ein fokussierter Laserstrahl benutzt, der über eine Probe aus fluoreszierenden Proteinen, die in einen sehr dünnen Polymerfilm eingebettet sind, gerastert wird. Das Volumen des Probenraumes ergibt sich somit zum einen durch die laterale Ausdehnung des auf die Probe fokussierten beugungsbegrenzten Anregungslichts und zum anderen bei sehr dünnen Polymerfilmen durch die Dicke des Polymerfilms, in die die fluoreszierenden Proteine eingebettet sind.

Um das Fluoreszenzsignal zu detektieren, muss das von der Probe reflektierte und gestreute Anregungslicht unterdrückt werden, da selbst Reste des Anregungslichtes um einige Größenordnungen intensiver sein können als das zu detektierende Fluoreszenzlicht eines einzelnen Moleküls. Dies kann durch hocheffiziente holografische Bandpassfilter (s.g. „Notch-Filter“) erreicht werden. Die Detektion des von einem einzelnen Molekül abgestrahlten Fluoreszenzlichtes erfolgt durch sehr empfindliche Detektoren wie Avalanche Photo Dioden (APD), oder durch gekühlte Charged Coupled Device (CCD) Kameras.

## 2.2 Lichtabsorption und -emission von Molekülen

Grundlage der hier durchgeführten Einzelmoleküldetektion ist die Fluoreszenz der untersuchten Proteine. Unter Fluoreszenz versteht man die strahlende Desaktivierung eines Moleküls zwischen zwei Zuständen gleicher Spinmultiplizität nach vorheriger Promotion in einen angeregten Zustand durch Lichtabsorption.

Eine schematische Darstellung der Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen zeigt das Jabloński-Termschema [32] (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Schema der elektronischen Zustände und Desaktivierungsprozesse eines organischen Moleküls (Jabloński-Termschema).**

**Absorption:** Übergang in elektronisch angeregte Zustände durch Absorption eines Photons.

**Fluoreszenz:** Lichtemission bei der Desaktivierung angeregter Singulettzustände zum Singulettgrundzustand.

**Phosphoreszenz:** Lichtemission bei der Desaktivierung angeregter Triplettzustände zum Singulettgrundzustand.

**Internal Conversion (IC):** Strahlungslose Übergänge zwischen Elektronenzuständen gleicher Spinmultiplizität.

**Inter System Crossing (ISC):** Strahlungslose Übergänge zwischen verschiedenen hoch angeregten Elektronenzuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität.

**Energieübertragung:** Energieübertragung auf andere, sich im Grundzustand befindende Moleküle in der direkten Umgebung.

Durch Absorption eines Photons geht das Molekül vom Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  über. Die strahlungslose Desaktivierung höher angeregter Schwingungszustände verläuft sehr schnell, so dass eine mögliche Fluoreszenzemission praktisch immer vom Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes ausgeht (Kashas-Regel). Von hier kann der

Übergang zu den verschiedenen Schwingungsniveaus des Grundzustandes unter Abgabe eines Fluoreszenzphotons erfolgen, wobei wie bei der Anregung das Franck-Condon-Prinzip gilt. Vernachlässigt man die äußerst schwache Anti-Stokes-Fluoreszenz, so ist das Fluoreszenzspektrum im Vergleich zum Absorptionsspektrum zu längeren Wellenlängen hin verschoben, da ein Teil der aufgenommenen Energie als Schwingungsenergie an die Umgebung abgegeben wurde.

Es sind noch weitere Desaktivierungswege, wie Energietransfer, Inter System Crossing und Phosphoreszenz oder strahlungslose Desaktivierung durch Internal Conversion, möglich (vgl. Abbildung 2.1).

## 2.3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bezeichnet einen Energietransfer aus dem ursprünglich angeregten Zustand des Donorchromophors zu einem Akzeptor, wobei das Fluoreszenzspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Der Energietransfer findet ohne Auftreten eines Photons statt und ist das Resultat weit reichender Dipol-Dipol Wechselwirkungen zwischen dem Donor und Akzeptor.

Die Energietransferrate ist gegeben durch [33]:

$$k_T = \frac{Q_D \cdot \kappa^2}{\tau_D \cdot r^6} \cdot \left( \frac{9000(\ln 10)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N \cdot n^4} \right) \cdot J(\lambda)$$

mit:

$Q_D$	Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$\kappa$	Orientierungsfaktor zur Beschreibung der relativen Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander
$\tau_D$	Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
$r$	Distanz zwischen Donor und Akzeptor
$N$	Avogadro'sche Zahl
$n$	Brechungsindex des Mediums
$J(\lambda)$	spektrales Überlappungsintegral zwischen Donorfluoreszenz und Akzeptorabsorption

Das Spektrale Überlappungsintegral ist wie folgt definiert:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda$$

$\lambda$  Wellenlänge

$F_D(\lambda)$  Flächennormierte korrigierte Donorfluoreszenz

$\varepsilon_A(\lambda)$  Extinktionskoeffizient des Akzeptors

Weit verbreitete Anwendung findet Fluoreszenz Resonanz Energietransfer in den Biowissenschaften, wo mit Hilfe der obigen Gleichungen Abstände zwischen Donor und Akzeptor von z.B. markierten Biomolekülen bestimmt werden. Bei Ensembleexperimenten können fast alle Parameter durch klassische Ensemblespektroskopie bestimmt werden, für den Brechungsindex  $n$  des Mediums wird bei Biomolekülen in wässriger Lösung meist  $n=1,4$  angenommen.

Es bleibt der Orientierungsfaktor  $\kappa$ , welcher wie folgt definiert ist:

$$\kappa^2 = (\cos \Theta_T - 3 \cdot \cos \Theta_D \cdot \cos \Theta_A)^2$$

mit

$\Theta_T$  Winkel zwischen dem Emissionsübergangsdipolmoment des Donors und dem Absorptionsübergangsdipolmoment des Akzeptors

$\Theta_D$  und  $\Theta_A$  Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten und dem den Donor und Akzeptor verbindenden Vektor

Je nach Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander kann  $\kappa^2$  Werte zwischen 0 und 4 einnehmen, wobei  $\kappa^2 = 4$  bei kollinear und parallel liegenden Übergangsdipolmomenten,  $\kappa^2 = 1$  bei parallel liegenden Übergangsdipolmomenten und  $\kappa^2 = 0$  bei senkrecht zueinander stehenden Übergangsdipolmomenten ist. Meist wird für  $\kappa^2$  der Wert  $2/3$  eingesetzt, welcher sich durch Mittelung der Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander durch im Vergleich zum Energietransfer schnelle Rotationsdiffusion der Chromophore ergibt.

Durch Markierung der zu untersuchenden Systeme, z.B. Proteine, DNA, RNA, etc. mit geeigneten FRET Partnern kann so speziell im Ensemble eine Abstandsmessung im Bereich weniger Nanometer erreicht werden.

Bei der Untersuchung eines einzelnen FRET Systems kann im Gegensatz zu Ensembleuntersuchungen nicht davon ausgegangen werden, dass die relevanten Parameter für alle untersuchten Systeme gleich und im einzelnen untersuchten System zeitlich stabil sind. Wenn Fluoreszenzquantenausbeuten, spektrale



Überlappungsintegrale, Lebensdauern, etc. für jedes untersuchte System schwanken können und sich zudem auch im Laufe der Zeit verändern können, ist es ausgesprochen schwierig, z.B. einerseits zwischen einer Veränderung der Energietransferrate aufgrund einer veränderten Distanz zwischen FRET Donor und Akzeptor und andererseits einer gesunkenen Fluoreszenzquantenausbeute oder einem verminderten spektralen Überlappungsintegral zu unterscheiden. Die Kenntnis der Verteilung der relevanten Parameter im Ensemble und die Kenntnis, mit welchen nicht durch Abstandsänderungen der FRET Partner bedingten Veränderungen der Parameter während des Experimentes gerechnet werden muss, kann die Unterscheidung zwischen entfernungsbedingten und nicht entfernungsbedingten Veränderungen der Energietransferrate erleichtern.

## 2.4 Fluoreszenzdynamik und Streuung spektraler Parameter

Bei der Messung einzelner Chromophore, die in Wechselwirkung mit ihrer Umgebung stehen, wird der individuelle Charakter der untersuchten Systeme sichtbar. Zum einen können die untersuchten spektralen Parameter von Molekül zu Molekül variieren, zum anderen fluktuieren die spektralen Parameter eines einzelnen Moleküls zeitlich.

Die bekannteste zeitliche Fluktuation von Fluoreszenz ist die bei der Beobachtung von Intensitätstrajektorien einzelner Moleküle gefundene Wechsel zwischen strahlenden Zuständen und nicht strahlenden Zuständen, die bei einer Vielzahl von Systemen beobachtet wurde. Je nach Dauer der Dunkelzeiten ohne Fluoreszenz wird von „Blinking“ oder „Reversible Photobleaching“ [24, 34, 35] gesprochen.

Bei der Beobachtung der Intensitätstrajektorien eines einzelnen Moleküls ist die einzige Observable die Fluoreszenzintensität, spektrale Veränderungen können nicht beobachtet werden. Bei spektral aufgelöster Beobachtung der Fluoreszenz, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, erhält man neben der Intensitätsinformation noch spektrale Informationen. Entsprechend vielfältiger ist die beobachtete Fluoreszenzdynamik.

An einem geeigneten System, nämlich dem Perylenderivat N,N-di(tert-butoxycarbonyl)-9-amino-N-(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4-dicarboximid, DAPI in Polystyrol konnten auf Einzelmolekülebene zahlreiche Unterschiede im Fluoreszenzspektrum einzelner Moleküle und zeitliche Variationen der Fluoreszenz einzelner Moleküle beobachtet werden [36]. Das Perylenderivat DAPI wurde gewählt, da es eine sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute und Stabilität gegen Photobleichen aufweist. Hinzu kommt eine ausgeprägte Schwingungsprogression der Fluoreszenz, was die Beobachtung von z.B. Veränderungen der Franck-Condon-Faktoren erleichtert.

Zunächst kann zwischen Intensitätsfluktuationen und spektralen Unterschieden unterschieden werden. Als spektrale Unterschiede oder spektrale Fluktuationen werden alle Veränderungen bezeichnet, die sich in der Form und in der Lage des Fluoreszenzspektrums zeigen. Demgegenüber stehen die Intensitätsveränderungen, die sich als Veränderungen der Intensität ohne sonstigen Einfluss auf das Fluoreszenzspektrum zeigen.

Im Experiment werden meist gleichzeitig Intensitätsfluktuationen und spektrale Fluktuationen beobachtet, zudem kommt es zu einer Überlagerung verschiedener, in ihrer Erscheinung unterschiedlicher spektraler Fluktuationen. Im folgenden sollen

spektrale Variationen, die bei der Spektroskopie der Fluoreszenz einzelner Moleküle beobachtet werden können, kurz modellhaft gezeigt werden (Beispiele siehe [36]).

### Variation der spektralen Lagen

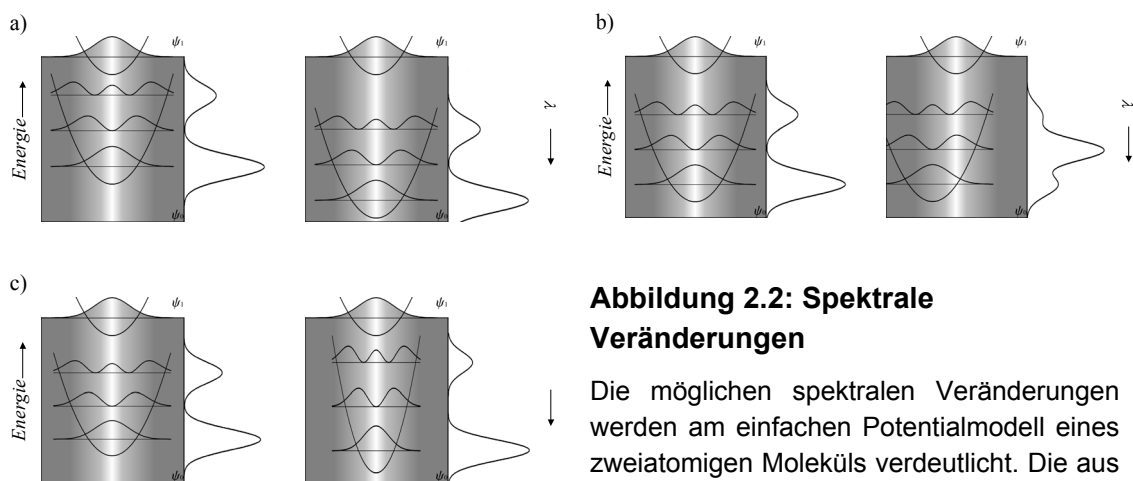
Die Verschiebung des gesamten Fluoreszenzspektrums ohne Veränderung der Bandenform wird durch die Änderung des energetischen Abstandes zwischen  $S_0$  und  $S_1$  Zustand verursacht, wobei die Potentialhyperflächen der Zustände nur ihren energetischen Abstand zueinander verändern, ohne dass sich ihre Form oder Lage zueinander verändert (Abbildung 2.2, a).

### Variation der Franck-Condon-Faktoren

Die Veränderung der Intensitätsverhältnisse der Schwingungsbanden im Emissionsspektrum wird verursacht durch eine isoenergetische Verschiebung der  $S_0$  und  $S_1$  Potentialhyperflächen gegeneinander (Abbildung 2.2, b).

### Variation der Spreizung der Schwingungsprogression

Die Veränderung der Spreizung der Schwingungsprogression wird durch eine Veränderung der Form des Potentialtopfes hervorgerufen (Abbildung 2.2, c). Eine energetische Stauchung führt zu einem geringeren energetischem Abstand der Schwingungsbanden, eine energetische Streckung führt zu einer Spreizung der Schwingungsprogression.



resultierenden Spektren sind jeweils rechts neben den Potentialen gezeigt.

- Variation der spektralen Lagen durch Veränderung des energetischen Abstandes zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand.
- Variation der Franck-Condon-Faktoren durch isoenergetische Verschiebung der Potentiale gegeneinander.
- Variation der Spreizung der Schwingungsprogression durch Veränderung der Form der Potentialtöpfe.

Die neben den spektralen Veränderungen beobachteten Intensitätsveränderungen können ihre Ursache zum einen im veränderten Abstrahlverhalten, z.B. durch veränderte Fluoreszenzquantenausbeute, oder im veränderten Absorptionsverhalten, z.B. durch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums oder durch Reorientierung, haben.

Die Auswertung von Fluoreszenzspektrenserien zeigte außerdem diffusionsartige und übergangsartige spektrale Veränderungen der Fluoreszenz einzelner Moleküle (Details und Beispiele siehe [36]). Bei diffusionsartigen Prozessen sind die gemessenen Werte der beobachteten Größe statistisch um einen Wert verteilt, bei übergangsartigen Prozessen sind die gemessenen Werte der beobachteten Größe um zwei oder mehr diskrete Werte verteilt. Wechseln die Werte zwischen den Verteilungen, wird dies als „Übergang“ oder „Sprung“ bezeichnet.

Bei in Polymermatritzen eingelagerten organischen Farbstoffmolekülen sind die beobachteten Veränderungen der Fluoreszenz in der Mehrzahl auf Fluktuationen der das Farbstoffmolekül umgebenden Polymerketten zurückzuführen. Die sich verändernde Chromophorumgebung führt dazu, dass sich ständig ein neues, leicht abgewandeltes „Supermolekül“ aus Chromophor und dessen Umgebung bildet, wobei sich die Potentialhyperflächen des Grundzustandes und des angeregten Zustandes des eingebetteten Moleküls verändern. Dies führt in der beschriebenen Weise zur Fluktuationen der Fluoreszenz.

Im Gegensatz zu der durch die umgebenden Polymerketten zufällig gebildeten Umgebung des Chromophors bei Farbstoffen in Polymeren ist die Umgebung des Chromophors bei fluoreszierenden Proteinen durch die Aminosäureketten des Proteins vorgegeben. Im Rahmen dieser Arbeit soll deshalb auch analysiert werden, in welchem Maße auch in einem solch definiertem System spektrale Dynamik beobachtet werden kann. Die geringen Fluoreszenzquantenausbeuten, geringe Stabilität gegen Photobleichen und wenig deutliche Auflösung der Schwingungsprogression limitieren allerdings die Möglichkeiten, die beobachtete Fluoreszenzdynamik nach den angeführten Erscheinungsformen und Mechanismen zu trennen.

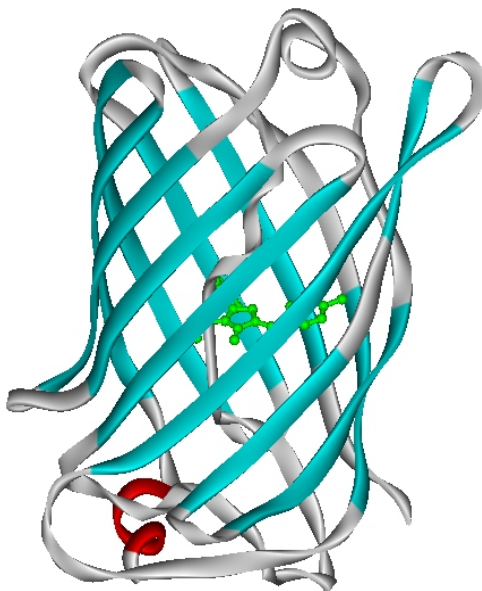
## 2.5 Fluoreszierende Proteine

Inzwischen ist eine Vielzahl von verschiedenen fluoreszierenden Proteinen bekannt, die in unterschiedlichen, aber immer maritimen Lebensformen entdeckt wurden [37]. Die fluoreszierenden Proteine aus verschiedenen Organismen wie Seeanemonen, Quallen oder Steinkorallen weisen erstaunlicherweise alle die gleiche prinzipielle Proteinstruktur und ähnliche Chromophore auf wie das Aequorea GFP. Da Aequorea GFP das erste gefundene und am weitesten erforschte fluoreszierende Protein ist, soll der prinzipielle Aufbau der fluoreszierenden Proteine und der Chromophor an Aequorea GFP erklärt werden, bevor auf spezifische Unterschiede der in dieser Arbeit verwendeten Proteine eingegangen wird.

### 2.5.1 Proteinstruktur

#### 2.5.1.1 Aequorea GFP und dessen Varianten

Aequorea GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26.9 kDa. Die Struktur des Proteins wurde mittels Röntgenstrukturanalyse von Yang et al. 1996 [38] aufgeklärt.



**Abbildung 2.3: Struktur des Aequorea GFP**

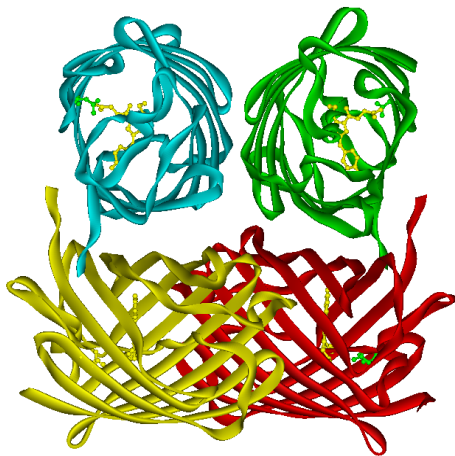
Das Aequorea GFP weist, wie alle fluoreszierenden Proteine, die Form eines Zylinders auf. 11  $\beta$ -Stränge formen die Außenwand des Zylinders, Loop-Strukturen und kurze  $\alpha$ -Helices formen „Deckel“, die den Zylinder verschließen. Eine  $\alpha$ -Helix läuft durch das Zentrum des Zylinders, der Chromophor entsteht aus Aminosäuren dieser Helix. Der Chromophor befindet sich in Zentrum des Zylinders und ist durch die  $\beta$ -Stränge von der Proteinumgebung getrennt.

Die Aminosäurekette formt einen Zylinder mit einem Durchmesser von 24 Angström und einer Höhe von 42 Angström. 11  $\beta$ -Stränge formen die Außenwand des Zylinders, Loop-Strukturen und kurze  $\alpha$ -Helices formen „Deckel“, die den Zylinder verschließen

(vgl. Abbildung 2.3). Eine  $\alpha$ -Helix läuft durch das Zentrum des Zylinders, an der sich im Zentrum des durch die  $\beta$ -Stränge geformten Zylinders der Chromophor befindet.

### 2.5.1.2 DsRed und dessen Varianten

DsRed ist aus 225 Aminosäuren aufgebaut und hat eine molekulare Masse von 25.9kDa [39]. Das aus der Steinkoralle *Discosoma* gewonnene Protein weist nur eine Aminosäuresequenzhomologie von ~23% zu *Aequorea* GFP auf, zeigt aber erstaunliche strukturelle Übereinstimmungen zu den fluoreszierenden Proteinen der *Aequorea victoria* Gruppe. Wie bei diesen Formen in DsRed 11  $\beta$ -Stränge einen Zylinder, der von  $\alpha$ -Helices an den Enden verschlossen wird. Wie bei *Aequorea* GFP läuft eine weitere  $\alpha$ -Helix durch das Zentrum des durch die  $\beta$ -Stränge gebildeten Zylinders, die die Aminosäuren, die den Chromophor aufbauen, trägt [40, 41]. Im Gegensatz zu den *Aequorea* GFP Proteinen, die nur sehr schwach ausgeprägte Tendenz zur Oligomerisierung haben, bildet DsRed Tetramere aus. Die Monomere sind im Tetramer als Dimer aus Dimeren paarweise gekreuzt zueinander angeordnet (Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4: Tetramerstruktur des DsRed**

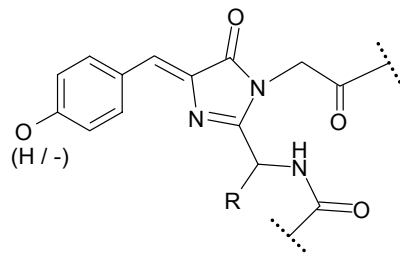
Trotz geringer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz sind die DsRed Monomere strukturelle Homologe des *Aequorea* GFP, jedoch bildet DsRed Tetramere aus.

Durch Ultrazentrifugationsversuche und FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) Experimente konnte gezeigt werden, dass DsRed selbst bei nanomolaren Konzentrationen als obligates Tetramer vorliegt [42, 43], was im Rahmen dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist, da dies den Konzentrationen entspricht, die bei der Präparation der Einzelmolekülproben verwendet wurden. Dies bedeutet, dass bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hauptsächlich Tetramere von DsRed und dessen Varianten untersucht wurden. Aus diesem Grund wird im Folgenden nicht von der Untersuchung einzelner Moleküle, sondern von der Untersuchung einzelner Oligomere oder Einheiten die Rede sein.

## 2.5.2 Der Chromophor und dessen Bildung

### 2.5.2.1 Aequorea GFP und dessen Varianten

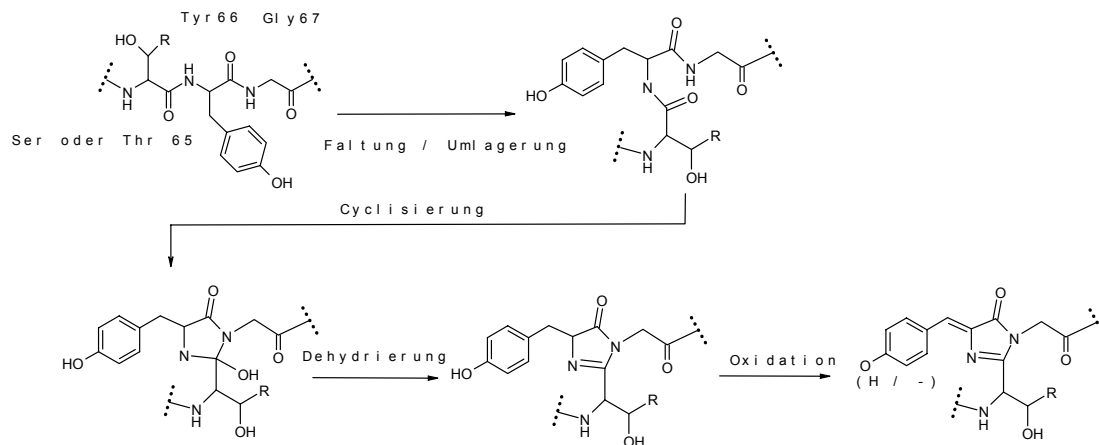
Die Struktur des GFP Chromophors wurde 1979, also lange bevor die GFP Struktur bekannt war, von Shimomura abgeleitet [2]. Ihm war es gelungen, ein kleines Peptidfragment aus GFP zu isolieren, welches den Chromophor enthielt. Durch Synthese von Modellsubstanzen und Vergleich der spektralen Eigenschaften identifizierte er den GFP Chromophor als 4-(p-hydroxybenzyliden)imidazolid-5-on (vgl. Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5: Chromophor des Aequorea GFP**

Der Chromophor des Aequorea GFP und vieler Varianten ist 4-(p-hydroxybenzyliden)imidazolid-5-on

Der Chromophor entsteht nach der Faltung der 11  $\beta$ -Stränge des Proteins zum Zylinder aus den Aminosäuren Serin an der Stelle 65 (kurz: Ser-65), Threonin an der Stelle 66 (kurz: Tyr-66) und Glycin an der Stelle 67 (kurz: Gly-67), die Teil der durch das Zentrum des Proteinzylinders laufenden  $\alpha$ -Helix sind. Der genaue Reaktionsmechanismus, der zur Chromophorbildung führt, ist nicht bekannt, jedoch wurde eine Folge von Reaktionen vorgeschlagen, die durch vom Protein selbst autokatalytisch begünstigte Reaktionsschritte zum fluoreszierenden Chromophor führen [44, 45] (vgl. Abbildung 2.6).

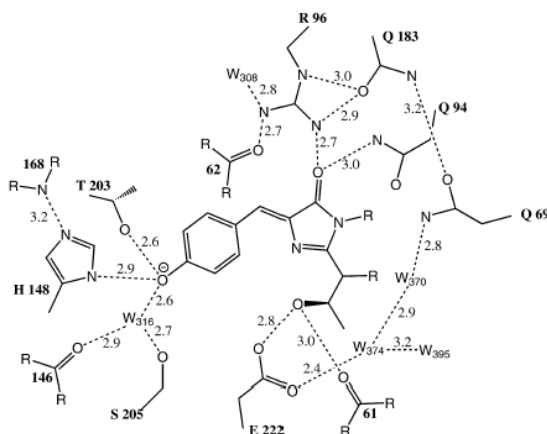


**Abbildung 2.6: Mechanismus der Chromophorbildung bei GFP**

Der von Heim und Cubitt [44, 45] vorgeschlagene Mechanismus geht nach der Faltung des Proteins von einer Cyclisierung, anschließender Dehydrierung und schließlich einer Oxidation aus, die zum fluoreszenten Chromophor führt.

Die Chromophorbildung verläuft demnach in drei Schritten: Nach der Faltung des Proteins zyklisiert das Aminosäurerückgrat durch einen nucleophilen Angriff der Aminogruppe von Gly-67 mit dem Carbonyl-Kohlenstoff von Ser-65, es folgt eine Kondensationsreaktion und schließlich eine Oxidation, die zum fluoreszenten Chromophor führt. Der letzte Schritt der Reaktion, die Oxidation, ist geschwindigkeitsbestimmend.

Der so entstandene Chromophor befindet sich im Zentrum des Proteinzyinders und wird durch die  $\beta$ -Stränge sowohl fixiert als auch gegen äußere Einflüsse abgeschirmt. Der Chromophor wird von mehreren polaren Gruppen und Wassermolekülen umgeben, Abbildung 2.7 zeigt den Chromophor der Aequorea GFP Variante Ser-65-Tyr, dessen unmittelbare Umgebung und die Wasserstoffbrücken in der unmittelbaren Chromophorumgebung.



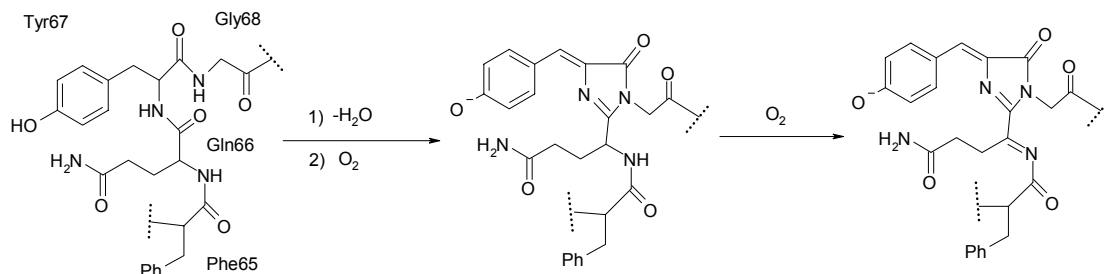
**Abbildung 2.7: Chromophor und dessen Umgebung im Protein**

Darstellung des Ser-65-Tyr Chromophors von S. Remington [46, 47] und der Wechselwirkungen mit der Chromophorumgebung. Sauerstoffatome von Wasser sind mit W gekennzeichnet, mögliche Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt.



### 2.5.2.2 DsRed und dessen Varianten

Wie bei *Aequorea* GFP wird der Chromophor aus Aminosäureresten der durch das Zentrum des Zylinders laufenden  $\alpha$ -Helix gebildet. Die Homologie zwischen *Aequorea* GFP und DsRed ist in der Region, die den Chromophor ausbildet und in dessen unmittelbarer Umgebung besonders groß. Die wichtigsten Aminosäuren für die Chromophorbildung im *Aequorea* GFP, nämlich Thr-66 und Gly-67 und in der Chromophorumgebung Arg-96 und Glu-222 finden ihre exakte Entsprechung in Thr-67, Gly-68, Arg-95 und Glu-215 des DsRed [42]. Die Bildung des rot fluoreszierenden Chromophors verläuft in mehreren Schritten, wobei zunächst ein grün fluoreszierendes Zwischenprodukt gebildet wird. Der Prozess der Ausbildung der roten Fluoreszenz über grüne Fluoreszenz wird als „Reifen“ oder „Maturieren“ bezeichnet. Zunächst wird durch Cyclisierung und Dehydrierung aus Gln-66, Tyr-67 und Gly-68 ein grün fluoreszierendes Zwischenprodukt, welches dem anionischen GFP Chromophor homolog ist, gebildet. Die darauf folgende Dehydrierung an Gln-66, bei der Sauerstoff anwesend sein muss, führt zu einem am Imidazolring durch Acylimin verlängerten chromophoren  $\pi$ -System, welches für die Rotverschiebung der Fluoreszenz verantwortlich ist. Die Dehydrierung des zweiten Schritts ist geschwindigkeitsbestimmend (für DsRed: 1 Tag) für die Gesamtreaktion [48].



**Abbildung 2.8: Mechanismus der Chromophorbildung bei DsRed**

Die Bildung des DsRed Chromophors verläuft über die Bildung eines dem *Aequorea* GFP Chromophor homologen grün fluoreszierenden Zwischenproduktes.

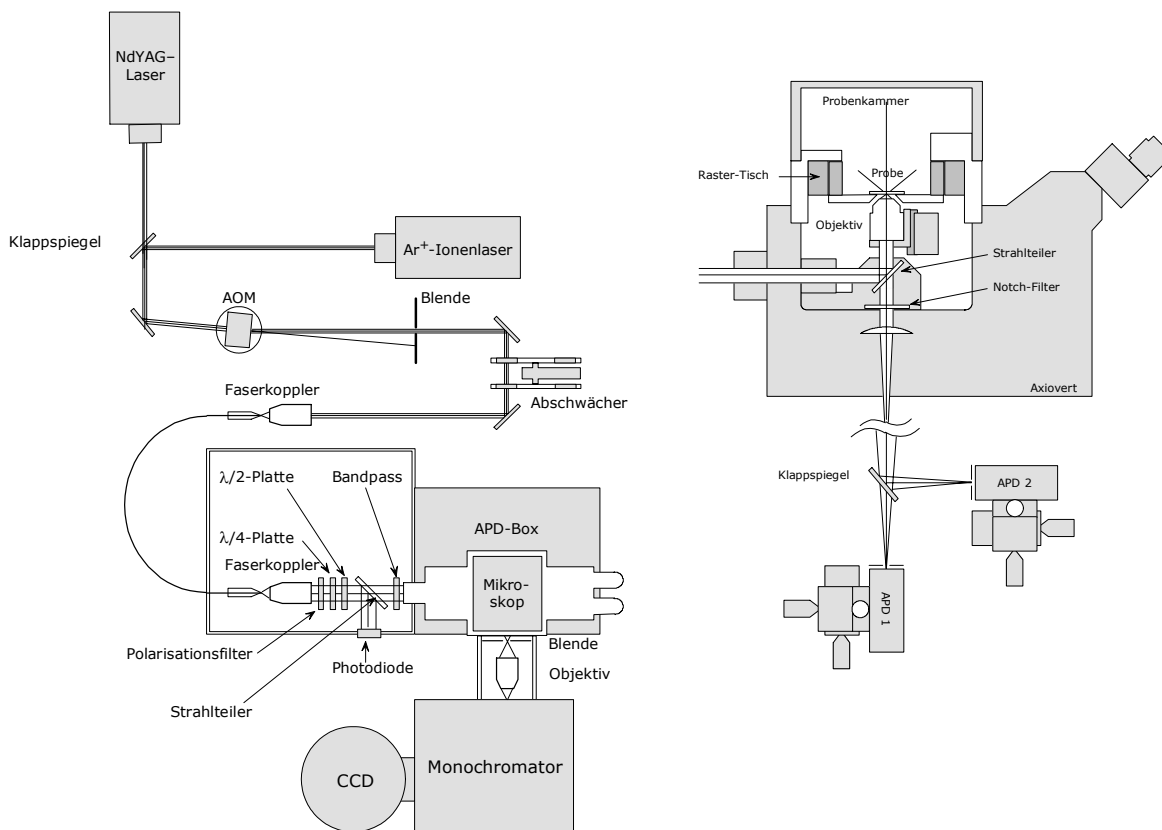
Die Umwandlung vom grün zum rot fluoreszierenden Chromophor verläuft nicht ganz vollständig (vgl. 4.2.1), es bleibt immer ein Teil Proteine, die den GFP typischen Chromophor in seiner anionischen Form enthalten, so dass etwas grüne GFP artige Fluoreszenz beobachtet werden kann.

Wie bei *Aequorea* GFP ist der Chromophor im DsRed durch die umgebenden Proteinketten und ein Geflecht aus Salzbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen im Innern des durch die  $\beta$ -Ketten geformten Zylinders fixiert [40].

## 3 Methoden

### 3.1 Experimenteller Aufbau zur Einzelmolekülspektroskopie

Alle Einzelmolekül-Messungen wurden an einem konfokalem Rastermikroskop, das in der Arbeitsgruppe Meixner auf der Basis eines Zeiss Axiovert 135 TV konzipiert und gebaut wurde, durchgeführt. Im Vergleich zum ursprünglichen Aufbau (ausführliche Beschreibung siehe [49]), wurden einige Modifikationen vorgenommen. Der verwendete Aufbau ist in Abbildung 3.9 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des verwendeten Versuchsaufbaus**

Links: Überblick über den gesamten Aufbau

Rechts: Darstellung der konfokalen Optik und des Detektionsstrahlengangs

Als monochromatische Lichtquellen dienten zwei verschiedene Laser, deren Licht wahlweise über einen Klappspiegel in die Apparatur eingekoppelt wurde. Es konnten so Untersuchungen mit Licht der Wellenlänge 514nm, 488nm und 458nm eines Argonionenlasers (American Laser Corporation 60X-200) und mit Licht der

Wellenlänge 532nm eines frequenzverdoppelten Nd:YVO<sub>4</sub> Lasers (Crystal Laser, GCL-025L) durchgeführt werden. Ein akustooptischer Modulator (AOM, Brimrose TEM-85-10) dient als Schalter, um den Laserstrahl in den Messaufbau einzukoppeln. Die schnelle Schaltung des Lichts durch den AOM erlaubt es, die Probe immer nur exakt dann zu beleuchten, wenn gemessen wird. Außerdem wird der AOM benutzt, um über einen Regelkreis die in das Mikroskop eingekoppelte Laserleistung konstant zu halten, was bei der Spektroskopie der fluoreszierenden Proteine von großer Bedeutung ist.

Durch einen Neutraldichtefiltersatz kann das Laserlicht abgeschwächt werden. Über eine Glasfaser wird das Laserlicht zum Mikroskop geleitet, eine Kombination aus Polarisationsfilter,  $\lambda/4$ - und  $\lambda/2$ -Plättchen führen unter entsprechenden Drehwinkeln zu zirkularer Polarisation des Anregungslichtes im Fokus. Der Laserstrahl wird direkt vor der Einkopplung in das Mikroskop durch eine Glasplatte geteilt, und die Leistung des geteilten Strahls wird durch eine Photodiode gemessen. Die gemessene Leistung wird genutzt, um den AOM durch einen Regelkreis so zu steuern, dass die Leistung des in das Mikroskop eingekoppelten Lichtes während der gesamten Messung konstant bleibt.

Ein Interferenzfilter vor dem Mikroskopeingang lässt nur Licht der Anregungswellenlänge transmittieren, so dass störendes Licht anderer Wellenlängen unterdrückt wird. Im Mikroskop wird das Laserlicht über eine Glasplatte, die als Strahlteiler dient, in ein Mikroskopobjektiv (Plan-Neofluar, 100x/1,30 Oil, Zeiss) reflektiert, welches das Laserlicht auf die Probe fokussiert. Die Probe befindet sich auf einem geregelten Rastertisch (PI-Instruments), der eine Positionierung der Probe auf wenigstens 5nm Genauigkeit (Herstellerangabe) in allen drei Raumrichtungen erlaubt. Während der Untersuchung der Probe wird mit Hilfe des Rastertisches die Probe definiert bewegt, wobei bei den vorliegenden Experimenten nur in der Probenebene ausgelenkt wurde. Der gesamte Probenraum ist abgedeckt und kann mit Stickstoff gespült werden.

Von der Probe abgestrahltes Fluoreszenzlicht wird vom Mikroskopobjektiv unter der Probe eingesammelt und fällt auf den Strahlteiler. Der größte Teil des von der Probe stammenden Lichtes wird durch diesen transmittiert und fällt auf den holografischen Bandfilter („Notch Filter“, Kaiser Optical Systems), der jeweils so gewählt ist, dass zurückreflektiertes und gestreutes Anregungslicht absorbiert werden. Hinter dem Notch-Filter kann ein Klappspiegel in den Strahlengang gebracht werden, so dass Fluoreszenzphotonen je nach Position des Spiegels auf zwei Arten detektiert werden können. Es kann zwischen Detektion per Avalanche Photodiode (APD, SPCM 200, EG&G) und einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten CCD Kamera (LN/CCD-1340PB, S&I GmbH) gewählt werden. Im Spektroskopiemodus wird das Fluoreszenzlicht in den

Monochromator (SpectraPro 300i, Acton) gelenkt, und das Fluoreszenzspektrum wird von der CCD Kamera, die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  betrieben wird, aufgenommen, wobei etwa drei Photonen ein Zählereignis (count) bedingen. Es ist so möglich, Spektrenserien mit hoher spektraler und zeitlicher Auflösung aufzunehmen, wobei zwischen zwei aufeinander folgenden Spektren jeweils ca. 20ms Totzeit der Apparatur liegen.

Neben der Detektion der Fluoreszenzphotonen mit einer gekühlten CCD-Kamera ist auch die Detektion mit zwei APDs möglich. Zwischen den zwei APDs kann durch Umlegen eines Klappspiegels gewählt werden. Dies ist besonders dann von Nutzen, wenn ein Probenbereich direkt nacheinander mit zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen untersucht werden soll. In diesem Fall wurde je eine APD auf eine der Anregungswellenlängen optimiert.

Die Bedienung des Mikroskops und die Aufnahme der Messdaten wird durch zwei PCs gesteuert. Einer der Computer synchronisiert AOM, Rastertisch und APD. Dieser Computer stellt auch alle Messdaten dar, die durch die APD aufgenommen werden. Der zweite PC steuert bei der Aufnahme von Spektren oder Spektrenserien den AOM, das Spektrometer und die CCD Kamera und verarbeitet die aufgenommenen Daten.

### **3.1.1 Messparameter**

Alle Einzelmoleküluntersuchungen wurden nach einem festen Schema und mit sehr ähnlichen Messparametern aufgenommen.

Als Anregungswellenlängen standen 458nm, 488nm, 514nm und 532nm zur Verfügung, die Anregungsleistung betrug zwischen  $0,2\text{kW}/\text{cm}^2$  und  $1\text{kW}/\text{cm}^2$  im Fokus und lag damit deutlich unter den Sättigungsleistungen der Anregung der Fluoreszenzintensität der Proteine [28].

Die zunächst aufgenommenen Fluoreszenzintensitätsbilder bildeten eine Fläche von  $10 \times 10\mu\text{m}$  ab und besaßen eine Auflösung von  $100 \times 100$  Punkten, die mit einer Integrationszeit von 5ms, bzw. 3ms aufgenommen wurden.

Alle Einzelspektren der Fluoreszenzspektrenserien einzelner Proteine wurden mit einer Integrationszeit von 1 Sekunde aufgenommen.

## 3.2 Datenaufnahme und Datenverarbeitung

### 3.2.1 Datenaufnahme

Die Datenaufnahme erfolgte immer nach dem gleichen Prinzip. Zunächst wurde ein Bereich von typischerweise  $10 \times 10 \mu\text{m}$  der Probe abgerastert, wobei das Fluoreszenzlicht mit einer APD detektiert wurde. Man erhält so ein Fluoreszenzintensitätsbild des abgerasterten Bereiches, auf dem einzelne Stellen hoher Intensität die Präsenz eines fluoreszierenden Proteins oder Oligomers anzeigen. Die Größe dieser Fluoreszenzsignale wird durch die laterale Ausdehnung des Anregungsfokusses gegeben.

Nachdem auf diese Weise die Lage der Proteine ermittelt wurde, können die Proteine durch Bewegen des Positioniertisches einzeln in den Anregungsfokus gestellt und untersucht werden.

Zur spektral aufgelösten Untersuchung der einzelnen Proteine oder Proteinoligomere wurde das Fluoreszenzlicht durch einen Monochromator auf die CCD-Kamera abgebildet. Vor jeder Messreihe wurde von einer isolierten, dunklen Stelle auf dem Fluoreszenzintensitätsbild der Probe ein Hintergrundspektrum unter den aktuellen Bedingungen aufgenommen, welches dann von den folgenden Fluoreszenzspektren der Proteine subtrahiert wurde.

Es wurden Sequenzen von meist 10 Spektren mit einer Integrationszeit von einer Sekunde aufgenommen. Die Totzeit zwischen den Spektren, während die CCD Kamera ausgelesen wurde, und die Daten an den angeschlossenen Rechner übertragen wurden, betrug jeweils ca. 20ms.

### 3.2.2 Verarbeitung der Rohdaten

Um in der Einzelmoleküluntersuchung zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist es unerlässlich, eine statistisch relevante Anzahl von Molekülen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Tausend einzelne Proteine oder Proteinoligomere fluoreszenzspektroskopisch untersucht, die erhaltene Datenmenge ist ohne Softwareunterstützung nur schwer auswertbar.

Standardsoftware, die den Anforderungen zur Auswertung einer großen Menge von spektralen Einzelmoleküldaten gerecht wird, ist nicht erhältlich, weshalb im Rahmen dieser Arbeit speziell an die Notwendigkeiten der spektral aufgelösten Fluoreszenzspektroskopie einzelner fluoreszierender Proteine angepasste Software

konzipiert und realisiert wurde. Da Übersichtlichkeit, intuitive Bedienbarkeit und grafische Darstellungen gefordert waren, wurden Programme mit grafischer Oberfläche in der Programmiersprache „Delphi 5.0 Professional“ von Borland geschrieben.

Im Folgenden wird ein grober Überblick über die Funktionalität der erstellten Software gegeben, ohne jedoch auf die genauen Programmstrukturen und Programmabläufe einzugehen.

Zur Auswertung der erhaltenen Rohspektren ist es notwendig, verschiedene spektrale Parameter, wie z.B. Lage und Intensität des Fluoreszenzmaximums mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit systematisch zu bestimmen. Bei der Spektroskopie einzelner Perylene gelang dies durch Glättung der Rohdaten durch Faltung mit einer Gaussfunktion [36].

Da die hier untersuchten fluoreszierenden Proteine eine deutlich höhere Quantenausbeute der Photozerstörung aufweisen als Perylene, musste mit geringen Anregungsleistungen angeregt werden, was zusammen mit der vergleichsweise geringen Fluoreszenzquantenausbeute der Proteine zu sehr wenig intensiven Spektren mit deutlich höherem Rauschanteil als bei den Perylenen führte. Es war deshalb nicht möglich, die Rohdaten durch einfache Glättung soweit aufzuarbeiten, dass die spektralen Parameter quantitativ ausgewertet werden konnten.

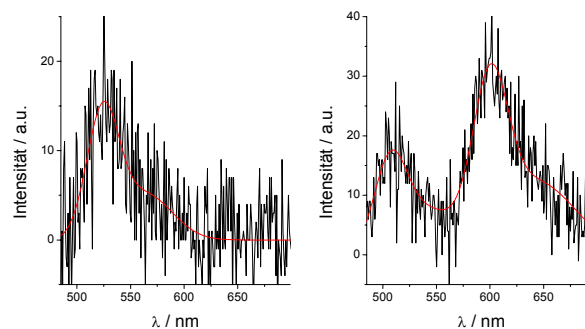
Es war deshalb notwendig, statt der Glättung der Spektren eine geeignete Funktion an die Rohdaten anzupassen. Gewählt wurde die Summe von zwei Gaußfunktionen, weil mit dieser Funktion das einfache Fluoreszenzspektrum aus zwei Schwingungsbanden, die ein Maximum und eine Schulter auf der langwelligen Seite des Spektrums bilden, adäquat dargestellt werden kann. Die Verwendung der Summe von mehr Gaussfunktionen führt zu keinem verbesserten Ergebnis, steigert aber den Rechenaufwand enorm.

Der einfachste Ansatz, die gewählte Funktion an die Rohdaten anzupassen, ist sicher ein schlichter „brute force“ Ansatz, bei dem alle Parameter systematisch verändert und am Ende das beste Ergebnis ausgegeben wird. Bei den hier zu variierenden sechs Parametern, nämlich für jede Gaußkurve jeweils die Maximumlage, Standardabweichung und Gesamtfläche, führt dieser Ansatz zu ausuferndem Rechenaufwand. Es wurde deshalb ein Ansatz gewählt, bei dem zunächst nach vorgegebenen Parametern ein Bereich für die einzelnen Parameter gesucht wurde, in dem das Fehlerquadrat minimal ist. Anschließend wurde der gefundene Bereich immer weiter verkleinert, bis die angestrebte Genauigkeit erreicht war.

Um die Güte der Anpassung zu überprüfen, wurde an die Ensemble Fluoreszenzspektren der Proteine die doppelte Gaussfunktion angepasst. Für die

Proteine, die ein Fluoreszenzmaximum um 500nm zeigen, stimmten die Maximallagen der angepassten Funktion bis auf weniger als 1nm mit den Ensemblemaxima überein. Bei den Proteinen mit Fluoreszenzmaximum um 585nm wurden Abweichungen zwischen Anpassung und Ensemblespektrum von bis zu 2nm gefunden. Die Maxima der angepassten Funktionen waren immer bathochrom zu den tatsächlichen Maxima verschoben, was sich aus dem steilen Anstieg der Fluoreszenzspektren auf der kurzwelligen Seite ergibt.

Ein Beispiel für ein Rohspektrum eines einzelnen Proteins, an das die Summe aus zwei Gaußverteilungen angepasst wurde, ist in Abbildung 3.10, links, gezeigt. Es ist gut zu erkennen, dass mit der gewählten Methode noch sehr intensitätsschwache Spektren mit hohem Rauschanteil zuverlässig ausgewertet werden können.



**Abbildung 3.10: Rohdaten und Anpassungen verschiedener Spektren**

Mit der gewählten Methode des Anpassens der Summe zweier Gaussverteilungen (rot) an die Rohdaten (schwarz) ist es möglich, selbst sehr intensitätsschwache Fluoreszenzspektren mit hohem Rauschanteil quantitativ auszuwerten.

Links: Typisches Einzelmolekülspektrum eines fluoreszierenden Proteins, an das eine doppelte Gaussverteilung angepasst wurde.

Rechts: Typisches zweibandiges Emissionsspektrum eines Oligomers aus fluoreszierenden Proteinen, an das an jede der zwei Fluoreszenzbanden eine doppelte Gaussverteilung angepasst wurde.

Besonders bei der Spektroskopie von DsRed und von DsRed Varianten wurden oft Spektren mit klar getrennten Fluoreszenzbanden zweier Chromophore oder spektral unterschiedlicher Formen detektiert. In diesen Fällen wurde nacheinander an jede der beiden Banden die Summe zweier Gaussfunktionen angepasst, wobei bei der langwelligeren Fluoreszenzbande die Anpassung der kürzerwelligen Fluoreszenzbande berücksichtigt wurde (Abbildung 3.10, Rechts).

Das Programm kann eine beliebige Anzahl von Spektren oder Spektrenserien nacheinander verarbeiten, wobei die gefundenen Anpassungsparameter für jedes Spektrum in den Dateikopf des ursprünglichen Datensatzes geschrieben werden.

In einem weiteren Schritt wurde in den Dateikopf der Dateiname des zu der Spektrenserie gehörenden Fluoreszenzintensitätsbildes und die Position, an der die Spektrenserie aufgenommen wurde, geschrieben, um bei der Auswertung die Spektrenserien dem entsprechenden Fluoreszenzsignal in einem Fluoreszenzintensitätsbild zuordnen zu können. Die hierfür notwendigen Daten werden von der Steuer- und Detektionssoftware der Messapparatur nicht protokolliert und müssen deshalb aus einer gesondert erstellten Tabelle importiert werden. Schließlich wurde in den Dateiheader noch eine individuelle Nummer für jeden Fluoreszenzpunkt eingesetzt, um auch mehrere Spektrenserien einem Fluoreszenzsignal im Fluoreszenzintensitätsbild zuordnen zu können.

### 3.2.3 Das Hintergrundsignal

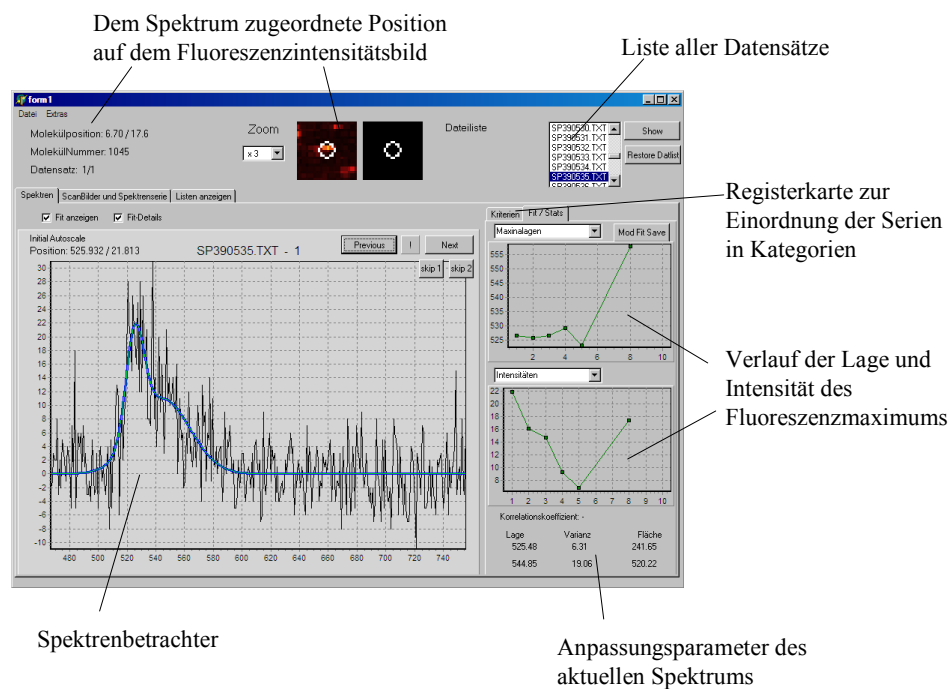
Da das Fluoreszenzsignal der fluoreszierenden Proteine vergleichsweise schwach ist, kommt dem Hintergrundspektrum, das bereits bei der Datenaufnahme von den Rohdaten subtrahiert wird, eine besondere Bedeutung zu. Wenn das tatsächliche Hintergrundsignal zur Zeit und am Ort der spektralen Untersuchung nicht dem aufgenommenen Hintergrundsignal entspricht, führt dies zu einer Verfälschung der Messwerte. Die gravierendste Quelle für diesen Fehler besteht in schwankenden Anregungsleistungen des verwendeten Laserlichtes. Diese Fehlerquelle wurde durch die aktive Regelung der Anregungsleistung eliminiert. Es bleiben somit geringe Schwankungen des Hintergrundsignals, die durch die Probe selbst, z.B. durch Schichtdickenunregelmäßigkeiten des Polymerfilms oder des Glasträgers, verursacht werden. Obwohl diese Unregelmäßigkeiten meist nur zu Intensitätsveränderungen von einigen Zählereignissen in einigen Kanälen des Spektrums führen, müssen sie doch bei den zum Teil sehr intensitätsschwachen Spektren berücksichtigt werden. Dies gelingt zum einen direkt beim Anpassen der doppelten Gaußverteilung an die Rohdaten, indem ein Schwellenwert vorgegeben wird, ab welcher Fläche ein Signal als Fluoreszenz zu interpretieren ist, zum anderen bei der Durchsicht aller Spektren. Da bei der Untersuchung der einzelnen Proteine oder Proteinoligomere stets darauf geachtet wurde, bis zum Bleichen der Fluoreszenz zu spektroskopieren, ergibt sich aus dem Spektrum, welches nach Bleichen der Proteine noch sichtbar war, ein Hinweis auf den lokalen Fluoreszenzhintergrund. In der Regel war nach dem Bleichen nur noch eine Nulllinie zu sehen, der lokale Hintergrund stimmte in diesen Fällen mit dem abgezogenen Hintergrund überein. In einigen Fällen wurden jedoch Erhöhungen oder Erniedrigungen im Spektrum gefunden, was zeigt, dass das lokale Hintergrundspektrum nicht exakt mit dem abgezogenen Spektrum übereinstimmte.



Gerade um diese möglicherweise falsch positiven Spektren zu finden, ist es notwendig, alle Spektren sorgfältig durchzugehen, bevor statistische Analysen der spektralen Parameter durchgeführt werden.

### 3.2.4 Sichtung der Spektren

Die eigentliche Sichtung und Beurteilung der Spektren, die der statistischen Auswertung von spektralen Parametern vorausgeht, erfolgte nach dem Hinzufügen der Informationen über die genaue Position, an der die Spektrenserie aufgenommen wurde, das zugehörige Intensitätsfluoreszenzbild und der individuellen Molekülnummer in den Dateikopf der Dateien der Spektrenserien. Das Hauptfenster des Programms ist in Abbildung 3.11 gezeigt.



**Abbildung 3.11: Hauptfenster des Programms zur Auswertung der Proteinspektren**

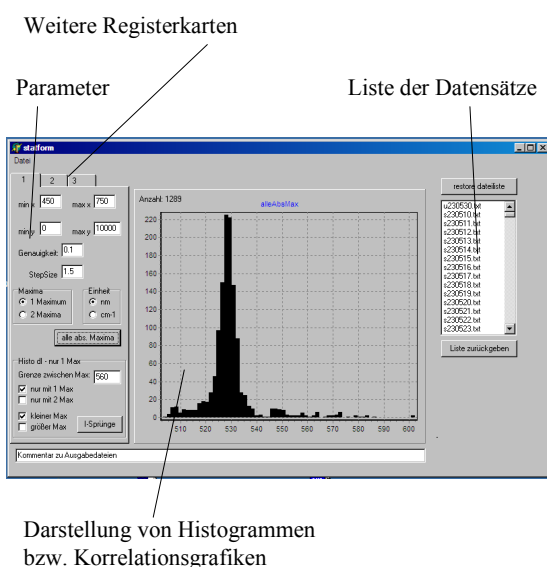
Das Programm dient hauptsächlich zur Betrachtung und Klassifizierung der Spektrenserien. Zwischen den Spektren einer Serie und auch zwischen verschiedenen Datensätzen kann schnell gewechselt werden. Zu den Spektren wird deren Position auf dem Fluoreszenzintensitätsbild und andere relevante Daten, wie die zugehörigen Anpassungsparameter oder die Entwicklung der Maximumlage und Intensität innerhalb der Spektrenserie, angezeigt.

Das Programm erlaubt das schnelle Durchblättern der Spektrenserien und den schnellen Wechsel zwischen verschiedenen Datensätzen. Die einzelnen Spektren werden als Rohdaten mit überlagerter Anpassung dargestellt, gleichzeitig werden die

relevanten Daten wie Anpassungsparameter und Verlauf der Maximumlagen und Maximumintensitäten der ganzen Serie gezeigt. Außerdem wird die Stelle auf dem entsprechenden Fluoreszenzintensitätsbild markiert, an dem die Spektrenserie aufgenommen wurde. Auf diese Weise kann die Spektrenserie schnell beurteilt und kategorisiert werden. Ungenaue Anpassungen können entfernt werden, in einer zweiten Registerkarte unterhalb des Maximumverlaufs kann die Serie in drei frei wählbare Kategorien eingeordnet werden, außerdem können Kommentare zu den Serien eingegeben werden. So können Gruppen von Proteinen mit ähnlichen Eigenschaften, z.B. Bleichverhalten, Intensitätsverhalten, etc. gebildet werden. Über eine integrierte Suchfunktion können die Kategorien verknüpft und die entsprechenden Spektrenserien dargestellt werden.

### 3.2.5 Erstellen von Histogrammen und Korrelationsdiagrammen verschiedener spektraler Parameter

Nach der Durchsicht der Spektren wurden mit Hilfe eines weiteren Programmteils verschiedene spektrale Parameter statistisch ausgewertet. Das Bedienfenster dieses Programmteils ist in Abbildung 3.12 dargestellt.



**Abbildung 3.12: Fenster des Programmmoduls zur statistischen Auswertung der Spektren**

Mit Hilfe des Programmmoduls können Histogramme verschiedener spektraler Parameter, z.B. der Verteilung der Lagen der Fluoreszenzmaxima und auch Korrelationsgrafiken, z.B. zwischen spektraler Verschiebung des Fluoreszenzmaximums und Intensitätsänderung von einem Spektrum zum nächsten, erzeugt werden.

Außerdem dient das Programm zum schnellen und effektiven Auffinden von Datensätzen, die Spektren mit bestimmten Eigenschaften enthalten. Diese Datensätze können dann zur weiteren Analyse an das Hauptprogramm übergeben werden.

Mit Hilfe dieses Programmteils können Histogramme der spektralen Position des absoluten Fluoreszenzmaximums, der Anzahl detektierter Photonen pro beobachteter Einheit, der spektralen Diffusion und der Intensitätssprünge von einem Spektrum zum folgenden erstellt werden. Außerdem können Korrelationsdiagramme zwischen spektraler Verschiebung des Fluoreszenzmaximums und Intensitätsänderung, wie auch Korrelationsdiagramme zwischen den Intensitätsveränderungen zweier spektraler Banden von einem Spektrum zum nächsten erzeugt werden. Die für die Auswertung jeweils interessanten Parameter, z.B. Klassengrößen, zu untersuchende Bereiche, Minimum- und Maximumwerte, etc. können jeweils variiert werden.

Die Ergebnisse werden direkt grafisch dargestellt, so dass eine sofortige Beurteilung stattfinden kann. Um die erhaltenen Daten in anderen Programmen weiter zu verarbeiten ist ein Export im ASCII Format möglich.

Alle Datensätze, die den Parametern entsprechen und in die Auswertung eingegangen sind, werden in eine Liste der Datensätze eingetragen. Die Liste kann dann an das Hauptprogramm zurückgegeben werden, wo die einzelnen Spektren betrachtet werden können. Umgekehrt ist es auch möglich, im Hauptprogramm mit Hilfe der Suchfunktionen ausgewählte Datensätze zur Analyse an das Statistikprogramm zu übergeben.

Auf diese Weise erfüllt der Programmteil eine doppelte Funktion, nämlich die Zusammenstellung von Histogrammen und Korrelationsgrafiken und das schnelle Auffinden von Datensätzen, die Spektren mit bestimmten Eigenschaften enthalten.

### 3.3 Probenpräparation

Alle hier untersuchten Proben bestanden aus einem dünnen Film aus Polyvinylalkohol (PVA) mit darin eingebetteten fluoreszierenden Proteinen, der auf ein Deckglas aufgebracht wurde. Da es sich bei der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie um ein äußerst empfindliches Verfahren handelt, sind die Anforderungen an die Reinheit der Proben besonders hoch. Um eine maximale und gleichbleibende Qualität der Proben zu erreichen, ist eine aufwendige Vorbehandlung der verwendeten Substanzen und Materialien nötig. Außerdem muss immer wieder überprüft werden, ob eine Kontamination der zur Probenpräparation verwendeten Lösungsmittel und Materialien stattgefunden hat.

Die Polymerlösung, aus der die Proben hergestellt werden, weist typischerweise eine Proteinkonzentration von  $\sim 10^{-10}$  Mol/l auf. Bei einer solch niedrigen Konzentration an Fluorophoren führen selbst sehr geringe Mengen fluoreszierender Fremdmoleküle zu gravierenden Verfälschungen.

Um Kontaminationen mit Staub so gering wie möglich zu halten, wurde die Präparation der Proben in einer Laminar-Flow-Box unter Reinraumbedingungen durchgeführt, in die durch den Gegenstrom speziell gefilterter, praktisch partikelfreier Luft ein Eindringen von Staub verhindert wird. Als Probenträger dienten handelsübliche Deckgläschen für die Mikroskopie. Um alle auf den Deckgläschen anhaftenden organischen Verunreinigungen zu zerstören, wurden die Deckgläschen für mindestens 3 Tage in Chromschwefelsäure aufbewahrt. Die Deckgläschen wurden unmittelbar vor Gebrauch aus der Chromschwefelsäure genommen und zunächst mit dreifach destilliertem Wasser, dann mit Methanol (Merck, Uvasol, zur Spektroskopie) abgespült.

Die verwendete Polymerlösung bestand aus 100g Polyvinylalkohol (Hoechst, Mowiol 40-88) pro Liter Lösung in einer Mischung aus dreifach destilliertem Wasser und Cacodylat Pufferlösung (Fluka, 100 mM Natriumcacodylattrihydrat, pH 7,5) im Verhältnis 1:1. Da solche Polymerlösungen fluoreszente Verunreinigungen enthalten [50], wurde die Lösung für einige Tage mit intensivem Weißlicht bestrahlt, wodurch fluoreszierende Verunreinigungen weitestgehend zerstört werden. Die so behandelte Polymerlösung diente als Vorratslösung, von der jeweils kleine Mengen von einigen Millilitern abgenommen und für einige Stunden mit dem intensiven Licht eines Argonionen Lasers (5W, alle Linien) bestrahlt wurden, bevor die Lösung zur Probenpräparation verwendet wurde. Ebenso wurde mit der zur Probenpräparation notwendigen Cacodylat Pufferlösung verfahren.

Zur Probenherstellung wurde jeweils eine frische, hochverdünnte Lösung des Proteins in Cacodylatpufferlösung hergestellt, wobei jeweils von einer ca.  $10^{-4}$  molaren Proteinlösung ausgegangen wurde. In einer Verdünnungsreihe wurde die Proteinlösung mit der Pufferlösung versetzt, bis eine Konzentration von ca.  $10^{-9}$  mol/l Protein in Pufferlösung erreicht war. Im letzten Verdünnungsschritt wurde die Lösung dann mit 50% Pufferlösung und 50% Polymerlösung so verdünnt, dass man eine ca.  $10^{-10}$  molare Lösung von Protein in Polymerlösung erhielt.

Von der so erhaltenen  $\sim 10^{-10}$  molaren Proteinlösung wurden jeweils 20  $\mu$ l auf die vorbereiteten Deckgläschen aufgeschleudert. Hierzu wurde ein Spin-Coater verwendet, auf dem sich das Deckgläschen mit ca. 5000 U/min drehte, so dass die aufgetropfte Polymerlösung sofort weggeschleudert wurde, und nur ein einige 10 Nanometer dünner Polymerfilm [51] mit eingelagerten Proteinen auf dem Deckglas zurückblieb. Es wurde mit großer Sorgfalt darauf geachtet, dass in dem dünnen Polymerfilm der mittlere Abstand der Proteine zueinander deutlich größer als das laterale Auflösungsvermögen des verwendeten Mikroskops war, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden konnte, dass tatsächlich einzelne Proteine untersucht wurden. Proben, bei denen dies nicht der Fall war, wurden verworfen, und die Verdünnung für die neu zu präparierenden Proben wurde vergrößert.

Um die Güte der so erhaltenen Proben zu überprüfen, wurden sie mit identisch präparierten Blindproben ohne eingelagerte fluoreszierende Proteine verglichen. Nur wenn sichergestellt war, dass keine relevanten fluoreszierenden Kontaminationen vorhanden waren, wurden die Proteinproben weiter untersucht. Im Idealfall zeigten die Blindproben keinerlei fluoreszierende Verunreinigungen.

### 3.4 Ensemblespektroskopie

Alle Ensemblespektren wurden an kommerziellen Spektrometern der Firma Varian durchgeführt. Die Absorptionsspektren wurden an einem Spektrometer des Typs Varian Cary 50 Bio gemessen, die Fluoreszenzspektren an einem Varian Cary Eclipse.

## 4 Spektrale Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine

Die spektralen Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine sind ausgesprochen vielschichtig. Im folgenden wird ein Überblick über das bekannte spektrale Verhalten der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Proteine gegeben, außerdem werden einige Experimente vorgestellt, die mit den klassischen Methoden der Ensemblespektroskopie in Lösung durchgeführt wurden.

### 4.1 Aequorea GFP und dessen Varianten

Die Fluoreszenz der fluoreszierenden Proteine hängt sehr stark von der Umgebung des Chromophors ab. Die Synthese des Chromophors zeigte, dass 4-(p-hydroxybenzyliden)imidazol-5-on in Lösung nur extrem geringe Fluoreszenz mit Quantenausbeuten von  $10^{-3}$  aufweist [52]. Wurde die synthetisierte Modellsubstanz jedoch in ethanolischer Lösung eingefroren und bei tiefen Temperaturen um den Siedepunkt von Stickstoff untersucht, wurde starke Fluoreszenz beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden für Proteinfragmente, die den Chromophor beinhalten, gefunden. Das Erscheinen der Fluoreszenz wird durch die in fester, gefrorener Matrix gehinderte Isomerisierung der exo-Methylen-Doppelbindung des Chromophors verursacht, die in Lösung zu einer effektiven strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustandes führt. GFP und seine Varianten zeigen nur Fluoreszenz, weil sich der Chromophor im gefalteten Protein in einer starren Umgebung befindet, die die strahlungslose Desaktivierung über eine cis-trans-Isomerisierung unterbindet. Folgerichtig zeigen die fluoreszierenden Proteine im denaturierten, also entfalteten Zustand keine Fluoreszenz.

Das Aequorea Protein zeigt recht komplexes spektrales Verhalten. Um die Spektren zu verändern und auf diese Weise mehr über die molekularen Grundlagen der Fluoreszenz der fluoreszierenden Proteine zu erfahren, und um für bestimmte Anwendungen optimierte spektrale Eigenschaften zu erhalten, wurden zahlreiche GFP Varianten erzeugt. Man erhielt so eine Anzahl fluoreszierender Proteine mit zum Teil deutlich abweichenden spektralen Eigenschaften.

Tsien zeigt, dass die bekannten GFP Varianten in sieben Klassen unterteilt werden können, wobei anhand des Chromophors unterschieden wird [47]. Eingeteilt wird in folgende Klassen:

1. Mischung aus neutralem Phenol und anionischem Phenolat (wild-type)
2. Phenolat Anion
3. Neutrales Phenol
4. Phenolat Anion mit gestapelten  $\pi$ -Elektronensystemen
5. Indole
6. Imidazole
7. Phenyle

In der Polypeptidkette der Varianten 1-4 befindet sich an der Stelle 66 Tyrosin, bei den Varianten 5-7 findet sich an dieser Stelle Tryptophan, Histidin oder Phenylalanin. Alle Mitglieder einer Klasse zeigen gruppentypische Absorptions- und Emissionsspektren.

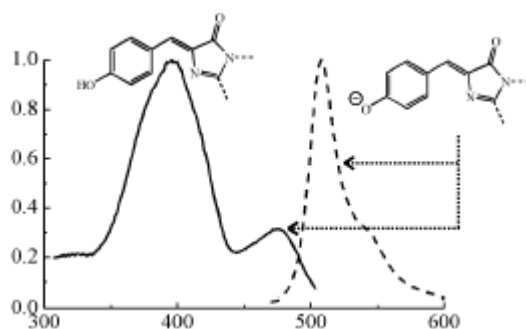
Zunächst soll hier kurz auf die spektralen Eigenschaften des wild-type Aequorea GFP eingegangen werden, bevor die spektralen Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Aequorea GFP Varianten EYFP und EGFP besprochen werden.

### 4.1.1 Aequorea GFP

Aequorea GFP ist nach der Klassifizierung von Tsien [47] ein Klasse 1 GFP, da die Fluoreszenz auf eine Mischung von Chromophoren mit neutralem Phenol und anionischem Phenolat zurückgeht. Im Absorptionsspektrum sind zwei Anregungsmaxima auszumachen (Abbildung 4.13). Das Hauptanregungsmaximum befindet sich bei 395nm, ein weiteres, deutlich schwächeres bei 475nm. Anregung bei 395nm führt in Lösung zu Fluoreszenz mit einem Maximum bei 508nm, Anregung bei 475nm führt zu einem Fluoreszenzmaximum bei 503nm. Hohe pH-Werte erhöhen die Absorption bei 475nm und verringern die Absorption bei 395nm. Diese Beobachtung wird so interpretiert, dass die Absorption bei 475nm von Proteinen stammt, deren Chromophor deprotoniert ist, also als Anion vorliegt, die Absorption bei 395nm hingegen von Proteinen mit neutralem Chromophor stammt [44, 45]. Da Phenole praktisch immer im angeregten Zustand deutlich azider sind als im Grundzustand, kann von einer Deprotonierung vom angeregten Zustand ausgegangen werden. Anregung des neutralen Chromophors bei 395nm führt zur Deprotonierung des Chromophors zum Anion im angeregten Zustand und somit zu Fluoreszenz mit Maximum

längerwellig 500nm. Zeitaufgelöste Spektroskopie im Picosekundenbereich bestätigt den angenommenen Protonentransfer im angeregten Zustand [53, 54]. Man erhält durch Anregung des neutralen Chromophors sehr ähnliche, aber nicht gleiche Fluoreszenz wie bei der direkten Anregung des anionischen Chromophors.

Abbildung 4.13 zeigt das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Aequorea GFP.



**Abbildung 4.13 Ensemble Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Aequorea GFP**

Anregung sowohl bei 395nm als auch bei 475nm führt zu Fluoreszenz, die typisch für den anionischen Chromophor mit Maximum längerwellig 500nm ist, was bei kurzweiliger Anregung des neutralen Chromophors auf eine Deprotonierung im angeregten Zustand zurückzuführen ist. Abbildung entnommen aus [47].

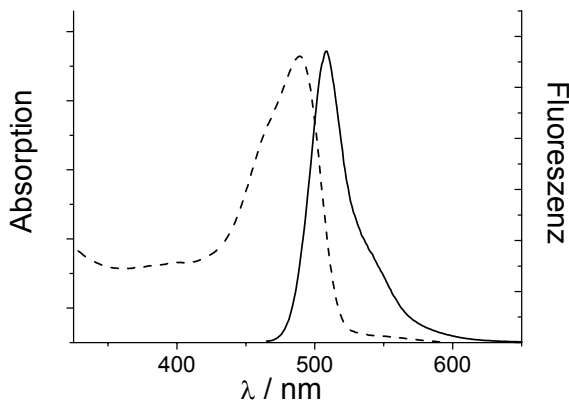
Im vorher unbeleuchteten Aequorea GFP liegen Proteine mit neutralem Chromophor zu Proteinen mit anionischem Chromophor im Verhältnis von ca. 6:1 vor. Der Protonentransfer, ausgehend vom angeregten Zustand, findet wahrscheinlich über die Wasserstoffbrücken eines eingelagerten Wassermoleküls und Ser-205 zum Glu-222 statt. Währenddessen rotiert die Seitenkette des Thr-203 so, dass die OH-Gruppe in Richtung Chromophor zeigt, was den anionischen Chromophor stabilisiert [55]. Die verschiedenen Formen des GFP werden als A-Form mit neutralem Chromophor, I-Form (Intermediate) mit anionischem Chromophor vor Drehung des Thr203 und B-Form mit anionischem Chromophor nach Drehung des Thr203 bezeichnet. Die drei verschiedenen Formen konnten bei tiefen Temperaturen spektroskopisch nachgewiesen werden, und es konnte gezeigt werden, dass A- und B-Form über die I-Form ineinander übergehen können [56].



### 4.1.2 EGFP

EGFP (**E**nhan**G** **G**reen **F**luorescent **P**rotein) ist eine Aequorea GFP Variante, deren photophysikalische Eigenschaften im Vergleich zu Aequorea GFP für die meisten Anwendungen günstiger sind. Besonders hervorzuheben sind bei dieser Aequorea GFP Variante die Möglichkeit der Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm und die Eignung zu Einzelmoleküluntersuchungen [28].

EGFP unterscheidet sich von Aequorea GFP durch den Austausch von zwei Aminosäuren, nämlich Ersetzung von Phenylalanin durch Leucin an der Stelle 64 (kurz: Phe-64-Leu) und Ersetzung von Serin durch Threonin an der Stelle 65 (kurz: Ser-65-Thr) [57, 58]. Das Absorptionsmaximum von EGFP liegt bei 490nm und das Maximum der Fluoreszenz bei 510nm (vgl. Abbildung 4.14). Der Extinktionskoeffizient beträgt bei 490nm  $55000 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , die Fluoreszenzquantenausbeute wurde zu 0,6 bestimmt [47].



**Abbildung 4.14 : Normierte Ensemble Absorptions- und Fluoreszenzspektren von EGFP**

Das Absorptionsmaximum von EGFP liegt bei 490nm, das Fluoreszenzmaximum bei 510nm. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 458nm.

Bei EGFP liegt der Chromophor hauptsächlich als Anion vor, EGFP gehört damit nach Tsien [47] zur Klasse 2 der GFP Varianten. Bei allen Klasse 2 Varianten ist Serin an der Stelle 65 der Peptidkette durch andere Aminosäuren so ersetzt, dass das Anion des Chromophors stabilisiert wird. Dies führt dazu, dass das Absorptionsmaximum bei 395nm zugunsten der Absorption bei 480nm stark abnimmt, was die Veränderung des Anzahlverhältnisses von neutralem Chromophor zu anionischem Chromophor anzeigt.

Der vermutete Mechanismus, der zur Favorisierung der Bildung des anionischen Chromophors führt, ist der, dass Aminosäuren an der Position 65 wie Glycin, Alanin und Leucin keine Wasserstoffbrücken ausbilden können, oder voluminöse Aminosäuren wie Threonin oder Cystein sich im dicht gedrängten Innern des Proteins nicht so orientieren können, dass am Glu-222 das Carboxylat entstehen kann. Damit führen die Veränderungen an der Stelle 65 dazu, dass die Carboxylgruppe am Glu-222 neutral bleibt, ein neutrales Glu-222 behindert nicht durch elektrostatische

Abstoßungen die Bildung des anionischen Chromophors in seiner unmittelbaren Umgebung, wie es ein negativ geladenes Glu-222 tut. Es kann, begünstigt durch die anderen polaren Gruppen in der unmittelbaren Chromophorumgebung, leicht zur Bildung des anionischen Chromophors kommen [46, 55].

Daten über ineinander übergehende spektrale Formen wie bei *Aequorea* GFP liegen bisher zu EGFP nicht vor, jedoch sind entsprechende Experimente mit einer eng verwandten Variante der Klasse 2 gemacht worden, nämlich mit dem Mutanten Ser-65-Thr, der sich nur um eine Aminosäure von EGFP unterscheidet. EGFP zeigt sowohl in der Absorption, als auch Fluoreszenz um einige Nanometer langwellig verschobene Spektren im Vergleich zu Ser-65-Thr, die Ser-65-Thr Daten sind jedoch qualitativ übertragbar. Creemers et al. [59] konnten durch spektrales Lochbrennen und hochauflösende Spektroskopie bei kryogenen Temperaturen zeigen, dass bei Ser-65-Thr drei spektral unterschiedliche Formen besetzt sind, die sie analog zu *Aequorea* GFP als A-, B- und I-Form bezeichnen, und dass die Formen bei kryogenen Temperaturen ineinander übergehen [59].

Wegen der Möglichkeit der Umwandlung in die beiden anderen Formen folgern Creemers et al., dass die Variante Ser-65-Thr überwiegend in der I-Form vorliegt, nicht in der B-Form, wie von anderen Autoren angenommen wurde [55, 60]. Gemäß der Benennung nach Creemers liegt das Fluoreszenzmaximum der I-Form bei 500nm, das der B-Form bei 484nm, und das der A-Form bei 434nm. Übergänge zwischen den angeregten Formen A\* und I\* und auch B\* und I\* konnten nicht beobachtet werden, jedoch die Übergänge von I\* nach B und B\* nach I, wobei diese Übergänge vermutlich über einen Triplet-Zustand ablaufen. Über weitergehende strukturelle Grundlagen der Formen, speziell der I-Form, ist bisher nichts bekannt.

### 4.1.3 EYFP

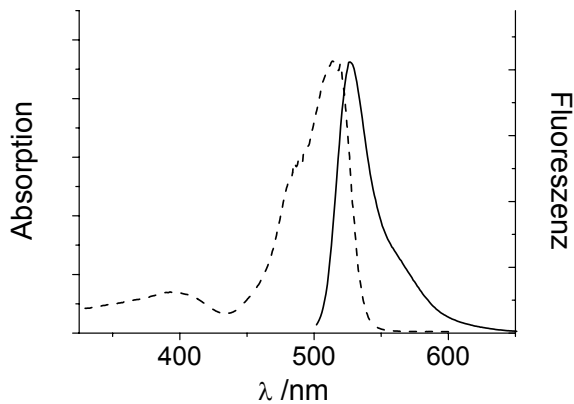
EYFP (**E**nanced **Y**ellow **F**luorescent **P**rotein) wurde zur Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt, weil es eine der Aequorea GFP Varianten ist, die am weitesten bathochrom verschobene Fluoreszenz und Absorption zeigt. Dies macht diese Variante sehr attraktiv für die Forschung, da in biologischen Systemen das Fluoreszenzhintergrundsignal durch Autofluoreszenz mit steigender Anregungswellenlänge abnimmt, weshalb EYFP besonders als *in vivo* Fluoreszenzlabel geeignet ist. Die zweite Hauptanwendung von EYFP ist als Akzeptor in FRET Systemen, wie z.B. dem Cameleon Konstrukt [15]. Ein weiterer oft genutzter Vorteil ist, dass EYFP durch Licht der Wellenlänge 514nm, wie es in zahlreichen kommerziellen Fluoreszenzmikroskopen verwendet wird, optimal angeregt wird.

Der EYFP Chromophor liegt als Anion mit gestapeltem  $\pi$ -Elektronensystem vor und gehört somit zu den Klasse 4 Mutanten des GFP nach Tsien [47]. Einige Jahre lang waren Klasse 4 GFP Varianten die langwelligsten bekannten fluoreszierenden Proteine. Die Klasse 4 Varianten sind planmäßig entwickelt worden, nachdem die Kristallstruktur der Ser-65-Tyr Variante aufgeklärt war. Man erwartete, dass eine zusätzliche Möglichkeit der Polarisierung am Chromophor und zusätzliche  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu einer Reduzierung der Energie des angeregten Zustandes und damit zu einer Rotverschiebung von Absorption und Fluoreszenz führen.

Bei allen Klasse 4 Varianten ist Serin an der Stelle 65 so ersetzt, dass die anionische Form des Chromophors stabilisiert wird (vgl. 4.1.2). Weiterhin ist an der Stelle 203 statt Threonin eine Aminosäure mit Aromat in der Seitenkette eingeführt (Histidin, Tryptophan, Phenylalanin oder Tyrosin), was die Wechselwirkung des aromatischen Ringsystems mit dem Phenolat-Anion des Chromophors durch  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen, sog.  $\pi$ -stacking, ermöglicht [46]. Wie erwartet kam es zu einer deutlichen Rotverschiebung der Spektren um ca. 20nm. Durch zufällige Mutation des ursprünglichen Gens wäre es praktisch nicht möglich gewesen, die Klasse 4 Varianten zu entdecken, da alle drei Basen, die bei Aequorea GFP für die Aminosäure 203 kodieren, ersetzt werden mussten, um eine Aminosäure mit aromatischem Rest an die Stelle 203 zu platzieren.

EYFP wird auch als GFP 10C bezeichnet und weist vier Mutationen zu Aequorea GFP auf. An der Stelle 65 trägt EYFP statt Serin Glycin, an der Stelle 68 Leucin statt Valin, an der Stelle 72 Alanin statt Serin und an der Stelle 203 Tyrosin statt Threonin (kurz: Ser-65-Gly, Val-68-Leu, Ser-72-Ala, Thr-203-Tyr). Das Absorptionsmaximum von EYFP liegt bei 515nm, das Fluoreszenzmaximum bei 528nm (Abbildung 4.15). Der

Extinktionskoeffizient beträgt bei 515nm  $83400 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , die Fluoreszenzquantenausbeute wurde zu 0,61 bestimmt [47].



**Abbildung 4.15: Normierte Ensemble Absorptions- und Fluoreszenzspektren von EYFP**

Das Absorptionsmaximum liegt bei 515nm, das Fluoreszenzmaximum bei 528nm. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 488nm.

Creemers et al. konnten durch spektrales Lochbrennen und hochauflösende Spektroskopie bei kryogenen Temperaturen zeigen, dass EYFP bei tiefen Temperaturen sowohl als A, B und auch I-Form vorliegt, wobei die Formen hier wiederum analog zu Aequorea GFP benannt wurden. Neben der vorherrschenden B-Form mit Fluoreszenzmaximum bei 528nm, sind auch die I-Form mit Fluoreszenzmaximum bei 507nm, und die A-Form mit Fluoreszenzmaximum bei 450nm, besetzt. Die Formen können bei kryogenen Temperaturen ineinander übergehen [59].

### 4.1.4 Bekanntes Fluoreszenzverhalten einzelner Proteine von Aequorea GFP und dessen Varianten

Der klassische und bei weitem am häufigsten praktizierte Weg der Einzelmoleküluntersuchung ist die Aufnahme von Intensitätstrajektorien einzelner Emitter mittels eines geeigneten Detektors, z.B. einer Avalanche Photo Diode (APD). Bei der Auswertung der Intensitätstrajektorien der Einzelmolekülfluoreszenz von Aequorea GFP und dessen Varianten wurden Dunkelzeiten ohne Fluoreszenz mit verschiedensten Zeitkonstanten gefunden. Für jede bisher untersuchte Aequorea GFP-Variante wurden Dunkelzeiten im Mikrosekundenbereich ebenso gefunden wie solche im Minutenbereich [24-26, 61], wobei zum Teil Abhängigkeiten vom pH-Wert und der Anregungsleistung beobachtet wurden.

Die Abhängigkeit von Übergangswahrscheinlichkeiten in einen nicht fluoreszierenden Zustand vom pH-Wert bei Anregung des anionischen Chromophors deuten auf die Rolle des neutralen Chromophors bei diesen dunklen Zuständen hin. Dafür spricht außerdem, dass einzelne Proteine beobachtet werden können, die durch Bestrahlung

mit Licht der Wellenlänge 405nm, mit der der neutrale Chromophor angeregt werden kann, aus einem langlebigen Dunkelzustand wieder in einen fluoreszierenden Zustand wechseln [24]. Es wurden jedoch auch Fälle gefunden, bei denen der Wechsel in einen nicht fluoreszierenden Zustand nicht mit dem pH-Wert zusammenhängt [26], was die Existenz wenigstens eines weiteren dunklen Zustands zeigt.

Außerdem gibt es lichtinduzierte Wechsel in nicht fluoreszierende Zustände von kurzer Lebensdauer im Mikrosekundenbereich, die dem Triplet-Zustand des Chromophors zugeordnet werden [27]. Ein weiterer lichtinduzierter Wechsel in einen dunklen Zustand, allerdings mit einer Lebensdauer im Sekundenbereich, wurde von Petermann et al. beobachtet [26]. Sie fanden, dass die Dauer der Zeiten, in denen Fluoreszenz auftritt, mit steigender Anregungsleistung abnimmt, womit gezeigt wurde, dass dieser Teil der dunklen Zustände über den angeregten Zustand erreicht wird.

Die Natur der meisten dunklen Zustände ist bisher nicht aufgeklärt, nur Dunkelzeiten, die auf den Wechsel in den Triplet-Zustand und auf die Bildung des nur sehr kurzweilig anregbaren neutralen Chromophors zurückgehen, sind bisher in ihrer Ursache identifiziert. Vorschläge, wie das Modell der Existenz eines zwitterionischen, nicht fluoreszenten Zustandes des Chromophors mit deprotonierter phenolischer Gruppe und protoniertem Stickstoff am Imidazolring [62] konnten experimentell nicht bestätigt werden, vielmehr gibt es inzwischen Ramanspektroskopische Daten, die darauf hinweisen, dass die vorgeschlagene Form des Chromophors nicht existiert [63].

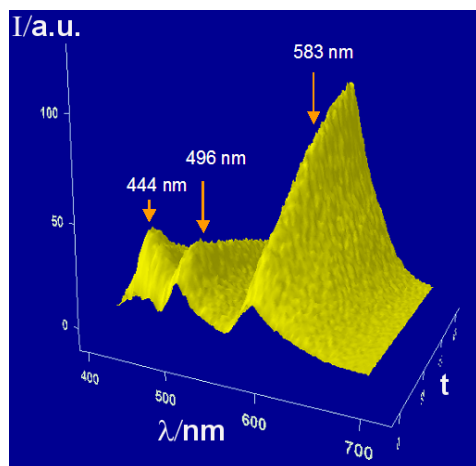
Die bisherigen Untersuchungen an einzelnen Proteinen von Aequorea GFP Varianten zeigen ein sehr vielfältiges Verhalten, was bei der Größe der Proteine und der sich daraus ergebenden Möglichkeit vieler energetisch ähnlicher Zustände, nicht verwundert.

## 4.2 DsRed und dessen Varianten

### 4.2.1 DsRed

Der Extinktionskoeffizient von DsRed beträgt  $75000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  am Absorptionsmaximum bei 558nm, und die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt 0,7 [42]. Die optischen Eigenschaften von DsRed sind damit deutlich besser als von seinen Entdeckern ursprünglich berichtet [39]. Die Quantenausbeute des Photobleichens unter typischen Ensemblebedingungen beträgt  $7 \cdot 10^{-7}$  [42] und ist somit signifikant kleiner als bei den Aequorea GFP Varianten.

Die für DsRed typische rote Fluoreszenz bildet sich erst im Verlauf eines Reifungsprozesses aus, der fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden kann. Direkt nach der Transkription des Proteins ist keine Fluoreszenz zu beobachten, es kommt dann zunächst zur Ausbildung des grün fluoreszierenden Chromophors, der dann in einem weiteren Reaktionsschritt zum typischen rot fluoreszierenden DsRed Chromophor weiterreagiert (Mechanismus vgl. Kapitel 2.5.2.2). Fluoreszenzspektroskopisch beobachtet man, wie in Abbildung 4.16 gezeigt, zunächst einen hohen Anteil an grüner Fluoreszenz, der dann im Laufe der Zeit immer stärker durch die zunehmende Bildung des rot fluoreszierenden Chromophors abnimmt.



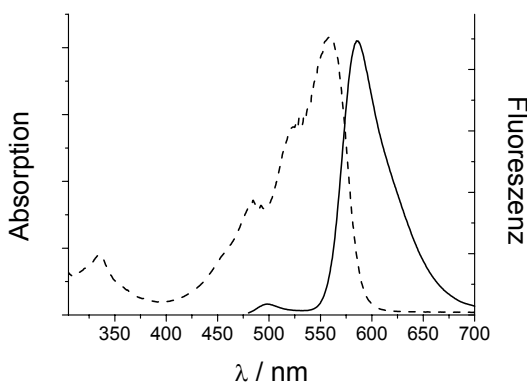
**Abbildung 4.16: Ausbildung der roten Fluoreszenz bei DsRed**

Nach der Transkription des Proteins bildet sich die charakteristische rote Fluoreszenz des DsRed erst durch einen Reifungsprozess aus, bei dem zunächst ein grün fluoreszierendes Zwischenprodukt entsteht.

Diagramm von V. Subramaniam

Die grüne Fluoreszenz verschwindet jedoch nicht völlig, bei einem Teil der Proteine kommt es nicht zur zweiten Dehydrierung und damit Bildung des rot fluoreszierenden Chromophors. Bleichexperimente zeigen, dass es sich nicht um ein Gleichgewicht zwischen den beiden Chromophoren handelt (vgl. Abbildung 4.19), sondern dass bei einem Teil der Proteine aus unbekanntem Grund der abschließende Schritt zur Bildung des langwellig fluoreszierenden Chromophors nicht eintritt.

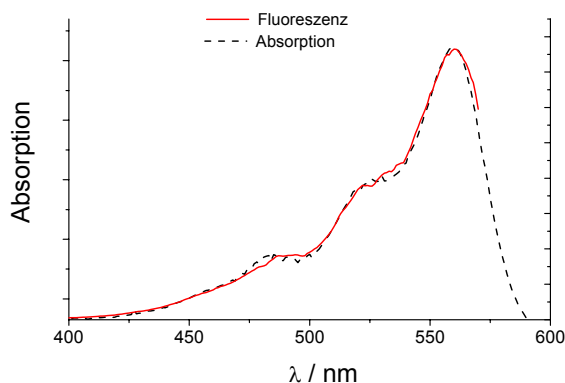
Abbildung 4.17 zeigt das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von gereiftem DsRed. Das Absorptionsspektrum hat sein Maximum bei 558nm, eine Schulter um 528nm und ein Nebenmaximum bei 487nm. Eine weitere charakteristische Absorption ist bei 335nm zu beobachten. Die Fluoreszenz wurde bei 458nm angeregt, was zu Emission mit Maxima bei 500nm und, deutlich stärker, bei 583nm führt. Die beiden Fluoreszenzbanden können zum einem dem grün fluoreszierenden Chromophor des Zwischenproduktes bei der Reifung und zum anderen dem gereiftem Chromophor zugeordnet werden.



**Abbildung 4.17: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von DsRed**

Auch im gereiften DsRed ist neben der roten Fluoreszenz mit Maximum bei 583nm grüne Fluoreszenz des nicht vollständig weiterreagierten Zwischenproduktes bei der Chromophorreifung mit Maximum bei 500nm sichtbar. Die Fluoreszenz wurde bei 458nm angeregt.

Das Nebenmaximum im Absorptionsspektrum bei 487nm befindet sich ungefähr dort, wo das Zwischenprodukt maximal absorbiert (480nm), weshalb dieses Nebenmaximum oft nicht der vibronischen Progression des rot fluoreszierenden Chromophors, sondern dem grün fluoreszierenden Chromophor zugeordnet wird [42, 48, 64]. Der Vergleich des Absorptionsspektrums mit dem Fluoreszenzanregungsspektrum (Abbildung 4.18) zeigt jedoch nur minimale Abweichungen zwischen den Spektren.



**Abbildung 4.18: Vergleich von Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektrum**

Die Spektren sind bis auf kleine Abweichungen identisch, was zunächst gegen die Anregung mehrerer unterschiedlicher Zustände oder Chromophore spricht.

Für nicht FRET gekoppelte Chromophore zeigt die sehr geringe Abweichung der Spektren voneinander eindeutig, dass die Absorption bei 485nm nicht von der vermuteten kurzwellig fluoreszierenden Spezies herrührt. Da DsRed jedoch Tetramere bildet, kann von einer völligen Unabhängigkeit der Chromophore nicht ausgegangen werden. Einen Hinweis auf die Kopplung gleichartiger Chromophore im DsRed Tetramer lieferte die Bestimmung der Fluoreszenzanisotropie von DsRed, wobei eine ungewöhnlich starke Depolarisierung gefunden wurde [43], die auf einen Energietransfer zwischen nichtparallelen Chromophoren hinweist. Ebenfalls in diese Richtung deuten Berechnungen, die auf Strukturdaten aus der Röntgenstrukturanalyse basieren, welche ergeben, dass die Übertragungsraten zwischen gleichartigen Chromophoren deutlich höher als die Emissionsraten sind [65].

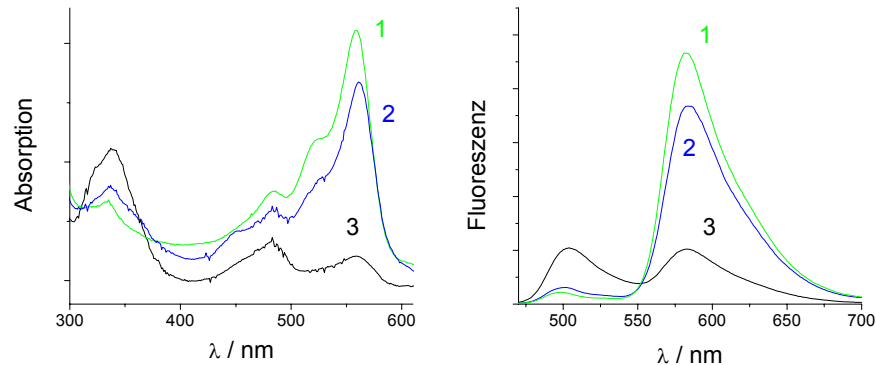
Sollte DsRed jedoch gemischte Tetramere aus Proteinen, die grün, bzw. rot fluoreszierende Chromophore enthalten, ausbilden, so werden Aussagen zur Interpretation des Anregungsspektrums deutlich schwieriger. Findet nämlich ein hocheffizienter Energieübertrag vom kurzwellig absorbierenden Chromophor zum langwellig fluoreszierenden Chromophor statt, erschwert dies die Interpretation des Anregungsspektrums. Abweichungen sind nur dann sichtbar, wenn ein Teil der absorbierten Energie nicht auf den FRET Akzeptor übertragen wird, also entweder strahlungslos deaktiviert oder als Akzeptorfluoreszenz abgegeben wird.

Bleichexperimente und zeitaufgelöste Untersuchungen der Fluoreszenz [66] deuten auf gemischte Tetramere und FRET gekoppelte Chromophore hin, jedoch sind Aussagen zur Effizienz der FRET Kopplung zwischen grün fluoreszierenden und rot fluoreszierenden Chromophoren innerhalb eines Tetramers in der Literatur widersprüchlich. So ermitteln Baird et al. aus in vivo Bleichexperimenten eine FRET Effizienz von 63-83% [42], andere Autoren gehen pauschal und ohne Begründung von einer FRET Effizienz von 100% aus [40]. Rechnungen für Tetramere mit gemischten Chromophoren deuten auf eine hohe FRET Effizienz hin, jedoch konnten diese Rechnungen nur mit Annahmen bezüglich der Orientierung der Übergangsdipolmomente und Abklingdauern der grünen Fluoreszenz [66] durchgeführt werden.

Bleichexperimente, die im Rahmen dieser Arbeit an DsRed durchgeführt wurden, bestätigen die Komplexität des beobachteten spektralen Verhaltens. Bei dem durchgeführten Bleichexperiment wurde das fokussierte Licht einer Halogen-Weißlichtquelle verwendet, wobei das Licht, welches die Probe traf, mittels eines Kantenfilters auf Wellenlängen oberhalb von 550nm beschränkt wurde. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass nur der rot fluoreszierende Chromophor angeregt und



somit photozerstört wird. In geeigneten zeitlichen Abständen wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abbildung 4.19).



#### Abbildung 4.19: Selektives Bleichen des langwellig fluoreszierenden Chromophors

Bei selektivem Bleichen der roten Fluoreszenz kann ein Anstieg der Fluoreszenz um 500nm beobachtet werden (Rechts). Ob es sich dabei um eine Photoreaktion oder um das Dequenching von FRET Donoren handelt, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, da auch die Absorptionsspektren (Links) hierzu kein eindeutiges Ergebnis liefern.

Die Zerstörung des langwellig fluoreszierenden Chromophors zeigt sich im Absorptionsspektrum durch Abnahme der zugehörigen Absorption um 558nm und im Fluoreszenzspektrum durch Abnahme der Fluoreszenzbande mit Maximum bei 583nm. Gleichzeitig tritt verstärkt Absorption bei 335nm auf, welche dem Photoprodukt, das bei der Zerstörung des rot fluoreszierenden Chromophors entsteht, zugeordnet werden kann. Das Nebenmaximum im Absorptionsspektrum bei 487nm bildet sich im Laufe des Bleichens immer deutlicher zum Absorptionsmaximum in diesem Bereich heraus. Da diese Bande durch Überlagerung der Absorption des ungereiften und des gereiften Chromophors entsteht, und sie während des Bleichens insgesamt abnimmt, kann die Bildung eines Photoproduktes nicht ausgeschlossen werden. Im Fluoreszenzspektrum nimmt die Fluoreszenz um 500nm während des zunehmenden Bleichens der rot fluoreszierenden Chromophore deutlich zu. Dies kann durch Dequenching verursacht sein, der verstärkten Fluoreszenz des Donor Chromophors in einem FRET System, verursacht durch verringerten Energietransfer zum Akzeptor Chromophor, z.B. durch dessen Zerstörung. Eine weitere Erklärung, zumal sich das Fluoreszenzmaximum der kurzwelligen Fluoreszenzbande kontinuierlich von 499nm nach 504nm verschiebt, besteht in einer Photoreaktion während des Bleichens, wobei sich ein grün fluoreszierendes Photoprodukt bildet. FRET kann ebenso wie die Bildung eines fluoreszierenden Photoproduktes auf diese Weise weder belegt noch widerlegt werden.

Interessanterweise weichen die hier während des selektiven Bleichens des gereiften Chromophors beobachteten Absorptionsspektren von einem ähnlichen, in der Literatur erwähnten Experiment von Cotlet et al. [30] ab. Cotlet et al. hatten DsRed mit gepulstem Laserlicht der Wellenlänge 532nm und hoher Intensität bestrahlt und dabei die Bildung einer neuen Bande bei 386nm und die Veränderung der maximalen Absorption des gereiften Chromophors von 558nm nach 574nm bei gleichzeitiger Veränderung des Emissionsmaximums von 583nm nach 595nm beobachtet. Während des Bleichens entstand eine von ihnen „super rot“ genannte Form des DsRed. Dies ist im hier durchgeführten Experiment nicht zu beobachten. Wie die später im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente an einzelnen Oligomeren zeigen, hängt die Bildung der super roten DsRed Form mit hohen Anregungsleistungen zusammen (vgl. Kapitel 5.2.2.1). Da bei dem hier präsentierten Bleichexperiment zur Anregung eine gefilterte Weißlichtquelle anstelle von intensivem Laserlicht benutzt wurde, war die Anregungsleistung zu niedrig, um die super rote DsRed Form in detektierbarer Menge entstehen zu lassen.

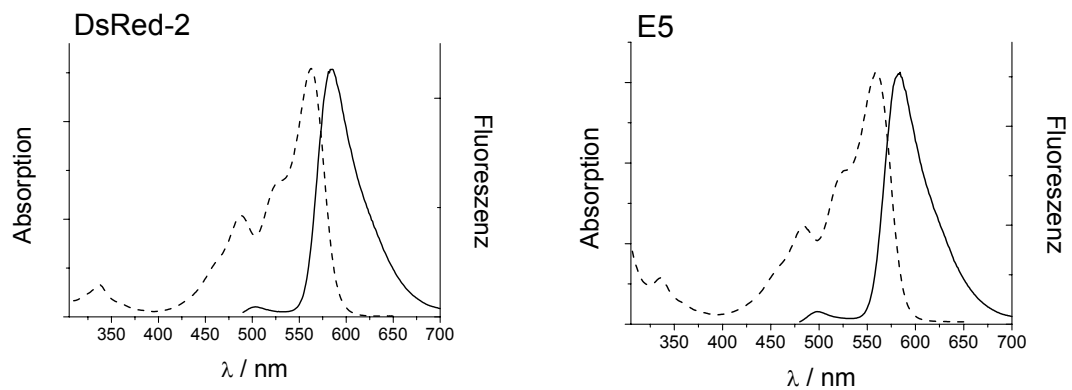
Um das spektrale Verhalten von DsRed zu verstehen, ist es außerdem besonders nachteilig, dass das Anzahlverhältnis von Monomeren mit rot und grün fluoreszierendem Chromophor zueinander nicht bekannt ist. Da dieser Anteil nicht bekannt ist, und auch die FRET Effizienz zwischen den unterschiedlichen Chromophoren letztlich unbekannt ist, kann die Frage nach der Zuordnung der Absorption bei 485nm nicht beantwortet werden.

Die Bestimmung des Anzahlverhältnisses von Proteinen mit grün, bzw. rot fluoreszierendem Protein ist demnach von einigem Interesse. Erste Hinweise auf das Anzahlverhältnis der Chromophore zueinander stammen von Gross et al. [48], die von Hinweisen auf eine 1:1 Zusammensetzung sprechen, gleichzeitig regen sie einzelmolekülspektroskopische Experimente an, um z.B. die Zusammensetzung der Tetramere zu bestimmen.

### **4.2.2 DsRed-2 und E5**

DsRed-2 und E5 sind zwei DsRed Varianten, die dem ursprünglichen DsRed in gereifter Form spektral sehr ähnlich sind, da beide Proteine nach der Reifung fast ausschließlich langwellige Fluoreszenz um 583nm und nur sehr wenig grüne Fluoreszenz um 500nm zeigen. Beide Varianten wurden hier nicht wegen ihrer speziell veränderten Reifungseigenschaften, sondern zu Vergleichszwecken, bzw. zur Charakterisierung wegen ihrer besonderen Bedeutung in der Forschung ausgewählt.

DsRed-2 unterscheidet sich um sechs Aminosäuren vom ursprünglichen DsRed, wobei die Ersetzungen Arg-2-Ala, Lys-5-Glu, Lys-9-Thr, Val-105-Ala, Ile-161-Thr und Ser-197-Ala vorgenommen wurden. Dies führt zu einer ca. doppelt so schnellen Reifung des Chromophors vom grün fluoreszierenden zum rot fluoreszierenden Chromophor und einer Fluoreszenzquantenausbeute von 55% [67]. Im Absorptionsspektrum von DsRed-2 ist ein Nebenmaximum bei 488nm, eine Schulter bei 527nm und das Absorptionsmaximum bei 562nm sichtbar. Bei geeigneter Anregung erhält man je eine Fluoreszenzbande mit Maximum bei 502nm, die dem unreifen Chromophor zuzuordnen ist, und eine um ein vielfaches intensivere Intensitätsbande mit Maximum bei 584nm, die dem gereiften Chromophor zuzuordnen ist (Abbildung 4.20, Links).



**Abbildung 4.20: Ensemble Absorptions- und Fluoreszenzspektren von DsRed-2 (Links) und E5 (Rechts)**

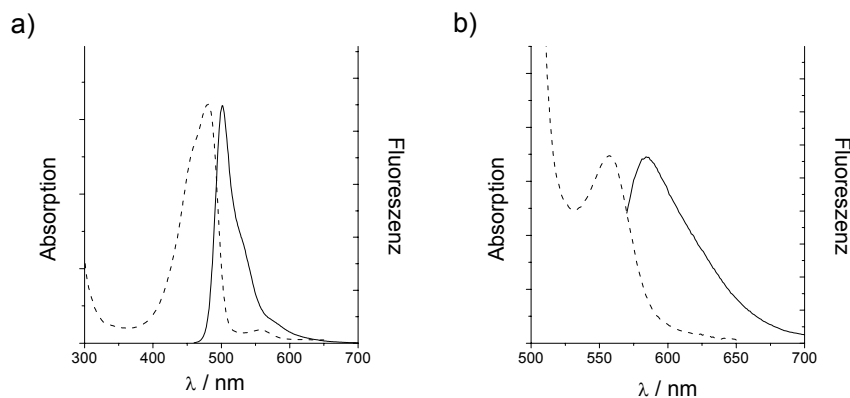
Spektral unterscheiden sich DsRed-2 und E5 von DsRed hauptsächlich während des Reifungsprozesses. Die Endprodukte der Reifung, welche hier untersucht wurden, entsprechen einander und auch DsRed spektral weitestgehend.

E5 weist im Vergleich zu DsRed zwei Aminosäureersetzungen, nämlich Val-105-Ala und Ser-197-Thr, auf. Diese Veränderungen führen zu einer Verstärkung der grünen Fluoreszenz während der Reifung des Proteins. E5 wird als „fluorescent Timer“ bezeichnet, da die Bildung des rot fluoreszierenden Chromophors aus dem verstärkt gebildeten grün fluoreszierenden Zwischenprodukt sehr gut spektral verfolgt werden kann [68]. Im gereiften Zustand ist E5 mit seinem Nebenmaximum bei 483nm, einer Schulter bei 525nm und dem Maximum bei 559nm im Absorptionsspektrum und den Fluoreszenzmaxima bei 500nm und, um ein Vielfaches intensiver, bei 582nm (Abbildung 4.20) dem DsRed homolog. Über E5 Fluoreszenzquantenausbeuten ist in der Literatur nichts bekannt.

### 4.2.3 AG4

Der DsRed Mutant AG4 wurde ausgewählt, weil er fast ausschließlich grüne Fluoreszenz zeigt. AG4 entstand durch Zufallsmutagenese des DsRed Gens. Das Protein unterscheidet sich in drei Aminosäuren von DsRed, es wurden die Vertauschungen Val-71-Met, Val-105-Ala und Ser-197-Thr durchgeführt [69].

Wie auch bei DsRed zeigt das frisch transkribierte Protein keine Fluoreszenz. Der Chromophor in AG4 bildet sich nach dem in Abbildung 2.8 gezeigten Mechanismus, wobei jedoch der letzte Reaktionsschritt, die Dehydrierung zur Bildung des Acylimins, bei der Mehrzahl der Proteine unterbleibt. Durch den Austausch der Aminosäuren wird die Bildung des rot fluoreszierenden Chromophors weitgehend verhindert. Es wird angenommen, dass der Austausch von Methionin durch Valin an der Stelle 71 und damit direkt in der Chromophorumgebung, durch den höheren sterischen Anspruch des Valin die weitere Reaktion stark behindert. Der Chromophor in AG4 entspricht dem im nicht gereiften DsRed Zwischenprodukt. Im Fluoreszenzspektrum ist bei Anregung mit 450nm nur die Fluoreszenz des ungereiften Chromophors bei 502nm sichtbar (Abbildung 4.21a).



**Abbildung 4.21: Absorption und Fluoreszenz von AG4**

- Die Absorption und Fluoreszenz entspricht weitgehend der Absorption und Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Zwischenproduktes, welches bei der Reifung von DsRed entsteht. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 450nm.
- Nur ein kleiner Teil der Proteine bildet den gereiften Chromophor aus, welcher im Absorptionsspektrum schwach sichtbar wird, und dessen Fluoreszenz bei langwelliger Anregung nachgewiesen werden kann. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte bei 557nm.

Im Gegensatz zum in der Literatur beschriebenen AG4 [69] sind bei dem verwendeten AG4 sowohl in der Absorption, als auch in der Emission bei geeigneter Anregung Hinweise auf den ausgereiften DsRed-artigen Chromophor zu finden. Die Absorptionsspektren in Abbildung 4.21 zeigen zwei Maxima, nämlich bei 481nm, dem grün fluoreszierenden Chromophor zuzuordnen, und bei 557nm, das dem rot fluoreszierenden Chromophor zuzuordnen ist. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 450nm ist praktisch nur Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Chromophors zu beobachten (Abbildung 4.21 a), die schwache Fluoreszenz des gereiften Chromophors wird überdeckt. Anregung im Absorptionsmaximum des gereiften Chromophors führt jedoch zu deutlicher Fluoreszenz dieses Chromophors mit Maximum bei 583nm (Abbildung 4.21 b).

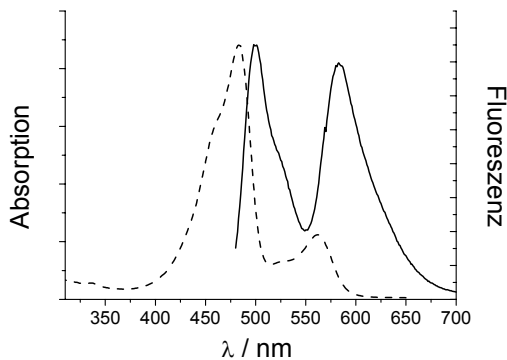
AG4 ist somit ein System, bei dem das Verhältnis zwischen roter und grüner Fluoreszenz umgekehrt zu DsRed liegt. Die Frage der FRET Kopplung ist überschaubarer, da das Absorptionsspektrum zeigt, dass der Anteil an gereiftem Chromophor zu ungereiftem in jedem Fall niedrig ist. Eine Komplikation durch Unsicherheiten in der Bandenzuordnung tritt bei AG4 nicht auf.

### 4.2.4 E8

Der E8 Mutant von DsRed ist bisher in der Literatur nicht beschrieben, er wurde im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt, da er spektral zwischen den Extremen DsRed und AG4 liegt. Wie AG4 wurde E8 durch Zufallsmutagenese gewonnen, wobei sich das Protein nur in einer Aminosäure von DsRed unterscheidet (Asn-42-His). Die Mutation führt dazu, dass sich nur noch in einem Teil der Proteine der voll ausgereifte, rot fluoreszierende Chromophor ausbildet.

Im Absorptionsspektrum ist die typische Absorptionsbande des nicht ausgereiften Zwischenproduktes mit Maximum bei 482nm sichtbar, außerdem die Absorption des gereiften Chromophors bei 562nm (Abbildung 4.22). Das Verhältnis der Absorption der zwei Chromophore beträgt  $\sim 4$ , woraus sich zwar nicht das Anzahlverhältnis der Chromophore bestimmen lässt, da der Extinktionskoeffizient des ungereiften Chromophors nicht bekannt ist, jedoch wird deutlich, dass ein hoher Anteil der Proteine den grün fluoreszierenden Chromophor trägt. Die Anregung mit Licht der Wellenlänge 450nm führt zu zwei etwa gleich intensiven Fluoreszenzbanden. Die Fluoreszenzbande

mit Maximum bei 500nm stammt vom nicht ausgereiften Chromophor, die bei 583nm vom voll ausgereiften, rot fluoreszierenden DsRed-artigem Chromophor.



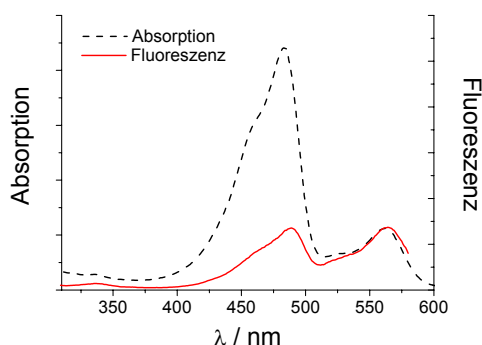
**Abbildung 4.22: Absorption und Fluoreszenz von E8**

Im Absorptionsspektrum ist deutlich stärkere Absorption des ungereiften als des gereiften Chromophors sichtbar. Anregung bei 450nm liefert fast gleich intensive Fluoreszenz der beiden Chromophore.

Anhand des Absorptionsspektrums würde man auf den ersten Blick für Anregung bei 450nm sehr deutliche Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Chromophors und wenig Emission vom rot fluoreszierenden Chromophor erwarten. Die etwa gleich intensive Fluoreszenz der beiden unterschiedlichen Chromophore ist interessant, wobei verschiedene Ursachen hierfür denkbar sind. Zum einen kommen deutlich unterschiedliche Fluoreszenzquantenausbeuten in Frage, geringe Fluoreszenzquantenausbeuten des nicht ausgereiften Chromophors würden trotz deutlich besserer Anregung dieses Chromophors zu dem beobachteten Fluoreszenzspektrum führen. Zum anderen kann eine FRET Kopplung einzelner Chromophore innerhalb der E8 Oligomere ebenfalls das beobachtete Fluoreszenzspektrum erklären. Dies setzt die Existenz von gemischten E8 Oligomeren aus Proteinen mit nicht gereiftem und gereiftem Chromophor voraus, da bei den gewählten Konzentrationen eine FRET Wechselwirkung zwischen verschiedenen Tetrameren vernachlässigt werden kann. Dass trotzdem noch starke Fluoreszenz des ungereiften Chromophors beobachtet wird, kann in diesem Fall auf eine FRET Effizienz, deutlich unter 100%, oder auf die Existenz von Oligomeren ohne ein Protein mit gereiftem Chromophor als FRET Akzeptor, zurückgehen.

Der Vergleich des Absorptionsspektrums mit dem Fluoreszenzanregungsspektrum mit Detektion bei 595nm (Abbildung 4.23) zeigt, dass die Anregung des nicht ausgereiften Chromophors sich durchaus auf die Fluoreszenzintensität bei 595nm, nahe dem Maximum der Fluoreszenz des gereiften Chromophors, auswirkt. Dies ist ein Indiz für Energietransfer vom kurzwellig absorbierenden auf den langwellig fluoreszierenden Chromophor, jedoch muss bedacht werden, dass auch die Emission des grün

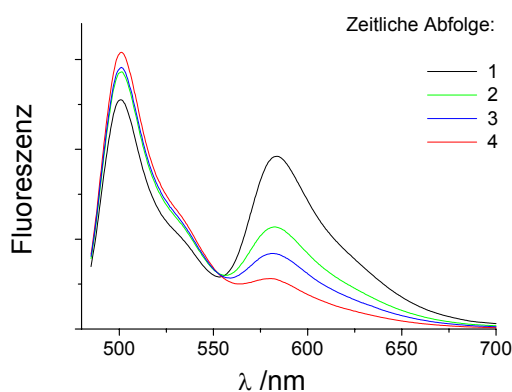
fluoreszierenden Chromophors noch eine gewisse Emission bei 595nm besitzt, die ins Anregungsspektrum eingeht.



**Abbildung 4.23: Absorptions- und Fluoreszenzanregungsspektrum**

Die Anregung des ungereiften Chromophors wirkt sich deutlich auf die für das Anregungsspektrum detektierte Fluoreszenz bei 595nm aus. Dies kann auf ein FRET System hinweisen, oder aber durch die, wenn auch geringe, Fluoreszenz des ungereiften Chromophors bei 595nm Wellenlänge bedingt sein.

Da E8 in der Literatur bisher unbeschrieben und zudem ein für die Einzelmolekülspektroskopie interessantes Protein ist, wurde an E8 ein Ensemble-Bleichexperiment durchgeführt, bei dem der ausgereifte, rot fluoreszierende Chromophor selektiv gebleicht wurde. Analog zum beschriebenen Bleichexperiment an DsRed (Kapitel 4.2.1) wurde das fokussierte Licht einer Halogen-Weißlichtquelle verwendet, wobei das Licht, welches die Probe traf, mittels eines Kantenfilters auf Wellenlängen oberhalb von 550nm beschränkt wurde. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass nur der rot fluoreszierende Chromophor angeregt wird.



**Abbildung 4.24: Selektives Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors**

Das Bestrahlen mit Licht längerwellig 550nm führt zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenz des gereiften Chromophors. Gleichzeitig wird eine Zunahme der Fluoreszenz mit Maximum bei 500nm beobachtet. Das beobachtete Verhalten deutet auf das Dequenching eines FRET Donors durch die Zerstörung des FRET Akzeptors hin.

Die Lösung wurde für einige Tage bestrahlt, währenddessen wurden von Zeit zu Zeit Fluoreszenzspektren und Absorptionsspektren aufgenommen. Die Fluoreszenzbande mit Maximum bei 583nm nimmt um ~70% der Ursprungsintensität ab, gleichzeitig steigt die Fluoreszenz bei 500nm um ~20% an.

Um zu überprüfen, ob die Zunahme der Fluoreszenz mit Maximum bei 500nm auf die Bildung eines Photoproduktes zurückzuführen ist, wurde auch die Entwicklung der Absorptionsspektren verfolgt. In den Absorptionsspektren wird das Bleichen des rot

fluoreszierenden Chromophors deutlich, während die Absorption des grün fluoreszierenden Chromophors bei 484nm fast unverändert bleibt.

Die Zunahme der grünen Fluoreszenz bei gleichzeitiger Konstanz der zugehörigen Absorption ist ein Hinweis auf das Vorliegen von FRET Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Chromophoren bei ungebleichtem E8. Die selektive Zerstörung des FRET Akzeptors führt zu einem Dequenching des FRET Donors, was als verstärkte Fluoreszenz bei 500nm beobachtet wird.

Über die FRET Effizienz kann keine Aussage gemacht werden, da das Anzahlverhältnis der Chromophore zueinander und die Fluoreszenzquantenausbeute des ungereiften Chromophors nicht bekannt sind.

### **4.2.5 Bekanntes Fluoreszenzverhalten einzelner DsRed Oligomere**

Die Anzahl der Arbeiten, die sich mit der Untersuchung der Fluoreszenz einzelner DsRed Oligomere beschäftigen, ist im Vergleich zu den Arbeiten zu Untersuchungen von Aequorea GFP Varianten auf Einzelmolekülebene gering. Wie auch bei den Aequorea GFP Varianten wurden zumeist Fluoreszenzintensitätstrajektorien gemessen. Ein großer Teil der Intensitätstrajektorien einzelner DsRed Oligomere zeigte schrittweises Bleichen der Fluoreszenz, was als weiterer Hinweis auf das Vorliegen von Tetrameren auch bei sehr hohen Verdünnungen gewertet wurde [30, 65, 70]. Interessanterweise wurden auch bei der Beobachtung der DsRed Oligomere Dunkelzeiten ohne detektierbare Fluoreszenz sowohl im Millisekunden- und Submillisekundenbereich [71, 72], als auch im Sekundenbereich [70], gefunden. Ein gleichzeitiger Wechsel aller vier Monomere innerhalb eines Tetramers in einen nicht fluoreszierenden Zustand ist unwahrscheinlich. Die Autoren erklären die beobachteten Dunkelzeiten durch Kopplung der Chromophore durch Energietransfer, so dass die Fluoreszenz immer vom energetisch niedrigsten Chromophor ausgeht. Wechselt dieser in einen nicht fluoreszierenden Zustand, solange er weiterhin Energie von den anderen Chromophoren akzeptieren kann, so wird keine Fluoreszenz mehr beobachtet. Daneben kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei oligomer vorliegendem DsRed in einigen Fällen nur ein einzelner Chromophor beobachtet wird, entweder weil nur ein einziges Protein eines Oligomers einen fluoreszierenden Chromophor enthält, oder weil ein Monomer spektroskopiert wird.



In einer einzigen Publikation wird von der spektral aufgelösten Untersuchung der Fluoreszenz einzelner DsRed Oligomere berichtet [30], wobei jedoch keine Spektrenserien aufgenommen wurden, so dass Fluoreszenzdynamik nicht detektiert wurde. Cotlet et al. zeigen, dass die Emissionsspektren einzelner DsRed Oligomere drei spektral unterschiedlichen Formen zugeordnet werden können, und dass bei der Spektroskopie einzelner DsRed Oligomere fast ausschließlich Fluoreszenz einer „super roten“ Form beobachtet wird, deren Fluoreszenzmaximum um etwa 10nm bathochrom zum Ensemblespektrum verschoben ist. Sie folgern, dass sich diese Form durch eine Photokonversion aus der Form mit Fluoreszenzmaximum bei 584nm bildet. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass sich in einer DsRed Lösung die Fluoreszenz durch intensive Bestrahlung bathochrom verschiebt [70, 71].

## 5 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen auf Einzelmolekülebene

Im Gegensatz zu in Polymeren eingebetteten einzelnen fluoreszierenden Molekülen ist die unmittelbare Chromophorumgebung bei fluoreszierenden Proteinen nicht zufällig, sondern durch die den Chromophor umschließenden Proteinketten vorgegeben. Außerdem ist bei allen bekannten fluoreszierenden Proteinen die Einbettung des Chromophors Voraussetzung für die Beobachtung von Fluoreszenz, denaturierte Proteine zeigen keine Fluoreszenz [52]. Wenn nur gefaltete Proteine Fluoreszenz zeigen, und aufgrund der Lage des Chromophors innerhalb des Proteins ohne Kontakt zum Lösungsmittel außerhalb des Proteins die Chromophorumgebung hochspezifisch ist, so erscheint es zunächst unwahrscheinlich, dass deutliche Variationen der Fluoreszenz auftreten. Wenn jedoch Unterschiede in der Fluoreszenz einzelner Proteine festgestellt werden, müssen diese intrinsische Ursachen haben und z.B. durch strukturelle Fluktuationen des Proteins bedingt sein.

Die bisherigen Untersuchungen an einzelnen fluoreszierenden Proteinen geben bereits Hinweise darauf, dass die fluoreszierenden Proteine keine starren Systeme sind, so wurden z.B. eine Anzahl unterschiedlicher nicht fluoreszierender Zustände gefunden [24-26, 61]. Die Tatsache, dass die Proteine der Aequorea GFP Klassen 1-4 alle auf den gleichen Chromophor zurückgehen, obwohl sie sich teilweise deutlich in ihrer Fluoreszenz unterscheiden, deutet darauf hin, dass bei der Untersuchung einzelner fluoreszierender Proteine Fluktuationen der Fluoreszenz zu beobachten sind. Die Unterschiede in der Fluoreszenz beruhen bei den Varianten des Typs 1-4 einzig auf der Veränderung der Ladung des Chromophors und auf Veränderungen in der Chromophorumgebung, wobei Änderungen praktisch aller photophysikalischer Parameter beobachtet werden, z.B. der Quantenausbeuten, Lagen der Spektren, Stokes-Shift, Lebensdauern, Fluoreszenz Sättigungsintensitäten, Effizienz des Photobleichens, [28, 47, 73] usw.

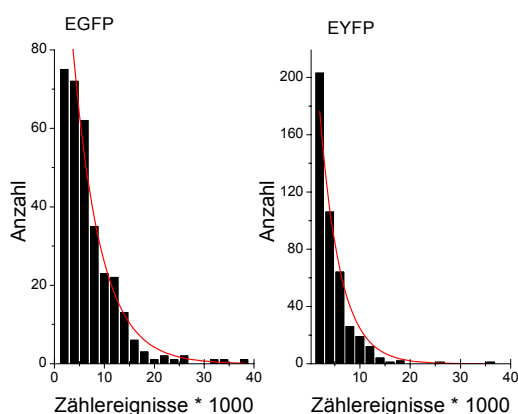
Im Folgenden sollen Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen einzelnen Proteinen und Veränderungen der Fluoreszenz einzelner Proteine gezeigt und charakterisiert werden.

## 5.1 Einzelmolekül Fluoreszenzspektroskopie an EYFP und EGFP

### 5.1.1 Quantenausbeuten des Photobleichens von EYFP und EGFP

Eine wichtige Größe bei der Beobachtung einzelner Moleküle ist die Anzahl von Fluoreszenzphotonen, die ein Molekül abgeben kann, bevor Photobleichen eintritt. Je mehr Photonen ein System aussendet, bevor es zerstört wird, desto besser lässt es sich mit Methoden der Einzelmolekülspektroskopie untersuchen. Die Quantenausbeute des Photobleichens ist die Wahrscheinlichkeit, dass nach Absorption eines Photons Bleichen auftritt und ist damit ein Maß für die Photostabilität eines Chromophors.

Um die Anzahl von Fluoreszenzphotonen pro fluoreszierendem Protein zu bestimmen, wurden Spektrenserien von 320 einzelnen EGFPs, bzw. 439 einzelnen EYFPs ausgewertet. Hierzu wurde die Summe der von der CCD-Kamera detektierten Zählereignisse (counts) pro Protein gebildet und mit einer Klassengröße von 2000 counts in ein Histogramm eingetragen. Anschließend wurde ein einfacher exponentieller Abfall an die erhaltenen Daten angepasst, woraus sich die mittlere Anzahl Zählereignisse pro Protein aus der Abklingkonstante der Funktion ergibt.



**Abbildung 5.25: Verteilung der Summe der detektierten Zählereignisse pro fluoreszierendem Protein**

Die Anpassung eines einfachen exponentiellen Abfalls an die Verteilungen zeigt, dass pro EGFP im Mittel 5500 Zählereignisse, und für EYFP 4100 Zählereignisse detektiert wurden. Unter Berücksichtigung der Fluoreszenzquantenausbeuten der Proteine und der Detektionseffizienz der Apparatur ergeben sich daraus Quantenausbeuten des Photobleichens von  $2,1 \cdot 10^{-6}$  für EGFP und  $2,8 \cdot 10^{-6}$  für EYFP.

Da laut Herstellerangabe der CCD Kamera jeweils 3 detektierte Photonen zu einem Zählereignis umgesetzt werden, ergeben sich für EGFP 16500 detektierte

Photonen pro Molekül und für EYFP 12300 detektierte Photonen pro Molekül. Zusammen mit der abgeschätzten Detektionseffizienz des gesamten Aufbaus von ~6% [49] und den Fluoreszenzquantenausbeuten der Proteine ergeben sich damit Quantenausbeuten des Photobleichens von  $2,1 \cdot 10^{-6}$  für EGFP und  $2,8 \cdot 10^{-6}$  für EYFP.

In der Literatur angegebene Quantenausbeuten des Photobleichens für die fluoreszierenden Proteine schwanken stark. So geben Baird et al. [42] die Quantenausbeuten des Photobleichens mit  $3 \cdot 10^{-6}$  für EGFP und  $5 \cdot 10^{-5}$  für EYFP an, wobei die Werte im Ensemble ermittelt wurden. Im Einzelmolekülexperiment ermittelte Werte sind  $8 \cdot 10^{-6}$  [26] und  $6,9 \cdot 10^{-5}$  [28] für EGFP und  $5,5 \cdot 10^{-5}$  [28] für EYFP. Insgesamt fällt jedoch auf, dass die von Harms et al. in [28] gemachten Angaben für alle Proteine, auch für DsRed, im Vergleich zu anderen Literaturangaben sehr groß sind. Ein Grund hierfür könnte die von Harms et al. gewählte Präparation der Proteine in Polyacrylamid sein, bei der die Lösung mit zugegebenen Proteinen polymerisiert wird. Eigene Versuche, fluoreszierende Proteine auf diese Weise in einen Film einzubetten, zeigten, dass nur wenige Proteine nach abgeschlossener Polymerisierung des Polyacrylamids noch Fluoreszenz zeigten.

Die Übereinstimmung der hier ermittelten Werte mit den Literaturangaben außer von Harms et al. ist für EGFP recht gut, der für EYFP ermittelte Wert ist deutlich kleiner als in der Literatur angegeben. Eine mögliche Fehlerquelle, die die Abweichungen erklären kann, ist die lange Integrationszeit von einer Sekunde pro Spektrum. Zum anderen können die Ergebnisse dadurch verfälscht werden, dass gerade sehr schnell bleichende Proteine in der Auswertung unberücksichtigt bleiben, weil kein auswertbares Fluoreszenzspektrum erhalten wurde.

## 5.1.2 EYFP - Verteilung der Einzelmolekülfluoreszenz

### Maximumlagen und Identifizierung von Subensembles

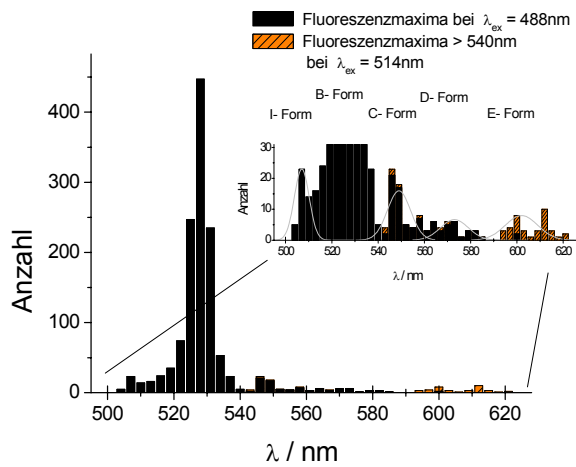
In den Untersuchungen von Creemers et al. [59] konnten die Subensembles der A-, I- und B-Form von EYFP nur bei tiefen Temperaturen und als Mischspektren zusammen mit den jeweils langwelliger fluoreszierenden anderen Formen nachgewiesen werden. Creemers et al. konnten weiterhin zeigen, dass die A- und B-Form via der I-Form über die angeregten Zustände bei tiefen Temperaturen ineinander übergehen können. Da nichts über die Höhe der Grundzustandsenergiebarrieren bekannt ist, ist die Frage offen, ob sich die I-Form bei Raumtemperatur schnell in eine der anderen Formen umwandelt, oder ob diese Form stabil genug ist, um bei der Spektroskopie bei Raumtemperatur relevant zu sein.

Mit Hilfe spektral aufgelöster Einzelmolekülspektroskopie ist es möglich, verschiedene im Ensemblespektrum nur schwer zugängliche Subensembles zu identifizieren und isolierte Fluoreszenzspektren einzelner das Subensemble aufbauender Moleküle zu erhalten [31] [21]. Mit Hilfe der spektral aufgelösten Einzelmolekülspektroskopie sollte deshalb die Frage beantwortet werden, ob die EYFP I-Form bei Raumtemperatur nachgewiesen werden kann. Die Analyse der Einzelmolekülspektren bietet darüber hinaus Zugang zu Erkenntnissen über die Verteilung verschiedener spektraler Parameter, die in der Ensemblespektroskopie nicht erhalten werden können.

Da es nicht möglich ist, mit einer einzigen Wellenlänge alle drei Formen von EYFP effizient anzuregen, wurde in einem ersten Experiment Licht der Wellenlänge 488nm verwendet. Mit dieser Wellenlänge werden sowohl die I- als auch die B-Form von EYFP angeregt, nicht jedoch die A-Form, von der ohnehin keine messbare Fluoreszenz zu erwarten ist.

Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm wurden 400 einzelne EYFP Moleküle untersucht, wobei 1288 Einzelmolekülspektren erhalten wurden.

Zur Bestimmung der Maximalagen und –intensitäten wurde an jedes erhaltene Spektrum eine doppelte Gaussverteilung angepasst. Die erhaltenen Maximalagen der Fluoreszenz wurden mit einer Klassengröße von 3nm in einem Histogramm zusammengestellt und sind in Abbildung 5.26 dargestellt, wobei die ermittelten Anzahlen bei Anregung mit 488nm schwarz dargestellt sind.



**Abbildung 5.26: Histogramm der Maximumlagen der Fluoreszenz für EYFP**

Fluoreszenzmaxima, die bei Anregung mit  $\lambda_{\text{ex}} = 488\text{nm}$  beobachtet wurden, sind schwarz aufgetragen, bei  $\lambda_{\text{ex}} = 514\text{nm}$  wurden nur Spektren mit Maximum bathochrom zu  $540\text{nm}$  berücksichtigt und in orange aufgetragen.

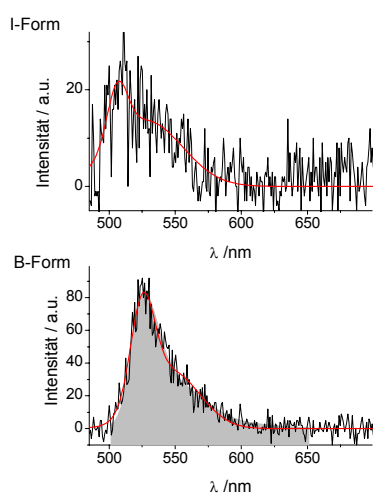
Im Inset sind die angenommenen Verteilungen verschiedener Formen zur Verdeutlichung als Gaußverteilungen eingezeichnet.

Die gewählte Klassengröße beträgt  $3\text{nm}$ .

Zunächst soll hier auf die Spektren mit Maximum hypsochrom zu  $540\text{nm}$  eingegangen werden, bevor auf die Spektren mit Maximum bathochrom zu  $540\text{nm}$  eingegangen wird (Kapitel 5.1.2.2).

### 5.1.2.1 Die I-Form und B-Form von EYFP

Die bei weitem meisten Maxima sind nur einige nm um 528nm gestreut zu finden. Dies entspricht der Erwartung und stimmt mit der Lage der EYFP Fluoreszenz im Ensemble sehr gut überein. Die Spektren mit Lage des Fluoreszenzmaximums innerhalb der Verteilung um 528nm stammen von Proteinen in der vorherrschenden B-Form. Das zweite Spektrum in Abbildung 5.27 ist ein typisches B-Form Spektrum mit Maximum bei 527nm.



**Abbildung 5.27 Einzelmolekülspektren der I- und B- Form von EYFP**

Im Einzelmolekülexperiment ist es möglich, die seltenen I-Form Spektren ohne Überlagerung durch B-Form Spektren zu beobachten (oben). Unten: Typisches B-Form Spektrum, im Hintergrund grau unterlegt das Ensemble-Fluoreszenzspektrum.

Die Häufung von Maximumlagen unter 510nm (Abbildung 5.26, Inset) zeigt die Existenz eines Subensembles aus EYFP in der I-Form und bestätigt das Vorkommen dieser spektralen Form auch bei Raumtemperatur. In Ensemblemessungen ist das Spektrum dieser Form nicht sichtbar, da die Fluoreszenz der vorherrschenden B-Form das Fluoreszenzspektrum dominiert. Ein typisches Einzelmolekülspektrum eines isolierten EYFP in I-Form ist in Abbildung 5.27 gezeigt. Das Fluoreszenzmaximum dieses Spektrums liegt bei 507nm und entspricht damit genau dem von Creemers et al. bestimmten Wert der maximalen I-Form Fluoreszenz des EYFP bei kryogenen Temperaturen. Die sehr gute Übereinstimmung der Maximumlagen bei den unterschiedlichen Temperaturen und bei unterschiedlichsten Einbettungen, so verwendeten Creemers et al. z.B. eine Lösung mit 50% Glycerol, bestätigen, dass die Umgebung der Chromophore in fluoreszierenden Proteinen allein durch den Proteinzyylinder gegeben ist, weshalb keinerlei Solvatochromie beobachtet werden kann.

### 5.1.2.2 Langwellig fluoreszierende Formen von EYFP

Die beobachteten deutlich rotverschobenen Spektren jenseits von 540nm sind nicht einer der bekannten spektralen Formen von EYFP zuzuordnen.

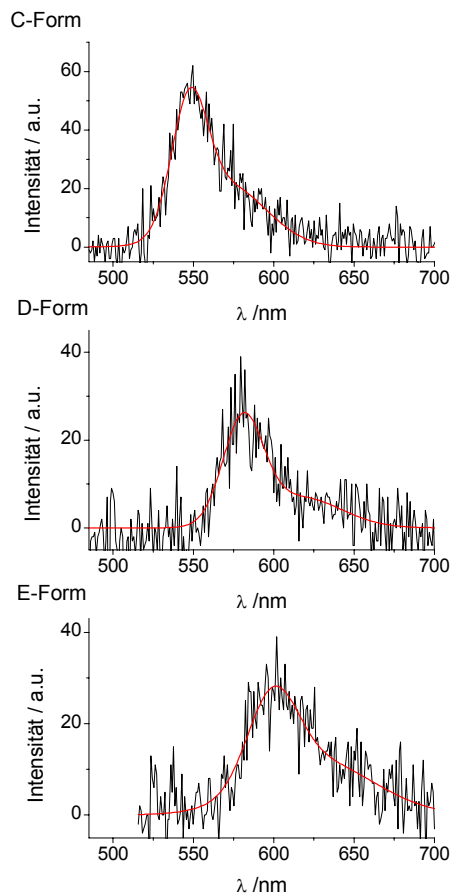
Um die Anzahl an Spektrenserien, auf denen diese rotverschobene Emission von EYFP zu sehen war, zu erhöhen, wurden weitere Einzelmolekülexperimente durchgeführt, wobei statt der Anregung bei 488nm Licht der Wellenlänge 514nm zur Anregung von EYFP verwendet wurde, da angenommen werden konnte, dass die stark langwellig verschobenen Formen so effizienter angeregt werden. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 514nm wurden 270 einzelne EYFP Proteine untersucht, wobei 957 Einzelmolekülspektren erhalten wurden. Spektren, die bei dieser Untersuchung gefunden wurden und ein Emissionsmaximum bathochrom zu 535nm hatten, wurden zum Histogramm in Abbildung 5.26 hinzugefügt.

Insgesamt wurden 43 einzelne EYFPs mit Fluoreszenzspektren mit Maximum längerwellig als 540nm beobachtet. Dies entspricht ca. 6% der untersuchten einzelnen EYFPs. Im Histogramm der Maximumlagen der Fluoreszenz (Abbildung 5.26, Inset) können verschiedene Häufungen ausgemacht werden, die auf die Existenz von sich in ihrer Fluoreszenz unterscheidenden Formen hinweisen. Die Häufungen sind wenig deutlich ausgeprägt, was hauptsächlich auf die relativ geringe Anzahl einzelner langwellig fluoreszierender Emitter zurückzuführen ist. Bei einer geringen Anzahl von Emittlern, die zu einer spektralen Form gehören, kann es zu einer Überrepräsentation der photostabilen Emitter gegenüber den schnell bleichenden Emittlern kommen, was dazu führt, dass die Verteilungen nicht mehr die charakteristische Form der Normalverteilung zeigen. Außerdem kann außergewöhnlich starke spektrale Diffusion bei den langwelligen Formen beobachtet werden (vgl. 5.1.6), was zeigt, dass die spektrale Verteilung innerhalb einer Form tatsächlich groß ist.

Berücksichtigt man diese Faktoren, können drei rotverschobene EYFP Formen identifiziert werden. Die Formen werden willkürlich wie folgt benannt: C-Form mit Emissionsmaximum um 550nm, die D-Form mit Emissionsmaximum um 575nm und schließlich die E- Form mit Emissionsmaximum um 600nm. Die Verteilungen der Maximumpositionen für die einzelnen Formen sind in Abbildung 5.26, Inset eingezeichnet. Die eingezeichneten Verteilungen sind als bloße Verdeutlichungen zu verstehen, deren genaue Werte für die wahrscheinlichsten Lagen und Standardabweichungen der Verteilungen der Emissionsmaxima der einzelnen Formen sich nach einer detaillierteren Untersuchung der langwelligen EYFP



Formen durchaus noch verändern können. Typische Beispielspektren für die langwelligen Formen sind in Abbildung 5.28 gezeigt.



**Abbildung 5.28: Beispielspektren für die langwelligen Formen von EYFP**

Oben: C-Form, Emissionsmaximum um 550nm

Mitte: D-Form, Emissionsmaximum um 575nm

Unten: E-Form, Emissionsmaximum um 600nm. Anregungswellenlänge war hier 514nm, was die Begrenzung auf der kurzwelligen Seite des Spektrums erklärt.

### 5.1.2.3 Anzahlen der Proteine, die Fluoreszenz der seltenen Formen zeigen

Insgesamt wird bei rund 9% der EYFP Proteine von der vorherrschenden B-Form abweichende Fluoreszenz beobachtet.

**Tabelle 1: Anzahl der Proteine, die Fluoreszenz der seltenen spektralen Formen von EYFP zeigen**

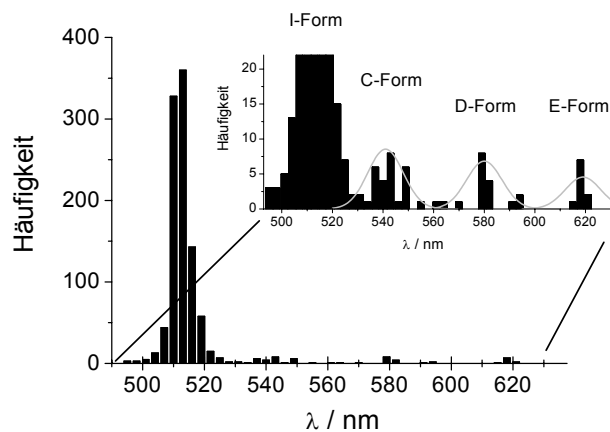
	Gesamt	
	Absolut	%
I-Form	12	3.0*
C-Form	15	2.2
D-Form	19	2.8
E-Form	9	1.3

\* nur die 400 einzelnen Proteine berücksichtigt, die mit 488nm angeregt wurden

### 5.1.3 EGFP- Verteilung der Einzelmolekülfluoreszenz

#### Maximumlagen und Identifizierung von Subensembles

Alle Einzelmolekülexperimente wurden mit Anregungslicht der Wellenlänge 488nm durchgeführt. Insgesamt wurden 294 einzelne EGFP Proteine untersucht, von denen 1098 Einzelmolekülspektren erhalten wurden. Die erhaltenen Spektren wurden wie die EYFP Spektren analysiert, d.h. zunächst wurde eine doppelte Gaussverteilung in jedes Spektrum angepasst. Die Maximumpositionen aller Emissionsspektren wurden zu einem Histogramm mit einer Klassengröße von 3nm zusammengestellt (Abbildung 5.29).



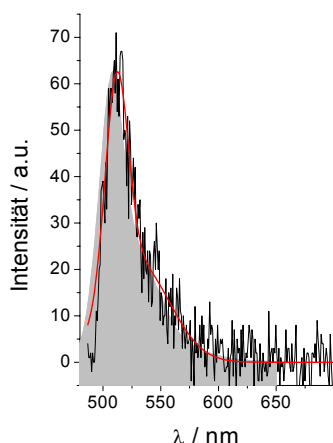
**Abbildung 5.29: Verteilung der EGFP Emissionsmaximumlagen**

Die bei weitem meisten Maxima sind eng um 512nm verteilt. Auch an den spektralen Positionen der schon für EYFP gefundenen langwelligen Spektren können Häufungen erkannt werden (auch Inset).

Die gewählte Klassengröße ist 3nm.

Fast alle beobachteten Lagen des EGFP Emissionsmaximums sind in einem Bereich von wenigen Nanometern um 512nm verteilt. Das häufigste Vorkommen des Fluoreszenzmaximums bei 512nm entspricht sehr gut dem Wert, den man vom Ensemblespektrum her erwartet (Vgl. Kapitel 4.2.1).

Die Fluoreszenz mit Maximum um 512nm hat ihre Ursache in der I-Form des EGFP, welche die bevorzugt besetzte Form bei EGFP ist [59]. Ein typisches Einzelmolekülspektrum der EGFP I-Form mit Maximum bei 512nm ist in Abbildung 5.30 gezeigt.



**Abbildung 5.30: EGFP Einzelmolekülspektrum**

Typisches Einzelmolekül I-Form Spektrum von EGFP. Im Hintergrund ist grau das EGFP Ensemblespektrum aufgetragen. Die Maximumlagen des Einzelmolekülspektrums und des Ensemblespektrums fallen zusammen.

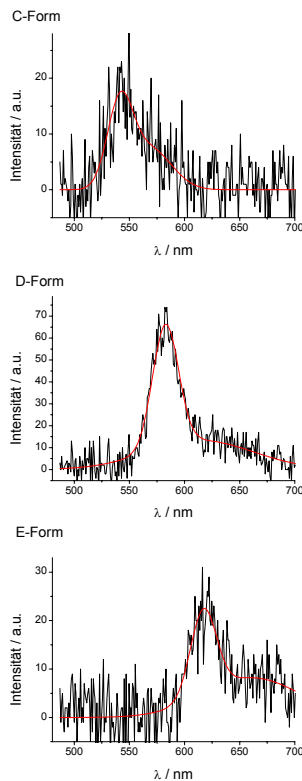
Erwartungsgemäß sind keine Hinweise auf A- oder B-Form Fluoreszenz vorhanden, da diese Formen im Vergleich zur I-Form hypsochrom verschoben sind und damit mit der verwendeten Anregungswellenlänge nicht mehr angeregt werden konnten.

### 5.1.3.1 Die langwelligen Formen bei EGFP

Analog zu der Verteilung der Maximumlagen bei EYFP werden auch bei EGFP deutlich langwellig verschobene Emissionsspektren beobachtet (vgl. Abbildung 5.29, auch Inset).

Auch bei EGFP sind die genauen Lagen der Verteilungen der Fluoreszenzmaxima der einzelnen Formen nur schwer zu bestimmen. Die Gründe hierfür sind wie bei EYFP hauptsächlich in der geringen Zahl an EGFPs mit langwelliger Fluoreszenz zu suchen. Deutlich wird jedoch, dass auch bei EGFP, analog zu EYFP, drei langwellige spektrale Formen beobachtet werden können. Die Maximumlagen der Emission dieser Formen liegen um 540nm, 580nm und 620nm. Die drei Formen werden analog zu den bei EYFP gefundenen Formen von der kurzwelligen zur langwelligen Form als C-Form mit Maximum um 540nm, als D-Form mit Maximum um 580nm und E-Form mit Maximum

um 620nm bezeichnet. Typische Einzelmolekülspektren für die C-, D-, und E-Form sind in Abbildung 5.31 abgebildet.



**Abbildung 5.31: Bathochrome Formen von EGFP**

Beispielspektren der C-, D- und E-Formen von EGFP. Oben: C-Form Spektrum mit Fluoreszenzmaximum um 540nm  
Mitte: D-Form Spektrum mit Fluoreszenzmaximum um 580nm  
Unten: E-Form Spektrum mit Fluoreszenzmaximum um 620nm

Wenn die EGFP und EYFP C-, D- und E-Formen jeweils den gleichen molekularen Ursprung haben, so würde man erwarten, dass auch bei den bathochromen EYFP Formen die  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Tyrosin an der Stelle 203 zu einer Rotverschiebung der Fluoreszenz führen. Dies ist nach den bisher vorliegenden Ergebnissen nicht erkennbar, entweder weil unterschiedliche Strukturen den spektroskopisch analogen Formen zugrunde liegen, oder weil die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen bei den bathochromen Formen aufgehoben sind. Möglich ist außerdem, dass die spektralen Lagen der Formen bisher durch statistische Ungenauigkeiten wegen zu kleiner Kohorten nicht genau bestimmt sind.

### 5.1.3.2 Anzahlen der Proteine, die Fluoreszenz der seltenen Formen zeigen

Insgesamt ergibt sich für EGFP ein Anteil von rund 7% an Proteinen, bei denen langwellig verschobene Fluoreszenz beobachtet wurde, die von der Fluoreszenz der vorherrschenden I-Form deutlich abweicht.

**Tabelle 2: Anzahl der Proteine, die Fluoreszenz der bathochrom verschobenen spektralen Formen von EGFP zeigen**

	Gesamt	
	Absolut	%
C-Form	14	4,8
D-Form	3	1,0
E-Form	3	1,0

### **5.1.4 Einzelmolekül-Fluoreszenzdynamik**

Neben der Identifizierung von Subensembles anhand der Verteilung der Emissionsmaximumlagen war es auch möglich, durch den Vergleich aufeinander folgender Emissionsspektren einzelner Proteine sowohl übergangsartige als auch diffusionsartige Veränderungen der Fluoreszenz zu unterscheiden. Im folgenden werden zunächst die übergangsartigen Veränderungen der Fluoreszenz beim Übergang eines Proteins von einer emittierenden Form in eine andere emittierende Form diskutiert.

#### **5.1.4.1 Umwandlungen der EYFP Formen ineinander**

Neben Spektrenserien, die während der gesamten Beobachtungszeit die Fluoreszenz einer einzigen Form des Proteins zeigten, wurden auch solche Spektrenserien aufgenommen, bei denen die Fluoreszenz von zwei unterschiedlichen Formen zu sehen war. Grundsätzlich kann bei der Spektroskopie auf Einzelmolekülebene die Beobachtung der Fluoreszenz zweier verschiedener Formen innerhalb einer Spektrenserie auf zwei verschiedene Phänomene zurückgeführt werden. Dies ist zum einen die Umwandlung eines Proteins von einer Form in eine spektroskopisch unterschiedliche Form, zum anderen die gleichzeitige Beobachtung zweier Proteine in unterschiedlichen Formen. In letzter Konsequenz ist bei den hier durchgeführten Untersuchungen nicht zwischen diesen zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, jedoch gibt es Hinweise, die es zu beachten gilt.

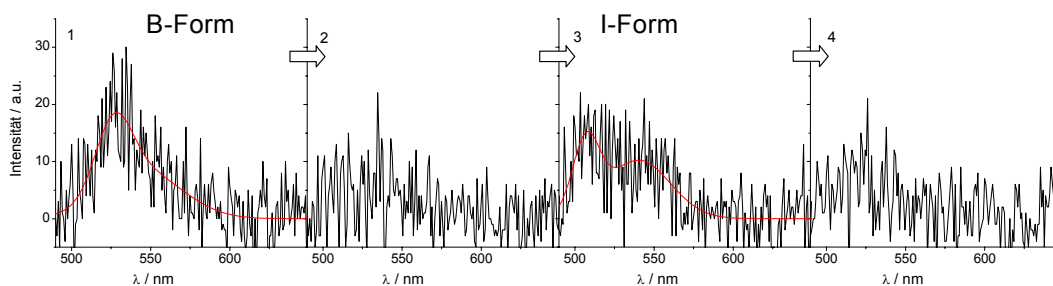
Bei der Präparation der Proben wurde sorgfältig darauf geachtet, dass der mittlere Abstand zwischen zwei benachbarten Proteinen in der präparierten Probe groß ist. Weiterhin wurden bei der spektralen Untersuchung nur solche Fluoreszenzsignale näher untersucht, die ein für einen einzelnen Emitter typisches Profil im Intensitätsbild der Probe zeigten. Zwei Proteine, die gleichzeitig spektroskopiert wurden, müssten demnach nur einige wenige Nanometer voneinander entfernt liegen, was denkbar ist und sicher auch vorkommt. Dass in diesem Fall jedoch eines der Proteine in einer der seltenen spektroskopischen Formen vorliegt und unter Umständen dann noch aus einem nicht fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand wechselt, ist sehr unwahrscheinlich und erklärt nicht die beobachteten zahlreichen Wechsel in der beobachteten spektralen Form.

Die zweite und deutlich plausiblere Erklärung der beobachteten Wechsel der spektralen Erscheinung einzelner fluoreszierender Proteine ist, dass es sich um Übergänge von einer Form in eine andere handelt, was als Veränderung der Emission beobachtet wird.

Die Umwandlung zwischen zwei spektral unterschiedlichen Formen kann zwei Erscheinungsarten innerhalb der detektierten Spektrenserie zeigen. Zum einen ist dies das offensichtliche zeitlich aufeinander folgende Auftreten der Formen in verschiedenen Spektren der Serie, wie z.B. in der Spektrenserie in Abbildung 5.33. Zum anderen ist es auch möglich, dass die Spektren der verschiedenen Formen innerhalb eines Spektrums einer Serie zu sehen sind. Solch überlagerte Spektren entstehen dadurch, dass innerhalb eines Integrationszeitraumes die Umwandlung stattfindet. Das beobachtete Spektrum erscheint deshalb als Überlagerung der zwei tatsächlich zeitlich getrennten spektralen Formen (z.B. Abbildung 5.35).

### 5.1.4.2 Umwandlungen zwischen B-Form und I-Form

Bei der Beobachtung einzelner EYFPs, die mit Licht der Wellenlänge 488nm angeregt wurden, zeigten 12 Proteine typische I-Form Fluoreszenz, von denen 7 einen spektralen Übergang vom oder zum B-Form Spektrum aufwiesen. In Abbildung 5.32 ist eine Spektrenserie gezeigt, bei der die Umwandlung von der EYFP B-Form in die I-Form anhand der typischen Emissionsspektren zu beobachten ist. Spektrum 1 zeigt ein typisches B-Form Spektrum mit Maximum bei 528nm, worauf während der zweiten Integrationszeit (2) eine Dunkelzeit ohne messbare Emission des EYFP folgt. Spektrum 3 ist ein I-Form Spektrum mit Fluoreszenzmaximum bei 508nm, schließlich kommt es zum irreversiblen Bleichen des Chromophors (4). Sowohl B-Form als auch I-Form Spektrum sind typische Spektren, deren Maximumlagen sehr genau mit den im Tieftemperatur-Ensembleexperiment ermittelten Werten übereinstimmen [59].



**Abbildung 5.32: Übergang von der B-Form in die I-Form in EYFP**

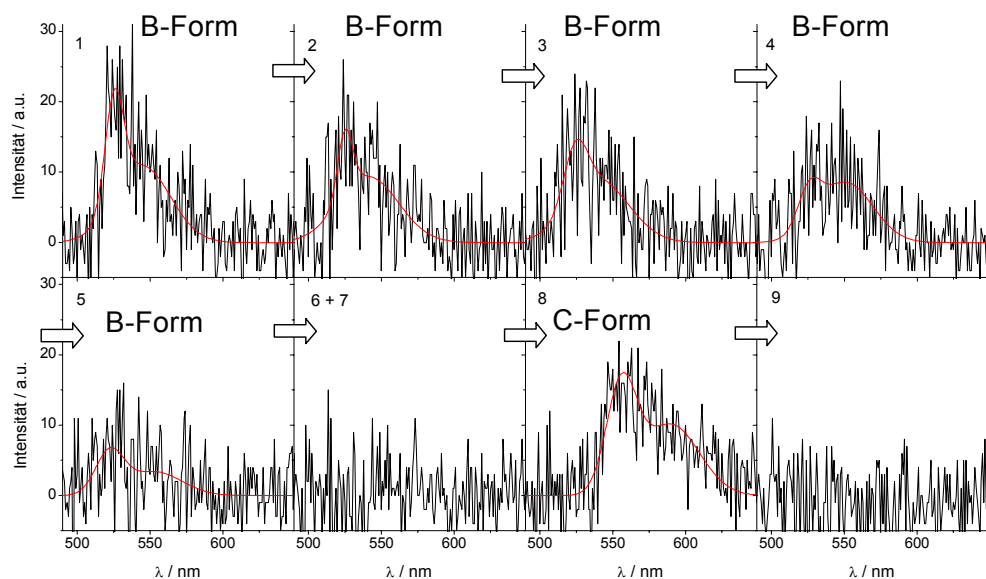
Der typischen B-Form Fluoreszenz folgt eine Dunkelzeit von ca. einer Sekunde, bevor I-Form Fluoreszenz zu beobachten ist. Schließlich bleicht der Chromophor, es kann keine weitere Emission mehr beobachtet werden (4).

Für *Aequorea* GFP wird angenommen, dass der strukturelle Unterschied zwischen B-Form und I-Form primär darin liegt, dass durch Rotation des Aminosäurerestes von Thr-203 einmal die Hydroxylgruppe des Threonins auf den Chromophor und einmal vom Chromophor wegzeigt [60, 74]. Für EYFP kann dies nicht zutreffen, da gerade die Aminosäure an der Stelle 203 ersetzt wurde, um durch „ $\pi$ -Stacking“ die spektralen Eigenschaften zu beeinflussen. Interessant ist in diesem Fall, dass die spektrale Lage der EYFP I-Form sehr gut der der EGFP I-Form entspricht, welche die Fluoreszenz des Chromophors ohne „ $\pi$ -Stacking“ zeigt. Es kann deshalb vermutet werden, dass sich die EYFP B-Form und die I-Form dadurch unterscheiden, dass die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Rest des Tyr-203 und dem chromophoren  $\pi$ -System aus z.B. sterischen Gründen aufgehoben sind.



### 5.1.4.2.1 Umwandlungen zwischen B-Form und den langwelligeren Formen

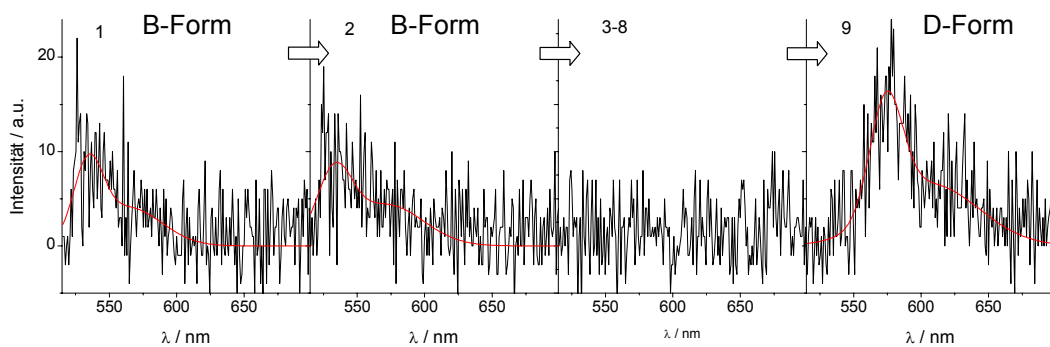
Außer den Umwandlungen zwischen B-Form und I-Form konnten verschiedene Umwandlungen zwischen der B-Form und den rotverschobenen fluoreszierenden Formen beobachtet werden. Während der gesamten Untersuchung mit beiden Anregungswellenlängen wurden 15 einzelne EYFPs gefunden, die ein C-Form Spektrum zeigten, von denen 5 einen Übergang vom, bzw. zum B-Form Spektrum zeigten. In Abbildung 5.33 ist eine komplette Spektrenserie, die einen solchen spektralen Sprung zeigt, dargestellt. Während der ersten fünf Sekunden (1-5) ist B-Form Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 527nm sichtbar. Obwohl die Spektren sich deutlich in Form und Intensität unterscheiden, ist nur sehr geringe spektrale Diffusion der Maximumlage von  $\pm 1\text{nm}$  zu beobachten. Anschließend folgen zwei Integrationsintervalle ohne messbare Fluoreszenz (6+7), was einer Dunkelzeit von wenigstens zwei Sekunden entspricht. Schließlich erscheint in Spektrum 8 das C-Form Spektrum mit Emissionsmaximum bei 556nm. Ab Spektrum 9 ist keine Fluoreszenz mehr zu beobachten.



**Abbildung 5.33: Übergang von der B-Form in die C-Form**

Während der ersten 5 Spektren ist B-Form Fluoreszenz mit Maximum recht stabil bei 527nm zu beobachten. Es folgt eine Dunkelzeit von ca. 2 Sekunden, bevor das typische C-Form Spektrum erscheint, dessen Emissionsmaximum bei 556nm liegt.

Insgesamt wurden 19 einzelne EYFPs gefunden, die D-Form Fluoreszenz mit Maximumlagen um 575nm zeigten. Von diesen zeigten 9 eine Veränderung von, bzw. zur B-Form. Das in Abbildung 5.34 gezeigte Beispiel zeigt zunächst den Übergang vom B-Form Spektrum (1 und 2) in einen ca. 6 Sekunden dauernden Dunkelzustand (3-6), bevor schließlich während des neunten Beobachtungsintervalls von jeweils einer Sekunde D-Form Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von 575nm sichtbar wird (9).



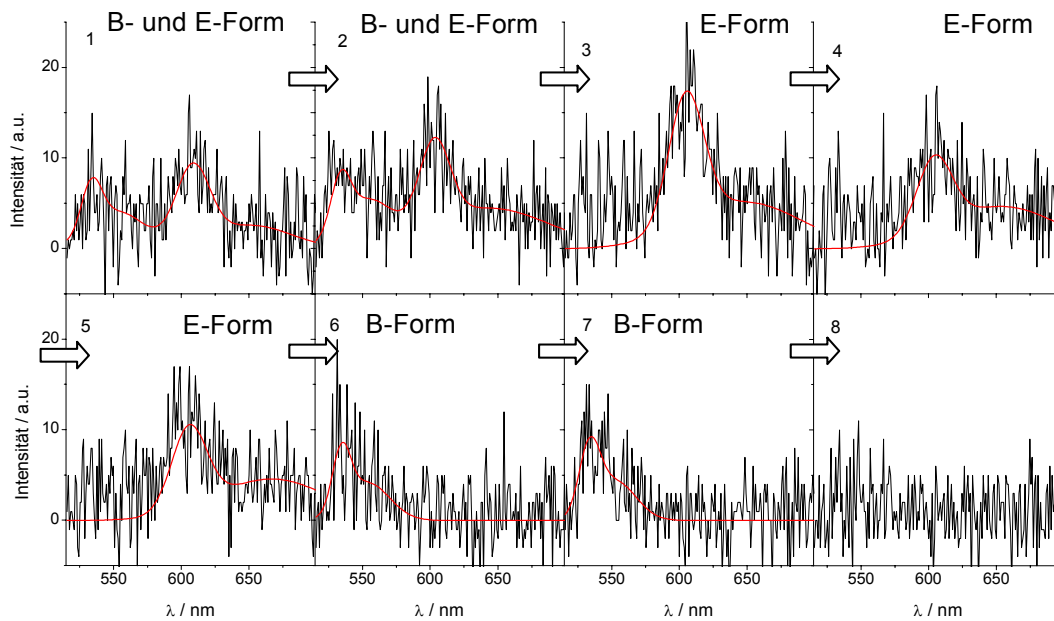
**Abbildung 5.34: Übergang von der B-Form in die D-Form**

Den zwei B-Form Spektren folgt eine sehr lange Dunkelzeit von ca. 6 Sekunden, bevor das D-Form Spektrum erscheint.

Die B-Form Spektren, die während der ersten zwei Beobachtungsintervalle sichtbar sind, scheinen ihr Maximum bei 535nm zu haben. Dies ist auf den verwendeten holografischen optischen Filter zur Absorption des Lichtes der Anregungswellenlänge zurückzuführen. Fluoreszenz hypsochrom zu ca. 525nm wird durch den verwendeten Filter abgeschwächt, und zwar umso stärker, je geringer die Differenz zur Zentralwellenlänge des Filters von 514nm ist. Dies führt im hier gezeigten Fall zur Abschwächung der Spektren auf der kurzwelligen Seite, was bei hypsochrom verschobenen Spektren leicht zu einer scheinbaren Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums führt. Im hier vorliegenden Fall spielt dies keine Rolle, da die Spektren eindeutig als B-Form Spektren zu erkennen sind. In jeder Art von Auswertung, bei der die genaue Lage, Form, etc. der Spektren eine Rolle spielt, können solche auf der kurzwelligen Seite verfälschten Spektren jedoch nicht verwendet werden.

E- Form Spektren wurden bei 9 einzelnen EYFPs beobachtet, von denen 7 einen Übergang zum, bzw. vom B-Form Spektrum zeigten. Entgegen den gezeigten Beispielen für die Umwandlungen zur C-Form und auch zur D-Form, die jeweils deutliche Dunkelzeiten vor dem Erscheinen der neuen spektralen Form aufwiesen, sind solche Dunkelzeiten im hier gewählten Beispiel des Übergangs zum E-Form Spektrum nicht zu sehen (Abbildung 5.35). Auffällig ist in diesem Beispiel zunächst das Doppelspektrum aus B-Form und E-Form, welches während der ersten zwei Integrationszeiträume (1 und 2) gemessen wird. Für diese Spektren gilt analog, was bereits oben für überlagerte Spektren diskutiert wurde (vgl. 5.1.4.1), nämlich dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass in einzelnen Fällen zwei statt ein Emitter gleichzeitig beobachtet wird, wobei dies jedoch aus den angeführten Gründen unwahrscheinlich ist. Daneben spricht besonders der Intensitätsanstieg vom zweiten, überlagerten, zum dritten reinen E-Form Spektrum dafür, dass es sich um ein einzelnes EYFP handelt, das nacheinander in verschiedenen spektralen Zuständen vorkommt. Die Beobachtung von zwei aufeinander folgenden Spektren, die eine Überlagerung von zwei spektralen Formen zeigen, ist selten, da in diesem Fall bei Beobachtung eines einzelnen Chromophors mindestens zwei Übergänge zwischen den Formen stattgefunden haben müssen. Im hier gezeigten Beispiel wird die im Kapitel 3.2.3 angesprochene Schwierigkeit sichtbar, dass der Fluoreszenzhintergrund nicht völlig gleichmäßig verteilt ist. Nach dem Bleichen der Fluoreszenz ist im Spektrum 8 immer noch ein Signal knapp oberhalb der Nulllinie zu sehen, was auf einen lokal erhöhten Fluoreszenzhintergrund zurückzuführen ist. Dieser erhöhte Hintergrund muss bei der Beurteilung, ob z.B. im Spektrum 5 Fluoreszenz der B-Form sichtbar ist, bedacht werden.

Falls Dunkelzeiten zwischen dem Erscheinen der verschiedenen spektralen Formen auftraten, müssen diese deutlich kürzer als die Integrationszeit von einer Sekunde gewesen sein. Im Spektrum 3 bis 5 ist schließlich nur noch E-Form Fluoreszenz zu beobachten. Danach verändert sich die Emission von Spektrum 5 zu 6 noch einmal vom E-Form Spektrum zum B-Form Spektrum. Wiederum kann keine Dunkelzeit aufgelöst werden. Im Spektrum 7 ist wiederum B-Form Fluoreszenz zu sehen, bevor es zum irreversiblen Bleichen des Chromophors kommt.



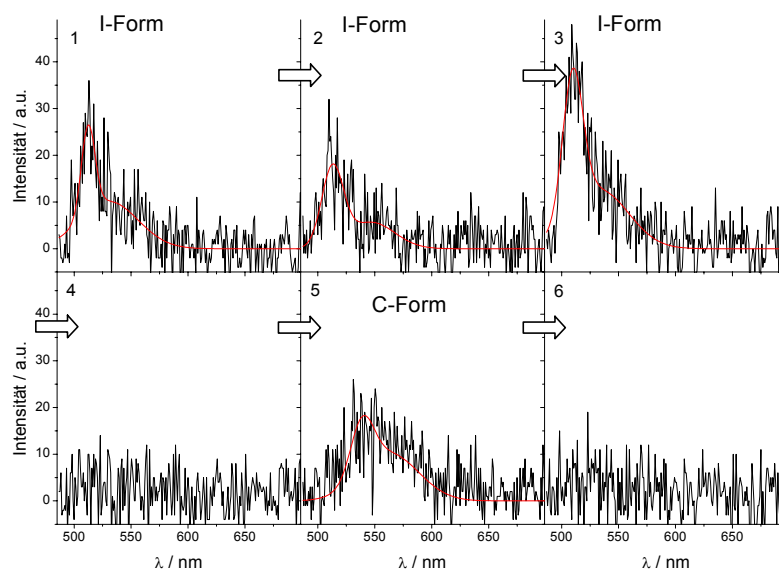
**Abbildung 5.35: Übergang von der B-Form in die E-Form**

Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Beispielen zeigten sich bei diesem Übergang keine Dunkelzeiten von mehr als einer Sekunde Dauer. Die Detektion von sowohl B- als auch E-Form während der ersten beiden Integrationsintervalle deutet auf jeweils mindestens einen spektralen Übergang zwischen den zwei Formen pro Integrationszeitraum hin. Die B- und E-Form Fluoreszenz ist in diesem Fall nicht gleichzeitig, sondern folgt einander und erscheint nur aufgrund der Integrationszeit von einer Sekunde in einem Spektrum. Besonders interessant ist, dass in dieser Spektrenserie auch Umwandlungen von der langwellig fluoreszierenden E-Form zurück zur B-Form sichtbar sind.

### 5.1.4.3 Fluoreszenzdynamik zwischen EGFP I-Form Spektren und bathochrom verschobenen Spektren

Auch für EGFP wurden analog zu EYFP Übergänge zwischen der vorherrschenden Form und den bathochrom verschobenen Formen beobachtet.

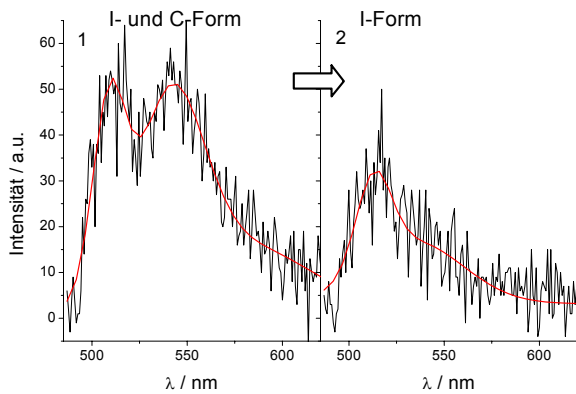
Es wurden 11 Übergänge zwischen der I-Form und der C-Form des EGFP beobachtet, ein solcher Übergang ist in Abbildung 5.36 gezeigt. Nach drei Sekunden I-Form Fluoreszenz mit Maximum bei 512nm folgt eine Dunkelzeit von ca. einer Sekunde. Im fünften Beobachtungszeitraum erscheint die typische C-Form Fluoreszenz mit Maximum bei 541nm.



**Abbildung 5.36: Übergang vom I-Form Spektrum zum C-Form Spektrum.**

Während der ersten drei Sekunden wird ein typisches I-Form Spektrum beobachtet. Nach einer Dunkelzeit von ca. einer Sekunde erscheint das C-Form Spektrum.

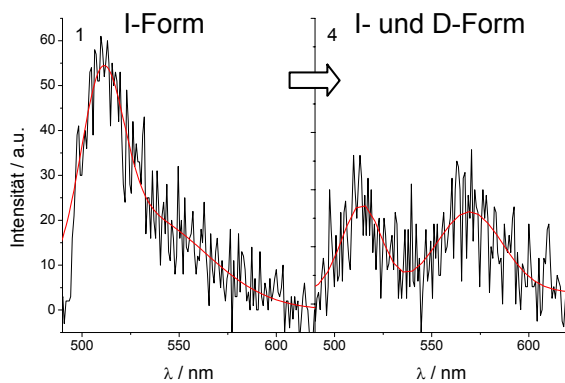
Neben den Umwandlungen zur längerwelligen Form mit Dunkelzeit über einer Sekunde wurden auch bei EGFP Umwandlungen mit Dunkelzeit unterhalb der Zeitauflösung des Experimentes und auch Umwandlungen von der längerwelligen zur I-Form beobachtet. Die Spektren in Abbildung 5.37 zeigen, dass im ersten Beobachtungsintervall von einer Sekunde eine Umwandlung zwischen C-Form und I-Form stattgefunden hat. Falls eine Dunkelzeit auftrat, war diese deutlich kürzer als eine Sekunde. Im nächsten Integrationszeitraum ist dann nur noch I-Form Fluoreszenz sichtbar.



**Abbildung 5.37: Umwandlung von der C-Form zur I-Form**

Die Maximalagen im ersten Spektrum sind typisch für die I- und die C-Form, nämlich 511 nm und 544 nm. Im zweiten Spektrum ist nur noch I-Form Fluoreszenz mit Maximum bei 513 nm sichtbar.

Auch zwischen der I-Form und der D-Form wurden Übergänge gefunden. Abbildung 5.38 zeigt als erstes Spektrum der Serie ein I-Form Spektrum. Es folgen zwei Spektren mit schwacher, nicht zuzuordnender Fluoreszenz, die wie schnelle Wechsel zwischen den Formen aussehen (nicht abgebildet), bevor im vierten Spektrum eine Überlagerung von I-Form und D-Form Spektrum zu sehen ist, welches die Umwandlung des beobachteten Proteins während dieser Integrationszeit von der I-Form in die D-Form anzeigt.



**Abbildung 5.38: Übergang zwischen I-Form und D-Form**

Das erste Spektrum zeigt das Vorliegen der I-Form an, dann folgen zwei Spektren mit schwacher Fluoreszenz (nicht abgebildet), bevor ein überlagertes I- und D-Form Spektrum erscheint.

Umwandlungen zwischen E-Form und anderen Formen wurden nicht beobachtet, was auf die insgesamt geringe Anzahl an Proteinen, die E-Form Spektren zeigen, zurückzuführen ist.

## 5.1.5 Die langwellig fluoreszierenden Formen von EYFP und EGFP – Folgerungen

### 5.1.5.1 Mögliche molekulare Ursachen

Sowohl bei EYFP als auch bei EGFP konnten stark rotverschobene Spektren beobachtet werden. Die beobachteten Übergänge zwischen den jeweils vorherrschenden spektralen Formen und den selteneren bathochrom emittierenden Formen belegen zum einen, dass die beobachteten Spektren nicht von in die Matrix eingebetteten Fremdchromophoren herrühren, zum anderen, dass sowohl bei EYFP als auch EGFP bei Raumtemperatur unter typischen Bedingungen für Einzelmolekülspektroskopie drastische Veränderungen der Emission auftreten können.

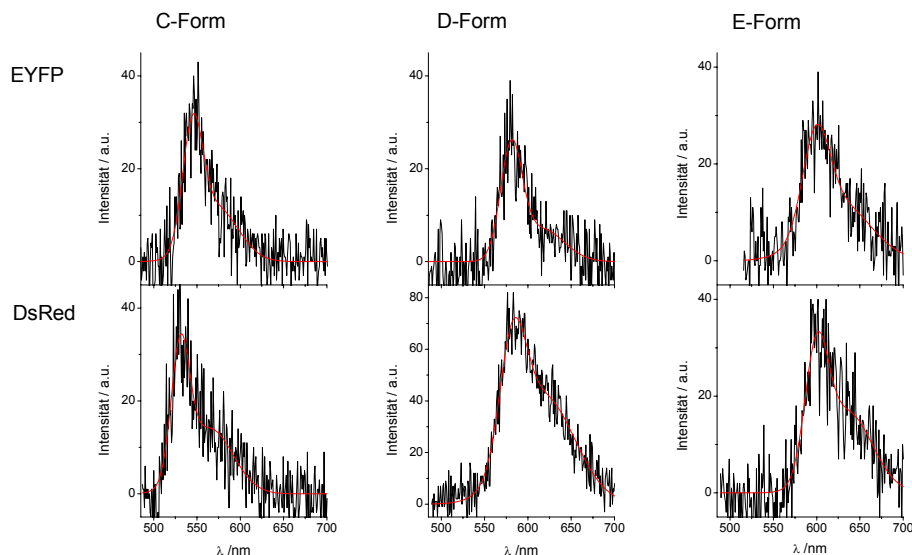
Betrachtet man die Art der Übergänge zwischen den vorherrschenden EGFP und EYFP-Form und den langwelligeren Formen C, D und E, so kann man keine formspezifische Systematik für die Dunkelzeiten ausmachen. Bei allen Formen konnten Übergänge mit Dunkelzeiten zum Teil deutlich über der Zeitauflösung des Experimentes von einer Sekunde beobachtet werden (vgl. z.B. Abbildung 5.33, Abbildung 5.34), bei allen Formen wurden aber auch Übergänge unterhalb der Zeitauflösung des Experiments gefunden (vgl. z.B. Abbildung 5.35, Abbildung 5.37).

Anhand der beobachteten Fluoreszenz kann klar zwischen zwei Reaktionsschritten, die bei der Bildung aller bathochromen Formen auftreten, unterschieden werden. Zunächst bildet sich ein nicht fluoreszierendes Zwischenprodukt, welches dann langsam in die wiederum fluoreszierende Form weiterreagiert. Eine quantitative Bestimmung der Zeitkonstanten der Übergänge konnte aufgrund der deutlich zu geringen Anzahl der beobachteten Übergänge nicht erfolgen.

Die beobachtete bathochrome Verschiebung des Fluoreszenzspektrums um bis zu 80nm deutet darauf hin, dass sich nicht nur die Chromophorumgebung verändert hat, sondern dass vielmehr durch eine Erweiterung des  $\pi$ -Systems eine chemische Veränderung des Chromophors stattgefunden hat.

Mit DsRed steht ein fluoreszierendes Protein zur Verfügung, bei dem eine solche Erweiterung des chromophoren  $\pi$ -Systems mit der damit verbundenen Veränderung der Fluoreszenz von grün nach rot beobachtet wird. Die rote DsRed Fluoreszenz bildet sich erst im Laufe eines Reifungsprozesses heraus, wobei ein grün fluoreszierendes, dem GFP Chromophor homologes Zwischenprodukt entsteht.

Der Vergleich der Emissionsspektren der C-, D- und E-Formen von EYFP und EGFP zeigt deutliche Parallelen zu Spektren, die bei der Untersuchung einzelner DsRed Oligomere gefunden wurden (vgl. Abbildung 5.39). Sowohl bei den Aequorea GFP Varianten als auch bei DsRed und dessen Varianten werden im Einzelmolekülexperiment drei spektral unterschiedliche Formen mit Emissionsmaxima zwischen 530nm und 610nm gefunden. Auch die Lagen der Emissionsmaxima der Formen stimmen bei den Aequorea GFP Varianten und DsRed gut überein, für die EYFP D- und E-Form Spektren können jeweils DsRed Spektren gefunden werden, die exakt die gleiche Maximumlage zeigen, wobei Abweichungen in der Form der Spektren auf den individuellen Charakter der Spektren einzelner Proteine und Oligomere und nicht auf prinzipielle Unterschiede zurückzuführen sind. Für die EYFP C-Form Spektren können keine DsRed Spektren mit exakt gleichem Emissionsmaximum gefunden werden, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Form sowohl bei den GFP als auch den DsRed Varianten nur selten vorkommt, was die Anzahl möglicher Vergleichsspektren stark einschränkt. Natürlich führt auch die unterschiedliche Chromophorumgebung in den verschiedenen Proteinen zu Abweichungen der Emissionslage. Dennoch wird die Ähnlichkeit zwischen den Spektren gut sichtbar.



**Abbildung 5.39: Vergleich EYFP und DsRed Spektren**

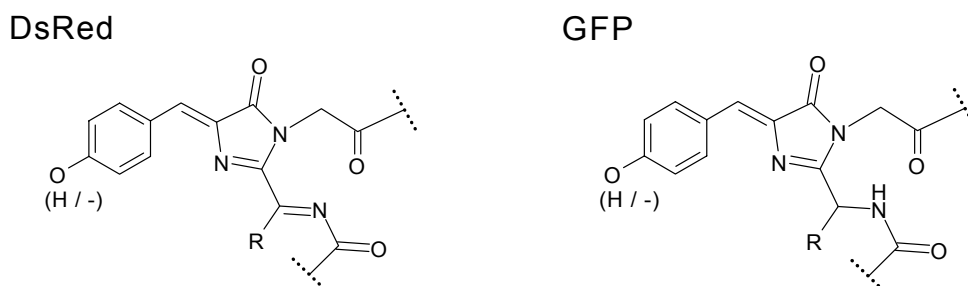
Zu den EYFP Beispielspektren (obere Reihe) für die C-, D- und E-Form aus Abbildung 5.28 können jeweils analoge DsRed-Spektren (untere Reihe) gefunden werden. Dass für das EYFP C-Form Spektrum kein DsRed Spektrum mit exakt der gleichen Maximumlage gefunden wurde, kann zum einen auf die geringe Anzahl an DsRed C-Form Spektren und zum anderen auf Unterschiede in der Chromophorumgebung innerhalb von EYFP und DsRed zurückgehen. Insgesamt sind die Ähnlichkeiten zwischen den Spektren so deutlich, dass zumindest EYFP D- und E-Form Emissionsspektren einzelner Proteine nicht von DsRed Spektren zu unterscheiden sind.



Anhand ihrer Einzelmolekülspektren können die langwellig fluoreszierenden Formen von EYFP und EGFP nicht von den entsprechenden DsRed Formen unterschieden werden.

Die Einzelmoleküldaten zeigen, dass die untersuchten Aequorea GFP Varianten EYFP und EGFP DsRed-artige Spektren zeigen können, welche aus den für diese Proteine typischen grün, bzw. gelb fluoreszierenden Formen hervorgehen. Wie der Schluss nahe lag, dass der grün fluoreszierende Chromophor des DsRed Zwischenproduktes GFP-artig ist, liegt umgekehrt nun der Schluß nahe, dass den rot fluoreszierenden D- und E-Formen ein DsRed-artiger Chromophor zugrunde liegt.

Die Chromophore von GFP und DsRed (Abbildung 5.40) sind sehr ähnlich, im Wesentlichen unterscheiden sie sich durch die Verlängerung des chromophoren  $\pi$ -Systems durch eine Acylimin Verlängerung beim DsRed, was zur bathochromen Verschiebung der Fluoreszenz führt.



**Abbildung 5.40: Struktur des GFP- und des DsRed Chromophors**

Der DsRed Chromophor (Links) unterscheidet sich vom GFP Chromophor (Rechts) durch eine Acylimin Verlängerung des chromophoren  $\pi$ -Systems. Prinzipiell ist diese Verlängerung des chromophoren  $\pi$ -Systems auch beim GFP Chromophor möglich.

Der DsRed Chromophor entsteht aus einem grün fluoreszierenden, dem Aequorea GFP homologen Chromophor durch einen weiteren Reaktionsschritt, nämlich einer Dehydrierung (vgl. Kapitel 2.5.2.2). Es wird angenommen, dass in DsRed dieser Reaktionsschritt durch die Umgebung begünstigt wird. In GFP und dessen Varianten besteht grundsätzlich auch die Möglichkeit der Verlängerung des  $\pi$ -Systems in der gleichen Weise wie bei DsRed, jedoch wird diese zumindest im Ensemble nicht beobachtet, weil die Chromophorumgebung die Dehydrierung nicht fördert.

Die im Einzelmolekülexperiment beobachteten DsRed-artigen Spektren der GFP Varianten EYFP und EGFP legen nahe, dass auch der GFP Chromophor dehydriert

werden kann. Die Dehydrierung führt zu einem DsRed analogen Chromophor, der Fluoreszenz mit langwellig verschobenem Maximum zeigt.

Inzwischen wurde ein weiteres fluoreszierendes Protein gefunden, das sehr leicht durch Bestrahlung mit Licht seine Fluoreszenz verändert, so dass rotverschobene Emission sichtbar wird. Es handelt sich um eine Variante eines fluoreszierenden Proteins aus der Steinkoralle *Trachypyllia geoffroyi*, welches als „Kaede“ bezeichnet wird. Nach der Bestrahlung erscheint stark rotverschobene Fluoreszenz mit Maximum bei 582nm, analog der hier beschriebenen D-Formen [75]. Auch in diesem Fall wird angenommen, dass die Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums durch die Verlängerung des chromophoren  $\pi$ -Systems am Imidazolring zustande kommt.

Über die möglichen molekularen Ursachen der C-Form Spektren ist nichts bekannt. Da diese Form deutlich hypsochromer fluoresziert, erscheint es wenig wahrscheinlich, dass die Fluoreszenz auf das gleiche verlängerte chromophore  $\pi$ -System zurückgeht wie die D- und E-Form Fluoreszenz.

In letzter Zeit wurden fluoreszierende Proteine mit Fluoreszenz im Bereich der C-Form Fluoreszenz gefunden [37], jedoch gibt es bisher keine Arbeiten zur Struktur des Chromophors und dessen unmittelbare Umgebung innerhalb des Proteins.

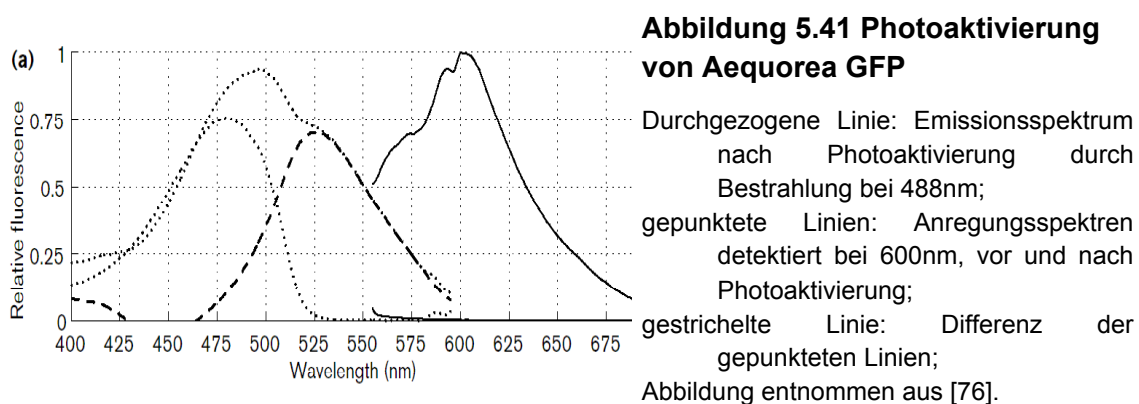
### 5.1.5.2 Photoaktivierung von GFP Varianten

Die generelle Möglichkeit, die Fluoreszenz von Aequorea GFP und vieler Varianten so zu verändern, dass in Ensemblelösungen deutlich rotverschobene Fluoreszenz entsteht, ist bereits vor einigen Jahren beobachtet worden.

Elowitz et al. [76] fanden, dass die Bestrahlung von Aequorea GFP mit Licht der Wellenlänge 488nm bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen zum Erscheinen stark rot verschobener Fluoreszenz führt. Dieser Effekt konnte für Aequorea GFP und alle von Elowitz et al. getesteten GFP Varianten, darunter auch EGFP, nachgewiesen werden und wird als Photoaktivierung bezeichnet. Photoaktivierung wurde sowohl an GFP Varianten *in vivo*, wie auch in aufgereinigter Lösung beobachtet. Es kann daher angenommen werden, dass es sich um eine Eigenschaft handelt, die unter den GFP Varianten weit verbreitet oder allgemeingültig ist.

Obwohl die Photoaktivierung von GFP Varianten Anwendungen im Bereich der Verfolgung von Bewegungen innerhalb der Zelle gefunden hat [77], ist nichts über die Ursachen der Rotverschiebung der Emission bekannt. Vergleicht man die Ergebnisse von Elowitz et al. zur Photoaktivierung mit den hier gefundenen Ergebnissen zu den bathochrom verschobenen C-, D- und E-Formen von EGFP und EYFP, so fallen deutliche Zusammenhänge auf.

Bei der Photoaktivierung der Proteinlösungen durch Elowitz et al. wurden die Lösungen für jeweils 20 Minuten mit einer Leistung von  $1,2 \text{ W/cm}^2$  bei 488nm bestrahlt, was zu Fluoreszenz mit zwei Maxima bei 590nm und 600nm und einer Schulter bei 560nm, und zu verstärkter Absorption um 525nm (vgl. Abbildung 5.41) führte.



Das Fluoreszenzspektrum von photoaktiviertem Aequorea GFP zeigt mit seinen zwei Maxima und einer Schulter auf der kurzwelligen Seite des Spektrums eine für

Fluoreszenzspektren einer einzelnen spektralen Form untypische Gestalt, was auf die Überlagerung der Emission verschiedener Subensembles hinweist. Da die im Einzelmolekülexperiment gefundenen Emissionsspektren in dem spektralen Bereich liegen, in dem nach Photoaktivierung Fluoreszenz ausgemacht wird, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der im Ensemble beobachteten Rotverschiebung der Fluoreszenz und der im Einzelmolekülexperiment beobachteten Bildung von drei stark langwellig verschobenen spektralen Formen um das gleiche Phänomen handelt. Tatsächlich kann das Ensemblespektrum gut als Überlagerung der Emissionsspektren der drei im Einzelmolekülexperiment identifizierten Formen beschrieben werden. Die Ensemblemaxima bei 590 und 600nm stammen von der D- und E-Form Fluoreszenz, die Schulter bei 560nm von der Emission der C-Form. Die Abweichungen zwischen den C- und D-Form Maximalagen der Einzelmolekülspektren und der resultierenden Schulter und dem Nebenmaximum erklärt sich dadurch, dass die Maxima dieser Spektren sich in der steil ansteigenden Flanke des Ensemblespektrums befinden, was zu einer scheinbaren bathochromen Verschiebung führt.

Die Annahme, dass die im Ensemble Experiment beobachtete Photoaktivierung auf die im Einzelmolekülexperiment beobachteten langwellig fluoreszierenden Formen von EYFP und EGFP zurückgeht, wird auch dadurch gestützt, dass Elowitz et al. nach einem Lichtpuls der Wellenlänge 488nm und einer Dauer von 30ms ein Hellerwerden der roten Fluoreszenz beobachteten, wobei die Zunahme der Fluoreszenz einer  $1/e$  Funktion mit einer Zeitkonstante von 0,7 Sekunden folgte. Dies weist auf einen zweistufigen Reaktionsmechanismus hin, bei dem zuerst durch Lichteinwirkung schnell ein Zwischenprodukt gebildet wird, das dann langsam zur rot fluoreszierenden GFP-Form weiterreagiert. Dies stimmt mit der hier bei der Spektroskopie einzelner Proteine gemachten Beobachtung überein, dass sich beim Übergang in eine der langwellig fluoreszierenden Formen zunächst ein nicht fluoreszierendes Zwischenprodukt ausbildet.

Es kann daher angenommen werden, dass die von Elowitz et al. beobachtete Photoaktivierung auf die Bildung der drei spektral verschiedenen Formen zurückgeht. Umgekehrt zeigt dieses Resultat, dass die im Einzelmolekülexperiment beobachteten Übergänge nicht spontan, sondern lichtinduziert waren.

Eine interessante Abweichung zwischen den Beobachtungen von im Ensemble photoaktivierten Aequorea GFP Varianten und den Beobachtungen an den C-, D- und E-Formen auf Einzelmolekülebene besteht darin, dass die langwellig verschobene Fluoreszenz bei Aequorea GFP und den untersuchten Varianten im Ensemble für wenigstens 24 Stunden stabil blieb [76]. Bei der Beobachtung einzelner Proteine wurde jedoch trotz der vergleichsweise geringen Anzahl von Proteinen, die Übergänge

zwischen den Formen zeigten, bei einigen Proteinen die Rückreaktion, nämlich die Bildung der kürzerwellig fluoreszierenden Form, beobachtet (vgl. Abbildung 5.35).

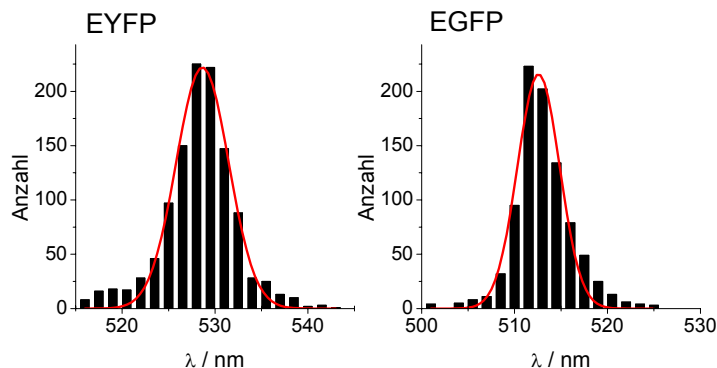
Ein entscheidender Unterschied zwischen dem hier durchgeführten Einzelmolekülexperiment und dem Ensembleexperiment von Elowitz et al. [76] ist, dass im Einzelmolekülexperiment ständig mit hoher Leistung beleuchtet wurde, wohingegen das Ensemble nur von Zeit zu Zeit, wenn eine Kontrollmessung gemacht wurde, mit den geringeren Leistungen der Ensemblespektroskopie angeregt wurde. Die im Einzelmolekülexperiment beobachteten Rückreaktionen weisen somit darauf hin, dass nicht nur die Hinreaktion, sondern auch die Rückreaktion zur kürzerwellig emittierenden Form photoaktiviert verläuft.

Der Grund, weshalb die Bildung langwellig emittierender Formen im Einzelmolekülexperiment ohne besondere Vorkehrungen bezüglich der Sauerstoffreduktion beobachtet werden kann, ist unklar. Möglicherweise ist die Bildung der langwellig fluoreszierenden Formen auf lokale Sauerstoffkonzentrationsschwankungen aufgrund der geringen Sauerstofflöslichkeit und Sauerstoffdiffusionsgeschwindigkeit in PVA, die die Reaktion einiger Proteine ermöglichen, zurückzuführen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Bildung der bathochromen Formen nur durch geringe Sauerstoffkonzentrationen begünstigt wird, diese aber keine notwendige Voraussetzung ist. Denkbar ist auch, dass die Einbettung der Proteine in Mikroporen des Polymers zur Untersuchung auf Einzelmolekülebene eine Rolle spielt.

## 5.1.6 Spektrale Verteilung und Diffusion ohne Formumwandlung bei EYFP und EGFP

### 5.1.6.1 Spektrale Verteilung der Maximumlagen der vorherrschenden Formen

Obwohl es sich bei der Chromophorumgebung der fluoreszierenden Proteine um eine, wie die Daten der Röntgenstrukturanalyse suggerieren, hochdefinierte Umgebung handelt, können deutliche spektrale Fluktuationen der Einzelmolekülspektren der untersuchten fluoreszierenden Proteine sowohl beim Vergleich der Spektren individueller Proteine, als auch im zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz eines einzelnen Proteins gefunden werden. Bereits in Abbildung 5.26 und Abbildung 5.29 kann man erkennen, dass die in EYFP und EGFP vorherrschende B-Form, bzw. I-Form Fluoreszenz nicht immer eine genau festgelegte Maximumposition hat, sondern dass die Maximumpositionen verteilt sind. Betrachtet man die Verteilung der Maximumlagen der EYFP B-Form und der EGFP I-Form genauer, so wird deutlich, dass diese jeweils um eine wahrscheinlichste Maximumposition normalverteilt sind (Abbildung 5.42).



**Abbildung 5.42: Maximumverteilung der EYFP B-Form und der EGFP I-Form**

Die Histogramme der Maximumlagen wurden mit einer Klassengröße von 1,5nm erstellt, die Verteilung der Maximumpositionen entspricht jeweils sehr gut einer Gaussverteilung (rot).

Die Maximumlagen von EYFP sind mit einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 5,6\text{nm}$  um 528,6nm verteilt, die von EGFP mit einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 4,5\text{nm}$  um 512,5nm. Die Standardabweichungen sind ein Maß für die Breite der Streuung der Maximumlagen der Fluoreszenz der einzelnen Proteinvarianten. Es ist gut erkennbar, dass die Maximumlagen von EYFP stärker gestreut sind als die von EGFP.

Die experimentellen Parameter wie Temperatur, Anregungsleistung, Integrationszeiten etc., waren bei den Einzelmolekülexperimenten von EYFP und EGFP vergleichbar und

scheiden damit als Ursache für die beobachteten Unterschiede aus. Die Standardabweichungen der Maximumpositionen der Fluoreszenz gehen auf strukturelle Inhomogenitäten der Proteine zurück, die sich auf die Fluoreszenz des Chromophors auswirken. Da die beiden Varianten prinzipiell gleichartig aufgebaut sind, ist nicht anzunehmen, dass EYFP insgesamt flexibler ist als EGFP, was darauf hinweist, dass die Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der direkten Chromophorumgebung zu suchen ist.

Dass Veränderungen in der unmittelbaren Chromophorumgebung sich deutlich auf die Fluoreszenz auswirken, zeigt der Vergleich verschiedener GFP Varianten. So unterscheiden sich EYFP und die EYFP Gln-69-Lys Variante nur in einer Aminosäure, nämlich Glutamin und Lysin an der Stelle 69, die Maxima der Absorption und Fluoreszenz sind jedoch beim EYFP Gln-69-Lys Mutant synchron um 2nm bathochrom verschoben [78]. Die Einführung der basischen Seitenkette des Lysin in die Chromophorumgebung führt somit zu einer Verschiebung sowohl des Absorptions- als auch des Emissionsspektrums.

Betrachtet man den Stokes-Shift verschiedener Varianten, findet man für den Stokes-Shift des anionischen Chromophors 29nm für Aequorea GFP, 22nm für Ser-65-Tyr (eng verwandt mit EGFP) und 14nm für EYFP. Die Reihe folgt der Anzahl von Atomen in van der Waals Kontakt mit dem Chromophor [73]. Dies ist plausibel, denn je dichter und unflexibler die Chromophorumgebung ist, umso weniger kann der angeregte Zustand durch energetisch günstigere Ausrichtung der umgebenden Atome und Atomgruppen stabilisiert werden, umso geringer fällt der Stokes-Shift aus.

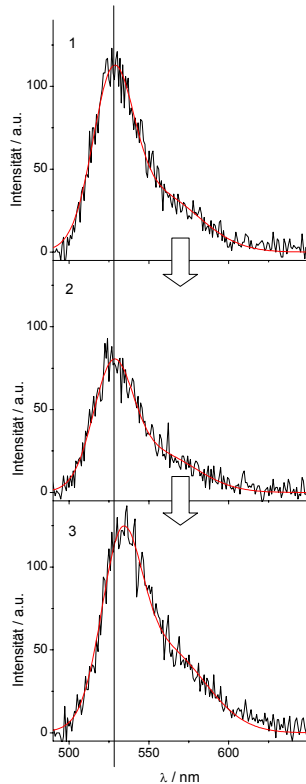
Die größere Anzahl von Atomen in van der Waals Kontakt zum Chromophor im EYFP im Vergleich zum EGFP ist auch der Grund für die beobachtete größere spektrale Verteilung der Maximumlagen des EYFP. Die Ursache für diesen Zusammenhang besteht darin, dass jedes Atom und jede Atomgruppe in Kontakt mit dem Chromophor die Fluoreszenz des Chromophors beeinflusst. Thermisch angeregte strukturelle Fluktuationen verändern ständig die Anzahl und Stärke der Kontakte zwischen dem Chromophor und dessen unmittelbarer Umgebung. Je mehr Möglichkeiten des Kontaktes bestehen, desto deutlicher können die Veränderungen der Fluoreszenz ausfallen, was in der größeren spektralen Verteilung der Fluoreszenzmaxima sichtbar wird.

Die Tendenz, dass eine größere Anzahl von Atomen oder Atomgruppen in direkter Umgebung des Chromophors zu einer größeren Verteilung der Fluoreszenzmaximumlagen führt, wird bei der Untersuchung von DsRed und seinen Varianten bestätigt werden (vgl. 5.2.2.7).

### 5.1.6.2 Spektrale Diffusion der Maximumlagen der Emission

Da die Erscheinung der Verteilung der Maximumlagen monomodal ist, kann schon aus dem Histogramm der Maximumlagen vermutet werden, dass nicht nur verschiedene fluoreszierende Proteine unterschiedliche Maximumpositionen der Emission aufweisen, sondern dass auch die Lage des Emissionsmaximums der einzelnen Proteine mit der Zeit spektral im Bereich der Verteilung des Fluoreszenzmaximums der entsprechenden spektralen Form diffundieren.

Bei der Mehrzahl der aufgenommenen Spektrenserien konnten spontane Veränderungen der Emissionsmaximumposition beobachtet werden. Sowohl langsame Änderungen, die als kleine Schritte im Subnanometerbereich erschienen, als auch größere Sprünge über einige Nanometer von einem Spektrum zum nächsten, (Abbildung 5.43) wurden beobachtet. In Abbildung 5.43 ist eine Spektrenserie gezeigt, bei der vom ersten zum zweiten Spektrum überhaupt keine Veränderung der spektralen Lage der Emission beobachtet wird, einzig die Intensität nimmt ab. Vom zweiten zum dritten Spektrum verändert sich die Maximumposition um 5nm bathochrom, wobei die Intensität wieder zunimmt.

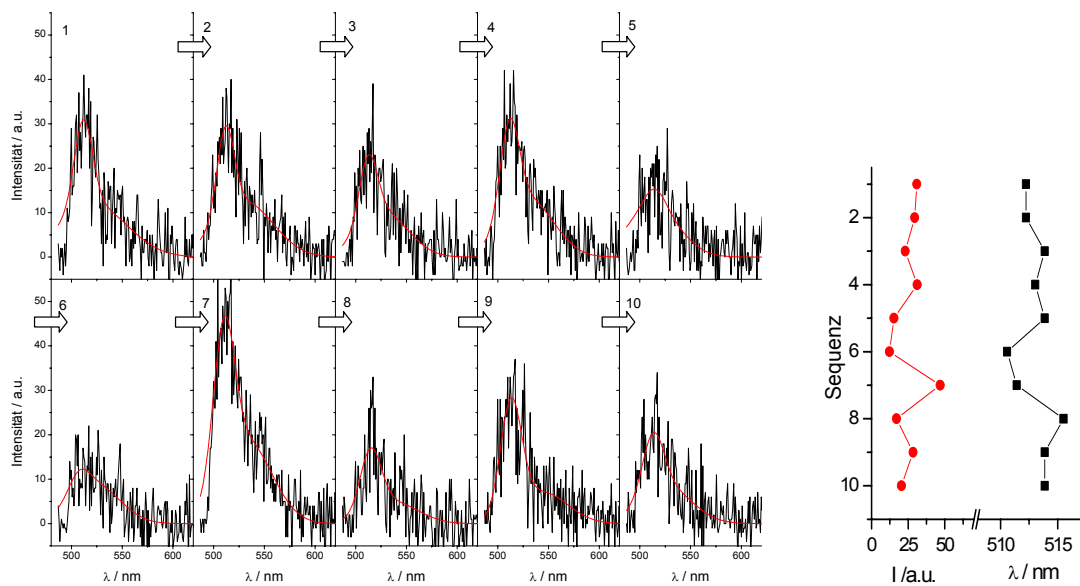


**Abbildung 5.43: Spektrale Diffusion der Lage des Emissionsmaximums**

Während der ersten zwei Beobachtungszeiträume kommt es zu keiner Veränderung der Lage des Emissionsmaximums des beobachteten einzelnen EYFPs. Vom zweiten zum dritten Spektrum springt die Maximumposition um 5nm.



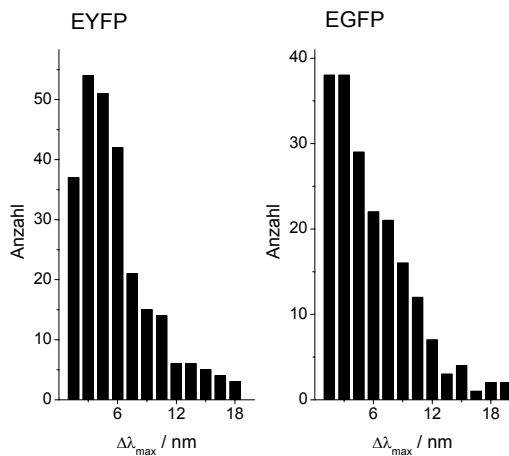
In Abbildung 5.44 ist eine EGFP Spektrenserie gezeigt, bei der langsame Veränderungen der Emission beobachtet wurden. So sind z.B. während der ersten vier Sekunden nur geringfügige Veränderungen der Spektrenlage und Intensität zu beobachten. Danach nimmt die Dynamik der Fluoreszenzspektren deutlich zu, wobei kein systematischer und wiederkehrender Zusammenhang zwischen spektraler Verschiebung und der beobachteten Intensität der Spektren ausgemacht werden kann (Abbildung 5.44, rechts).



**Abbildung 5.44: Diffusion des Fluoreszenzmaximums**

Abgebildet ist eine EGFP Spektrenserie und die dazugehörigen Trajektorien der Maximumintensität (rote Kreise) und der Maximumposition (schwarze Quadrate). Ein systematischer und wiederkehrender Zusammenhang zwischen der Veränderung der Spektralen Lage und Intensität des Emissionsmaximums ist nicht erkennbar.

Die gemessene Diffusion der Lage des Emissionsmaximums kann bestimmt und wiederum zu einem Histogramm zusammengestellt werden. Hier soll die spektrale Diffusion je einzeltem Protein als Differenz zwischen dem kurz- und langwelligsten Spektrum, welches je Protein detektiert werden konnte, ermittelt und ausgewertet werden. Veränderungen von über 20nm wurden nicht mehr berücksichtigt, da es sich bei diesen spektralen Sprüngen in der Regel um Übergänge zwischen verschiedenen spektralen Formen handelt. Die Werte für die erhaltene spektrale Diffusion wurden mit einer Klassengröße von 1,5nm zu einem Histogramm zusammengestellt (vgl. Abbildung 5.45).



**Abbildung 5.45: Histogramm der spektralen Diffusion pro Protein innerhalb der vorherrschenden Form**

Ausgewertet wurde die Differenz zwischen dem kurz- und langwelligsten Emissionsspektrum einer Spektrenserie. Obwohl deutliche Unterschiede bei der Wahrscheinlichkeit von sehr geringer spektraler Diffusion des Emissionsmaximums zu erkennen sind, liegen die Wahrscheinlichkeiten bei der Beobachtung eines einzelnen Proteins, spektrale Diffusion der Maximumlage der Fluoreszenz von weniger als 4,5nm zu beobachten, sehr eng zusammen, nämlich für EYFP bei 55% und für EGFP bei 53%.

Die beobachtete spektrale Diffusion pro Protein hängt stark von den gewählten Versuchsbedingungen ab, weshalb die in Abbildung 5.45 gezeigte Verteilung der spektralen Diffusion des Emissionsmaximums der untersuchten fluoreszierenden Proteine nur das Verhalten unter den gewählten Versuchsbedingungen abbildet. Wird z.B. die mögliche Gesamtbeobachtungszeit pro Molekül etwa durch variierte Anregungsleistungen verändert, kann sich auch die Weite der spektralen Diffusion der einzelnen fluoreszierenden Proteine ändern. Dies ist z.B. für den Teil der spektralen Diffusion der Fall, der durch zufällige, thermisch bedingte strukturelle Änderungen in der Chromophorumgebung bedingt wird.

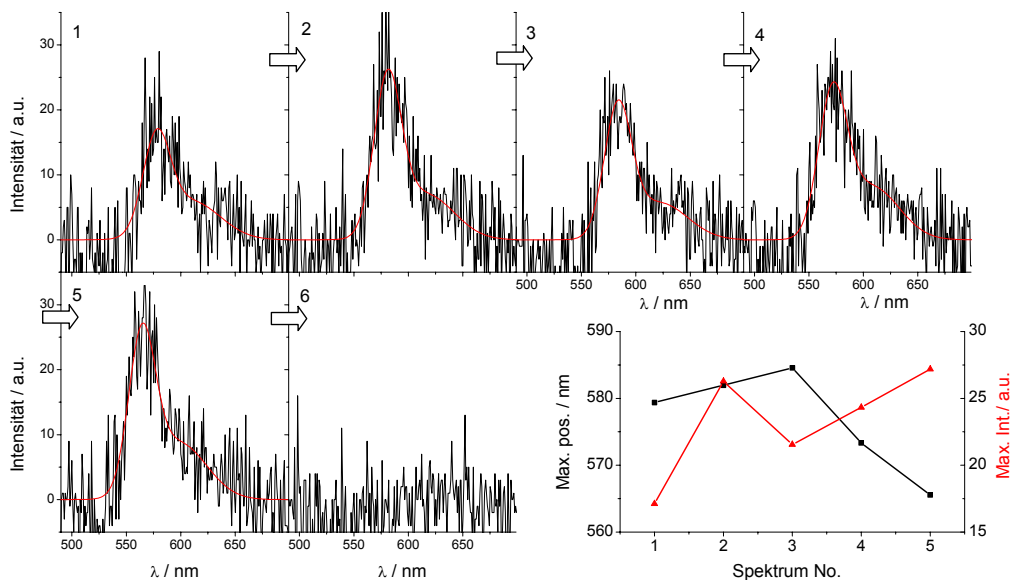
Da die experimentellen Parameter bei der Untersuchung von EYFP und EGFP ungefähr gleich waren, können die Histogramme der spektralen Sprungweiten direkt miteinander verglichen werden. Für EYFP konnte die spektrale Diffusion der Maximumlagen der Fluoreszenz von 258 einzelnen Moleküle bestimmt werden, bei EGFP konnte die spektrale Diffusion von 198 einzelnen Emittlern bestimmt werden. Die Histogramme zeigen, dass EGFP häufiger spektral stabil ist als EYFP und spektrale Diffusion unter 1,5nm zeigt, jedoch sind die Werte, die man für die spektrale Diffusion bis 4,5nm erhält, recht ähnlich. Bei EYFP zeigen 55% aller beobachteten Proteine spektrale Diffusion des Fluoreszenzmaximums bis 4,5nm, bei EGFP sind es mit 53% nur unwesentlich weniger.

Da die experimentellen Parameter auf die Spektroskopie einzelner fluoreszierender Proteine optimiert waren, sind die Ergebnisse zumindest tendenziell auf andere Einzelmolekülexperimente an fluoreszierenden Proteinen übertragbar. Beide Tatsachen, nämlich, dass die Maximumlagen unterschiedlicher individueller EGFPs

bzw. EYFPs verteilt sind, und dass die Maximumlagen der Emissionsspektren spektral während der Beobachtungszeit diffundieren, sind bei der Auswertung von Einzelmolekülexperimenten mit EGFP und EYFP zu berücksichtigen. Bei Einzelmolekül-FRET Experimenten ist dies besonders kritisch. Die spektrale Diffusion von EGFP als FRET-Donor führt zu einem veränderten spektralen Überlapp von Donor und Akzeptor und damit zu einer veränderten FRET Rate. Die Auswertung von Einzelmolekül FRET Experimenten wird dadurch kompliziert, dass die meist angestrebte Beobachtung der Veränderung der FRET-Rate aufgrund von Veränderungen der Donor und Akzeptor Position zueinander kaum von der spontanen Veränderung der FRET Rate durch spektrale Diffusion von Donor und Akzeptor zu unterscheiden ist. Weiter erschwert wird die Auswertung noch durch spontane Intensitätsänderungen der Einzelmolekülemission, wie sie im Kapitel 5.1.7 diskutiert werden.

### 5.1.6.3 Spektrale Diffusion der Maximumlagen bei den langwelligen Formen

In Kapitel 5.1.2 wurde bereits erwähnt, dass die spektrale Verteilung der Fluoreszenzmaxima der langwelligen C-, D- und E-Formen von EYFP und EGFP sehr groß ist, was unter anderem die Identifizierung der Subensembles erschwert. In Abbildung 5.46 ist eine EYFP Spektrenserie gezeigt, bei der sich innerhalb einiger Sekunden die Lage des Fluoreszenzmaximums um ca. 20nm verändert. Auch die Fluoreszenzintensität variiert, wobei jedoch kein Zusammenhang mit der spektralen Verschiebung des Spektrums zu erkennen ist.



**Abbildung 5.46: Spektrale Diffusion der Maximumposition der langwelligen D-Form**

Intensität und vor allem Lage des Emissionsmaximums verändern sich innerhalb der 5 Sekunden Beobachtungszeit erheblich. Unten rechts sind die Trajektorien der Maximumposition (schwarze Quadrate) und Maximumintensitäten (rote Dreiecke) aufgetragen.

Vergleichbar große diffusionsartige Änderungen der Maximumposition wurden innerhalb der bei EYFP vorherrschenden B-Form und der EGFP I-Form nicht gefunden.

Eine Zusammenstellung der Daten zu einem Sprungweitenhistogramm war aufgrund der Seltenheit der langwelligen Formen nicht möglich.

### 5.1.7 Intensitätsfluktuationen der Emission

Bei fast allen beobachteten Spektrenserien der fluoreszierender Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen wurden, wurden deutliche Intensitätsfluktuationen gefunden.

Grundsätzlich konnten von der Erscheinung her zwei unterschiedliche Arten von Intensitätsänderungen beobachtet werden, nämlich zum einen Wechsel zwischen Hell- und Dunkelzeiten, in denen gar keine Emission beobachtet werden konnte, und andererseits die Folge von unterschiedlich intensiven aufeinanderfolgenden Spektren.

#### 5.1.7.1 Fluktuationen der Fluoreszenzintensität

Da über einen relativ langen Zeitraum von einer Sekunde gemittelt wurde, ist das zeitweise Wechseln eines Moleküls in einen dunklen Zustand von weniger als einer Sekunde Dauer nicht von einer absolut verminderten Fluoreszenz, z.B. durch verminderte Quantenausbeute, zu unterscheiden.

Um die insgesamt beobachteten Intensitätsschwankungen zu verdeutlichen, können die beobachteten Intensitätsschwankungen von einem Spektrum zum nächsten in einem Histogramm zusammengestellt werden. Dabei ist die Auftragung der Differenz der absoluten Intensitätswerte nicht sinnvoll, da die fluoreszierenden Proteine in eine Polymermatrix eingebettet sind, was zu einer statistischen Verteilung der Übergangsdipolmomente der Chromophore in der untersuchten Probe führt. Die absolute Intensität der Spektren verschiedener Chromophore kann deshalb nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Absorption von Anregungslicht und die Emission von Fluoreszenz in Detektionsrichtung abhängig von der Ausrichtung der Chromophore sind, welche sich aus dem detektierten Fluoreszenzlicht nicht bestimmen lässt.

Es ist daher notwendig, eine geeignete Mittelung oder Normierung zu finden. Gewählt wird hier:

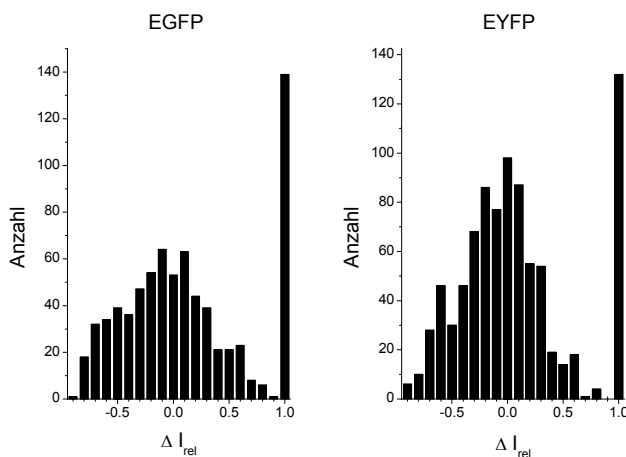
$$\Delta I_{rel} = \frac{I_{\max_2} - I_{\max_1}}{I_{\max'}}$$

mit

$I_{\max_{1/2}}$  Intensität des Emissionsmaximums des ersten, bzw. des folgenden Spektrums

$I_{\max'}$  per Definition der größere der beiden Intensitätswerte der aufeinander folgenden Spektren

Man erhält so die vorzeichenbehaftete relative Intensitätsveränderung von einem Spektrum zum nächsten, bezogen auf das intensivere Spektrum. Die relativen Intensitätsänderungen wurden mit einer Klassengröße von 0,1 zu Histogrammen zusammengestellt (Abbildung 5.47). Die relativen Intensitätsänderungen und somit die Histogramme hängen von den Bedingungen des Experiments, z.B. der Anregungsleistung, der Integrationsdauer, etc. ab. Da diese Parameter in den vorliegenden Untersuchungen vergleichbar waren, können die Histogramme miteinander verglichen werden.



**Abbildung 5.47: Relative Intensitätsänderungen von EGFP und EYFP**

Wie die große Anzahl von relativen Intensitätssprüngen mit dem Wert +1 zeigt, wird bei beiden Varianten häufig ein Einsetzen der Fluoreszenz nach einer Dunkelzeit von über einer Sekunde beobachtet.

Generell verhalten sich EGFP und EYFP bezogen auf Fluoreszenzintensitätssprünge sehr ähnlich.

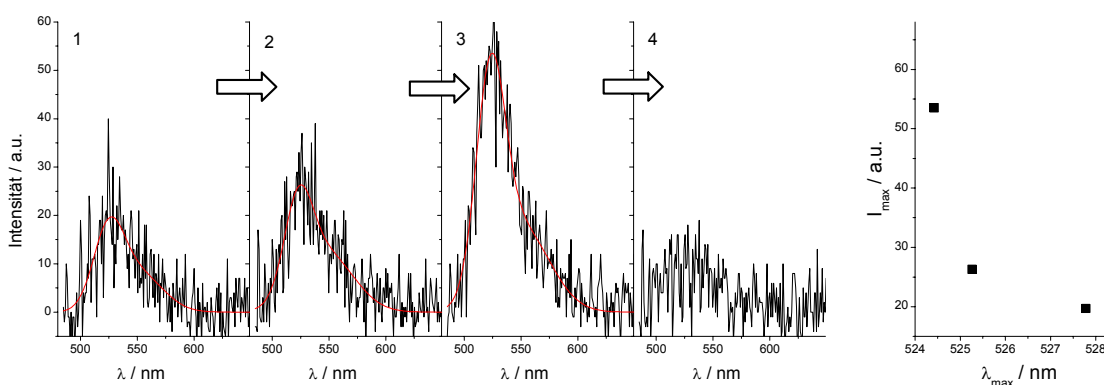
Zunächst fällt die große Anzahl von Fällen mit der relativen Intensitätsveränderung +1 auf, was für ein Erscheinen der Fluoreszenzbande steht. Hier wird deutlich, dass reversibles Bleichen mit Dunkelzeiten über der Integrationszeit von einer Sekunde und wieder Einsetzen der Fluoreszenz ein bei den untersuchten GFP Varianten nicht selten zu beobachtendes Phänomen ist. Generell sind Intensitätszunahmen häufig zu beobachten, wie die Werte größer 0 in den Histogrammen zeigen.

Die Wahrscheinlichkeiten, dass das folgende Spektrum intensiver ist als das zuletzt beobachtete, lag bei EGFP bei 37%, bei EYFP bei 34%, die Wahrscheinlichkeit, dass als nächstes ein Spektrum mit niedrigerer Intensität beobachtet wurde betrug für EGFP 54% und für EYFP 53%, jeweils für den Fall, dass noch kein Bleichen stattgefunden hatte. EGFP und EYFP verhalten sich, was die Wahrscheinlichkeit einer Intensitätszunahme bzw. -abnahme angeht, generell sehr ähnlich, jedoch ist im Histogramm deutlich zu erkennen, dass bei EGFP öfter größere Intensitätsveränderungen zu beobachten waren als bei EYFP.

Der hier verwendete Ansatz ermöglicht es zu überprüfen, ob Intensitätsschwankungen mit einer Verschiebung des Emissionsspektrums korreliert sind. Geht man von dem

einfachen Modell des konstanten Stokes-Shifts aus, so hat jede Veränderung der spektralen Lage eine ebensolche Entsprechung im Absorptionsspektrum.

Bei der Anregung von EYFP mit Licht der Wellenlänge 488nm wird 27nm hypsochrom des Absorptionsmaximums angeregt, was bedeutet, dass die Anregung in der steil ansteigenden Flanke des Spektrums erfolgt (vgl. 4.1.3). Dies hat zur Folge, dass hypsochrome Verschiebungen des Absorptionsspektrums zu vermehrter Absorption, bathochrome Verschiebungen hingegen zu verminderter Absorption führen, was sich unter bestimmten Umständen im Emissionsspektrum verfolgen lässt. Wenn die Fluoreszenzquantenausbeute, die Dauer der möglichen Dunkelzeiten pro Integrationszeit und der Stokes-Shift sich nicht zu stark gleichzeitig mit der spektralen Verschiebung verändern, kann man korreliertes Verhalten von Maximumlage und Maximumintensität beobachten (Abbildung 5.48).



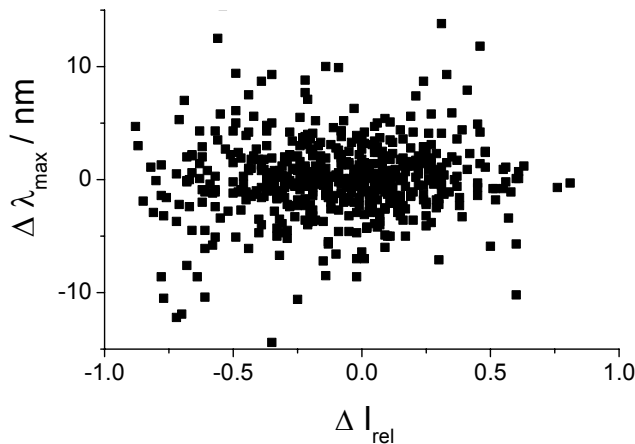
**Abbildung 5.48: Verstärkte Emission bei hypsochromer Verschiebung des Spektrums**

Abgebildet ist die Emission eines einzelnen EYFPs, bei dem der Anstieg der Emission mit der hypsochromen Verschiebung des Spektrums einhergeht, was auch aus der Auftragung der Maximumposition gegen Maximumintensität (rechts) zu erkennen ist.

Wenn der in Abbildung 5.48 beispielhaft gezeigte Zusammenhang zwischen Fluktuationen der spektralen Lage der Fluoreszenz und Intensitätsfluktuationen eine Eigenschaft des EYFP ist, so muss sich dies durch Auswertung einer großen Menge von Einzelmolekül-Fluoreszenzspektren nachweisen lassen.

In der hier durchgeführten Untersuchung soll die relative Intensitätsänderung auf Korrelation mit der Änderung der Maximumlage der Emission von einem Spektrum zum nächsten untersucht werden. Wie bereits oben gezeigt, wird zunächst die vorzeichenbehaftete relative Intensitätsveränderung von einem Spektrum zum nächsten, bezogen auf das intensivere Spektrum, bestimmt. Die Veränderung der Maximumlage kann direkt als Differenz bestimmt und aufgetragen werden, so dass

man ein Korrelationsdiagramm aus relativer Veränderung der Emissionsmaximumintensität gegen Veränderung der spektralen Lage des Fluoreszenzmaximums von jeweils einem Spektrum zum nächsten einer Serie erhält (Abbildung 5.49).



**Abbildung 5.49:**  
**Korrelationsdiagramm der spektralen Verschiebung gegen die relative Intensitätsänderung für EYFP**

Aufgetragen wurde die spektrale Verschiebung gegen die relative Intensitätsänderung aufeinander folgender Fluoreszenzspektren. Eine Korrelation der Größen ist nicht sichtbar, der erwartete Zusammenhang wird durch andere Effekte überlagert und ist nicht detektierbar.

Aus Abbildung 5.49 ist zu erkennen, dass eine hypsochrome Verschiebung des Spektrums nicht unbedingt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt und auch eine bathochrome spektrale Verschiebung mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit von einem Anstieg wie einem Abfall der Emissionsintensität begleitet wird. Eine Korrelation zwischen der Veränderung der spektralen Lage und der Intensitätsänderung ist nicht erkennbar.

Die Ursprungsidee, dass die veränderte Absorption, bedingt durch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums, sich auf die Fluoreszenzintensität auswirkt, insofern alle anderen photophysikalischen Parameter sich nicht zu sehr ändern, ist sicher richtig. Obwohl es nicht möglich ist, die Absorptionsspektren einzelner Moleküle zu beobachten, ist es dennoch plausibel anzunehmen, dass diese von der strukturellen Umgebung des Chromophors abhängen und somit zeitlich nicht vollkommen konstant sind, sondern sich ebenfalls diffusionsartig verändern. Die beobachtete Fluoreszenz ist jedoch neben der Absorption von weiteren Parametern wie der Fluoreszenzquantenausbeute, der Anzahl und Dauer von Dunkelzeiten ohne Fluoreszenz, dem Stokes-Shift, etc. abhängig, die wiederum ebenfalls von der Chromophorumgebung abhängen. Strukturelle Veränderungen wirken sich je nach Art der Umlagerung unterschiedlich stark und in ihrer Wirkung auf die Fluoreszenz durchaus auch entgegengesetzt auf diese Parameter aus. Es kommt somit zu einer Überlagerung der unterschiedlichen Effekte, so dass sich kein Trend zwischen veränderter spektraler Lage und veränderter Fluoreszenzintensität mehr erkennen lässt.



Die Auswertung der EGFP Daten auf die gleiche Weise ist wenig vielversprechend, da EGFP bei Anregung mit 488nm genau an seinem Absorptionsmaximum angeregt wird. Es ist deshalb nicht mehr vorhersagbar, ob eine hypsochrome/bathochrome Verschiebung zu verstärkter oder geringerer Absorption führt, da dies von der genauen und leider unbekanntem spektralen Lage des Absorptionsmaximums des einzelnen Proteins abhängt.

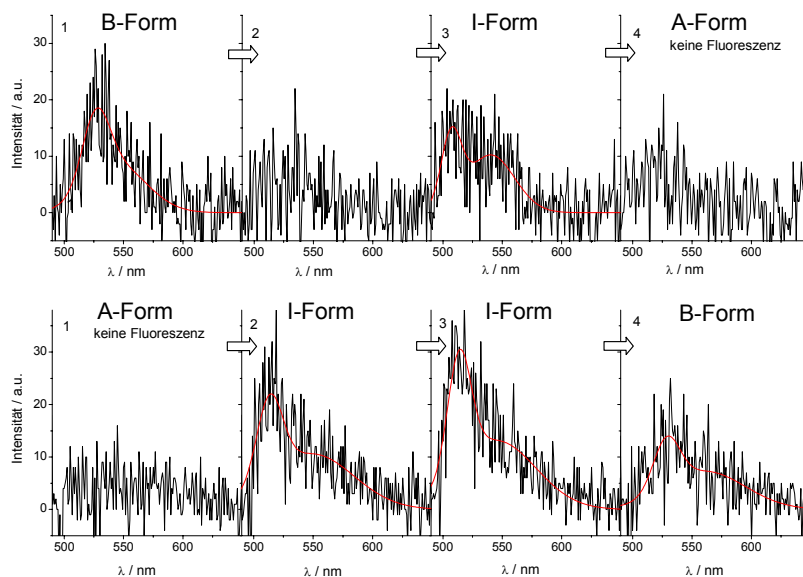
### 5.1.7.2 Dunkelzeiten ohne beobachtbare Fluoreszenz

Die Untersuchungen der Fluoreszenzdunkelzeiten haben gezeigt, dass die dunklen und hellen Zustände der fluoreszierenden Proteine vom pH-Wert, der Anregungsleistung und natürlich von der untersuchten Variante abhängen [24-26, 61]. Über die nicht fluoreszierenden Zustände selbst ist wenig bekannt. Für einige Typ 4 Varianten, zu denen auch EYFP gehört, gibt es Vorschläge, die langlebige dunkle Zustände erklären. Die Erklärung geht auf die Beobachtung von Dickson et al. an den EYFP eng verwandten Typ 4 Proteinen zurück, dass sich einige der scheinbar endgültig gebleichten Chromophore durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 405nm wieder in einen fluoreszierenden Zustand zurückversetzen lassen [24]. Es wird angenommen, dass bei den scheinbar gebleichten Proteinen der Chromophor in seiner neutralen, kürzerwellig absorbierenden Form vorliegt. Durch Anregung der neutralen Form bei 405nm kommt es schließlich zur Deprotonierung und damit Wiederherstellung des anionischen Chromophors.

Die Untersuchungen von Creemers et al. haben gezeigt, dass EYFP in drei spektral verschiedenen Formen, die ineinander übergehen können, vorliegt, wobei die A-Form mit neutralem Chromophor und die B-Form mit anionischem Chromophor nur via der I-Form ineinander übergehen [59]. Aufgrund ihrer Beobachtungen verfeinerten Creemers et al. den von Dickson vorgeschlagenen Mechanismus, der zu Dunkelzeiten und der Reaktivierung der Fluoreszenz führt. Da die Dauer der Hell-Zeiten mit zunehmender Anregungsleistung abnimmt, kann eine Umwandlung, ausgehend vom angeregten Zustand, angenommen werden. Anregung mit 488nm führt dazu, dass schließlich ein Übergang aus dem angeregten Zustand der B-Form in den Grundzustand der I-Form erfolgt. Bei Anregung bei 488nm wird auch die I-Form angeregt und aus der angeregten I-Form kann nun eine Umwandlung in die A- oder die B-Form erfolgen. Tritt eine Umwandlung in die A-Form auf, kann keine weitere Fluoreszenz mehr beobachtet werden, da diese bei 488nm nicht absorbiert. Proteine, die in der A-Form vorliegen, können entweder mit Licht  $\lambda < 446\text{nm}$  angeregt werden, wobei die Anregung nach  $A^*$  zur Photokonversion zu  $I^*$  führt, oder thermisch bedingt

wieder in die I-Form übergehen. Aus der I-Form kann dann wieder die Umwandlung zur A- oder B-Form erfolgen.

Übergänge von der vorherrschenden B-Form in die A-Form des EYFP, die bei 488nm nicht angeregt wird, verlaufen demnach immer über die I-Form, die, wie bereits gezeigt werden konnte, mit den Methoden der spektral aufgelösten Einzelmolekülspektroskopie nachgewiesen werden kann. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm sollten Umwandlungen zwischen der B-Form und der bei Anregung mit 488nm nicht angeregten A-Form zu Spektrenserien wie in Abbildung 5.50 führen. In der oberen Reihe ist zunächst ein B-Form Spektrum sichtbar, bevor nach einer kurzen Dunkelzeit ein I-Form Spektrum erscheint, danach folgt der hier angenommene Übergang in die A-Form. In der unteren Reihe wird zunächst eine Dunkelzeit beobachtet, nach dem hier angenommenen Mechanismus liegt das Molekül als A-Form vor. Aufgrund der fehlenden Anregung der A-Form kommt es dann nicht zu einem lichtinduzierten, sondern zu einem thermisch bedingten Übergang in die I-Form, deren Spektrum für zwei Sekunden sichtbar wird, bevor der Übergang in die B-Form erfolgt.



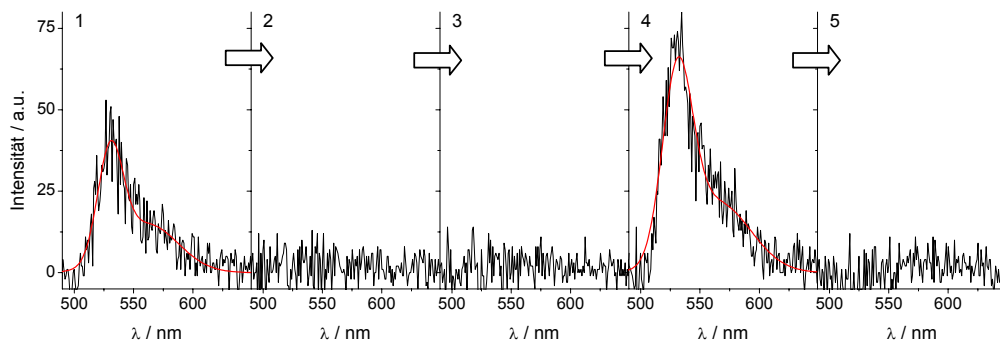
**Abbildung 5.50: Dunkelzeiten durch Übergänge von der EYFP B-Form in die nicht angeregte A-Form via der I-Form**

Bei Anregung mit 488nm erscheinen Übergänge von der B-Form (oben, 1) über die I-Form (oben, 3) zur nicht angeregten A-Form (oben, 4; unten, 1) und wieder zurück (I-Form unten 2,3; B-Form unten 4), wie hier beispielhaft dargestellt. Da keine einzelnen Proteine gefunden wurden, an denen reversible Übergänge via der I-Form gefunden wurden, ist das Beispiel aus zwei Serien (oben, unten) zu Demonstrationszwecken zusammengesetzt.

Die in Abbildung 5.50 gezeigten Spektren gehören jedoch zu zwei unterschiedlichen EYFPs, da keine einzelnen EYFPs beobachtet werden konnten, bei denen mehrere Übergänge via der I-Form gefunden werden konnten.

Von den beobachteten 400 einzelnen EYFPs zeigten 78 (19%) reversibles Photobleichen mit einer Dunkelzeit über einer Sekunde, jedoch konnte nur bei 9 Proteinen (2,3%) I-Form Fluoreszenz zwischen der dunklen Phase und der B-Form Fluoreszenz detektiert werden.

Für den weitaus größten Teil der Moleküle, bei denen reversibles Photobleichen beobachtet wurde, zeigten sich keine ungewöhnlichen Veränderungen bezüglich der spektralen Lage der Fluoreszenz. Abbildung 5.51 zeigt ein typisches Beispiel für reversibles Bleichen, wie es meist bei EYFP beobachtet wurde. Angeregt wurde mit Licht der Wellenlänge 488nm, so dass Wechsel in die I-Form an deren Fluoreszenz zu erkennen wären.



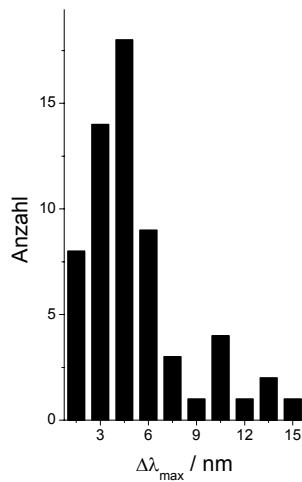
**Abbildung 5.51: Reversibles Bleichen bei EYFP, ohne dass I-Form Fluoreszenz beobachtet wird.**

Beim Wechsel zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Zustand ist bei der weitaus größten Anzahl der beobachteten Fälle keine intermediäre I-Form Fluoreszenz sichtbar. Nach der Dunkelzeit erscheint die Fluoreszenz wieder bei der gleichen spektralen Lage.

Beim Wechsel vom fluoreszierenden in den dunklen Zustand ist keine intermediäre I-Form Fluoreszenz sichtbar, das Gleiche gilt bei der Rückkehr der Fluoreszenz in Spektrum 4. Das Fehlen von intermediärer I-Form Fluoreszenz beim Bleichen bzw. bei der Rückkehr in einen fluoreszierenden Zustand bei den meisten Proteinen zeigt, dass der Übergang zwischen A-Form und B-Form via der I-Form kein dominierender Effekt bei der Ausbildung von Dunkelzeiten ist. Eine weitere Erklärung dafür, dass nur sehr selten intermediäre I-Form beobachtet wurde, wäre, dass die I-Form sehr schnell in Richtung A- oder B-Form depopuliert wird. Gegen eine Depopulierung der I-Form nach nur wenigen Anregungszyklen, so dass keine I-Form Fluoreszenz beobachtet werden

kann, spricht, dass bei 3% der Gesamtzahl der beobachteten EYFPs I-Form Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Betrachtet man die Verteilung der spektralen Diffusion der Lagen der Emissionsmaxima von allen EYFPs, die reversibles Bleichen zeigten, stellt man fest, dass reversibel bleichende Proteine kaum größere spektrale Diffusion der Maximumlagen zeigen als die Gesamtheit der EYFPs. Der Wechsel zwischen fluoreszierendem und nicht fluoreszierendem Zustand wird nicht von einer verstärkten Streuung der Emissionsmaximumlagen begleitet, was gegen deutliche strukturelle Umlagerungen in der Chromophorumgebung spricht, da diese ihren Niederschlag in einer größeren Veränderung der Maximumpositionen finden sollten.



**Abbildung 5.52: Verteilung der spektralen Diffusion der Maximalagen von EYFPs, die reversibles Bleichen zeigten**

Die Verteilung der spektralen Diffusion der Maximumlagen entspricht gut der für die Gesamtheit der EYFPs ermittelten Diffusion (vgl. Abbildung 5.45, links). Der Wechsel zwischen einem dunklen und einem hellen Zustand hat keinen besonderen Einfluss auf die Lage des Emissionsspektrums.

Die Klassengröße des Histogramms beträgt 1,5nm.

## 5.2 DsRed und Varianten

Seit der Entdeckung des DsRed durch Matz et al. im Jahr 1999 [39] ist das Interesse an diesem fluoreszierenden Protein und dessen inzwischen produzierten Varianten wegen deren weit bathochrom verschobener Fluoreszenz, groß. Die Einsatzmöglichkeiten dieser neu entdeckten Proteingruppe als in vivo Fluoreszenzmarker und als Komponenten von FRET Systemen legen die Untersuchung auf Einzelmolekülebene nahe. Die bisher in dieser Richtung durchgeführten Arbeiten beruhen jedoch praktisch ausschließlich auf der Verfolgung von Intensitätstrajektorien, wobei eine ganze Reihe verschiedener Dunkelzustände, ähnlich denen von GFP und seinen Varianten, gefunden wurden [70-72]. Eine breiter angelegte Untersuchung der Einzelmolekülspektren dieser Proteinfamilie zur Charakterisierung von Eigenschaften, die im Ensemble verborgen sind, z.B. der spektralen Diffusion, existiert bisher nicht. Diese Charakterisierung auf Einzelmolekülebene durch spektral aufgelöste Fluoreszenzspektroskopie soll hier an DsRed und einigen ausgewählten Varianten erfolgen. Untersucht wurden DsRed, die ebenfalls rot fluoreszierenden Varianten DsRed-2 (Arg-2-Ala, Lys-5-Glu, Lys-9-Thr, Val-105-Ala, Ile-161-Thr, Ser-197-Ala) und E5 (Val-105-Ala, Ser-197-Thr), die orange fluoreszierende Variante E8 (Asn-42-His) und die grün fluoreszierende Variante AG4 (Val-71-Met, Val-105-Ala, Ser-197-Thr).

Da DsRed und dessen hier untersuchte Varianten auch in nanomolaren Konzentrationen noch Tetramere ausbilden (vgl. Kapitel 4.2.1), ist davon auszugehen, dass auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen von DsRed und seinen Varianten keine einzelnen Proteine, sondern einzelne Oligomere untersucht wurden. Statt von einzelnen Molekülen wird deshalb von einzelnen Oligomeren oder Einheiten die Rede sein.

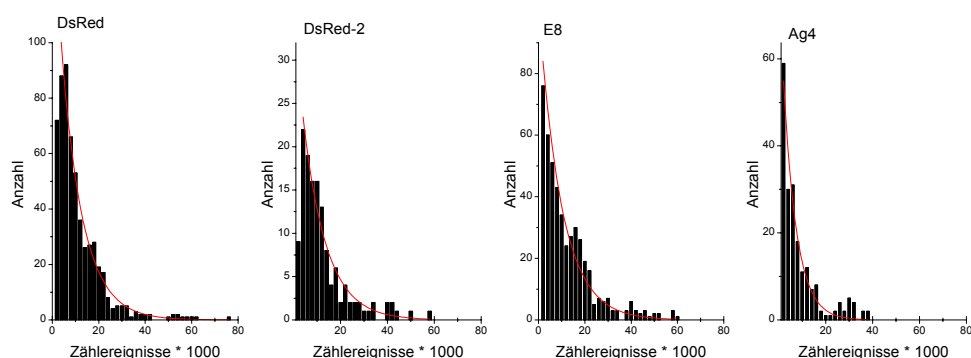
### 5.2.1 Anzahl der emittierten Photonen pro Oligomer für DsRed und seine Varianten

Analog zu der in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Methode wurde die Anzahl der emittierten Photonen und die Quantenausbeute des Photobleichens pro Proteinoligomer unter den gewählten Versuchsbedingungen bestimmt.

Insgesamt wurden die Fluoreszenzspektren von 571 DsRed Einheiten, 129 DsRed-2 Einheiten, 201 AG4 Einheiten und 463 E8 Einheiten, die bei 488nm angeregt wurden, ausgewertet und die Summen der Zählereignisse pro Einheit in Histogrammen

zusammengestellt. Für E5 standen für Anregung bei 488nm nicht genug Daten zur Verfügung, der Vergleich mit Anregung bei 458nm ist nicht sinnvoll, da es Hinweise gibt, dass die Bleichrate bei kürzeren Anregungswellenlängen stark ansteigt (siehe unten).

Die Verteilung der Anzahl der Zählereignisse pro beobachteter Einheit ist für DsRed, DsRed-2 und E8 ähnlich (Abbildung 5.53). An die Verteilungen wurde eine einfacher exponentieller Abfall angepasst, aus dessen Abklingkonstante sich die mittlere Anzahl Zählereignisse ergibt.



**Abbildung 5.53: Verteilung der Summe der detektierten Zählereignisse pro Proteinoligomer**

An die Verteilung der Summe der detektierten Zählereignisse der verschiedenen Varianten, die alle bei 488nm angeregt wurden, wurde jeweils ein einfacher exponentieller Abfall angepasst.

Daraus ergibt sich die mittlere Anzahl Zählereignisse und damit die mittlere Anzahl Photonen, die pro Oligomer emittiert wurden. Man erhält für DsRed  $4,65 \cdot 10^5$  Photonen (9300 Zählereignisse), für DsRed2  $4,95 \cdot 10^5$  Photonen (9900 Zählereignisse), für E8  $4,85 \cdot 10^5$  Photonen (9700 Zählereignisse) und für AG4  $2,8 \cdot 10^5$  Photonen (5600 Zählereignisse).

Da nur für DsRed die Fluoreszenzquantenausbeute bekannt ist, kann nur für DsRed die Quantenausbeute des Photobleichens zu  $1,5 \cdot 10^{-6}$  bestimmt werden.

Für DsRed erhält man 9300 Zählereignisse, was ca.  $4,65 \cdot 10^5$  emittierten Photonen oder, unter Berücksichtigung der Fluoreszenzquantenausbeute von DsRed, einer Quantenausbeute des Photobleichens von  $1,5 \cdot 10^{-6}$  pro beobachtetem Oligomer entspricht. Dieser Wert weicht von dem im Ensemble bestimmten Wert von  $7 \cdot 10^{-7}$  [42] um den Faktor 2 ab, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die durch hohe Anregungsleistungen im Einzelmolekülexperiment bedingte Bildung einer spektral bathochrom verschobenen super roten Form zurückgeht (vgl. 5.2.2.1).

Die Abweichungen zu dem von Harms et al. [28] ermittelten Wert für die Quantenausbeute des Photobleichens von einzelnen DsDed Oligomeren in einer Gelmatrix von  $15 \cdot 10^{-5}$  sind jedoch beträchtlich. Wie bereits bei der Bestimmung der

Quantenausbeute des Photobleichens der Aequorea GFP Varianten diskutiert (Kapitel 5.1.1), sind die von Harms et al. bestimmten Werte generell sehr groß. Gegen den angeführten Wert von  $15 \cdot 10^{-5}$  spricht eindeutig, dass dieser nur ca. 5000 emittierten Photonen pro Oligomer entspricht, was eine spektral aufgelöste Detektion der Proteinfluoreszenz ausschließen würde.

In der Literatur findet sich eine weitere Arbeit, die sich mit der Verteilung der Summe der emittierten Photonen pro DsRed Oligomer beschäftigt. Lounis et al. [65] detektierten im Einzelmolekülexperiment 5100 Photonen pro Oligomer, wobei sie leider keine Angabe über die Detektionseffizienz ihres Aufbaus machen. Geht man jedoch von einer ähnlichen Detektionseffizienz wie im hier verwendeten Aufbau aus, so entspricht dies ungefähr einer Quantenausbeute des Photobleichens von  $8 \cdot 10^{-6}$ , einem Wert, der die Annahme, dass die von Harms et al. ermittelten Werte deutlich zu groß sind, bestätigt. Die Abweichungen zwischen dem von Lounis et al. und dem hier ermittelten Wert gehen vermutlich auf tatsächlich unterschiedliche Detektionseffizienzen und unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurück.

Außerdem liegt eine Abhängigkeit der Anzahl Photonen, die pro Oligomer emittiert wird, bevor Bleichen eintritt, von der Anregungswellenlänge nahe, da bei Anregung von DsRed mit Licht der Wellenlänge 458nm nur noch 5300 Zählereignisse statt wie bei 488nm Anregung 9300 Zählereignisse pro Einheit detektiert werden.

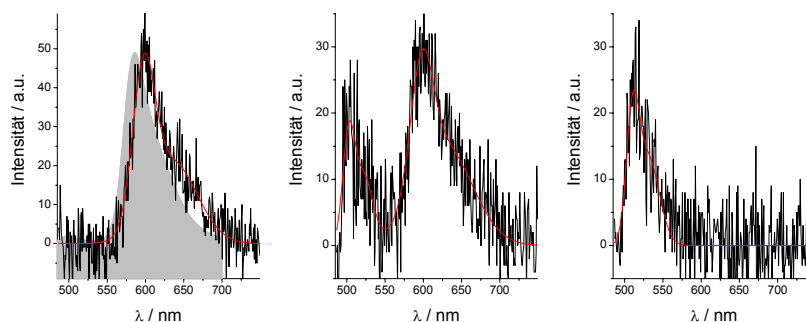
Für DsRed-2 und E8 erhält man ähnliche Ergebnisse wie für DsRed, nämlich 9900, bzw. 9700 Zählereignisse, was ca.  $4,95 \cdot 10^5$  bzw. ca.  $4,85 \cdot 10^5$  emittierten Photonen pro beobachtetem Oligomer entspricht. Für AG4 hingegen werden nur 5600 Zählereignisse beobachtet, was ca.  $2,80 \cdot 10^5$  emittierten Photonen pro beobachtetem Oligomer entspricht.

Bedenkt man den oligomeren Charakter der DsRed Varianten, geht man also davon aus, dass in der Mehrzahl der beobachteten Einheiten vier Chromophore emittierten, so zeigt sich, dass DsRed und die hier untersuchten Varianten nach weniger emittierten Photonen ausbleichen als die untersuchten GFP Varianten (vgl. Kapitel 5.1.1).

## 5.2.2 Einzelmolekülspektren und deren Verteilung der spektralen Lagen des Fluoreszenzmaximums

### 5.2.2.1 DsRed

DsRed wurde mit den Anregungswellenlängen 488nm und 458nm untersucht. Bei Anregung mit 488nm wurden insgesamt 539 einzelne DsRed Oligomere untersucht, wobei 2263 Fluoreszenzspektren von jeweils einer Sekunde aufgenommen wurden. Bei Anregung mit 458nm wurden 549 Spektren von jeweils einer Sekunde von 141 einzelnen Oligomeren aufgenommen. Um die spektralen Charakteristiken wie Lage des Maximums, Intensität, etc. zuverlässig und reproduzierbar auswerten zu können, wurde auch hier jeweils eine Funktion aus zwei überlagerten Gaussverteilungen an jede Fluoreszenzbande der Rohdaten angepasst.



**Abbildung 5.54: Typische Emissionsspektren einzelner DsRed Oligomere**

Die bei weitem meisten Spektren zeigen ausschließlich die langwellige Fluoreszenz des gereiften Chromophors (Links). Das Ensemblespektrum ist grau hinter das Einzelmolekülspektrum gelegt, wobei deutlich zu erkennen ist, dass das Emissionsspektrum des einzelnen Oligomers bathochrom gegenüber dem Ensemblespektrum verschoben ist. Bei einigen Oligomeren wurde gemischte Fluoreszenz des ungereiften und des gereiften Chromophors detektiert (Mitte), bei einer kleinen Anzahl von Oligomeren wurde die reine Fluoreszenz des ungereiften Chromophors detektiert (Rechts).

Die bei weitem größte Zahl der Einzelmolekülspektren konnte dem ausgereiften, rot fluoreszierenden Chromophor des DsRed zugeordnet werden (Abbildung 5.54 Links), wobei jedoch eine bathochrome Verschiebung der Spektren einzelner Oligomere gegenüber dem Ensemblespektrum beobachtet wurde. Da die Anregungswellenlängen so gewählt waren, dass auch der ungereifte, grün fluoreszierende Chromophor angeregt wurde, wurde in einigen Fällen auch Emission dieses Chromophors beobachtet. In den meisten Fällen wurde die Fluoreszenz des ungereiften Chromophors mit Intensitätsmaximum um 500nm zusammen mit der langwelligen

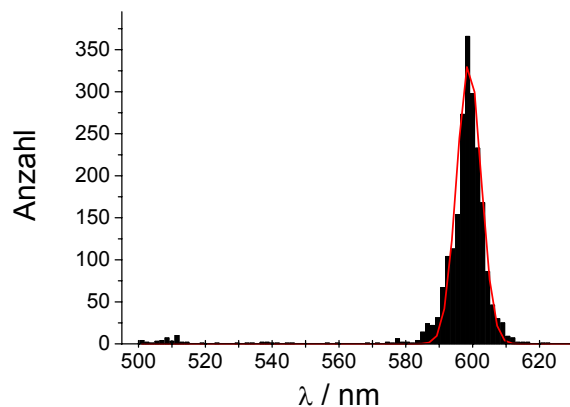


Fluoreszenz des ausgereiften Chromophors gefunden (Abbildung 5.54, mitte). Die Intensitätsverhältnisse der beiden Fluoreszenzbanden zueinander variierten in diesen Fällen, bei einigen Spektren wurde ausschließlich die kurzwellige Fluoreszenz des ungereiften Chromophors gefunden (Abbildung 5.55, rechts).

Die Beobachtung von Fluoreszenz zweier unterschiedlicher Formen oder Chromophore in einem Fluoreszenzspektrum ist im Fall der als Oligomer vorliegenden DsRed Varianten anders zu interpretieren als bei den monomeren Aequorea GFP Varianten. Da wegen der starken Tendenz von DsRed und dessen Varianten zur Oligomerbildung in der Regel ein Oligomer aus mehreren Monomeren untersucht wird, deutet die Beobachtung von zwei Fluoreszenzbanden auf die gleichzeitige Beobachtung zweier unterschiedlicher Chromophore und nicht primär auf die Umwandlung eines Chromophors während der Beobachtungszeit hin. Bestätigt wird diese Interpretation auch dadurch, dass bei DsRed und Varianten nur selten innerhalb einer Serie Übergänge zwischen den reinen Spektren verschiedener Formen zu beobachten waren.

Dass bei der Untersuchung einzelner Oligomere Spektren, die gleichzeitig die charakteristischen Fluoreszenzbanden des ungereiften und des gereiften Chromophors zeigen, gefunden wurden, zeigt demnach, dass in DsRed gemischte Oligomere aus Proteinen, die den ungereiften und Proteinen, die den gereiften Chromophor enthalten, vorliegen können. Außerdem wurden in geringem Maße Spektren, die keinem der bekannten Chromophore zuzuordnen waren, gefunden.

Die Maximumlagen aller Fluoreszenzbanden, die bei Anregung mit 488nm beobachtet wurden, wurden anschließend ermittelt und mit einer Klassengröße von 1,5nm zu einem Histogramm zusammengestellt (Abbildung 5.55). Die bei weitem meisten Maxima finden sich bathochrom zu 580nm, was dem Spektrum in Abbildung 5.54 links entspricht. Spektren, die Fluoreszenz des ungereiften Chromophors zeigten, verursachen die Häufung um 510nm, Maximumlagen zwischen 520nm und 570nm stammen von Spektren, die keinem der beiden Chromophore zugeordnet werden konnten.



**Abbildung 5.55: Verteilung der Maximumlagen der Emissionsbanden**

Die bei weitem meisten Maximumpositionen der Emission sind um 598nm normalverteilt.

Die Verteilung der Maximumpositionen des rot fluoreszierenden Chromophors lässt sich gut durch eine Gaussverteilung um 598nm und einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 7,3\text{nm}$  beschreiben.

Besonders auffällig ist der Unterschied zwischen dem Emissionsmaximum im Ensemble bei 583nm und dem Maximumwert der Verteilung der Einzelmolekülemissionsmaxima bei 598nm. Die Verteilung zeigt, dass nur ein verschwindend kleiner Teil der Einzelmolekülspektren das Emissionsmaximum bei der für das Ensemble gemessenen Wellenlänge von 583nm aufwiesen.

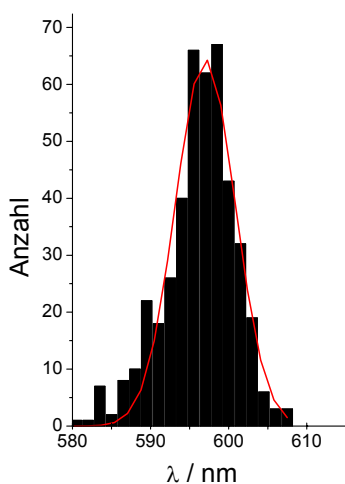
In der Literatur sind Hinweise auf die Bildung einer spektral bathochrom verschobenen, s.g. „super roten“ Form des DsRed zu finden [30, 70, 71]. So führt die Bestrahlung einer DsRed Lösung mit Licht der Wellenlänge 532nm zur Bildung einer Absorptionsbande bei 574nm unter Rückbildung der Absorption bei 558nm und der Ausbildung einer Fluoreszenzbande bei 595nm [30], wobei die Bildung der langwellig fluoreszierenden Form von der Intensität des eingestrahlt Lichtes abhängt, wie FCS Experimente zeigen [71]. Weiterhin konnte die super rote Form bereits auf Einzelmolekülebene nachgewiesen werden [30]. Über die strukturellen Ursachen der super roten Fluoreszenz ist bis dato nichts bekannt.

Die hier durchgeführten zeitlich und spektral aufgelösten Untersuchungen der Fluoreszenz einzelner DsRed Oligomere bestätigen die sehr schnelle Bildung der super rot fluoreszierenden Form bei hohen Anregungsleistungen. Fluoreszenzspektren einzelner Oligomere mit Emissionsmaximum bei 584nm, wo im Ensemblespektrum das Maximum der Fluoreszenz beobachtet wird, wurden nur in Ausnahmefällen beobachtet.

Unter der Annahme, dass die Chromophore eines Tetramers via FRET gekoppelt sind, reicht unter Umständen bereits die Umwandlung eines Chromophors in die super rote Form, um nur noch Fluoreszenz mit Maximum bei 595nm zu zeigen. Rechnungen,

basierend auf der Röntgenstrukturanalyse von DsRed unter Abschätzung der Orientierung der Übergangsdipolmomente, weisen auf eine FRET Kopplung gleichartiger Chromophore innerhalb eines Tetramers hin [65]. In einem effektiven FRET System bildet die super rote Form eine Energiefalle, zu der die absorbierte Energie der Chromophore geleitet wird, und von der aus Fluoreszenz erfolgt. Im Laufe der Bestrahlung kommt es dann zur Umwandlung auch der anderen Chromophore in die super rote Form, so dass schließlich auch beim sukzessiven Bleichen der Chromophore nur Fluoreszenz der super roten Form beobachtet werden kann.

Die für die Anregungswellenlänge 488nm gemachten Beobachtungen werden auch bei einer Anregungswellenlänge von 458nm gemacht. Die Auswertung von 469 Einzelmolekülspektren liefert ein Histogramm analog zu Abbildung 5.55, die Maximumpositionen sind hier mit einer Standardabweichung von  $2\cdot\sigma=7,6\text{nm}$  um 597nm verteilt (Abbildung 5.56) und stimmen somit sehr gut mit den Daten, die für 488nm Anregung ermittelt wurden, überein.



**Abbildung 5.56: Verteilung der Maximumlagen der Emission bei 458nm Anregung**

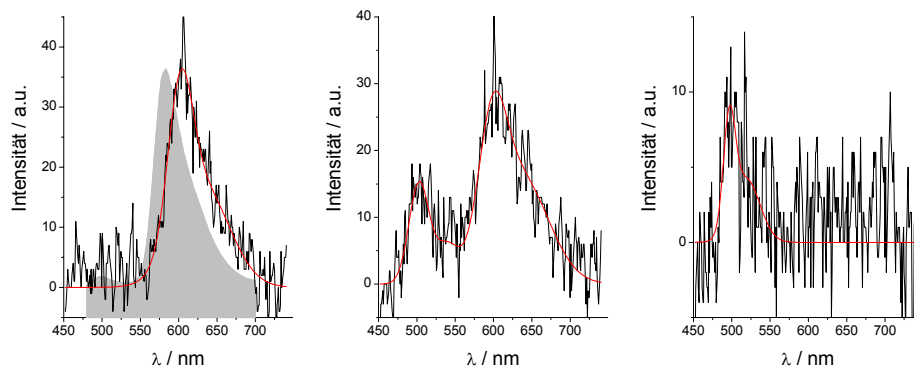
Wie bei Anregung mit 488nm sind die Maximumpositionen der Emission um 597nm gestreut. Dies zeigt, dass wiederum fast ausschließlich die super rote DsRed Form vorliegt.

Auch die Standardabweichung der gaussverteilten Maximumpositionen ist für die Anregungswellenlängen 458nm und 488nm fast gleich, nämlich jeweils  $2\cdot\sigma\sim 7,5\text{nm}$ .

### 5.2.2.2 E5

Die DsRed Variante E5 wurde mit Anregungswellenlängen von 458nm und 488nm untersucht. Dabei erhielt man bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm 167 Einzelspektren von 52 E5 Einheiten und bei Anregung mit 488nm 894 Einzelspektren von 258 Oligomeren.

Die sehr große spektrale Ähnlichkeit zwischen gereiftem DsRed und E5 spiegelt sich auch in den Emissionsspektren einzelner Oligomere wider. Die bei weitem meisten Spektren konnten dem ausgereiften Chromophor zugeordnet werden (Beispielspektrum Abbildung 5.57 links). Daneben wurden wie bei DsRed einige Spektren gefunden, die zwei Fluoreszenzbanden zeigten, die auf gemischte Oligomere mit sowohl gereiften wie auch ungereiften Chromophoren hinweisen (Beispielspektrum Abbildung 5.57 mitte). Sehr wenige Spektren zeigten ausschließlich die Emission des grün fluoreszierenden Zwischenproduktes der Reifung des Chromophors (Beispielspektrum Abbildung 5.57 rechts).

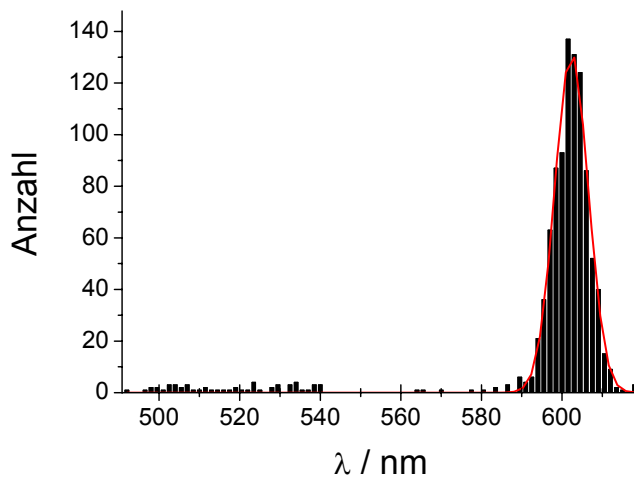


**Abbildung 5.57: Typische Emissionsspektren einzelner E5 Oligomere**

Analog zu DsRed wurden bei E5 hauptsächlich Spektren mit langwelliger Fluoreszenz des gereiften Chromophors (Links) gefunden, im Hintergrund ist das Ensembleemissionsspektrum von E5 abgebildet. Es ist eine deutliche bathochrome Verschiebung des Emissionsspektrums des einzelnen Oligomers gegenüber dem Ensemblespektrum sichtbar. Außerdem wurden einige Oligomere mit gemischter Fluoreszenz von ungereiftem und gereiftem Chromophor (Mitte) und wenige Spektren, die die kurzwellige Fluoreszenz des ungereiften Chromophors zeigen (Rechts), beobachtet.

Die Maximumlagen der Fluoreszenzbanden aller bei Anregung mit 458nm aufgenommenen Spektren wurden zu einem Histogramm mit der Klassengröße 1,5nm zusammengestellt (Abbildung 5.58). Die größte Häufung der Maximumlagen ist im langwelligen Bereich um 600nm zu beobachten und ist der Fluoreszenz des gereiften Chromophors zuzuordnen, wobei die im Einzelmolekülexperiment bestimmten Maximumpositionen der Emission des gereiften Chromophors deutlich von der Position

des Fluoreszenzmaximums im Ensemble bei 583nm abweichen, was analog zu DsRed auf die schnelle Bildung der super roten Form des Chromophors zurückzuführen ist. Die Fluoreszenzbandenmaxima unter 510nm stammen vom ungereiften, grün fluoreszierenden Chromophor. Somit sind fast alle beobachteten Emissionen den bekannten zwei unterschiedlichen Chromophoren zuzuordnen. Es blieb jedoch ein kleiner Teil Spektren mit Maximumlagen zwischen 510nm und 540nm, die nicht eindeutig zugeordnet werden können.



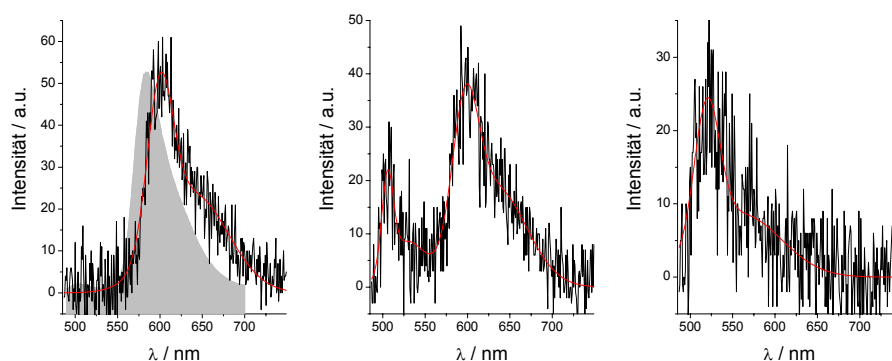
**Abbildung 5.58: Verteilung der Maximumlagen der Emissionsbanden**

Die bei weitem meisten Maximumpositionen der Emission sind um 602nm normalverteilt und dem ausgereiften Chromophor zuzuordnen. Daneben sind Maximumlagen unterhalb 510nm vom ungereiften Chromophor und nicht eindeutig zuzuordnende Spektren mit Maximumlagen zwischen 510nm und 540nm zu sehen.

Die Verteilung der Maximumpositionen der roten Fluoreszenz des gereiften Chromophors kann durch eine Normalverteilung um 602nm mit einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 8,2\text{nm}$  beschrieben werden. Das Maximum der Verteilung liegt damit 4nm bathochrom im Vergleich zu DsRed, obwohl sich die Lagen der Fluoreszenzmaxima in den Ensemblespektren nicht unterscheiden.

### 5.2.2.3 DsRed-2

Von DsRed-2 wurden 129 einzelne Oligomere bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm untersucht, wobei 420 Emissionsspektren erhalten und ausgewertet wurden. Es überrascht nicht, dass auch für dieses Protein fast ausschließlich Spektren, die die super rote Fluoreszenz des gereiften Chromophors zeigen, gefunden wurden. Beispielspektren einzelner Oligomere sind in Abbildung 5.59 gezeigt, auch bei DsRed-2 zeigt die Beobachtung von Spektren mit kurz- und langwelliger Fluoreszenz das Vorhandensein von gemischten Oligomeren aus Proteinen mit ungereiftem und gereiftem Chromophor.

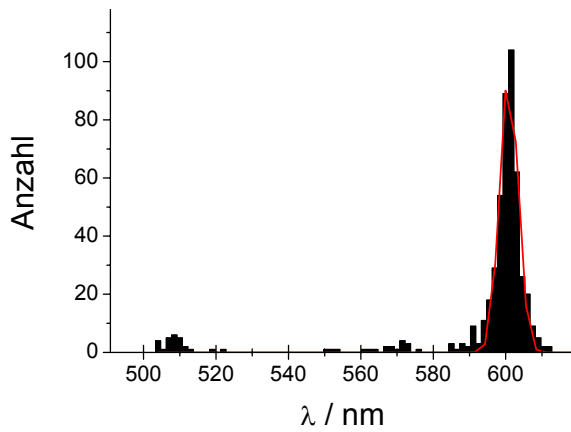


**Abbildung 5.59: Typische Emissionsspektren einzelner DsRed-2 Oligomere**

Wie bereits bei den spektral eng verwandten Proteinen DsRed und E5 wurden bei DsRed-2 hauptsächlich Spektren mit langwelliger super roter Fluoreszenz des gereiften Chromophors (Links) gefunden, im Hintergrund ist das Ensembleemissionsspektrum von DsRed-2 abgebildet. Es ist eine deutliche bathochrome Verschiebung des Emissionsspektrums des einzelnen Oligomers gegenüber dem Ensemblespektrum sichtbar. Außerdem wurden einige Oligomere mit gemischter Fluoreszenz von ungereiftem und gereiftem Chromophor (Mitte) und wenige Oligomere, die die reine kurzwellige Fluoreszenz des ungereiften Chromophors zeigen (Rechts), beobachtet.

Auch das Histogramm der Maximumpositionen der Fluoreszenzbanden, das mit einer Klassengröße von 1,5nm erstellt wurde, zeigt die schon von DsRed und E5 bekannte charakteristische Verteilung (Abbildung 5.60). Die Häufung um 510nm wird durch Oligomere, die wenigstens einen ungereiften Chromophor enthalten, verursacht. Einige nicht den zwei bekannten Formen zuzuordnende Emissionsspektren verursachen die Häufung um 570nm. Die Fluoreszenzmaxima der gereiften Chromophore sind bei DsRed-2 mit einer Standardabweichung von  $2\sigma = 5,0\text{nm}$  um 600nm verteilt. Offensichtlich entsteht auch bei der Spektroskopie von DsRed-2 sehr schnell die super rot fluoreszierende Form des Proteins mit gereiftem Chromophor, so dass ausschließlich diese Form beobachtet wird. Interessant ist die sehr geringe Standardabweichung der Maximumpositionen von nur 5,0nm, die DsRed-2

Fluoreszenzmaxima sind damit sehr viel weniger gestreut als die von DsRed, bzw. E5, obwohl die Fluoreszenz auf den gleichen Chromophor zurückgeht.



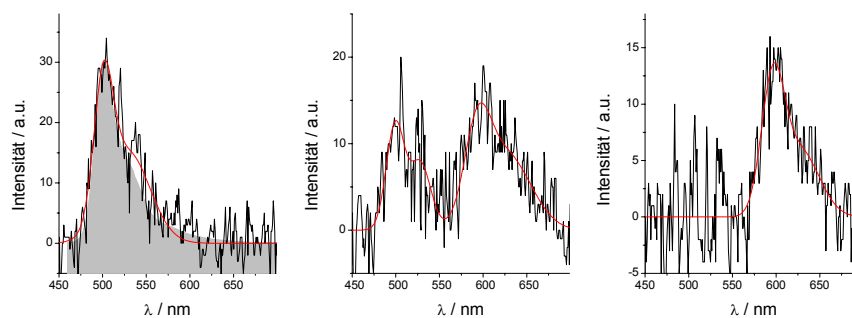
**Abbildung 5.60: Verteilung der Maximumlagen der Emissionsbanden**

Bei DsRed-2 zeigt sich die gleiche charakteristische Verteilung wie bereits bei DsRed und E5. Maximumlagen um 510nm sind dem ungereiften Chromophor zuzuordnen, Maximumlagen um 570nm gehören zu keiner der beiden Chromophore. Die bei weitem meisten Maximumpositionen der Emission sind um 600nm normalverteilt und der super roten Form des ausgereiften Chromophors zuzuordnen.

### 5.2.2.4 AG4

Auch die fast ausschließlich grün fluoreszierende DsRed Variante AG4 wurde bei Einzelmolekülkonzentrationen nacheinander bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen fluoreszenzspektroskopisch vermessen. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm wurden 276 einzelne AG4 Einheiten untersucht, wobei 689 Emissionsspektren erhalten wurden, weitere 158 einzelne Oligomere wurden bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm vermessen, wobei 487 Emissionsspektren erhalten wurden.

Erwartungsgemäß wurde ein zu den rot fluoreszierenden Varianten umgekehrtes Verhältnis von Fluoreszenz des ungereiften zu Fluoreszenz des gereiften Chromophors gefunden. Spektren, die die kurzwellige Emission des ungereiften Chromophors zeigten, überwogen (Abbildung 5.61, links). Daneben wurden wiederum einige Spektren mit gemischter Fluoreszenz des gereiften und ungereiften Chromophors gefunden und einige Spektren nur mit Fluoreszenz des gereiften Chromophors (Abbildung 5.61, mitte und rechts).

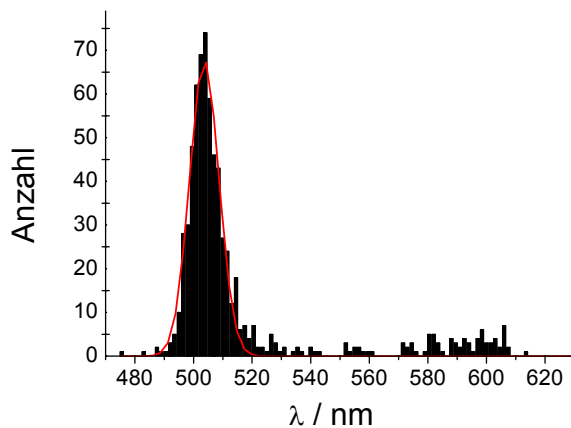


**Abbildung 5.61: Typische Emissionsspektren einzelner AG4 Oligomere**

Auch bei AG4 wurden die drei für DsRed Varianten typischen Arten von Emissionsspektren gefunden. Die kurzwelligen Spektren des ungereiften Chromophors überwogen deutlich (Links), im Hintergrund ist das Ensembleemissionsspektrum von AG4 abgebildet. Das Emissionsspektrum des einzelnen Oligomers und das Ensemblespektrum entsprechen sich. Außerdem wurden Spektren mit gemischter Fluoreszenz (Mitte), bzw. Spektren mit ausschließlicher Fluoreszenz des gereiften Chromophors beobachtet (Rechts).

Die spektralen Lagen der Emissionsmaxima aller mit Anregung bei 458nm aufgenommenen Spektren wurden mit einer Klassengröße von 1,5nm zum Histogramm in Abbildung 5.62 zusammengestellt. Auch bei AG4 ist der größte Teil der Emissionsmaximumlagen normalverteilt, nämlich um 503nm mit einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 10,0 \text{ nm}$ .





**Abbildung 5.62: Verteilung der Maximumlagen der Emissionsbanden**

Die bei weitem meisten Maximumpositionen der Emission sind mit einer Standardabweichung von 10,0nm um 503nm gaussverteilt.

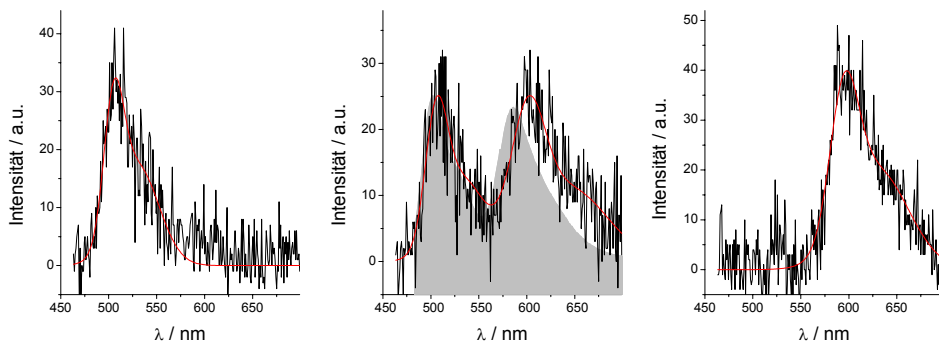
Die wahrscheinlichste Maximumposition bei 503nm entspricht sehr gut dem Fluoreszenzmaximum des Ensembles bei 502nm, was zeigt, dass in diesem Fall der unveränderte AG4 Chromophor spektroskopiert wurde und kein Photoprodukt gebildet wurde.

Die Standardabweichung der Maximumlagen der Emission ist mit  $2 \cdot \sigma = 10,0 \text{ nm}$  gut doppelt so groß wie bei EGFP, welches einen analogen Chromophor aufweist. Hier wird besonders deutlich, dass die Standardabweichung der Maximumpositionen von der Art der Chromophorumgebung abhängt, da der gleiche Chromophor je nach umgebendem Protein deutlich unterschiedliche Verteilungen der Emissionsmaxima zeigt.

### 5.2.2.5 E8

Von E8 wurden bei Anregungswellenlängen von 458nm und 488nm Emissionsspektren einzelner Oligomere aufgenommen. Von den 315 bei 458nm angeregten Oligomeren wurden 1379 Einzelspektren erhalten, von den 329 Oligomeren die bei 488nm angeregt wurden, wurden 2004 Einzelspektren erhalten.

Dass E8 spektral zwischen DsRed und AG4 steht, zeigte sich bei den Emissionsspektren, indem hauptsächlich Spektren einzelner Oligomere mit gemischter Fluoreszenz des gereiften und des ungereiften Chromophors gefunden wurden (Abbildung 5.63, Mitte). Seltener wurden die Spektren, die ausschließlich Fluoreszenz des ungereiften, bzw. des gereiften Chromophors zeigten, gefunden (Abbildung 5.63, Links, Rechts). Wenn Spektren mit gemischter Fluoreszenz beobachtet wurden, war das Intensitätsverhältnis der Banden zueinander nicht festgelegt. E8 bildet demnach ebenfalls gemischte Oligomere aus Proteinen, die unterschiedliche Chromophore enthalten können. Die beobachtete Ensemblefluoreszenz geht also nicht auf nebeneinander vorliegende Oligomere mit ausschließlich ungereiften, bzw. ausschließlich gereiften Chromophoren zurück.

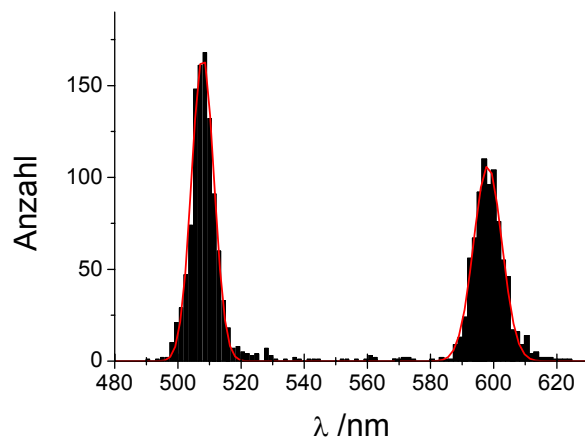


**Abbildung 5.63: Typische Emissionsspektren einzelner E8 Oligomere**

Die spektrale Erscheinung von E8 als Ensemblemischspektrum der Fluoreszenz von ungereiftem und gereiftem Chromophor spiegelt sich in der vornehmlichen Detektion von gemischten Spektren einzelner Oligomere wider (Mitte), im Hintergrund ist das Ensemblefluoreszenzspektrum von E8 abgebildet. Die kurzwellige Fluoreszenzbande von Ensemblespektrum und Einzelmolekülspektrum stimmen in ihrer Lage gut überein, bei der langwelligen Fluoreszenzbande sind wiederum Abweichungen um einige Nanometer sichtbar. Seltener wurden Oligomere mit reiner Emission des ungereiften (Links) oder des gereiften Chromophores (Rechts) beobachtet.

Die Verteilung der Positionen der Emissionsbandenmaxima wurde für Anregung bei 458nm bestimmt, wobei die Positionen der Fluoreszenzmaxima der kurzwelligen und der langwelligen Fluoreszenz mit einer Klassengröße von 1,5nm zu einem Histogramm zusammengestellt wurden (Abbildung 5.64). Bei 1065 Einzelspektren war die

kurzwellige Fluoreszenzbande des ungereiften Chromophors sichtbar, bei 835 Einzelspektren war die langwellige Fluoreszenzbande des gereiften Chromophors sichtbar. Auch hier wird eine Gaussverteilung der Maximumpositionen für die Fluoreszenz beider unterschiedlicher Chromophore deutlich. Die kurzwellige Fluoreszenz des ungereiften Chromophors ist mit einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 7,0 \text{ nm}$  um  $507 \text{ nm}$  verteilt, die langwellige Fluoreszenz des gereiften Chromophors ist mit einer Standardabweichung von  $2 \cdot \sigma = 9,0 \text{ nm}$  um  $598 \text{ nm}$  verteilt.



**Abbildung 5.64: Verteilung der Maximumlagen der Emissionsbanden**

Da E8 sowohl deutliche Fluoreszenz des ungereiften, wie auch des gereiften Chromophors zeigt, werden zwei Gaussverteilungen der Maximumlagen beobachtet, wobei die kurzwellige Verteilung der Fluoreszenz des ungereiften Chromophors und die langwellige Verteilung der Fluoreszenz des gereiften Chromophors zugeordnet ist.

Die Verteilungen entsprechen in ihrer Lage bis auf einige Nanometer den wahrscheinlichsten Maximumlagen, die für AG4 und DsRed bestimmt wurden, die dennoch beobachteten Abweichungen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf substanzbedingte Unterschiede zurückzuführen. Auch bei E8 kommt es offensichtlich, analog zu DsRed und allen anderen DsRed Varianten mit gereiftem Chromophor, zu einer schnellen Bildung der super roten Form, was die monomodale Verteilung um  $598 \text{ nm}$  zeigt.

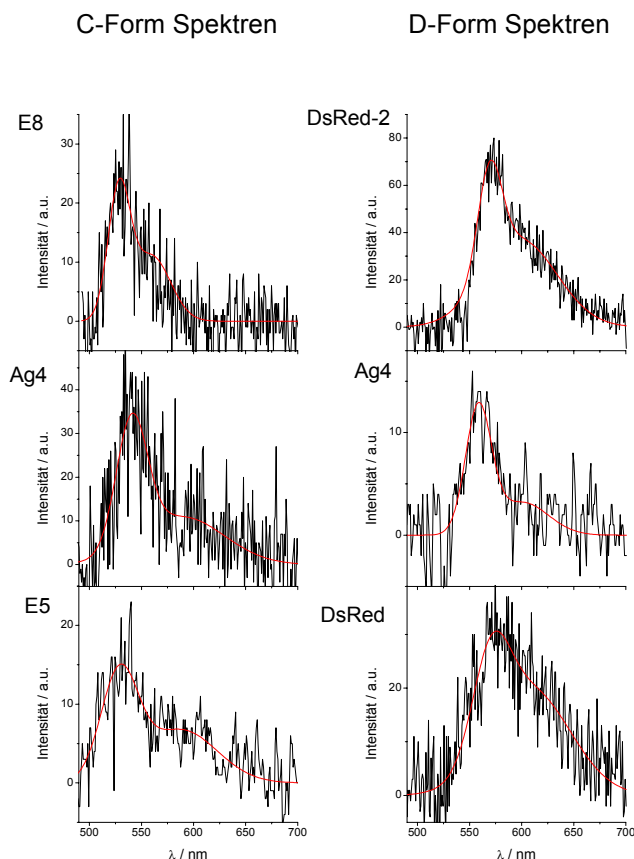
### 5.2.2.6 Seltene spektrale Formen von DsRed und dessen Varianten

In der Hauptsache wurden für DsRed und alle DsRed Varianten Fluoreszenzspektren gefunden, die bekannten Formen der Proteine zugeordnet werden konnten. Zum einen waren dies Spektren mit Fluoreszenzmaximum unterhalb von 510nm, die von Proteinen mit ungereiftem Chromophor stammen, zum anderen waren dies Fluoreszenzspektren längerwellig als 580nm, die von Proteinen mit gereiftem Chromophor entweder in der im Ensemble vorherrschenden Form, bzw. der super roten Form stammten.

Jedoch zeigen die Histogramme der Maximumlagen aller untersuchten DsRed Varianten eine geringe Anzahl an Spektren mit Maximum zwischen 520nm und 580nm, die keiner dieser Formen zuzuordnen sind (vgl. Abbildung 5.58, Abbildung 5.60, Abbildung 5.62, Abbildung 5.64). Diese Maxima gruppieren sich vornehmlich um zwei Positionen, nämlich um 535nm und 565nm, wobei es zu gewissen Verschiebungen der Lagen für die verschiedenen Varianten kommt.

Die Häufung der Maximumpositionen bei zwei deutlich unterschiedlichen Wellenlängen und die Beobachtung der Umwandlung der Spektren in zuordenbare Spektren (siehe unten) macht deutlich, dass es sich bei den Spektren um die Fluoreszenz von bisher nicht beschriebenen Formen handelt. In Anlehnung an die Benennung der Formen, die für die GFP Varianten gefunden wurden, wird die Form mit Fluoreszenzmaximum um 535nm als C-Form und die mit Fluoreszenzmaximum um 565nm als D-Form bezeichnet. Die Fluoreszenz der hier als C-Form bezeichneten Form wurde in der Literatur bereits an einer Stelle erwähnt, wurde jedoch fälschlich als „grüne Fluoreszenz“ des Zwischenprodukt Chromophors bezeichnet [30]. C-Form Spektren wurden in dieser Untersuchung von DsRed auf Einzelmolekülebene deutlich häufiger gefunden als bei der hier vorliegenden Untersuchung.

Beispiele für Spektren beider Formen bei unterschiedlichen Varianten sind in Abbildung 5.65 gezeigt. Da zu jeder Form jeder Variante nur eine begrenzte Anzahl an Fluoreszenzspektren zur Auswahl stand, konnte die Form der Spektren bei der Auswahl der Beispielspektren nicht berücksichtigt werden. Es ist davon auszugehen, dass die Unterschiede in der Form der Spektren die individuelle Natur der Spektren einzelner Proteineinheiten widerspiegeln und nicht auf grundsätzliche Unterschiede zurückzuführen sind.



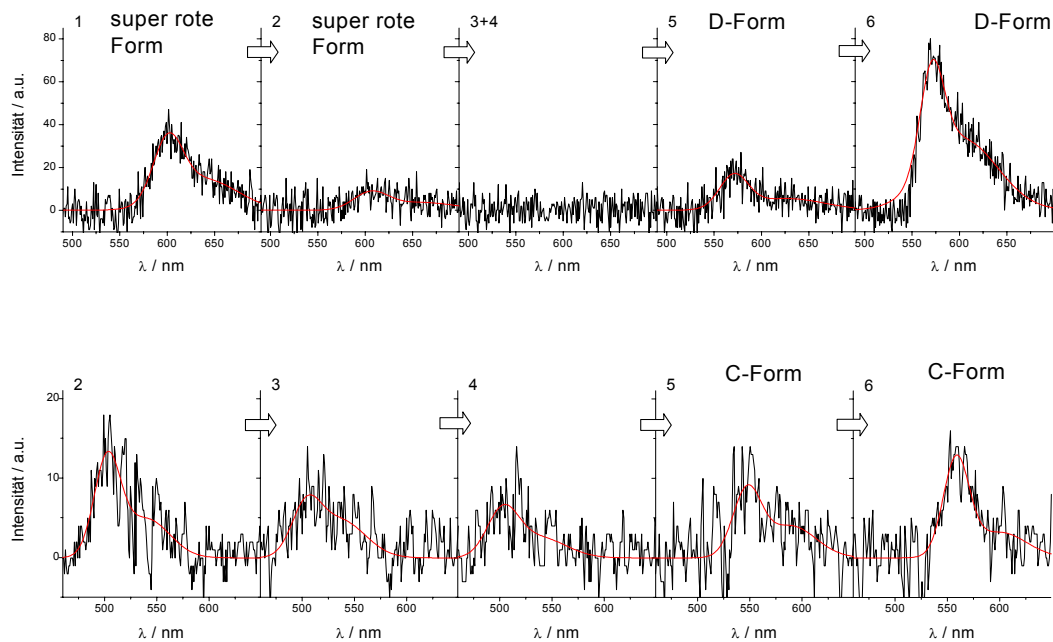
**Abbildung 5.65: Seltene spektrale Formen aller DsRed Varianten**

Bei DsRed und allen untersuchten Varianten wird die Fluoreszenz zweier weiterer fluoreszierender Formen, die als C- und D-Form bezeichnet werden, beobachtet.

Zum einen sind dies Spektren der C-Form mit Maximum um 535nm (Links) und zum anderen D-Form Spektren mit Maximum um 565nm (Rechts). Die Unterschiede in der Form der Spektren werden der individuellen Natur der Spektren zugeschrieben und sind nicht auf prinzipielle spektrale Unterschiede der Formen je nach Variante zurückzuführen.

Wie bereits bei allen anderen spektral unterschiedlichen Formen der fluoreszierenden Proteine wurden auch für diese Formen der DsRed Varianten Übergänge zwischen den vorherrschenden Emissionsspektren der Proteine und den Formen mit Fluoreszenzmaximum um 535nm und 565nm beobachtet. Zwei beispielhafte Übergänge zu den Formen sind in Abbildung 5.66 dargestellt. In Abbildung 5.66 oben ist eine Spektrenserie gezeigt, die bei der Untersuchung von DsRed-2 bei Anregung mit 488nm detektiert wurde. Zunächst ist das Spektrum der für Einzelmolekülspektroskopie typischen super roten Form sichtbar, während der zweiten Integrationszeit von jeweils einer Sekunde verschwindet die Fluoreszenz und die Proteineinheit bleibt für weitere zwei komplette Integrationszeiten in einem nicht fluoreszierenden Zustand. Während des fünften und sechsten Beobachtungsintervalls ist schließlich D-Form Fluoreszenz mit Maximum um 570nm zu sehen.

Die zweite Spektrenserie stammt von AG4, welches bei 458nm angeregt wurde, und zeigt eine Umwandlung zwischen der typischen kurzwelligen AG4 Fluoreszenz und der C-Form Fluoreszenz mit Maximum um 535nm. In dem hier gezeigten Fall kann keine Dunkelzeit aufgelöst werden.



**Abbildung 5.66: Übergang zwischen den vorherrschenden Spektren und C- und D-Form Spektren bei DsRed Varianten**

Oben: Spektrenserie einer DsRed-2 Einheit, die die Veränderung der typischen Fluoreszenz der super roten Form zur D-Form Fluoreszenz zeigt. Zwischen den für die Formen typischen Spektren trat eine Dunkelzeit ohne detektierbare Fluoreszenz von über zwei Sekunden auf.

Unten: Spektrenserie einer AG4 Einheit, die den Übergang von der für den unreifen Chromophor typischen Fluoreszenz zur Fluoreszenz der C-Form zeigt, ohne dass dabei eine Dunkelzeit zeitlich aufgelöst werden kann.

Die bei DsRed und dessen Varianten beobachteten Formen mit Fluoreszenzmaximum um 535nm und um 565nm weisen deutliche Parallelen zu den bei GFP Varianten gefundenen Spektren der C- und D-Form auf. Die Lagen der Spektren der C- und D-Form der Aequorea GFP Varianten stimmen gut mit den hier gefundenen Lagen der C- und D-Form Spektren der DsRed Varianten überein. Analog zu den GFP Varianten wurden auch bei den Übergängen der DsRed Varianten in die C- und D-Form verschieden ausgedehnte Dunkelzeiten zwischen dem Verschwinden der Fluoreszenz der einen Form und dem Erscheinen der Fluoreszenz der anderen Form gefunden.

Insgesamt ergeben sich damit starke Hinweise darauf, dass die beobachteten Formen von GFP und DsRed Varianten vergleichbare molekulare Ursachen haben. Dies ist ein weiterer Beleg für die Hypothese, dass auch bei den GFP Varianten die Ausbildung eines DsRed analogen Chromophors möglich ist (vgl. Kapitel 5.1.5.1), und unterstreicht einmal mehr die Ähnlichkeit der chromophoren Systeme zwischen den fluoreszierenden Proteinen unterschiedlichen Ursprungs, auch wenn die gesamte Aminosäurehomologie zwischen den einzelnen Proteinen nur gering ist.

### **5.2.2.7 Vergleich der Standardabweichungen der Verteilungen der Maximumpositionen**

Es fällt auf, dass die ermittelten Standardabweichungen der Verteilungen der Positionen des Emissionsmaximums der jeweils vorherrschenden Fluoreszenz für die verschiedenen Proteine deutlich unterschiedlich sind. Es ist nicht zulässig, die Streuung der Maximumlagen unterschiedlicher Chromophore direkt miteinander zu vergleichen. Der Vergleich der Standardabweichungen der Verteilungen gleicher Chromophore mit unterschiedlicher Chromophorumgebung ist jedoch möglich und wurde bei den GFP Varianten im Rahmen dieser Arbeit auch schon durchgeführt (vgl. Kapitel 5.1.6.1).

Der von der Röntgenstrukturanalyse von DsRed ausgehende Vergleich verschiedener DsRed Varianten deutet darauf hin, dass die Geschwindigkeit des Reifungsprozesses des Chromophors und auch das Endverhältnis von ungereiftem zu gereiftem Chromophor stark von der unmittelbaren Umgebung des Chromophors abhängt. Je weniger Atome oder Atomgruppen in van der Waals Kontakt mit dem Chromophor sind, je mehr freier Platz also um den Chromophor verfügbar ist, desto schneller und vollständiger reift der grün fluoreszierende Zwischenproduktchromophor zum rot fluoreszierenden Chromophor [69]. AG4 zeigt fast ausschließlich kurzwellige Fluoreszenz, da aufgrund der sehr dichten Einbettung des Chromophors nur in einem sehr kleinen Teil der Proteine der Zwischenproduktchromophor zum rot fluoreszierenden Chromophor ausreift. Im DsRed Protein ist der Chromophor weniger dicht eingebettet, was dazu führt, dass ein weitaus größerer Teil der Chromophore zum rot fluoreszierenden Chromophor reift [69].

Die beiden anderen rot fluoreszierenden Proteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, nämlich DsRed-2 und E5 können ebenfalls entsprechend diesem Schema eingeordnet werden. DsRed-2 reift schneller als DsRed, der Chromophor ist demnach lockerer eingebettet, E5 zeigt deutliche grüne Fluoreszenz vor dem Ausreifen und reift langsamer als DsRed, der Chromophor ist demnach fester eingebettet als in DsRed. Analog kann auch E8 eingeordnet werden, das Protein nimmt eine Zwischenstellung zwischen AG4 und DsRed ein, da ein deutlich höherer Anteil der Chromophore als beim AG4 ausreift, jedoch der Anteil an rot fluoreszierenden Chromophoren noch deutlich unter dem von DsRed liegt. Für die Einbettung des Chromophors bedeutet dies, dass der Chromophor weniger stark eingebettet ist als in AG4, aber stärker als in DsRed.

Wie bei den GFP Varianten zeigt sich ein klarer Trend zwischen Streuung der spektralen Verteilung der Maximumlagen der Einzelmolekülfluoreszenz und der

Einbettung der Chromophore im Protein. Die Stärke der Einbettung oder die Anzahl von Atomen oder Atomgruppen in van der Waals Kontakt mit dem Chromophor nimmt in der Reihenfolge E8, E5, DsRed zum DsRed-2 hin, ab. Für die Standardabweichung der Maximumlagen erhält man 9,0nm für E8, 8,2nm für E5, 7,3nm für DsRed und 5,0nm für DsRed-2. Die Standardabweichung der Maximumlagen nimmt in der Reihenfolge der Anzahl der Atome oder Atomgruppen in van der Waals Kontakt mit dem Chromophor, also wie die Stärke der Einbettung der Chromophore in die Proteinumgebung, ab.

Das gleiche Ergebnis zeigt sich beim Vergleich von AG4 und dem kurzwelligem Chromophor in E8, nämlich eine Standardabweichung der Verteilung der Maximumlagen von 10,0nm in AG4 und nur 7,0nm im weniger dicht gepackten E8.

Es wird deutlich, dass der schon für GFP Varianten gefundene Zusammenhang zwischen Anzahl der Atome und Atomgruppen in van der Waals Kontakt mit dem Chromophor und der Standardabweichung der Verteilung der Maximumpositionen der Emission auch auf die untersuchten DsRed Varianten zutrifft. Je mehr Atome oder Atomgruppen in van der Waals Kontakt mit dem Chromophor sind, desto größer ist die Standardabweichung der Maximumpositionen der Emission. Die Ursache für diesen Zusammenhang besteht darin, dass jedes Atom und jede Atomgruppe in Kontakt mit dem Chromophor die Fluoreszenz des Chromophors beeinflusst. Thermisch angeregte strukturelle Fluktuationen verändern ständig die Anzahl und Stärke der Kontakte zwischen dem Chromophor und dessen unmittelbarer Umgebung. Je mehr Möglichkeiten des Kontaktes bestehen, desto deutlicher können die Veränderungen der Fluoreszenz ausfallen, was in der größeren spektralen Verteilung der Fluoreszenzmaxima sichtbar wird.

Die Standardabweichung der Maximumpositionen stellt damit ein Maß für die Dichte der Einbettung des Chromophors in das Protein dar.

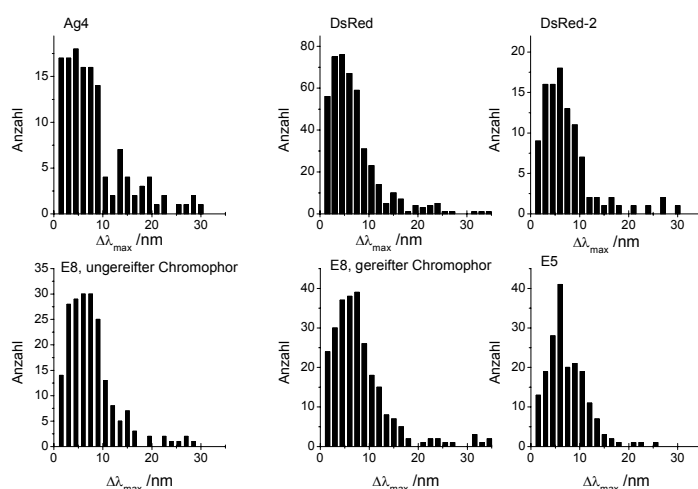


### 5.2.3 Spektrale Diffusion von DsRed und dessen Varianten

Da auch bei DsRed und dessen Varianten Serien von aufeinander folgenden Fluoreszenzspektren aufgenommen wurden, kann auch für diese Proteine die Veränderung von spektralen Eigenschaften mit der Zeit verfolgt werden. Zwei aufeinander folgende Emissionsspektren eines einzelnen Oligomers waren nur in den seltensten Fällen gleich, praktisch immer sind Veränderungen, wie z.B. der Lage oder Intensität des Emissionsmaximums, der Form des Spektrums oder Ähnliches, zu beobachten gewesen.

Wie bei den GFP Varianten wurde auch bei den von DsRed und dessen Varianten aufgenommenen Spektren diffusionsartige Änderungen der spektralen Lage des Emissionsmaximums beobachtet.

Die Auswertung der Verteilung der spektralen Lage aller Emissionsspektren in Kapitel 5.2.2 zeigt an, welche Maximumpositionen auftreten, sie macht aber keine Aussage über das spektrale Verhalten einzelner Oligomere. Um die Veränderungen der spektralen Lage des Emissionsspektrums pro beobachtetem Oligomer abzuschätzen, wird die Weite der beobachteten spektralen Diffusion der Lage der Emissionsmaxima pro beobachteter Einheit in einem Histogramm zusammengestellt. Die Weite der spektralen Diffusion wird für jedes beobachtete Proteinoligomer bestimmt, indem die Differenz zwischen der Lage des langwelligsten und kurzwelligsten beobachteten Maximum eines Spektrums eines Oligomers gebildet wird. Die erhaltenen Werte wurden dann mit einer Klassengröße von 1,5nm zu den Histogrammen in Abbildung 5.67 zusammengestellt.



**Abbildung 5.67: Spektrale Diffusion der Lage des Emissionsmaximums von DsRed und dessen Varianten pro Oligomer**

Die Verteilung der Weite der spektralen Diffusion der Lage des Emissionsmaximums ist qualitativ für alle beobachteten Chromophore ähnlich, obwohl die Verteilungen der Maximumlagen aller Spektren einer Variante zum Teil deutliche Unterschiede aufweisen.

Ausgewertet wurden für den ungereiften Chromophor, also für AG4 und für die kurzwellige Fluoreszenz von E8, Spektrenserien, die bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm aufgenommen wurden. Von AG4 konnten 135 und von E8 204 Einheiten ausgewertet werden, bei denen jeweils mehr als ein Fluoreszenzspektrum mit entsprechender Fluoreszenz vorlag (Abbildung 5.67, linke Spalte). Für die Auswertung von DsRed, DsRed-2 und des gereiften Chromophors von E8 wurden Spektren von Oligomeren, die mit 488nm angeregt wurden, verwendet, bei E5 Spektren von Oligomeren, die bei 458nm angeregt wurden. Von DsRed konnten die Spektren von 448 Einheiten, von DsRed-2 von 103 Einheiten, von E5 von 188 Einheiten und vom gereiften E8 Chromophor konnten die Spektren von 278 Einheiten ausgewertet werden.

Der Vergleich zeigt, dass sich sowohl der ungereifte Chromophor in AG4 und der ungereifte Chromophor in E8 als auch der gereifte Chromophor in DsRed und alle untersuchten Varianten bezüglich der spektralen Diffusion der Lage des Emissionsmaximums pro beobachtetem Oligomer ähnlich verhalten. Die Wahrscheinlichkeit, bei der Beobachtung eines einzelnen Oligomers eine Veränderung der Lage des Emissionsmaximums von mehr als 6nm zu beobachten, beträgt für den ungereiften Chromophor in AG4 50% und in E8 51%, bei den gereiften Chromophoren in DsRed 39%, in E8 52%, in E5 47% und in DsRed-2 43%.

Die erhaltenen Werte für den ungereiften Chromophor stimmen sehr gut überein, die Abweichungen beim gereiften Chromophor sind durch die unterschiedlichen Chromophorumgebungen der Varianten und die nicht völlig gleichen Bedingungen des Experiments zu erklären. Es wird an dieser Stelle deutlich, dass unter Bedingungen des Einzelmolekülexperimentes mit nicht unerheblicher spektraler Diffusion der Lage des Emissionsmaximums innerhalb der möglichen Beobachtungszeit eines einzelnen Oligomers gerechnet werden muss.

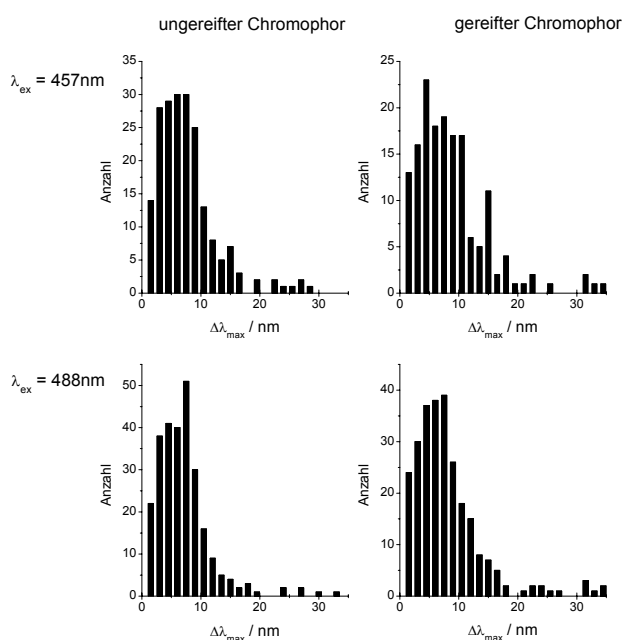
Interessant ist, dass für den ungereiften Chromophor ähnliche spektrale Diffusion gefunden wurde wie für den gereiften Chromophor, obwohl die Verteilung der Maximumlagen für den ungereiften Chromophor deutlich größer ist (vgl. Kapitel 5.2.2). Zu erklären ist dies durch das schnellere Bleichen des ungereiften Chromophors (vgl. Kapitel 5.2.1). Da ein Grund für spektrale Diffusion zufällige strukturelle Umlagerungen in der Chromophorumgebung sind, bedeutet ein schnelleres Ausbleichen, dass weniger ausgeprägte spektrale Diffusion mit dieser Ursache beobachtet wird.

Um die spektrale Diffusion der Lage des Emissionsmaximums des ungereiften und des gereiften Chromophors direkt miteinander zu vergleichen, ist E8 das ideale System. Dadurch, dass in E8 sowohl Fluoreszenz des ungereiften als auch des gereiften

Chromophors beobachtet wird, kann im gleichen Experiment die Veränderung der Fluoreszenz beider Chromophore bestimmt werden, was den Vorteil hat, dass die experimentellen Parameter für beide Chromophore gleich sind.

Die spektrale Diffusion der Lage der Emissionsmaxima pro beobachtetem Oligomer wurde bestimmt und mit einer Klassengröße von 1,5nm in das in Abbildung 5.68 gezeigte Histogramm eingetragen. Für Anregung bei 458nm konnten für den ungereiften Chromophor die Spektren von 204 Oligomeren ausgewertet werden, für den gereiften Chromophor die Spektren von 175 Oligomeren. Bei 50% der beobachteten kurzwelligen Fluoreszenz um 500nm wurden spektrale Verschiebungen der Maximumposition von mehr als 6nm gefunden, bei der langwelligen Fluoreszenz um 598nm wurde in 60% der Spektrenserien eine Änderung der spektralen Lage von mehr als 6nm beobachtet.

Bei Anregung mit 488nm wurde die kurzwellige Fluoreszenz von 269 Oligomeren und die langwellige Fluoreszenz von 271 Oligomeren analysiert, wobei 48%, bzw. 52% der Spektrenserien Veränderungen der Lage der jeweiligen Fluoreszenz von mehr als 6nm zeigten.



**Abbildung 5.68: Spektrale Diffusion in E8**

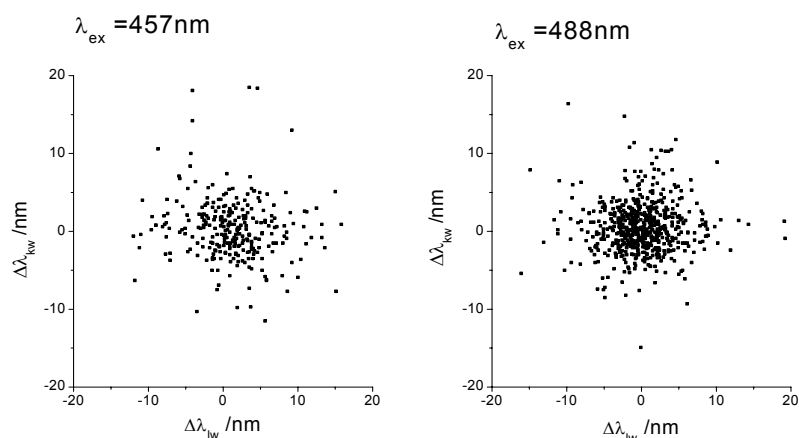
Vergleich der spektralen Diffusion der einzelnen Maximumlagen der Fluoreszenzbanden des E8 bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen.

Obere Reihe: Anregung mit 458nm  
 Untere Reihe: Anregung mit 488nm  
 Linke Spalte: ungereifter Chromophor  
 Rechte Spalte: gereifter Chromophor

Die beobachtete spektrale Diffusion der Lage des Emissionsmaximums ist in allen Fällen vergleichbar.

Da bei vielen einzelnen E8 Oligomeren sowohl Fluoreszenz des ungeriffen wie auch des gereiffen Chromophors beobachtet werden kann, kann für diese Oligomere mit gemischten Monomeren untersucht werden, ob die Veränderungen der Maximumpositionen der Fluoreszenz der spektral unterschiedlichen Chromophore zusammenhängen.

Hierbei hat die Gesamtveränderung der Maximumposition der beiden Fluoreszenzbanden während der photophysikalischen Lebensdauer des Oligomers nur wenig Aussagekraft, da rote und grüne Fluoreszenz auch durchaus nacheinander und nicht gleichzeitig auftreten können. Ausgewertet wurden deshalb nur aufeinander folgende Spektren einer Serie, in denen jeweils beide Fluoreszenzbanden sichtbar waren. Es wurde jeweils die Differenz der Positionen der Bandenmaxima zweier aufeinander folgender Spektren gebildet und gegen die Differenz der Positionen der Bandenmaxima der zweiten Bande aufgetragen. Man erhält so eine Auftragung, die die Veränderung der Emissionsmaximalagen beider Fluoreszenzbanden aufeinander folgender Spektren in Abhängigkeit voneinander darstellt.



**Abbildung 5.69: Auftragung spektraler Diffusion der Lagen der Emissionsmaxima des gereiffen Chromophors gegen die des ungeriffen Chromophors**

Die Auftragung der spektralen Diffusion der Lage des Emissionsmaximums der zwei Fluoreszenzbanden gegeneinander, die aus jeweils aufeinander folgenden Spektren, die jeweils Fluoreszenz von beiden Chromophoren zeigten, ermittelt wurde, zeigt die Unabhängigkeit der Diffusion der Lage des Emissionsmaximums der Fluoreszenz des ungeriffen Chromophors von der Diffusion der Lage der Fluoreszenz des gereiffen Chromophors in gemischten Oligomeren.

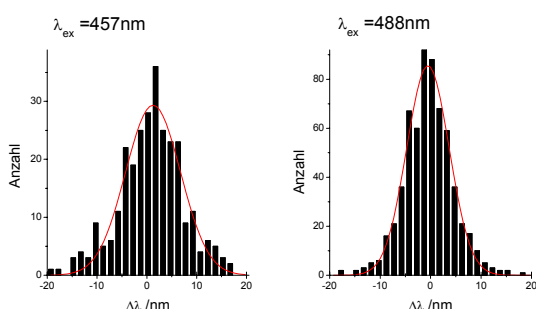
$\Delta\lambda_{lw}$  : Differenz der Lagen der langwelligen Bandenmaxima (gereifter Chromophor)

$\Delta\lambda_{kw}$  : Differenz der Lagen der kurzwelligen Bandenmaxima (ungeriefer Chromophor)

Für Anregung bei 458nm konnten 284 aufeinander folgende Spektren, für Anregung bei 488nm 624 aufeinander folgende Spektren analysiert werden. Die sich sowohl für die Anregung mit 458nm als auch mit 488nm ergebende wolkenartige Verteilung der

Punkte um den Ursprung zeigt, dass sich die spektralen Lagen der Bandenmaxima unabhängig voneinander verändern (Abbildung 5.69). Für spektrale Diffusion, die auf zufällige strukturelle Veränderungen der Chromophorumgebung zurückgeht, entspricht dies der Erwartung, da davon ausgegangen werden kann, dass diese Fluktuationen in ihrer Wirkung nicht über das jeweilige Monomer hinausreichen.

Aus Daten, die den Korrelationsdiagrammen in Abbildung 5.69 zugrunde liegen, kann ein Histogramm, welches die Verteilung der Veränderung des spektralen Abstands zwischen den Bandenmaxima darstellt, erstellt werden. Hierzu wird die Differenz der spektralen Veränderungen beider Bandenmaximumlagen gebildet und in das Histogramm mit einer Klassengröße von 1,5nm eingetragen (Abbildung 5.70). Werte unter Null stehen für ein Auseinanderdiffundieren der Bandenmaxima, Werte über Null zeigen ein Aufeinanderzudiffundieren der Bandenmaxima. Die Verteilungen können gut durch Gaussverteilungen beschrieben werden, deren Maximum jeweils um 0nm liegt. Die Standardabweichung ist bei Anregung mit 458nm mit  $2 \cdot \sigma = 11,0\text{nm}$  größer als bei Anregung mit 488nm, wo die Standardabweichung 8,4nm beträgt. Diese Werte spiegeln die bereits festgestellte etwas größere Diffusion im Experiment mit Anregung bei 458nm im Vergleich zu 488nm wider (vgl. Abbildung 5.68). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich von einem Spektrum zum darauf folgenden der spektrale Abstand zwischen den Bandenmaxima um mehr als 3,5nm ändert, beträgt bei Anregung mit 458nm 48% und bei Anregung mit 488nm 36%.



**Abbildung 5.70: Verteilung der spektralen Abstandsänderung**

Die Verteilung der Veränderung des spektralen Abstandes zwischen den Bandenmaxima aufeinander folgender Spektren ist normalverteilt. Die Standardabweichung im Experiment mit Anregung von 488nm ist etwas größer als die bei 458nm beobachtete Standardabweichung, was aus der bereits festgestellten etwas größeren spektralen Diffusion bei Anregung bei 458nm resultiert.

Bedeutung haben die hier erhaltenen Ergebnisse besonders für die Auswertung von Einzelmolekül FRET Untersuchungen von FRET Systemen aus fluoreszierenden Proteinen. In solchen Systemen ist der spektrale Überlapp von Donor Fluoreszenz und Akzeptor Absorption von zentraler Bedeutung. Das Akzeptor Absorptionsspektrum einzelner Chromophore ist nicht zugänglich, weshalb das Modell des konstanten

Stokes Shifts angewandt werden soll, was, sicher vereinfachend, postuliert, dass eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums eine ebensolche Entsprechung der Verschiebung des Absorptionsspektrums hat. Für diesen Fall zeigen die in Abbildung 5.70 dargestellten Verteilungen die spontane Verschiebung der für FRET entscheidenden Spektren gegeneinander an, woraus die Veränderung der FRET Effizienz ohne Veränderung des Abstandes oder der Orientierung der FRET Partner zueinander abgeleitet werden kann (Kapitel 5.2.4). Diese Werte müssen schließlich bei der Auswertung des Experimentes berücksichtigt werden, wenn die Veränderungen der Orientierung und des Abstandes der FRET Partner bestimmt werden.

### **5.2.4 Abschätzung der Auswirkung spektraler Verschiebung auf das spektrale Überlappungsintegral zweier FRET Partner**

Ein Ziel bei der Variation der verschiedenen fluoreszierenden Proteine war und ist es, geeignete Proteine zu schaffen, die als FRET Partner, auch auf Einzelmolekülebene, fungieren können. Gerade die Beobachtung eines einzelnen FRET Paares ermöglicht die unmittelbare Beobachtung struktureller Veränderungen, vorausgesetzt, es ist möglich, zwischen Veränderungen der FRET Effizienz aufgrund von Abstands- und Orientierungsänderungen und spontanen Veränderungen, z.B. durch Veränderung des spektralen Überlappungsintegrals oder der Fluoreszenzquantenausbeuten, zu unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Proteins oder eines Oligomers zeitlich fluktuieren kann, ebenso können die Lagen der Fluoreszenzspektren einzelner fluoreszierender Proteine untereinander als auch eines Proteins mit der Zeit variieren.

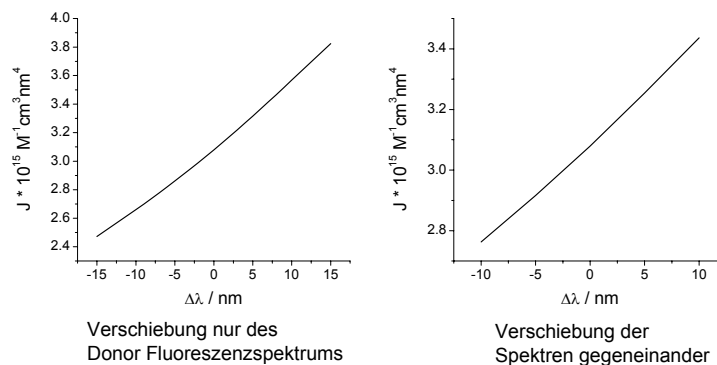
An dieser Stelle soll abgeschätzt werden, wie groß der Einfluss der Fluktuation der Lage der Spektren auf das spektrale Überlappungsintegral und damit auf die beobachtete FRET Kopplung eines FRET Paares ist. Betrachtet wird hier ein hypothetisches FRET Paar aus AG4 als FRET Donor und DsRed als FRET Akzeptor. Ein solches FRET Paar wird zwar kaum realisiert werden, da beide Proteine als Oligomer vorliegen, was hier jedoch nicht von Bedeutung ist, da nur eine Abschätzung des Einflusses der spektralen Verschiebung von zu AG4 und DsRed spektral vergleichbaren fluoreszierenden Proteinen durchgeführt werden soll.

Das Spektrale Überlappungsintegral wird entsprechend der unten stehenden Formel (Kapitel 2.3) berechnet:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda$$

Da das Absorptionsspektrum eines einzelnen Moleküls keine zugängliche Größe ist, wurden statt der Einzelmolekülspektren die Ensemble Absorptions- und Fluoreszenzspektren verwendet, wobei dem Absorptionsmaximum des DsRed bei 558nm ein Extinktionskoeffizient von  $75000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  zugeordnet wurde [42].

Das spektrale Überlappungsintegral für AG4 und DsRed beträgt ausgehend von den Ensemblespektren  $J = 3.08 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1}\text{cm}^3\text{nm}^4$ . In Abbildung 5.71 links ist die Veränderung des spektralen Überlappungsintegrals bei Verschiebung des Fluoreszenzspektrums des FRET Donors und gleichzeitigem Beibehalten der spektralen Lage des Absorptionsspektrums des FRET Akzeptors aufgetragen. In Kapitel 5.2.3 wurde ermittelt, dass bei 50% der AG4 Proteine spektrale Diffusion über 6nm zu beobachten ist. Eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums um 6nm in jede Richtung führt jeweils zu einem Anstieg oder Abfall des spektralen Überlappungsintegrals von ca. 9%, was im gleichen Maße die Energietransferrate zwischen den Chromophoren beeinflusst, jeweils vorausgesetzt, das Absorptionsspektrum des FRET Akzeptors bleibt unverändert.



**Abbildung 5.71: Veränderung des spektralen Überlappungsintegrals bei Verschiebung der Spektren**

Links: Veränderung des spektralen Überlappungsintegrals, wenn sich nur das Fluoreszenzspektrum des FRET Donors verschiebt und das Absorptionsspektrum des FRET Akzeptors unverändert bleibt.

Rechts: Fluoreszenzspektrum des Donors und Absorptionsspektrum des FRET Akzeptors verschieben sich gegeneinander, wobei jedes Spektrum die Hälfte der Gesamtverschiebung erfährt.

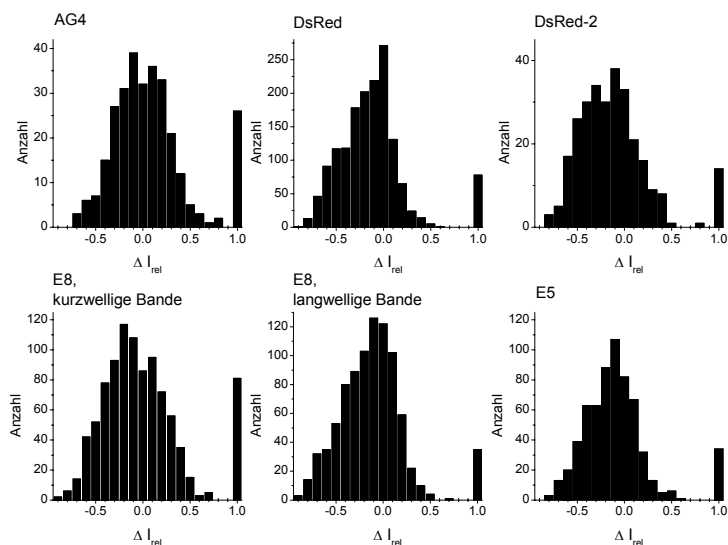
In Kapitel 5.2.3 wurde auch die Verschiebung des Fluoreszenzspektrums des Donors gegen das Absorptionsspektrum des Akzeptors unter der Annahme eines konstanten Stokes Shifts beim FRET Akzeptor diskutiert. Um die Auswirkungen der Verschiebung beider Spektren abschätzen zu können, ist in Abbildung 5.71 rechts der Fall der gleichzeitigen Verschiebung der Spektren um den selben Betrag gegeneinander aufgetragen. Positive Verschiebungen zeigen eine geringere Differenz zwischen den Spektrenmaxima an, negative Werte bedeuten, dass sich die Maximumlagen voneinander entfernen. Eine Verschiebung der Spektren von 5nm in jede Richtung gegeneinander führt zu einem Anstieg oder Abfall des spektralen Überlappungsintegrals um 5%.

Es wird deutlich, dass der Einfluss von Diffusion der Maximumlagen der Fluoreszenz des FRET Donors und der Absorption des FRET Akzeptors ebenso wie spontane Intensitätsänderungen der Donor- und Akzeptorfluoreszenz bei der Auswertung von Einzelmolekül-FRET Experimenten mit fluoreszierenden Proteinen nicht vernachlässigt werden kann. Nur deutlichere und häufigere Veränderungen der Energietransferraten als die Fluktuationen, die aufgrund der hier beschriebenen spontanen Veränderungen zu erwarten sind, können als Beleg für Abstands- und Orientierungsänderungen der FRET Partner angesehen werden.

### **5.2.5 Fluktuationen der Fluoreszenzintensität**

Wie bei der Beobachtung der Aequorea GFP Varianten wurden auch bei der Beobachtung von DsRed und dessen Varianten sehr häufig Intensitätsfluktuationen beobachtet. Wie in Kapitel 5.1.7 für die Aequorea GFP Varianten, sind in Abbildung 5.72 die von einem Spektrum zum nächsten innerhalb einer Serie beobachteten relativen Intensitätsänderungen des Maximums der jeweiligen Fluoreszenzbande für die verschiedenen Varianten in Histogrammen zusammengestellt. Angeregt wurde die Fluoreszenz jeweils bei 488nm, außer bei E5, welches mit 458nm angeregt wurde. Am auffälligsten gegenüber den entsprechenden Histogrammen der Aequorea GFP Varianten ist das vergleichsweise seltene Erscheinen einer Bande, dargestellt durch den Wert +1 der relativen Intensitätsänderung. Das vergleichsweise seltene Erscheinen einer Fluoreszenzbande ist eine Folge der Untersuchung von Oligomeren. Der Wechsel eines Proteins eines Oligomers in einen nicht strahlenden Zustand und zurück in einen strahlenden Zustand kann nur dann als Erscheinen von Fluoreszenz detektiert werden, wenn die anderen Proteine des Oligomers nicht fluoreszieren.





**Abbildung 5.72: Relative Intensitätsfluktuationen von DsRed und dessen Varianten**

Aufgrund der Ausbildung von Oligomeren wird bei DsRed und dessen Varianten deutlich seltener als bei den Aequorea GFP Varianten das Erscheinen einer Fluoreszenzbande,  $\Delta I_{\text{rel}} = +1$ , beobachtet. Die kurzwellige Fluoreszenz des ungereiften Chromophors von AG4 und E8 zeigt insgesamt deutlich ausgeprägtere Fluktuationen als die langwellige Fluoreszenz von DsRed, DsRed-2, E5 und E8. Die Wahrscheinlichkeit, eine relative Intensitätsänderung größer Null zu beobachten, beträgt bei der Fluoreszenz des ungereiften Chromophors für AG4 41% und für E8 32%, bei der Fluoreszenz des gereiften Chromophors für DsRed 16%, für DsRed2 21%, für E5 19% und für E8 23%.

Es fällt weiterhin auf, dass die Fluoreszenz des ungereiften Chromophors (AG4 und E8, kurzwellige Bande) deutlichere Intensitätsfluktuationen zeigt als die Fluoreszenz des gereiften Chromophors (DsRed, DsRed-2, E5 und E8, langwellige Bande). Bei der Beobachtung von AG4 liegt die Wahrscheinlichkeit, dass das nächste gemessene Spektrum intensiver ist als das vorhergehende bei 41%, bei der kurzwelligen Fluoreszenz von E8 bei 32%, vorausgesetzt, es wird noch Fluoreszenz detektiert. Die entsprechenden Werte für die langwellige Fluoreszenz des gereiften Chromophors sind deutlich geringer, nämlich 16% für DsRed, 21% für DsRed-2, 19% für E5 und 23% für E8. Auch an dieser Stelle wird die Homologie zwischen dem spektralen Verhalten der gereiften Proteine von DsRed, DsRed-2, E5 und der langwelligen Fluoreszenz von E8 einerseits und von AG4 und der kurzwelligen Fluoreszenz von E8 andererseits, einmal mehr deutlich.

Ob die beobachteten Intensitätsänderungen auf Dunkelzeiten ohne Fluoreszenz unterhalb der Zeitauflösung des Experimentes oder auf veränderte Absorptionseigenschaften oder veränderte Fluoreszenzquantenausbeuten zurückgehen, kann hier nicht beantwortet werden. Es wird jedoch deutlich, dass DsRed und alle untersuchten DsRed Varianten zum Teil deutliche spontane Intensitätsschwankungen zeigen.

## 5.2.6 Kopplung unterschiedlicher Chromophore via FRET

### 5.2.6.1 E8

#### 5.2.6.1.1 Bleichverhalten

Die Untersuchung von einzelnen DsRed Oligomeren zeigte schnell, dass DsRed kein besonders geeignetes System ist, um die vorhergesagte Kopplung [40, 66] von ungereiften und gereiften Chromophoren via FRET innerhalb eines einzelnen Oligomers zu untersuchen.

Der Fund von Oligomeren, die sowohl Fluoreszenz des ungereiften als auch des gereiften Chromophors zeigten, belegt zwar das Vorhandensein von gemischten Chromophoren, in denen ein FRET Donor-Akzeptor System bestehen kann, jedoch konnte die Fluoreszenz des ungereiften Chromophors nur in wenigen Fällen detektiert werden. Diese Fälle mit einer Fluoreszenzbande um 500nm waren deutlich zu selten, um Aussagen über die Wechselwirkungen der beiden unterschiedlichen Chromophore machen zu können. Besonders nachteilig wirkte sich hier wiederum aus, dass das Anzahlverhältnis zwischen Monomeren mit ungereiften und Monomeren mit gereiftem Chromophor weder für DsRed noch für eine der zahlreichen Varianten bekannt ist, weshalb nicht zu entscheiden war, ob keine kurzwellige Fluoreszenz detektiert wurde, weil z.B. deren Energie mit sehr hoher Effizienz an die rot fluoreszierenden Chromophore abgegeben wurde, oder ob grundsätzlich nur wenige ungereifte Chromophore in DsRed vorhanden sind.

Ein vielversprechendes System, um die FRET Wechselwirkungen innerhalb eines Oligomers zu untersuchen, ist E8. Bereits die ersten spektral aufgelösten Untersuchungen einzelner Oligomere zeigten, dass die im Ensemble beobachtete deutliche Fluoreszenz sowohl des ungereiften als auch des gereiften Chromophors nicht auf nebeneinander vorliegende Oligomere, die jeweils ausschließlich grün, bzw. rot fluoreszieren, zurückgehen. Vielmehr zeigt die Mehrzahl der Oligomere Fluoreszenz beider Chromophore, was bedeutet, dass die Mehrzahl der Oligomere aus gemischten Monomeren besteht, also sowohl aus Monomeren, die den ungereiften Chromophor enthalten, als auch Monomeren, die den gereiften Chromophor enthalten.

Als Anregungswellenlänge zur Untersuchung von E8 wurde zunächst Licht der Wellenlänge 488nm verwendet, da in der Literatur an einigen Stellen diskutiert wird, dass das Nebenmaximum im DsRed Absorptionsspektrum bei 485nm nicht der vibronischen Progression des gereiften Chromophors, sondern dem grün fluoreszierenden Chromophor zuzuordnen ist [42, 48, 64] und eine Anregung bei

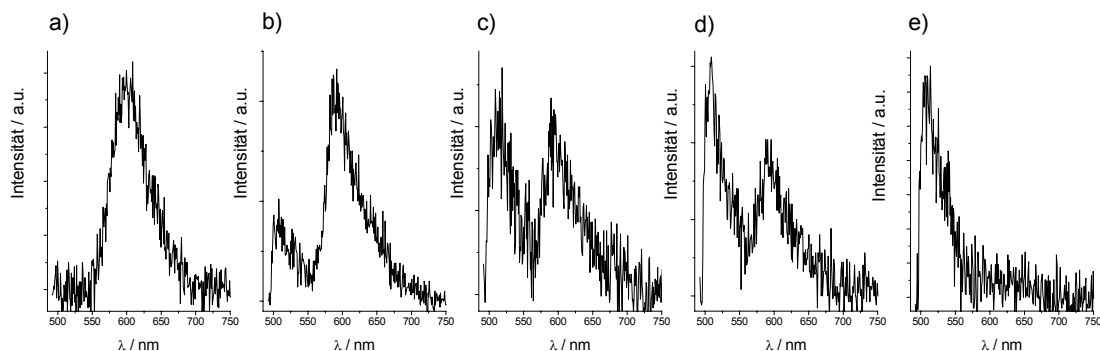
488nm nur zu vernachlässigbarer Anregung der rot fluoreszierenden Form führt, wie es Garcia-Parajo et al. dargelegt haben [70]. Dies bedeutet, dass immer, wenn Fluoreszenz des gereiften Chromophors beobachtet wird, der Chromophor ausschließlich durch Energietransfer vom ungereiften Chromophor angeregt wurde. Im Fall von E8 bedeutet dies, dass offensichtlich nur ein Teil der vom kurzwellig fluoreszierenden Chromophor absorbierten Energie an den FRET Akzeptor abgegeben wird, so dass die Fluoreszenz beider Chromophore sichtbar ist.

Zunächst wurden die Anzahlen an einzelnen Oligomeren bestimmt, bei denen ausschließlich Fluoreszenz des ungereiften, des gereiften und sowohl des ungereiften als auch des gereiften Chromophors gefunden wurde. Insgesamt wurden 44 Einheiten mit ausschließlich grüner Fluoreszenz des ungereiften Chromophors, 64 Einheiten mit ausschließlich roter Fluoreszenz des gereiften Chromophors und 209 Einheiten, die sowohl grüne als auch rote Fluoreszenz zeigten, gefunden. Dies entspricht einem Anteil von 14% grün fluoreszierenden, 20% rot fluoreszierenden und 66% grün und rot fluoreszierenden Einheiten.

Für eine rein statistische Zusammensetzung von Tetrameren aus Monomeren, die verschiedene Chromophore enthalten, sind die Anteile der Oligomere mit rein roter oder rein grüner Fluoreszenz zu hoch. Hierfür sind verschiedene Erklärungen denkbar. Zum einen könnten bevorzugt Tetramere aus gleichartigen Monomeren gebildet werden, was nicht auszuschließen ist, da der Grund dafür, dass ein Teil der Proteine rot fluoreszierende, ein anderer Teil nur den grün fluoreszierenden Chromophor ausbildet, unbekannt ist. Da es sich nicht um ein chemisches Gleichgewicht zwischen den Chromophoren handelt, ist es wahrscheinlich, dass die Proteine sich strukturell so unterscheiden, dass nur ein Teil der Proteine gereifte Chromophore ausbilden kann, was sich auch auf die Fähigkeit zur Zusammenlagerung auswirken kann. Weiterhin ist denkbar, dass nicht alle Einheiten tatsächlich vier fluoreszierende Chromophore enthalten, entweder weil die Einheit nicht tetramer ist, oder weil nicht alle Proteine eines Tetramers einen fluoreszierenden Chromophor enthalten. Da bekannt ist, dass die fluoreszierenden Proteine nicht fluoreszente, dunkle Zustände aufweisen [70-72], kann es vorkommen, dass ein Monomer gerade in einem solchen Zustand ist. Besonders bei einem Verhältnis von drei Chromophoren einer Form zu einem der spektral anderen Form führt dies zur Nichtdetektion der nur einfach vertretenen Form, wenn diese gerade in einem nicht fluoreszenten Zustand ist. Eine weitere Schwierigkeit, die besonders bei drei zu eins Tetrameren zu erwarten ist, geht auf die zufällige Orientierung der Tetramere in der einbettenden Matrix zurück. Durch die zufällige Orientierung der Oligomere in der Matrix kann es passieren, dass ein Chromophor so zur Anregung und Detektion orientiert ist, dass keine Fluoreszenz

dieses Chromophors detektiert werden kann, so dass auch in einem solchen Fall eine gemischte Einheit als Einheit nur einer Form erscheint.

Einige Beispiele für die bei Anregung mit 488nm gefundenen Emissionsspektren einzelner E8 Oligomere sind in Abbildung 5.73 gezeigt. Die Spektren, die ausschließlich rote, bzw. grüne Fluoreszenz (Abbildung 5.73, a, e) zeigen, sind analog den vorherrschenden DsRed bzw. AG4 Spektren. Die meisten Spektren wiesen jedoch gemischte Fluoreszenz sowohl der grün als auch der rot fluoreszierenden Form auf, wobei keine festen Verhältnisse zwischen den Intensitäten der Fluoreszenzbanden gefunden werden konnten (z.B. Abbildung 5.73, b-e).



**Abbildung 5.73: Emissionsspektren einzelner E8 Einheiten**

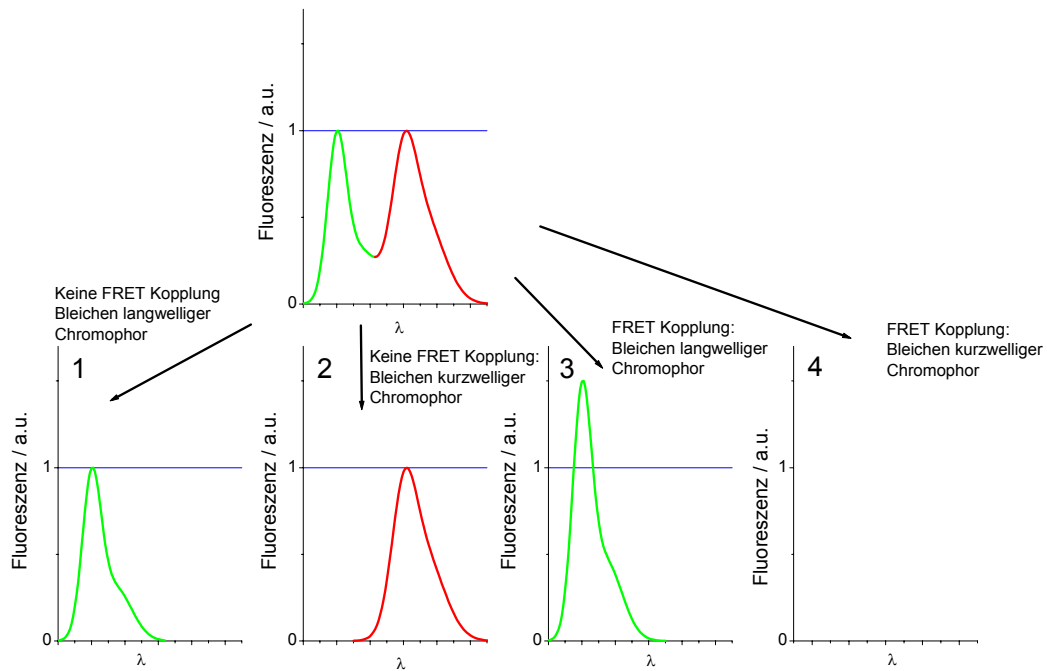
Bei der Untersuchung wurden Spektren mit jeglichem Verhältnis von Fluoreszenz der grün fluoreszierenden zur rot fluoreszierenden Form gefunden. Rückschlüsse aus dem Intensitätsverhältnis der Fluoreszenzbanden (b, c, d) auf die Zusammensetzung des Tetramers aus grün und rot fluoreszierenden Proteinen ist wegen der zufälligen Orientierung der Tetramere in der Matrix relativ zur Anregungs- und Detektionsrichtung nicht möglich.

Bei immer gleicher Orientierung der Monomere innerhalb der Tetramere relativ zur Anregungs- und Detektionsrichtung könnte man feste Intensitätsverhältnisse der Fluoreszenzbanden je nach Anzahlverhältnis zwischen rot und grün fluoreszierenden Chromophoren im Tetramer erwarten, welche ungefähr der Verteilung der Intensitätsverhältnisse der Beispielspektren in Abbildung 5.70 entsprechen könnte. Drei rot fluoreszierende Proteine und ein grün fluoreszierendes Protein könnten zu einem Spektrum wie unter a) führen, zwei rot fluoreszierende Proteine und zwei grün fluoreszierende Proteine würden zu einem Spektrum wie unter b) führen, etc. Jedoch sind die E8 Tetramere relativ zur Anregung und Detektion zufällig orientiert, was verhindert, dass jedes Anzahlverhältnis der verschiedenen Chromophore zueinander im Tetramer zu einem charakteristischen Intensitätsverhältnis zwischen den Fluoreszenzbanden führt. Aus den gezeigten gemischten Spektren können also keine Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Tetramere gemacht werden.

Bereits die Beobachtung, dass die Mehrzahl der einzelnen Oligomere gemischte Fluoreszenz sowohl des grün als auch des rot fluoreszierenden Chromophors aufweisen, kann die in der Literatur für DsRed gemachte Annahme, dass die Chromophore innerhalb eines Oligomers ein hoch effektives FRET System ausbilden, bei dem die Fluoreszenz stets vom energieärmsten Chromophor ausgeht, für E8 nicht zutreffen.

Neben der Auswertung der einzelnen, statischen Fluoreszenzspektren kann auch die Betrachtung der zeitlichen Veränderung der Emission einzelner Oligomere, mithin die Fluoreszenzdynamik, Aufschlüsse über die Ausbildung eines FRET Systems im einzelnen Tetramer geben.

Bei der Beobachtung eines einfachen Systems mit zwei unterschiedlichen Chromophoren auf Einzelmolekülebene kann beim Bleichen eines der beiden Chromophore eine Veränderung der Emission gemäß dem in Abbildung 5.74 gezeigten Modell beobachtet werden. Beim Bleichen eines der beiden Chromophore werden je nachdem, ob die Chromophore via FRET gekoppelt waren oder nicht, unterschiedliche Veränderungen des Spektrums zu beobachten sein. Sind beide Chromophore völlig unabhängig voneinander, so wird das Bleichen eines der Chromophore keinen Einfluss auf die Emission des anderen Chromophors haben (Abbildung 5.74, 1; 2). Findet zwischen den intakten Chromophoren jedoch ein Energietransfer statt, so findet das Bleichen eines der Chromophore seinen Niederschlag in der Fluoreszenz des anderen Chromophors. Bleicht der FRET Akzeptor Chromophor vor dem Donor Chromophor, so kommt es, da in diesem Fall keine Energie mehr vom Donor auf den Akzeptor transferiert werden kann, zu einem Dequenching der Donor Fluoreszenz, die Donor Fluoreszenz nimmt also zu (Abbildung 5.74, 3). Für den Fall, dass der FRET Donor Chromophor vor dem Akzeptor Chromophor bleicht, kommt es zum Abfall auch der Akzeptor Fluoreszenzintensität, da vom Donor keine Energie mehr auf den Akzeptor übertragen wird. Wenn der Akzeptor ausschließlich über den Energietransfer vom Donor angeregt wird, führt ein Bleichen des Donor Chromophors auch zum Verschwinden der Akzeptor Fluoreszenz (Abbildung 5.74, 4).



**Abbildung 5.74: Bleichen eines Chromophors in einem zweichromophorigen System**

In einem zweichromophorigen System führt das Bleichen eines der Chromophore zu unterschiedlichen Veränderungen der Emission, je nachdem, ob die Chromophore unabhängig oder durch Energietransfer gekoppelt sind.

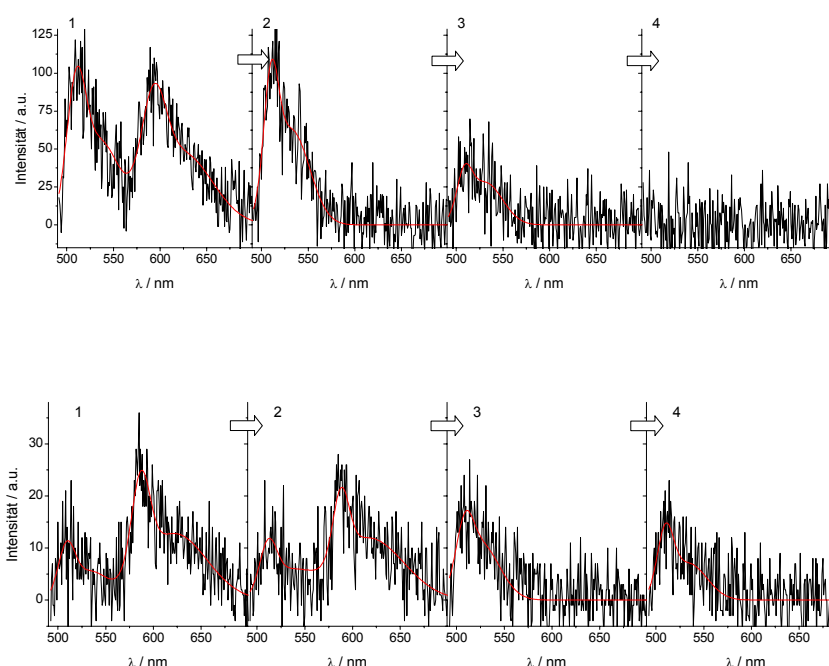
- 1, 2: Bei unabhängigen Chromophoren hat das Bleichen eines Chromophors keinen Einfluss auf die Emission des anderen.
- 3: Bei gekoppelten Chromophoren führt das Bleichen des Akzeptor Chromophors zu einem Dequenching der Donor Emission.
- 4: Das Bleichen des Donor Chromophors führt zum Abfall, bzw. Verschwinden der Akzeptor Fluoreszenz, wenn diese ausschließlich durch Energietransfer angeregt wird.

Obwohl im vorliegenden Fall Tetramere, und nicht wie im Modell Dimere, vorliegen, sollte sich grundsätzlich das beschriebene Verhalten zeigen.

In einer ersten Untersuchung wurde genau nach diesem Verhalten bei Bleichen einzelner Chromophore gesucht [31]. Für den Fall, dass der langwellig fluoreszierende Chromophor, wie in der Literatur beschrieben, praktisch ausschließlich durch Energietransfer angeregt wird, sollten sich deutliche Veränderungen der Emission beim Bleichen eines Chromophors gemäß dem angeführten Modell zeigen.

Insgesamt wiesen bei dieser Untersuchung 91 einzelne E8 Oligomere genug aufeinander folgende Fluoreszenzspektren auf, um die Veränderung der Fluoreszenz entsprechend dem Modell einzuordnen.

Bei 75 einzelnen Oligomeren wurde eine Veränderung des Spektrums von gemischter grüner und roter Fluoreszenz hin zu rein grüner Fluoreszenz beobachtet. Von diesen 75 Fällen wurde bei 70 Oligomeren kein Dequenching, also mit dem Abfall der roten Fluoreszenz konzentrierter Anstieg der grünen Fluoreszenz, festgestellt. Die Intensität der grünen Fluoreszenzbande blieb wie in Abbildung 5.75 oben nach Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors entweder konstant oder nahm ebenfalls ab. In dem hier gegebenen Beispiel in Abbildung 5.75 oben ist deutlich zu erkennen, dass das Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors während des ersten Messintervalls keinerlei Einfluss auf die Intensität der kurzwelligen Fluoreszenz hat. Die Intensität der grünen Fluoreszenz ist im ersten und zweiten Spektrum gleich, erst im dritten Beobachtungsintervall kommt es zum Bleichen auch der grünen Fluoreszenz.



**Abbildung 5.75: Wechsel von gemischtem Spektrum zu rein grüner Fluoreszenz**

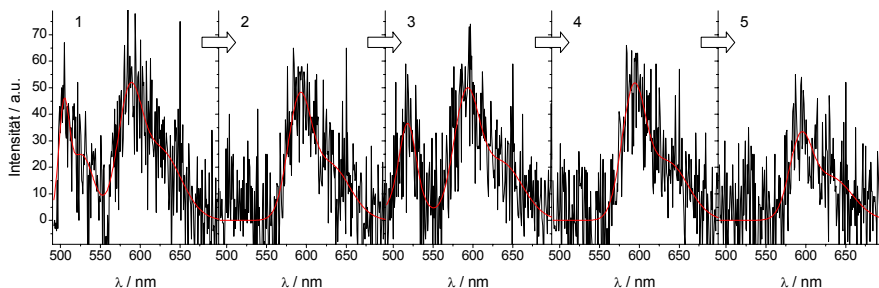
In der Mehrzahl der Fälle wurde spektrales Verhalten wie in der Abbildung oben gefunden. Das Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors führte zu keinem Anstieg der grünen Fluoreszenz. Unten: Spektrenserie, die auf ein Dequenching des grün fluoreszierenden Chromophors hinweist. Mit Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors steigt die Intensität der grünen Fluoreszenzbande an.

Bei nur 5 von 75 Fällen konnte beim Wechsel von gemischter Fluoreszenz zu rein grüner Fluoreszenz ein mit dem Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors konzentriertes deutliches Dequenching der grünen Fluoreszenz beobachtet werden. Ein

entsprechendes Beispiel ist in Abbildung 5.75, unten, gezeigt. Während der ersten beiden Spektren ist gemischte Fluoreszenz zu sehen, im dritten Spektrum nur noch grüne Fluoreszenz, wobei diese an Intensität zugenommen hat.

Auch der Fall, dass bei gemischten Spektren die grüne Fluoreszenz zuerst bleicht, wurde beobachtet. In zwei Fällen wurde neben dem Bleichen der grünen Fluoreszenz auch ein korrespondierender Abfall der roten Fluoreszenz beobachtet, was ein Hinweis auf FRET zwischen den Chromophoren sein kann. In sechs weiteren Fällen hatte das Bleichen der kurzwelligen Fluoreszenz keinen Einfluss auf die rote Fluoreszenz.

Ein Beispiel für solches spektrales Verhalten ist in Abbildung 5.76 gegeben. Während der ersten vier Beobachtungsintervalle bleibt die rote Fluoreszenz konstant, während die grüne Fluoreszenz verschwindet, wiederkommt und schließlich endgültig bleicht. Die unveränderte rote Fluoreszenz bei fluktuierender grüner Fluoreszenz deutet darauf hin, dass die Chromophore nicht durch Energietransfer wechselwirken, was wiederum bedeutet, dass der gereifte Chromophor entgegen den Darstellungen in der Literatur sehr wohl mit Licht der Wellenlänge 488nm angeregt werden kann.



**Abbildung 5.76: Wechsel zwischen gemischter und rein roter Fluoreszenz**

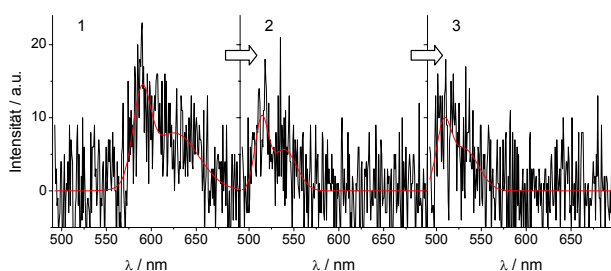
Die beobachtete rote Fluoreszenz bleibt während der ersten vier Spektren konstant, das Verschwinden und Zurückkehren der grünen Fluoreszenz hat keinerlei Einfluss auf die langwellige Fluoreszenzbande. Dies ist ein Hinweis darauf, dass kein Energietransfer zwischen den Chromophoren stattfindet, was wiederum bedeutet, dass der rot fluoreszierende Chromophor bei 488nm direkt angeregt wird.

Bei vier Einheiten wurde der Wechsel von rein roter zu rein grüner Fluoreszenz ohne detektierbare Dunkelzeit beobachtet. Ein konzertierter Wechsel von rein roter zu rein grüner Fluoreszenz ist innerhalb des Modells ein Hinweis auf eine hoch effektive Kopplung der ungebleichten Chromophore durch Energietransfer. Ein Beispiel für den Wechsel von langwelliger zu kurzwelliger Fluoreszenz ist in Abbildung 5.77 gezeigt. Der Wechsel erfolgt scheinbar konzertiert, eine Dunkelzeit ist nicht zu erkennen. Da die



Integrationszeit pro Spektrum jedoch eine Sekunde beträgt, bedeutet dies, dass Dunkelzeiten kürzer als eine Sekunde nicht detektiert werden können.

### Abbildung 5.77: Wechsel von roter zu grüner Fluoreszenz



Nur ein konzertierter Wechsel von roter zu grüner Fluoreszenz ist ein Hinweis auf eine FRET Kopplung der Chromophore. Befindet sich zwischen dem Verschwinden der roten Fluoreszenz und dem Erscheinen der grünen Fluoreszenz eine Dunkelzeit ohne Fluoreszenz, spricht dies gegen Energietransfer zwischen den Chromophoren.

Bei weiteren vier Einheiten trat zwischen dem Verschwinden der roten Fluoreszenz und dem Erscheinen der grünen Fluoreszenz eine Dunkelzeit von wenigstens einer Sekunde auf, was gegen ein Dequenching des kurzweilig fluoreszierenden Chromophors als Grund für das Sichtbarwerden der kurzweiligen Fluoreszenz spricht, da der angenommene Mechanismus eine konzertierte spektrale Veränderung bedingt. Außerdem wurde bei einer beobachteten Einheit ein Wechsel der Fluoreszenz von rein grün nach rein rot beobachtet, was innerhalb des Modells, bei dem nur spektrale Veränderungen aufgrund des Bleichens eines Chromophors berücksichtigt wird, nicht vorkommt.

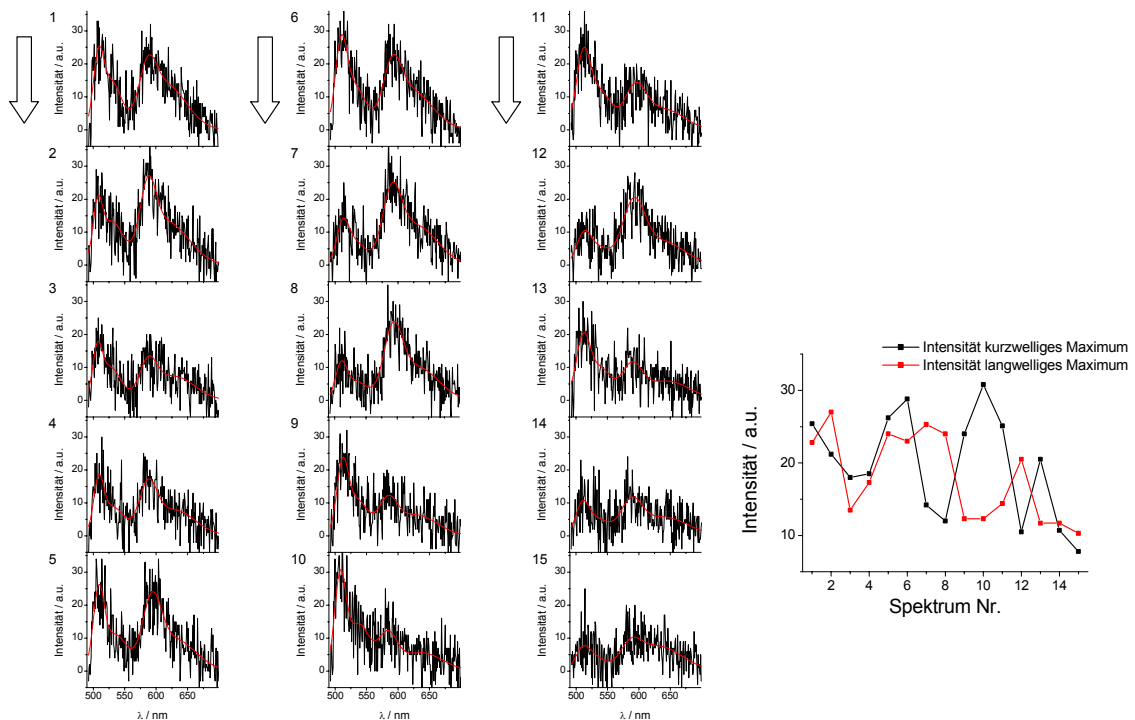
Die vier Fälle, in denen eine Dunkelzeit zwischen dem Verschwinden der roten Fluoreszenz und dem Erscheinen der grünen Fluoreszenz beobachtet wurde, deuten auf zufällige Intensitätsfluktuationen der Fluoreszenz hin und sprechen gegen eine FRET Kopplung der Chromophore.

Die Anzahlen der jeweiligen beobachteten spektralen Veränderungen sind noch einmal in Tabelle 3 zusammengestellt.

**Tabelle 3: Spektrale Veränderungen von E8 bei Bleichen eines Chromophors**

Spektrale Erscheinung	Anzahl Einheiten
Gemischte zu rein grüner Fluoreszenz, kein Hinweis auf Dequenching	70
Gemischte zu rein grüner Fluoreszenz, mögliches Dequenching	5
Gemischte zu rein roter Fluoreszenz, mit konzertiertem Abfall der roten Fluoreszenz	2
Gemischte zu rein roter Fluoreszenz ohne Abfall der roten Fluoreszenz	6
Rein rote zu rein grüner Fluoreszenz, dazwischen detektierbare Dunkelzeit	4
Rein rote zu rein grüner Fluoreszenz ohne detektierbare Dunkelzeit	4
Rein grüne zu rein roter Fluoreszenz	1

Bereits diese einfache Auswertung zeigte, dass das Fluoreszenzverhalten der E8 Oligomere komplizierter und vielgestaltiger ist als bisher angenommen. So deuten fluktuierende Maximaintensitäten der einzelnen Banden z.B. auf die Möglichkeit von sich verändernden FRET Effizienzen hin. Neben der Auswertung des Bleichverhaltens wurde deshalb bereits für die erste Messserie an E8 die Entwicklung der Bandenintensitäten der Emission eines einzelnen E8 Oligomers beispielhaft für eine besonders photostabile Einheit ausgewertet (siehe auch [31]). Auf diese Weise kann überprüft werden, ob Fluktuationen der Maximumintensitäten auf eine sich verändernde FRET Effizienz zwischen den Chromophoren zurückzuführen ist. In diesem Fall sollte stets eine niedrigere Intensität der grünen Fluoreszenzbande mit einer höheren Intensität der roten Fluoreszenzbande und umgekehrt, einhergehen. Die gesamte ausgewertete Serie ist in Abbildung 5.78 gezeigt, im Verlauf von 15 Einzelspektren von jeweils einer Sekunde Integrationsdauer sind zum Teil drastische Veränderungen der Intensitätsverhältnisse der Bandenmaxima zu beobachten. Der Verlauf der Bandenmaxima ist rechts aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Abfall von grüner Fluoreszenz nicht systematisch zu einer Erhöhung der roten Fluoreszenz, bzw. umgekehrt, führt. Die fluktuierenden Fluoreszenzintensitäten sind also nicht ausschließlich durch eine fluktuierende FRET Effizienz bedingt.



**Abbildung 5.78: Fluktuierende Intensitäten der Bandenmaxima**

Links: Während der Beobachtung von 15 Einzelspektren von jeweils einer Sekunde treten zum Teil drastische Veränderungen der Verhältnisse der Bandenintensitäten zueinander auf.

Rechts: Die Auftragung der Intensitätsverläufe der Emissionsbanden (kurzwellige Fluoreszenz schwarz, langwellige rot) zeigt keinen systematischen Zusammenhang zwischen den Intensitätsverläufen. Die Intensitätsschwankungen können demnach nicht ausschließlich durch sich verändernde FRET Effizienz bedingt sein.

Insgesamt gibt die Analyse des Bleichverhaltens einzelner E8 Oligomere und auch die exemplarische Auswertung einer Spektrenserie keine deutlichen Hinweise auf effizienten Energietransfer zwischen kurzwellig und langwellig fluoreszierenden Chromophoren. Im Gegenteil, Spektrenserien wie die in Abbildung 5.75 oben oder Abbildung 5.76 sprechen deutlich gegen effizienten Energietransfer zwischen den Chromophoren.

Bei den wenigen Beispielen, die auf FRET zwischen den Chromophoren hindeuten, ist nicht zwischen Kausalität und Koinzidenz zu unterscheiden. Wie bereits an DsRed und an AG4 gezeigt wurde, sind Intensitätssprünge der Emission ein allgegenwärtiges Phänomen (vgl. 5.2.5). Diese spontanen Intensitätssprünge können z.B. so mit dem Bleichen des langwelligen Chromophors zusammenfallen, dass ein Anstieg der grünen Fluoreszenz beobachtet wird, welcher der Erscheinung nach nicht von einem Dequenching der grünen Fluoreszenz zu unterscheiden ist.

Um alle Spektren und die Intensitätsdynamik, die im Einzelmolekülexperiment gefunden wurde, zu erklären, ist es nicht notwendig, von Energietransfer zwischen den Chromophoren auszugehen. Andererseits weisen die Bleichexperimente an E8 (Kapitel 4.2.4) auf Energietransfer zwischen ungereiften und gereiften Chromophoren innerhalb eines Tetramers hin.

Zu Beginn der spektralen Untersuchung war, entsprechend den Literaturangaben, einerseits von einem sehr effektiven Energietransfer zwischen den Chromophoren [40, 66] und andererseits, ebenfalls entsprechend den Literaturangaben, davon ausgegangen worden, dass der rot fluoreszierende Chromophor nur vernachlässigbar bei 488nm direkt angeregt werden kann [70]. Beides trifft, wie die obige Untersuchung gezeigt hat, so für E8 nicht zu. Ein wenig effizienter Energietransfer zwischen den Chromophoren kann den im Ensemble-Bleichexperiment beobachteten Anstieg der Donor Fluoreszenz erklären, bei der Art der Auswertung der Einzelmolekülexperimente könnte ein solch schwacher Energietransfer aber unerkant bleiben, da nach Anzeichen für einen effektiven Energietransfer gesucht wurde.

### **5.2.6.1.2 Fluktuierende Bandenintensitäten**

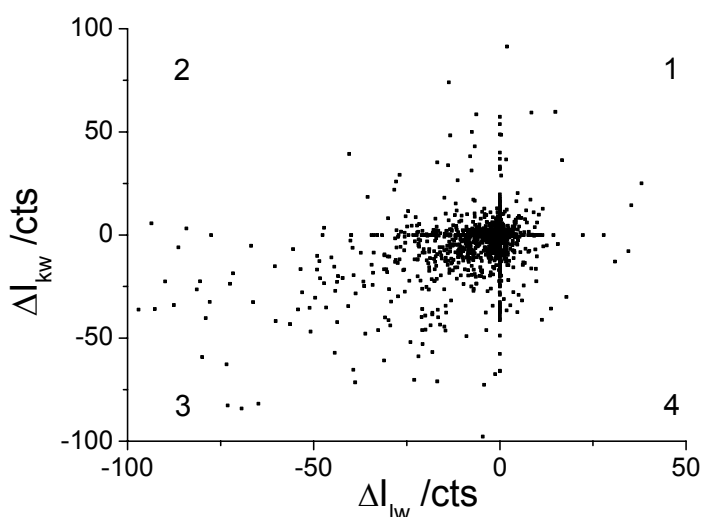
Unter diesen Umständen erschien die angewendete Auswertemethode zu stark vereinfachend und auch subjektiv geprägt zu sein, weshalb zunächst überprüft wurde, ob mit einer verfeinerten Auswertemethode, die außerdem die Datenbasis verbreitert, die gleichen Ergebnisse erhalten werden.

Anstatt sich auf das Bleichverhalten einer Einheit zu konzentrieren, sollen im Folgenden die Intensitätsveränderungen beider Fluoreszenzbanden von einem Spektrum zum darauf folgenden untersucht werden. Auf diese Weise wird der tetramere Charakter der Einheiten besser berücksichtigt, außerdem sollte es möglich sein, nicht nur beim Bleichen eines Chromophors die entsprechenden Intensitätsveränderungen aufzuspüren, sondern auch sich verändernde FRET Effizienzen, die zu konzertierten Intensitätsänderungen der Emissionsbanden führen. In Ansätzen war dies bereits bei der beispielhaften Betrachtung der Spektrenserie in Abbildung 5.78 (auch veröffentlicht in [31]) geschehen, jedoch musste das Verfahren noch weiterentwickelt werden.

Kernpunkt der Betrachtung der Veränderung der Emissionsbanden von einem Spektrum zum nächsten ist die genaue und systematische Bestimmung der spektralen Position und der Intensität der Fluoreszenzbanden. Die ursprünglich bei Perylenspektren angewandte Methode der Glättung der Spektren ergab bei den wenig intensiven Emissionsspektren der fluoreszierenden Proteine keine akzeptablen

Ergebnisse, weshalb auf das Anpassen einer Funktion an die Rohdaten zurückgegriffen wurde. Die Bandenlage und Intensität wird so mit ausreichender Genauigkeit zugänglich, so dass auch weniger augenscheinliche spektrale Fluoreszenzdynamik ausgewertet werden kann.

Zur Suche nach Bestätigung für Energietransfer zwischen einzelnen Chromophoren wurden nur die Spektren solcher Oligomere ausgewertet, bei denen Emission sowohl des ungereiften, als auch des gereiften Chromophors gefunden wurde. Zunächst wurde die Intensitätsveränderung beider Fluoreszenzbanden von jedem Spektrum zum nächsten bestimmt und diese dann gegeneinander aufgetragen. Insgesamt konnten 1350 Wertepaare aus aufeinander folgenden Spektren ermittelt werden, welche im Diagramm in Abbildung 5.79 aufgetragen sind. Auf der Ordinate ist die Intensitätsveränderung der kurzwelligen, grünen Fluoreszenz des ungereiften Chromophors von einem Spektrum zum nächsten aufgetragen, auf der Abszisse die Intensitätsveränderung der langwelligen Fluoreszenzbande des gereiften Chromophors. Punkte mit  $x=0$  oder  $y=0$  zeigen Intensitätsänderungen nur einer Bande an, ohne dass sich die entsprechend andere Bandenintensität verändert, sei dies, weil die Emission genau gleich intensiv blieb, oder weil in beiden aufeinander folgenden Spektren keine Fluoreszenz der anderen Bande gefunden wurde.



**Abbildung 5.79: Korrelation der absoluten Intensitätsveränderungen**

Auftragung der Differenzen der Intensitätsänderungen beider Fluoreszenzbanden von einem Spektrum zum nächsten, gegeneinander. Auf der Abszisse sind die Intensitätsdifferenzen der langwelligen Fluoreszenzbande, auf der Ordinate die Intensitätsdifferenzen der kurzwelligen Fluoreszenzbande aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass jegliche mögliche Veränderungen der Intensitätsmaxima zueinander beobachtet werden.

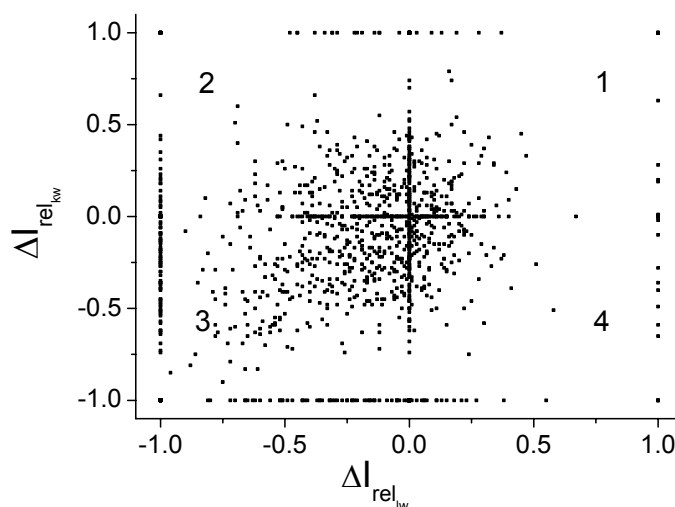
Alle Punkte im ersten Quadranten des Koordinatensystems in Abbildung 5.79 zeigen eine gleichzeitige Zunahme beider Fluoreszenzbanden, alle Punkte im dritten Quadranten eine gleichzeitige Abnahme beider Fluoreszenzbanden. Im zweiten Quadranten finden sich alle Fälle, bei denen die Intensität der grünen Fluoreszenz zugenommen und die der roten Fluoreszenz abgenommen hat. Im vierten Quadranten sind schließlich alle Spektren eingetragen, bei denen die Intensität der grünen Fluoreszenz abnahm, während die der roten Fluoreszenz zunahm. In Abbildung 5.79 wird deutlich, dass alle möglichen Intensitätsveränderungen der beiden Banden gegeneinander auch beobachtet werden.

Die Auftragung der absoluten Intensitätsveränderungen gibt zwar einen guten Überblick, verdeckt aber andererseits einige Informationen. Hauptproblem ist hierbei die grundsätzlich unterschiedliche Intensität der detektierten Spektren, die auf die zufällige Orientierung der Oligomere in der Matrix zurückgeht. So ist z.B. eine Verdopplung der Intensität einer im vorherigen Spektrum schwachen Bande nicht von nur geringen Intensitätsschwankungen in einem intensiven Spektrum zu unterscheiden. Auch das völlige Bleichen oder das Auftauchen einer Bande ist im Diagramm der absoluten Intensitätsveränderungen nicht auszumachen.

Aus diesem Grund wurde die Methode weiter verfeinert, indem eine Normierung der Intensitäten eingeführt wurde, um die Intensitätsschwankungen untereinander vergleichbar zu machen. Gewählt wurde die bereits in Kapitel 5.1.7.1 vorgestellte Normierung, um relative Intensitätsänderungen zu erhalten. Es wurde die Differenz zwischen den Maximumintensitäten jeder Fluoreszenzbande in aufeinander folgenden Spektren gebildet und diese dann durch die größere der beiden Intensitäten der entsprechenden Fluoreszenzbande geteilt. Man erhält so Werte zwischen  $-1$  und  $1$ , Intensitätsabnahmen erscheinen als negative Werte, Intensitätszunahmen als positive Werte.

Die so erhaltenen Werte für sowohl die kurzwellige als auch die langwellige Fluoreszenzbande wurden wiederum gegeneinander aufgetragen, man erhielt die Grafik in Abbildung 5.80. Die verschiedenen Möglichkeiten der Intensitätsveränderungen der beiden Fluoreszenzbanden sind analog zu Abbildung 5.79 in den vier Quadranten des Koordinatensystems zu finden. Veränderungen nur einer Bandenintensität bei unveränderter zweiter Bande erscheinen auf den Achsen des Koordinatensystems. Im Vergleich zur Auftragung der absoluten Intensitätsänderungen hat die Auftragung der relativen Intensitätsänderungen einige Vorteile. Zum Einen werden die Intensitätsschwankungen unabhängig von ihrer absoluten Intensität vergleichbar. Zum Anderen werden im Diagramm die Fälle deutlich sichtbar, bei denen eine Fluoreszenzbande verschwindet oder erscheint. Das

Erscheinen einer Bande ergibt den Wert 1, das Verschwinden einer Bande den Wert -1 für die relative Intensitätsänderung der jeweiligen Bande.



**Abbildung 5.80: Korrelation der relativen Intensitätsveränderungen**

Die absoluten Intensitätsveränderungen der Fluoreszenzbanden wurden durch Division durch den größeren Intensitätswert der aufeinander folgenden Banden normiert.

Die Auftragung der relativen Intensitätsveränderungen der Bandenmaxima gegeneinander zeigt, dass jegliche Art von Intensitätsveränderungen gefunden wird. Intensitätsschwankungen einer Bande ohne Veränderung der Intensität der anderen Bande ergeben Punkte auf den Achsen des Koordinatensystems. Das Bleichen einer Bande ergibt den Wert  $-1$  für die relative Intensitätsänderung, das Erscheinen einer Bande ergibt den Wert  $1$  der relativen Intensitätsänderung.

FRET zwischen den Chromophoren kann auch mit dieser verfeinerten Auswertung nicht belegt, aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Interpretiert man das Diagramm mit Blick auf Energietransfer zwischen den Chromophoren, sind im zweiten Quadranten all die Fälle dargestellt, bei denen die FRET Effizienz abnahm, wo ein Dequenching, z.B. aufgrund des Bleichens eines rot fluoreszierenden Chromophors, zu beobachten war. Im vierten Quadranten sind all die Fälle, bei denen die FRET Effizienz zunahm, d.h. die FRET Donor Fluoreszenz abnahm und die FRET Akzeptor Fluoreszenz zunahm. Im dritten Quadranten sind all die Fälle, bei denen sowohl die rote als auch die grüne Fluoreszenz abnahmen, z.B. wegen Bleichen eines FRET Donors, was dann auch zur Abnahme der Akzeptorintensität führte.

Die ausschließliche Interpretation von Abbildung 5.80 aus der Perspektive des Energietransfers zwischen den Chromophoren lässt sich jedoch bei vollständiger Betrachtung der Auswertung nicht halten. Am augenscheinlichsten widerspricht das Vorhandensein von Punkten im ersten Quadranten der ausschließlichen FRET Interpretation. Im ersten Quadranten sind all die Fälle verzeichnet, bei denen ein

gleichzeitiger Anstieg der roten und grünen Fluoreszenz beobachtet wurde, was mit sich veränderndem Energietransfer zwischen den Chromophoren nicht zu erklären ist. Auch die Intensitätsabnahme beider Chromophore, dargestellt im dritten Quadranten, ist kein wirklicher Hinweis auf Energietransfer, schließlich kann die Abnahme auch durch spontanes Bleichen von jeweils wenigstens einem grün und einem rot fluoreszierenden Chromophor verursacht sein.

Auch die Fälle im vierten Quadranten, bei denen  $y=-1$  und  $x>1$  ist, sind im Sinne der Theorie zur Erklärung von Intensitätsänderungen durch veränderte FRET Effizienzen wenig überzeugend. In diesen Fällen wurde das völlige Verschwinden der grünen Fluoreszenz bei gleichzeitigem Anstieg der roten Fluoreszenz gefunden. Dies würde den Anstieg der FRET Effizienz auf 100% bedeuten, was vor dem Hintergrund, dass in fast allen Spektren sowohl grüne als auch rote Fluoreszenz zu beobachten ist, unwahrscheinlich erscheint.

Hinweise darauf, was dem beobachteten spektralen Verhalten zugrunde liegt, ergeben sich, wenn man die Achsen der Auftragung der gegeneinander fluktuierenden Intensitäten betrachtet. Auf den Achsen des Koordinatensystems sind die Fluktuationen einer Fluoreszenzbande ohne Veränderung der anderen Fluoreszenzbande abgebildet. Hier wird deutlich, dass die einzelnen Fluoreszenzbanden von der anderen Fluoreszenzbande unabhängige Intensitätsfluktuationen analog denen, die in AG4 und DsRed gefunden wurden, zeigen. Offensichtlich liegt in diesen spontanen Intensitätsfluktuationen die Erklärung eines großen Teils der beobachteten Intensitätsveränderungen der Fluoreszenzbanden.

Prinzipiell sind die spontanen Intensitätsfluktuationen der Banden ausreichend, um das gesamte in Abbildung 5.80 dargestellte spektrale Verhalten zu erklären. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass ein Teil des in den Quadranten 2 bis 4 abgebildeten Intensitätsverhaltens auf sich verändernden Energietransfer zwischen den Chromophoren zurückgeht, oder dass im ersten Quadranten abgebildete Fälle auf eine verstärkte Fluoreszenz des Donors und damit stärkerer Energieübertragung auf den Akzeptor zurückgehen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass auch mit der verbesserten Auswertung der Serien von Emissionsspektren einzelner E8 Einheiten Energietransfer zwischen den Chromophoren nicht nachgewiesen, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden kann.

Der scheinbare Widerspruch zwischen dem Ensembleexperiment, wo Hinweise auf FRET gefunden wurden, und dem Einzelmolekülexperiment, wo FRET nicht widerlegt,



aber auch nicht eindeutig bestätigt werden konnte, konnte demnach auch durch eine deutlich verfeinerte Auswertemethode nicht beseitigt werden.

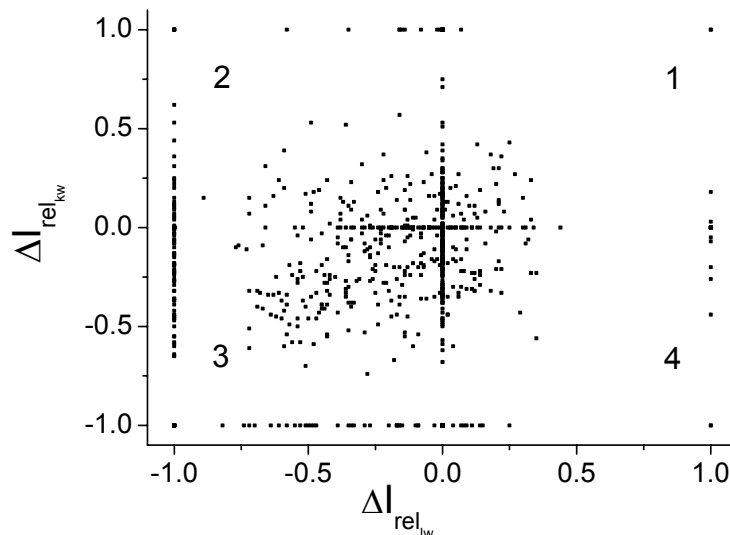
Dies war Grund genug, die Aufmerksamkeit wieder auf die prinzipiellen Unterschiede der Untersuchungsmethoden zu richten. Interessant ist in diesem Fall besonders die Anregbarkeit des rot fluoreszierenden, ausgereiften Chromophors bei der hier verwendeten Anregungswellenlänge von 488nm. Obwohl in der Literatur die Meinung vertreten wird, dass diese Anregung vernachlässigt werden kann [70], zeigen die hier durchgeführten Experimente, dass dies nicht so ist. Sicher ist die Absorption des gereiften Chromophors bei 488nm nicht mehr sehr groß, jedoch muss man die in der Spektroskopie einzelner Einheiten üblichen und notwendigen hohen Anregungsleistungen in Betracht ziehen.

Findet eine direkte Anregung des gereiften Chromophors statt, so steht dieser immer, wenn er direkt angeregt wurde, für diesen Anregungs- und Relaxationszyklus nicht mehr als FRET Akzeptor zur Verfügung. Bei hohen Anregungsleistungen ist dies häufig der Fall. Daraus ergibt sich zum einen verstärkte rote Fluoreszenz durch direkte Anregung des gereiften Chromophors als auch verstärkte grüne Fluoreszenz durch Dequenching, da der FRET Donor durch Fluoreszenz relaxiert, wenn zum FRET Akzeptor keine Energie übertragen werden kann. Effektiv beobachtet man unter Umständen bei hohen Anregungsleistungen eine geringere FRET-Kopplung als bei geringeren Anregungsleistungen.

Wenn die direkte Anregung des gereiften Chromophors die dargelegte Rolle spielt, sollte eine Veränderung der Anregungswellenlänge und der Anregungsintensität eine Veränderung der im Einzelmolekülexperiment aufgenommenen Daten ergeben. Um dies zu überprüfen, wurden in einem nächsten Experiment einzelne E8 Oligomere bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm untersucht. Dies führt zu einer deutlich geringeren Absorption des gereiften Chromophors und einer ungefähr gleichbleibenden Absorption des ungereiften Chromophors. Außerdem wurde die Anregungsleistung um 4/5 auf ca.  $0.2\text{kW/cm}^2$  gesenkt. Beide Maßnahmen ergänzen sich, weshalb eine Veränderung im spektralen Verhalten sichtbar sein sollte, wenn die direkte Anregung des gereiften Chromophors eine Rolle beim Energietransfer zwischen den Chromophoren spielt.

Die Auswertung der Emissionsspektren von E8, die mit deutlich geringerer Anregungsleistung und Anregung bei 458nm aufgenommen wurden, ergaben ein analoges spektrales Verhalten zu dem, welches in der Versuchsreihe mit höheren Anregungsleistungen bei 488nm beobachtet wurde. Wiederum wurde eine Überzahl an Einheiten gefunden, die gemischte Spektren einer Form aufwiesen, nämlich 180

Einheiten mit gemischter Fluoreszenz beider Chromophore, 72 Einheiten mit rein grüner Fluoreszenz und 59 Einheiten mit rein roter Fluoreszenz. Die Auswertung der Korrelation der relativen Intensitätsveränderungen (Abbildung 5.81) der beiden Fluoreszenzbanden gegeneinander von einem Spektrum zum nächsten zeigt die gleichen Charakteristiken wie die entsprechende Auswertung für Anregung mit 488nm. Besonders hervorzuheben sind wiederum die große Anzahl Punkte im ersten Quadranten des Koordinatensystems, welche die gleichzeitige Zunahme sowohl der roten als auch der grünen Fluoreszenzbande anzeigen, was nicht zur FRET Vermutung als Ursache von Intensitätsschwankungen passt. Weiterhin wurden wiederum sehr viele Fälle gefunden, bei denen eine Bande von der zweiten Fluoreszenzbande unabhängige Intensitätsschwankungen zeigte, welche im Diagramm auf den Achsen des Koordinatensystems zu finden sind.



**Abbildung 5.81: Korrelation der relativen Intensitätsveränderungen**

Aufgetragen wurden die relative Intensitätsveränderung der langwelligen Fluoreszenzbande gegen die relative Intensitätsveränderung der kurzwelligen Fluoreszenzbande von einem Spektrum zum nächsten einer Serie. Die Anregung der Proteine erfolgte hier bei 458nm. Die Auswertung zeigt die gleichen Charakteristiken wie die entsprechende Auswertung für Anregung mit 488nm. Wiederum ist kein eindeutiger Beleg für FRET auszumachen.

Auch bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm konnten für E8 keine zwingenden Hinweise auf einen Energietransfer zwischen unterschiedlichen Chromophoren innerhalb eines einzelnen Oligomers gefunden werden. Durch die zweite Anregungswellenlänge neben 488nm und die reduzierten Anregungsleistungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die vergleichsweise hohen Anregungsleistungen und die direkte Absorption des gereiften Chromophors keinen Einfluss auf die Veränderungen der Bandenintensitäten hat.

Die Hinweise auf FRET aus dem Ensembleexperiment konnten im Einzelmolekülexperiment nicht erhärtet, aber auch nicht entkräftet werden. Es wurde deutlich, dass Intensitätsschwankungen durch veränderten Energietransfer, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielen, bei der Betrachtung einzelner E8 Oligomere dominieren spontane oder durch das Anregungslicht induzierte Intensitätsschwankungen der Fluoreszenz, die z.B. durch veränderte Quantenausbeuten, veränderte Absorption, etc. bedingt sind.

### 5.2.6.2 Energietransfer bei DsRed und DsRed Varianten

Wie bereits dargelegt wurde, ist eine analoge Untersuchung auf Energietransfer zu E8 bei DsRed nur dann sinnvoll, wenn einige Tausend Oligomere untersucht werden, da für DsRed nur eine begrenzte Anzahl Spektren gefunden wird, bei denen Fluoreszenz des ungereiften Chromophors sichtbar war. Für eine solche Untersuchung steht der Aufwand in keinem akzeptablen Verhältnis zum Erkenntnisgewinn.

Auf eine solche Untersuchung kann außerdem verzichtet werden, da nach der in Kapitel 5.2.7.1 beschriebenen Methode der Anteil von Proteinen mit ungereiftem Chromophor zu 1,5% bis 5% abgeschätzt werden konnte. Dieser Anteil kann mit dem Anteil Oligomere mit kurzweiliger Fluoreszenz, die bei der spektral aufgelösten Untersuchung einzelner DsRed Oligomere gefunden wurde, verglichen werden. Von den 539 DsRed Einheiten, die bei Anregung mit 488nm untersucht wurden, zeigten 19 Fluoreszenz des ungereiften Chromophors. Daraus errechnet sich unter Annahme stochastischer Zusammensetzung der Tetramere ein Anteil von 1% Proteine mit ungereiftem Chromophor, was gut mit den 1,5% übereinstimmt, die aus den im Bleichexperiment detektierten Spektren des ungereiften Chromophors errechnet werden konnten.

Die gute Übereinstimmung der Zahlen zeigt, dass nicht ein Teil der grün fluoreszierenden Chromophore aufgrund eines effizienten Energietransfers zum rot fluoreszierenden Chromophor keine Fluoreszenz zeigten und deshalb nicht detektiert werden konnten. Dies belegt, dass die Spektren, in denen Fluoreszenz des ungereiften Chromophors gefunden wurde, repräsentativ sind. Da die meisten dieser Spektren nebeneinander Fluoreszenz sowohl des ungereiften als auch des gereiften Chromophors zeigten, bedeutet dies, dass innerhalb von gemischten DsRed Oligomeren aus Proteinen mit ungereiftem und gereiftem Chromophor kein hocheffizienter Energietransfer zu dem oder den rot fluoreszierenden Proteinen

stattfindet (vgl. hierzu auch 5.2.7). Der in der Literatur an einigen Stellen unterstellte Energietransfer mit praktisch 100%iger Effizienz [40] muss deshalb relativiert werden.

Die große spektrale Ähnlichkeit von E5 und DsRed-2 zu DsRed zeigt sich auch an dieser Stelle. Für E5 konnte ein vergleichbarer Anteil an grün fluoreszierenden Proteinen wie in DsRed ausgemacht werden, so dass auch in diesem Fall davon ausgegangen werden kann, dass die Spektren, in denen Fluoreszenz des ungereiften Chromophors gefunden wurde, repräsentativ sind und damit ein hocheffektiver Energietransfer ausgeschlossen werden kann. Vergleichbares kann für AG4 und DsRed-2 angenommen werden.

### **5.2.7 Untersuchungen zum Anzahlverhältnis zwischen gereiftem und ungereiftem Chromophor bei verschiedenen DsRed Varianten**

Die Untersuchung des DsRed Mutanten E8 auf Einzelmolekülebene hat einige Ergebnisse erbracht, die zur Beurteilung des spektralen Verhaltens von DsRed und sämtlicher Varianten von Interesse sind. Speziell die Erkenntnis, dass zwischen unterschiedlichen Chromophoren innerhalb der Oligomere bestenfalls ein moderater Energietransfer stattfindet, führt zu der Frage, ob E8 eine Sonderstellung einnimmt, oder ob diese Erkenntnisse auf die anderen Varianten übertragen werden können.

Entscheidend für die Beantwortung dieser Frage ist, wie im vorigen Kapitel dargelegt, das Anzahlverhältnis zwischen Proteinen mit ungereiftem und gereiftem Chromophor in DsRed. Ist der Anteil an Proteinen mit ungereiftem Chromophor hoch, zeigt die nur seltene Detektion der für diesen Chromophor typischen Fluoreszenz bei der Untersuchung einzelner Oligomere, dass ein hoch effizienter Energietransfer zum gereiften Chromophor stattfindet. Die ungereiften Chromophore sind in diesem Fall im Oligomer zwar vorhanden, fluoreszieren aber nicht. Damit würde E8 eine Sonderstellung bei den DsRed Varianten einnehmen, da bei E8 bei der Mehrzahl der Oligomere Fluoreszenz des ungereiften Chromophors gefunden wurde. Ist umgekehrt der Anteil der ungereiften Chromophore gering, zeigt die, wenn auch seltene Detektion im Einzelmolekülexperiment, dass der Energietransfer nicht effektiv verläuft, E8 also keine Sonderstellung einnimmt, sondern ein sehr geeignetes System ist, um mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie Erkenntnisse über DsRed und dessen Varianten zu erhalten.

In der Literatur ist die Frage nach dem Anzahlverhältnis von Proteinen mit ungereiftem zu gereiftem Chromophor bei DsRed bisher nicht abschließend beantwortet. Klassische spektroskopische Methoden scheiden zur Lösung dieser Frage aus, da nur Absorptionsspektren von Proteinen mit gemischten Chromophoren erhältlich sind, da beide Formen immer nebeneinander entstehen, wobei weiterhin erschwerend hinzukommt, dass Uneinigkeit besteht, inwieweit das Nebenmaximum im Absorptionsspektrum bei 585nm zur Schwingungsprogression des Spektrums des gereiften Chromophors gehört, oder ob es sich hierbei alleine um Absorption des ungereiften Chromophors handelt. Auch die Fluoreszenz von DsRed hilft in dieser Frage nicht weiter, da im Fluoreszenzspektrum, sollte effektiver Energietransfer stattfinden, was aber bisher ungeklärt ist, primär die Fluoreszenz der längerwelligen Form erscheint.

Erste Ergebnisse aus der Massenspektroskopie wiesen auf ein Verhältnis von ca. 1 : 1 zwischen rot und grün fluoreszierendem Chromophor hin [48], auch Abschätzungen aus der Elektronendichteverteilung aus Röntgenstrukturdaten wiesen in diese Richtung [40], insgesamt bleiben die Autoren jedoch eher vage.

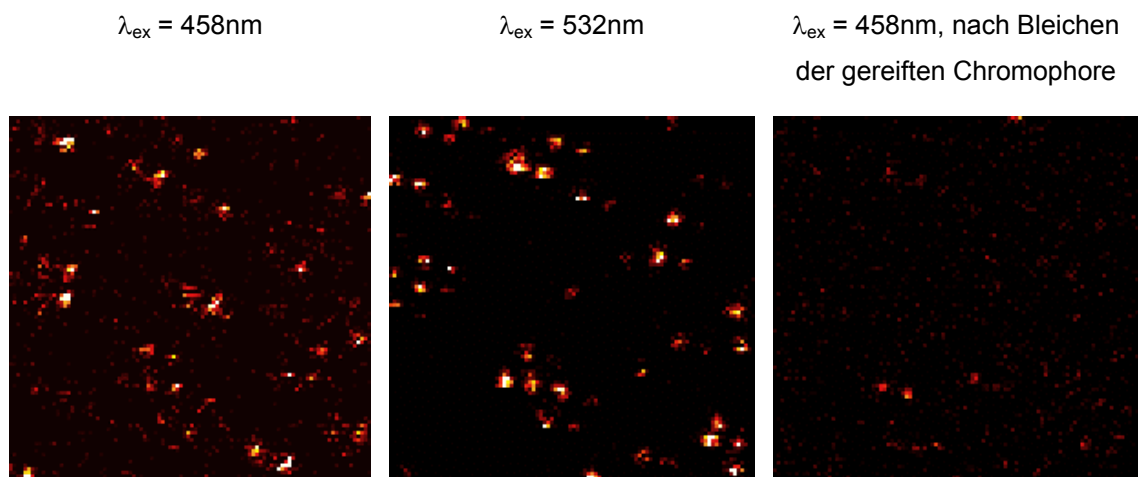
### 5.2.7.1 Bleichexperimente auf Einzelmolekülebene

Die Einzelmolekülspektroskopie bietet die Möglichkeit, der Frage nach dem Anzahlverhältnis von Proteinen mit gereiftem zu ungereiftem Chromophor nachzugehen. Am einfachsten wäre sicherlich das einfache Abzählen, bei wie vielen DsRed Spektren einzelner Oligomere bei gleichzeitiger möglicher Anregung beider Chromophorarten Fluoreszenz des grün fluoreszierenden, ungereiften Chromophors, bzw. des rot fluoreszierenden, gereiften Chromophors gefunden wurde. Dieser Ansatz ignoriert allerdings die bisher ungeklärte Frage nach Energietransfer zum langwellig fluoreszierenden Chromophor, was bei sehr effizientem Energietransfer die Ergebnisse dieser Zählung völlig verfälscht, da die kurzwellig fluoreszierenden Chromophore aufgrund des Energietransfers in diesem Fall auch im Einzelmolekülexperiment nicht sichtbar sind.

Dieses Problem kann durch ein Bleichexperiment auf Einzelmolekülebene nach folgendem Schema berücksichtigt werden: Von einer Stelle der Probe wird zunächst ein Fluoreszenzintensitätsbild mit Anregung bei 458nm aufgenommen, direkt gefolgt von einem Bild mit Anregung bei 532nm. Danach wird die gerade untersuchte Probenfläche intensiv mit Licht der Wellenlänge 532nm bestrahlt. Da bei dieser Wellenlänge nur der ausgereifte, rot fluoreszierende Chromophor absorbiert, wird dieser selektiv photozerstört. Das Resultat der Bestrahlung wird jeweils überprüft, erst wenn bei Anregung bei 532nm keine Fluoreszenz mehr detektiert werden kann, wird fortgefahren, indem wiederum ein Fluoreszenzbild mit Anregung bei 458nm aufgenommen wird. Alle Stellen, an denen in diesem Bild noch Fluoreszenz beobachtet werden kann, zeigen die Existenz von ungereiften Chromophoren an, zur eindeutigen Identifizierung werden diese Fluoreszenzsignale abschließend noch spektroskopiert.

Durch Vergleich der Bilder sind sowohl Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Oligomere als auch die Anregbarkeit des langwellig fluoreszierenden Chromophors bei kurzweiliger Anregung möglich, jedoch sind die experimentellen Schwierigkeiten nicht zu unterschätzen. Hauptsächlich sind in dieser Hinsicht die geringe Photostabilität gegen Bleichen der Chromophore und die geringe Anregbarkeit des gereiften

Chromophors bei kurzen Wellenlängen zu erwähnen. Hier sind Kompromisse notwendig. Einerseits braucht man zur deutlichen Detektion hohe Anregungsleistungen und lange Integrationszeiten, andererseits ist es notwendig, die Proteine in drei Fluoreszenzbildern und danach noch spektral zu untersuchen, was geringe Anregungsleistungen und kurze Integrationsdauern notwendig macht. Gewählt wurden hier kurze Integrationsdauern bei der Aufnahme der Fluoreszenzintensitätsbilder, da es von entscheidender Bedeutung ist, von den empfindlichen ungereiften Chromophoren so wenige wie möglich vor Abschluss der Untersuchung zu bleichen. Dies zusammen mit den starken Intensitätsfluktuationen, die für die fluoreszierenden Proteine typisch sind, führt zu einem mäßigen Signal zu Rausch Verhältnis der Bilder, was die Auswertung zusammen mit der durch den Aufbau bedingten Ausbildung eines Doppelbildes durch einen zweiten Anregungsfocus, erschwert.



**Abbildung 5.82: Bleichexperiment mit einzelnen DsRed Oligomeren**

Die Fluoreszenzintensitätsbilder stellen den gleichen Probenausschnitt dar.

Links: Anregung bei 458nm

Mitte: Anregung bei 532nm

Rechts: Anregung bei 458nm nach selektivem Photozerstören der gereiften Chromophore mit Licht der Wellenlänge 532nm

Nach dem Zerstören der gereiften Chromophore sind bei Anregung mit 458nm nur noch wenige fluoreszierende Proteine, nämlich die mit ungereiftem Chromophor, sichtbar. Dies belegt zum einen, dass die gereiften Chromophore bei kurzweiliger Anregung nicht ausschließlich über Energietransfer angeregt werden, zum anderen kann durch Vergleich der Anzahl an Fluoreszenzpunkten vor und nach dem selektiven Bleichen der gereiften Chromophore der Anteil von ungereiften Chromophoren in DsRed abgeschätzt werden.

In Abbildung 5.82 sind die Fluoreszenzintensitätsbilder der skizzierten Untersuchung für einen Bereich einer Probe mit DsRed Proteinen gezeigt. Bild a) wurde bei Anregung mit 458nm aufgenommen, unmittelbar danach folgte die Untersuchung des gleichen Probenbereiches mit Anregung bei 532nm, wobei das Bild b) erhalten wurde. Danach

wurde der Bereich intensiv mit Laserlicht der Wellenlänge 532nm bestrahlt, um den rot fluoreszierenden Chromophor selektiv zu bleichen. Die Auswirkung des Bleichens zeigt sich nicht nur bei Anregung mit 532nm, wo gar keine Fluoreszenz mehr beobachtet wurde, sondern auch bei Anregung mit 458nm in Bild c). Um zu verifizieren, dass es sich bei der beobachteten Fluoreszenz in c) um Fluoreszenz des ungeriffen Chromophors handelt, wurden alle Stellen, an denen Fluoreszenz beobachtet werden konnte, noch spektral aufgelöst untersucht.

Obwohl die Auswertung oft schwierig war, war das Ergebnis dennoch eindeutig. Für DsRed waren die Bilder mit Anregungswellenlängen von 458nm und 532nm vor dem selektiven Bleichen des gereiften Chromophors praktisch identisch, zu beinahe jedem Fluoreszenzsignal ließ sich eine Entsprechung bei der jeweils anderen Anregungswellenlänge finden.

Das Bleichen des langwelligen Chromophors führte dazu, dass bei kurzweiliger Anregung nur noch sehr wenige fluoreszierende Chromophore gefunden werden konnten. Insgesamt wurden auf den Fluoreszenzbildern vor dem selektiven Bleichen 231 einzelne DsRed Oligomere gefunden, nach dem selektiven Bleichen des gereiften Chromophors konnte nur noch an 42 Stellen Fluoreszenz bei Anregung bei 458nm detektiert werden, wovon an 12 dieser Stellen eindeutige Fluoreszenzspektren des ungeriffen Chromophors nachgewiesen wurden.

Bei einem Anteil des ungeriffen Chromophors von ca. 50%, wie in der Literatur angedeutet, enthalten bei stochastischer Zusammensetzung der Tetramere ca. 94% der Tetramere wenigstens ein Protein mit ungeriffem Chromophor, welches nach dem Bleichen der langwelligen Chromophore bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm detektiert werden kann. Dies bedeutet, dass in diesem Fall an 94% der Stellen, an denen vor dem Bleichen der gereiften Chromophore Fluoreszenz beobachtet werden konnte, dies auch nach dem Bleichen der gereiften Chromophore bei Anregung bei 458nm möglich sein muss. Die erhaltenen Bilder zeigen deutlich, dass dies im vorliegenden Fall nicht zutrifft. Der Anteil an Oligomeren, die wenigstens ein Protein mit ungeriffem Chromophor enthalten, ist signifikant geringer als 94%.

Eindeutig nachgewiesen werden konnte das Vorhandensein ungeriffen Chromophore für 5% der Oligomere, nämlich für die 12, bei denen eindeutige Fluoreszenzspektren nach dem Bleichen des gereiften Chromophors gefunden wurden. Einen Einfluss, weshalb bei den restlichen Stellen, bei denen Fluoreszenz bei Anregung mit 458nm gefunden wurde, aber keine Spektren zu detektieren waren, hat sicherlich die geringe Stabilität gegen Photobleichen der fluoreszierenden Proteine, so dass die Chromophore bereits zerstört waren, als die Spektren aufgenommen wurden.



Weiterhin ist von einer kleinen Anzahl falsch positiver Signale, z.B. durch Verunreinigungen, auszugehen.

Geht man von Tetrameren und stochastischer Zusammensetzung aus Proteinen mit rot und grün fluoreszierendem Chromophor aus, so kann der Anteil rot zu grün fluoreszierender Proteine aus diesen Daten leicht errechnet werden. Je nachdem, ob man von den spektral nachgewiesenen oder den im Fluoreszenzintensitätsbild gefundenen Fluoreszenzpunkten bei kurzweiliger Anregung nach dem Bleichen des gereiften Chromophors ausgeht, erhält man einen Anteil von ca. 1,5%, bzw. ca. 5% Proteine mit ungereiftem Chromophor in DsRed.

Neben dem geringen Anteil an ungereiften Chromophoren beweist das Experiment außerdem die Möglichkeit der kurzweiligen Anregung der rot fluoreszierenden Proteine. Die beobachtete rote Fluoreszenz bei kurzweiliger Anregung ist eindeutig nicht auf ausschließliche Anregung des ungereiften Chromophors und Energietransfer auf den rot fluoreszierenden Chromophor zurückzuführen.

Die bestimmte Spanne für den Anteil an ungereiften Chromophoren weicht deutlich von dem zwischenzeitlich von Garcia-Parajo et al. ebenfalls im Einzelmolekülexperiment ermitteltem Wert ab [70]. Deren Methode bestand im Prinzip aus dem Vergleich von Fluoreszenzbildern mit Anregung bei 488nm und Anregung bei 568nm. Einige Oligomere waren nur auf den Bildern mit Anregung bei 488nm zu sehen, andere nur auf denen mit Anregung bei 568nm. Zur Interpretation wurde vorausgesetzt, dass der rot fluoreszierende Chromophor nicht mit Licht der Wellenlänge 488nm angeregt werden kann, Fluoreszenz dieses Chromophors bei Anregung bei 488nm ausschließlich von effektivem Energietransfer herrührt. Daraus wurde geschlossen, dass die Oligomere, die nur bei Anregung mit 488nm detektiert wurden, aus rein grün fluoreszierenden Proteinen und die, die ausschließlich bei Anregung bei 568nm detektiert wurden, ausschließlich aus rot fluoreszierenden Proteinen aufgebaut sind. Hieraus errechnete sich ein Anzahlverhältnis von grün zu rot fluoreszierenden Proteinen von 1:1,2-1,5. Der verwendete Ansatz stellt den ersten Teil des oben diskutierten Experimentes dar, und greift damit zu kurz, da der entscheidende Teil des Bleichens und Überprüfens der Fluoreszenz fehlt. Es wurden keine Spektren, sondern nur Fluoreszenzintensitäten detektiert, weshalb nur spekuliert werden konnte, dass die Oligomere, die ausschließlich mit Anregung bei 488nm gefunden wurden, tatsächlich rein grün fluoreszierten. Auch die Annahme, dass der rot fluoreszierende Chromophor bei 488nm nicht anzuregen ist, ist, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, nicht zu halten, und auch die Beantwortung der Frage nach Energietransfer zwischen den Chromophoren ist nicht abschließend geklärt.

Neben dem hier durchgeführten Experiment spricht auch das Absorptionsspektrum gegen einen hohen Anteil an ungereiftem Chromophor (vgl. Kapitel 4.2.1), weiterhin sind die Daten konsistent zu der spektral aufgelösten Einzelmoleküluntersuchung, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 5.2.6.2).

E5 wurde nach der gleichen Methode untersucht, wobei analoge Ergebnisse wie bei DsRed erhalten wurden. Auch bei E5 zeigten die Fluoreszenzintensitätsbilder mit Anregung bei 458nm und 532nm die gleichen Oligomere. Nach dem selektiven Bleichen der gereiften Chromophore mit Licht der Wellenlänge 532nm waren auch bei E5 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 458nm nur noch wenige Oligomere auszumachen. Von 150 identifizierten Oligomeren war nach dem Bleichen noch von 28 im Fluoreszenzbild Emission auszumachen, von diesen konnte von 10 Einzelmolekülfluoreszenzspektren aufgenommen werden. Es ergibt sich damit ein Anteil von 5% Proteinen mit ungereiftem Chromophor, wenn man von der Detektion im Fluoreszenzintensitätsbild ausgeht, und von 2%, wenn man von der durch Emissionsspektren bestätigten Identifikation ausgeht. Insgesamt zeigt sich auch hier die sehr große spektrale Übereinstimmung zwischen ausgereiftem DsRed und ausgereiftem E5.

Die hier gefundenen Anteile für Proteine mit ungereiftem Chromophor sind als Untergrenzen zu verstehen. Obwohl großer Wert darauf gelegt wurde, mit möglichst geringen Anregungsleistungen zu arbeiten, kann nicht verhindert werden, dass ein Teil der Chromophore vor Abschluss der Untersuchung eines Probenausschnitts bereits durch Bleichen zerstört wurde. Da die Stabilität gegen Photobleichen des grün fluoreszierenden Chromophors geringer ist als die des rot fluoreszierenden Chromophors (vgl. Kapitel 5.2.1), kann dies letztlich zu einer gewissen Unterrepräsentation der grün fluoreszierenden Proteine führen. Dennoch zeigen die Experimente deutlich, dass die Anteile an grün fluoreszierenden Proteinen geringer sind als in der Literatur angegeben.

In ähnlicher Weise wurde auch AG4 untersucht, allerdings wurde in diesem Fall auf das Bleichen des rot fluoreszierenden Chromophors verzichtet, da bei dem geringen Anteil rot fluoreszierender Chromophore davon keinerlei Erkenntnisgewinn zu erwarten war. Stattdessen wurde aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitätsbilder mit Anregung bei 458nm und bei 532nm der Anteil an Einheiten bestimmt, der bei Anregung mit 532nm und 458nm sichtbar war. Unter Vernachlässigung schnellen Ausbleichens und des Wechsels in einen nicht fluoreszierenden Zustand sind nur diese Einheiten bei beiden Wellenlängen sichtbar, die wenigstens ein Protein mit gereiftem Chromophor enthalten. Von den insgesamt 224 beobachteten Einheiten traf dies auf 38 Einheiten zu. Daraus errechnet sich für stochastisch zusammengesetzte Tetramere

ein Anteil von 5,4% Proteinen, die den gereiften rot fluoreszierenden Chromophor enthalten. Bestätigt wird dieser Wert durch die spektral aufgelösten Untersuchungen an AG4, bei denen von 434 beobachteten Einheiten 86 Fluoreszenz des gereiften Chromophors zeigten, woraus sich der Anteil von rot fluoreszierenden Chromophoren zu 4,5% bestimmt.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es zu zeigen, dass die zeitlich und spektral aufgelöste Spektroskopie einzelner fluoreszierender Proteine in-vitro möglich ist. Durch Optimierung der Präparationsmethoden und der experimentellen Bedingungen der Fluoreszenzspektroskopie war es möglich, Spektrenserien von einzelnen fluoreszierenden Proteinen der Aequorea GFP Gruppe und von einzelnen fluoreszierenden Proteinoligomeren der DsRed Gruppe aufzunehmen.

Obwohl die fluoreszierenden Proteine breite Anwendung in den Biowissenschaften finden, gibt es bis heute nur wenige Arbeiten, die sich mit der Fluoreszenz einzelner Proteine der GFP Varianten und einzelner Oligomere des DsRed beschäftigen. Spektral und zeitlich aufgelöste Untersuchungen einzelner fluoreszierender Proteine und Proteinoligomere liegen bisher nicht vor, aus der DsRed Gruppe wurde bisher überhaupt nur der Gesamtintensitätsverlauf der Fluoreszenz von DsRed auf Einzelmolekülebene untersucht.

Es wurden die grün und gelb fluoreszierenden Varianten EGFP (Phe-64-Leu, Ser-65-Thr) und EYFP (Ser-65-Gly, Val-68-Leu, Ser-72-Ala, Thr-203-Tyr) des fluoreszierenden Proteins aus der Qualle *Aequorea victoria*, sowie das rot fluoreszierende DsRed aus der Steinkoralle *Discosoma* und dessen ebenfalls rot fluoreszierende Varianten E5 (Val-105-Ala, Ser-197-Thr) und DsRed-2 (Arg-2-Ala, Lys-5-Glu, Lys-9-Thr, Val-105-Ala, Ile-161-Thr, Ser-197-Ala) und die orange, bzw. grün fluoreszierenden DsRed Varianten E8 (Asn-42-His) und AG4 (Val-71-Met, Val-105-Ala, Ser-197-Thr) untersucht.

Zur Charakterisierung der Fluoreszenz der Proteine wurden insgesamt einige Tausend einzelne Proteine, bzw. einzelne Proteinoligomere bei verschiedenen Anregungswellenlängen spektroskopiert. Die erhaltenen Rohspektren wurden mit einer eigens für diesen Zweck ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit konzipierten und realisierten Software weiterverarbeitet, gesichtet und ausgewertet.

Die fluoreszierenden Proteine waren so ausgewählt, dass ein möglichst breiter Bereich verschiedener Fluoreszenz abgedeckt war, und außerdem verschiedene Varianten der für die Forschung vor allen in den Biowissenschaften wichtigen fluoreszierenden Proteine der *Aequorea* GFP und der DsRed Gruppe in der Auswahl enthalten waren. Auf diese Weise konnte das Fluoreszenzverhalten einzelner fluoreszierender Proteine innerhalb der Gruppen, aber auch zwischen den Gruppen, miteinander verglichen werden. Die DsRed Varianten waren außerdem so gewählt, dass durch Vergleich der

Fluoreszenz Rückschlüsse über die bis dato ungeklärten Fragen der Stöchiometrie der Proteinoligomere aus Proteinen mit ungereiftem und gereiftem Chromophor und der FRET Wechselwirkungen verschiedener Chromophore innerhalb eines Oligomers gezogen werden konnten.

Bei allen fluoreszierenden Proteinen wurde eine Vielzahl von spektralen Unterschieden zwischen verschiedenen einzelnen Proteinen, aber auch Veränderungen der Fluoreszenz der vorherrschenden Formen mit der Zeit beobachtet. Zur Verteilung der spektralen Parameter und der spektralen Dynamik der vorherrschenden Formen wurden folgende Ergebnisse erhalten:

- Es wurden die Verteilungen der Maximumlagen der Emissionsbanden für alle untersuchten Proteine bestimmt. Der Vergleich der Breite der Streuung der Maximumlagen für jeweils homologe Chromophore zeigt, dass die Verteilung der Maximumlagen bei allen Proteinen, sowohl der Aequorea GFP als auch der DsRed Gruppe, mit der Anzahl der Atome und Atomgruppen in van der Waals Kontakt zum Chromophor zunimmt. Die nur bei der Beobachtung einzelner Proteine zugängliche Breite der Verteilung der Maximumlagen ist somit ein Maß für die Einbettung des Chromophors in die Proteinumgebung.
- Die Bestimmung der spektralen Diffusion der Emissionsmaximumlagen ohne Formumwandlungen pro Protein zeigt, dass sich bei EGFP und EYFP bei ca. 50% der Proteine die Lage des Fluoreszenzmaximums um mehr als 4,5nm während der Beobachtungszeit verändert. Bei den Proteinen der DsRed Gruppe verändert sich die Lage der Bandenmaxima bei ca. 50% der beobachteten Oligomere um mehr als 6nm.
- Um die Auswirkungen von spontanen oder photoinduzierten spektralen Verschiebungen auf die FRET Rate in einem FRET Paar abzuschätzen, wurde exemplarisch die Veränderung des spektralen Überlappungsintegrals des FRET Paares aus DsRed und AG4 berechnet. Ausgegangen wurde hierbei von den Werten der spektralen Diffusion der Maximumlagen der Emission für die Proteine der DsRed Gruppe und den Ensemblespektren von DsRed und AG4. Die spontanen spektralen Verschiebungen können bei bis zur Hälfte der beobachteten FRET Paare Veränderung des spektralen Überlappungsintegrals von über 10% bewirken. Die spontanen spektralen Verschiebungen der

Spektren sind demnach ein nicht zu vernachlässigender Effekt bei der Spektroskopie einzelner FRET Paare aus fluoreszierenden Proteinen.

- Die Verteilung der relativen Intensitätsänderungen des Emissionsmaximums von einem Spektrum zum nächsten einer Serie wurde für alle verschiedenen Proteine bestimmt und zeigt, dass die beobachteten Proteine deutliche Intensitätsfluktuationen aufweisen. Bei der Beobachtung der Proteine der Aequorea GFP Gruppe wurden deutlich häufiger Dunkelzeiten ohne Fluoreszenz, länger als die Zeitauflösung des Experimentes von einer Sekunde, gefunden als bei den Proteinen der DsRed Gruppe, was auf das Vorliegen dieser Proteine als Oligomere zurückzuführen ist.

Durch Verfolgung der Fluoreszenzspektren konnte für EYFP gezeigt werden, dass der für dieses Protein in der Literatur vorgeschlagene Mechanismus der Protonierung des Chromophors nicht die dominierende Ursache für die beobachteten Dunkelzeiten ist.

Neben den Unterschieden und Fluktuationen der Fluoreszenz bei den vorherrschenden Formen der Proteine wurden im Einzelmolekülexperiment auch spektral von der vorherrschenden Form abweichende Formen gefunden, die im Ensemble nicht oder nur schwer nachzuweisen sind:

- Es wurde gezeigt, dass in EYFP die kurzweilig zur vorherrschenden B-Form fluoreszierende I-Form, die bisher ausschließlich bei kryogenen Temperaturen nachgewiesen werden konnte, auch bei Raumtemperatur populiert ist. Weiterhin konnten Übergänge zwischen der B- und der I-Form des EYFP beobachtet werden.
- Sowohl für EYFP als auch für EGFP konnten jeweils drei einander entsprechende bathochrom zu den vorherrschenden Formen bisher unbekannte fluoreszierende Formen identifiziert werden. Es wurden Übergänge zwischen den vorherrschenden und allen bathochrom fluoreszierenden Formen beobachtet, wobei zum Teil Dunkelzeiten von einigen Sekunden Dauer ohne Fluoreszenz zwischen dem Verschwinden der Fluoreszenz der einen Form und dem Erscheinen der Fluoreszenz der anderen Form auftraten. Daraus wurde auf einen zweistufigen Reaktionsmechanismus über ein nicht fluoreszierendes Zwischenprodukt geschlossen.

- Die Lage der Fluoreszenz der drei Formen und die beobachtete zweistufige Bildung weisen darauf hin, dass der bereits im Ensemble beobachteten photoaktivierten Bildung roter Fluoreszenz bei Aequorea GFP Varianten die Bildung der drei im Einzelmolekülexperiment identifizierten Formen zugrunde liegt.
- Der Vergleich der beiden am stärksten bathochrom verschobenen Formen der Aequorea GFP Varianten zeigt deutliche Analogien zu bei DsRed beobachteten Fluoreszenzspektren. Ausgehend von den spektralen Homologien wurde vorgeschlagen, dass die stark rotverschobenen Aequorea GFP Formen auf ein verlängertes chromophores  $\pi$ -System analog zu dem von DsRed zurückgehen.
- Für DsRed und dessen Varianten DsRed-2, E5, E8 und Ag4 konnte gezeigt werden, dass im Einzelmolekülexperiment aufgrund der vergleichsweise hohen Anregungsleistungen der ausgereifte Chromophor schnell in eine ca. 15nm bathochrom zur Ensemblefluoreszenz fluoreszierende „super rote“ Form übergeht. Bei allen Varianten wird bei Beobachtung der Fluoreszenz des gereiften Chromophors praktisch ausschließlich Fluoreszenz der super roten Form beobachtet.
- Bei allen Proteinen der DsRed Gruppe wurden Formen mit Fluoreszenzmaximum um 530nm und 570nm gefunden, die den Formen, die bei der Untersuchung der Proteine der Aequorea GFP Gruppe beobachtet wurden, entsprechen. Dies unterstreicht einmal mehr die Homologie der Proteine beider Gruppen.

Weiterhin wurde die bislang ungeklärte Frage nach der Zusammensetzung der Oligomere der Proteine der DsRed Gruppe aus Monomeren mit ungereiftem und gereiftem Chromophor und der FRET Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Chromophoren innerhalb eines Oligomers mit den Methoden der Einzelmolekülspektroskopie angegangen. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- Bei allen Proteinen aus der DsRed Gruppe wurden gemischte Fluoreszenzspektren aus Fluoreszenz des ungereiften und des gereiften Chromophors gefunden. Dies zeigt, dass sowohl bei DsRed als auch bei allen untersuchten Varianten gemischte Oligomere aus Monomeren mit gereiftem und ungereiftem Chromophor vorkommen. Die im Ensemble beobachtete rote und grüne Fluoreszenz der Proteine beruht demnach nicht

auf der Emission rein rot fluoreszierender und rein grün fluoreszierender Oligomere.

- Die Fluoreszenzdynamik der DsRed Variante E8, die sowohl deutliche Fluoreszenz des ungereiften, als auch des gereiften Chromophors zeigt, wurde auf FRET Wechselwirkungen innerhalb der Oligomere untersucht, die sich an Veränderungen der Verhältnisse der Fluoreszenzbandenintensitäten zueinander zeigen sollten. Es konnten keine eindeutigen Belege für, aber auch keine eindeutigen Belege gegen eine FRET Kopplung unterschiedlicher Chromophore eines Oligomers gefunden werden. Eine hocheffektive FRET Kopplung, wie in der Literatur an einigen Stellen postuliert, konnte jedoch ausgeschlossen werden.
- Durch Bleichexperimente auf Einzelmolekülebene mit verschiedenen Anregungswellenlängen konnte das Anzahlverhältnis zwischen Proteinen mit gereiftem zu ungereiftem Chromophor für DsRed, E5 und AG4 abgeschätzt werden. Für DsRed und E5 wurde ein Anteil von ca. 1,5% bis 5% grün fluoreszierende Proteine, für AG4 ein Anteil von ca. 5% rot fluoreszierende Proteine, abgeschätzt.
- Der Anteil Oligomere mit ungereiftem Chromophor, der bei der spektral aufgelösten Untersuchung der Fluoreszenz einzelner Oligomere von DsRed und E5 beobachtet wurde, entspricht dem Anteil, der im Bleichexperiment bestimmt wurde. Es kann daraus geschlossen werden, dass auch bei DsRed und E5 kein hocheffizienter Energietransfer zwischen unterschiedlichen Chromophoren stattfindet. Gleiches gilt für AG4.

Es kann abschließend festgestellt werden, dass es mit Hilfe der spektral aufgelösten Untersuchung einzelner fluoreszierender Proteine, bzw. Proteinoligomere gelang, einige offene Fragen zu klären, aber auch neue Anknüpfungspunkte für weitere Arbeiten zu schaffen. Speziell im Hinblick auf kommende Experimente an einzelnen FRET Paaren aus fluoreszierenden Proteinen ist es notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte spektrale Heterogenität und Dynamik zu berücksichtigen. Anknüpfungspunkte ergeben sich durch weitere Experimente, z.B. mit Anregung mit mehreren Wellenlängen, eine Methode, die im Rahmen dieser Arbeit nur am Rande angewendet wurde, und die sicher noch optimiert werden kann und auf interessante Ergebnisse hoffen lässt.



Gerade die in letzter Zeit vorangetriebene Entwicklung weiterer Varianten und auch die Entdeckung neuer Gruppen fluoreszierender Proteine zeigt, dass die fluoreszierenden Proteine ein nicht mehr wegzudenkendes Werkzeug in den Biowissenschaften geworden sind. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie können die fluoreszierenden Proteine zum einen charakterisiert werden, zum anderen stellen die fluoreszierenden Proteine zusammen mit der Einzelmolekülspektroskopie eine vielversprechende Methode dar, um Fragestellungen der Biowissenschaften zu beantworten.

## 7 Literatur

1. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J. Cell. Comp. Physiol., 1962. **59**: p. 223-239.
2. Shimomura, O., *Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein*. FEBS Letters, 1979. **104**: p. 220-222.
3. Prasher, D.C., V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, and M.J. Cormier, *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 1992. **111**: p. 229-233.
4. Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher, *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
5. Schmundt, H., *Das Kunst-Gen*. Der Spiegel, 2000. **26**: p. 114.
6. Yang, M., E. Baranov, A.R. Moossa, S. Penman, and R.M. Hoffman, *Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging*. PNAS, 2000. **97**(22): p. 12278-12282.
7. Chan, A., K. Chong, C. Martinovich, C. Simerly, and G. Schatten, *Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes*. science, 2001. **291**: p. 309-312.
8. Zhang, J., R.E. Campbell, A. Ting, and R.Y. Tsien, *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nature Review Molecular Biology, 2001. **3**: p. 906-918.
9. Sun, Y., M.D. Wong, and B.P. Rosen, *Role of CysteinyI Residues in Sensing Pb(II), Cd(II), and Zn(II) by the Plasmid pI258 CadC Repressor*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(18): p. 14955-14960.
10. Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy, *Studying protein dynamics in living cells*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(6): p. 444-456.
11. Lippincott-Schwartz, J. and G. Patterson, *Development and use of fluorescent protein markers in living cells*. science, 2003. **300**: p. 87-91.
12. White, J. and E. Stelzer, *Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**(2): p. 61-65.
13. Jayaraman, S., P. Haggie, R. Wachter, S.J. Remington, and A.S. Verkman *Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor*. J. Biol. Chem., 2000. **275**: p. 6047-6050.
14. Elsliger, M.-A., R.M. Wachter, K. Kallio, G.T. Hanson, and S.J. Remington, *Structural and Spectral Response of Green Fluorescent Protein Variants to Changes in pH*. Biochemistry, 1999. **38**: p. 5296-5301.
15. Miyawaki, A., O. Griesbeck, R. Heim, and R. Tsien, *Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons*. PNAS, 1999. **96**: p. 2135-2140.

16. Ruehr, M., D. Zakhary, D. Damron, and B. M., *Cyclic AMP-dependent protein kinase binding to A-kinase anchoring proteins in living cells by fluorescence resonance energy transfer of green fluorescent protein fusion proteins*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(46): p. 33092-33096.
17. Xia, Z., Q. Zhou, J. Lin, and L. Y., *Stable SNARE complex prior to evoked synaptic vesicle fusion revealed by fluorescence resonance energy transfer*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(3): p. 1766-1771.
18. Zimmer, M., *Green Fluorescent Protein (GFP): Application, Structure, and Related Photophysical Behavior*. chemical Reviews, 2002. **102**: p. 759-781.
19. Betzig, E. and R.J. Chichester, *Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy*. science, 1993. **262**: p. 1422-1425.
20. Ha, T., T. Enderle, D.S. Chemla, P.R. Selvin, and S. Weiss, *Quantum jumps of single molecules at room temperature*. Chemical Physics Letters, 1997. **271**(1-3): p. 1-5.
21. Stracke, F., C. Blum, S. Becker, K. Müllen, and A. Meixner, *Intrinsic conformer jumps observed by single molecule spectroscopy in real time*. Chemical Physics Letters, 2000. **325**: p. 196-202.
22. Weiss, S., *Measuring Conformational Dynamics of Biomolecules by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy*. Nature Structural Biology, 2000. **7**: p. 724-729.
23. Ha, T., X. Zhuang, H. Kim, J. Orr, J. Williamson, and S. Chu, *Ligand-induced conformational changes observed in single RNA molecules*. PNAS, 1999. **96**(16): p. 9077-9082.
24. Dickson, R., A. Cubitt, R. Tsien, and W. Moerner, *On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent proteins*. nature, 1997. **388**: p. 355-358.
25. Garcia-Parajo, M., G. Segers-Nolten, J. Veerman, J. Greve, and N. van Hulst, *Real-time light-driven dynamics of the emission in single green fluorescent protein molecules*. PNAS, 1999. **97**(13): p. 7237-7242.
26. Petermann, E., S. Brassalet, and W. Moerner, *The Fluorescence Dynamics of Single Molecules of Green Fluorescent Protein*. Journal of Physical Chemistry A, 1999. **103**: p. 10553-10560.
27. Zumbusch, A. and G. Jung, *Single Molecule Spectroscopy of the Green Fluorescent Protein: A Critical Assessment*. Single Molecules, 2000. **1**(4): p. 261-270.
28. Harms, G., L. Cognet, P. Lommerse, G. Blab, and T. Schmidt, *Autofluorescent Proteins in Single Molecule Research: Applications to Live Cell Imaging Spectroscopy*. Biophysical Journal, 2001. **80**: p. 2396-2408.
29. Brassalet, S., E.J.G. Peterman, A. Miyawaki, and W.E. Moerner, *Single-molecule fluorescence resonant energy transfer in calcium concentration dependent cameleon*. journal of Physical Chemistry B, 2000. **104**: p. 3676-3682.

30. Cotlet, M., J. Hofkens, S. Habuchi, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Michiels, J. Vanderleyden, and F. De Schryver, *Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy*. PNAS, 2001. **98**(25): p. 14398-14403.
31. Blum, C., V. Subramaniam, F. Schleifenbaum, F. Stracke, B. Angres, A. Terskikh, and A. Meixner, *Single molecule fluorescence spectroscopy of mutants of the discosoma red fluorescent protein DsRed*. Chemical Physics Letters, 2002. **362**: p. 355-361.
32. Becker, *Einführung in die Photochemie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, 1983: p. 73.
33. Lakowicz, J., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Second Edition ed. 1999, New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers. 368.
34. Fleury, L., B. Sick, G. Zumhofen, B. Hecht, and U.P. Wild, *High photo-stability in an organic crystal at room temperature observed by scanning confocal optical microscopy*. Molecular Physics, 1998. **95**: p. 1333-1338.
35. Panzer, O., W. Gohde, O.C. Fischer, H. Fuchs, and K. Müllen, *Influence of oxygene on single molecule blinking*. Advanced Materials, 1998. **10**: p. 1469-1472.
36. Blum, C., F. Stracke, S. Becker, K. Müllen, and A. Meixner, *Discrimination and Interpretation of spectral phenomena by room-temperature single-molecule spectroscopy*. Journal of Physical Chemistry A, 2001. **105**: p. 6983-6990.
37. Labas, Y.A., N.G. Gurskaya, Y.G. Yanushevich, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, S.A. Lukyanov, and M.V. Matz, *Diversity and evolution of the green fluorescent protein family*. PNAS, 2002. **99**(7): p. 4256-4261.
38. Yang, F., L. Moss, and G. Phillips, *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature Biotechnology, 1996. **14**(1246-1251).
39. Matz, M., A. Fradkov, Y. Labas, A. Savitsky, A. Zaraisky, M. Markelov, and S. Lukyanov, *Fluorescent proteins from non-bioluminescent Anthozoa species*. Nature Biotechnology, 1999. **17**: p. 969-973.
40. Yarbrough, D., R. Wachter, K. Kallio, M. Matz, and S. Remington, *Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution*. PNAS, 2001. **98**: p. 462-467.
41. Wall, M., M. Socolich, and R. Ranganathan, *The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed*. Nature Structural Biology, 2000. **7**(12): p. 1089.
42. Baird, G., D. Zacharias, and R. Tsien, *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of dsRed, a red fluorescent protein from coral*. PNAS, 2000. **97**(22): p. 11984-11989.
43. Heikal, A., S. Hess, G. Baird, R. Tsien, and W. Webb, *Molecular Spectroscopy and Dynamics of Intrinsically Fluorescent Proteins: Coral Red (DsRed) and Yellow (Citrine)*. PNAS, 2000. **97**: p. 11996-12001.
44. Heim, R., D. Prasher, and R. Tsien, *Wavelength Mutations and Posttranslational Autoxidation of Green Fluorescent Protein*. PNAS, 1994. **91**: p. 12501-12504.

45. Cubitt, A., R. Heim, S. Adams, A. Boyd, L. Gross, and R. Tsien, *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends in Biochemical Sciences, 1995. **20**(11): p. 448-455.
46. Ormoe, M., A. Cubitt, K. Kallio, L. Gross, R. Tsien, and S. Remington, *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. science, 1996. **272**(5280): p. 1392-1395.
47. Tsien, R., *The Green Fluorescent Protein*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**: p. 509.
48. Gross, L., G. Baird, R. Hoffman, K. Baldrige, and R. Tsien, *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. PNAS, 2000. **97**(22): p. 11990-11995.
49. Weber, M., *Dissertation*. Dissertation, Physikalische Chemie, Universität Siegen, 1999: p. 21.
50. Blum, C., *Schwerpunktarbeit, Herstellung von Fluoreszenzproben für die Einzelmolekülmikroskopie*. Physikalische Chemie, Universität Siegen, 1998.
51. Stracke, F., *Beschreibung, Klassifikation und statistische Analyse der zeitabhängigen Fluoreszenz einzelner Moleküle*. Dissertation, Physikalische Chemie, Universität Siegen, 2002: p. 40.
52. Niwa, H., S. Inouye, T. Hirano, T. Matsuno, S. Kojima, M. Kubota, M. Ohashi, and F. Tsuji, *Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein*. PNAS, 1996. **93**: p. 13617-13622.
53. Chatteraj, M., B. King, G. Bublitz, and S. Boxer, *Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer*. PNAS, 1996. **93**(16): p. 8362-8367.
54. Lossau, H., A. Kummer, R. Heinecke, F. Pöllinger-Dammer, C. Kompa, G. Bieser, T. Jonsson, C.M. Silva, M.M. Yang, D.C. Youvan, and M.E. Michel-Beyerle, *Time-resolved Spectroscopy of Wild-type and Mutant Green Fluorescent Proteins Reveals Excited State Deprotonation Consistent with Fluorophore-protein Interactions*. Chemical Physics, 1996. **213**: p. 1-16.
55. Brejc, K., T. Sixma, P. Kitts, S. Kain, R. Tsien, M. Ormö, and S. Remington, *Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. PNAS, 1997. **94**: p. 2306-2311.
56. Creemers, T., A. Lock, V. Subramaniam, T. Jovin, and S. Völker, *Three photoconvertible forms of green fluorescent protein indentified by spectral hole-burning*. Nature Structural Biology, 1999. **6**: p. 557-560.
57. Cormack, B., R. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. **173**: p. 33-38.
58. Patterson, G., S. Knobel, W. Sharif, S. Kain, and D. Piston, *Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy*. Biophysical Journal, 1997. **73**: p. 2782-2790.
59. Creemers, T., A. Lock, V. Subramaniam, T. Jovin, and S. Völker, *Red-shifted mutants of green fluorescent protein: reversible photoconversion*

- studied by hole-burning and high resolution spectroscopy*. Chemical Physics, 2002. **275**: p. 109-121.
60. Palm, G., A. Zdanov, G. Gaitanaris, R. Stauber, G. Pavlakis, and A. Wlodauer, *The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein*. Nature Structural Biology, 1997. **4**: p. 361-365.
  61. Schwille, P., S. Kummer, A. Heikal, W. Moerner, and W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins*. PNAS, 2000. **97**(1): p. 151-156.
  62. Weber, W., V. Helms, A. McCammon, and P. Langhoff, *Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins*. PNAS, 1999. **96**: p. 6177-6182.
  63. Bell, A., X. He, R. Wachter, and P. Tonge, *Probing the ground state structure of the green fluorescent protein chromophore using Raman spectroscopy*. Biochemistry, 2000. **39**: p. 4423-4431.
  64. Wiehler, J., J. von Hummel, and B. Steipe, *Mutants of Discosoma red fluorescent protein with a GFP-like chromophore*. FEBS Letters, 2001. **487**(3): p. 384-389.
  65. Lounis, B., J. Deich, F. Rosell, S. Boxer, and W. Moerner, *Photophysics of dsRed, a Red Fluorescent Protein, from the ensemble to the single molecule level*. Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**: p. 5048-5054.
  66. Schüttrigkeit, T., U. Zachariae, T. von Feilitzsch, J. Wiehler, J. von Hummel, B. Steipe, and M. Bayerle, *Picosecond Time-Resolved FRET in the Fluorescent Protein from Discosoma Red (wt-DsRed)*. ChemPhysChem, 2001. **2**(5): p. 325 - 328.
  67. Bevis, B. and B. Glick, *Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)*. Nature Biotechnology, 2002. **20**: p. 83-87.
  68. Terskikh, A., A. Fradkov, G. Ermakova, A. Zaraisky, P. Tan, A. Kajava, X. Zhao, S. Lukyanov, M. Matz, S. Kim, I. Weissman, and P. Siebert, *"Fluorescent timer": protein that changes color with time*. science, 2000. **290**: p. 1585-1588.
  69. Terskikh, A., A. Fradkov, Z. A., A. Kajava, and B. Angres, *Analysis of DsRed Mutants*. The Journal of Biological Chemistry, 2002. **227**(10): p. 7633-7636.
  70. Garcia-Parajo, M., M. Koopman, v.D. E, V. Subramaniam, and N. van Hulst, *The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection*. PNAS, 2001. **98**(25): p. 14392-14397.
  71. Malvezzi-Campeggi, F., M. Jahnz, K. Heinze, P. Dittrich, and P. Schwille, *Light-Induced Flickering of DsRed Provides Evidence for Distinct and Interconvertible Fluorescent States*. Biophysical Journal, 2001. **81**(3): p. 1776-1785.
  72. Cotlet, M., J. Hofkens, F. Köhn, J. Michiels, G. Dirix, M. Van Guyse, J. Vanderleyden, and F. De Schryver, *Collective effects in individual*

- oligomers of the red fluorescent coral protein DsRed*. Chemical Physics Letters, 2001. **336**: p. 415-423.
73. Wachter, R., M. Elsliger, K. Kallio, G. Hanson, and J. Remington, *Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein*. Structure, 1998. **6**: p. 1267-1277.
74. Lill, M. and V. Helms, *Proton shuttle in green fluorescent protein studied by dynamic simulations*. PNAS, 2002. **99**(5): p. 2778-2781.
75. Ando, R., H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, and A. Miyawaki, *An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein*. PNAS, 2002. **99**(20): p. 12651-12656.
76. Elowitz, M., M. Surette, P. Wolf, J. Stock, and S. Leibler, *Photoactivation turns green fluorescent protein red*. Current Biology, 1997. **7**: p. 809-812.
77. Elowitz, M.B., M.G. Surette, P.-E. Wolf, J.B. Stock, and S. Leibler, *Protein Mobility in the Cytoplasm of Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1999. **181**(1): p. 197-203.
78. Cubitt, A., L. Woollenweber, and R. Heim, *Understanding Structure-Function Relationships in the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein*. Green Fluorescent Proteins (Methods in Cell Biology, Volume), 1999. **58**: p. 19-30.





---

## Dank

Herrn Prof. Dr. Meixner danke ich für die Möglichkeit, mich mit fluoreszierenden Proteinen zu beschäftigen, das hohe Maß an Freiheit, das er mir bei der Bearbeitung des Themas dieser Arbeit ließ und für seine Gesprächsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Subramaniam, der die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten fluoreszierenden Proteine zur Verfügung stellte, und der mir stets mit Rat, und häufig auch mit Tat, zur Seite stand.

Danken möchte ich außerdem allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die Hilfe bei verschiedenen Problemen.

