

**Gerichtete Evolution und Charakterisierung von  
Bakteriophytochromen  
für die tiefrote, hochauflösende  
Fluoreszenzmikroskopie**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Maria Kamper

aus Neuss

Göttingen, 2017

Betreuungsausschuss

**Prof. Dr. Stefan Jakobs**

Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien,  
Abteilung NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen  
Abteilung Neurologie, Universitätsmedizin, Göttingen

**Dr. Till Ischebeck**

Gruppenleiter, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut der  
Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Stefan Jakobs

Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien  
Abteilung NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen  
Abteilung Neurologie, Universitätsmedizin, Göttingen

Korreferent: Dr. Till Ischebeck

Gruppenleiter, Abteilung Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller-Institut der  
Pflanzenwissenschaften, Georg-August-Universität Göttingen

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Helmut Grubmüller

Abteilung für theoretische und computergestützte Biophysik, Max-Planck-Institut für  
biophysikalische Chemie, Göttingen

Prof. Dr. Stefan Hell

Abteilung für NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen

Prof. Dr. Michael Müller

Abteilung für Neuro- und Sinnesphysiologie, Medizinische Fakultät,  
Georg-August-Universität Göttingen

PD Dr. Thomas Teichmann

Abteilung Zellbiologie der Pflanze, Schwann-Schleiden Forschungszentrum für molekulare  
Zellbiologie, Georg-August-Universität Göttingen



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit „Gerichtete Evolution und Charakterisierung von Bakteriophytochromen für die tiefrote, hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie“ selbständig angefertigt wurde und nur die genannten Hilfen und Quellen verwendet wurden.

Maria Kamper, 02.06.17, Göttingen

<b>Summary</b> .....	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>4</b>
1.1 Mikroskopie.....	4
1.1.1 Hochauflösende Mikroskopieverfahren.....	5
1.1.1.1 STED- und RESOLFT-Nanoskopie .....	5
1.1.1.2 Anforderungen an die verwendeten Fluorophore in der Nanoskopie.....	7
1.2 GFP-ähnliche fluoreszierende Proteine.....	9
1.2.1 Globale Struktur .....	9
1.2.2 Chromophormaturation anhand von <i>mGFP</i> und DsRed .....	10
1.2.3 Die Farbpalette der GFP-ähnlichen Fluoreszenzproteine.....	12
1.2.4 Photomodulierbare Fluoreszenzproteine .....	14
1.2.5 Strategie zur Generierung eines GFP-basierten, roten RSFPs.....	16
1.3 Photorezeptoren als optische Werkzeuge.....	18
1.3.1 Phytochrome .....	19
1.3.1.1 Natürliches Vorkommen und Funktion .....	20
1.3.1.2 Gemeinsamkeiten und Tertiärstruktur der Phytochrome.....	21
1.3.1.3 Lineare Tetrapyrrole als externes Chromophor.....	26
1.3.1.4 Chromophorbindetasche.....	27
1.3.1.5 Photozyklus und Signalweiterleitung in (Bakterio)- Phytochromen.....	29
1.3.1.6 Vergleich der Eigenschaften von GFP-homologen und (Bakterio-) Phytochrom-basierten Proteinen.....	33
1.3.1.7 Möglichkeiten der Generierung von FPs auf Basis von Bakteriophytochromen .....	34
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>36</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1 Screening.....	37
3.2 Entwicklung und Vergleich verschiedener Ausgangsvarianten.....	40
3.3 Entwicklung eines FPs auf Basis von Wi-Phy .....	45
3.3.1 Mutagenesestrategie.....	45

3.3.2	Charakterisierung.....	46
3.3.2.1	Spektrale Charakterisierung der generierten Varianten .....	47
3.3.2.2	Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten Varianten.....	48
3.3.2.3	Fluoreszenzlebenszeit und Helligkeitseigenschaften der generierten Varianten.....	50
3.3.3	Anwendung der Variante W4.35 in der Mikroskopie.....	51
3.3.3.1	STED-Nanoskopie mit der Variante W4.35 .....	54
3.4	Entwicklung eines RSFPs auf Basis von Wi-Phy.....	57
3.4.1	Semirationale Mutagenesestrategie .....	57
3.4.2	Positionsstudie .....	58
3.4.3	Vergleich der besten generierten RSFPs.....	62
3.4.4	Weitergehende Charakterisierung der entwickelten RSFPs.....	64
3.4.4.1	Spektrale Charakterisierung der generierten NIR RSFPs.....	64
3.4.4.2	Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten NIR RSFPs .....	65
3.4.4.3	Fluoreszenzlebenszeit, Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient der generierten NIR RSFPs .....	66
3.4.5	Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen.....	67
3.4.5.1	Abhängigkeit des Schalthintergrunds von der 660 nm Laserleistung .....	69
3.4.5.2	Abhängigkeit der Halbwertszeit des Ausschaltens von der 660 nm Laserleistung.....	70
3.4.5.3	Abhängigkeit der Anschaltkinetik von der 785 nm Laserleistung .....	71
3.4.5.4	Stabilität des Aus-/ und An-Zustands .....	72
3.4.5.5	Bleichstabilität der entwickelten NIR RSFPs.....	75
3.4.5.6	Vergleich von W3.37 und W3.103 mit W3 unter den ermittelten optimalen Bedingungen.....	76
3.4.6	Anwendung der generierten NIR RSFPs in der Mikroskopie.....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>79</b>
4.1	Kombiniertes Screening.....	79
4.2	Generierte Ausgangsvarianten.....	80
4.3	Die Generierung von NIR FPs auf Basis der Variante W4.....	82
4.3.1	Rolle der substituierten Positionen.....	84
4.3.2	Ausblick NIR-FPs .....	86
4.4	Die Generierung von NIR RSFPs auf Basis der Variante W3.....	89
4.4.1	Einfluss der aufgedeckten Positionen .....	89
4.4.2	Vergleichende Charakterisierung der besten generierten NIR RSFPs.....	91
4.4.3	Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen .....	92

4.4.4	Erste Anwendung der generierten Variante W3.37 .....	96
4.4.5	Ausblick NIR RSFPs.....	97
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>99</b>
5.1	Molekularbiologische Methoden.....	99
5.1.1	DNS-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	99
5.1.2	RNS-Isolierung aus Säugerzellen .....	99
5.1.3	Restriktion und Ligation von DNS .....	99
5.1.4	Aufreinigung von DNS.....	100
5.1.5	Klonierung von Konstrukten zur Expression in <i>E. coli</i> .....	100
5.1.6	Klonierung von Konstrukten zur Expression in Säugerzellen.....	101
5.1.7	Zufällige Mutagenese .....	103
5.1.8	(Ziel-)gerichtete Mutagenese.....	104
5.1.8.1	Ortsspezifische Mutagenese.....	104
5.1.8.2	Multiple Ortsspezifische Mutagenese.....	105
5.1.9	DNS-Sequenzierung.....	106
5.1.10	Reverse Transkriptase-PCR .....	107
5.2	Zellbiologische Methoden.....	107
5.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	107
5.2.1.1	Expression der Häm-Oxygenase in <i>E. coli</i> -Zellen .....	107
5.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	108
5.2.3	Säugerzelllinien.....	108
5.2.4	Transfektion von Säugerzellen .....	108
5.2.5	Verwendete Viren und Virenpartikelherstellung .....	109
5.3	Charakterisierung von fluoreszierenden Proteinen.....	110
5.3.1	Kleine Proteinaufreinigung aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	110
5.3.2	Semi-native PAGE .....	110
5.3.3	Messung der Absorptionsspektren .....	111
5.3.4	Messung Fluoreszenzspektren.....	112
5.3.5	Bestimmung der pH-Stabilität .....	112
5.3.6	Bestimmung von Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient.....	112
5.3.7	Analyse der Fluoreszenzeigenschaften und ihrer Modulierbarkeit.....	113
5.3.7.1	Automatisiertes Mikroskop und Screening in <i>E. coli</i> -Zellen.....	113
5.3.7.2	FACS .....	115
5.3.7.3	Bestimmung der maximalen Helligkeit und des Schalthintergrunds.....	115

5.3.7.4	Bestimmung der Relaxationszeit .....	116
5.3.7.5	Bestimmung der Schaltgeschwindigkeiten.....	116
5.3.7.6	Bestimmung der (Schalt-)Bleichstabilität .....	116
5.3.7.7	Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit.....	116
5.4	Mikroskopie .....	117
5.4.1	Konfokalmikroskopie .....	117
5.4.2	STED-Nanoskopie.....	117
5.4.3	Konfokalmikroskopie der NIR RSFPs und RESOLFT-Nanoskopie .....	118
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Formelverzeichnis .....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>124</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
<b>11</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>139</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>144</b>
	<b>Konferenzbeiträge .....</b>	<b>145</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>146</b>

## Summary

The green fluorescent protein (GFP) and its homologues have revolutionized molecular biology through their considerable utility as genetic probes, among myriad other applications. Moreover, in recent decades, the extraordinary potential of photomodulatable GFP-based proteins has invited particular interest within the scientific community. Due to their unique properties and resultant versatility across a spectrum of applications, the further discovery and development of reversibly switchable fluorescent proteins (RSFPs), a subclass of photomodulatable FPs, attracted even more attention. Most notably, these proteins have facilitated the implementation of the Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions (RESOLFT) principle.

To date, no GFP-based FPs and especially RSFPs have been developed for use in the spectral range below 680 nm, thus precluding application in the near infrared range (NIR, 650 nm-900 nm). However, minimal absorption of these wavelengths by hemoglobin and water as well as low autofluorescence and scattering properties make this optical window ideal for many methods that require light to penetrate living cells or organisms.

Phytochromes are photoreceptors capable of absorbing deep-red and near infrared wavelength light and incorporate linear tetrapyrrols as chromophors. The bacteriophytochrome subclass incorporates biliverdin, a chromophore that also occurs naturally in mammals, and exhibits spectral properties in the NIR region. In light of these properties, bacteriophytochromes have been increasingly used as a template for the generation of new NIR FPs since 2009.

The present work describes the development of bacteriophytochrome-based (RS)FPs, thereby opening the NIR optical window for STED (STimulated Emission Depletion) and RESOLFT nanoscopic methods. Due to the special requirements for screening of NIR (RS)FPs with an external chromophore, a new system was developed for screening in both *E. coli*- and mammalian cells. Various monomerized and truncated variants of the PAS-GAF-PHY domains of *D. radiodurans* bacteriophytochrome were chosen as templates for optimization using this screening system.

In the first part of this dissertation, a new NIR FP is generated. This NIR FP (W4.35) shows superior properties in cellular brightness, molecular brightness and pH-stability in comparison to the other variants investigated in this work. Furthermore, it shows high bleaching stability as well as good suitability as part of carboxy- and aminoterminal fusion proteins. Using W4.35, STED nanoscopy was performed in the NIR optical window for the first time, with all imaging performed in living cells. An 860 nm STED beam enabled resolution below 80 nm, opening a completely new wavelength range in STED nanoscopy.

The second half of this dissertation describes the development of NIR RSFPs subsequently characterized and implemented in confocal microscopy and RESOLFT nanoscopy of living cells. Positional screening determined the influence of different amino acid substitutions on the characteristics of each variant, facilitating further generation and optimization of NIR RSFPs in future studies. This screening process significantly improved the switching background of investigated variants, a common limiting factor in the application of RESOLFT nanoscopy. Importantly, all variants are more stable to bleaching than GFP-based RSFPs. With an optical setup customized for the use of NIR RSFPs, confocal microscopy as well as a detailed characterization of switching properties under confocal conditions were performed. The latter allowed the evaluation of suitable parameters for the first successful performance of RESOLFT nanoscopy with an NIR RSFP.

In summary, with the development of near infrared standard and reversibly switchable fluorescent proteins in this work, imaging in the near infrared region is now attainable with STED and RESOLFT nanoscopy.

## Zusammenfassung

Das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) und seine Homologe haben, unter anderem durch ihre Verwendbarkeit als genetische Sonden, die Molekularbiologie revolutioniert. In den letzten Jahrzehnten zeigte sich außerdem das große Potential photomodulierbarer GFP-basierter Proteine. Aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften und der sich daraus ergebenden Anwendungsmöglichkeiten erregte hier vor allem die Entdeckung der neuen Proteinklasse der reversibel schaltbaren FPs (*reversible switchable fluorescent proteins*, RSFPs) Aufmerksamkeit. Insbesondere die Verwirklichung des RESOLFT-Prinzips (*Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions*) demonstrierte hierbei das Potential dieser Proteinklasse.

Sowohl die Klasse der GFP-basierten FPs als auch insbesondere die der GFP-basierten RSFPs ist auf den spektralen Bereich unter 680 nm beschränkt. Der nahe Infrarotlichtbereich (*Near InfraRed*, NIR, 650-900 nm), konnte somit nicht genutzt werden. Dieses optische Fenster ist, aufgrund der minimierten Absorption von Hämoglobin und Wasser sowie der geringen Autofluoreszenz und Streuung, bevorzugt für viele Methoden bei denen Licht lebende Zellen oder Organismen penetriert.

Phytochrome gehören zu den im tiefroten Wellenlängenbereich des Lichts und dem nahen Infrarotlicht absorbierenden Photorezeptoren und inkorporieren lineare Tetrapyrrole als Chromophor. Die Untergruppe der Bakteriophytochrome inkorporiert mit Biliverdin ein natürlicherweise in Säugern vorkommendes Chromophor und zeigt spektrale Eigenschaften im NIR-Bereich des Lichts. Aus diesem Grund, wird die Gruppe der Bakteriophytochrome seit 2009 zunehmend als Vorlage für die Generierung neuer NIR FPs verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Bakteriophytochrom-basierte (RS)FPs für die Nanoskopie generiert werden und somit der Bereich des nahen Infrarotlichts für die Nanoskopiemethoden STED (*STimulated Emission Depletion*) und RESOLFT zugänglich gemacht werden. Aufgrund der speziellen Anforderungen eines Screenings nach NIR (RS)FPs mit externem Chromophor, wurde ein neues, kombiniertes Screeningsystem entwickelt, welches das Screening in *E. coli*- und Säugerzellen kombiniert. Als Basis für dieses Screening wurden verschiedene, monomerisierte und verkürzte Varianten der PAS-GAF-PHY-Domänen des Bakteriophytochroms aus *D. radiodurans* gewählt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird ein neues NIR FP generiert. Dieses NIR FP (W4.35) weist, im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit generierten beziehungsweise untersuchten Varianten, überlegene Eigenschaften bezüglich der zellulären Helligkeit, der molekularen Helligkeit beziehungsweise der pH-Stabilität auf. Außerdem zeigt W4.35 eine hohe Bleichstabilität sowie eine gute Eignung als carboxy- und aminoterminales Fusionsprotein. Unter Verwendung von W4.35 konnte erstmals STED-Nanoskopie im NIR Wellenlängenbereich des Lichts durchgeführt werden. Hierbei dienten lebende Zellen als Probe. Mit einer STED-Wellenlänge von 860 nm, wurde eine Auflösung von unter 80 nm erreicht und wird ein komplett neuer Wellenlängenbereich für die STED-Nanoskopie eröffnet.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit werden erstmalig NIR RSFPs generiert, charakterisiert und für die konfokale Mikroskopie sowie die RESOLFT-Nanoskopie lebender Zellen verwendet. Mittels einer Positionsstudie konnte der Einfluss verschiedener Aminosäuresubstitutionen auf die Charakteristika der Varianten gezeigt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit einer gezielteren Mutagenese bei der zukünftigen Generierung und Optimierung von NIR-RSFPs. Im Rahmen des Screenings wurde insbesondere der Schalthintergrund, als einer der die Anwendung in der RESOLFT-Nanoskopie limitierenden Faktoren, maßgeblich verbessert. Alle Varianten sind hierbei deutlich bleichstabiler als GFP-basierten RSFPs. Mit Hilfe eines im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten, auf die Anwendung von NIR RSFPs optimierten, optischen Aufbaus wurde die erstmalige konfokale Mikroskopie sowie die detaillierte Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen durchgeführt. Letztere

ermöglichte die Evaluierung geeigneter Parameter für die erfolgreiche erste Durchführung der RESOLFT-Nanoskopie unter Verwendung eines der generierten NIR RSFPs.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit erstellten NIR FPs und RSFPs wurde der NIR Wellenlängenbereich des Lichts für die Nanoskopie-Methoden STED und RESOLFT zugänglich gemacht.



# 1 Einleitung

## 1.1 Mikroskopie

Die Entwicklung des linsenbasierten Lichtmikroskops im 17. Jahrhundert ermöglichte erstmals den Einblick in Bereiche, die dem menschlichen Auge zuvor verborgen blieben. So konnte R. Hooke bereits 1665 den Aufbau pflanzlichen Gewebes aus Zellen, den kleinsten Einheiten des Lebens, identifizieren (Mazzarello, 1999). Stetige technische Verbesserungen machten das Lichtmikroskop in der Folge zu einem der bedeutendsten biologischen Werkzeuge, um neue Einblicke in den Aufbau und die Struktur von Lebewesen gewinnen zu können.

Die Lichtmikroskopie war hierbei durch den mangelnden Kontrast, bedingt durch die optischen Eigenschaften der Probe, wie der Absorption und Brechung des Lichts, limitiert. Mit der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie wurde Anfang des 20. Jahrhunderts der Grundbaustein für eine Mikroskopiemethode gelegt, die den Einfluss dieser Limitierung deutlich abschwächte. Trotz weiterer technischer Verbesserungen der Mikroskope und der Probenvorbereitung, gab es eine Grenze für die Trennschärfe, die von Ernst Abbe im Jahre 1873 beschrieben wurde (Abbe, 1873). Diese Auflösungsgrenze nach Abbe ist proportional abhängig von der Wellenlänge des fokussierten Lichts und lässt sich demnach auch bei optimalen optischen Bauteilen nicht unbegrenzt verbessern. Sie wird mathematisch durch die folgende Formel 1 und Formel 2 abgebildet:

$$r_{lateral} \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

**Formel 1:** laterale Auflösungsgrenze nach Abbe

$$r_{axial} \approx \frac{\lambda}{2n \sin^2(\alpha/2)}$$

**Formel 2:** axiale Auflösungsgrenze nach Abbe

**Formel 1 und 2:**  $r_{lateral}$  und  $r_{axial}$  stehen für die Halbwertsbreite (FWHM *full width at half maximum*) des fokussierten Lichtspots in der jeweiligen Dimension,  $\lambda$  ist die Wellenlänge des fokussierten Lichts,  $n$  der Brechungsindex des Mediums und  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel der Linse des Objektivs.

Die Wellenlänge des verwendeten Lichts und die numerische Apertur ( $NA = n \sin(\alpha)$ ) der Objektivlinse, als die nach Abbe die Auflösung eines Mikroskops bestimmenden Faktoren, sind in der Lichtmikroskopie nur begrenzt optimierbar. Da das sichtbare Licht eine Wellenlänge von etwa 400 - 800 nm hat, liegt die Auflösungsgrenze eines klassischen Lichtmikroskops, selbst bei optimaler numerischer Apertur der Objektivlinse, lateral bei ungefähr 200 nm und axial bei etwa 500 nm (Jakobs und Wurm, 2014). Eine höhere Auflösung konnte bis dahin nur durch die Verwendung kürzerer Wellenlängen erreicht werden. So kann mit dem Elektronenmikroskop, aufgrund der verwendeten Kathodenstrahlen einer De-Broglie-Wellenlänge im Bereich von Pikometern, eine Auflösung von unter 0,1 nm erreicht werden. Diese Methode hat aber den großen Nachteil, dass sie nicht an lebenden, sondern nur an fixierten und präparierten Proben durchgeführt werden kann. In der biologischen und medizinischen Forschung ist jedoch die nicht invasive Beobachtung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen und Organismen von großer Bedeutung. Hierbei weisen insbesondere subzelluläre Strukturen und Kompartimente häufig eine Größe unterhalb eines Mikrometers auf. So besitzen beispielsweise die mitochondrialen Tubuli einen durchschnittlichen Durchmesser von 250 – 500 nm (Jakobs und Wurm, 2014). Dieser liegt nur knapp oberhalb der Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops. Die Untersuchung der submitochondrialen Proteinverteilung

und dynamischer Prozesse innerhalb der Mitochondrien und auch zahlreicher anderer zellulärer Kompartimente ist daher in der konventionellen Mikroskopie stark erschwert.

### 1.1.1 Hochauflösende Mikroskopieverfahren

Die durch Abbe beschriebene Auflösungsgrenze galt bis in die beginnenden 1990er Jahre als unüberwindbare Grenze der Lichtmikroskopie. Daher war die Idee, Objekte nicht mehr allein durch das Fokussieren des Lichts, sondern durch unterschiedliche Zustände der abzubildenden Moleküle voneinander zu trennen, bahnbrechend und führte 2014 zur Vergabe des Nobelpreises für Chemie an Stefan Hell, Eric Betzig und William Moerner. Auf diesem Prinzip basierende, lichtmikroskopische Verfahren, welche alle diese Idee teilen, werden als hochauflösende Mikroskopie oder Nanoskopie bezeichnet. Die so zusammengefassten Verfahren können in zwei Untergruppen unterteilt werden.

Bei der ersten Gruppe erfolgt der Wechsel der Fluorophore zwischen den An- und Aus-Zuständen stochastisch und ihre Lokalisierung wird im Nachhinein berechnet (*coordinate-stochastic methods*). Hierfür wird das Maximum der Gaußverteilung über dem unscharfen, beugungsbegrenzten Fluoreszenzspot eines einzelnen Fluorophors bestimmt. Die Anzahl der Photonen gibt hierbei die Präzision der Lokalisierung vor. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel die Mikroskopie mittels Grundzustands-Entleerung gefolgt durch Einzelmolekülrückkehr (*Ground State Depletion followed by Individual Molecule return microscopy*, GSDIM-Mikroskopie; Fölling et al., 2008) und die (Fluoreszenz)-Photoaktivierungs-Lokalisierungs-Mikroskopie (*(Fluorescence) Photo-Activation Localization Microscopy*, (F)PALM; Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006).

Bei der zweiten Gruppe hingegen wird durch Belichtungsmuster bestimmt, welche Moleküle sich in welchem Zustand befinden (*coordinate-targeted methods*). Die Lokalisierung der Moleküle wird demnach direkt durch die Position des Anregungslichts bestimmt. Zu dieser Gruppe gehören unter Anderen die stimulierte Emissions-Entleerungs-Mikroskopie (*STimulated Emission Depletion microscopy*, STED-Nanoskopie; Hell und Wichmann, 1994; Klar und Hell, 1999b; Klar et al., 2000) sowie die Mikroskopie mittels reversibler sättigbarer optischer Fluoreszenzübergänge (*Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions microscopy*, RESOLFT-Mikroskopie; Hell et al., 2003; Hell et al., 2004). Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Generierung von Markern für die STED- und die RESOLFT-Mikroskopie liegt, wird auf diese beiden Verfahren im nächsten Absatz näher eingegangen.

#### 1.1.1.1 STED- und RESOLFT-Nanoskopie

Sowohl in der STED- als auch in der RESOLFT-Nanoskopie wird ein fluoreszierender An-Zustand und ein nicht fluoreszierender Aus-Zustand zur Unterscheidung der Moleküle adressiert. Bei der Annahme, dass die adressierten Moleküle vollständig von dem An- in den Auszustand überführt werden können, ist die durch dieses An-/Aus-Prinzip erreichte Auflösung theoretisch unbegrenzt. Sie wird durch die Formel 3 dargestellt:

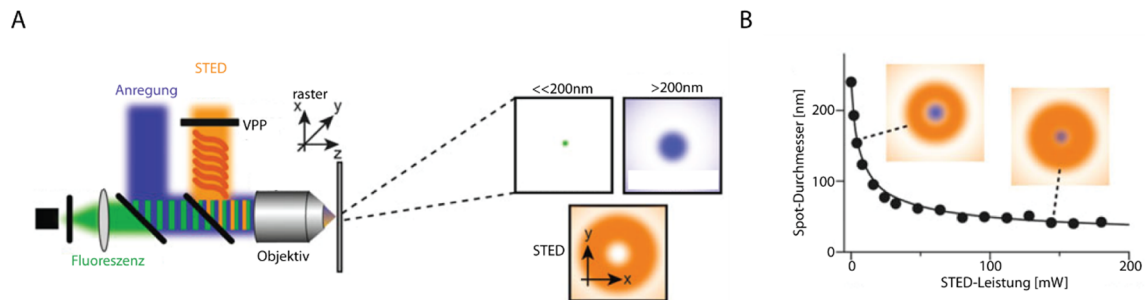
$$d \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\max} / I_s}}$$

**Formel 3: Auflösungsgrenze für die beschriebenen Nanoskopieverfahren**

$d$  steht für die Halbwertsbreite (FWHM *full width at half maximum*) der Intensitätsnull,  $\lambda$  ist die Wellenlänge des fokussierten Lichts,  $n$  der Brechungsindex des Mediums,  $\alpha$  der halbe Öffnungswinkel der Linse des Objektivs,  $I_{\max}$  die maximale Intensität, welche die Intensitätsnull umgibt und  $I_s$  die Saturations-Intensität (Hell, 2007).

Das Verfahren der STED-Nanoskopie wurde erstmals 1994 (Hell und Wichmann, 1994) vorgeschlagen und 1999 und 2000 realisiert (Klar und Hell, 1999a; Klar et al., 2000). In dieser Methode werden die Moleküle zum Zeitpunkt der Detektion durch den fluoreszierenden, angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  (*singlet*-Zustand,  $S_1$ ) und den nicht fluoreszierenden Grundzustand  $S_0$  unterschieden. Genauer gesagt wird stimulierte

Emission verwendet, um Moleküle in vorbestimmten Zonen der Probe gezielt und reversibel in den nicht fluoreszierenden  $S_0$ -Zustand zu pumpen. Dies ermöglicht die zeitlich getrennte Detektion der Moleküle, aufgrund der unterschiedlichen Zustände. Die stimulierte Emission wird hierbei durch den STED-Laser ausgelöst, dessen Wellenlänge im roten Randbereich der Emission der verwendeten Fluorophore lokalisiert ist. Die Rotverschiebung soll die Wiederanregung der Fluorophore in den  $S_1$ -Zustand nach der stimulierten Emission minimieren.



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des STED-Prinzips**

A: Schematische Darstellung eines klassischen STED-Aufbaus. Das STED-Licht und das Anregungslicht werden durch das Objektiv, welches auch das zu detektierende Emissionslicht sammelt, auf die Probe fokussiert. Die Probe wird in x-, y- und z-Richtung relativ zum Laserlicht bewegt (raster). Durch die Phasenplatte (*vortex phase plate*, VPP) im STED-Strahl wird der STED-Doughnut mit einem lokalen Intensitätsminimum erzeugt. Durch das so erzeugte Lichtmuster wird ein Anregungsvolumen unterhalb der Beugungsgrenze erreicht. B: Verhältnis zwischen verwendeter STED-Leistung und erzeugter Intensitätsnull beziehungsweise erzeugtem Anregungsvolumen. Die Abbildung wurde angepasst aus Clausen et al., 2013 übernommen.

In einem klassischen STED-Mikroskop ist der STED-Laser in ein konfokales Weitfeld-Mikroskop implementiert und wird standardmäßig ringförmig auf die Probe fokussiert (STED-Doughnut, siehe Abbildung 1-1, A). Dieser STED-Doughnut liegt über dem punktförmigen, beugungsbegrenzten Anregungsstrahl. Die Größe des Zentrums des STED-Doughnuts entspricht dem Anregungsvolumen, also der Anzahl an Molekülen, welche nicht in den  $S_0$ -Zustand gepumpt werden und folglich spontan emittieren. Dieses Anregungsvolumen und die somit erreichbare Auflösung ist abhängig von der Intensität des STED-Strahls. Aus der Erhöhung der STED-Intensität folgt eine höhere Sättigung des Aus-Zustands ( $S_0$ ) und damit eine kleinere Intensitätsnull beziehungsweise ein kleineres Anregungsvolumen und eine höhere Auflösung (siehe Abbildung 1-1, B). Die eigentlich beugungsbegrenzte Anregung mit dem spotförmigen Anregungsstrahl wird durch Überlagerung mit dem Doughnut und die sofortige stimulierte Emission der angeregten Moleküle im Randbereich des Spots der Beugungsgrenze entzogen (Hell, 2007; Klar et al., 2000; Tinnefeld et al., 2015).

Grundsätzlich werden unter dem Überbegriff RESOLFT-Mikroskopie Verfahren wie STED, GSD und SPEM zusammengefasst. Diesen Verfahren ist gemein, dass sie unterschiedliche Zustände der verwendeten Markermoleküle und zeitsequentielles Auslesen dieser Zustände innerhalb der Beugungszone an definierten Koordinaten nutzen (Hell, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff RESOLFT aber speziell für die Anwendung des Verfahrens mithilfe der Nutzung von schaltbaren Farbstoffen (Bossi et al., 2006) oder einer speziellen Klasse von fluoreszierenden Proteinen (FPs), den reversibel schaltbaren fluoreszierenden Proteinen (*Reversible Switchable Fluorescent Protein*, RSFP, siehe Absatz 1.2.4), verwendet. RESOLFT-Nanoskopie unter der Anwendung von RSFPs wurde 2003 erstmals vorgeschlagen (Hell et al., 2003) und 2005 *in vitro* (Hofmann et al., 2005) beziehungsweise 2011 *in vivo* (Brakemann et al., 2011; Grotjohann et al., 2011) erstmals durchgeführt. Auf dem gleichen Prinzip beruhend, unterscheiden sich das RESOLFT- und das STED-Verfahren im Wesentlichen durch die adressierten Zustände der Fluorophore. Bei den verwendeten RSFPs wird der An- und Aus-Zustand durch eine reversible *cis-trans*-Isomerisierung beziehungsweise eine reversible Wasseraddition/-eliminierung des Chromophors repräsentiert (siehe Absatz 1.2.4). Insbesondere in der ersten Anwendung des RESOLFT-Verfahrens mit dem Tetramer

asFP595 (Hofmann et al., 2005; Lukyanov et al., 2000; Schwentker et al., 2007) wurde deutlich, dass der Erfolg der Methode klar durch die Eigenschaften des verwendeten Proteins bestimmt wird.

Die in den Methoden STED und RESOLFT benötigte Lichtintensität ist stark unterschiedlich. Dies liegt an den unterschiedlichen Zuständen, welche durch die Methoden adressiert werden. Ist ein Molekül durch Licht zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen A und B schaltbar, so gelten folgende Grundsätze: Die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül in Zustand A bleibt, sinkt exponentiell mit der Lichtintensität mit der es bestrahlt wird. Die Sättigungsintensität des Übergangs zwischen Zustand A und Zustand B skaliert invers mit der Lebenszeit der Zustände. Somit werden bei kürzeren Lebenszeiten der adressierten Zustände höhere Lichtintensitäten nötig (Hell, 2009). Folglich ist der große Unterschied der Lebenszeiten der Zustände  $S_1/S_0$  und *cis/trans* (beziehungswise Wasseraddition/-eliminierung) die Ursache für die unterschiedlichen benötigten Laserleistungen. In der STED-Nanoskopie werden typischerweise Intensitäten in einer Größenordnung von MW/cm<sup>2</sup> eingesetzt, wohingegen in der RESOLFT-Mikroskopie, wie in der herkömmlichen konfokalen Mikroskopie, mit Intensitäten in einem Bereich von kW/cm<sup>2</sup> gearbeitet wird. Dieser Unterschied um Größenordnungen kann insbesondere bei lebenden Proben als Vorteil des RESOLFT-Verfahrens gegenüber dem eng verwandten STED-Verfahren bezeichnet werden (Klar et al., 2000; Schnorrenberg et al., 2016; Wäldchen et al., 2015).

Die langlebigen, in der RESOLFT-Nanoskopie adressierten Zustände resultieren jedoch in längeren Beleuchtungsschemata verglichen mit der STED-Nanoskopie. Diese kann pro Pixel nahezu dieselben Geschwindigkeiten wie die herkömmliche konfokale Mikroskopie erreichen. In den ersten Umsetzungen des RESOLFT-Verfahrens hingegen benötigten Aufnahmen von 10 µm mal 10 µm etwa 20 – 30 Minuten. Die Weiterentwicklung der verwendeten RSFPs führte zu einer Beschleunigung des Verfahrens auf eine Aufnahmezeit von unter einer Minute für ein solches Bild (Brakemann et al., 2011; Grotjohann et al., 2011; Grotjohann et al., 2012). Um diesem Nachteil der Geschwindigkeit entgegen zu wirken, wurde das RESOLFT-Verfahren mit parallelisiertem Rastern der Probe entwickelt (Chmyrov et al., 2013; Wang et al., 2016b). Außerdem wurde gezeigt, dass die Nullintensität im RESOLFT-Verfahren auch durch ein linienförmiges Muster erzeugt werden kann. Auch hierdurch wird die Geschwindigkeit des Verfahrens erhöht (Hofmann et al., 2005; Schwentker et al., 2007; Tinnefeld et al., 2015).

Eine Möglichkeit die Vorteile der STED- und der RESOLFT-Nanoskopie zu kombinieren, wurde 2015 vorgestellt. Die Methode der hochauflösenden Mikroskopie mit mehreren Ausschaltübergängen (*Multiple OFF-State Transitions*, MOST) in Form von geschütztem STED (*protected STED*; Danzl et al., 2016) kombiniert die Verfahren, indem die adressierten Aus-Zustände der Methoden kombiniert werden. Durch dieses Adressieren zweier unterschiedlicher Aus-Zustände konnte das Bleichen der Fluorophore vermindert und der Zustandskontrast und somit der Kontrast des Bildes erhöht werden. Mit MOST wurde auch die starke Abhängigkeit von den Schaltcharakteristika der verwendeten Markermoleküle (siehe Absatz 1.1.1.2), welche bei dem RESOLFT-Verfahren vorhanden ist, reduziert.

### 1.1.1.2 Anforderungen an die verwendeten Fluorophore in der Nanoskopie

Die Voraussetzung für die Durchführung jeder fluoreszenzmikroskopischen Methode sind die jeweilig optimalen Eigenschaften des verwendeten Markers. Die Mindestanforderungen sind hier passende Absorptions- und Emissionseigenschaften sowie Fluoreszenzlebenszeiten, eine hohe Quanteneffizienz, ein hoher Extinktionskoeffizient und eine ausreichende Bleichstabilität. Markermoleküle sollten hierbei möglichst spezifisch und stabil die jeweilige Zielstruktur binden, ohne mit anderen zellulären Bestandteilen zu interagieren. Seit ihrer Entdeckung finden fluoreszierende Proteine als genetische Marker (siehe Absatz 1.2 und 1.3.1.7) weitläufig Verwendung in der Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei haben Faktoren wie eine schnelle Faltung des Proteins, Maturation beziehungsweise Bindeeigenschaften des Chromophors sowie die Monomerisierung des Proteins unter den in der Probe herrschenden Bedingungen an Bedeutung gewonnen. Optimiert tragen diese Faktoren dazu bei, möglichst wenig mit der natürlichen Funktion des zu

markierenden Zielproteins zu interferieren und somit mögliche Artefakte in der Lokalisierung oder die Zytotoxizität zu minimieren.

Mit der Weiterentwicklung der Mikroskopieverfahren wuchsen auch die Anforderungen an die verwendeten Markermoleküle. So erfordern Nanoskopieverfahren aufgrund ihrer erhöhten Sensitivität eine exakte Markierung der zellulären Zielmoleküle ohne unspezifische Hintergrundsignale. Hinzu kommt, dass Fehllokalisierungen durch Fehlfaltung oder Artefakte der Fixierung, die in der konfokalen Mikroskopie aufgrund der Auflösungsgrenze nicht sichtbar sind, durch das erhöhte Auflösungsvermögen in der Nanoskopie sichtbar werden können (Tinnefeld et al., 2015).

Des Weiteren hat jede Nanoskopiemethode aufgrund der verschiedenen adressierten Hell- und Dunkelzustände und des bildgebenden Verfahrens sehr spezifische Anforderungen an den verwendeten Marker. So ist für die Anwendung in der STED-Nanoskopie optimierte Marker eine möglichst geringe Wahrscheinlichkeit der Wiederanregung durch das STED-Licht von hoher Bedeutung. Eine Wiederanregung führt neben einem verstärkten Bleichrisiko für den Marker zu einer die Auflösung verschlechternden Hintergrundfluoreszenz. Außerdem spielt die Fluoreszenzlebenszeit des Markers eine wichtige Rolle in der STED-Nanoskopie und die Pulslänge des STED-Lasers muss an diese angepasst werden. Die Verwendung von FPs in der STED-Nanoskopie (Hein et al., 2008; Morozova et al., 2010; Strack et al., 2009; Hense et al., 2015; Nägerl et al., 2008) wurde bisher hauptsächlich durch die nicht ausreichende Helligkeit und ein starkes Bleichverhalten der Proteine limitiert. Aufgrund dieser Tatsache wurde das STED-Verfahren in lebenden Zellen bisher vermehrt mit Markierungsverfahren wie Halo, Snap oder Clip und organischen Farbstoffen durchgeführt (Pellett et al., 2011; Schroder et al., 2009; Fitzpatrick et al., 2009; Hein et al., 2010; Lukinavicius et al., 2013; Tinnefeld et al., 2015). STED-Nanoskopie wurde prinzipiell bereits mit Laserlinien des gesamten sichtbaren Lichtspektrums realisiert. Die am weitesten etablierten Wellenlängen sind bisher jedoch 590 nm und 775 nm (Dyba und Hell, 2002; Gottfert et al., 2013; Sidenstein et al., 2016; Willig et al., 2014).

Insbesondere für die RESOLFT-Nanoskopie kommen zu den oben genannten allgemein wichtigen Eigenschaften hohe Anforderungen an das Schaltverhalten der verwendeten Marker hinzu. Eine möglichst geringe Hintergrundfluoreszenz im Aus-Zustand, die Fähigkeit zahlreiche Schaltzyklen ohne den Rückgang der Maximalfluoreszenz zu bewältigen, ein möglichst geringes Übersprechen zwischen den Schaltwellenlängen und möglichst viele Schaltzyklen in möglichst kurzer Zeit abzuschließen sind hierbei die Hauptanforderungen. Diese Anforderungen beschränken bisher die Anzahl der verwendeten RSFPs. RESOLFT-Nanoskopie wurde bisher größtenteils im grünen Wellenlängenbereich des Lichts durchgeführt, wobei die Familie der rsEGFPs hierbei am stärksten vertreten ist (Brakemann et al., 2011; Duwe et al., 2015; Grotjohann et al., 2011; Grotjohann et al., 2012; Jensen et al., 2014; Schnorrenberg et al., 2016; Wang et al., 2016b).

Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung von Bakteriophytochrom-basierten FPs im tiefroten Wellenlängenbereich als Marker für die Nanoskopieverfahren STED und RESOLFT. Zunächst werden daher hier die Anfänge der genetisch codierten Marker anhand der Familie der auf dem grün fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) basierenden FPs dargelegt. Hierfür wird insbesondere auf relevante Eigenschaften der GFP-Familie für das Proteindesign genetisch kodierter Marker für die Nanoskopie, wie die Maturation (Absatz 1.2.2) und Farbgebung (Absatz 1.2.3) des Chromophors hervorgehoben, um auf die Möglichkeiten und die Limitationen der GFP-basierten FPs besonders im Bereich der (tief-)roten Proteine einzugehen. Im Anschluss erfolgt der Übergang zu Bakteriophytochromen als potentielle Vorlage für das FP-Design (Absatz 1.3), welche die Grundlage dieser Arbeit bilden und ein abschließender Vergleich der beiden Proteinfamilien.

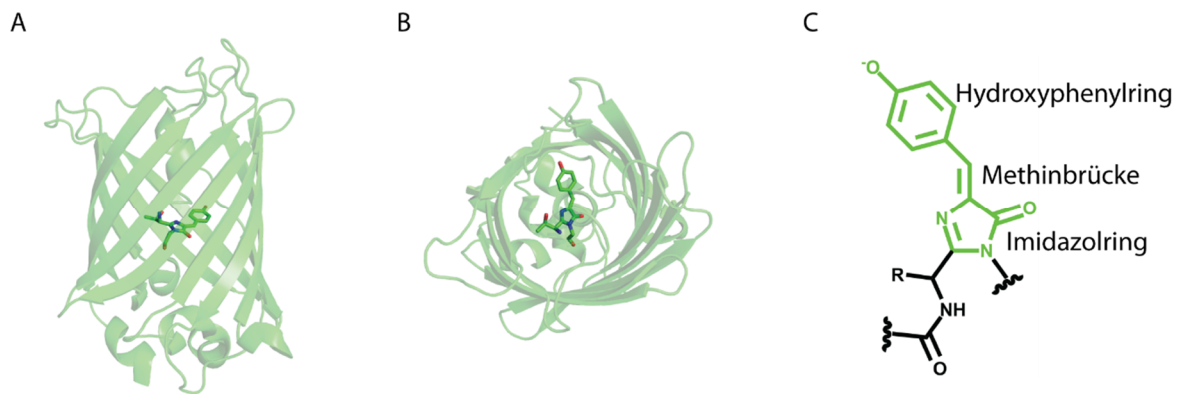
## 1.2 GFP-ähnliche fluoreszierende Proteine

GFP und dessen Homologe sind aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften zu essentiellen Bestandteilen der modernen Zellbiologie geworden. Seit der Entdeckung von GFP in der Qualle *Aequorea victoria* (*Aequorea victoria* GFP; *avGFP*) im Jahr 1962 (Shimomura et al., 1962) und der ersten Studie zur Peptidzusammensetzung des sich autokatalytisch formenden Chromophors (Shimomura, 1979) kam es im Jahre 1994 zu ersten Verwendungen GFPs zur Expression und als Marker in lebenden Zellen (Chalfie et al., 1994; Wang und Hazelrigg, 1994; Inouye und Tsuji, 1994) und zur Kristallstrukturaufklärung der kompletten Proteinstruktur (Yang et al., 1996; Ormö et al., 1996).

Die Bedeutung der Entdeckung dieser genetischen Sonden und ihrer Eigenschaften wird in der rasanten Erforschung und Anwendung des ursprünglichen GFPs, der Vergabe des Nobelpreises 2008 für Chemie an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien und der Entwicklung des gesamten Forschungsbereichs gewürdigt. So wurden durch Mutagenesen die Eigenschaften des GFPs verändert und Varianten für verschiedene Anwendungen generiert oder optimiert (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1995; Sawano und Miyawaki, 2000; Shaner et al., 2004). Allein im Jahr 2006 erschienen mehr als 10 000 Publikationen in denen GFP verwendet wurde (Lemay et al., 2008). Neben der Arbeit mit dem ursprünglichen GFP wurden Homologe des Proteins aus nicht-biolumineszenten Korallen, Nesseltieren (Cnidaria), Gliederfüßern (Arthropoda) und Chordatieren (Chordata) isoliert (Aglyamova et al., 2011; Alieva et al., 2008; Deheyne et al., 2007; Hunt et al., 2010; Karasawa et al., 2004; Labas et al., 2002; Matz et al., 1999b; Matz et al., 2002; Shagin et al., 2004). Das erste rot fluoreszierende FP, das ursprüngliche Tetramer drFP583 (oder DsRed) aus der Koralle *Discosoma sp.* (Fradkov et al., 2000; Yarbrough et al., 2001), wurde nach seiner Monomerisierung als mRFP1 (Campbell et al., 2002) neben GFP eines der wichtigsten verwendeten fluoreszierenden Proteine. Die Farbpalette der zur Verfügung stehenden Marker wurde damit in den roten und gelben Bereich erweitert.

### 1.2.1 Globale Struktur

Auch wenn die Sequenzhomologie von manchen GFP-ähnlichen, fluoreszierenden Proteinen nur bei ungefähr 23 % liegt (Yarbrough et al., 2001), haben alle die gleiche globale Struktur mit vielen stark konservierten Bereichen. Ihre Primärstruktur besteht aus ungefähr 220 Aminosäuren, was zu einem Molekulargewicht von etwa 27 kDa führt. In der Sekundärstruktur bilden sich elf Beta-Faltblätter, welche sich in der Tertiärstruktur zur sogenannten Fassstruktur zusammenlagern, die von einer Alphahelix durchzogen wird. Im Zentrum des Fasses formt sich das Chromophor autokatalytisch aus drei Aminosäuren der Alphahelix (siehe Abbildung 1-2). Die Beta-Faltblätter der Fassstruktur werden durch kurze Schlaufen miteinander verbunden. Das Fass hat eine ungefähre Höhe von etwa 42 Å und einen Durchmesser von etwa 24 Å (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996).



**Abbildung 1-2: Globale Struktur und Chromophorstruktur von GFP-Homologen anhand von EGFP.**

A, B: Globale Struktur von GFP-Homologen von der Seite (A) und von oben (B). Für die Abbildung wurden die von Arpino et al., 2012 veröffentlichten Strukturen verwendet (pdb: 2Y0G). C: Zeigt die Struktur des GFP-Chromophors in der fluoreszierenden *cis*-Isoform mit dem Hydroxyphenylring, der Methinbrücke und dem Imidazolring.

## 1.2.2 Chromophormaturation anhand von *av*GFP und DsRed

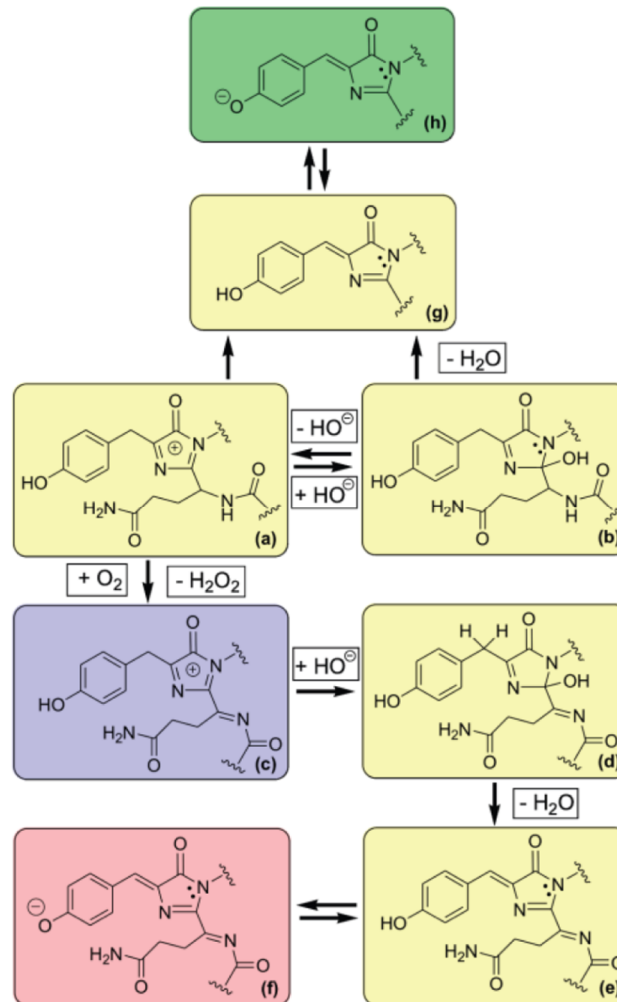
Die posttranslationale Maturation des Chromophors aus drei Aminosäuren verläuft in allen GFP-Homologen autokatalytisch und benötigt abgesehen von molekularem Sauerstoff keine weiteren Cofaktoren (Heim et al., 1994). In *av*GFP wird das Chromophor durch die drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin an den Positionen 65-67 der Proteinkette (S65-Y66-G67) gebildet. Innerhalb nahezu aller soweit aus Organismen isolierter GFP-Homologe ist die zweite und die dritte Aminosäure konserviert, wobei die erste variabel ist. Mit LANFP10-A aus dem Lanzettfischchen *Branchiostoma floridae* wurde kürzlich das erste fluoreszierende Protein entdeckt, bei dem das Glycin an der dritten Chromophorposition durch ein Alanin ersetzt ist (Roldan-Salgado et al., 2016). Durch Mutagenesen konnten auch Varianten erstellt werden, bei welchen auch die zweite Chromophorposition verändert wurde (Heim et al., 1994).

Die Voraussetzung für die Chromophormaturation ist die vollständige und korrekte Proteinfaltung. Für die Maturation ist nämlich sowohl das Betafäss als Reaktionsumgebung mit der richtigen Positionierung katalytischer Aminosäuren als auch die korrekte Anordnung des Tripeptids, welches das Chromophor formt, durch die Alpha-helix nötig (Reid und Flynn, 1997; Lemay et al., 2008). Durch die sogenannte enge Kurve (*tight turn*), einer Verkrümmung der das Betafäss durchspannenden Alpha-helix um  $80^\circ$ , werden die entsprechenden Atome der Aminosäuren an den Positionen 65 und 67 nahe zueinander positioniert, was den ersten Schritt der autokatalytischen Chromophorbildung ermöglicht. Ihr Abstand in der Peptidkette vor der Maturation aber nach der Proteinfaltung wurde mit etwa  $3.25 \text{ \AA}$  kleiner als die Summe ihrer kovalenten Radien geschätzt (Branchini et al., 1998; Lemay et al., 2008).

Der die Zyklisierung startende Schritt ist dann ein nukleophiler Angriff des Stickstoffatoms der Aminosäure G67 ( $N_{67}$ ) auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom der Aminosäure S65 ( $C_{65}$ ), was in einem Imidazolring resultiert. Die darauffolgende Enolisierung durch die Deprotonierung des  $C_\alpha$ -Atoms des Y66 führt zu einem Intermediat, welches im Gleichgewicht zwischen der dehydrierten und der hydrierten Form vorliegt. Die darauffolgende Oxidation und eine finale Dehydrierung vervollständigen die Maturation des Chromophors (Craggs, 2009; Heim et al., 1994).

Mit DsRed wurde das erste rote GFP-ähnliche Fluoreszenzprotein und somit ein neuer Chromophortyp beschrieben (Fradkov et al., 2000; Matz et al., 1999a; Yarbrough et al., 2001). Das über einen Acylimin-Substituenten erweiterte  $\pi$ -Elektronensystem, welches aus den Aminosäuren Q66-Y67-G68 gebildet wird, sorgt für ein rot verschobenes Anregungs- und Emissionsmaximum des Proteins von  $558 \text{ nm}$  und  $583 \text{ nm}$  (Gross et al., 2000). Das rote Chromophor reift nicht wie zunächst angenommen über ein grünes Intermediat (Baird et al., 2000; Gross et al., 2000), sondern über eine andere Maturationsabzweigung mit

einem blauen Intermediat (Strack et al., 2010; Verkhusha et al., 2004; Wachter et al., 2010). Das letzte gemeinsame Intermediat der grünen und roten Maturation ist das farblose Imin, aus welchem durch Dehydrierung das grüne Chromophor entstehen kann. Es liegt im Gleichgewicht zwischen hydroxylierter und kationischer Form vor. Durch Oxidation entsteht das Acyliminintermediat, das nach einer Hydroxylierung und einer Deprotonierung von C $\beta$  zu dem DsRed Chromophor maturiert (siehe Abbildung 1-3, Strack et al., 2010; Wachter et al., 2010).



**Abbildung 1-3: Chromophormaturation des DsRed-Chromophors**

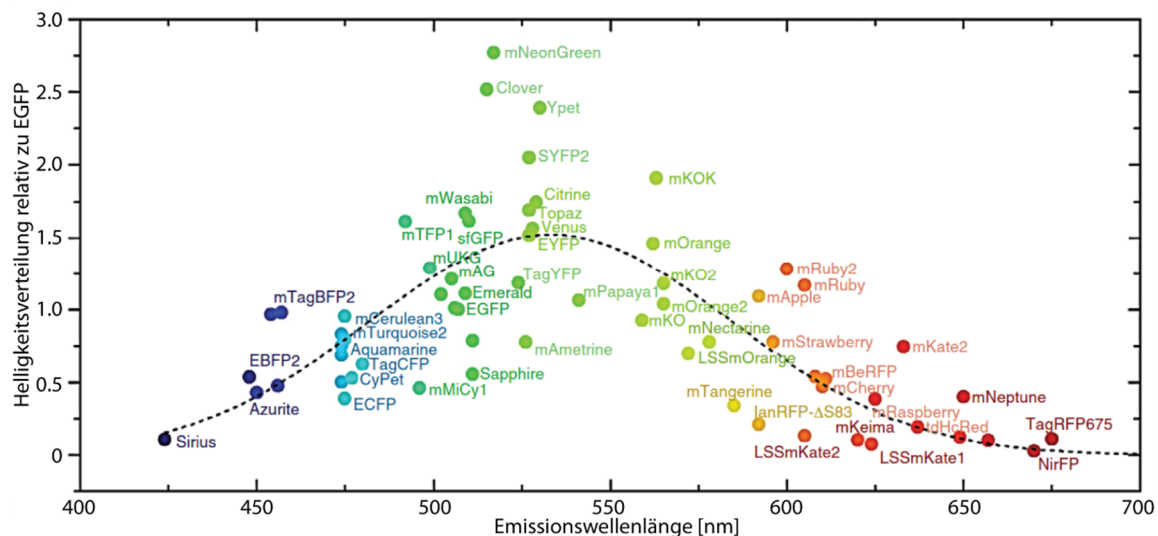
Das letzte gemeinsame Intermediat der grünen (g-h) und der roten (c-d) Chromophormaturation ist das farblose Imin, welches in der kationischen und hydroxylierten Form vorliegen kann (a-b). Aus diesem kann durch Dehydrierung das grüne Chromophor entstehen (h). Zur Abzweigung in den roten Maturationsweg wird das farblose Imin oxidiert, was zur Entstehung des blauen Acyliminintermediats (c) führt. Darauf folgend führt eine Hydroxylierung (d) und eine Deprotonierung von C $\beta$  (e) zu der Bildung des roten Chromophors. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis aus Wachter et al., 2010 übernommen. Copyright 2010 American Chemical Society.

Das GFP-ähnliche Chromophor kann grundsätzlich in zwei ineinander konvertierbaren, koexistierenden Grundzuständen vorkommen: Einer neutralen Form, bei der das apikale Sauerstoffatom am Sechsring protoniert ist, und einer anionischen Form, in der dieses Sauerstoffatom deprotoniert ist. Der jeweilige Zustand des Chromophors wird durch die direkte Chromophorumgebung und das vorliegende Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt. Die Absorptionsbanden des protonierten und des deprotonierten Chromophors unterscheiden sich, wobei die protonierte Absorptionsbande immer blauverschoben ist (Jung et al., 2005).



### 1.2.3 Die Farbpalette der GFP-ähnlichen Fluoreszenzproteine

Das ursprüngliche avGFP hat sein Anregungsmaximum bei 395 nm und sein Emissionsmaximum bei 508 nm. Trotz der sehr hohen Homologien zwischen allen bisher bekannten GFP-ähnlichen FPs deckt ihr Farbspektrum fast das komplette sichtbare Lichtspektrum ab (siehe Abbildung 1-4). Diese Farbvarianz kann durch Veränderungen des  $\pi$ -Elektronensystems mittels Modifikationen des Chromophors selbst oder seiner direkten Umgebung verursacht werden (Shcherbakova et al., 2012). Im Folgenden werden anhand von Farbvarianten unter den GFP-Homologen beispielhaft verschiedene Mechanismen dieser Farbverschiebungen erläutert, um die Möglichkeiten und Grenzen des Farbspektrums dieser Proteinklasse, insbesondere im roten Spektralbereich, darzulegen.



**Abbildung 1-4: Helligkeitsverteilung von Fluoreszenzproteinen abhängig von ihrer Emissionswellenlänge.**

Die Helligkeit wird relativ zu EGFP angegeben. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis von Elsevier (*Copyright* 2014) von Adam et al., 2014 übernommen und leicht abgeändert.

In natürlich vorkommenden FP-Varianten ist die Varianz der Chromophoraminoinsäuren stark eingeschränkt. Nur die erste Aminosäure an Position 65 ist variabel, während sowohl das Y66 als auch das G67, mit der vorab erwähnten Ausnahme (Roldan-Salgado et al., 2016), stark konserviert sind. Für das Tyrosin allerdings wurde schon früher durch mutagenisierte Varianten gezeigt, dass es gegen andere aromatische Aminosäuren ausgetauscht werden kann, ohne die autokatalytische Chromophormaturierung zu behindern (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1994). Weitere Farbverschiebungen ergeben sich vor allem durch Veränderungen der direkten Chromophorumgebung, die auf das  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors einwirken. So führt die Mutation der Position 203 von einem Threonin in ein Tryptophan, Histidin oder Tyrosin in GFP-S65T zu einer Rotverschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren in den gelben Bereich des Spektrums (Heim et al., 1994; Ormö et al., 1996). Dies ist durch die Bildung eines  $\pi$ -Stapels ( $\pi$ -stack) der eingefügten Aminosäuren mit dem Chromophor begründet. Die Tatsache, dass alle drei eingefügten Aminosäuren zu einer Rotverschiebung führen, lässt vermuten, dass nicht Dipolwechselwirkungen, sondern die Polarisierbarkeit der eingefügten Aminosäure die Ursache für die Farbverschiebung ist (Wachter et al., 1998).

Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere Farbveränderungen in den roten Wellenlängenbereich des Lichts interessant. Bei GFP-ähnlichen Fluoreszenzproteinen gibt es hier sowohl in der Absorption als auch in der Emission eine durch die Chromophorstruktur gegebene Grenze. Die rötteste Absorption beziehungsweise Emission, die für ein GFP-basiertes Chromophor nachgewiesen wurde, basiert auf dem DsRed-Typ des Chromophors. Dieser weist als deprotonierte Form Absorptions- und Emissionsmaxima zwischen etwa 560 nm – 580 nm beziehungsweise etwa 570 nm – 610 nm auf (Piatkevich et al., 2013a).

Eine weitere bathochromische Verschiebung der Spektren kann durch Interaktionen der direkten und indirekten Chromophorumgebung erfolgen und ist limitiert. Das GFP-basierte Fluoreszenzprotein mit der bisher rötesten Anregung ist TagRFP657 (Morozova et al., 2010). Es weist ein Anregungs-/Emissionsmaximum von 611 nm/657 nm auf. Die rötteste Emission unter den GFP-basierten Fluoreszenzproteinen besitzt mit einem Anregungsmaximum von 598 nm und einem Emissionsmaximum von 675 nm TagRFP675 (Piatkevich et al., 2013a).

Die häufigsten Interaktionen, die zu einer bathochromischen Verschiebung der Spektren verglichen zum DsRed-Chromophor führen können, sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen verschiedenen Positionen des Chromophors und seiner direkten Umgebung mittels Wassermolekülen oder Aminosäuren. So verursacht beispielsweise eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Acylimin des Chromophors und einem Wassermolekül in mNeptune (Lin et al., 2009), eqFP650, eqFP670 (Pletnev et al., 2012; Shcherbo et al., 2010), mRojoA und mRouge (Chica et al., 2010) eine Rotverschiebung der Emission. Auch Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Sauerstoff der Acyliminbindung oder dem Stickstoffatom des Imidazolrings (Shu et al., 2009b) und Interaktionen zwischen dem p-Hydroxyphenolring des Chromophors und seiner Umgebung (Pletnev et al., 2012) wurden als Ursache für Rotverschiebungen beschrieben.

Eine andere Art der Interaktion zwischen dem p-Hydroxyphenolring des Chromophors und der Umgebung ist ein  $\pi - \pi$  - Stapel, wie er oben schon für die rotverschobenen GFP-S65T-Varianten beschrieben wurde. Im Bereich der roten FPs wird eine solche Interaktion und die dadurch folgende Stabilisierung des angeregten Zustands als mitverantwortlich für die bathochromische Verschiebung in den RFP1-Varianten mRojoA und mRojoB vermutet (Chica et al., 2010). Zusätzlich hierzu wurde gezeigt, dass das Stapeln des Chromophors zwischen zwei aromatischen Ringen (Triple-Decker Motiv) und somit die Erhöhung der Stabilität des  $\pi$ -Elektronensystems die Quantenausbeute des FPs erhöhen kann (Pandelieva et al., 2016).

Eine Möglichkeit zur alleinigen Veränderung des Emissionsspektrums ist der Protonentransfer im angeregten Zustand (*excited state proton transfer*, ESPT), welcher auch schon bei *mGFP* beobachtet wurde (Chattoraj et al., 1996). Ein Teil der Energie des absorbierten Lichts geht immer durch Vibrationen des angeregten Moleküls verloren. Aus diesem Grund ist die emittierte Wellenlänge stets langwelliger, also energieärmer, als die absorbierte. Diesen Unterschied nennt man Stokes-Verschiebung (*stokes shift*) (Abbyad et al., 2007). Der ESPT kann diese Stokes-Verschiebung stark vergrößern. Eine Variante von mKeima mit einer sehr großen Stokes-Verschiebung (*large stokes shift* mKeima, LSS-mKeima) weist ein Anregungs-/Emissionsmaximum von 440 nm und 620 nm auf. Damit verfügt sie unter den GFP-ähnlichen Fluoreszenzproteinen über den größten Unterschied zwischen dem Anregungs- und dem Emissionsmaximum (Kogure et al., 2006). Es wird postuliert, dass die Ursache für diesen LSS ein ESPT von der Hydroxylgruppe des Chromophors über das Serin an Position 142 zu der Asparaginsäure an Position 157 ist. Wird an dieser Position des Protonenakzeptors ein neutrales Asparagin anstatt der Asparaginsäure eingesetzt, führt dies zu einer Verschiebung des Anregungsmaximums um 125 nm in den roten Wellenlängenbereich und somit zu einer Reduktion des LSSs (Henderson et al., 2009; Violot et al., 2009). Aktuellere Beispiele dieser Art liefern die LSS-mKate-Varianten (Piatkevich et al., 2010).

Wie in Absatz 1.2.2 beschrieben, sind für die komplexere Maturation des roten Chromophors im Vergleich zum grünen Chromophor zwei weitere Schritte nötig. Der Verzweigungspunkt zwischen der roten und der grünen Chromophormaturation liegt erst im letzten Intermediat vor dem maturierten grünen Chromophor, dem farblosen Imin (Strack et al., 2010; Subach und Verkhusha, 2012; Verkhusha et al., 2004). Schon leichte Veränderungen der Proteinsequenz können zu einer Unterbrechung der roten Chromophormaturation im blauen Intermediat oder einer Abzweigung in den grünen Maturationsweg führen (Subach et al., 2010b und Absatz 1.2.5).

Wie vorab dargelegt, ist die Rotverschiebung der Spektren GFP-basierter FPs auf Interaktionen mit der Chromophorumgebung angewiesen und limitiert. Aufgrund der komplexen Maturation und des größeren

Chromophors sind die Maturation und die spektralen Eigenschaften von Chromophoren des dsRed-Typs sehr anfällig für spektrale Veränderungen durch Modifikationen. Außerdem weisen rote GFP-basierte FPs aufgrund der geringen Quantenausbeute generell eine geringe Helligkeit verglichen zu grünen GFP-basierten FPs auf (siehe Abbildung 1-4, Absatz 1.2.3). Es ist zu vermuten, dass dies auf eine erhöhte Flexibilität des vergrößerten  $\pi$ -Elektronensystems zurückzuführen ist. Zusammen limitieren diese Faktoren die weitere Verbesserung und Rotverschiebung der bis dato entwickelten roten FPs.

#### 1.2.4 Photomodulierbare Fluoreszenzproteine

Es gibt zwei unterschiedliche Gruppen von GFP-basierten FPs, welche ihre Absorption durch Bestrahlung irreversibel ändern: die photoaktivierbaren FPs und die photokonvertierbaren FPs. Erstere sind einmalig und durch Bestrahlung induziert von einem nicht fluoreszierenden in einen fluoreszierenden Zustand aktivierbar (Verkhusha und Sorkin, 2005; Patterson und Lippincott-Schwartz, 2002; Chudakov et al., 2003). Letztere lassen sich irreversibel und durch Bestrahlung induziert von einem Zustand in einen anderen fluoreszierenden Zustand mit einem anderen Emissionsmaximum konvertieren (Mizuno et al., 2003; Gurskaya et al., 2006; Wiedenmann et al., 2004; Tsutsui et al., 2005; Elowitz et al., 1997; Sawin und Nurse, 1997; Chudakov et al., 2004; Subach et al., 2009). Neben diesen irreversibel aktivierbaren oder konvertierbaren FPs wurde im Jahr 2000 mit dem Protein asFP595 aus der Seeanemonenart *Anemonia sulcata* (Lukyanov et al., 2000) eine komplett neue Klasse der FPs eröffnet, die sich reversibel zwischen einem nicht fluoreszierenden Aus- und einem fluoreszierenden An-Zustand hin und her schalten lässt (*reversible switchable fluorescent protein*, RSFP). Da diese Proteinklasse bisher die Grundlage für die RESOLFT-Nanoskopie lieferte, wird im Folgenden näher auf ihre Entdeckung und Entwicklung eingegangen.

asFP595 war der erste Vertreter der RSFPs. Durch Anregung mit grünem Licht wird es simultan in einen An-Zustand konvertiert und es wird rote Fluoreszenz (595 nm) angeregt. Durch Beleuchtung mit blauem Licht lässt sich das Protein wieder in seinen nicht fluoreszierenden Grundzustand zurückschalten. Dieser Prozess lässt sich mehrere Male wiederholen. Durch seine geringe Quantenausbeute und die Oligomerisierung zu einem Tetramer ist die Anwendung von asFP595 allerdings limitiert. Der nächste Vertreter der RSFPs wurde durch Mutagenesen eines aus Steinkorallen (*Pectiniidae*) isolierten Proteins entwickelt (Ando et al., 2004). Das resultierende, grün fluoreszierende FP Dronpa ist in seinem Equilibrium im An-Zustand. Durch Bestrahlung mit 488 nm wird konkurrierend Fluoreszenz angeregt oder das Protein in seinen Aus-Zustand geschaltet. Durch Anregung des Aus-Zustands mit 405 nm wird das Protein wieder in seinen An-Zustand geschaltet. Anhand der mit den beiden ersten Vertretern der Gruppe der RSFPs aufgeführten Wellenlängenabhängigkeiten lassen sich zwei Untergruppen der RSFPs erläutern: die Positiv- und Negativschalter. Bei einem Positivschalter wird mit der Anregungswellenlänge auch das Anschalten des Proteins ausgelöst, bei einem Negativschalter hingegen das Ausschalten (Andresen et al., 2008; Brakemann et al., 2010). Somit wird asFP595 als Positivschalter und Dronpa als Negativschalter bezeichnet.

Durch die Kristallstrukturaufklärung von asFP595 wurde 2005 erstmals der Schaltmechanismus eines RSFPs aufgeklärt. Hier wurde gezeigt, dass dem Schalten eine *cis-trans*-Isomerisierung zugrunde liegt. Das Chromophor liegt demnach in seinem An-Zustand als *cis*-Isomer vor, wobei das Chromophor deprotoniert ist, und wird durch Bestrahlung mit blauem Licht in das nicht fluoreszierende, protonierte *trans*-Isomer isomerisiert. Mit der Isomerisierung gehen einige Neuaneordnungen von Aminosäuren der Umgebung einher (Andresen et al., 2007; Andresen et al., 2005).

Bei den Dronpa-Varianten Padron, Padron0.9 und seiner monomerisierten Variante Padron\* als erste durch Mutagenesen erzeugte positiv-schaltende RSFPs zeigte sich, dass nicht nur das Schaltverhalten, sondern auch der Protonierungszustand des Chromophors, verändert ist. Anhand von Strukturaufklärung wurde gezeigt, dass auch bei Padron0.9 der Kernmechanismus für das Schalten eine *cis-trans*-Isomerisierung ist. Interessanterweise liegt das Chromophor im An-Zustand (*cis*) jedoch in einem Equilibrium zwischen

protonierter und deprotonierter Form vor. Im Aus-Zustand (*trans*) hingegen geht es in den deprotonierten Zustand über. Damit weicht das Protonierungsverhalten von den bisher bekannten RFSP-Varianten ab. Die Strukturdaten und das Protonierungsverhalten von Padron weisen darauf hin, dass die *cis-trans*-Isomerisierung und nicht die Veränderung des Absorptionsspektrums durch ein verändertes Protonierungsverhältnis essentiell für den Schaltvorgang sind (Andresen et al., 2008; Brakemann et al., 2010).

Ein Protein, das bisher einzigartige Schalteigenschaften aufweist und sich deutlich von den oben beschriebenen Positiv- beziehungsweise Negativschaltern abhebt, ist das schaltbare FP Dreiklang (Brakemann et al., 2011). Diese Citrine-Variante lässt sich von dem im Equilibrium vorliegenden An-Zustand, mit einem Anregungs- beziehungsweise Emissionsmaximum von 511 nm und 529 nm, durch Bestrahlung mit 405 nm in den Aus-Zustand und aus diesem durch Bestrahlung mit 365 nm zurück in den An-Zustand schalten. Damit konkurriert der Anregungsprozess hier weder mit dem Prozess des Ausschaltens noch mit dem des Anschaltens. Der Schaltvorgang kann als entkoppelt bezeichnet werden. Der diesem neuartigen Schaltvorgang zugrundeliegende Mechanismus wurde anhand der Kristallstrukturen aufgeklärt (Brakemann et al., 2011). Das Chromophor (G65-Y66-G67) liegt demnach im An-Zustand und im Aus-Zustand als *cis*-Isomer vor. Das Schaltverhalten wird durch eine reversible Wasseraddition/-eliminierung hervorgerufen, wodurch im Aus-Zustand eine weitere Hydroxylgruppe am C<sub>65</sub>-Kohlenstoffatom und somit ein verkürztes  $\pi$ -Elektronensystem entsteht. Mit Dreiklang als Fluorophor wurden schon die Mikroskopie-Verfahren RESOLFT, STED und GSDIM (Jensen et al., 2014) sowie hochauflösende Bildgebung durch optische Fluktuation (*Super-resolution optical fluctuation imaging*, SOFI; Geissbuehler et al., 2014) durchgeführt. Das entkoppelte Schaltverhalten macht es bis dato einzigartig. Seine vergleichsweise sehr langsamen Schaltkinetiken führen allerdings zu Limitationen in der Anwendung bei der Beobachtung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen.

Nach der Entdeckung der Klasse der RSFPs folgten zahlreiche Neu- und Weiterentwicklungen von Mitgliedern dieser Proteinklasse (Andresen et al., 2008; Brakemann et al., 2011; Chmyrov et al., 2013; El Khatib et al., 2016; Grotjohann et al., 2011; Grotjohann et al., 2012; Henderson et al., 2007; Lavoie-Cardinal et al., 2014; Stiel et al., 2008; Subach et al., 2010a; Tiwari et al., 2015). Besonders hervorzuheben ist hier die Familie der bei 510 nm emittierenden, negativ schaltenden rsEGFPs, welche auf EGFP beruhen. Mit der Variante rsEGFP2, welche verglichen zu rsEGFP eine verbesserte Maturationszeit bei 37 °C, schnellere Schaltkinetiken sowie eine erhöhte Bleichstabilität aufweist und rsEGFP(N205S) sind hier die bisher am häufigsten für die RESOLFT-Nanoskopie verwendeten Proteine vertreten (Chmyrov et al., 2013; Grotjohann et al., 2012; Schnorrenberg et al., 2016). RESOLFT-Nanoskopie in Säugerzellen im roten Farbbereich wurde hingegen bisher erst einmal mit der negativ schaltenden, bei 609 nm emittierenden RSFP-Variante rsCherryRev1.4 durchgeführt (Lavoie-Cardinal et al., 2014).

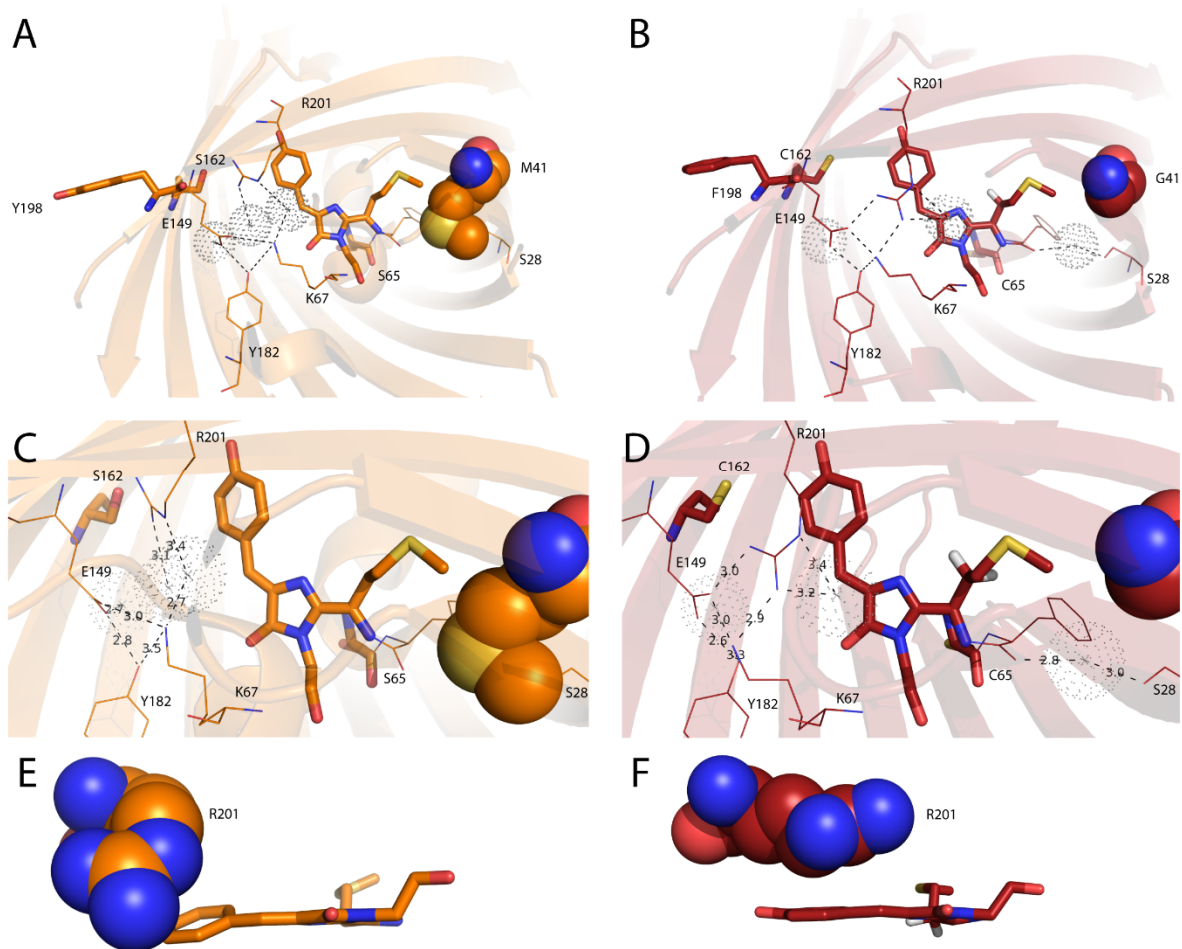
Hinzu kommt, dass für den tiefroten Bereich, also für Proteine, die anders als die bisher generierten Varianten rsCherry, rsCherryRev und TagRFP, röter als das DsRed-Chromophor (560-610 nm) fluoreszieren, bisher keine RSFPs beschrieben wurden, die für die RESOLFT-Nanoskopie geeignet wären. Dies ist darauf zurückzuführen, dass weiter ins Rote verschobene Varianten, wie in Absatz 1.2.3 beschrieben, auf direkte und indirekte Reaktionen mit der Umgebung angewiesen sind, die leicht durch Mutationen, welche eine *cis-trans*-Isomerisierung ermöglichen würden, eingeschränkt werden können. So erschwert beispielsweise ein wie in eqFP670 beobachtetes Netzwerk aus Aminosäuren der Umgebung und dem p-Hydroxyphenylring des Chromophors die *cis-trans*-Isomerisierung. Ein Austausch der verantwortlichen Aminosäuren D148 und N158 führt allerdings zu einer hypsochromischen Verschiebung der Emission (Pletnev et al., 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde neben den im Ergebnisteil zusammengefassten Arbeiten anfänglich auch ein GFP-basiertes RSFP generiert. Ausgewählte Ergebnisse dieses Projektes sollen im

folgenden Kapitel dazu dienen, die Schwierigkeiten bei der Mutagenese von (tief)-roten, GFP-basierten FPs zur Generierung eines RSFPs zu verdeutlichen und das Hauptprojekt der Dissertation herzuleiten.

### 1.2.5 Strategie zur Generierung eines GFP-basierten, roten RSFPs

Die grundsätzliche Strategie für die Generierung eines tiefroten GFP-basierten FPs beruht auf Modifikationen der Chromophorinteraktionen mit seiner direkten Umgebung (beispielhaft: Chu et al., 2014; Lin et al., 2009; Pandelieva et al., 2016). Soll ein (tief)rotes RSFP erstellt werden, so muss insbesondere in der direkten Umgebung des p-Hydroxyphenylrings des Chromophors Platz für eine cis-trans-Isomerisierung des Chromophors geschaffen werden.

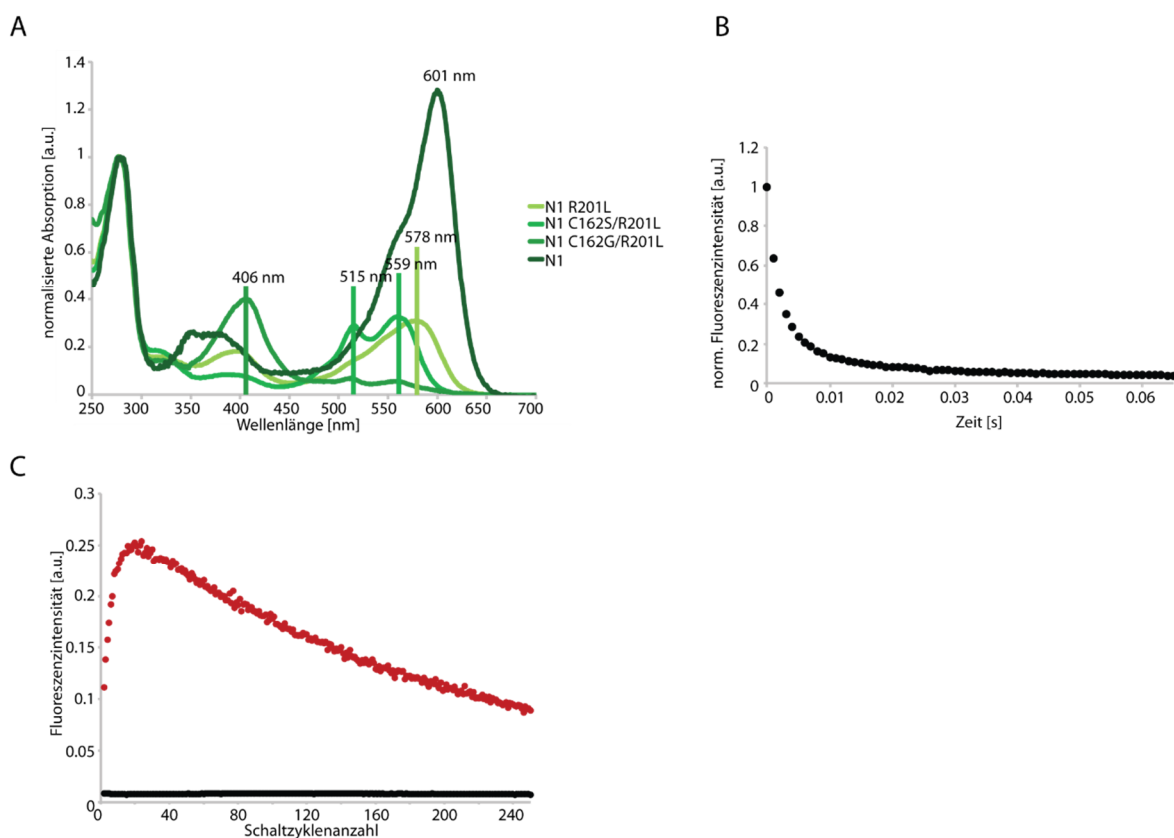


**Abbildung 1-5: Interaktionen in der Chromophorumgebung von mKate und mNeptune.**

A,B: Übersichten der Chromophorumgebung von mKate (A) und mNeptune (B) mit den im Text erwähnten Aminosäuren. In C (mKate) und D (mNeptune) ist eine Vergrößerung der direkten Chromophorumgebung zu sehen. Zwischen ausgewählten Aminosäuren und Wassermolekülen (gepunktete Sphären) sind die Abstände in Å angegeben. E (mKate) und F (mNeptune) zeigen das Chromophor und seine Planarität, welche hauptsächlich durch die Positionierung und Ausdehnung des Arginins an Position 201 bestimmt wird. Hierbei sind die Positionen, welche zwischen mKate und mNeptune mutiert sind, in Stäbchen und die übrigen wichtigen Positionen in Linien dargestellt. In der Farbcodierung steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Lin et al., 2009 (A, C, E) beziehungsweise Pletnev et al., 2008 (B, D, F) veröffentlichten Strukturen verwendet (pdb: A,C,E 3IP2 ;B,D,F 3XBX)

Als Basis für die Generierung eines (tief)roten GFP-basierten RSFPs wurde aufgrund ihrer verhältnismäßig großen Helligkeit und ihrer rotverschobenen Emission die mKate-Variante mNeptune (mKate M45G/S65C/S162C/Y198F; Lin et al., 2009) gewählt. mNeptune weist eine Quantenausbeute von 20 % und einen Extinktionskoeffizienten von  $67000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  auf. Das Anregungs-/Emissionsmaximum ist mit  $600 \text{ nm}/650 \text{ nm}$  verglichen mit dem Vorlage-FP mKate (Shcherbo et al., 2007) bathochromisch um  $15 \text{ nm}$  verschoben. Diese spektrale Veränderung ist nach Lin et al., 2009 durch einen additiven Mechanismus und

nicht durch eine einzelne Mutation begründet. In der Abbildung 1-5 sind die direkte Chromophorumgebung von mKate und mNeptune im Überblick (A-B) und in verschiedenen Vergrößerungsstufen (C-F) dargestellt, um die folgenden Ausführungen zu veranschaulichen. In mKate bildet das S162 eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem R201. In mNeptune führt die Mutation S162C zu einer vergrößerten Seitenkette und dem Verlust der Wasserstoffbrückenbindung, was in einer veränderten Position des Arginins resultiert. Es streckt sich hier parallel zur langen Achse des Chromophors aus und die Phenolatgruppe des Chromophors und das Cystein an Position 162 rücken um 1 Å näher zusammen. Durch diese Umorientierung wird vermutlich die Verkipfung zwischen dem Imidazol- und dem Phenolat-Ring des Chromophors reduziert (Abbildung 1-5, E, F). Das R201 bildet außerdem neue Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren K67 und E149. Durch die Mutation M41G kommt es zu einer Raumaussparung, welche in mNeptune durch ein neuorientiertes Wassermolekül ausgefüllt wird. Dies führt zu Wasserstoffbrücken zwischen dem Wassermolekül, dem Serin an Position 28 und dem Sauerstoff des Acylimins am Chromophor (Abbildung 1-5, C, D) (Lin et al., 2009).



**Abbildung 1-6: Überblick über ausgewählte Eigenschaften von generierten, schaltbaren mNeptune-Varianten.**

A: Normalisierte Absorptionsspektren von 3 unterschiedlichen mNeptune-Varianten. N1 stellt das publizierte mNeptune (Lin et al., 2009) dar. B: Ausschaltzyklus der Variante N1 C162S/R201L. Die Kurven wurden während kontinuierlicher Bestrahlung mit 594 nm aufgenommen. Für die Abbildung wurden 5 Messungen gemittelt. Die Schaltkinetiken der Abbildungen B und C wurden in *E. coli*-Zellen auf Agar-Platten aufgenommen. C: Maxima (rot) und Minima (schwarz) von 250 aufeinanderfolgenden Ausschaltzyklen der Variante N1 C162S/R201L. Die Variante wurde abwechselnd mit Bestrahlung durch 594 nm angeregt und ausgeschaltet (150 ms), beziehungsweise mit 450 nm angeschaltet (1 s). Für die Abbildungen wurden ebenso fünf Messungen gemittelt.

Für die Generierung eines RSFPs auf Basis von mNeptune wurden neben zufälligen Mutagenesen Aminosäurereste der direkten Chromophorumgebung, wie die Positionen 143, 156, 201, 164, 162, 178, 96 und 182, adressiert. Hier wurden sowohl gezielt als auch zufällig Aminosäuren substituiert. Nach mehreren Runden der Mutagenese und Charakterisierung ergab sich die Mutation R201L als Kernmutation für die Generierung einer schaltbaren Variante. Das Arginin an dieser Position hat, wie oben beschrieben, nach Lin et al., 2009 eine mögliche Rolle bei der Umpositionierung und Rotverschiebung des Chromophors verglichen zu mKate.

Das resultierende Protein ist ein Negativschalter, welcher mit 594 nm angeregt wird und in einem konkurrierenden Prozess in den Aus-Zustand geschaltet wird. Durch Bestrahlung mit 450 nm kann man es zurück in den An-Zustand schalten. Schon diese eine Mutation hat das Absorptions- und Emissionsspektrum jedoch in den blauen Wellenlängenbereich des Lichts verschoben und die Faltung des Proteins deutlich verschlechtert. Weitere Optimierungen des Schaltens, welche hier anhand der Varianten C162S/R201L und C162G/R201L dargestellt werden, führten zu starken Veränderungen des Absorptionsspektrums und dem Auftreten von zusätzlichen Absorptionsmaxima im blauen (406 nm) und im grünen Wellenlängenbereich (515 nm), die vermutlich auf Faltungsintermediate beziehungsweise Fehlfaltungen zurückzuführen sind (siehe Abbildung 1-6, A). Die Absorption im roten Wellenlängenbereich ging in allen drei Varianten stark zurück. Wie in Abbildung 1-6, B zu sehen ist, wurde unter optimierten Bedingungen mit der Variante C216S/R201L ein Schalthintergrund von unter 4 % der Fluoreszenz im An-Zustand erreicht. Dieser ist jedoch nicht über viele Zyklen erreichbar. So ist zu Beginn der 250 Zyklen ein starker Anstieg der maximalen Fluoreszenz und ab circa 20 Zyklen ein starker Rückgang derselben zu sehen. Nach 250 Zyklen ist der relativ geringe Anfangswert der Maximalintensität erreicht (siehe Abbildung 1-6, C). Dieses Verhalten ist vermutlich durch eine Kombination an lichtinduzierter Nachreifung des roten Chromophors (Verkhusha et al., 2004) und einer starken Schaltermüdung zu erklären. Diese Daten zeigen einige der Schwierigkeiten der Generierung eines (tief)roten RSFPs auf Basis eines GFP-basierten Proteins auf. Hinzu kommt eine ebenso beobachtete, häufig auftretende verminderte Maturation bei 37 °C, was bei der Anwendung in Säugerzellen ein großer Nachteil ist.

asFP595 (Lukyanov et al., 2000) und rsCherryRev1.4 (Lavoie-Cardinal et al., 2014) als die zwei roten RSFPs, welche bisher in der RESOLFT-Nanoskopie verwendet wurden, zeigen beide mit 572 nm/595 nm (asCP595) beziehungsweise 572 nm/609 nm (rsCherryRev1.4) kein stark rot-verschobenes Anregungs-/Emissionmaximum verglichen zum DsRed-Chromophor (siehe Absatz 1.2.3). Beide RSFP-Varianten sind nicht monomerisiert, was zu Problemen in der Verwendung als Markerprotein in lebenden Zellen führen kann. Keines der bisher entwickelten roten RSFPs konnte die Anforderungen an ein optimales Protein für die RESOLFT-Nanoskopie erfüllen.

Die hier aufgeführten Daten zusammen mit der in Absatz 1.2.2 erläuterten komplizierten Maturation des DsRed-Chromophors und seinen in Absatz 1.2.3 zusammengefassten Möglichkeiten und Limitationen bezüglich einer Rotverschiebung der Anregungs- und Emissionsmaxima zeigen, wie wichtig die Suche nach alternativen Vorlagen für die Generierung von roten und vor allem tief-roten FPs und RSFPs ist. Aus diesem Grund und ihren im Folgenden erläuterten vielversprechenden spektralen Eigenschaften wurden für diese Arbeit Bakteriophytochrome als Basis für die Generierung von (RS)FPs gewählt.

### 1.3 Photorezeptoren als optische Werkzeuge

Photorezeptoren spielen in Organismen wie Pflanzen, Bakterien, Pilzen und höheren Eukaryoten eine wichtige Rolle. Sie ermöglichen dem Organismus die Lichtfarbe und -intensität seiner Umgebung wahrzunehmen und dieses physikalische Signal in eine biochemische Ausgabe umzuwandeln. Sie stellen die Kopplung zwischen Umgebungslicht und dem Organismus dar und sind für Prozesse wie die Schattenvermeidung und Photomorphogenese in Pflanzen zuständig (Franklin und Whitelam, 2005; Rockwell und Lagarias, 2010; Shcherbakova et al., 2015b). Im Gegensatz zu den GFP-Homologen FPs inkorporieren Photorezeptoren einen externen Co-Faktor als Chromophor. Nach der kovalenten Bindung ermöglicht dieser Licht wahrzunehmen und darauffolgend ein Signal an das Proteingerüst weiterzugeben sowie final eine zelluläre Antwort auszulösen. Dieser Photozyklus wird durch eine Isomerisierung des Chromophors initiiert und ist in vielen Photorezeptoren reversibel. Als Chromophor-Bindedomäne (CBD) wird der Teil des Phytochroms bezeichnet, welcher für die Inkorporation des Chromophors zuständig ist.



Die CBD ist ein Element des photosensorischen Kernmoduls (*Photosensory CoreModule*, PCM), welches aus den Domänen besteht, die das Chromophor binden und primäre Konformationsänderungen als Reaktion auf das Licht durchlaufen. Häufig bestehen die Photorezeptoren aus einem solchen aminoterminalen photosensorischen Modul und einer carboxyterminalen Effektor-Domäne, die in den meisten Fällen eine enzymatische Aktivität aufweist. Es gibt auch Fälle mit einer aminoterminalen Effektor-Domäne (Christie et al., 2012; Rockwell und Lagarias, 2010; Shcherbakova et al., 2015b).

Photorezeptoren, welche bisher für das Design optischer Werkzeuge verwendet wurden, werden nach der Wellenlänge des absorbierten Lichts und der Art des inkorporierten Chromophors in unterschiedliche Gruppen unterteilt. Flavoproteine absorbieren UV-Licht und blaues Licht (300-500 nm) und inkorporieren Flavin-Mono-Nukleotide (FMN) oder Flavin-Adenin-Di-Nukleotide (FAD) als Chromophor. Zu dieser Gruppe der Photorezeptoren gehören die Licht-Sauerstoff-Spannungs-Domänen (*light-oxygen-voltage*, LOV-Domänen), die blaues Licht nutzenden Flavin-Adenin-Dinukleotid-Domänen (*blue-light-utilizing*-FAD Domänen, BLUF-Domänen) und die Cryptochrome (Chaves et al., 2011; Losi und Gartner, 2012; Shcherbakova et al., 2015b). Opsine, welche zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*G-Protein Coupled Receptors* GPCR) gehören, werden in sieben Unterfamilien unterteilt und sind die wohl farbvariabelste Gruppe der Photorezeptoren. Sie absorbieren grünes, blaues und rotes Licht, während sie Retinal als Chromophor verwenden (Shcherbakova et al., 2015b; Terakita, 2005). Von besonderem Interesse und im Fokus der vorliegenden Arbeit sind diejenigen Photorezeptoren, welche Licht im tiefroten und nahe des infraroten Wellenlängenbereichs des Lichts absorbieren. Diese werden unter dem Namen Phytochrome zusammengefasst und nutzen verschiedene, lineare Tetrapyrrole als Chromophor (Shcherbakova et al., 2015b).

In der nahen Vergangenheit wurden Vertreter der oben genannten Gruppen für das Design von Photosensoren (Gu et al., 2011; Potzkei et al., 2012), als Marker für die Optogenetik (Kennedy et al., 2010; Levskaya et al., 2005; Mattis et al., 2012; Strickland et al., 2008), als Marker für die photoakustische Tomographie (Yao et al., 2016) oder als Basis für die Generierung von FPs (Auldridge et al., 2012; Filonov et al., 2011; Shu et al., 2009a; Yu et al., 2015; Yu et al., 2014) verwendet.

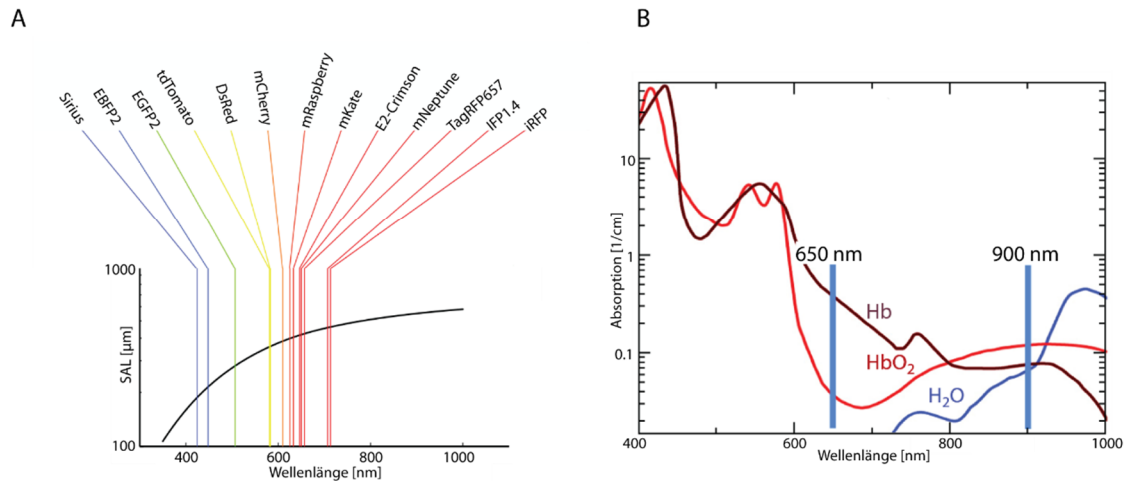
### 1.3.1 Phytochrome

Licht nahe dem infraroten Wellenlängenbereich (*Near InfraRed*, NIR, 650 nm - 900 nm) ist bevorzugt für viele Methoden, bei denen Licht lebende Zellen und Organismen penetriert, da langwelliges Licht eine geringere Energie und folglich eine geringere Zytotoxizität aufweist. Besonders für die Anwendung in dickeren Geweben ( $>500 \mu\text{m}$ ) ist die Nutzung von NIR-Licht unabdingbar. Dies liegt darin begründet, dass die Absorption von Hämoglobin und Wasser, den am stärksten absorbierenden Substanzen in Geweben im Bereich des sichtbaren und infraroten Lichts, in diesem optischen Fenster ihr Minimum aufweist (siehe Abbildung 1-7, B). Somit ist auch die Autofluoreszenz der Gewebe in diesem Wellenlängenbereich reduziert. Die geringe Streuung und Absorption führen zu einer entsprechend größeren Streuungs-Abschwächungs-Länge (*Scattering Attenuation Length*, SAL, siehe Abbildung 1-7, A, Lecoq und Schnitzer, 2011; Shcherbakova et al., 2015b). Mit dieser Größe wird jene Eindringtiefe in ein Material angegeben, bei welcher die Wahrscheinlichkeit, dass ein Photon nicht absorbiert wurde, auf  $1/e$  gesunken ist.

Dieser Wellenlängenbereich des NIR-Lichts konnte bislang jedoch nicht mit GFP-basierten FPs erreicht werden. Aufgrund der in den Absätzen 1.2.2 und 1.2.3 aufgeführten strukturellen Gegebenheiten, ist dies auch in Zukunft sehr unwahrscheinlich. Daher sind diejenigen unter den Photorezeptoren, welche das Potential haben das Feld der GFP-basierten FPs mit ihren einzigartigen Eigenschaften zu erweitern, die Phytochrome und hier im Speziellen die Bakteriophytochrome. Diese dringen mit ihrer Absorption und Emission genau in besagtes, begehrtes Fenster des NIR-Lichts ein.



Da sich diese Arbeit mit dem Design von Bakteriophytochrom-basierten FPs und RSFPs für die Nanoskopie beschäftigt, wird im Folgenden detailliert auf das natürliche Vorkommen von Phytochromen und im Speziellen Bakteriophytochromen, ihren Aufbau und ihre Eigenschaften sowie bisherige Modifikationen und Anwendungen eingegangen.



**Abbildung 1-7: Wellenlängen-spezifische Absorptions- und Streueigenschaften.**

A: Abhängigkeit der SAL von der Wellenlänge des eindringenden Lichts. Als Beispiele sind einige GFP-basierte und zwei Bakteriophytochrom-basierte FPs anhand ihrer Emissionsmaxima dargestellt. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis, angepasst aus Lecoq und Schnitzer, 2011 übernommen. Copyright 2011, rights managed by Nature Publishing group. B: Absorptionsspektren (400- 1000 nm) von Wasser (H<sub>2</sub>O), Hämoglobin (Hb) und Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>). Die Abbildung wurde angepasst aus Shcherbakova et al., 2015b übernommen. Copyright 2015, Annual Reviews.

### 1.3.1.1 Natürliches Vorkommen und Funktion

Phytochrome kommen in Pflanzen, Pilzen, Bakterien, Cyanobakterien und auch Algen vor. Sie wurden zuerst 1959 in Pflanzen entdeckt (Butler et al., 1959). Schon in dieser ersten Veröffentlichung wurde das reversible Schaltverhalten der Phytochrome zwischen zwei spektral unterschiedlichen Zuständen beschrieben. Nach ihrer Erstentdeckung wurde das Vorkommen von Phytochromen in Cyanobakterien (Hughes et al., 1997), sowohl photosynthetischen als auch nicht-photosynthetischen Bakterien (Jiang et al 1999, Davis et al 1999), Pilzen (Blumenstein et al., 2005; Froehlich et al., 2005) und zuletzt Algen (Rockwell et al., 2014) beschrieben. Abweichend von den übrigen Organismengruppen weisen die in Algen gefundenen Homologe ein an den Lebensraum Wasser angepasstes, merklich ins Blaue geschobenes Absorptionsmaximum im Grundstadium auf. Auch in Cyanobakterien wurde eine zusätzliche Untergruppe der Phytochrome entdeckt, welche blauverschobene Absorptionsspektren aufweist (Ikeuchi und Ishizuka, 2008).

Die Lichtsensitivität der Phytochrome wird durch Inkorporation eines linearen Tetrapyrrols als Chromophor ermöglicht. Die Struktur dieses Tetrapyrrols und die Lokalisierung der Bindestelle variiert hierbei zwischen den verschiedenen Organismengruppen (siehe Absatz 1.3.1.3). Die Signalweitergabe und somit die Steuerung zahlreicher lichtabhängiger, physiologischer Prozesse wird durch eine reversible Interkonvertierung zwischen einem rotes Licht absorbierenden Stadium (P *red*, Pr) und einem tief-rotes Licht absorbierenden Stadium (P *far red*, Pfr) ermöglicht (siehe Absatz 1.3.1.5 und Piatkevich et al., 2013b).

Die strukturellen Gemeinsamkeiten, welche diesen spektralen Eigenschaften und Funktionsweisen der (Bakterio)- Phytochrome zugrunde liegen, werden im folgenden Absatz erläutert. Für alle Strukturen zeigenden Abbildungen der vorliegenden Einleitung wurden Strukturdaten des Bakteriophytochroms von

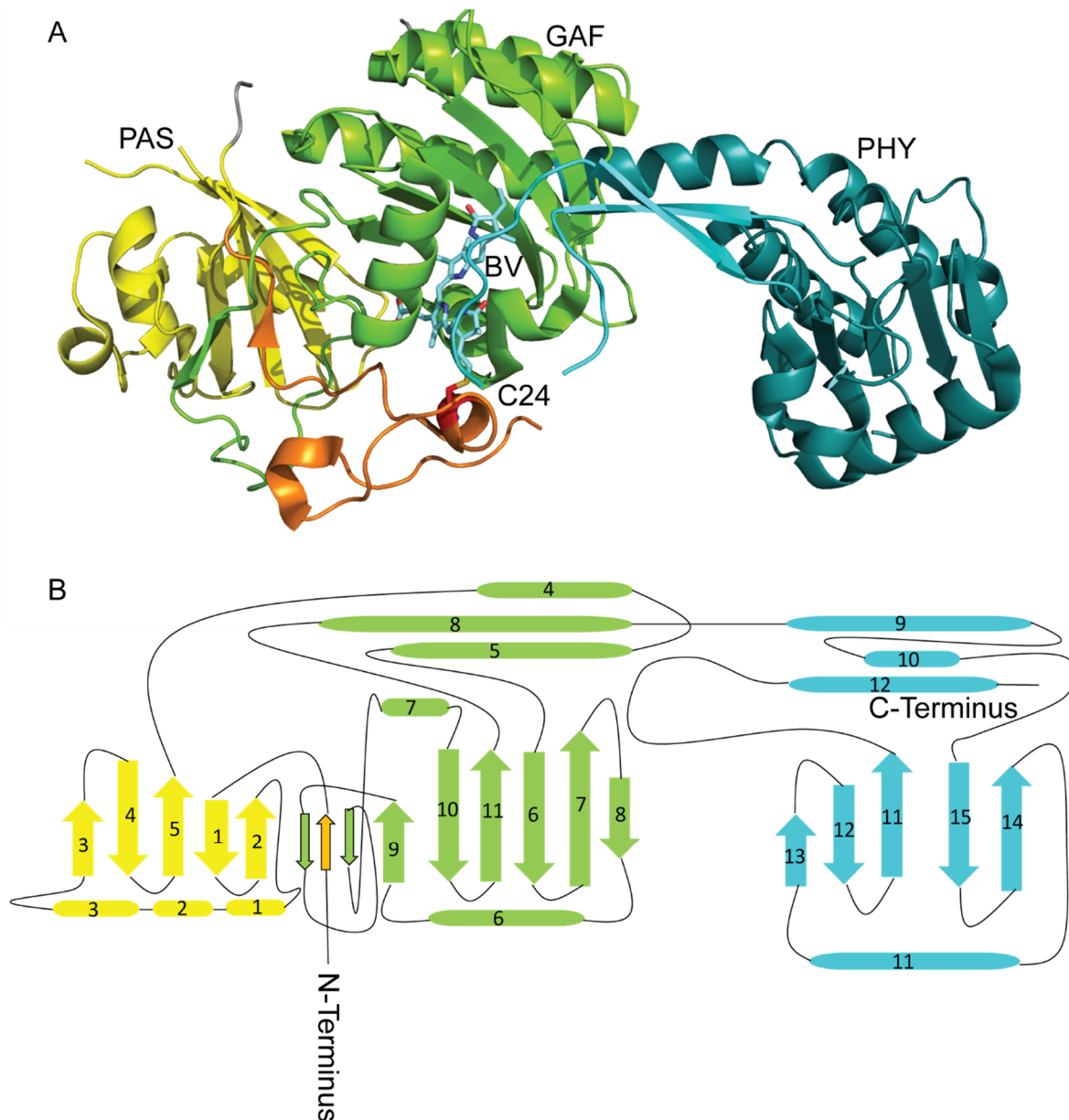
*D. radiodurans* verwendet, da dieses als Basis für die (RS)FP-Generierungen und – Charakterisierungen in der vorliegenden Arbeit diente.

### 1.3.1.2 Gemeinsamkeiten und Tertiärstruktur der Phytochrome

Phytochrome kommen natürlicherweise nur als Homodimere vor, wobei jedes Monomer aus mindestens vier Domänen besteht: Der Per-ARNT-Sim - Domäne (PAS-Domäne), der cGMP Phosphodiesterase/Adenylatcyclase/FhLA-Domäne (GAF-Domäne), der Phytochrom-spezifischen Domäne (PHY-Domäne) und einer aminoterminalen Effektor-Domäne. Letztere wird in den meisten Fällen durch eine Histidin-Kinase repräsentiert. Es wurden jedoch auch schon Domänen, welche mit DNS-Repressoren interagieren, Di-Guanylatcyklasen oder Phospho-Di-Esterasen als Effektor-Domänen nachgewiesen (Bellini und Papiz, 2012; Shcherbakova et al., 2015b; Tarutina et al., 2006).

Das PCM der Phytochrome setzt sich demnach klassischerweise aus der PAS, der GAF und der PHY-Domäne zusammen. Bisher weicht hiervon nur eine kleine Gruppe von Phytochromen ab, welche keine PAS-Domäne in ihrer PCM beinhaltet und trotzdem eine normale Photochromie aufweist (Montgomery und Lagarias, 2002; Ulijasz et al., 2008). In pflanzlichen Phytochromen befindet sich neben der PAS-Domäne innerhalb des PCMs noch eine zweifache PAS-Wiederholung vor der Effektor-Domäne. Als zusätzliche Abweichung von der Domänenanordnung in den restlichen bekannten Phytochromen tritt hier noch eine aminoterminal Extension (NTE) vor dem PCM auf (Nagano, 2016). Der Großteil der Phytochrome hat neben dieser Domänenstruktur auch das Pr-Stadium als Grundstadium gemeinsam, aus welchem es durch Absorption von rotem Licht in das Pfr-Stadium, dem Signalstadium, konvertiert wird. Im Fall von Bakteriophytochromen weist das Pr-Stadium zwei Absorptionsbanden auf, wobei eine bei 380 nm – 420 nm (Soret-Bande) und die zweite bei 690 nm – 710 nm (Q-Bande) liegt. Die Anregung beider Banden kann zur Emission im NIR-Bereich um 720 nm führen. Gleichzeitig führt die Anregung der Q-Bande klassischerweise in einem konkurrierenden Prozess zur Photokonvertierung in das Pfr-Stadium, welches eine ähnliche Soret-Bande und eine rotverschobene Q-Bande bei 740 nm - 760 nm aufweist. Anregung in diese tiefrote Q-Bande führt zur Konvertierung in das Pr-Stadium. Zwischen den beiden Stadien kann eine Dunkel-Relaxation stattfinden (Piatkevich et al., 2013b; Shcherbakova et al., 2015b).

Von diesem klassischen Schema weicht eine kleine Gruppe sogenannter *bathy*-Phytochrome ab, die als Grundstadium das Pfr-Stadium aufweist und durch Absorption von tief-rottem Licht in das Pr-Stadium als Signalstadium konvertiert wird (Giraud et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003; Karniol et al., 2005). Auch die Photokonvertierung des Bakteriophytochroms RpBphP3 aus dem photosynthetischen Bakterium *Rhodospseudomonas palustris* weicht von der klassischen Form ab. Hier liegt das Bakteriophytochrom im Grundstadium zwar im Pr-Stadium vor, allerdings ist das Signalstadium, mit einem Absorptionsmaximum von 650 nm, in den kurzwelligeren Bereich verschoben. Interessanterweise weist das aus dem gleichen Organismus stammende Bakteriophytochrom RpBphP2, welches eine 52 %ige Sequenzidentität zu RpBphP3 aufweist, das klassische Grund- und Signalstadium auf (Yang et al., 2007).

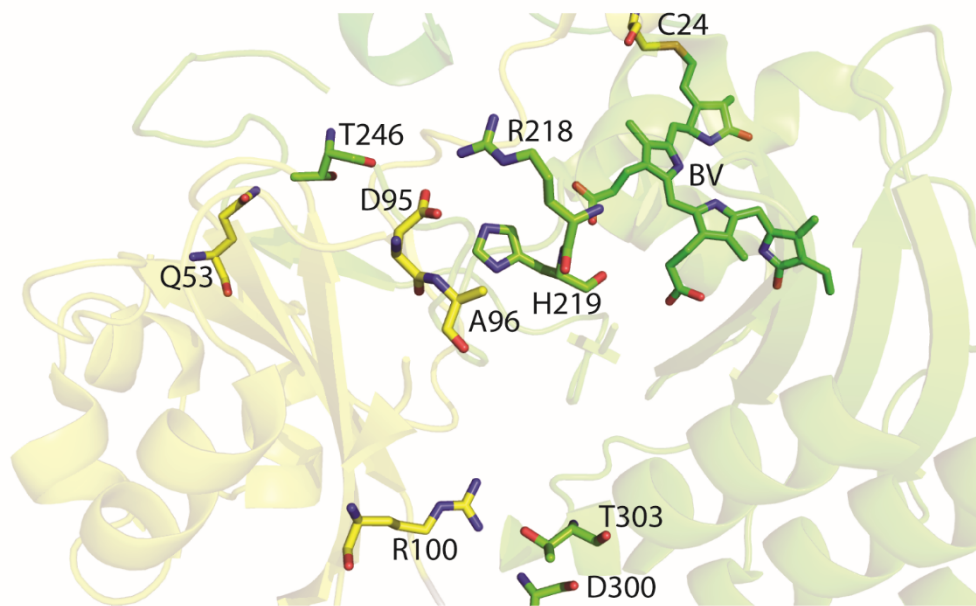


**Abbildung 1-8: Struktur der PAS-GAF-PHY Domänen von Bakteriophytochromen.**

A: Struktur anhand des Phytochroms von *D. radiodurans*. Die Farbcodierung ist folgende: orange aminoterminale Extension, gelb PAS-Domäne, grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Das Cystein24, welches das Chromophor bindet, und das inkorporierte lineare Tetrapyrrol (hier Biliverdin, BV) sind in Stäbchen dargestellt. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen des Pr-Stadiums verwendet (pdb 4O0P). B: Schema der klassischen Domänenstruktur von Bakteriophytochromen mit dem aus der PAS- und der GAF-Domäne gebildeten 8-er-Knoten.  $\beta$ -Faltblätter sind als Pfeile dargestellt,  $\alpha$ -Helices als Tonnen, die Farbcodierung entspricht derjenigen der Abbildung A.

Die erste Strukturaufklärung eines Phytochroms wurde anhand der CBD des Bakteriophytochroms von *Deinococcus radiodurans* (*DrCBD*) von Wagner et al., 2005 veröffentlicht. Nach ihr folgten zahlreiche Weitere (beispielhaft: Essen et al., 2008; Takala et al., 2014; Yang et al., 2008). Hierbei ist besonders die erstmalige Veröffentlichung von Strukturen des kompletten PCMs anhand eines cyanobakteriellen und eines bakteriellen Phytochroms von Bedeutung. Hier wurden nämlich neben der erstmaligen Strukturaufklärung des kompletten PCMs auch erstmalig die beiden unterschiedlichen Stadien (Pr und Pfr) kristallisiert (Bellini und Papiz, 2012; Mailliet et al., 2011). Die hierdurch gewonnenen ersten Hinweise über strukturelle Veränderungen zwischen dem Pr- und dem Pfr-Stadium von Phytochromen (siehe Absatz 1.3.1.5) konnten 2014 durch die erste Veröffentlichung von Strukturen eines Phytochroms aus einem Organismus in beiden Stadien ausgeweitet und verdeutlicht werden (Burgie et al., 2014b; Takala et al., 2014).

Generell weisen die drei Domänen des PCMs innerhalb der Phytochrome dieselbe globale Tertiärstruktur und innerhalb dieser stark konservierte Bereiche auf. Abbildung 1-8 zeigt diese Tertiärstruktur anhand der Struktur des PCMs von *D. radiodurans* (A) und einer schematischen, vereinfachten Darstellung (B). Die PAS-Domäne besteht üblicherweise aus fünf antiparallelen Beta-Faltblättern ( $\beta_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_4$  und  $\beta_3$ ), welche auf einer Seite durch drei Alpha-Helices flankiert werden ( $\alpha_1$ -3). In den meisten Phytochromen geht der PAS-Domäne aminoterminal eine zufällig gewundene Kette aus etwa 35 Aminosäuren voraus. Bei den Phytochromen der Pilze und Bakterien ist innerhalb dieser das Cystein lokalisiert, welches das Chromophor kovalent bindet. Die GAF-Domäne besteht aus sechs antiparallelen Beta-Faltblättern ( $\beta_9$ ,  $\beta_{10}$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_6$ ,  $\beta_7$  und  $\beta_8$ ), die durch ein Bündel aus drei Alpha-Helices ( $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_8$ ) sowie die Alpha-Helices 6 und 7 umrahmt werden. Durch diese wird die Bindetasche für das Chromophor geformt (siehe Absatz 1.3.1.4). Die PAS- und die GAF-Domäne sind durch einen Linker aus ungefähr zehn Aminosäuren verbunden. Die PHY-Domäne besteht ebenfalls aus typischen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern und zeigt starke Ähnlichkeit zur GAF-Domäne. Fünf  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta_{13}$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{15}$ ,  $\beta_{14}$ ) bilden hierbei das Zentrum und werden von einer  $\alpha$ -Helix auf der einen Seite ( $\alpha_{11}$ ) und einem helikalen Bündel ( $\alpha_9$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{12}$ ) auf der anderen Seite eingerahmt. Die Dimerisierungsschnittstelle der Homodimere wird hauptsächlich durch hydrophobe Aminosäuren der  $\alpha$ -Helices der GAF-Domäne gebildet und stellt demnach ein Sechserbündel aus  $\alpha$ -Helices dar (Auldridge et al., 2012; Nagano, 2016; Wagner et al., 2005; Wagner et al., 2007; Yang et al., 2008).



**Abbildung 1-9: Aminosäuren, welche Interaktionen zwischen der PAS- und der GAF-Domäne ermöglichen.**

Die im Text erwähnten Aminosäuren, welche hydrophobe und elektrostatische Interaktionen zwischen der PAS- und der GAF-Domäne ermöglichen, sind in Stäbchen dargestellt. Die Farbcodierung für die Tertiärstruktur ist folgende: gelb PAS-Domäne und grün GAF-Domäne. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen verwendet (pdb: 4O0P).

Der oben erwähnte Linker aus zehn Aminosäuren, welcher die PAS- und die GAF-Domäne verbindet sowie die begrenzten hydrophoben und elektrostatischen Interaktionen durch Aminosäuren wie D95 und R218, R100 und D300/T303, Q53 und T246 oder H219 und A96 (Wagner et al., 2005) (siehe Abbildung 1-9) verknüpfen die PAS und die GAF-Domäne.

Die umfangreichere und engere Verbindungsfläche ist jedoch ein hochkonservierter, hydrophober 8-er Knoten, welcher zuerst durch Wagner et al., 2005 anhand der *Dr*CBD nachgewiesen wurde. Dieser entsteht durch eine Schlaufe der GAF-Domäne, die durch das aminoterminal zur PAS-Domäne lokalisierte Polypeptid durchstoßen wird (siehe Abbildung 1-8, B und Abbildung 1-10). Grundsätzlich sind solche

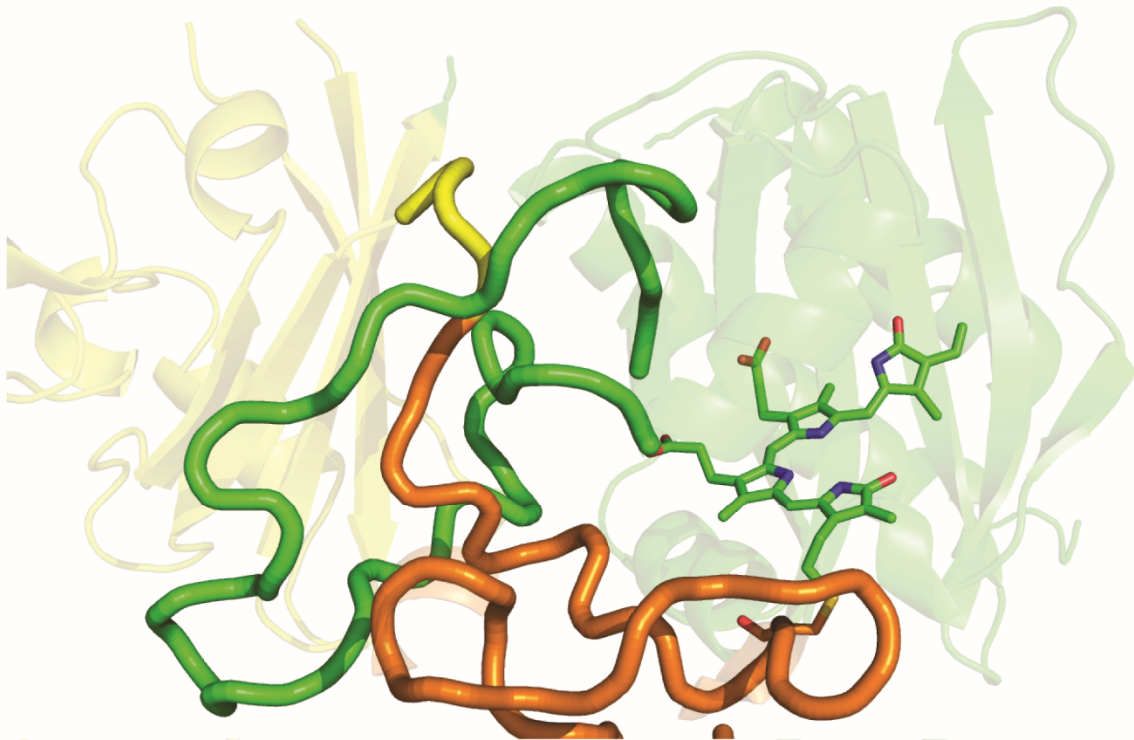
Knoten in Proteinstrukturen sehr selten. Es gibt jedoch einige Beispiele, die eine solche Struktur zeigen (Mallam und Jackson, 2005; Nureki et al., 2004; Taylor, 2000; Wagner et al., 2005; Zarembinski et al., 2003). Im Fall der Phytochrome wurde diese in Proteinen seltene Struktur nach der *D1r*CBD auch in anderen Phytochromen bestätigt (Bhattacharya et al., 2014; Essen et al., 2008; Mailliet et al., 2011; Yang et al., 2007). Das Abgleichen von insgesamt 40 Phytochrom-Sequenzen aus Bakterien, Cyanobakterien, Pilzen und Pflanzen hat eine hohe Konservierung der den Knoten umgebenden Region gezeigt. Aufgrund dieser Tatsache und der stetigen Präsenz der Schlaufe der GAF-Domäne, wird vermutet, dass alle Phytochrome diese dreidimensionale Struktur aufweisen. Eine Ausnahme bildet vermutlich die vorab erwähnte kleine Untergruppe der Phytochrome, die keine PAS-Domäne aufweist (Wagner et al., 2005). Als Funktion des Knotens wird sowohl die Stabilisierung der PAS-GAF-Verbindung als auch die Verminderung von Energieverlusten als Nebeneffekt der Photoisomerisierung des Chromophors angenommen. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass er zur korrekten Orientierung der BV-Bindestelle und somit zu einer effizienten Chromophorbindung beiträgt und die Entstehung von Fehlfaltungen während der Proteinfaltung verringert (Wagner et al., 2005; Stepanenko et al., 2014).

Die Details des Knotens werden an dieser Stelle anhand der *D1r*CBD erläutert, da hier der Knoten erstmalig beschrieben wurde (Wagner et al., 2005) und die genannte CBD in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle einnimmt. Der Knoten wird in allen bisher untersuchten Phytochromen aus den 35 Aminosäuren, welche der PAS-Domäne vorangehen, gebildet, indem diese die in der GAF-Domäne liegende Schlaufe durchstechen. Diese Schlaufe wird aus  $\beta 9$  und  $\alpha 7$  geformt. Der Knoten wird demzufolge aus einem kleinen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt gebildet, wobei die äußeren beiden Stränge ursprünglich zur Schlaufe der GAF-Domäne gehören und der mittlere Strang durch die aminoterminal zur PAS-Domäne lokalisierte Region gestellt wird (siehe Abbildung 1-8, B). Durch die PAS- und die GAF-Domäne und den Knoten wird ein nicht kontinuierliches  $\beta$ -Faltblatt geformt. Die Aminosäuren R254, S272 und S274, die in der GAF-Domäne beziehungsweise ihrer Schlaufe (R254) lokalisiert sind, überbrücken hierbei das Chromophor durch Interaktionen mit den Propionsäure-Seitenketten des B-Rings (R254) beziehungsweise des C-Rings (S272, S274) des BVs. Der Knoten zeichnet sich durch einen stabilisierenden, stark hydrophoben Kern aus. Im Zentrum dieses Kerns ist die Aminosäure I35 lokalisiert, die Van-der-Waals-Interaktionen zu den Aminosäuren L41, V232, L234, L248 und L253 ausbildet. Die Aminosäure Q36 aus der aminoterminal zur PAS-Domäne lokalisierten Kette durchspannt die Schlaufe der GAF-Domäne durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Resten A225 und R254. In Abbildung 1-10, A ist eine Übersicht über den Knoten dargestellt. Abbildung 1-10, B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt und die Lage der wichtigsten Aminosäuren sowie ausgewählte Abstände.

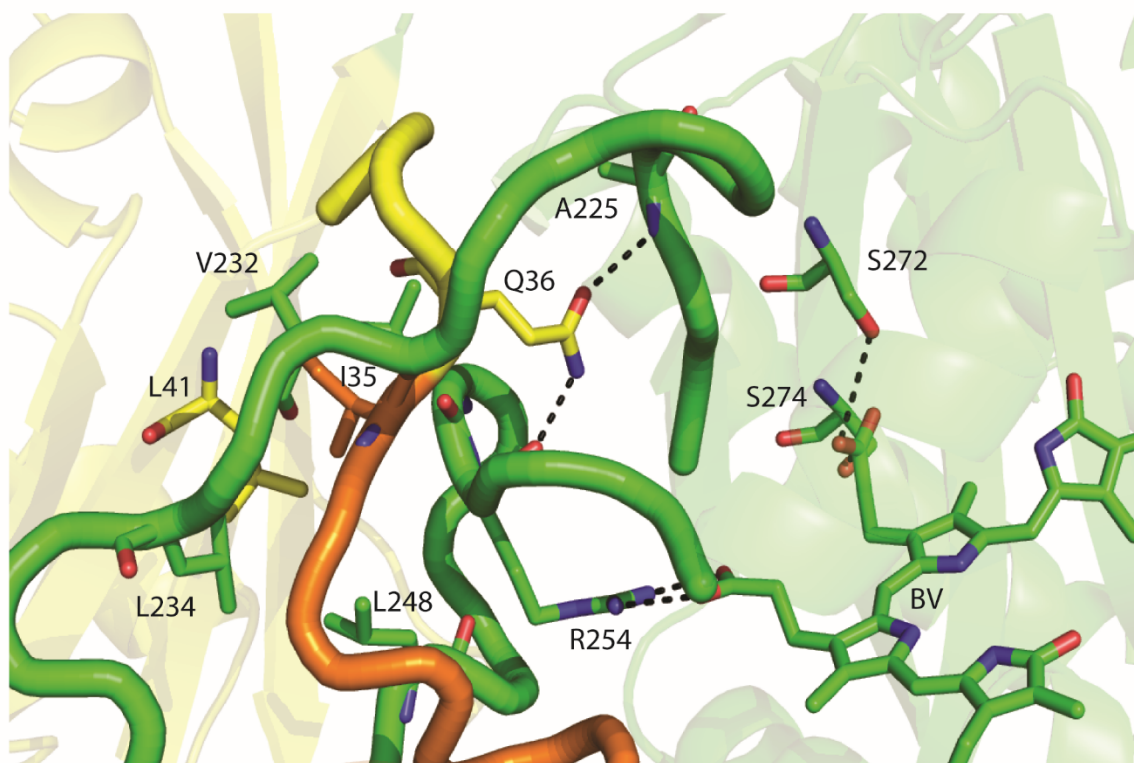
Die Frage, wie und wann sich diese komplexe Struktur des Phytochroms bildet, kann nur spekulativ beantwortet werden. Wagner et al., 2005 postulieren, dass die PAS-Domäne co-translational zuerst gefaltet wird, wobei die aminoterminal Kette aus 35 Aminosäuren mitsamt des I35 unstrukturiert und lösungsexponiert bleibt. Darauf folgend wird die erste Hälfte der GAF-Domäne mit den  $\alpha$ -Helices  $\alpha 4$ - $\alpha 5$ , dem halben  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ) und der  $\alpha$ -Helix  $\alpha 6$  translatiert und nimmt ihre Sekundärstruktur ein. Nun wird der Strang  $\beta 9$  synthetisiert, dessen hydrophobe Seitenketten sich um die Aminosäure I35 legen und den hydrophoben Kern des Knotens bilden. Zuletzt wird die zweite Hälfte der GAF-Domäne translatiert.



A



B



**Abbildung 1-10: Hydrophober, hochkonservierter 8-er Knoten.**

A: Übersicht über den im Text beschriebenen hydrophoben Knoten, welcher die PAS- und die GAF-Domäne verbindet. Der Knoten wird durch eine von der GAF-Domäne gebildete Schlaufe und den aminoterminal zur PAS-Domäne liegenden Strang gebildet, der diese Schlaufe durchsticht. B: detaillierte Ansicht des Knotens. Die im Text erwähnten Aminosäuren sind als Stäbchen abgebildet, wichtige Interaktionen sind dargestellt. Die Farbcodierung für die Tertiärstruktur ist folgende: orange aminoterminaler Extension, gelb PAS-Domäne, grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Wagner et al., 2005 veröffentlichten Strukturen verwendet (pdb: 1ztu).



Bakterien und Pilze nutzen hingegen natürlicherweise ein Cystein aminoterminal der PAS-Domäne als Bindestelle für BV und binden das Chromophor über sein C3<sup>2</sup>-Atom. Hierdurch entsteht eine Doppelbindung zwischen dem C3- und dem C3<sup>1</sup>- oder dem C2-Kohlenstoffatom des Chromophors, welche das  $\pi$ -Elektronensystem, gegenüber den cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochromen, erweitert (Hontani et al., 2016; Karniol et al., 2005; Lamparter et al., 2004; Lamparter et al., 2002; Wagner et al., 2005; Wagner et al., 2007; Yang et al., 2007). Für viele Phytochrome wurde gezeigt, dass sie neben ihrem natürlichen Chromophor auch andere, darunter synthetische, Chromophore an einer alternativen oder derselben Bindestelle binden können (Lehtivuori et al., 2013; Burgie et al., 2014b; Hanzawa et al., 2001; Lamparter et al., 2002; Wagner et al., 2008).

Im Folgenden wird auf die Chromophorbindetasche der Phytochrome eingegangen, welche neben der Bindestelle zu einer funktionalen Inkorporation des Chromophors führt. Diese Einbettung beeinflusst die spektralen Eigenschaften des Chromophors und in Folge die des Proteins und ist daher von großem Interesse für die vorliegende Arbeit.

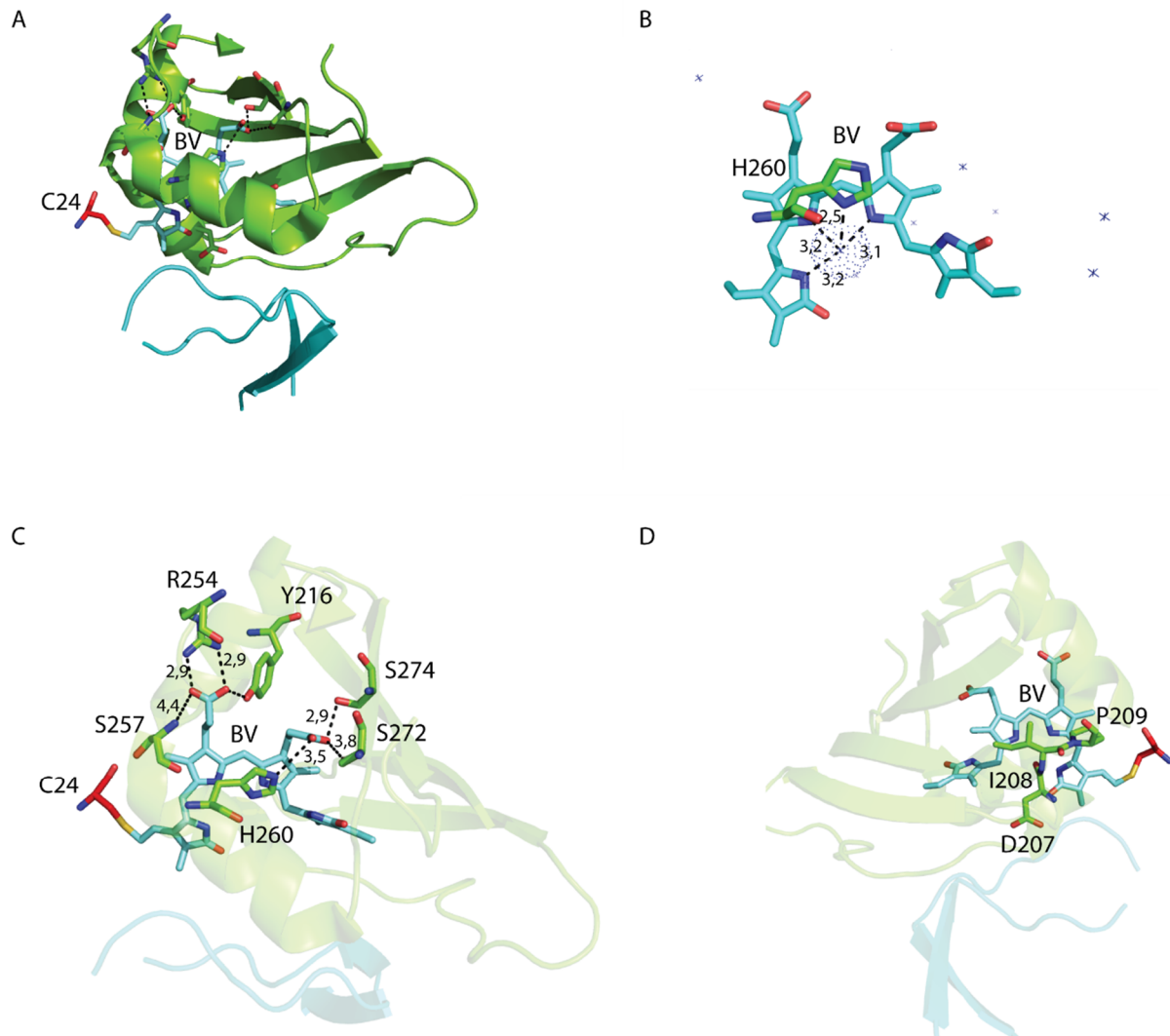
#### 1.3.1.4 Chromophorbindetasche

Die Lokalisierung Chromophorbindetasche variiert nicht wie die Chromophorbindestelle zwischen den Organismengruppen. Die Bindetasche wird soweit bekannt größtenteils durch die GAF-Domäne gebildet. Das Chromophor ist hier zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt und den  $\alpha$ -Helices  $\alpha_6$  und  $\alpha_7$  der Domäne eingebettet. Eine durch die Aminosäuren 446-477 der PHY-Domäne geformte Lasche schirmt das Chromophor zusätzlich von der Umgebung ab und spielt eine essentielle Rolle im Photozyklus der Phytochrome (siehe Absatz 1.3.1.5). Die Positionierung des Chromophors in der Bindetasche wird durch die Proteinstruktur bestimmt und ist essentiell für die Bildung der kovalenten Thioetherbindung zum Chromophor (Auldridge und Forest, 2011; Takala et al., 2014).

Anhand der *D<sub>r</sub>CBD* ist in Abbildung 1-12 die Chromophor-Bindetasche in verschiedenen Ausschnitten und Vergrößerungsstufen zu sehen. Wie in Abbildung 1-12, C zu sehen, spielen die Propionsäure-Seitenketten der Ringe B und C des BVs eine wichtige Rolle in der Positionierung und Stabilisierung des Chromophors. Sie ragen durch die  $\alpha$ -Helix 7 und die Stränge 9 und 10 des  $\beta$ -Faltblattes aus der Chromophorbindetasche hinaus und interagieren mit hochkonservierten Aminosäuren. Der Carbonylsauerstoff der Propionsäure-Seitenkette des Rings B formt Salzbrücken mit dem Amin der Aminosäure R254 und Wasserstoffbrückenbindungen mit der Hydroxylgruppe des Y216 und dem Stickstoffatom des Serins an Position 257. Die Sauerstoffatome der Propionsäure-Seitenkette des Rings C sind durch eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Histidin an Position 260 und den Hydroxylgruppen der Aminosäuren S272 und S274 verbunden. Zwischen einem Wassermolekül (W18) der Propionsäure-Seitenkette des C-Rings und dem Histidin an Position 290 besteht ebenfalls ein konserviertes Netzwerk. Des Weiteren formt das Histidin an Position 290 Wasserstoffbrückenbindungen mit Stickstoffatomen der Ringe B und C. Das Wassermolekül 12 („Pyrrol-Wasser“) ermöglicht ein auffälliges Netzwerk zwischen dem N $\delta$ 1 des Histidins an Position 260 und den Stickstoffatomen der Pyrrol-Ringe A, B und C (Abbildung 1-12, B).

Ein weiteres hochkonserviertes Motiv ist das „DIP“-Motiv aus den Aminosäuren D207, I208 und P209 (siehe Abbildung 1-12, D). Das Prolin löst einen Knick in der Proteinkette aus, der durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette des D207 und seinem eigenen Hauptketten-Stickstoffatom stabilisiert wird. Die Aminosäuren des DIP-Motivs haben somit Zugang zu dem Chromophor. Es entstehen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Aminosäure I208 und dem C-Ring, zwischen dem Prolin an Position 209 und dem C10 des Chromophors und zwischen demselben Prolin und dem B-Ring (Wagner et al., 2005).





**Abbildung 1-12: Chromophor und Chromophorbindetasche anhand der *DrCBD*.**

A: Übersicht über die Chromophor-Bindetasche, welche aus dem  $\beta$ -Faltblatt und den  $\alpha$ -Helices  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$  der GAF-Domäne besteht. Eine Lasche aus den Resten 446-477 der PHY-Domäne schirmt das Chromophor zusätzlich ab. B: Das Chromophor (BV) und seine Interaktion mit dem Pyrrolwasser und dem Histidin an Position 260. C: Vergrößerung der direkten Chromophorumgebung. D: Die Lage des DIP-Motivs zum Chromophor.

Im Text erwähnte Aminosäuren sind als Stäbchen dargestellt. Ausgewählte Abstände sind in Å angegeben. Die Farbcodierung für die Tertiärstruktur ist folgende: grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Wassermoleküle sind als Kreuze dargestellt. Für die Abbildungen A und C wurden die von Takala et al., 2014 (pdb: 4O0P) und für Abbildung B die von Wagner et al., 2005 (pdb: 1ZTU) veröffentlichten Strukturen verwendet.

Bei der Betrachtung der Bindetasche und der Packung um das Chromophor fällt auf, dass der D-Ring zwar durch die hydrophoben Reste M174, V186 und L286 umrahmt wird, welche eine Art hydrophobe Höhle bilden, jedoch nicht so eng umschlossen ist, wie der Rest des Chromophors. Eine engere Packung um den D-Ring würde den im folgenden Absatz erläuterten Photozyklus verhindern. Seine Hauptinteraktionen mit seiner direkten Umgebung sind eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Rest H290 und hydrophobe Interaktionen mit den Resten Y176, Y263, F198 und F203 (Takala et al., 2014; Wagner et al., 2005.)

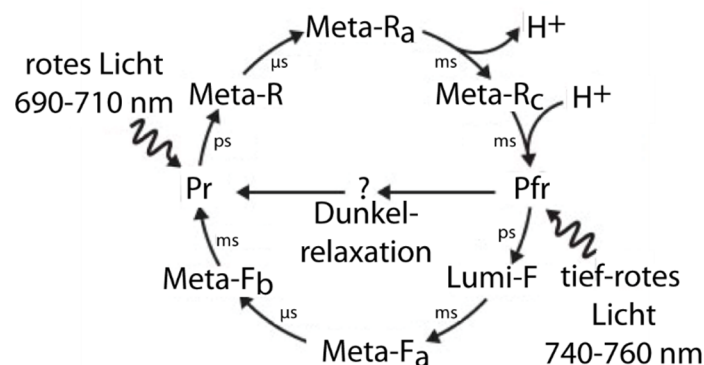
Die Untersuchungen von Wagner et al., 2008 zeigten anhand von Mutationsstudien eine auffallend geringe Sensitivität der BV-Bindung gegenüber vielen Mutationen in der direkten Umgebung des BVs und seiner Bindestelle. So führte beispielsweise nur die Mutation von drei der 38 getesteten Aminosäuren zur Unterbindung der BV-Bindung. Selbst durch die Deletion von 20 Aminosäuren aminoterminal des konservierten Cysteins (C24), oder durch die Substitution von Aminosäuren in seiner direkten Umgebung (E25A, E27A) kann die BV-Bindung nicht verhindert werden. Die Substitutionen H260D, H260K und R254Q können jedoch nicht ausgeglichen werden und führen zu dem Verlust der Bindung von BV. Weitere

Studien auf diesen Positionen ergaben, dass wohl die elektrostatische Umgebung des Pyrrol-Wassers und/oder der Ringe B und C des Chromophors essentiell für die zur Bindung passende Positionierung des Chromophors ist (Wagner et al., 2008).

### 1.3.1.5 Photozyklus und Signalweiterleitung in (Bakterio)- Phytochromen

Wie bereits beschrieben, binden alle Phytochrome lineare Tetrapyrrole als Chromophor. Diese Inkorporation ermöglicht die Isomerisierung des Chromophors und die damit einhergehende Konvertierung des Phytochroms zwischen den zwei stabilen, ineinander konvertierbaren, spektral unterschiedlichen Stadien Pr und Pfr. Diese Umwandlung wird durch eine schnelle, lichtinduzierte *cis-trans*-Photoisomerisierung der C15-C16-Methin-Doppelbindung des Chromophors initiiert und durch Relaxationsschritte, welche an strukturelle Veränderungen in der direkten und weiteren Chromophorumgebung gekoppelt sind, vollendet (Shcherbakova et al., 2015b; Takala et al., 2014; Wagner et al., 2008).

Der genaue Mechanismus, insbesondere die genauen Photodynamiken, welche der Konvertierung zwischen dem Pr- und dem Pfr-Stadium zugrunde liegen, sind trotz zahlreicher Studien noch nicht bis ins Detail geklärt (Wagner et al., 2008). Am genauesten untersucht wurden hierbei die strukturellen Veränderungen des Chromophors, seiner direkten Umgebung und der PHY-Domäne, welche mit der Isomerisierung einhergehen. Dagegen ist über die genauen Photodynamiken, die der Konvertierung zwischen dem Pr- und dem Pfr-Stadium zugrunde liegen, nur sehr wenig bekannt.



**Abbildung 1-13: Schematische Darstellung des Photozyklus' von Phytochromen.**

Die Abbildung wurde abgeändert aus Wagner et al., 2008 übernommen (Copyright 2008, the American Society for Biochemistry and Molecular Biology) und stellt die im Text erläuterten Intermediate des Photozyklus' von Phytochromen dar.

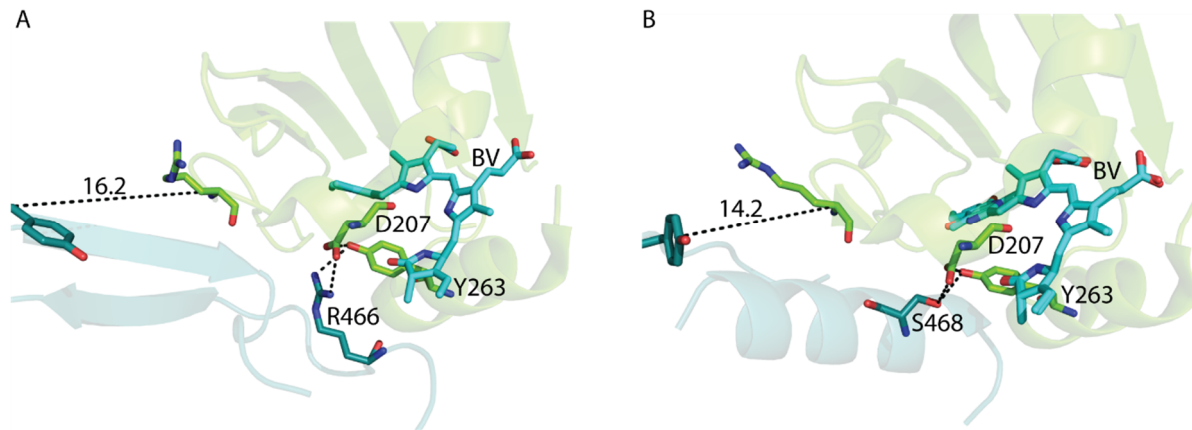
Generell scheinen alle bisher untersuchten Phytochrome die in Abbildung 1-13 zusammengefassten Zwischenstadien gemein zu haben. Der erste Schritt bei der Photokonvertierung von dem Pr- in das Pfr-Stadium ist Organismengruppen übergreifend eine sehr schnelle, lichtinduzierte (Anregung bei 700 nm) *cis-trans*-Isomerisierung der C15-C16-Methin-Doppelbindung des Chromophors, welche auch mit einer thermalen leichten Rotation um die C5-C6-Methin-Bindung einhergeht (Borucki et al., 2005). Diese initiiierende *cis-trans*-Isomerisierung führt zu dem Photoprodukt Meta-R. Für diesen Übergang des Pr-Stadiums in das Meta-R-Stadium wurden multiexponentielle Kinetiken mit Lebenszeiten von zwischen 0,1 und 400 ps beobachtet. Durch thermale Relaxation geht dieses Photoprodukt über zwei Intermediate (Meta-RA und Meta-RC) in das Pfr-Stadium über. Dies geschieht auf einer Zeitskala von Millisekunden. Die Bildung des Meta-RC-Stadiums geht mit der Abgabe eines Protons des Chromophors einher. Während des darauffolgenden Übergangs in das Pfr-Stadium wird das Chromophor wieder protoniert. Somit liegt das Chromophor sowohl im Pr- als auch im Pfr-Stadium kationisch vor. Für den Übergang von dem Pr- in das Pfr-Stadium ist das erste Photoprodukt das Lumi-F, welches ähnlich wie Meta-R innerhalb von

Pikosekunden gebildet wird. Hier ist der erste Schritt die lichtinduzierte *trans-cis*-Isomerisierung, die durch Bestrahlung mit tiefrotem Licht (etwa 750 nm) induziert wird. Nach der Entstehung von Lumi-F folgt eine Relaxation im Millisekunden-Bereich über zwei Intermediate (Meta-F<sub>A</sub> und Meta-F<sub>B</sub>) in das Pr-Stadium. Genauso wie bei dem Übergang von dem Pr- in das Meta-R-Stadium, zeigt auch der Übergang von dem Pfr- in das Lumi-F-Stadium multiexponentielle Kinetiken. Hierbei ist in beiden Fällen noch nicht final geklärt, ob dies durch ein homogenes oder ein heterogenes Modell zu erklären ist. Im ersten Fall wären die verschiedenen Lebenszeiten durch verschiedene Intermediate begründet. Im zweiten Fall wären unterschiedliche Subpopulationen des Grundstadiums, die sich durch unterschiedliche Übergangskinetiken auszeichnen, die Ursache. Wang et al., 2016a, nehmen für beide Übergänge ein homogenes Modell an (Andel et al., 1996; Borucki et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2012; Heyne et al., 2002; Kim et al., 2012; Kneip et al., 1999; Rüdiger et al., 1983; Shcherbakova et al., 2015b; van Thor et al., 2007; van Wilderen et al., 2009; Wang et al., 2016a).

Interessanterweise sind die oben beschriebenen Übergänge zwischen den Intermediaten beziehungsweise Stadien unterschiedlich stark sensibel gegenüber Aminosäuresubstitutionen in der Chromophorumgebung. Hierbei sind die Chromophorbindung und der Übergang von dem Pr in das Meta-R Stadium relativ unsensibel gegen einzelne Aminosäuresubstitutionen in der direkten Chromophorumgebung. Die späteren Schritte der Konvertierung (Meta-R zu Meta-R<sub>A</sub> und Meta-R<sub>C</sub>) scheinen allerdings sensibler gegenüber Substitutionen in der Chromophorbindetasche zu sein. Insbesondere die in Absatz 1.3.1.4 eingeführten, hoch konservierten Aminosäuren D207 und His260 scheinen bei dem Protonenaustausch des späten Photozyklus eine essentielle Rolle zu spielen. Ebenso wird für die Reste Y176 und Y263 eine essentielle Rolle im Photozyklus angenommen (Wagner et al., 2008).

Das Pfr-Stadium ist thermisch nicht stabil, sodass vom Pfr- in das Pr-Stadium auch eine nicht photochemische Dunkelrelaxation möglich ist. Im Organismus selbst muss dieser Vorgang eine wichtige Rolle bei der Einstellung des Equilibriums zwischen dem Pr- und dem Pfr-Stadium spielen und hat somit großen Einfluss auf die Fähigkeit Signale aufzunehmen beziehungsweise weiterzugeben. Es sind mehrere Faktoren bekannt, welche die Dunkelrelaxationsrate beeinflussen können, wie der pH-Wert oder Ionenstärken und die Konzentration von Metallionen (Rockwell et al., 2006). Interessanterweise wurde in pflanzlichen Phytochromen gezeigt, dass die Dunkelrelaxation durch beispielsweise Interaktionen mit anderen Proteinen oder Mutationen stark beeinflusst werden kann (Elich und Chory, 1997; Rockwell et al., 2006; Sweere et al., 2001).

Auf größerer struktureller Ebene (Tertiär- und Quartärstruktur) folgen dem vorab beschriebenen Photozyklus des Chromophors weitere Veränderungen. So wird davon ausgegangen, dass sich das Chromophor nach der *cis-trans*-Isomerisierung leicht in der Bindetasche verschiebt, um eine neue, energetisch günstige Position einzunehmen. Dies führt zur Veränderung zahlreicher Chromophor-Protein und Protein-Protein Interaktionen. Die Verbindung zwischen der Lasche, welche von der PHY-Domäne gebildet wird und das Chromophor zusätzlich abschirmt und der GAF-Domäne wird unterbrochen. Wie in Abbildung 1-14, A und B zu sehen ist, verändert die Lasche in Folge dessen ihre Tertiärstruktur von einem antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (Pr-Stadium, Abbildung 1-14, A) zu einer helikalen Struktur mit Schlaufen (Pfr-Stadium, Abbildung 1-14, B). Dies führt zu einer Verkürzung der Lasche um 2,5 Å. Das  $\beta$ -Faltblatt des Pr-Stadiums ist über das Arginin an Position 466 mit den Aminosäuren D207 und Y263 verbunden. Hinzu kommen Interaktionen mit den Aminosäuren W451, G452, P456, P465 und F469. Die helikale Struktur des Pfr-Stadiums hingegen adressiert die Aminosäuren Y263 und D207 über das Serin an Position 468 (Burgie et al., 2014b; Takala et al., 2014).

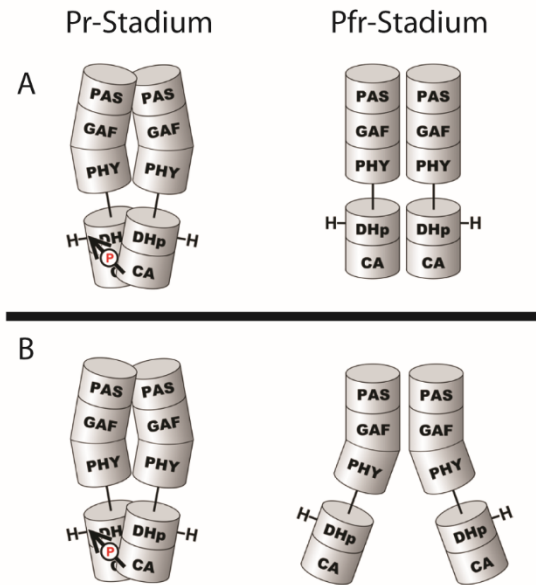


**Abbildung 1-14: Veränderung der Lasche der PHY-Domäne während des Photozyklus'.**

A: Ausschnitt der Chromophorbindetasche mit Fokus auf die von der PHY-Domäne geformte Lasche, welche hier als  $\beta$ -Faltblatt vorliegt und das Chromophor. Der Abstand zwischen der GAF- und der PHY-Domäne beträgt circa 16,2 Å. Die Aminosäuren D207, Y263 und R466 sind in Stäbchenform gezeigt. B: Gleicher Vergrößerungsausschnitt, allerdings im Pfr-Stadium. Die von der PHY-Domäne geformte Lasche liegt als  $\alpha$ -Helix vor. Der Abstand zwischen der GAF- und der PHY-Domäne ist um 2 Å verkürzt. Der Abstand wurde zwischen den ebenfalls als Stäbchen dargestellten Aminosäuren Y479 und R202 gemessen. Die Farbcodierung für die Tertiärstruktur ist folgende: grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen verwendet (pdb-Nummern: A, 4O0P; A, 4O0I).

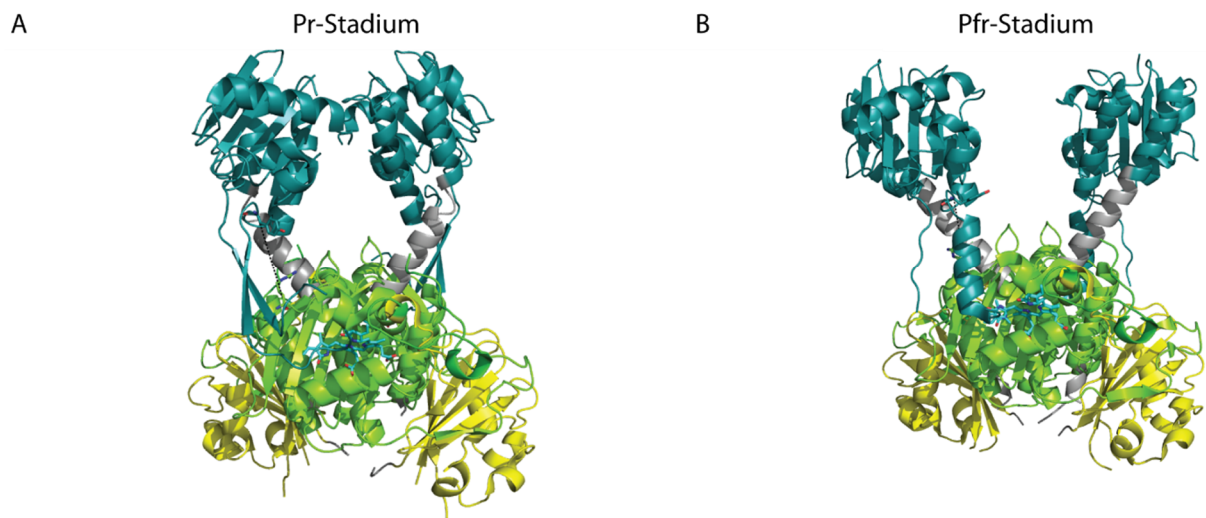
Alle hier beschriebenen Aminosäuren sind Teile von hochkonservierten Motiven ( $P_{465}$ -R-X-S-F<sub>469</sub>, D<sub>207</sub>-I-P<sub>209</sub>, W<sub>451</sub>-G-G<sub>453</sub> oder Hb<sub>472</sub>XE<sub>474</sub>, wobei Hb für *hydrophobic bulky* steht). Diese Tatsache lässt, trotz der fehlenden Strukturdaten in vielen Phytochromen, annehmen, dass es sich um konservierte Interaktionen handelt. Mutationsstudien von Burgie et al., 2014b zeigen, dass diese Konvertierung durch einen multiplen Mechanismus zu erklären ist und nicht allein beispielsweise von der Salzbrücke zwischen den Aminosäuren D207 und R466 abhängt (Burgie et al., 2014b; Takala et al., 2014).

Wie die Signalweitergabe bis zur Effektor-domäne der Phytochrome erfolgt ist noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Es gibt allerdings zwei Hauptmodelle, wie die Änderungen der Tertiärstruktur zu einer Umstrukturierung der Quartärstruktur und somit zu einer Steuerung der Aktivität der Effektor-domäne führen kann. In beiden Modellen wird angenommen, dass die Aktivität der Effektor-domäne (Histidinkinase) im Pr-Stadium höher ist als im Pfr-Stadium (Nagano, 2016; Takala et al., 2014; Takala et al., 2015; Yang et al., 2015). Die beiden Modelle sind in Abbildung 1-15 dargestellt und wurden anhand der Strukturen des Phytochroms von *R. palustris* und *P. aeruginosa* (*RpBphP*, *PaBphP*, Yang et al., 2015) (A) beziehungsweise *D. radiodurans* (Takala et al., 2014; Takala et al., 2015) (B) entwickelt. In beiden Modellen wird davon ausgegangen, dass die Aktivität der Histidinkinasen im Pr- beziehungsweise Pfr-Stadium durch die Lage des Phosphorakzeptors Histidin des einen Protomers der Histidinkinase zu der katalytischen ATP-Bindedomäne des anderen Protomers der Histidinkinase reguliert wird. Die geringere Aktivität der Histidinkinase im Pfr-Stadium ist bei Modell A durch eine Änderung der relativen Orientierung der Protomere zueinander und bei Modell B durch eine komplette Separierung der Protomere voneinander zu erklären.



**Abbildung 1-15: Schematische Darstellung der zwei postulierten Mechanismen der Signalweitergabe zur Effektor-domäne.**  
 A: Schematische Darstellung des von Yang et al., 2015 postulierten Modells, bei welchem die Aktivität der Effektor-domäne über die relative Orientierung zwischen dem Phosphorakzeptor Histidin und der katalytischen ATP-Bindedomäne der zwei Protomere zueinander gesteuert wird. B: Schematische Darstellung des von Takala et al., 2014 postulierten Modells, bei welchem die Aktivität der Histidinkinase durch die komplette räumliche Trennung des Phosphorakzeptors Histidin und der katalytischen ATP-Bindedomäne der zwei Protomere der Histidinkinasen gesteuert wird. Hierbei ist die strukturelle Veränderung der durch die PHY-Domäne geformten Lasche zuständig für diese Separierung. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis leicht verändert aus Nagano, 2016 übernommen (Copyright 2016, The Botanical Society of Japan and Springer). Dhp steht für die *Dimerization and Histidin Phototransfer domain* und CA für die *Catalytic and ATP-binding domain* der Histidinkinase, welche die Effektor-domäne der meisten Phytochrome darstellt.

Modell (B) beruht auf Kristallstrukturen des Pr- und Pfr-Stadiums von *D. radiodurans* (Takala et al., 2014; Takala et al., 2015) und hat somit für vorliegende Arbeit eine größere Wichtigkeit. Aus diesem Grund ist in Abbildung 1-16 das Modell B anhand der Strukturen des Phytochroms von *D. radiodurans* dargestellt. Es wurde gezeigt, dass die oben beschriebenen Umordnungen der direkten Chromophorumgebung und der durch die Reste 446-477 der PHY-Domäne gebildeten Lasche im Pfr-Stadium in erster Hinsicht zu einer Verringerung der Distanz zwischen der GAF- und der PHY-Domäne um 2 Å führt (siehe Abbildung 1-14). Es wird angenommen, dass dies zu der V-förmigen Aufspaltung des Homodimers führt, welche in Abbildung 1-15, B und Abbildung 1-16, B zu erkennen ist. Somit wird die Aktivität der Effektor-domäne im Pfr-Stadium vermindert.



**Abbildung 1-16: Strukturelle Veränderungen während der Photokonvertierung des Phytochroms von *D. radiodurans*.**  
 A: PAS-, GAF- und PHY-Domäne des Phytochroms von *D. radiodurans* im Pr-Stadium. B: PAS-GAF- und PHY-Domäne des Phytochroms von *D. radiodurans* im Pfr-Stadium. Die Farbcodierung für die Tertiärstruktur ist folgende: orange aminoterminaler Extension, gelb PAS-Domäne, grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen verwendet (pdb-Nummern: A, 4O0P; B, 4O01).

### 1.3.1.6 Vergleich der Eigenschaften von GFP-homologen und (Bakterio-) Phytochrom-basierten Proteinen

GFP-homologe FPs werden weitverbreitet in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung, etwa als fluoreszierende, genetische Marker in der Fluoreszenzmikroskopie, photomodulierbare FPs in der hochauflösenden Mikroskopie (siehe Absatz 1.1.1 und 1.2.4) oder Biosensoren eingesetzt (Adam et al., 2014; Shcherbakova et al., 2012).

Das Farbspektrum der Absorptions- und Emissionsmaxima der GFP-Homologe ist hierbei allerdings auf den Bereich des sichtbaren Lichts begrenzt (siehe Absatz 1.2.3). Die Verwendung von Bakteriophytochromen, die ebenfalls den Vorteil genetisch codierter Marker aufweisen, ermöglicht eine Ausweitung des für die Fluoreszenzmikroskopie zugänglichen Farbspektrums in den nahen Infrarotbereich. Weiterhin macht ihre natürliche Fähigkeit, Licht als Signal wahrzunehmen und dieses in eine intrazelluläre Antwort zu konvertieren (siehe Absatz 1.3.1.5), Phytochrome zu einer naheliegenden und vielversprechenden Grundlage für die Generierung von Werkzeugen für die Optogenetik (Gasser et al., 2014; Levskaya et al., 2009; Piatkevich et al., 2013b). Auch nicht fluoreszierende Varianten können so eine Anwendung finden, wie die Verwendung eines bakteriellen Phytochroms in der photoakustischen Tomographie (*photoacoustic tomography*, PAT) zeigt (Yao et al., 2016). Die vergleichsweise geringe Fluoreszenzquanteneffizienz der Bakteriophytochrom-basierten Proteine ist hier nicht von Bedeutung. Insbesondere bei der gewünschten Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie und speziell bei Einzelmolekülnachweisverfahren ist diese geringe Quanteneffizienz jedoch nachteilig. Sie kann aber bis zu einem gewissen Maße durch die deutlich reduzierte Autofluoreszenz von Geweben in diesem Wellenlängenbereich kompensiert werden.

Generell muss insbesondere bei der Generierung von FPs auf Basis von Bakteriophytochromen beachtet werden, dass die molekulare Helligkeit als das Produkt aus der Quantenausbeute und dem Extinktionskoeffizienten sich nicht als alleiniges Maß für die Helligkeit des FPs in Zellen (zelluläre Helligkeit) eignet. Zusätzlich zu allgemeinen Charakteristika wie der Proteinexpression, -faltung und -stabilität, die die tatsächliche, zelluläre Helligkeit eines FPs massgeblich beeinflussen, muss bei Bakteriophytochromen immer auch die Bindung des externen Chromophors beachtet werden. So wirken sich etwa die Affinität zum Chromophor und die Konzentration des Chromophors in der Zelle sowie die intrazelluläre Stabilität des Komplexes sehr stark auf die zelluläre Helligkeit des FPs aus (Shcherbakova et al., 2015b).

Neben einer für gewöhnlich höheren Quantenausbeute haben GFP-Homologe den Vorteil des vergleichsweise geringeren Molekulargewichts. Dieses beträgt bei Monomeren zwischen 24 und 28 kDa, wohingegen Phytochrom-basierte Proteine aus dem kompletten PCM ein Molekulargewicht von 55-60 kDa und solche aus der CBD eines von 35-38 kDa aufweisen (Piatkevich et al., 2013b). Ein weiterer Vorteil der GFP-Homologe ist deren einzigartige Fähigkeit zur autokatalytischen Chromophormaturation. Phytochrom-basierte Proteine benötigen hingegen wie beschrieben immer ein lineares Tetrapyrrol als externes Chromophor (siehe Absatz 1.2.2 und 1.3.1.3).

Generell kann man sagen, dass beide Proteingruppen Vor- und Nachteile haben, deren Gewichtung je nach Anwendung variiert. Insbesondere für die Anwendung in lebenden Geweben und Organismen, sind die spektralen Eigenschaften der Bakteriophytochrome jedoch besonders hervorzuheben.

Das bislang größte Anwendungsgebiet von Bakteriophytochromen ist die Entwicklung und Anwendung von FPs, die auch das Thema der vorliegenden Arbeit sind. Der Aufbau aus Domänen, die tieftrote Fluoreszenz und der natürliche Photozyklus erweitern die Möglichkeiten des Proteindesigns. Der folgende Abschnitt soll dazu dienen dies anhand von ausgewählten Beispielen zu verdeutlichen.



### 1.3.1.7 Möglichkeiten der Generierung von FPs auf Basis von Bakteriophytochromen

Bisher wurden auf der Basis von (Bakterio-) Phytochromen größtenteils permanent fluoreszierende Proteine generiert. Hierfür wurde nach Möglichkeit die Photokonvertierung blockiert und die strahlungsfreie Energieabgabe minimiert. Als Vorlage für permanent fluoreszierende FPs wurden daher bisher meistens CBDs, als der Teil der Domänen, welche minimal nötig ist, um das Chromophor kovalent zu binden, von Phytochromen verwendet (Shcherbakova et al., 2015b). Eine Möglichkeit, die Photokonvertierung zu unterbinden, ist die Verwendung eines alternativen Chromophors, welches nicht zu dieser befähigt ist. Dies wurde mithilfe der GAF-Domänen von cyanobakteriellen Phytochromen und Phycoerythrobilin (PEB) als alternatives Chromophor gezeigt. Auf diese Weise konnten FPs mit einer Quantenausbeute von bis zu 72 % generiert werden. Diese werden jedoch durch die Notwendigkeit der PEB-Zugabe limitiert und absorbieren sowie emittieren nicht im bevorzugten NIR-Bereich, sondern im orangen Wellenlängenbereich (Shcherbakova et al., 2015b; Sun et al., 2014).

Für die Generierung von FPs im NIR-Bereich ist die Verwendung von BV also Chromophor am besten geeignet. Es ist natürlicherweise in Säugerzellen vorhanden und seine Inkorporation kann zu einer Absorption und Emission im NIR-Bereich des Lichts führen (siehe Absatz 1.3.1.2 und 1.3.1.3). Um permanent fluoreszierende FPs zu erhalten, wurde hier in den meisten Fällen versucht die Rotation des D-Ringes zu unterbinden. Seit der Veröffentlichung des ersten auf der CBD eines Bakteriophytochroms beruhenden FPs (Shu et al., 2009a) kam es in den folgenden Jahren zu zahlreichen weiteren Publikationen von neu generierten FPs (Auldridge et al., 2012; Bhattacharya et al., 2014; Filonov et al., 2011; Lehtivuori et al., 2015; Piatkevich et al., 2013c; Rumyantsev et al., 2015; Shcherbakova et al., 2016; Shcherbakova und Verkhusha, 2013; Yu et al., 2015; Yu et al., 2014), was das Potential dieser Proteinklasse für die Anwendung als FPs verdeutlicht. Besonders hervorzuheben sind hier Beispiele, welche die Vielfalt der Möglichkeiten, die Bakteriophytochrome als Basis für die Generierung von FPs bieten, verdeutlichen.

So wurde beispielsweise im Jahr 2015 ein Protein auf der Basis der *Rp*CBD entwickelt, welches besondere BV-Bindeeigenschaften aufweist (Shcherbakova et al., 2015a). BphP1-FP weist blauverschobene Absorptions-/Emissionsspektren von 643 nm/669 nm und mit 13 % die bisher höchste Quantenausbeute unter den auf Basis von Bakteriophytochromen entwickelten FPs auf. Mithilfe von Mutationsstudien wurde gezeigt, dass diese beiden Eigenschaften auf eine zweite BV-Bindestelle innerhalb der GAF-Domäne (C253) zurückzuführen sind. Kristallstrukturen zeigten zwei unterschiedliche Bindungsmöglichkeiten des BVs an dieses Cystein auf. Demnach ist eine Bindung über das C3<sup>1</sup>- oder das C3<sup>2</sup>-Atom des BVs möglich (siehe Abbildung 1-11, Absatz 0), welche ungefähr in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 auftreten. In beiden Varianten kommt es nicht zu der in der klassischen Bindung des BVs auftretenden Ausdehnung des  $\pi$ -Elektronensystems über die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C3<sup>1</sup> und C2 (siehe Absatz 1.3.1.3). Mutationstudien von Hontani et al., 2016 auf den ebenfalls blauverschobenen iRFP-Varianten iRFP670 und iRFP682 (Shcherbakova und Verkhusha, 2013) unterstützen diese Untersuchung. Die verlängerten Fluoreszenzlebenszeiten und die erhöhten Quantenausbeuten der Varianten mit einer zweiten Chromophorbindestelle werden durch Hontani et al., 2016 mit einer stärker eingegengten Thioetherbindung innerhalb der GAF-Domäne und somit einer stärker eingeschränkten Bewegung des A-Rings des BVs und einem kleineren  $\pi$ -Elektronensystem, aufgrund der fehlenden Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C3 und C3<sup>1</sup> oder C2 des BVs, begründet. Diese Studien zeigen, dass eine Erhöhung der Helligkeit Bakteriophytochrom-basierter FPs auch durch eine Einschränkung der Bewegungsgrade des A-Rings und nicht nur, wie oben erwähnt, des D-Rings des BVs möglich ist. Dies erhöht den Freiheitsgrad der Entwicklungsmöglichkeiten zukünftiger FPs. Der in manchen Fällen nachteilige Fakt der Blauverschiebung, muss allerdings beachtet werden.

Das von Rumyantsev et al., 2015 vorgestellte GAF-FP zeigt, dass aufgrund der Domänenstruktur der Phytochrome auch die Generierung einer sehr kleinen, fluoreszierenden, genetischen Sonde möglich ist. Mit 19.6 kDa ist das nur auf der GAF-Domäne des Phytochroms von *R. palustris* basierende Protein kleiner als

GFP-basierte genetische Sonden. GAF-FP weist bislang noch Nachteile bei der Spezifität der BV-Bindung auf. Ausserdem wurde noch nicht gezeigt, dass es sich für die Markierung zellulärer Strukturen eignet und es hat mit einem Emissionsmaximum von 670 nm blauverschobene Spektren.

Da in der vorliegenden Arbeit Proteine für die Nanoskopieverfahren STED und RESOLFT generiert und charakterisiert werden sollen ist die natürliche Photoisomerisierung der (Bakterio-) Phytochrome und damit natürliche Hell- und Dunkelzustände von Phytochromen von besonderem Interesse. Zu der Nutzung dieser für das Design von photoaktivierbaren oder sogar reversibel schaltbaren FPs gibt es bisher nur zwei zu nennende Publikationen. Piatkevich et al., 2013c entwickelten auf Basis des PCMs des *bathy*-Phytochroms von *Agrobacterium tumefaciens* die FPs PaiRFP 1 und 2. Hier wurde also nicht nur die CBD sondern das PCM als Ausgangspunkt gewählt. Die resultierenden Proteine lassen sich mithilfe von rotem oder tiefrotem Licht durch Photokonvertierung aus dem Pfr- in das Pr-Stadium aktivieren. Die Relaxation zurück in den Ausgangszustand dauert je nach Variante 1-4 Stunden. Diese Aktivierbarkeit wurde in der Fluoreszenzmikroskopie im tiefen Gewebe genutzt, da trotz starker Autofluoreszenz ein gutes Signal-zu-Rauschen Verhältnis erreicht wurde, indem jeweils Bilder vor und nach der Photoaktivierung aufgenommen und voneinander subtrahiert wurden. Das erste und bisher einzige, eingesetzte reversibel schaltbare Protein auf Basis eines Bakteriophytochroms ist nicht fluoreszierend und wurde in der photoakustischen Tomographie angewendet (Yao et al., 2016). Hier wurde das natürliche Schaltverhalten des Phytochroms von *R. palustris* genutzt. Die Untersuchungen von Yao et al., 2016 zeigen hierbei deutlich die Vorteile von Bakteriophytochromen für Verfahren, welche in Gewebe eindringen und das Potential der natürlichen Photomodulierbarkeit dieser Phytochrome. Diese Studie ist ein Hinweis, dass Bakteriophytochrome sich als Basis für das Design von RSFPs eignen. Es gibt bisher noch keine Arbeiten zu der Optimierung und Nutzung von RSFPs auf Basis von (Bakterio)- Phytochromen.

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist das FP WiPhy auf Basis der *D*-CBD (Auldridge et al., 2012). Hier wurde gezeigt, dass die monomerisierte Form der CBD teilweise noch die Photoisomerisierung zwischen dem Pr- und dem Pfr-Stadium durchläuft, obwohl hierfür normalerweise die Phy-Domäne nötig ist (siehe Absatz 1.3.1.5). Aufgrund der somit erhöhten Möglichkeit ein RSFP auf Basis der CBD und nicht des kompletten PCMs generieren zu können wurden die PAS-GAF-PHY-Domänen und verschiedene aus ihnen generierte Derivate (siehe Absatz 3.2) in der vorliegenden Arbeit als Grundlage für die Generierung eines tiefroten (RS)FPs gewählt.



## 2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es die Farbpalette der zur Verfügung stehenden (RS)FPs in den tiefroten beziehungsweise den nahen Infrarotlichtbereich zu verschieben. Als Basis für das Screening sollen Bakteriophytochrome verwendet werden und durch semirationale Mutagenese-strategien Mutanten mit verbesserten Eigenschaften für sowohl die STED- als auch die RESOLFT-Nanoskopie entwickelt werden. Vielversprechende Varianten sollen mit einem im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnden Screeningsystem beziehungsweise mikroskopischen Aufbauten identifiziert und charakterisiert werden. Schließlich sollen diese Proteine in der STED- und RESOLFT-Nanoskopie eingesetzt werden und somit der nahe Infrarotlichtbereich für diese Nanoskopiemethoden eröffnet werden.

## 3 Ergebnisse

Der vorliegende Ergebnisteil ist in vier Hauptabschnitte unterteilt. Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Entwicklung und der Zusammensetzung des neu etablierten, kombinierten Screeningablaufs in Säuger- und *E. coli*-Zellen zur Generierung und Verbesserung von Bakteriophytochrom-basierten (RS)FPs für die Nanoskopie (siehe Absatz 3.1). Anschließend werden die generierten Ausgangsproteine und die Auswahlkriterien vergleichend vorgestellt (siehe Absatz 3.2). Der Fokus des Ergebnisteils liegt dann auf der eigentlichen Generierung, Charakterisierung und Anwendung von NIR FPs (Abschnitt 3.3) und NIR RSFPs (Abschnitt 3.4).

### 3.1 Screening

Bei der Generierung von FPs auf Basis von Bakteriophytochromen muss beachtet werden, dass die molekulare Helligkeit als das Produkt aus der Quantenausbeute und dem Extinktionskoeffizienten sich aufgrund des externen Chromophors nicht als alleiniges Maß für die Helligkeit des FPs in Zellen (zelluläre Helligkeit) eignet (siehe Absatz 1.3.1.6). Daher müssen, insbesondere für das optimale Screening und die Generierung eines neuen Bakteriophytochrom-basierten FPs, die Expressionsbedingungen in späteren Untersuchungsorganismen oder -zellen beachtet werden.

Der Ausgangspunkt des zu entwickelnden Screeningsystems war das in Absatz 5.3.7.1 beschriebene Screening an dem gruppenintern gebauten, automatisierten Mikroskop. Die (RS)FPs werden hierbei in *E. coli*-Zellen exprimiert und anhand der Schaltcharakteristika und der zellulären Helligkeit in *E. coli*-Zellen analysiert und sortiert. Mit diesem innerhalb der Arbeitsgruppe entworfenen Aufbau und dem darauf basierenden Screening wurden bereits GFP-basierte RSFPs wie rsEGFP2 und Dreiklang entwickelt (Brakemann et al., 2011; Grotjohann et al., 2012). Der zugrundeliegende mikroskopische Aufbau musste im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die spektralen Eigenschaften der stark rot verschobenen Bakteriophytochrom-basierten FPs angepasst werden, um ein Screening nach verbesserten Varianten zu ermöglichen. Aufgrund der spektralen Eigenschaften der Ausgangsvarianten (siehe Absatz 3.2, Abbildung 3-3) wurde die Wellenlängen 671 nm und 785 nm für das Anregen und Aus- beziehungsweise Anschalten der zu generierenden NIR RSFPs ausgewählt und in das System integriert. Hiermit wurden die potentiellen Schaltwellenlängen möglichst weit auseinandergezogen, um einerseits ein Übersprechen der Wellenlängen zu minimieren und andererseits einen möglichst hohen Absorptionsquerschnitt zu erreichen. Für das Screening und die Charakterisierung der Schalteigenschaften wurden die Laser immer unter voller Leistung verwendet, was zu Laserintensitäten im Fokus zwischen ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup> (785 nm Laser) und ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup> (671 nm Laser) führte. Das Screening unter hohen Leistungen wurde gewählt, um die Bleichstabilität der Varianten unter hohen Leistungen in die Auswertung einbeziehen zu können. Aufgrund der schlechten Justierungsmöglichkeiten des automatisierten Mikroskops und der nicht vorhandenen Konfokalität, sind diese Intensitäten nur als Näherungen zu betrachten.

Die Laserpulsabfolge, welche auf jeder fluoreszierenden Kolonie durchgeführt wurde, musste bei jedem Screeningdurchlauf an die jeweilige Mutagenese und den Stand des Screenings angepasst werden. Ein solches Protokoll der Abfolge aus Laserpulsen bestand aus mehreren Wiederholungen einzelner Pulssequenzen. Jede Sequenz beinhaltete eine Abfolge aus Laserpulsen. Hierbei wurden zwischen den einzelnen Pulssequenzen variierende Anschaltzeiten aber zumeist konstante Ausschaltzeiten gewählt. Die Ausschaltzeit wurde anhand der jeweiligen Ausgangsvarianten der Mutagenese ausgewählt und angepasst. Ein Testen verschiedener Ausschaltzeiten während eines Screenings war nicht nötig, da eine Veränderung des erreichten Hintergrundwerts oder der Ausschaltkinetik auch bei konstanter Ausschaltdauer ablesbar war. Die Anschlagkinetik der Fluorophore konnte aufgrund des starken Einflusses des Anregungslasers auf den Zustand der Proteinpopulation jedoch nicht aufgenommen werden. Die Fluorophore wurden daher durch alleinige Bestrahlung mit dem 785 nm Laser angeschaltet. Veränderungen zwischen verschiedenen

Varianten wären bei gleichbleibender Bestrahlung mit dem 785 nm Laser in der Auswertung somit nicht zwingend ersichtlich und es wäre beispielsweise nicht ablesbar, ob die Population komplett angeschaltet wurde, oder ob nur ein Bruchteil der Anschließkinetik beendet wurde. Aus diesem Grund wurden für das Screening Pulssequenzen mit verschiedenen langen Pulsen des Anschaltlasers durchgeführt. Zusätzlich zu Sequenzen mit Pulsen des 671 nm Lasers und des 785 nm Lasers, wurden auch solche ohne den Anschaltlaser durchgeführt, um ein eventuelles thermisches Rückfallen der Fluorophore aus dem Aus-Zustand zu messen. Globale Wiederholungen der Sequenzabfolgen dienten dazu die Bleichstabilität in das Screening zu involvieren. Anfänglich wurden solche Pulssequenzen anhand der generierten Ausgangsvarianten W3 beziehungsweise W4 (siehe Absatz 3.2) etabliert. Im Lauf der Mutagenesen und der Screeningdurchläufe wurden sie an die jeweiligen generierten Varianten und Ausgangsvarianten für darauffolgende Mutagenesen angepasst.

Zusätzlich zu dieser Anpassung des Aufbaus und den benötigten an die Fluorophore angepassten Pulsabfolgen beruhte der Screeningablauf zu Beginn der vorliegenden Arbeit lediglich auf der Expression in *E. coli*-Zellen. Für die Anpassung an das Screening nach FPs mit externem Chromophor, musste die Chromophorzufuhr gewährleistet werden. Hierfür wurden, wie in Absatz 5.2.1.1 beschrieben, *E. coli*-Zellen verwendet, die neben dem gewünschten Protein zusätzlich induzierbar auch eine Hämoxxygenase exprimieren. Hämoglobinvorläufer wurden über das Medium zur Verfügung gestellt. Dieses System führt zu einer stark erhöhten, intrazellulären BV-Konzentration. Aufgrund der beiden verwendeten unterschiedlich induzierbaren Expressionssysteme und der Zugabe von Hämoglobinvorläufern variiert die Menge des produzierten BVs stark je nach Expressionslevel und Zeitpunkt der Messung, was zu einer erschwerten Kontrolle der Messungen führt. Für ein reines Screening nach Schalteigenschaften würden diese Schwankungen die Ergebnisse eventuell nicht zu stark beeinflussen, da hier vor Allem die relativen Veränderungen des Schaltens ausgewertet werden. Für ein Screening, das primär die Helligkeit der Varianten berücksichtigen soll, ist diese erhöhte Variabilität ein Nachteil. Aufgrund dieser und der beschriebenen, die zelluläre Helligkeit von FPs bestimmenden Faktoren, ist ein Screening in Säugerzellen für Bakteriophytochrom-basierte (RS)FPs unerlässlich. Diese Erweiterung auf ein kombiniertes Screening aus dem bewährten System in *E. coli*-Zellen und einem neu entwickelten System in Säugerzellen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Ein vereinfachtes Schema des bestehenden Screenings in *E. coli*-Zellen ist im unteren Teil der Abbildung 3-1 dargestellt. Vor der Herstellung von Plasmidbibliotheken wurde jeweils eine Mutagenese-strategie entworfen. Diese setzte sich in den meisten Fällen aus einer Kombination zufälliger und (semi)gezielter, PCR-basierter Mutagenese-strategien zusammen (siehe Absatz 3.3.1 und Absatz 3.4.1). Um eine rationale (gezielte) Mutagenese-strategie zu entwerfen, dienten bereits publizierte Strukturdaten und Literaturwerte zu dem Ausgangsprotein oder anverwandten Proteinen als Auswahlkriterium. Zumeist wurden solche Positionen in der direkten oder indirekten Chromophorumgebung ausgewählt, welche einen möglichen Einfluss auf die Helligkeits-, Maturations- und/oder Schalteigenschaften des Proteins haben könnten. Die zufälligen Mutagenesen dienten zur Aufdeckung neuer Positionen mit Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins. Nach dem Aufdecken einer neuen Position, wurde diese in darauffolgenden Durchläufen häufig durch Sättigungsmutagenesen adressiert, um den Einfluss verschiedener Aminosäuren an dieser Position zu evaluieren. Nach der Erstellung einer Plasmidbibliothek wurde diese in *E. coli*-Zellen transformiert und am automatisierten Mikroskop charakterisiert. Auf diese Screeningrunde folgten die Auswahl und gegebenenfalls genauere Charakterisierung interessanter Varianten sowie die Auswahl neuer Ausgangsvarianten für darauffolgende Mutagenesen und Screeningrunden.

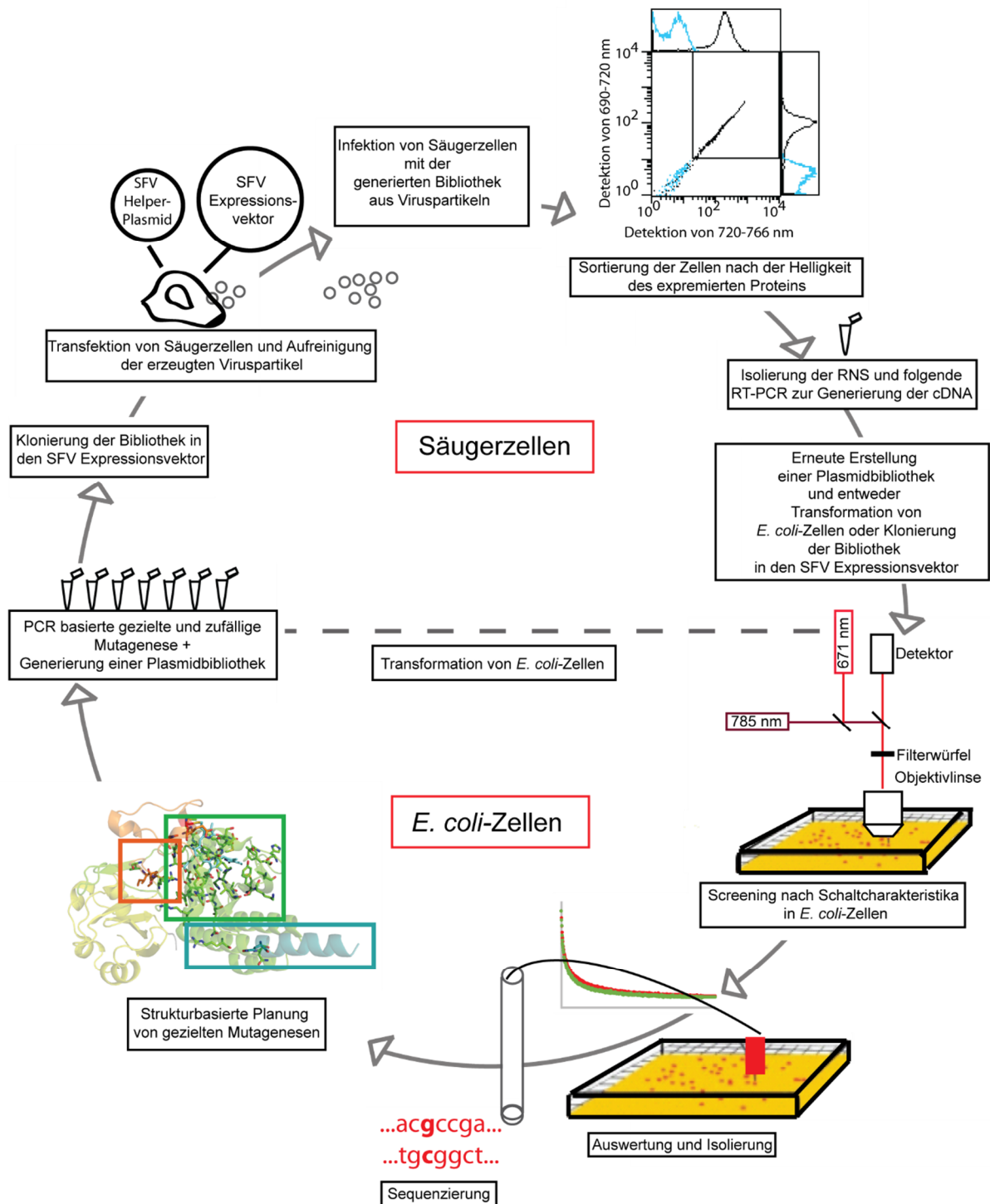


Abbildung 3-1: Übersichtsschema zum kombinierten Screening in *E. coli*-Zellen und Säugerzellen.

Für das neu entwickelte Screening in Säugerzellen, das im oberen Teil der Abbildung 3-1 dargestellt ist, wurde das Expressionssystem des Semliki-Forest-Virus<sup>1</sup> (SFV, siehe Absatz 5.2.5) verwendet. Mit einem einfachen System, das auf Plasmidtransfektionen beruht, wäre es nicht möglich gewesen die Anzahl der exprimierten Proteinvarianten pro Zelle so einzuschränken. Die Schwankungen, welche auf das Expressionslevel zurückzuführen sind, können auch in dem viralen System nicht vermieden werden. Diese sind aufgrund der großen Stichprobenmenge, welche durch die Sortierung am FACS ermöglicht wird, jedoch zu vernachlässigen. Für einen Wechsel von dem *E. coli*-System in das Säugerzellen-System, wurde demnach die generierte Plasmidbibliothek in den Expressionsvektor des SFV-Systems kloniert. Nach der

Herstellung der Virenpartikel (siehe Absatz 5.2.5), was in diesem Teil des Screenings mit vier bis fünf Tagen der zeitaufwändigste Schritt ist, wurden Säugerzellen mit der generierten Bibliothek aus Virenpartikeln infiziert. Nach 24 Stunden wurden die infizierten Zellen dann am FACS-System nach ihrer zellulären Helligkeit in Säugerzellen sortiert. Bei dem Screening nach NIR-RSFPs mit verbesserten Eigenschaften (siehe Absatz 3.4), werden die Varianten hierbei nur in ihrem Grundzustand sortiert, da sie vor der Sortierung nicht angeschaltet werden können. Somit werden solche Varianten bevorzugt, welche sich im Grundzustand im An-Zustand befinden und, unabhängig davon wie hell sie im An-Zustand sind, solche benachteiligt, welche im Grundzustand im Aus-Zustand sind. Direkt nach der Sortierung wurde aus den ausgewählten Zellen die RNS isoliert und über eine RT-PCR in cDNA umgeschrieben (siehe Absatz 5.1.2 und Absatz 5.1.10). Je nach Stand des Screenings wurde nach diesem Punkt des Ablaufs entschieden, ob eine erneute Runde in Säugerzellen durchgeführt werden sollte oder der Wechsel in das *E. coli*-System erfolgen sollte. Dementsprechend musste hierfür entweder eine Plasmidbibliothek für das virale oder das bakterielle Expressionssystem erstellt werden. Das Screening in *E. coli*-Zellen hat hierbei klar den Vorteil der einfachen und vor allem schnellen Handhabung im Labor. Hier kann ein Durchlauf in fünf Tagen durchgeführt werden. Bei dem Screening in Säugerzellen hingegen benötigt allein die Herstellung der Virenpartikel mindestens fünf Tage, was zu einer Gesamtdauer dieses Teils des Screenings von mindestens zehn Tagen führt.

Mithilfe dieses Screenings konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene verbesserte NIR FP- und RSFP-Varianten generiert werden (siehe Absatz 3.3 und 3.4). Alle in den Absätzen 3.2, 3.4.2 und 3.4.3 gezeigten Ergebnisse bezüglich der Schaltcharakteristika der generierten Ausgangs- beziehungsweise RSFP-Variante wurden an dem in Absatz 5.3.7.1 beschriebenen nicht konfokalen Screening-Aufbau aufgenommen. Erst die in Absatz 3.4.5 vorgestellten Ergebnisse beschäftigen sich mit der Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen an dem eigens dafür gruppenintern entworfenen und gebauten Charakterisierungsaufbau (siehe Absatz 5.4.3).

## 3.2 Entwicklung und Vergleich verschiedener Ausgangsvarianten

Als Grundlage der in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesen wurde das Bakteriophytochrom aus *D. radiodurans* gewählt, dessen PAS-GAF-Domänen auch die Vorlage für die publizierten, nicht schaltenden FPs WiPhy, WiPhy2, IFP1.4 und IFP2.0 sind (Auldrige et al., 2012; Lehtivuori et al., 2015; Shu et al., 2009a; Yu et al., 2014). Die PAS-GAF-PHY-Domänen dieses Bakteriophytochroms wurden mit auf *H. sapiens* optimierter Codon-Nutzung synthetisiert (MWG-Biotech AG, BY, DE). Die ursprüngliche Sequenz stammt von der KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>) und diente als Vorlage für die verschiedenen generierten Derivate (W1-W4).

Das verwendete Bakteriophytochrom von *D. radiodurans* gehört zu den konventionellen Phytochromen, welche im Grundzustand im fluoreszierenden Pr-Stadium vorliegen und sich durch Anregung dieses Stadiums in das rotverschobene, nicht fluoreszierende Pfr-Stadium schalten lassen (Auldrige et al., 2012; Shcherbakova et al., 2015b). NIR RSFPs mit einem solchen Schaltverhalten, bei dem die Anregungswellenlänge auch das Schalten des Proteins in den nicht fluoreszierenden Zustand auslöst, werden im Rahmen dieser Arbeit analog zu den GFP-basierten RSFPs (siehe Absatz 1.2.4) als Negativschalter bezeichnet. Einhergehend mit dieser Nomenklatur wird das Pr-Stadium, als das Stadium aus welchem Fluoreszenz angeregt werden kann, als An-Zustand und das Pfr-Stadium als Aus-Zustand definiert.

Die Varianten W1-W4 wurden erstellt, um den Einfluss der PHY-Domäne und der Länge carboxyterminaler Überhänge auf die Schalt- und Helligkeitscharakteristika zu untersuchen und die beste Variante als Ausgangspunkt für die durchgeführten Mutagenesen auszuwählen. Keine der generierten Ausgangsvarianten entspricht carboxyterminal exakt dem Bereich, welcher für die publizierten Varianten WiPhy und WiPhy2 verwendet wurde. Bei den publizierten Varianten sind carboxyterminal die drei Aminosäuren A-L-E vorhanden. Diese sind bei W4 entfernt und bei W3 durch zehn alternative Aminosäuren ersetzt. In Abbildung 3-2 ist die Aminosäuresequenz der *D<sub>r</sub>*PAS-GAF-PHY und des publizierten NIR FPs WiPhy (Auldridge et al., 2012) im Vergleich zu den generierten Varianten W1-W4 abgebildet. Sequentiell unterscheiden sich die Varianten W1-W4 von der Ursprungsvariante nur in den rot markierten Positionen 145, 311 und 314. Hier wurden bei W1-W4 die von Auldridge et al., 2012 publizierten Monomerisierungsmutationen eingefügt (F145S/L311E/L314E). Weitere Unterschiede sind nur bezüglich der Vollständigkeit der Sequenz vorhanden. W1 und W2 bestehen aus allen drei Domänen. W2 ist hierbei um 19 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes hinter der PHY-Domäne kürzer als W1. W3 und W4 bestehen nur aus der CBD (PAS-GAF-Domäne) mit kurzen Derivaten der PHY-Domäne. Hierbei weist Variante W4 einen um zehn Aminosäuren kürzeres carboxyterminales Ende hinter der GAF-Domäne auf.

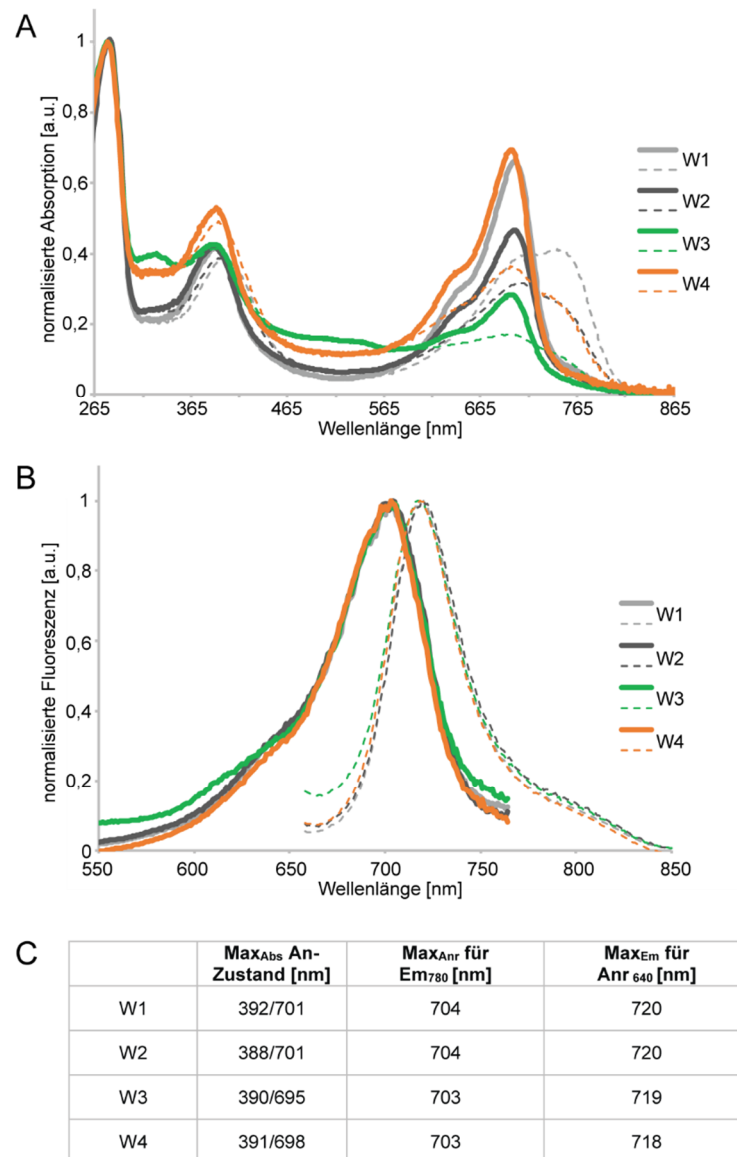
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL
<b>WiPhy</b>	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL
<b>W1</b>	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL
<b>W2</b>	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL
<b>W3</b>	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL
<b>W4</b>	MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAG
<b>WiPhy</b>	NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAG
<b>W1</b>	NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAG
<b>W2</b>	NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAG
<b>W3</b>	NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAG
<b>W4</b>	NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAG
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	HLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMFALESAPNLRALAEVATQTV
<b>WiPhy</b>	HLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMFALESAPNLRALAEVATQTV
<b>W1</b>	HLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMSALESAPNLRALAEVATQTV
<b>W2</b>	HLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMSALESAPNLRALAEVATQTV
<b>W3</b>	HLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMSALESAPNLRALAEVATQTV
<b>W4</b>	HLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMSALESAPNLRALAEVATQTV
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	RELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRH
<b>WiPhy</b>	RELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASHIPAQARALYTRH
<b>W1</b>	RELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRH
<b>W2</b>	RELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRH
<b>W3</b>	RELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRH
<b>W4</b>	RELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRH
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	LLRLTADTRAAAVPLDPVLPNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLL
<b>WiPhy</b>	LLRLTADTRAAAVPLDPVLPNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLL
<b>W1</b>	LLRLTADTRAAAVPLDPVLPNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLL
<b>W2</b>	LLRLTADTRAAAVPLDPVLPNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLL
<b>W3</b>	LLRLTADTRAAAVPLDPVLPNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLL
<b>W4</b>	LLRLTADTRAAAVPLDPVLPNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLL
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	SVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAAFR
<b>WiPhy</b>	SVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLLSLQVQVKEALE
<b>W1</b>	SVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLESEQVQVKEAADVAAFR
<b>W2</b>	SVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLESEQVQVKEAADVAAFR
<b>W3</b>	SVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLESEQVQVKEAADVAAFR
<b>W4</b>	SVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLESEQVQVKE
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	QSLREHHARVALAAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGRWQTLGEV
<b>W1</b>	QSLREHHARVALAAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGRWQTLGEV
<b>W2</b>	QSLREHHARVALAAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGRWQTLGEV
<b>W3</b>	QS
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	PPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWS
<b>W1</b>	PPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWS
<b>W2</b>	PPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWS
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	ECLVWLRPELELRLEVAWGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEPWHPG
<b>W1</b>	ECLVWLRPELELRLEVAWGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEPWHPG
<b>W2</b>	ECLVWLRPELELRLEVAWGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEPWHPG
<b>Dr PAS-GAF-PHY</b>	EIEEAQDLRDTLTGALGE
<b>W1</b>	EIEEAQDLRDTLTGALGERLSVIRDNLNRAQTQSNAEWRQYGFV
<b>W2</b>	EIEEAQDLRDTLTGALGERLSVIR

Abbildung 3-2: Sequenzvergleich der erstellten Ausgangsvarianten mit dem PCM von *D. radiodurans*.

Gelb steht für die PAS-Domäne, grün für die GAF-Domäne und türkis für die PHY-Domäne. Die Positionen, welche zwischen der DrPAS-GAF-PHY, WiPhy und den Varianten W1-W4 variieren, sind rot markiert.

Um die Auswahl der am besten geeigneten Ausgangsvariante für die Generierung eines NIR FPs beziehungsweise RSFPs treffen zu können, wurden die spektralen Eigenschaften der Varianten an

aufgereinigtem Protein gemessen (Abbildung 3-3) und die Schalteigenschaften sowie die Helligkeit in *E. coli*-Zellen bestimmt (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-3: Spektren der auf der Basis der PAS-GAF-PHY-Domänen des Phytochroms von *D. radiodurans* generierten NIR Ausgangs-Varianten.**

A: Normalisierte Absorptionsspektren der generierten Ausgangsvarianten. Die durchgezogenen Linien zeigen die Spektren nach achtminütiger Bestrahlung der Küvette mit 769/41 nm und repräsentieren die Spektren des An-Zustands. Die gestrichelten Linien zeigen die Spektren nach achtminütiger Bestrahlung der Küvette mit 661/20 nm und repräsentieren die Spektren des Aus-Zustands. B: Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren im Pr-Stadium. Das Anregungsspektrum wurde für die Emission bei 780 nm und das Emissionsspektrum für die Anregung bei 640 nm aufgezeichnet. C: Zusammenfassung der Absorptions- Anregungs- und Emissionsmaxima der generierten Ausgangsvarianten im An-Zustand.

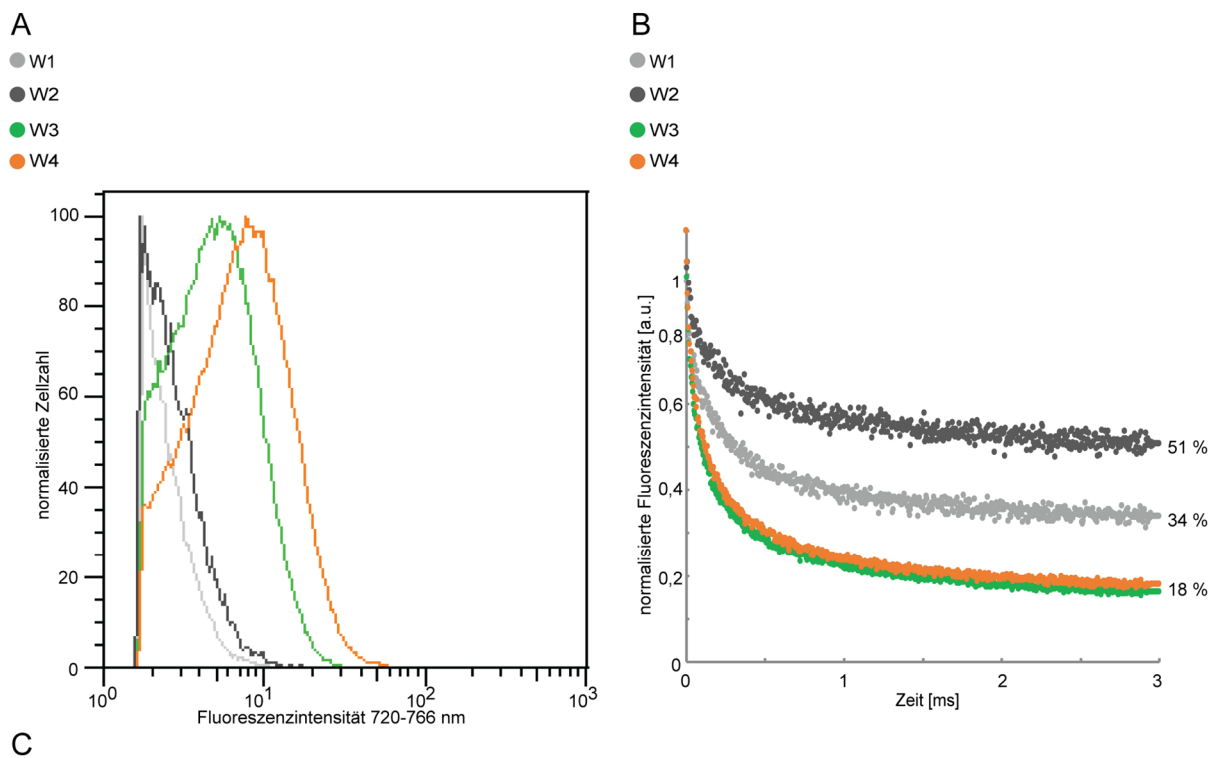
Die Absorptionsspektren wurden wie in Absatz 5.3.3 beschrieben an einem Cary 4000 UV-VIS Spektrometer aufgenommen und die Fluoreszenz- und Anregungsspektren wie in Absatz 5.3.4 beschrieben an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Alle Spektren wurden bei einem pH-Wert von 7,5 gemessen.

Die gemessenen Spektren zeigen eine ähnliche Form sowie nicht stark voneinander abweichende Maxima. Die Absorptionsspektren im fluoreszierenden An-Zustand weisen alle ein kurzwelliges Maximum bei 388-392 nm und ein langwelliges Maximum bei 695-701 nm auf. Die Anregung des langwelligeren Maximums führt zu Fluoreszenz im Bereich von 720 nm (siehe Abbildung 3-3, B/C). Im nicht fluoreszierenden Aus-Zustand ist die rote Absorptionsbande bei 695-701 nm reduziert und die Absorption im rot verschobenen Bereich bei 750-760 nm verstärkt. Unter den gegebenen Umständen des Schaltens der Proteinlösung in der Küvette (siehe Absatz 5.3.3), kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die jeweilige Proteinlösung



vollständig geschaltet werden kann (oder komplett schaltbar ist). Demzufolge sind die zu sehenden Spektren immer als Gemisch aus dem An- und dem Aus-Zustand zu interpretieren. Alle generierten Ausgangsvarianten weisen die für Bakteriophytochrom-basierte FPs charakteristische Absorption und Emission im NIR-Bereich des Lichts auf. Somit liegen sie spektral in einem für GFP-basierte (RS)FPs nicht erreichbaren Bereich (siehe Absatz 1.2.3 und Absatz 1.2.5).

Die zelluläre Helligkeit der Ausgangsvarianten im Grundzustand wurde in *E. coli*-Zellen bei gleichzeitiger Expression der Hämoxxygenase mithilfe des FACS-Geräts bei Anregung mit 671 nm und Detektion im NIR-Bereich des Lichts zwischen 720 nm und 766 nm bestimmt. Dabei zeigten sich stark unterschiedliche zelluläre Helligkeiten im Grundzustand der vier Ausgangsvarianten (Abbildung 3-4, A/C). Relativ zum vollständigen PCM (W1) war die Variante W2 etwas dunkler, die verkürzten Varianten (W3 und W4) jedoch um das 2,5- bis 3,5-Fache heller.



WiPhy-Variante	Domänen	Schalt-hintergrund [%]	$t_{1/2 \text{ AUS}}$ [ $\mu\text{s}$ ]	Helligkeit gemessen in <i>E. coli</i> -Zellen Det. 720-766 nm [% W1]
W1	PAS-GAF-PHY 530 AS	26	108	100 $\pm$ 9
W2	PAS-GAF-PHY -19 AS C-terminal 511 AS	51	138	68 $\pm$ 28
W3	PAS-GAF 331 AS	17	71	260 $\pm$ 10
W4	PAS-GAF -10 AS C-terminal 321 AS	19	80	355 $\pm$ 18

**Abbildung 3-4: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Vorlagevarianten W1-W4.**

A: Helligkeitsverteilung der Varianten gemessen in *E. coli*-Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Detektionsfenster von 720-766 nm, siehe Absatz 5.3.7.2). B: Ausschaltkurven der Varianten W1-W4. Diese wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattierten, das jeweiligen RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Zu sehen sind die Ausschaltkinetiken, welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) für 3 ms aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Die Kinetiken wurden auf das Maximum normiert. Jeder Messpunkt basiert auf mindestens sieben unabhängigen Messungen. C: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten W1-W4. Der Schalthintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik ( $t_{1/2 \text{ AUS}}$ ) wurden anhand der in B dargestellten Kinetiken, wie in Absatz 5.3.7.5 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

Auch bei den Schalteigenschaften zeigten sich große Unterschiede zwischen den generierten Ausgangsvarianten W1-W4. Ebenso wie bei der Helligkeit macht das Fehlen der PHY-Domäne in den Varianten W3 und W4 den entscheidenden Unterschied und verbessert den Schalthintergrund und die Schaltgeschwindigkeit (siehe Abbildung 3-4, C). Die Varianten W1 und W2 besitzen einen Schalthintergrund von 34 % beziehungsweise 54 % des Maximalsignals. Die Varianten W3 und W4 liegen jedoch beide bei einem Schalthintergrund von 17-18 % des Maximalsignals. Der Schalthintergrund und die Schaltgeschwindigkeit wurde hierbei wie in Absatz 5.3.7.3 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben bestimmt. Nach dem Anschalten der Proteinpopulation im Fokus mit 785 nm (30 ms, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>) wurde die Proteinpopulation durch Bestrahlung mit 671 nm (etwa 60 kW/cm<sup>2</sup>) ausgeschaltet. Hierfür wurde eine Zeitspanne von 3 ms ausgewählt, da sich nach 3 ms eine Sättigung der Kinetik einstellt. Dieses Messschema wurde für alle am automatisierten Mikroskop durchgeführten in diesem Ergebnisteil gezeigten Schaltkinetiken verwendet, um die gezeigten Varianten (siehe Absatz 3.4.2 und Absatz 3.4.3) vergleichen zu können. Während des Screenings (siehe Absatz 3.1 und Absatz 5.3.7.1) wurden die Messschemata hingegen den jeweiligen Anforderungen angepasst.

Aufgrund der oben beschriebenen verbesserten zellulären Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen beziehungsweise der verbesserten Schalteigenschaften und des kleineren Molekulargewichts, wurden die Varianten W3 und W4 als Grundlage für die Generierung eines NIR RSFPs beziehungsweise FP's gewählt.

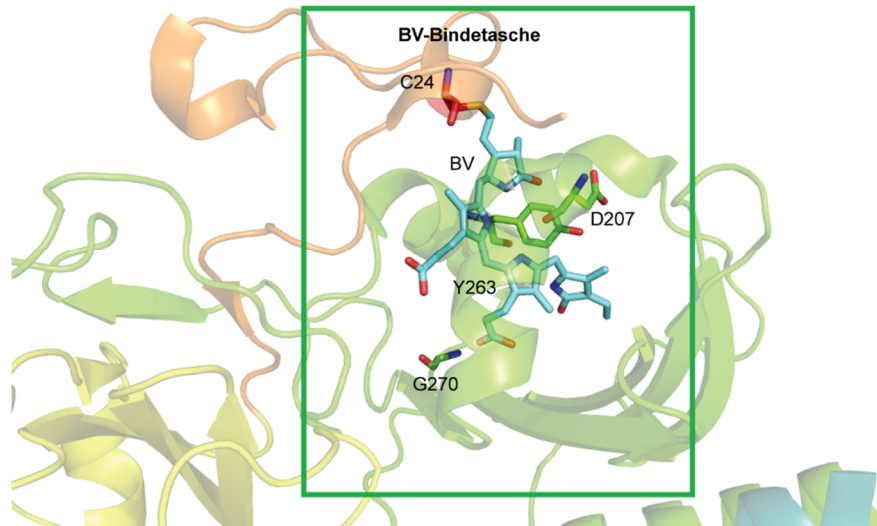
### 3.3 Entwicklung eines FP's auf Basis von Wi-Phy

Wie in Absatz 3.2 beschrieben ist W4 mit 2,9-3,6-mal erhöhter zellulärer Helligkeit in *E. coli*-Zellen gegenüber W1 die hellste Variante. Sie zeigt einen schlechteren Schalthintergrund als W3, der aber bei der Generierung eines FP's von Vorteil ist. Aus diesen Gründen diente die Variante W4 als Vorlage zur Entwicklung eines NIR-FP's.

#### 3.3.1 Mutagenesestrategie

Für die Generierung eines neuen NIR-FP's auf Basis der Vorlagevariante W4 wurden sowohl zufällige als auch gezielte Mutagenesen durchgeführt. Letztere konzentrierten sich nur auf die Bindetasche des Chromophors, mit dem Ziel, die Affinität für die Chromophorbindung zu erhöhen und die Inkorporation desselbigen zu stabilisieren. Abbildung 3-5 zeigt die gezielt adressierten Reste in der Chromophorbindetasche. Hierbei wurden sowohl Positionen ausgewählt, für die bereits ein Einfluss auf die Helligkeit der FP's und/oder die Fähigkeit zur Photoisomerisierung bekannt ist (beispielsweise Position 207 und Position 263, siehe Absatz 1.3.1.5, Auldridge et al., 2012; Lehtivuori et al., 2015; Shu et al., 2009a; Wagner et al., 2008) als auch solche, die bisher nicht näher beschrieben sind. Diese wurden auf Basis der von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen des PCMs des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans* ausgewählt. Hierbei wurden mit den Positionen 206, 208, 209 und 286 neben den bereits bekannten Positionen 207 und 263 weitere Positionen in der Nähe des D-Rings des Chromophors ausgewählt. Diese wurden gezielt ausgewählt, um die natürliche Photoisomerisierung des Phytochroms durch eine bessere Fixierung des D-Rings zu unterbinden. Die Positionen 259 und 25 wurden aufgrund ihrer Nähe zu der Chromophorbindestelle und die Positionen 212, 216, 222, 223, 224, 254, 256, 260, 270 und 274 aufgrund ihrer zentralen Position in der Bindetasche und/oder in der direkten Nähe eines der Pyrrol-Ringe des Chromophors adressiert. Manche der genannten Positionen gehören zu hochkonservierten Positionen oder Motiven innerhalb der Proteinklasse der (Bakterio)Phytochrome (siehe Absatz 1.3.1.4 und Absatz 1.3.1.5).





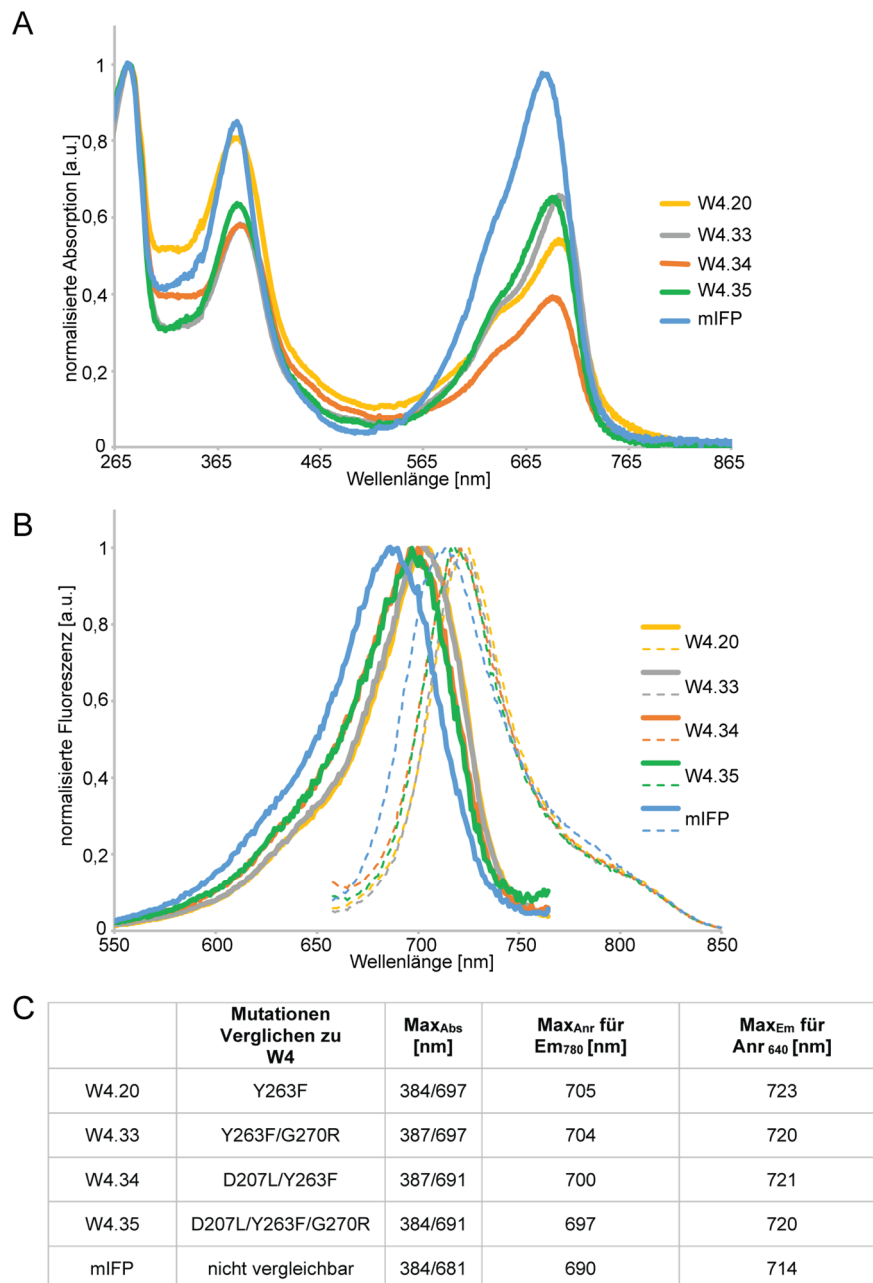
**Abbildung 3-6** Lage der Positionen 263, 207 und 270 relativ zum Chromophor des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans*. Die Farbcodierung ist wie folgt: orange aminoterminaler Extension, gelb PAS-Domäne, grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Die Chromophorbindestelle (C24) ist in roten und das Chromophor (BV) in türkisen Stäbchen zu sehen. Die Aminosäuren D207, Y263 und G270 sind in Stäbchen (farblich passend zur Domäne) dargestellt. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen des Pr-Stadiums verwendet (pdb 4O0P).

Die Variante W4.34 entspricht in ihren Mutationen (Y263F/D207L) dem publizierten WiPhy2. Das carboxyterminale Ende von W4 stimmt jedoch nicht komplett mit dem Teil der *Dr*CBD überein, der im Fall der publizierten Proteine IFP1.4, IFP2.0, WiPhy und WiPhy2 (Auldridge et al., 2012; Lehtivuori et al., 2015; Shu et al., 2009a; Yu et al., 2014) als Vorlage verwendet wurde (siehe Abbildung 3-2). Somit können hier streng genommen nur die Auswirkungen der Mutationen miteinander verglichen werden. Der Unterschied zwischen W4 und der Vorlage für WiPhy beträgt allerdings nur drei carboxyterminale Aminosäuren.

Um die Auswirkungen der eingefügten Mutationen auf die spektralen Eigenschaften des Proteins zu evaluieren, wurden die Spektren der aufgereinigten Proteine aufgenommen. Zusätzlich wurden die auf W4-basierenden Varianten mit dem publizierten mIFP verglichen (Yu et al., 2015), um die bestimmten Charakteristika der generierten Varianten mit den bereits publizierten Varianten vergleichen zu können. mIFP ist das erste monomere Bakteriophytochrom-basierte FP, dessen Anwendung bereits sowohl in Säugerzellen als auch in *Drosophila* als Volumenfärbung gezeigt wurde.

### 3.3.2.1 Spektrale Charakterisierung der generierten Varianten

Wie in Abbildung 3-7 zu sehen ist, unterscheiden sich die Absorptions- (A) beziehungsweise Anregungs- und Emissionsspektren (B) der auf W4-basierenden Varianten untereinander kaum und sind leicht rotverschoben bezogen zu dem als Referenz gewählten NIR FP mIFP. Die Substitution G270R hat somit keinen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften, also das  $\pi$ -Elektronensystem. Alle Varianten weisen entsprechend den charakteristischen spektralen Eigenschaften von Bakteriophytochromen zwei Absorptionsbanden auf (Piatkevich et al., 2013b). Die kurzwellige Bande (Soret-Bande) liegt zwischen 384 nm und 387 nm und die langwellige Bande (Q-Bande) bei 691-697 nm. Es ist keine zusätzliche Absorptionsbande bei 750 nm zu sehen, was für eine Blockung der Photoisomerisierung im Pr-Stadium spricht. Die Varianten, welche die Mutation D207L in sich tragen (W4.34 und W4.35), weisen eine leichte Blauverschiebung der Q-Bande um sechs Nanometer auf. Bei allen Varianten wird durch Anregung der Q-Bande tiefrote Fluoreszenz bei 720 nm–723 nm ausgelöst. Alle generierten Varianten liegen somit mit ihrer Absorption und Emission im bevorzugten spektralen Bereich des NIR-Lichts.



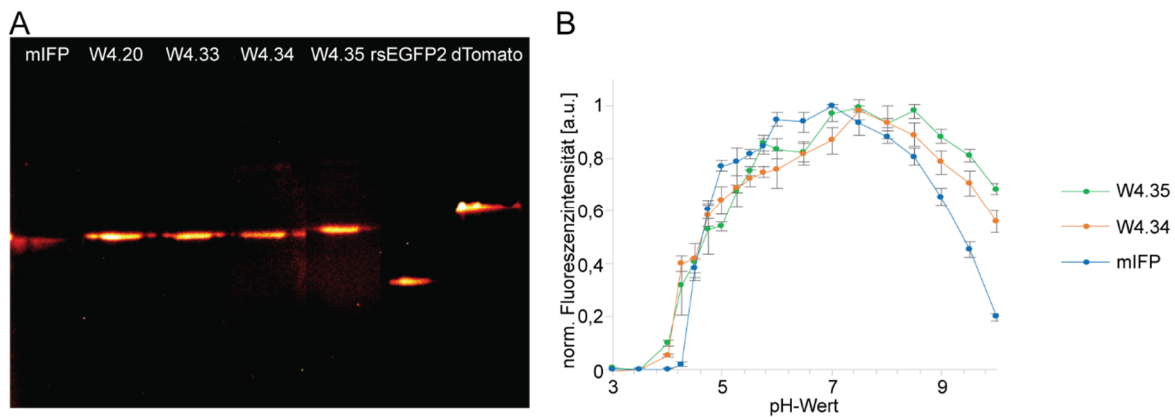
**Abbildung 3-7: Spektren der generierten NIR FPs im Vergleich zu mIFP.**

A: Normalisierte Absorptionsspektren und B: Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren. Das Emissionsspektrum wurde für die Anregung bei 640 nm und das Anregungsspektrum für die Emission bei 780 nm aufgezeichnet. Die Absorptionsspektren wurden wie in Absatz 5.3.3 beschrieben an einem Cary 4000 UV-VIS Spektrometer und die Fluoreszenz- und Anregungsspektren wie in Absatz 5.3.4 beschrieben an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Alle Spektren wurden bei einem pH-Wert von 7,5 gemessen.

### 3.3.2.2 Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten Varianten

Für die erfolgreiche Anwendung als amino- und carboxyterminales Fusionsprotein ist der Oligomerisierungsgrad des FPs ein wichtiges Kriterium. Bakteriophytochrome kommen natürlicherweise als Dimer vor (Shcherbakova et al., 2015b). In die Ausgangsvarianten W1-W4 wurden, wie vorab erwähnt (siehe Absatz 3.2), die von Aldridge et al., 2012 publizierten Monomerisierungsmutationen eingefügt. Um den Oligomerisierungsgrad der generierten Varianten zu überprüfen, wurde eine semi-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt (siehe Absatz 5.3.2). Bei monomerem Verhalten ist bei den generierten NIR FPs eine Größe zwischen den gewählten Größenstandards rEGFP2 und dTomato zu erwarten. Wie auf dem Gel zu sehen ist (siehe Abbildung 3-8, A), verhielten sich die getesteten Varianten

unter den gegebenen Umständen monomer. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Oligomerisierungsgrad der FPs unter abweichenden Bedingungen variieren kann. Beeinflussende Faktoren können hierbei beispielsweise die Proteinkonzentration, die Salzkonzentration oder der pH-Wert sein.



**Abbildung 3-8: Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten NIR FPs.**

A: Semi-native PAGE. Als Größenstandards wurden rsEGFP2 (Monomer Größe ungefähr 29 kDa) und dTomato (Dimer Größe ungefähr 58 kDa) aufgetragen. NIR Fluoreszenz wurde durch Bestrahlung mit 655/40 nm angeregt und bei 740/40 nm detektiert. Grüne Fluoreszenz (rsEGFP2) wurde durch Bestrahlung mit 470/10 nm angeregt und bei 525/60 nm detektiert und rote Fluoreszenz (dTomato) wurde durch Bestrahlung mit 545/20 nm angeregt und bei 617/37 nm detektiert. Die Bilder wurden übereinandergelegt und sind einheitlich in Falschfarben (firescale) dargestellt. B: Die normalisierte Fluoreszenzintensität ist gegen den pH-Wert der Lösung aufgetragen. Die Messungen wurden an einem Platerreader des Modells Cytation 3 der Firma BioTek (BW, DE), wie in Absatz 5.3.5 beschrieben, durchgeführt. Jedem Messpunkt liegen fünf Messungen zugrunde. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Der pH-Wert ist eine Bedingung, welche zwischen verschiedenen Zellkompartimenten stark variiert. Die Verwendbarkeit eines FPs in lebenden Zellen wird durch seine pH-Stabilität beeinflusst. In *E. coli*-Zellen liegt der zytoplasmatische pH-Wert zwischen 7,2 und 7,8 (Wilks und Slonczewski, 2007). In Säugerzellen ist er im Zytosol ebenso bei 7,2, kann aber in den verschiedenen Kompartimenten zwischen 4,7 in den Lysosomen und 6 - 6,7 im Golgi-Apparat bis hin zu 8 in den Mitochondrien variieren (Demaurex, 2002; Llopis et al., 1998). Zur Bestimmung der pH-Stabilität der generierten Varianten, wurde die Fluoreszenzintensität einer Lösung von aufgereinigtem Protein abhängig von dem pH-Wert des Puffers bestimmt (siehe Absatz 5.3.5). Diese Messung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeiten für die generierten Varianten W4.34 und W4.35 im Vergleich zu mIFP durchgeführt (siehe Abbildung 3-8, B). Es ist zu sehen, dass das Fluoreszenzsignal zwischen pH 4 und pH 5 rapide ansteigt. Die Hälfte des maximalen Fluoreszenzsignals wird bei pH-Werten zwischen 4,5 und 4,75 erreicht. Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei mIFP bei einem pH-Wert von 7 und bei W4.34 und W4.35 bei einem pH-Wert von 7,5. Bei W4.35 bleibt dieses bis zu einem pH-Wert von 8,5 konstant. Sowohl bei mIFP als auch bei W4.34 nimmt die Fluoreszenzintensität direkt nach dem Erreichen des Maximums ab. Dies führt dazu, dass bei einem pH-Wert von 8,5 im Fall von mIFP noch  $80\% \pm 3\%$  Restfluoreszenz und bei W4.34 noch  $89\% \pm 4\%$  Restfluoreszenz vorhanden sind. Im Bereich von zellulären pH-Werten ist die Variante W4.35 demnach am stabilsten. Insbesondere aufgrund der nicht mit den Literaturwerten vergleichbaren Ergebnisse der pH-Stabilität der Variante mIFP (Yu et al., 2015), sollten diese Werte nur vergleichend und nicht absolut betrachtet werden.



### 3.3.2.3 Fluoreszenzlebenszeit und Helligkeitseigenschaften der generierten Varianten

Die Fluoreszenzlebenszeit gibt den Mittelwert der Zeit an, die ein Molekül im angeregten Zustand bleibt, bevor es ein Photon abgibt und somit in den Grundzustand zurückfällt. Diese Zeit ist insbesondere für die STED-Nanoskopie ein wichtiger Parameter, da die Pulse des STED-Lasers auf diese Zeit angepasst werden müssen. Die Moleküle im Volumen des STED-Doughnuts müssen nach Anregung mit dem Anregungslaser, aber vor Abgabe eines Photons, also innerhalb der Fluoreszenzlebenszeit, in den S0-Zustand zurück gepumpt werden.

	Mut. bezogen auf W3	$\phi$ [%]		$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\tau$ [ps]	Fluoreszenz bei pH 8.5 [%]	Helligkeit in Säugerzellen Det. 720-760 nm
		absolute Messung	relative Messung				
W4		n. b.	n.b.	n.b.	n. b.	n.b.	n.b
W4.20	Y263F	n. b.	2,7 ± 0,2	47351 ± 1103	n. b.	n.b.	100
W4.33	Y263F G270R	n. b.	2,5 ± 0,3	53893 ± 3585	597 ± 4	n.b	[% W4.20] 156 ± 9
W4.34	Y263F D207L	2,9 ± 0,1	1,9 ± 0,5	73600 ± 3387	627 ± 9	89 ± 4	100
W4.35	Y263F D207L G270R	2,2 ± 0,1	3 ± 0,3	138601 ± 8018	631 ± 11	98 ± 3	[% W4.34] 115 ± 5
mIFP		4 ± 0,9	8	55000	623 ± 7	80 ± 3	n.b

**Tabelle 3-1: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten.**

Die in rot markierten Werte wurden als Referenz aus der Publikation von Yu et al., 2014 entnommen. Alle anderen Werte wurden vergleichend für die dargestellten Varianten gemessen. Die Quantenausbeute ( $\phi$ ) und der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) wurden, wie in Absatz 5.3.6 beschrieben, bei pH 7,5 bestimmt. Die relative Messung wurde zweimal in unterschiedlichen Proteinaufreinigungen wiederholt, die Fehler stellen die Standardabweichungen dar. Die absolute Messung der Quantenausbeute wurde an einer Proteinaufreinigung gemessen. Die Messung wurde zehnmal wiederholt. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung. Die Messung der Fluoreszenzlebenszeiten ( $\tau$ ) ist in Absatz 5.3.7.7 beschrieben. Die angegebene Lebenszeit basiert auf mindestens drei unabhängigen Messungen in lebenden Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen. Die pH-abhängigen Fluoreszenzmessungen wurden wie in Absatz 5.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Daten basieren auf fünf Messungen. Die Proteinaufreinigungen wurden wie in Absatz 5.3.1 beschrieben durchgeführt. Für die Helligkeitsmessung in Säugerzellen wurde das virale Expressionssystem des SF-Virus verwendet. Dem Zellmedium wurde zwei Stunden vor der Messung 25  $\mu$ M BV hinzugefügt. Die Helligkeit wurde durch Messung der IR-Fluoreszenz im Bereich zwischen 720 nm und 766 nm nach Anregung mit 671 nm mithilfe des FACS-Geräts (siehe Absatz 5.3.7.2) bestimmt.

Die Lebenszeit der generierten FPs wurde wie in Absatz 5.3.7.7 beschrieben an dem gruppenintern gebauten STED-Aufbau (siehe Absatz 5.4.2) gemessen. Die Ergebnisse für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Varianten im Vergleich zu mIFP sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst. Alle gemessenen Varianten weisen eine ähnliche Fluoreszenzlebenszeit zwischen 597 ps und 631 ps auf. Die längste Lebenszeit unter den bisher bekannten Bakteriophytochrom-basierten FPs hat mit 1,56 ns das BphP1 FP (Hontani et al., 2016; Shcherbakova et al., 2015a). Diese ist hier auf eine zweite BV-Bindestelle (siehe Absatz 1.3.1.7) zurückzuführen. Alle weiteren bisher bekannten Bakteriophytochrom-basierten FPs weisen Fluoreszenzlebenszeiten unter 1 ns auf (Bhattacharya et al., 2014; Lehtivuori et al., 2015; Toh et al., 2010, 2011; Zhu et al., 2015). Die Messungen wurden in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden Zellen durchgeführt, da sowohl der Brechungsindex der umgebenden Lösung als auch der pH-Wert oder die Anwesenheit von Fluoreszenz-Quenchern die Lebenszeit eines FPs verändern kann (Jung et al., 2012; Tregidgo et al., 2008).

Ebenso in Tabelle 3-1 zusammengefasst sind die Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten der generierten Varianten sowie die bestimmte zelluläre Helligkeit in Säugerzellen. Die Quantenausbeuten wurde wie in Absatz 5.3.6 beschrieben einmal vergleichend mit der Referenz mIFP und einmal absolut mit Hilfe eines Quantaurus-QY (C11347, Hamamatsu, J) bestimmt. Für die absolute Messung wurde als Referenz die Quantenausbeute des Farbstoffes Alexa 647 mit 31 % ± 0,7 % bestimmt. Dieser Wert ist vergleichbar zu den publizierten Werten dieses Farbstoffes (<https://www.thermofisher.com>). Für die publizierte Variante mIFP (Yu et al., 2014) wurde hingegen eine verglichen zu dem Literaturwert um 50 % reduzierte Quantenausbeute bestimmt. Diese Variation ergibt sich vermutlich daraus, dass bei Fluoreszenzproteinen die Bestimmung der Quantenausbeute und des Extinktionskoeffizienten immer auch

durch den Reifegrad der Proteinlösung bestimmt wird. In Proteinen mit externem Chromophor ist zusätzlich der Sättigungsgrad mit diesem entscheidend. Eine nicht vollständige Sättigung des Apoproteins mit dem Chromophor führt zu einem niedrigeren bestimmten Extinktionskoeffizienten. In der Publikation der Variante mIFP sind keine Angaben über die Expressionsbedingungen der Proteine vor der Proteinaufreinigung für die Bestimmung der Parameter angegeben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Proteinlösungen verwendet, die wie in Absatz 5.3.1 beschrieben aufgereinigt wurden. Die Expression erfolgte während 20-stündiger Inkubation der *E. coli*-Zellen bei 37 °C, um den experimentellen Bedingungen für das Mikroskopieren lebender Säugerzellen nach einem Tag der Expression von Fusionsproteinen nahe zu kommen. Ein längeres Nachreifen der Proteine vor der Aufreinigung bei von 37 °C abweichenden Temperaturen würde eventuell den Faltungsgrad der aufgereinigten Proteine und somit die Helligkeitswerte verbessern, da sich aufgrund der längeren Faltungszeit das Verhältnis von ungefaltetem zu gefaltetem Protein verschieben würde. Für einen Vergleich der Anwendbarkeit wäre dieser Parameter aber weniger aussagekräftig. Insbesondere durch die von Cranfill et al., 2016 vorgestellten Vergleichsstudien zwischen in verschiedenen Laboren aufgenommenen Daten bezüglich der Quantenausbeute und des Extinktionskoeffizienten wird die geringe Vergleichbarkeit von nicht parallel gemessenen Daten verdeutlicht.

Wie der Tabelle 3-1 zu entnehmen ist, haben die Varianten alle vergleichbare Quantenausbeuten zwischen 2 % und 3 %. Bezüglich des Extinktionskoeffizienten weist die Variante W4.35 hingegen mit  $138601 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \pm 8018 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  den höchsten Wert auf. Dieser ist um das nahezu Zweifache gesteigert gegenüber der Variante W4.34, die sich von W4.35 nur durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entdeckte Mutation G270R unterscheidet. Als Referenz wurde die publizierte Variante mIFP verwendet. Hier ist bei Bestimmung des Extinktionskoeffizienten über die Proteinkonzentration ein Wert von  $55000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  publiziert (Yu et al., 2015). Der Extinktionskoeffizient von W4.35 ist demnach 2,5-fach größer als bei mIFP und nahezu zweifach gesteigert in W4.35 gegenüber W4.34.

Die zelluläre Helligkeit in Säugerzellen wurde durch die Mutation G270R ebenfalls verbessert. Dies wird durch den Vergleich der Varianten W4.20 und W4.33 beziehungsweise W4.34 und W4.35 deutlich (siehe Tabelle 3-1). Hierbei fällt auf, dass der Einfluss auf die zelluläre Helligkeit in den Varianten ohne die von Lehtivuori et al., 2015 publizierte Mutation D270L (W4.33 zu W4.20) mit einer Steigerung um das 1,6-Fache größer ist, als in den Varianten, welche die Mutation D207L in sich tragen (W4.35 zu W4.34). Hier beträgt die Steigerung nur das 1,2-Fache.

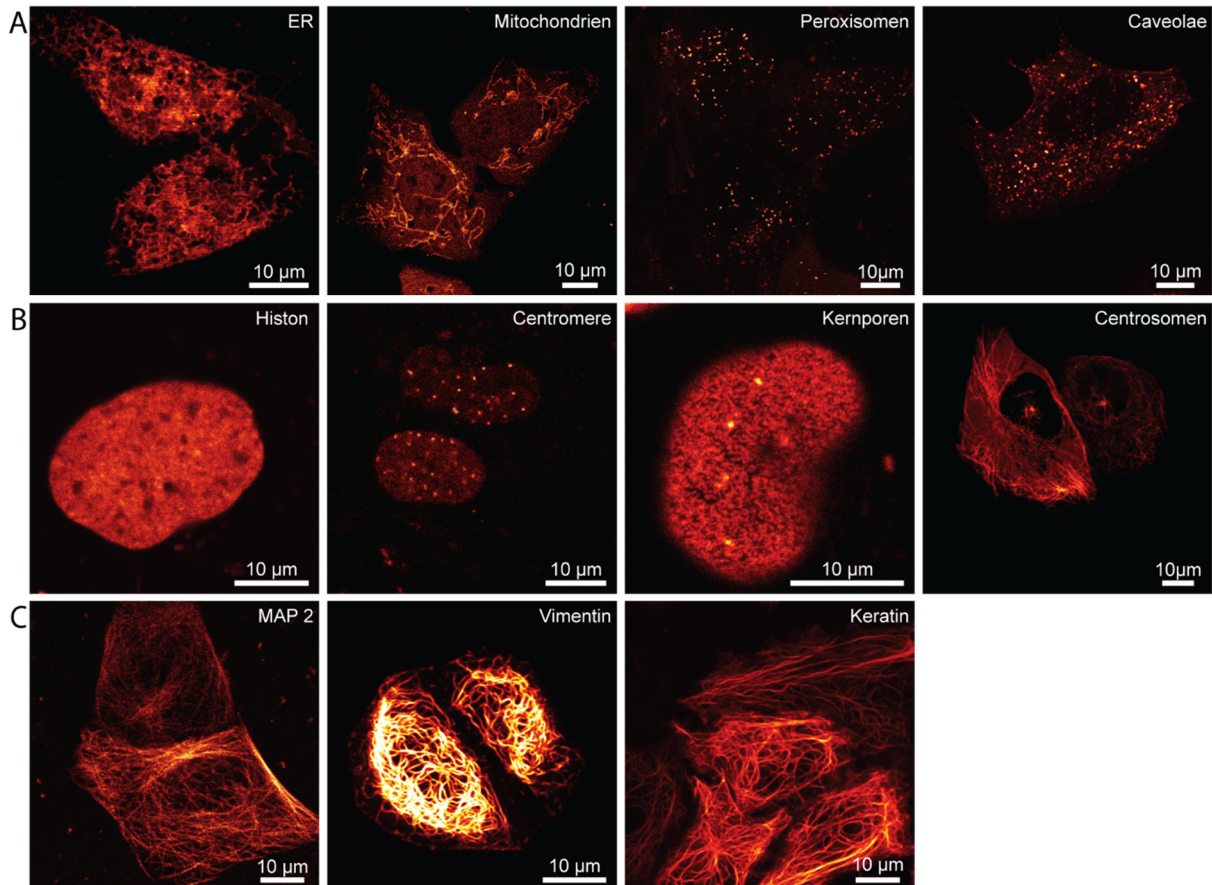
### 3.3.3 Anwendung der Variante W4.35 in der Mikroskopie

Aufgrund der verbesserten Eigenschaften bezüglich der zellulären und molekularen Helligkeit sowie der pH-Stabilität wurde die generierte Variante W4.35 für einen Test der Anwendung in der Mikroskopie und Nanoskopie ausgewählt. Dafür wurden zunächst verschiedene Konstrukte zur Expression von Fusionsproteinen in Säugerzellen generiert. Hierbei sollte die Zellverträglichkeit und die Verwendung von W4.35 als genetischer Marker bei sowohl carboxy- als auch aminoterminaler Fusion evaluiert werden. Besonders für die Verwendung in der Nanoskopie ist eine exakte Markierung der zellulären Zielmoleküle ohne unspezifische Hintergrundsignale von großer Bedeutung (siehe Absatz 1.1.1.2).

Die generierten Konstrukte decken verschiedene zelluläre Bereiche ab. Zur Fusion mit Proteinen des Zytoskeletts wurden die Konstrukte W4.35-Vimentin und W4.35-Keratin 18 sowie das Konstrukt W4.35-MAP2 zur Fusion mit MAP2 als einem mit dem Zytoskelett assoziierten Protein generiert. Um die Lokalisierung an verschiedene Proteine des Zellkerns zu testen, wurden die Konstrukte W4.35-Histone 1 H2bn, W4.35-CENP C, W4.35-Nup50-C10 und CEP41-W4.35 erstellt. Für die Lokalisierung in anderen Zellkompartimenten wurden die Konstrukte W4.35-ER, Mito-W4.35, W4.35-PTS und Cav 1-W4.35 zur



Färbung des jeweiligen Kompartiments hergestellt. Die Erstellung der Konstrukte ist in Absatz 5.1.6 beschrieben. Die genannten Konstrukte wurden in lebenden Säugerzellen exprimiert und zeigten eine korrekte Lokalisierung (siehe Abbildung 3-9). W4.35 eignet sich demnach als carboxy- und aminoterminalen Fusionsprotein in lebenden Zellen. Alle in dieser Zusammenstellung gezeigten Aufnahmen sind repräsentativ und wurden an einem kommerziell erwerblichen Mikroskop (Leica TSC SP8, Leica Microsystems, HE, DE) aufgenommen. Hier ist mit 644 nm die Anregung relativ zum Maximum (siehe Abbildung 3-7, B) stark ins Blaue verschoben. Auch die Detektion ist nicht auf die NIR-Fluoreszenz mit ihrem Maximum bei 720 nm optimiert. Trotzdem ließen sich auch dunklere Strukturen wie NUP50, CEP41 oder CENP C aufnehmen.



**Abbildung 3-9: Repräsentative Zusammenstellung von in Säugerzellen exprimierten W4.35-Fusionsproteinen.**

**A von links nach rechts:** endoplasmatisches Retikulum (W4.35-ER), mitochondriale Matrix (Mito-W4.35), Peroxisomen (W4.35- Peroxisomal Targeting Signal, PTS) und Caveolae (Caveolin 1-W4.35).

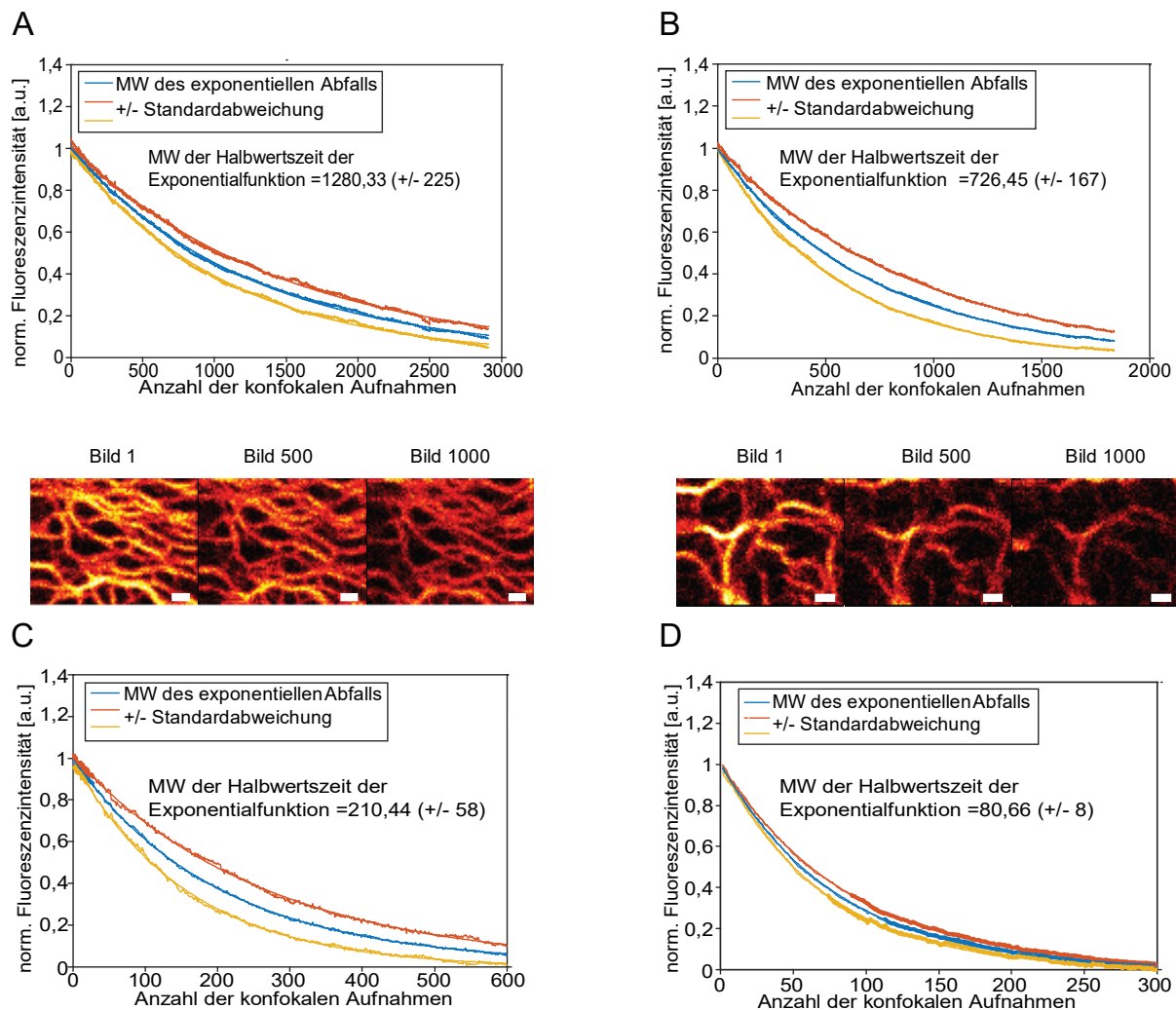
**B von links nach rechts:** Histon 1 (W4.35-Histone 1 H2bn), centromeres Protein C (W4.35-CENP C), Kernporenprotein NUP50 (W4.35 -Nup50 -C10) und centrosomales Protein 41 (CEP 41-W4.35).

**C von links nach rechts:** Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (W4.35-MAP2), Vimentin (W4.35-Vimentin) und Keratin 18 (W4.35-Keratin 18).

Die meisten Konstrukte wurden in U2OS-Zellen transfiziert. In der vorliegenden Zusammenstellung wurden lediglich für das W4.35-Krt18-Konstrukt HeLa-Zellen verwendet. Alle Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop von Leica bei Anregung mit 644 nm und einem Airy Unit von 1 aufgenommen (Leica TSC SP8). Etwa 2 Stunden vor der Mikroskopie der Zellen wurde dem Medium 25 µM BV hinzugefügt.

Neben der Zytotoxizität und der hiervon abhängigen Eignung zur Verwendung als genetischer Marker ist die Bleichstabilität eines FPs ein wichtiger Faktor, welcher seine Verwendbarkeit in der Mikroskopie und hier vor allem in der STED-Nanoskopie (siehe Absatz 1.1.1.2) beeinflusst. Um diese zu evaluieren diente die Anzahl der konfokalen Bilder, die auf einer Stelle in einer lebenden Zelle aufgenommen werden kann, als Richtwert. Als Referenz fungierte das Protein mCardinal (Chu et al., 2014), das auf mNeptune

(Lin et al., 2009) basiert und mit einem Anregungsmaximum von 604 nm und einem Emissionsmaximum von 659 nm zu den stark rot verschobenen GFP-basierten FPs gehört.



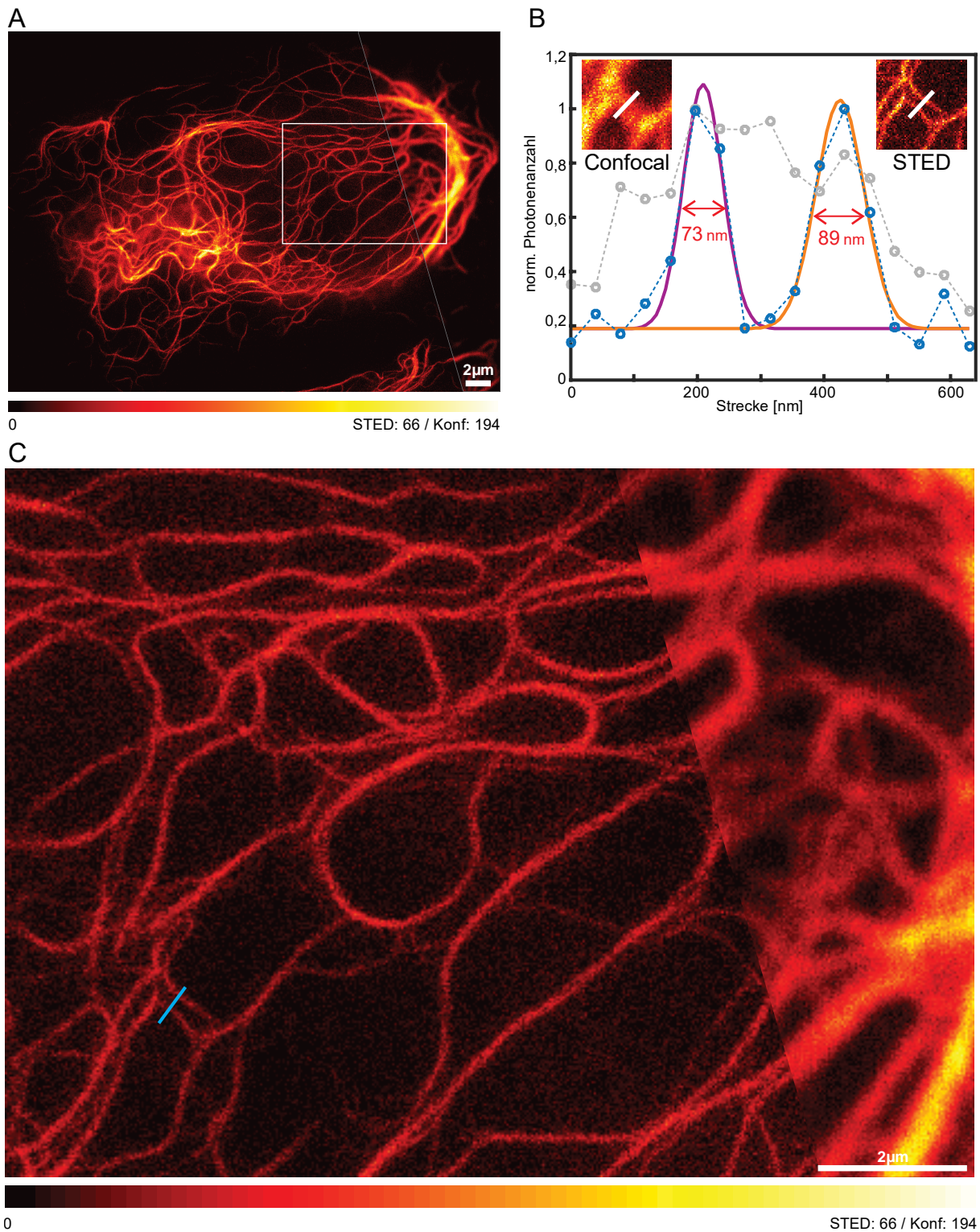
**Abbildung 3-10: Bleichverhalten des generierten NIR FPs W4.35 im Vergleich zu dem GFP-basierten FP mCardinal.**

A: W4.35 bei 3  $\mu$ W 676/10 nm Laser; B: W4.35 bei 6  $\mu$ W 676/10 nm Laser, C: mCardinal bei 3  $\mu$ W 600/20 nm Laser; D: mCardinal bei 6  $\mu$ W 600/20 nm Laser. Jeder Grafik liegen mindestens vier unabhängige Messungen zugrunde. Aufgetragen wurde die gemittelte, auf den exponentiellen Abfall normalisierte Fluoreszenzintensität über den jeweiligen kompletten Bildausschnitt gegen die Anzahl an konfokalen Aufnahmen bei gegebener Laserleistung. Für die angegebenen charakteristischen Zahlen der Halbwertszeit des exponentiellen Abfalls der Fluoreszenzintensität wurden die Fits der jeweiligen Messungen ohne Normierung gemittelt. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung. Die NIR Fluoreszenz wurde bei 732/68 nm und die rote Fluoreszenz bei 645/30 nm detektiert. Die Größenstandards sind 1  $\mu$ m. Die Messungen wurden an dem in Absatz 5.4.2 beschriebenen NIR STED-Aufbau durchgeführt. Die angegebenen Laserleistungen beziehen sich auf die Rückapertur des Objektivs. Die Messungen wurden in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden Säugerzellen durchgeführt. Im Fall der Variante W4.35 wurde dem Zellmedium etwa 2 Stunden vor dem Experiment 25  $\mu$ M BV hinzugefügt.

Die in Abbildung 3-10 zusammengefassten Ergebnisse zeigen klar die höhere Bleichstabilität von W4.35 gegenüber dem GFP-basierten roten FP mCardinal. Zur Halbwertszeit der abfallenden Exponentialfunktion konnten unter den gegebenen Umständen mit W4.35  $1280 \pm 225$  beziehungsweise  $726 \pm 167$  konfokale Bilder und mit mCardinal hingegen  $210 \pm 58$  beziehungsweise  $80 \pm 8$  konfokale Bilder aufgenommen werden.



## 3.3.3.1 STED-Nanoskopie mit der Variante W4.35

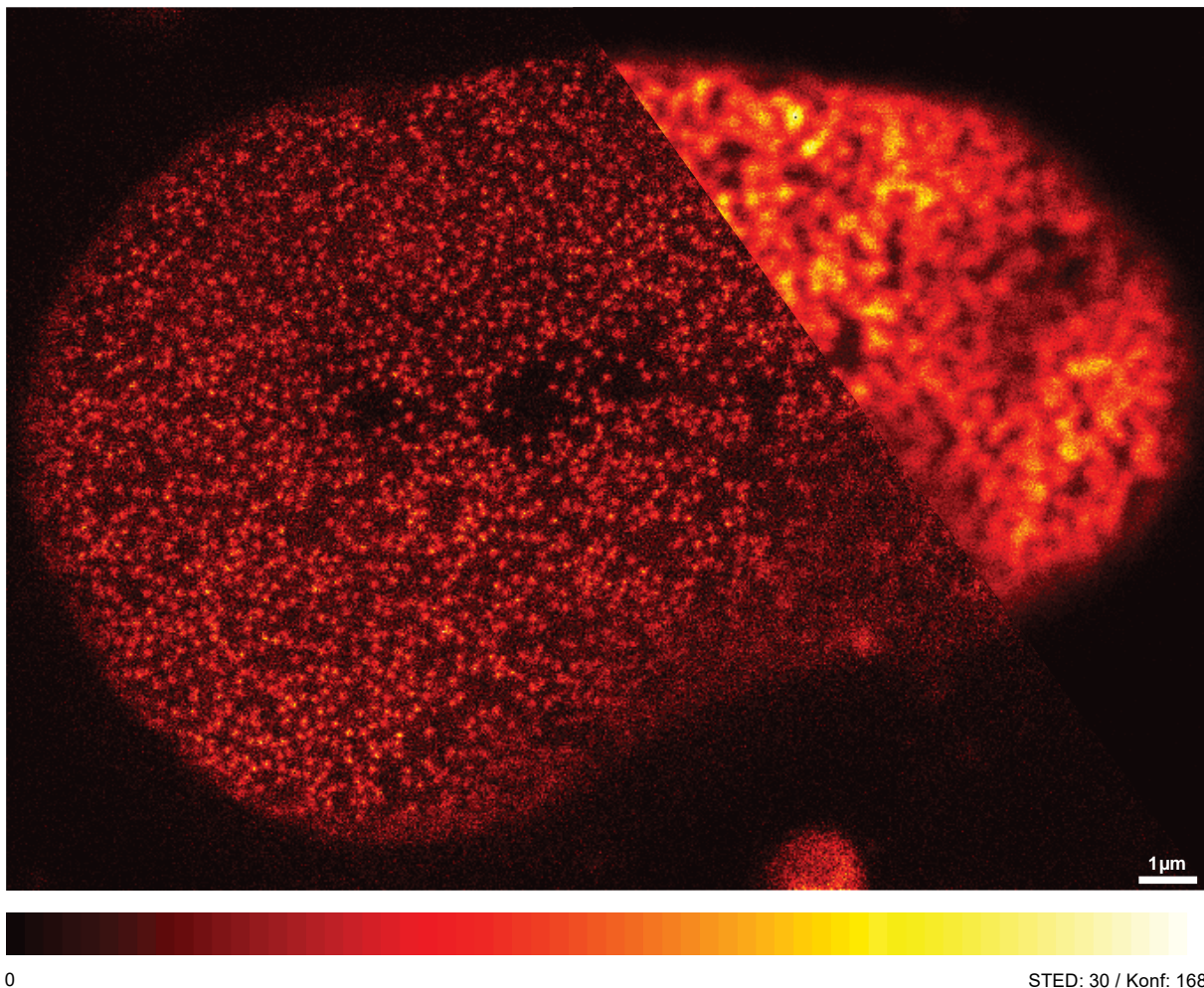


**Abbildung 3-11: Repräsentative Gegenüberstellung von Konfokaler- und STED-Nanoskopie in einer lebenden W4.35-Vim exprimierenden Zelle.**

A: Übersichtsaufnahme der kompletten Zelle. Rechter oberer Ausschnitt konfokale Mikroskopie, übriges Bild STED-Nanoskopie. B: Liniensprofil über den in B markierten Bereich. Die Daten basieren auf der Mittelung drei benachbarter Pixel und wurden auf 1 normalisiert. Die FWHM wurde mittels des gezeigten Gauss-Fits bestimmt. C: Vergrößerung des in A markierten Bereichs. Aufteilung wie vorab: rechter Ausschnitt konfokale Mikroskopie, übriges Bild STED-Nanoskopie. Die Fluoreszenz wurde mit 667/10 nm angeregt und bei 732/68 nm mit der zweiten APD (siehe 5.4.2) detektiert. Die STED-Wellenlänge war 860 nm (Leistung etwa 220 mW–230 mW). Die Pixelgröße beträgt 30 nm und die Verweildauer pro Pixel 40  $\mu$ s. Die Größenstandards entsprechen 2  $\mu$ m. Dem Zellmedium wurde mindestens zwei Stunden vor der Mikroskopie 25  $\mu$ M Biliverdin hinzugefügt (siehe Absatz 5.2.3). Die Aufnahmen wurden an dem in Absatz 5.4.2 beschriebenen, gruppeninternen gebauten NIR-STED Aufbau aufgenommen.

Unter der Verwendung des generierten Bakteriophytochrom-basierten FPs W4.35 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals STED-Nanoskopie durchgeführt. Die verwendete STED-Wellenlänge ist mit 860 nm stark rot verschoben gegenüber den bisherigen STED-Anwendungen. Die Verwendung von rotem und tiefrotem Licht in der Mikroskopie von lebenden Zellen und Geweben weist den Vorteil der geringeren Zytotoxizität des langwelligen Lichts sowie der geringen Absorption der Gewebe in diesem Wellenlängenbereich auf (siehe Absatz 1.3.1).

Abbildung 3-11 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die STED-Nanoskopie einer W4.35-Vimentionfusionsprotein exprimierenden lebenden Zelle. Es ist eine deutliche Verbesserung der Auflösung zu erkennen. Mit der STED-Nanoskopie konnten Filamente mit einem Durchmesser unter 80 nm gemessen werden.

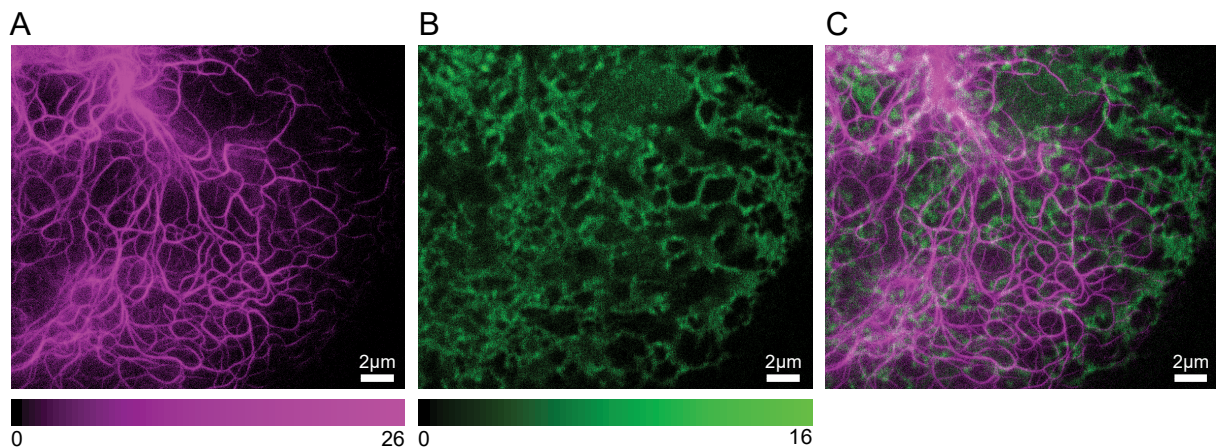


**Abbildung 3-12: Repräsentative Gegenüberstellung von Konfokaler- und STED-Nanoskopie in einer lebenden W4.35-NUP50 exprimierenden Zelle.**

A: Übersichtsaufnahme der kompletten Zelle. Rechter oberer Ausschnitt konfokale Mikroskopie, übriges Bild STED-Nanoskopie. Die Fluoreszenz wurde mit 667/10 nm angeregt und bei 732/68 nm mit der ersten APD (siehe Absatz 5.4.2) detektiert. Die STED-Wellenlänge war 860 nm (Leistung etwa 220 mW-230 mW). Die Pixelgröße beträgt 30 nm und die Verweildauer pro Pixel 200  $\mu$ s. Die Größenstandards entsprechen 1  $\mu$ m. Dem Zellmedium wurde mindestens zwei Stunden vor der Mikroskopie 25  $\mu$ M Biliverdin hinzugefügt (siehe Absatz 5.2.3). Die Aufnahmen wurden an dem in Absatz 5.4.2 beschriebenen, gruppenintern gebauten NIR-STED Aufbau aufgenommen.

Abbildung 3-12 zeigt eine weitere repräsentative STED-Aufnahme. Hier wurde eine lebende Zelle mikroskopiert, die das Konstrukt W4.35-NUP50 exprimiert. Auch hier ist eine substantielle Verbesserung der Auflösung zu erkennen. Dies zeigt, dass die Verwendung von W4.35 für die STED-Nanoskopie auch für dunklere Strukturen möglich ist.





**Abbildung 3-13: NIR und rote Zweifarbenmikroskopie einer W4.35-Vimentinfusionsprotein und mCherry-ER-Fusionsprotein co-exprimierenden, lebenden HeLa-Zelle.**

A: STED-Nanoskopie der W4.35-Vimentinfilamente. Die Fluoreszenz wurde mit 667/10 nm angeregt und bei 732/68 nm mit der ersten APD (siehe Absatz 5.4.2) detektiert. STED-Wellenlänge 860 nm (Leistung etwa 200 mW). B: Konfokale Mikroskopie der mCherry-ER Expression. Die Fluoreszenz wurde bei 600/20 nm angeregt und bei 645/30 nm detektiert. C: Überlagerung von A und B. Die Pixelgröße beträgt 30 nm und der Größenstandard ist 2 µm.

Des Weiteren wurde mit der Variante W4.35 und dem GFP-basierten FP mCherry (Shaner et al., 2004) zweifarbige rote beziehungsweise NIR-Mikroskopie an lebenden Zellen durchgeführt. Hierbei war für den NIR-Farbkanal auch die STED-Nanoskopie möglich. Ein repräsentatives Bild ist in Abbildung 3-13 zu sehen. Dies zeigt eine W4.35-Vimentinfusionsprotein und mCherry-ER-Fusionsprotein co-exprimierende Zelle. Für den NIR-Farbkanal war sowohl STED-Nanoskopie als auch konfokale Mikroskopie möglich. In Abbildung 3-13, A ist die STED-Nanoskopie der W4.35-Vimentinfusionsproteinstrukturen zu sehen. Die Fluoreszenz wurde bei 667/10 nm angeregt und bei 732/68 nm detektiert. Als STED-Wellenlänge diente 680 nm. Die mCherry Fluoreszenz wurde mit 600/20 nm angeregt und bei 645/30 nm detektiert (siehe Abbildung 3-13, B). Abbildung 3-13, C zeigt eine Überlagerung der beiden Detektionskanäle.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierte NIR FP Variante W4.35 weist verbesserte Eigenschaften gegenüber der Ausgangsvariante und bisherigen publizierten Varianten bezüglich der zellulären Helligkeit, dem Extinktionskoeffizienten und der pH-Stabilität auf. Mit W4.35 konnte erstmal STED-Nanoskopie im NIR Bereich des Lichts durchgeführt werden.



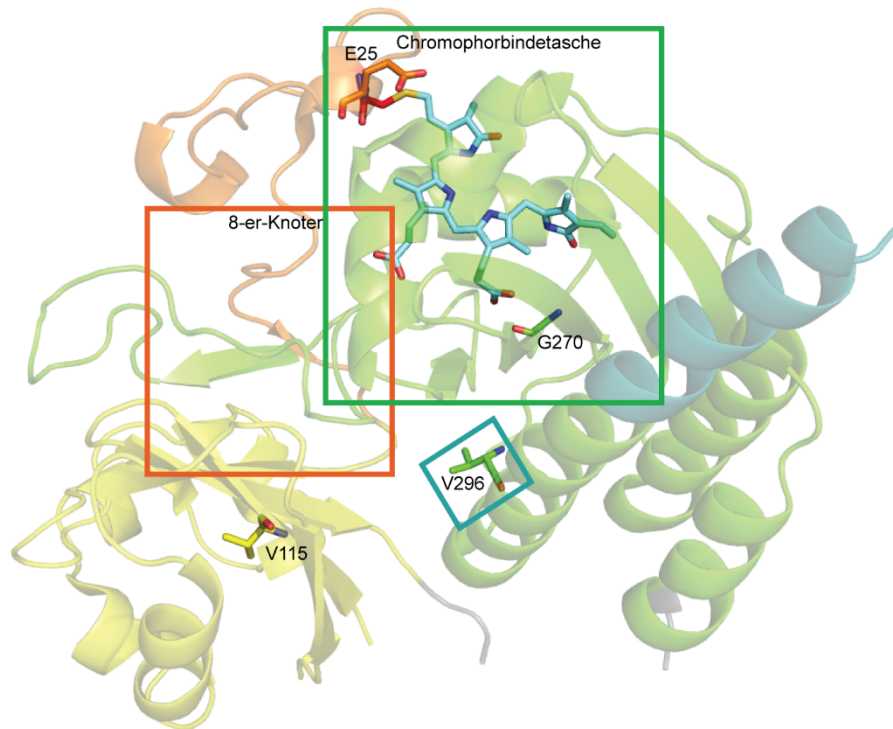
Gezielt wurden Aminosäurereste adressiert, die soweit bekannt eine Funktion im natürlichen Photozyklus der Phytochrome besitzen oder laut vorhandenen Strukturdaten in der direkten Biliverdinumgebung beziehungsweise anderen Bereichen denen ein Einfluss zugeordnet werden kann lokalisiert sind. Somit wurden Positionen der Bindetasche, des hydrophoben 8-er Knotens und des carboxyterminalen Endes der CBD adressiert. Erstere wurden sowohl aufgrund eines möglichen Einflusses auf die Binde- und Einbettungseigenschaften für BV als auch aufgrund eines solchen auf die Schalteigenschaften ausgewählt. Zusätzlich zu den für die Generierung eines NIR FPs adressierten Positionen (siehe Abbildung 3-5) wurden die Positionen 173, 175, 177, 186, 198, 201, 203, 267, 269, 290 und 291 aufgrund ihrer Lage in der Umgebung des D-Rings des BVs ausgewählt. Durch die Rotation des D-Rings wird das Chromophor während der Photoisomerisierung von einer cis-Konformation (Pr-Stadium) in eine trans-Konformation (Pfr-Stadium) isomerisiert. Die oben genannten Reste wurden ausgewählt, um durch Sättigungsmutagenesen Aminosäuresubstitutionen zu generieren, welche diese Isomerisierung besser ermöglichen.

Da das carboxyterminale Ende der CBD in der ursprünglichen Form die Verbindung zur PHY-Domäne darstellt, welche eine wichtige Rolle während des Photozyklus‘ spielt (siehe Absatz 1.3.1.5), wurden die Positionen 298, 305, 310, 315 und 317 gezielt für Sättigungsmutagenesen angesteuert.

Die Region des hydrophoben 8-er Knotens ist hoch konserviert zwischen allen bisher untersuchten Phytochromen. Mit den Positionen 35, 36, 37 und 232 wurden hier Positionen in seinem hydrophoben Kern und der direkten Umgebung mutagenisiert. Der Knoten wurde als Region ausgewählt, da ihm sowohl eine Rolle bei der Stabilisierung der PAS-GAF-Domäne als auch bei der richtigen Positionierung der BV-Bindestelle zugeschrieben wird (siehe Absatz 1.3.1.2).

### 3.4.2 Positionsstudie

Dieser Absatz fasst einige Ergebnisse des Screenings nach NIR RSFPs anhand einer Positionsstudie zusammen. Während des Screenings fielen insbesondere die Positionen 25, 115, 296 und 270 aufgrund ihres Einflusses auf die Charakteristika der NIR-RSFPs auf. Die Lage dieser Positionen ist in Abbildung 3-15 dargestellt. Für die gezeigten Schaltkinetiken wurden die in Absatz 3.2 anhand der Ausgangsvarianten festgelegten Parameter (Anschalten: 30 ms 785 nm, etwa 40 kW/cm<sup>2</sup>, Ausschalten: 3 ms 671 nm, etwa 60 kW/cm<sup>2</sup>) für die Bestimmung des Schalthintergrunds und die Schaltgeschwindigkeit (siehe Absatz 5.3.7.3 und Absatz 5.3.7.5) angewendet.



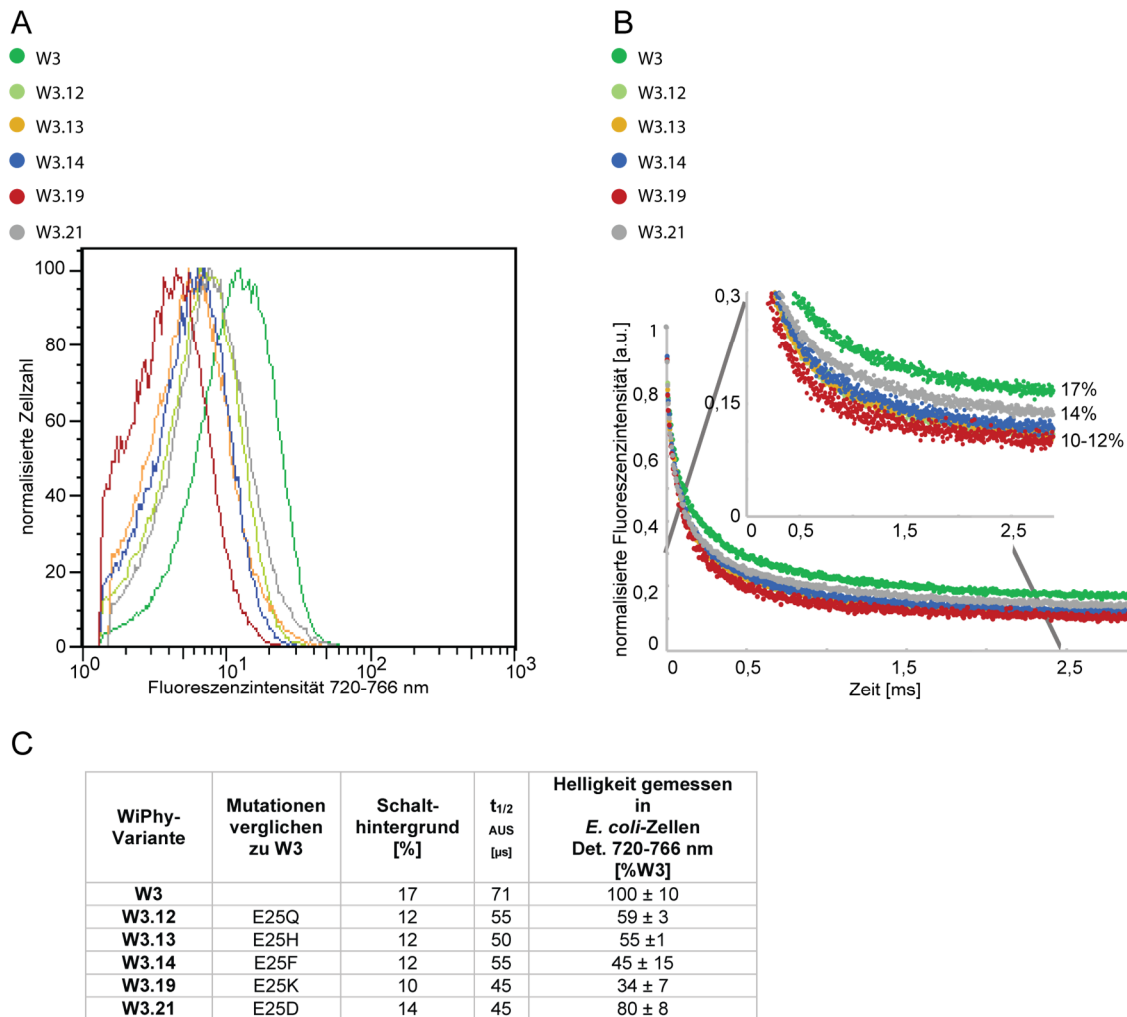
**Abbildung 3-15: Lage der Positionen 25, 115, 296 und 270 zum Chromophor.**

Zu sehen ist der Teil der PAS-GAF-PHY-Domänen des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans* auf dem die Ausgangsvariante W3 beruht. Die farblichen Umrahmungen beziehen sich auf die in Abbildung 3-14 eingefügten Bereiche, welche gezielt durch Mutagenesen angesteuert wurden. Die Farbcodierung der Tertiärstruktur ist: orange aminoterminaler Extension, grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Die Chromophorbindestelle (C24) ist in roten und das Chromophor (BV) in türkisen Stäbchen zu sehen. Die in der Positionsstudie angesprochenen Reste sind ebenfalls in Stäbchen (farblich passend zur jeweiligen Domäne) dargestellt. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen des Pr-Stadiums der PAS-GAF-PHY Domänen des Phytochroms von *D. radiodurans* verwendet (pdb 4O0P).

Position 25 liegt direkt carboxyterminal der BV-Bindestelle (siehe Abbildung 3-15). In der *Dr*CBD ist hier mit einer Glutaminsäure eine polare und saure Aminosäure mit einer Seitenkette mittlerer Größe positioniert. Während des Screenings nach einem geringeren Schaltheintergrund fiel auf, dass bei der gezielten Substitution der Aminosäure E25 der Schaltheintergrund stark variierte (siehe Abbildung 3-16, B). Besonders das Einfügen einer basischen oder neutralen Aminosäure (Phenylalanin, Lysin, Histidin, Glutamin) führte zu einer stärkeren Reduktion des Schaltheintergrunds auf 10-12 % des Maximalsignals. Auch das Einfügen der alternativen polaren und sauren Aminosäure Asparaginsäure führte zu einer Reduktion des Schaltheintergrunds. Diese fiel mit einer Reduktion um 3 % jedoch nicht so stark aus.

Auch die zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen wurde durch die beschriebenen Substitutionen an Position 25 stark beeinflusst (siehe Abbildung 3-16, A). Alle Varianten mit verbessertem Schaltheintergrund weisen eine geringere zelluläre Helligkeit auf als W3. W3.21, welche die einzige Variante mit verbessertem Hintergrund und mit einer sauren Aminosäure an Position 25 ist, weist unter den Varianten mit verbessertem Schaltheintergrund die größte zelluläre Helligkeit ( $80 \pm 8$  % von W3), aber auch mit einer Verbesserung um nur 3 % die geringste Verbesserung des Schaltheintergrunds auf. W3.12, bei welcher ein Glutamin an Position 25 ist, hat mit 12 % des Maximalsignals einen stärker reduzierten Schaltheintergrund und weist mit  $59 \pm 3$  % von W3 die unter den Varianten mit basischer oder neutraler Aminosäure an Position 25 größte zelluläre Helligkeit auf. Variante W3.19 weist mit 10 % des Maximalsignals den am stärksten reduzierten Schaltheintergrund, jedoch mit  $34 \pm 7$  % von W3 die geringste zelluläre Helligkeit auf.





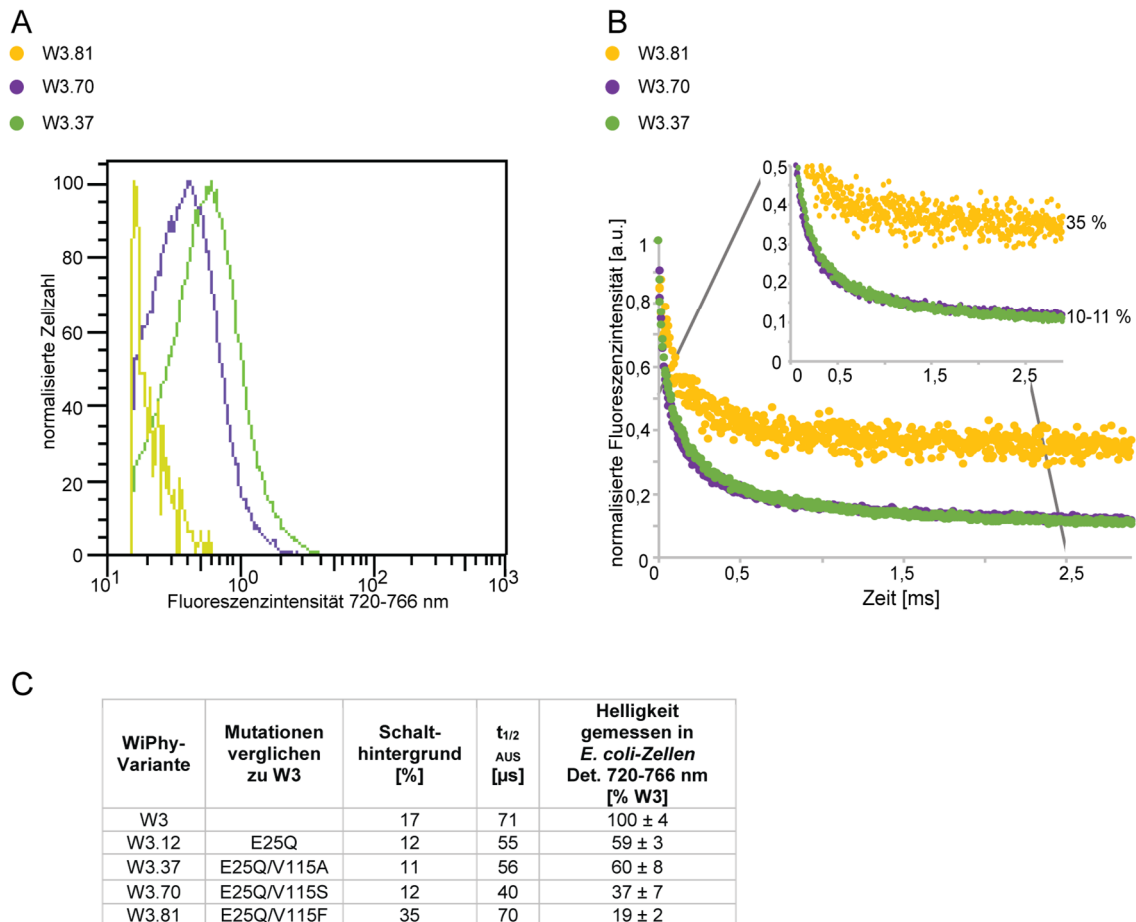
**Abbildung 3-16: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten mit variabler Position 25.**

A: Helligkeitsverteilung der Varianten gemessen in *E. Coli*-Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Detektionsfenster von 720-766 nm, siehe Absatz 5.3.7.2). B: Ausschaltkurven der Varianten W3.12, W3.13, W3.14, W3.19 und W3.21 im Vergleich zu W3. Diese wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattierten, das jeweilige RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Zu sehen sind die Ausschaltkinetiken, welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) für 3 ms aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Die Kinetiken wurden auf das Maximum normiert. Jeder Messpunkt basiert auf mindestens vier unabhängigen Messungen. C: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten W3.12, W3.13, W3.14, W3.19 und W3.21 im Vergleich zu W3. Der Schalthintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik (t<sub>1/2</sub>AUS) wurden anhand der in B dargestellten Kinetiken, wie in Absatz 5.3.7.3 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

Die Position 115 (siehe Abbildung 3-15) liegt außerhalb der ausgewählten mit gezielten Mutagenesen adressierten Bereiche im  $\beta$ -Faltblatt 5 der PAS-Domäne (siehe Schema Abbildung 1-8, B). Damit ist Position 115 zwar örtlich gesehen nahe dem hydrophoben, hoch konservierten 8-er-Knoten lokalisiert, jedoch nicht in dem  $\beta$ -Faltblatt, welches dem aminoterminal zur PAS-Domäne lokalisierten Polypeptid am nächsten ist, das zusammen mit der durch die GAF-Domäne gebildeten Schlaufe den Knoten formt.

Ursprünglich ist an dieser Position die unpolare, neutrale Aminosäure Valin mit einer Seitenkette mittlerer Größe positioniert. Eine Substitution des Valins durch die ebenso unpolare und neutrale Aminosäure Phenylalanin mit einer größeren Seitenkette führt in der Variante W3.81 zu einer starken Verschlechterung der zellulären Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen (19 % von W3) und des Schalthintergrunds (siehe Abbildung 3-17). Der Hintergrund steigt von 12 % auf 35 % des Maximalsignals und die zelluläre Helligkeit nimmt um das Zwei- bis Dreifache ab. Das Einfügen der kleineren Aminosäure Alanin resultiert hingegen in W3.37 in einem um 1 % verbesserten Schalthintergrund und beeinflusst die zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen nicht. Ein polares Serin (W3.70) führt an dieser Stelle zu einer Variante mit

unverändertem Hintergrund, aber einer Verschlechterung der zellulären Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen auf 40 % der Ausgangsvariante.



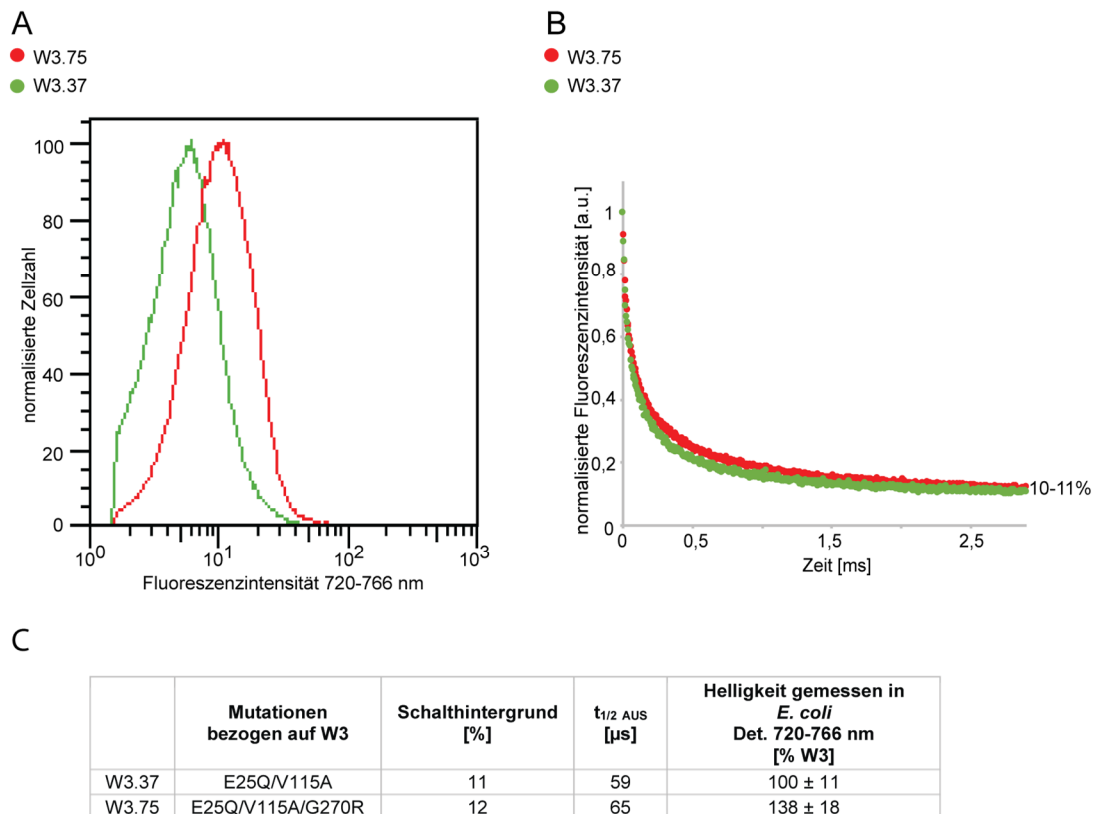
**Abbildung 3-17: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten mit variabler Position 115.**

A: Helligkeitsverteilung der Varianten gemessen in *E. coli*-Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Detektionsfenster von 720-766 nm, siehe Absatz 5.3.7) B: Ausschaltkurven der Varianten W3.37, W3.70 und W3.81. Diese wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattieren, das jeweilige RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Zu sehen ist die Ausschaltkinetik welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm für 3,5 ms (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Die Kinetiken wurden auf das Maximum normiert. Jeder Messpunkt basiert auf mindestens vier unabhängigen Messungen. C: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten W3.37, W3.70 und W3.81 im Vergleich zu W3.12. Der Schalt-hintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik ( $t_{1/2AUS}$ ) wurden anhand der in B dargestellten Kinetiken, wie in Absatz 5.3.7.5 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

Position 296 ist in der  $\alpha$ -Helix lokalisiert, die innerhalb eines kompletten PCMs die GAF- und die PHY-Domäne verbindet ( $\alpha 8$ , siehe Abbildung 1-8, B) und liegt somit innerhalb der gezielt adressierten Bereiche (siehe Abbildung 3-15). An dieser Position ist ursprünglich ein Valin lokalisiert. Dieses wurde im Rahmen der Positionsstudie durch ein Glycin, Threonin, Asparagin, Phenylalanin und Lysin ersetzt. Diese Substitutionen führten zu keiner Veränderung oder einer starken Verschlechterung der Schalt- und zellulären Helligkeitseigenschaften der resultierenden Varianten (siehe Anhang, Abbildung 11-2).

Die Position 270 ist im Bereich der Chromophorbindetasche lokalisiert und liegt somit ebenfalls in dem Bereich der gezielt angesteuerten Positionen (siehe Abbildung 3-15). Hier ist im ursprünglichen Fall mit einem Glycin die kleinste, unpolare und neutrale Aminosäure positioniert. Im Rahmen des vorrangig beschriebenen Screenings nach einem NIR FP wurde diese Position bereits identifiziert (siehe Absatz 3.3.2) und es wurde gezeigt, dass die Substitution des Glycins durch die basische und polare Aminosäure Arginin

mit einer großen Seitenkette zu einer Erhöhung der zellulären und molekularen Helligkeit des FPs sowie einer Verbesserung der pH-Stabilität führt (siehe Absatz 3.3.2). Aus diesem Grund wurde diese Position auch gezielt bei dem Screening nach verbesserten RSFPs mutagenisiert. Auch hier führt die genannte Substitution G270R zu einer Steigerung der zellulären Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen. Der Schalthintergrund wird durch diese Mutation nur minimal beeinflusst (Erhöhung um 1 %, siehe Abbildung 3-18).



**Abbildung 3-18: Einfluss der Mutation G270R.**

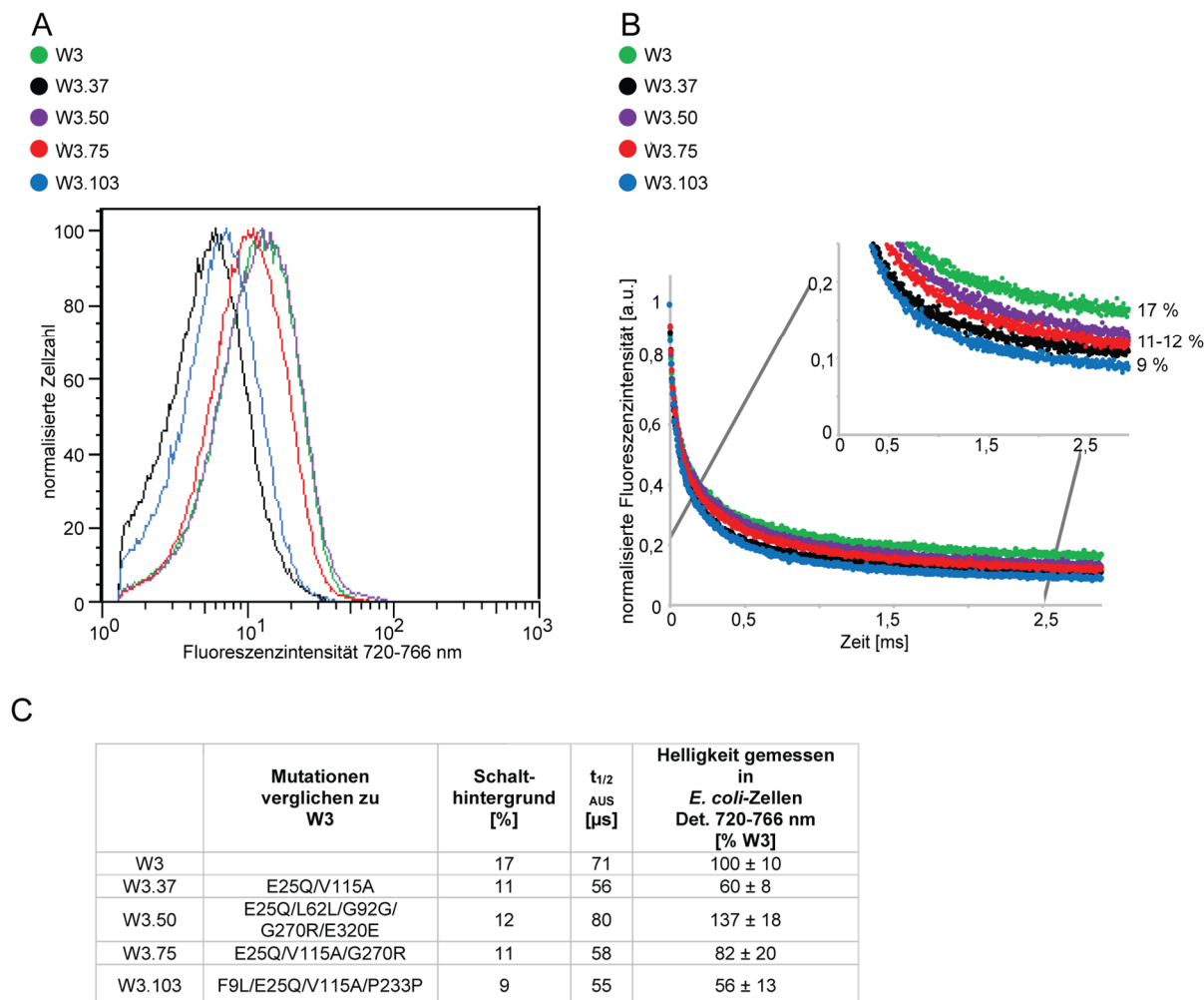
A: Helligkeitsverteilung der Varianten gemessen in *E. coli*-Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Detektionsfenster von 720 -766 nm, siehe Absatz 5.3.7.2). B: Ausschaltkurven der Varianten W3.37 und W3.75. Diese wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattierten, das jeweilige RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Zu sehen sind die Ausschaltkinetiken, welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) für 3 ms aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Die Kinetiken wurden auf das Maximum normiert. Jeder Messpunkt basiert auf mindestens vier unabhängigen Messungen. C: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten W3.75 im Vergleich zu W3.37. Der Schalthintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik ( $t_{1/2 \text{ AUS}}$ ) wurden anhand der in B dargestellten Kinetiken, wie in Absatz 5.3.7.3 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

Wie bei den vorab gezeigten Positionsstudien zu erkennen ist, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mehrere, bisher unbekannt Positionen mit Einfluss auf die Schalteigenschaften und/oder die zelluläre Helligkeit in *E. coli*-Zellen aufgedeckt und vergleichend untersucht werden. Der folgende Absatz soll dazu dienen, die besten generierten Varianten detailliert, vergleichend zu charakterisieren.

### 3.4.3 Vergleich der besten generierten RSFPs

Alle in Abbildung 3-19 dargestellten Varianten zeigen eine Verbesserung gegenüber der Ausgangsvariante W3. Die Varianten W3.37, W3.50 und W3.75 beinhalten alle nur Kombinationen aus Mutationen, die innerhalb der vorab beschriebenen Positionsstudien bereits behandelt wurden. Hierbei weist W3.50 sowohl bezüglich des Schalthintergrunds als auch bezüglich der zellulären Helligkeit in *E. coli*-Zellen eine Verbesserung verglichen zu der Ausgangsvariante W3 auf. Der Schalthintergrund beträgt hier 12 % des

Maximalsignals und die zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen ist um das 1,4-Fache gesteigert. Alle anderen generierten Varianten zeigen größere Verbesserungen des Schalthintergrunds, weisen jedoch eine geringere zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen auf.



**Abbildung 3-19: Eigenschaften der vier besten entwickelten RSFPs.**

A: Helligkeitsverteilung der Varianten gemessen in *E. coli*-Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Detektionsfenster von 720 -766 nm, siehe Absatz 5.3.7.2). B: Ausschaltkurven der Varianten W3.37, W3.50, W3.75, W3.103 im Vergleich zu W3. Diese wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattierten, das jeweilige RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Zu sehen sind die Ausschaltkinetiken welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) für 3 ms aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Die Kinetiken wurden auf das Maximum normiert. Jeder Messpunkt basiert auf mindestens vier unabhängigen Messungen. C: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten W3.37, W3.50, W3.75, W3.103 im Vergleich zu W3. Der Schalthintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik ( $t_{1/2 \text{ AUS}}$ ) wurden anhand der in B dargestellten Kinetiken, wie in Absatz 5.3.7.5 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

W3.75 weist mit 11 % des Maximalsignals einen Schalthintergrund vergleichbar zu W3.37 auf, ist jedoch mit dem 0,8-Fachen der zellulären Helligkeit in *E. coli*-Zellen, die hellste Variante unter den Varianten mit stärker verbessertem Schalthintergrund.

W3.103 beinhaltet als einzige Variante eine Position, welche bisher noch nicht vorgestellt wurde. Neben einer stillen Mutation (P233P) unterscheidet sich diese Variante durch die Mutation F9L von W3.37. Die Position 9 ist in dem der PAS-Domäne aminoterminal vorangehenden Polypeptid lokalisiert. Sie ist 15 Aminosäuren von der Chromophorbindestelle (C24) entfernt. Mit F9L wurde hier die neutrale Aminosäure Phenylalanin mit einer großen Seitenkette durch die ebenso neutrale Aminosäure Leucin ausgetauscht. Dieser Austausch hat verglichen zu W3.37 zu einer weiteren Reduktion des Schalthintergrunds um 2 %

geführt. Die zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen wurde durch den Austausch an Position 9 nicht beeinflusst.

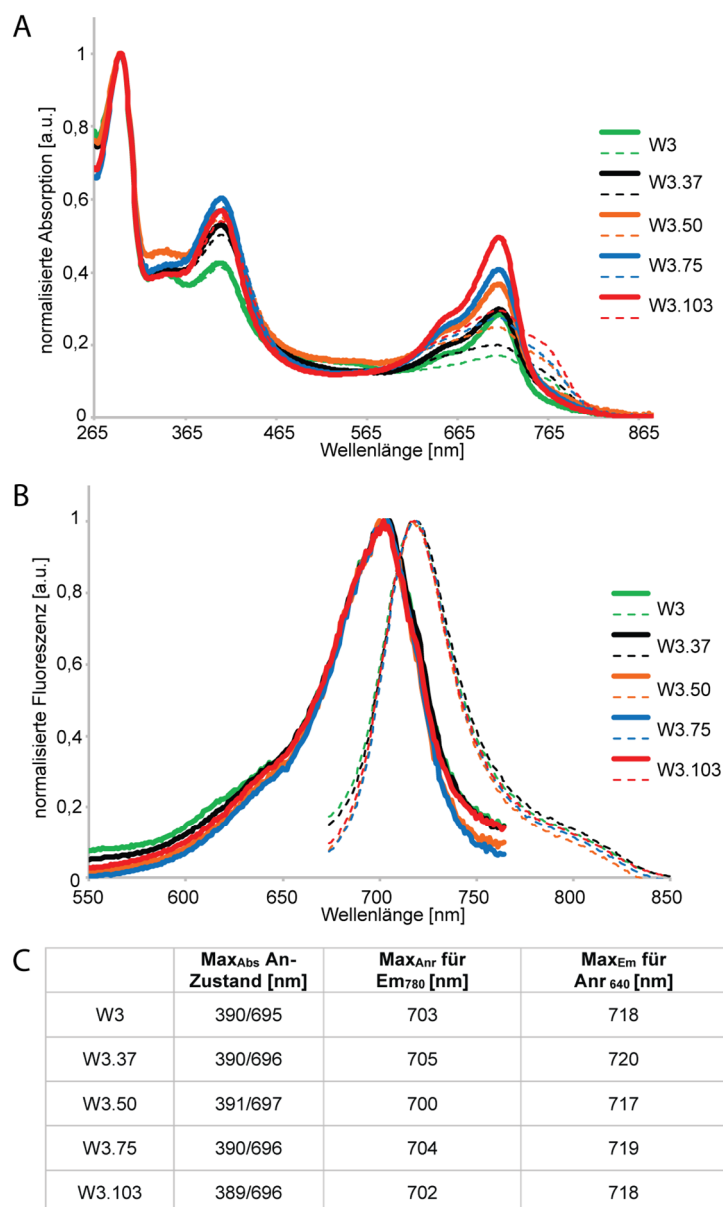
Alle aufgeführten Varianten weisen bei der Bestimmung ihrer Schaltcharakteristika mithilfe des nicht konfokalen, automatisierten Mikroskops eine Halbwertszeit des Ausschaltvorgangs von unter 100  $\mu$ s auf. Die Varianten mit dem geringsten Schalthintergrund, W3.37 und W3.103, sind hierbei mit 56  $\mu$ s beziehungsweise 55  $\mu$ s die Varianten mit der schnellsten Ausschaltkinetik.

Zwei der den Schalthintergrund verbessernden Mutationen, die in den Varianten W3.37 und W3.75 vertreten sind (E25Q/V115A), wurden im Folgenden in die übrigen Ausgangsvarianten (W1, W2 und W4) eingebracht. Die Eigenschaften der generierten Varianten sind in Tabelle 11-2 (siehe Anhang) zusammengefasst. Der Einfluss der Mutationen E25Q/V115A führt in beiden Varianten ohne PHY-Domäne (W3 und W4) zu einer Verbesserung des Schalthintergrunds um 6-7 %. Auch das alleinige Einbringen der Mutation E25Q resultiert in einer vergleichbaren Reduzierung des Schalthintergrunds. Bei den Varianten mit PHY-Domäne (W1 und W2) hingegen kann kein so einheitlicher Einfluss der Mutationen nachgewiesen werden. In der Variante W1 führt das Einbringen der Mutation E25Q zu einer Verschlechterung des Schalthintergrunds um 7 %. Das Hinzufügen der Mutation V115A verringert den negativen Einfluss der Mutation E25Q um 6 %. Bei Variante W2, die um 19 carboxyterminale Aminosäuren verkürzt ist, führt sowohl das alleinige Einbringen der Mutation E25Q als auch die Kombination der Mutationen E25Q/V115A zu einer Reduzierung des Schalthintergrunds um ungefähr 9 %.

### 3.4.4 Weitergehende Charakterisierung der entwickelten RSFPs

#### 3.4.4.1 Spektrale Charakterisierung der generierten NIR RSFPs

Wie in Abbildung 3-20 zu sehen ist, unterscheiden sich die Absorptions- (A) beziehungsweise Anregungs- und Emissionsspektren (B) der auf W3-basierenden NIR RSFP Varianten untereinander kaum. Die Maxima sind in einem ähnlichen Bereich wie die der Ausgangsvariante W3. Alle weisen die bereits beschriebene kurzwellige Bande (Soret-Bande) zwischen 384 und 387 nm und die langwellige Bande (Q-Bande) bei 691 - 697 nm auf. Die Anregung des langwelligeren Maximums führt zu Fluoreszenz im Bereich von 720 nm (siehe Abbildung 3-20, B/C). Im Aus-Zustand geht das langwelligere Maximum des An-Zustands zurück und die Absorption im rotverschobenen Bereich bei 750-760 nm steigt.



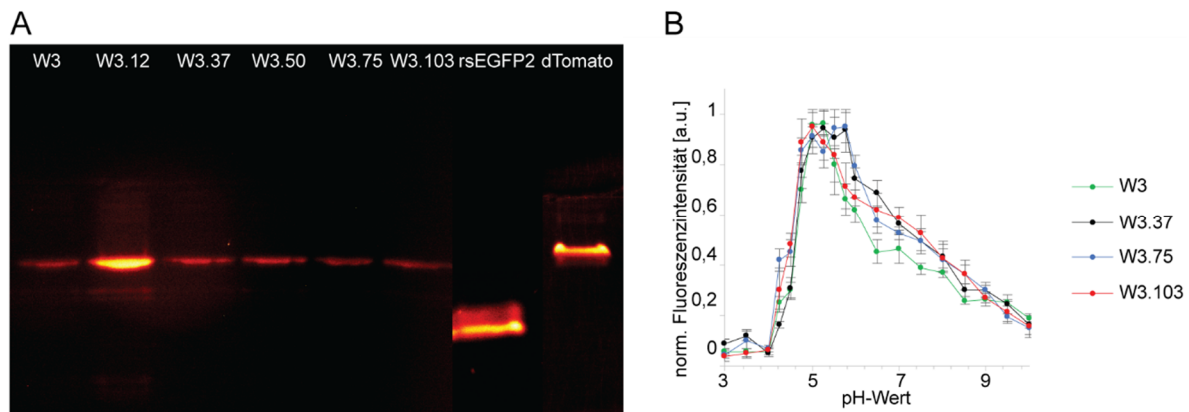
**Abbildung 3-20: Spektren der auf der Basis von W3 generierten RSFPs.**

A: Normalisierte Absorptionsspektren. Die durchgezogenen Linien zeigen die Spektren nach achtminütiger Bestrahlung der Küvette mit 769/41 nm und repräsentieren die Spektren des An-Zustands. Die gestrichelten Linien zeigen die Spektren nach achtminütiger Bestrahlung der Küvette mit 661/20 nm und repräsentieren die Spektren des Aus-Zustands. B: Normalisierte Anregungs- und Emissionsspektren im An-Zustand. Das Anregungsspektrum wurde für die Emission bei 780 nm und das Emissionsspektrum für die Anregung bei 640 nm aufgezeichnet. C: Zusammenfassung der Maxima der Varianten.

Die Absorptionsspektren wurden wie in Absatz 5.3.3 beschrieben an einem Cary 4000 UV-VIS Spektrometer und die Fluoreszenz- und Anregungsspektren wie in Absatz 5.3.4 beschrieben an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Alle Spektren wurden bei einem pH-Wert von 7,5 gemessen.

### 3.4.4.2 Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten NIR RSFPs

Wie vorab beschrieben, liegen Bakteriophytochrome natürlicherweise als Homodimere vor (siehe Absatz 1.3.1.2). In die Ausgangsvarianten für das Screening nach NIR (RS)FPs wurden die von Auldridge et al., 2012 publizierte Monomerisierungsmutationen (F145S/L311E/L314E) für die *DrcBD* eingefügt. Der Oligomerisierungsgrad der generierten RSFP-Varianten wurde, wie für die NIR FPs beschrieben (siehe Absatz 3.3.2.2) über eine seminatale SDS-PAGE (siehe Absatz 5.3.2) bestimmt. Hierbei dienten die GFP-basierten (RS)FPs rsEGFP2 (Monomer, Größe ungefähr 29 kDa) und dTomato (Dimer, Größe ungefähr 58 kDa) als Größenstandards. Wie in Abbildung 3-21, A zu sehen ist, verhielten sich die generierten NIR-RSFPs unter den gegebenen Umständen monomer.



**Abbildung 3-21: Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten NIR RSFPs.**

A: Semi-native PAGE. Als Größenstandards wurden rsEGFP2 (Monomer Größe ungefähr 29 kb) und dTomato (Dimer Größe ungefähr 58 kb) aufgetragen. NIR Fluoreszenz wurde durch Bestrahlung mit 655/40 nm angeregt und bei 740/40 nm detektiert. Grüne Fluoreszenz (rsEGFP2) wurde durch Bestrahlung mit 470/10 nm angeregt und bei 525/60 nm detektiert und rote Fluoreszenz (dTomato) wurde durch Bestrahlung mit 545/20 nm angeregt und bei 617/37 nm detektiert. Die Bilder wurden übereinandergelegt und sind einheitlich in Falschfarben (firescale) dargestellt. B: Die normalisierte Fluoreszenzintensität ist gegen den pH-Wert der Lösung aufgetragen. Die Messungen wurden an einem Platerreader des Modells Cytation 3 der Firma BioTek (BW, DE), wie in Absatz 5.3.5 gemessen. Jedem Messpunkt liegen fünf Messungen zugrunde. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die pH-Stabilität der generierten NIR RSFPs wurde analog zu derjenigen der generierten NIR FPs (siehe Absatz 3.3.2.2) anhand der Messung der Fluoreszenzintensität in Lösungen verschiedener pH-Werte bestimmt. Die Hälfte des Maximums der Fluoreszenzintensität wird bei den generierten NIR-RSFPs genauso wie bei den generierten NIR-FPs im Bereich zwischen 4,5-4,75 erreicht (siehe Abbildung 3-21, B). Jedoch fällt die erreichte Fluoreszenzintensität nach ihrem Maximum bei einem pH-Wert von 5,25 stark ab. Die generierten Varianten sind von der pH-Stabilität alle leicht besser als die Ausgangsvariante W3. Bei einem pH-Wert von 7,5 weist W3 nur noch eine Fluoreszenzintensität von  $40\% \pm 2\%$  auf wohingegen die übrigen Varianten noch bei 50 % liegen.

#### 3.4.4.3 Fluoreszenzlebenszeit, Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient der generierten NIR RSFPs

Analog zu den generierten NIR FPs (siehe Absatz 3.3.2.3) wurde auch für die generierten NIR RSFPs die Fluoreszenzlebenszeit, die Quantenausbeute und der Extinktionskoeffizient bestimmt (siehe Tabelle 3-2). Die in lebenden, Vimentininfusionsprotein-exprimierenden Zellen bestimmten Fluoreszenzlebenszeiten zeigen zwischen den Varianten keinen maßgeblichen Unterschied und sind mit 512-531 ps sehr kurz. Durch die erhöhte Flexibilität des Chromophors in einem RSFP und den Übergang zwischen dem An- und dem Aus-Zustand als zu der Emission konkurrierendem Prozess, ist eine Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit gegenüber nicht schaltenden Varianten zu erwarten. Generell entsprechen die kurzen Fluoreszenzlebenszeiten bisherigen publizierten Werten von unter 1 ns für Bakteriophytochrom-basierte FPs (Bhattacharya et al., 2014; Hontani et al., 2016; Shcherbakova et al., 2015a; Toh et al., 2010, 2011; Zhu et al., 2015).

Die Quantenausbeute wurde, wie in Absatz 5.3.6 beschrieben, absolut und relativ im Vergleich zu mIFP bestimmt. Für die relative Messung und die Messung des Extinktionskoeffizienten wurde das Küvettenvolumen wie in Absatz 5.3.3 beschrieben vor der Messung durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 769/41 nm geschaltet. Es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass sich die komplette Proteinlösung des Küvettenvolumens im An-Zustand befindet. Dies muss in die Bewertung der Daten einbezogen werden, insbesondere, da im Fall der generierten NIR-RSFPs davon ausgegangen werden kann, dass sich die Absorptionsbande des Aus-Zustands zu einem gewissen Teil mit der des An-Zustands mischt. Somit ist hier sowohl für die Bestimmung der Quantenausbeute als auch für diejenige des



Extinktionskoeffizienten erforderlich, dass sich die Proteinlösung im An-Zustand befindet. Passend hierzu fallen die absolut bestimmten Quantenausbeuten deutlich niedriger aus als die relativ bestimmten. Zwischen den Varianten ist aufgrund der hohen Standardabweichungen weder bezüglich der Quantenausbeuten noch bezüglich des Extinktionskoeffizienten ein Unterschied messbar (siehe Tabelle 3-2). Diese hohe Standardabweichung lässt sich damit erklären, dass die Proteinlösung nicht komplett geschaltet werden kann und immer davon ausgegangen werden kann, dass auf einem Gemisch aus dem An- und dem Aus-Zustand gemessen wurde. Hinzu kommt, dass die Quantenausbeute und der Extinktionskoeffizient bei einem pH-Wert von 7,5 bestimmt wurden. Bei diesem pH-Wert weist keines der generierten NIR RSFPs sein Maximum an Fluoreszenzintensität auf (siehe Abbildung 3-21,B). Auch dies kann zu Schwankungen führen, die durch leichte Veränderungen des pH-Wertes ausgelöst werden können.

	Mut. bezogen auf W3	$\phi$ [%]		$\epsilon$ [ $M^{-1} cm^{-1}$ ]	$\tau$ [ps]	Fluoreszenz bei pH 8.5 [%]	Helligkeit in <i>E. Coli</i> -Zellen Det. 720-766 nm [%W3]
		absolute Messung	relative Messung				
W3		1,5 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2	85380 $\pm$ 25962	n. b.	26 $\pm$ 1	100 $\pm$ 10
W3.37	E25Q V115A	1,3 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 1,3	81798 $\pm$ 25358	512 $\pm$ 63	30 $\pm$ 2	60 $\pm$ 8
W3.50	E25Q L62L G92G G270R E320E	n. b.	n.b.	n.b.	531 $\pm$ 32	n.b.	137 $\pm$ 18
W3.75	E25Q V115A G270R	1,3 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 1,8	105552 $\pm$ 40475	531 $\pm$ 20	36 $\pm$ 4	82 $\pm$ 20
W3.103	F9L E25Q V115A P233P	1,5 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,6	72104 $\pm$ 28468	523 $\pm$ 44	36 $\pm$ 6	56 $\pm$ 13

**Tabelle 3-2: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten.**

Alle dargestellten Werte wurden vergleichend zwischen den jeweiligen Varianten gemessen. Die Quantenausbeute ( $\phi$ ) und der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) wurden wie in Absatz 5.3.6 beschrieben anhand von Proteinlösung (pH 7,5) bestimmt. Die relative Messung wurde zweimal in unterschiedlichen Proteinaufreinigungen wiederholt, die Fehler stellen die Standardabweichungen dar. Die absolute Messung der Quantenausbeute wurde an einer Proteinaufreinigung gemessen. Die Messung wurde zehnmal wiederholt. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung. Die Messung der Fluoreszenzlebenszeiten ( $\tau$ ) ist in Absatz 5.3.7.7 beschrieben. Die angegebenen Lebenszeiten basieren auf mindestens drei unabhängigen Messungen in lebenden Vimentinfusionsprotein- exprimierenden HeLa-Zellen. Die pH-abhängigen Fluoreszenzmessungen wurden wie in Absatz 5.3.5 beschrieben durchgeführt. Die Daten basieren auf fünf Messungen. Für die Helligkeitsmessung in Säugerzellen wurde das virale Expressionssystem des SF-Virus verwendet (siehe Absatz 5.2.5). Dem Zellmedium wurde zwei Stunden vor der Messung 25  $\mu$ M BV hinzugefügt (siehe Absatz 5.2.3). Die Helligkeit wurde durch Messung der IR-Fluoreszenz im Bereich zwischen 720 nm und 766 nm nach Anregung mit 671 nm mithilfe des FACS-Geräts (siehe Absatz 5.3.7.2) bestimmt.

Die Variante W3.50, welche die Mutation G270R enthält weist unter den generierten NIR RSFPs die größte zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen auf. Diese ist um das 1,4-Fache gesteigert gegenüber der Ausgangsvariante W3. Alle Varianten mit stärker verbessertem Schalthintergrund (W3.37, W3.75 und W3.103) weisen eine Reduzierung der zellulären Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen gegenüber der Ausgangsvariante auf (siehe Tabelle 3-2).

### 3.4.5 Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen

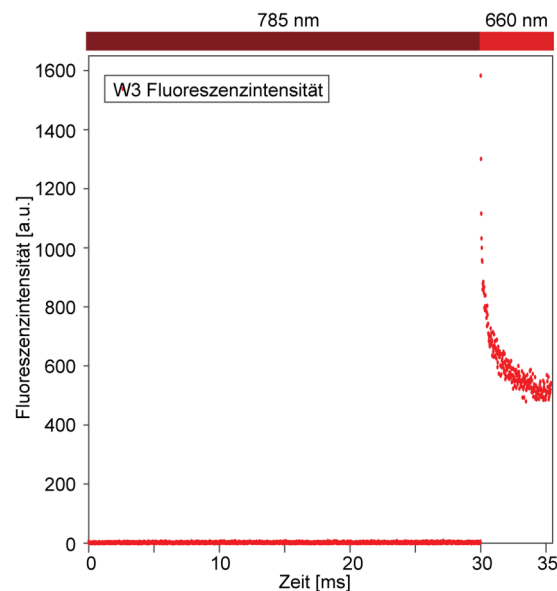
Wie in Absatz 5.3.7.1 beschrieben, weist das für das Screening verwendete automatisierte Mikroskop Limitationen bezüglich der Zeitauflösung und der Genauigkeit der einprogrammierten Pulssequenzen auf. Die beschriebenen Pausen verhindern beispielsweise die genaue Untersuchung der Stabilität der Zustände und des Übersprechens zwischen den Schaltwellenlängen. Hinzu kommt, dass zu Beginn der vorliegenden Arbeit weder für die konfokale Mikroskopie noch für die RESOLFT-Nanoskopie der neu entwickelten NIR RSFPs ein geeigneter kommerzieller oder gruppenintern entworfener mikroskopischer Aufbau existierte. Aus diesen Gründen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Unterstützung und Anleitung von



Dr. Marcel Leutenegger der in Abbildung 5-2, A schematisch skizzierte, mikroskopische Aufbau entworfen und gebaut. Der Aufbau ist auf die Verwendung der neu generierten NIR RSFPs optimiert. Das Detektionsfenster reicht von 698 -766 nm und deckt damit, wie in Abbildung 5-2, B zu sehen ist, das Emissionsspektrum der generierten NIR RSFPs optimal ab. Die Anregungs-/Ausschaltwellenlänge und die Anschlagwellenlänge wurden mit 660 nm und 785 nm möglichst weit auseinandergezogen, um ein Übersprechen zwischen den Schaltwellenlängen zu minimieren.

In diesem Kapitel wird die Charakterisierung der Schalteigenschaften der Varianten W3.37 und W3.103 im Vergleich zu W3 unter konfokalen Bedingungen zusammengefasst. Alle gezeigten Daten wurden an dem in Absatz 5.4.3 beschriebenen, auf NIR RSFPs optimierten konfokalen Aufbau aufgenommen. Die angegebenen Leistungen beziehen sich auf die Rückapertur der Objektivlinse. Zur Kalkulierung der tatsächlichen Leistungen beziehungsweise Intensitäten muss der Verlust durch das Objektiv sowie die aktuelle Wellenlänge und somit PSF-Größe beachtet werden (siehe Tabelle 11-5). Das als Ausgangsvariante gewählte Bakteriophytochrom weist, wie bereits erwähnt, einen konventionellen Photozyklus auf und ist somit ein Negativschalter. Zur Bestimmung der Schalteigenschaften am konfokalen Aufbau wurde der 785 nm Laser zum Anschalten der Fluorophore und der 660 nm Laser zum Anregen der Fluoreszenz und zum Ausschalten der Fluorophore verwendet. Als Probe dienten lebende HeLa-Zellen, die Fusionsproteine des jeweiligen generierten NIR RSFPs mit Vimentin exprimierten.

Abbildung 3-22 zeigt beispielhaft an der Ausgangsvariante W3 die detektierte, aufsummierte Fluoreszenzantwort auf eine 50-Mal wiederholte Pulssequenz aus 30 ms 785 nm ( $2,5 \mu\text{W}$ ) und 6,4 ms 660 nm ( $3,8 \mu\text{W}$ ). Die Daten wurden jeweils bi-exponentiell gefittet, um anhand des Fits die Schaltcharakteristika, wie den Schalthintergrund und die Schaltgeschwindigkeit zu bestimmen (siehe Absatz 5.3.7). Für die Bestimmung des Schalthintergrunds wurde die Proteinpopulation nach dem Anschalten so lange ausgeschaltet, bis die Kinetik in die Sättigung geht. Diese Länge wurde an die entsprechende Laserleistung angepasst. Der Schalthintergrund ergibt sich aus dem Anteil der Hintergrundfluoreszenz im Aus-Zustand von der Maximalfluoreszenz im An-Zustand.

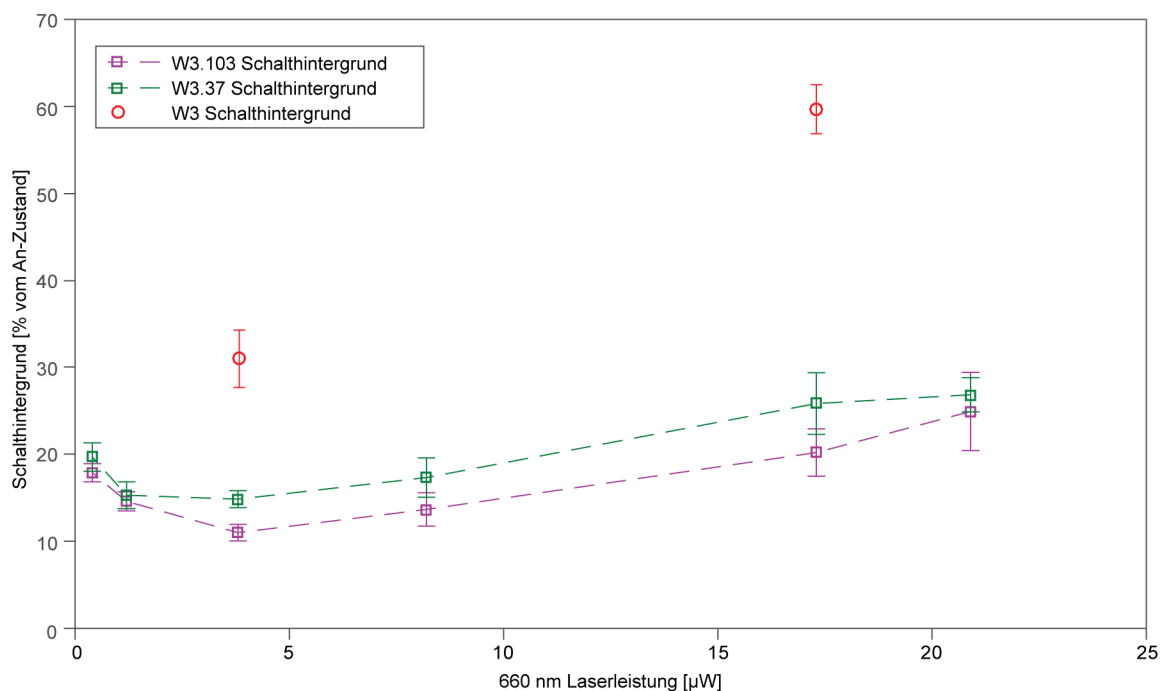


**Abbildung 3-22: Schaltschema am konfokalen Aufbau zur Charakterisierung der NIR RSFPs.**

Zu sehen ist die Fluoreszenzantwort der Vorlagevariante W3 auf ein Schaltschema von 30 ms 785 nm Laser ( $2,9 \mu\text{W}$ ) zum Anschalten der Proteine und direkt darauffolgend 6,4 ms 660 nm Laser ( $3,8 \mu\text{W}$ ) zum Anregen der Fluoreszenz und zum Ausschalten der Fluorophore. Das Signal von 50 aufeinanderfolgenden Messzyklen gleicher Sequenz wurde aufsummiert. Für die Auswertung der im folgenden Absatz vorgestellten Ergebnisse wurde die Fluoreszenzantwort auf den 660 nm Laser mit einem bi-exponentialen Fit ausgewertet.

### 3.4.5.1 Abhängigkeit des Schalthintergrunds von der 660 nm Laserleistung

Abbildung 3-23 zeigt die Abhängigkeit des Schalthintergrunds der Variante W3.37 und W3.103 im Vergleich zu zwei Messpunkten der Ausgangsvariante W3. Hierfür wurde mit variierender Leistung des 660 nm Lasers die Ausschaltkinetik der Varianten gemessen und anhand des exponentiellen Fits der Schalthintergrund bestimmt. Jedem Messpunkt liegen mindestens acht unabhängige Messungen mit je 50 aufsummierten Wiederholungen in lebenden Vimentinfusionsprotein- exprimierenden HeLa-Zellen zugrunde. Die Länge des 660 nm Laserpulses für das Ausschalten der Fluorophore wurde an die jeweilige Leistung angepasst, um zu gewährleisten, dass die Moleküle derselben Lichtdosis ausgesetzt waren. Dies ist nötig, um Parameter wie das Bleichen der RSFPs aus der Auswertung ausschließen zu können.



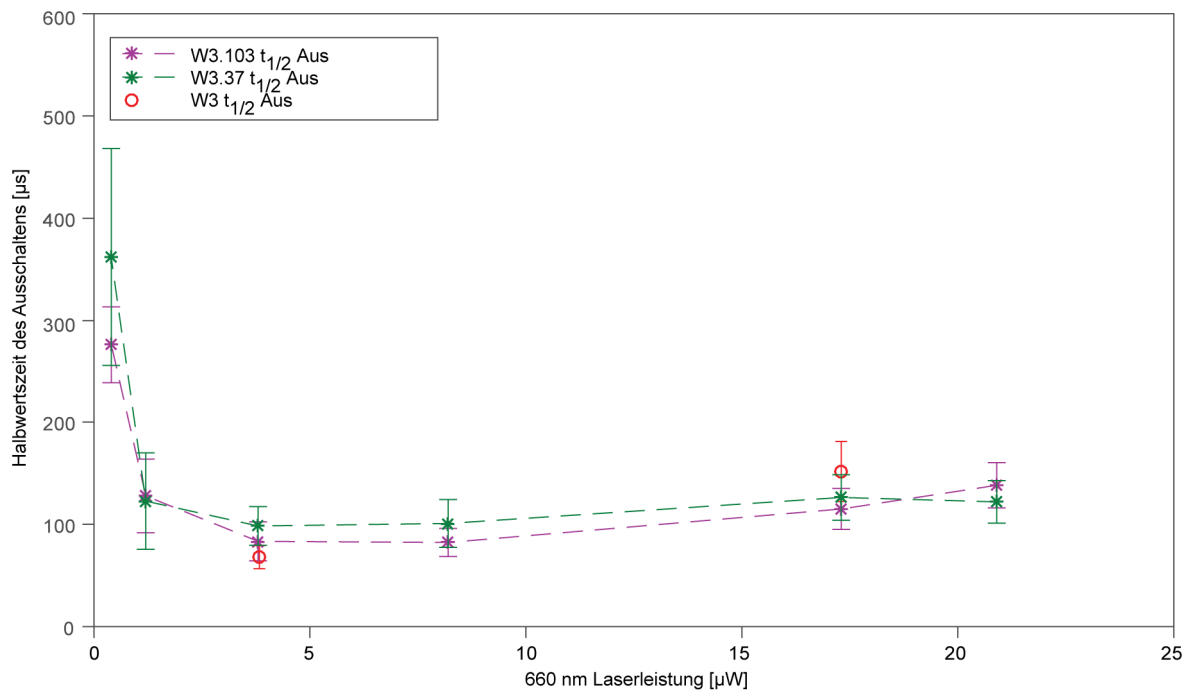
**Abbildung 3-23: Abhängigkeit des Schalthintergrunds von der Laserleistung des 660 nm Lasers.**

Leistungsabhängigkeit des Schalthintergrunds der Varianten W3.37 und W3.103 verglichen zu W3. Der erreichte Schalthintergrund in Prozent vom An-Zustand ist gegen die Leistung des 660 nm Laserpulses aufgetragen. Die Dauer des 660 nm Laserpulses wurde der jeweiligen Leistung angepasst. Es wurden Datenpunkte für Laserleistungen von 20,9 µW (3,5 ms); 17,3 µW (4,1 ms); 8,2 µW (5,4 ms); 3,8 µW (6,4 ms); 1,2 µW (6,8 ms) sowie 0,4 µW (7 ms) aufgenommen. Für die Leistungswerte 17,3 µW und 3,8 µW wurde jeweils eine Vergleichsmessung mit der Vorlagevariante W3 hinzugefügt (rote Messpunkte). Als An-Zustand wurde das erreichte Fluoreszenzsignal nach einem 30 ms langen 785 nm Laserpuls (2,9 µW) definiert. Vor dem Auslesen und Ausschalten des Fluoreszenzsignals mit dem 660 nm Laser wurden die Proteine jeweils mit einem entsprechenden Laserpuls (785 nm) angeschaltet. Die Farbcodierung ist der Legende zu entnehmen. Jedem Datenpunkt liegen mindestens acht unabhängige Messungen mit je 50 aufsummierten Wiederholungen zugrunde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Messungen wurden in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt.

Die Abbildung 3-23 zeigt deutlich für beide Varianten die starke Verbesserung des Schalthintergrunds gegenüber der Ausgangsvariante W3. Der Unterschied zwischen W3 und W3.37 beziehungsweise W3 und W3.103 und auch zwischen W3.37 und W3.103 fällt deutlich stärker aus als in Abbildung 3-19 für die Bedingungen des automatisierten Screening-Mikroskops zu sehen. Jedoch wird mit der Variante W3.103 an beiden Aufbauten der geringste Schalthintergrund erreicht. Dieser liegt unter konfokalen Bedingungen bei minimal 10-12 % des Signals des An-Zustands. Sowohl für W3 als auch für W3.37 und W3.103 ist zu sehen, dass eine Steigerung der 660 nm Laserleistung zu einer Erhöhung des Schalthintergrunds führt. Bei W3.37 und W3.103 wird der geringste Schalthintergrund bei einer Laserleistung von 3,8 µW erreicht. Die fünffache Erhöhung der Leistung führt bei allen drei Varianten ungefähr zu einer Verdopplung des Schalthintergrunds. Leistungen unterhalb von 4 µW führen bei den Varianten W3.37 und W3.103 zu einer schwachen Erhöhung des Schalthintergrunds.

### 3.4.5.2 Abhängigkeit der Halbwertszeit des Ausschaltens von der 660 nm Laserleistung

Die Schaltgeschwindigkeit des RSFPs bestimmt die Verweildauer pro Pixel in der RESOLFT-Nanoskopie und spielt daher insbesondere in der Mikroskopie von lebenden und sich folglich bewegenden Zellen eine große Rolle für den Erfolg der Methode.



**Abbildung 3-24: Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Laserleistung des 660 nm Lasers.**

Leistungsabhängigkeit der Halbwertszeit der Varianten W3.37 und W3.103 verglichen zu W3. Die erreichte Halbwertszeit der Ausschaltkinetik in  $\mu\text{s}$  ist gegen die Leistung des 660 nm Laserpulses aufgetragen. Die Dauer des Laserpulses wurde der jeweiligen Laserleistung angepasst. Es wurden Datenpunkte für Laserleistungen von 20,9  $\mu\text{W}$  (3,5 ms); 17,3  $\mu\text{W}$  (4,1 ms); 8,2  $\mu\text{W}$  (5,4 ms); 3,8  $\mu\text{W}$  (6,4 ms); 1,2  $\mu\text{W}$  (6,8 ms) sowie 0,4  $\mu\text{W}$  (7 ms) aufgenommen. Für die Leistungswerte 17,3  $\mu\text{W}$  und 3,8  $\mu\text{W}$  wurde jeweils eine Vergleichsmessung mit der Vorlagevariante W3 hinzugefügt (rote Messpunkte). Vor dem Auslesen und Ausschalten des Fluoreszenzsignals wurden die Proteine mit einem 785 nm Laserpuls von 30 ms-Länge (2,9  $\mu\text{W}$ ) angeschaltet. Die Farbcodierung ist der Legende zu entnehmen. Jedem Datenpunkt liegen mindestens acht unabhängige Messungen mit je 50 aufsummierten Wiederholungen zugrunde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Messungen wurden in lebenden, Vimentininfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt.

Abbildung 3-24 fasst den Einfluss der 660 nm Laserleistung auf die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik der Varianten W3.37 und W3.103 im Vergleich zu zwei exemplarischen Messpunkten der Ausgangsvariante W3 zusammen. Es ist deutlich zu sehen, dass in dem getesteten Leistungsbereich die Geschwindigkeitssteigerung der Ausschaltkinetik bereits früh gesättigt wird. Bereits bei einer 660 nm Laserleistung von 4  $\mu\text{W}$  ist die minimale Halbwertszeit der Ausschaltkinetik erreicht. Diese liegt bei W3.37 bei ungefähr 95  $\mu\text{s}$  und bei W3.103 bei ungefähr 83  $\mu\text{s}$ . Bei beiden Varianten ist eine leichte Steigerung der Halbwertszeit bei gesteigerter Laserleistung zu beobachten. Die fünffache Steigerung der Leistung führt zu einer 1,2-1,7-fachen Steigerung der Halbwertszeit. Die Ausgangsvariante W3 liegt mit ungefähr 70  $\mu\text{s}$  in einem ähnlichen Bereich, hier fällt die Steigerung der Halbwertszeit bei Erhöhung der Laserleistung jedoch etwas stärker aus.

3.4.5.3 Abhängigkeit der Anschaltkinetik von der 785 nm Laserleistung

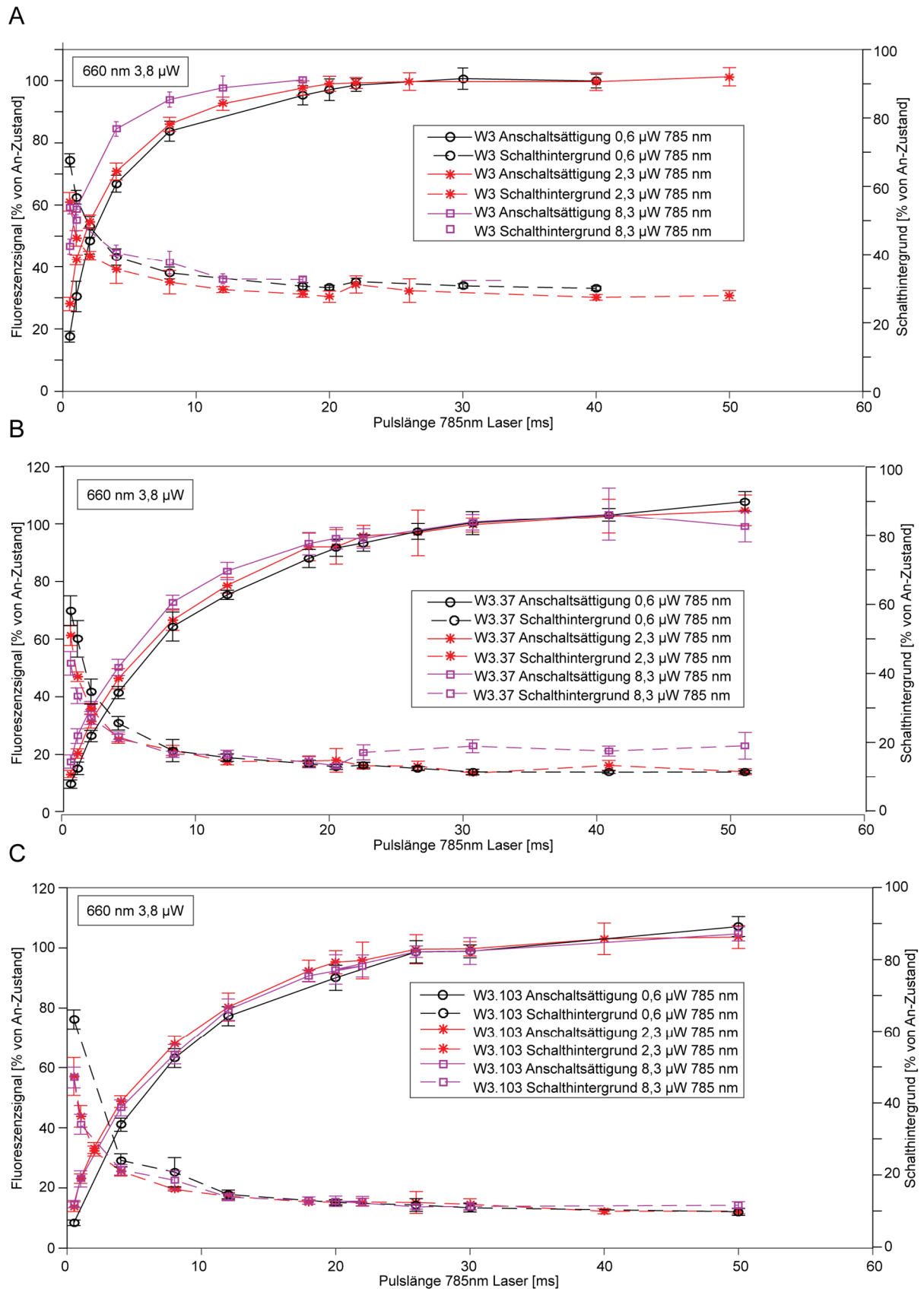


Abbildung 3-25: Anschaltsättigung und Schalthintergrund der Varianten W3, W3.37 und W3.103 bei verschiedenen Leistungen des 785 nm Lasers.

A: W3, B: W3.37, C: W3.103. Das erreichte Fluoreszenzsignal in Prozent vom An-Zustand (linke Y-Achse) ist gegen die Länge des 785 nm Laserpulses in ms aufgetragen (durchgezogene Linien). In unterbrochenen Linien ist der zugehörige Schalthintergrund in Prozent vom An-Zustand (rechte Y-Achse) aufgetragen. Als An-Zustand wurde das erreichte Fluoreszenzsignal nach einem 30 ms langen 785 nm Laserpuls definiert. Nach

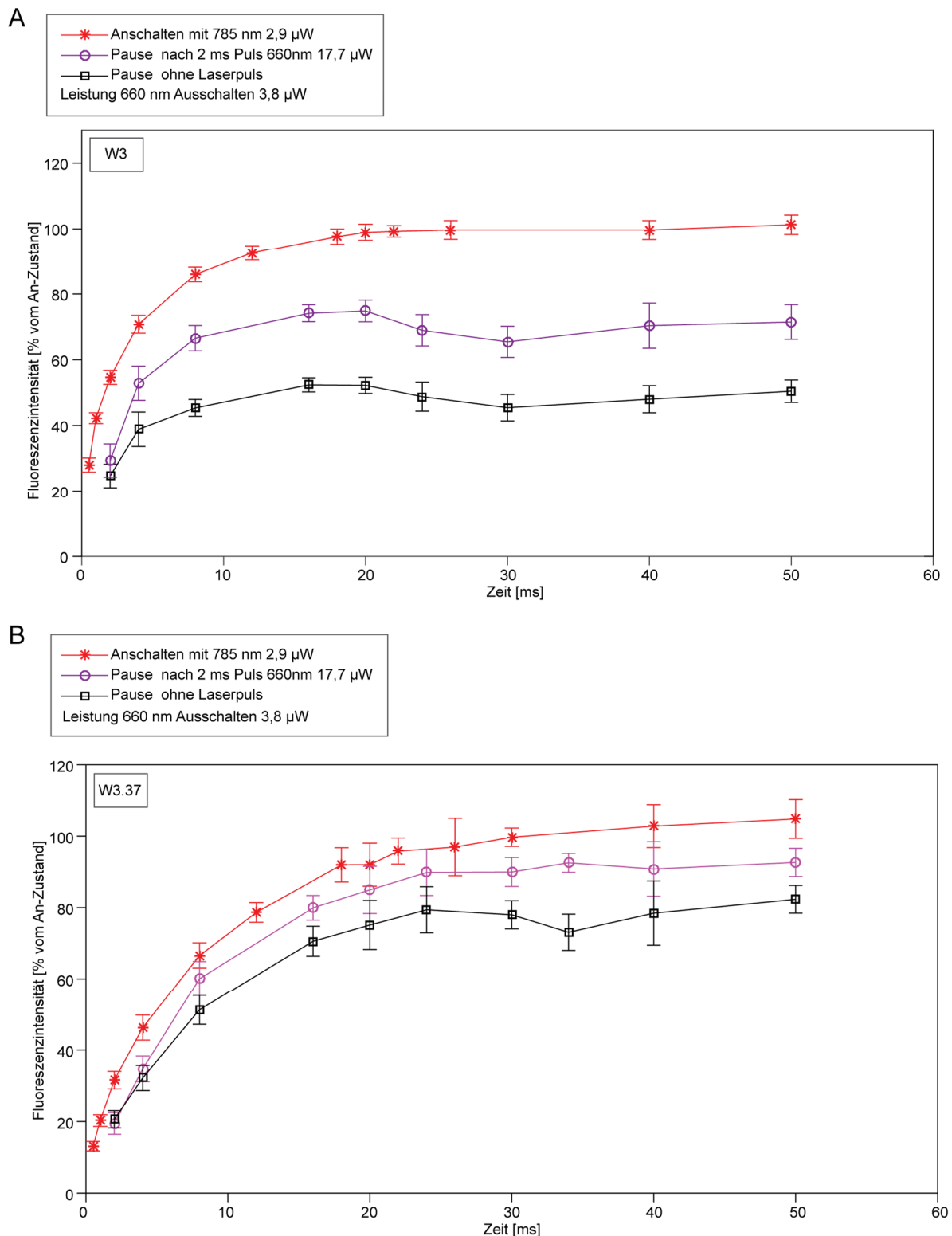
jedem Anschaltzyklus wurden die Proteine durch einen 660 nm Laserpuls ausgeschaltet (2,8  $\mu\text{W}$ , 6,4 ms). Die Farbcodierung ist der Legende zu entnehmen. Jedem Datenpunkt liegen mindestens acht unabhängige Messungen mit je 50 aufsummierten Wiederholungen zugrunde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Messungen wurden in lebenden, Vimentin-Fusionsproteinen exprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt.

Die Anschaltkinetik der Varianten kann nicht aufgenommen werden, da das Auslesen der Fluoreszenz mit dem 660 nm Laser bereits bei niedrigen Leistungen zum Ausschalten der Proteine führt und folglich die Anschaltkinetik verfälscht. Die benötigte Zeit für den Anschaltvorgang wurde bestimmt, indem eine wiederholte Reihe an Messungen mit zwischen den Messungen gesteigerter Länge des 785 nm Laserpulses durchgeführt wurde. Zur Auswertung ist in Abbildung 3-25 die Fluoreszenzintensität in Prozent des An-Zustands gegen die Länge des 785 nm Laserpulses aufgetragen. Diese Messreihe wurde für die Varianten W3 (A), W3.37 (B) und W3.103 (C) jeweils für die Laserleistungen 0,6  $\mu\text{W}$ , 2,3  $\mu\text{W}$  und 8,3  $\mu\text{W}$  durchgeführt. Als An-Zustand wurde hierfür die Intensität nach einer Aktivierung für 30 ms mit 785 nm definiert, da bei längeren Anschaltzeiten für keine der generierten Varianten eine weitere Steigerung des Fluoreszenzsignals zu beobachten war.

Für die Ausgangsvariante W3 zeigte sich (siehe Abbildung 3-25, A), dass die Steigerung der 785 nm Laserleistung zu einer leichten Beschleunigung des Anschaltprozesses führt. Die Halbwertszeit des Anschaltprozesses liegt sowohl bei einer 785 nm Laserleistung von 0,6  $\mu\text{W}$  als auch bei einer Laserleistung von 2,3  $\mu\text{W}$  bei 2 ms. Bei einer Steigerung der 785 nm Laserleistung auf 8,3  $\mu\text{W}$  wird sie auf ungefähr 0,5 ms reduziert. Für die Varianten W3.37 und W3.103 (siehe Abbildung 3-25, B und C) kann kein so eindeutiger Effekt nachgewiesen werden. Die Schwankungen liegen noch innerhalb der Standardabweichungen. Diese sind aufgrund des starken Einflusses der Z-Position auf die Messergebnisse generell relativ groß. Hinzu kommen die sehr kurzen Halbwertszeiten des Ausschaltprozesses (siehe Abbildung 3-24). In Kombination mit der Zeitauflösung des Aufbaus von 20  $\mu\text{s}$  können diese dazu führen, dass der erste Messpunkt der Ausschaltkinetik nicht immer mitgemessen wird und sich somit die Schwankungen zwischen den Messungen erhöhen. Für die Varianten W3.37 und W3.103 liegen die Halbwertszeiten der Anschaltkinetiken für 2,3  $\mu\text{W}$  und 8,3  $\mu\text{W}$  Laserleistung bei 4 ms und werden bei 0,6  $\mu\text{W}$  leicht verlangsamt. Die Kinetik des Anschaltens lässt sich demnach, wie vorab für die Ausschaltkinetik beschrieben, im gemessenen Leistungsbereich nicht stark beeinflussen. Bei allen drei Varianten ist der Schalthintergrund nicht von der Leistung des 785 nm Lasers abhängig.

#### 3.4.5.4 Stabilität des Aus-/ und An-Zustands

Bei der Charakterisierung des Schaltverhaltens am automatisierten Mikroskop für das Screening und am konfokalen Charakterisierungsaufbau fiel auf, dass der Aus-Zustand nicht langlebig ist. Während der ansteuerungsbedingten Pause von 15 ms zwischen den Laserpulsen, welche am automatisierten Mikroskop bislang nicht umgangen werden konnte, veränderte sich das Gleichgewicht schon in Richtung eines fluoreszierenden Zustands. Das genaue Maß des selbständigen Übergangs in einen fluoreszierenden Zustand und vor allem die Zeitspanne, in welcher die Proteine im Aus-Zustand verweilen, ist mit dem automatisierten Mikroskop nicht bestimmbar, da es ansteuerungsbedingte Pausen zwischen den einprogrammierten Pulssequenzen aufweist und die Dauer der Laserpulse nicht exakt programmierbar ist (siehe Absatz 5.3.7.1).



**Abbildung 3-26: Stabilität des Aus-Zustands.**

A: Ausgangsvariante W3. B: Variante W3.37. Die Fluoreszenzintensität als prozentualer Anteil des An-Zustands ist gegen die Zeit in ms aufgetragen. Als An-Zustand wurde die Fluoreszenzintensität nach Bestrahlung mit 785 nm Licht (2,9  $\mu$ W) für 30 ms definiert. Der rote Graph repräsentiert hierbei jeweils die Werte, welche nach unterschiedlich langer Bestrahlung mit 785 nm Licht (2,9  $\mu$ W) erreicht wurden. Hierbei stellt die X-Achse also die Länge des 785 nm Laserpulses dar. Der violette Graph stellt die Werte dar, welche durch einen Puls des 660 nm Lasers von hoher Leistung (17,7  $\mu$ W) und einer darauffolgenden Pause erreicht wurden. Hierbei stellt die X-Achse also die Länge der Pause nach dem Puls des 660 nm Lasers dar. Der schwarze Graph repräsentiert die Werte, welche durch verschiedene lange Pausen erreicht wurden. Die X-Achse gibt demnach hier die Länge der Pause nach dem normalen Ausschaltprozess an.

Jedem Datenpunkt liegen mindestens acht unabhängige Messungen mit je 50 aufsummierten Wiederholungen zugrunde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Messungen wurden in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt.

Abbildung 3-26 zeigt eine Zusammenstellung von Messungen, um die Stabilität des Aus-Zustands bei den Varianten W3 und W3.37 zu evaluieren. Hierfür wurde nach dem Ausschalten der Proteine eine Pause mit variabler Länge eingefügt und darauffolgend die Fluoreszenzintensität an derselben Stelle ermittelt (schwarze, durchgezogene Linien). Aus der entstehenden Kurve können zwei interessante Parameter bestimmt werden. Die Halbwertszeit der Stabilität des Aus-Zustands sowie das Equilibrium, welches sich durch den automatischen Rückfall einstellt. Dieses wird hier als Kurzzeitequilibrium bezeichnet, da nicht mit Sicherheit zu sagen ist, ob es mit dem Grundzustand (Langzeitequilibrium) der Proteine übereinstimmt. Dieser Grundzustand ist schwer zu bestimmen, da bereits das Fokussieren auf die Probe mit dem Anregungslaser einen Einfluss auf den Zustand der Proteine hat. Das Kurzzeitequilibrium liegt bei W3 bei 50 % und bei W3.37 bei 80 % der Fluoreszenz des An-Zustands. Die Halbwertszeit der Stabilität des Aus-Zustands, welche durch den Rückfall in das Kurzzeitequilibrium bestimmt wird, liegt bei W3 bei 2 ms und bei W3.37 bei 4 ms.

Die violette, durchgezogene Linie in Abbildung 3-26 steht jeweils für die Fluoreszenzintensität, welche durch das Einfügen eines 660 nm Laserpulses von 2 ms (17,7  $\mu\text{W}$ ) nach dem Ausschalten und vor einer variierenden Pause erreicht wird. Bei beiden Varianten wird bei der Messung mit 660 nm Laserpuls eine höhere Fluoreszenzintensität erreicht als bei der vergleichbaren Messung ohne Laserpuls. Dies bedeutet, dass der 660 nm Laser einen Einfluss auf die Stabilität des Aus-Zustands hat.

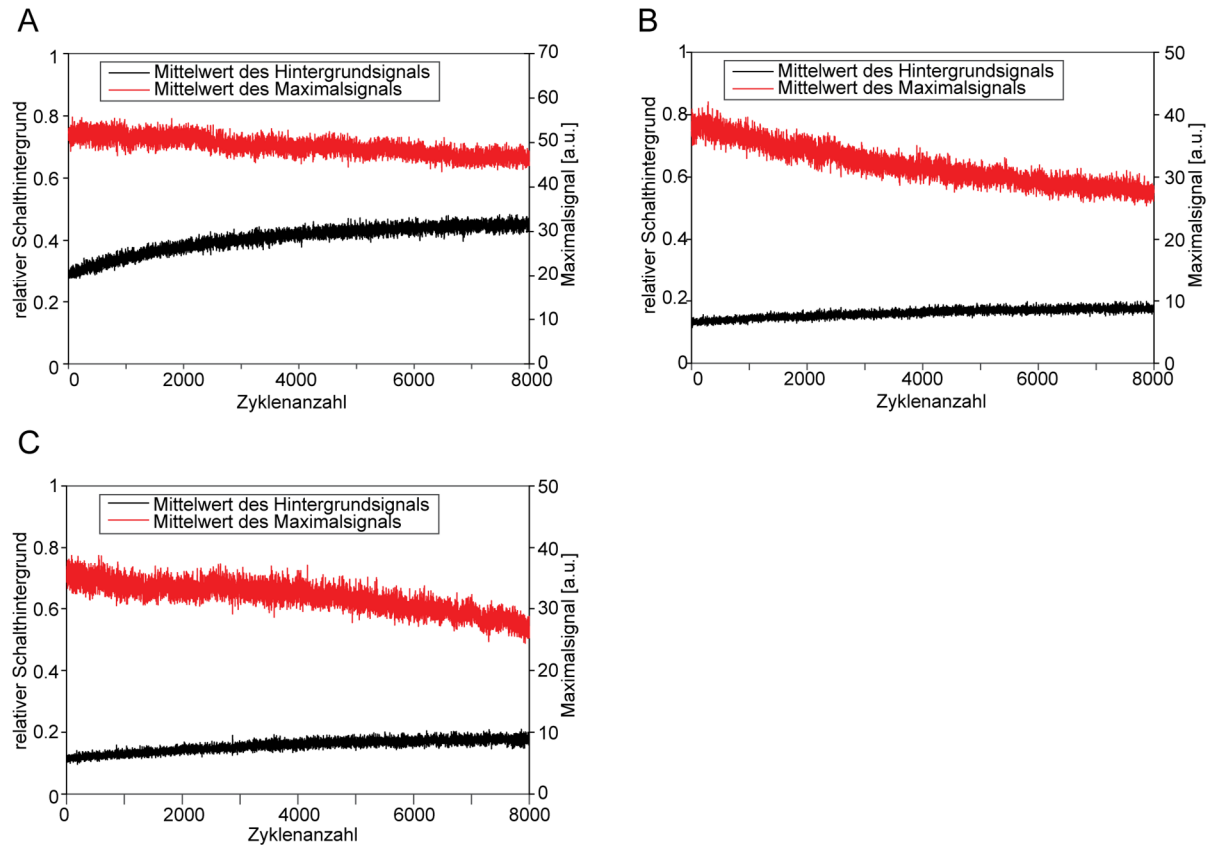
Die Fluoreszenzintensitäten, welche sich nach verschiedenen langen Pulsen des 785 nm Lasers einstellen, sind in Abbildung 3-26 in der roten durchgezogenen Linie dargestellt. Die Sättigung dieser Kurve entspricht demnach dem An-Zustand der Fluorophore. Bei beiden gemessenen Varianten wird durch den 660 nm Laserpuls hoher Leistung mit darauffolgender Pause (violette durchgezogene Linie) ein Equilibrium zwischen dem vorab beschriebenen Kurzzeitequilibrium (schwarze durchgezogene Linie) und dem An-Zustand (Sättigung, rote durchgezogene Linie) erreicht. Dies liegt für W3 bei 75 % des An-Zustands und für W3.37 bei 90 % des An-Zustands.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei beiden Varianten der Aus-Zustand instabil ist und thermisch in einen fluoreszierenden Zustand übergeht. Ebenso lässt sich der Aus-Zustand durch eine hohe Intensität des 660 nm Lasers ansteuern und in einen fluoreszierenden Zustand transferieren. In beiden Varianten wird weder durch eine Pause und den thermischen Übergang noch durch Anregung mit einer hohen Leistung des 660 nm Lasers das Fluoreszenzniveau des An-Zustands erreicht. Hierfür ist das Anschalten mit 785 nm nötig. Die Differenz zwischen den verschiedenen erreichten Zuständen ist jedoch bei W3.37 kleiner als bei W3.

Auch die Stabilität des An-Zustands wurde bestimmt. Hierfür wurde jeweils eine Position in der Probe angeschaltet (30 ms, 785 nm, 2,3  $\mu\text{W}$ ), die Fluoreszenzintensität bestimmt und die Position in der Probe ausgeschaltet (6,4 ms, 660 nm, 3,8  $\mu\text{W}$ ). Nach erneutem Anschalten der Probe wurde eine sechsminütige Pause eingefügt und nach Ablauf der Pause erneut die Fluoreszenzintensität bestimmt. Die Messung ergab, dass die Varianten nach dem Anschalten mindestens sechs Minuten in dem angeschalteten Zustand verbleiben. Der An-Zustand der Fluorophore ist unter den gegebenen Umständen demnach deutlich stabiler als der Aus-Zustand.

### 3.4.5.5 Bleichstabilität der entwickelten NIR RSFPs

Die Bleichstabilität von RSFPs setzt sich aus dem Bleichen des An-Zustands und der Schaltermüdung zusammen. Die Anzahl an Schaltzyklen, die ein RSFP schalten kann, bevor es gebleichen ist, ist kritisch für seine Verwendung in der RESOLFT-Nanoskopie (Hell, 2009).



**Abbildung 3-27: Bleichverhalten der generierten Varianten W3.37 und W3.103 im Vergleich zu W3.**

A: W3, B: W3.37, C: W3.103. Der relative Schalthintergrund als Anteil an der Fluoreszenz des An-Zustands (linke Y-Achse) ist gegen die Zyklanzahl aufgetragen (schwarze Linie). Das entsprechende Maximalsignal über 8000 Schaltzyklen (rechte Y-Achse) ist in rot dargestellt. Für die Messung wurden die in den vorab dargestellten Messungen evaluierten optimalen Laserleistungen verwendet (660 nm Laser, 3,8  $\mu$ W für 6,4 ms; 785 nm Laser, 2,9  $\mu$ W für 30 ms). Jeder Grafik liegen die gemittelten Werte von mindestens 15 unabhängigen Messungen zugrunde. Die Messungen wurden in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt.

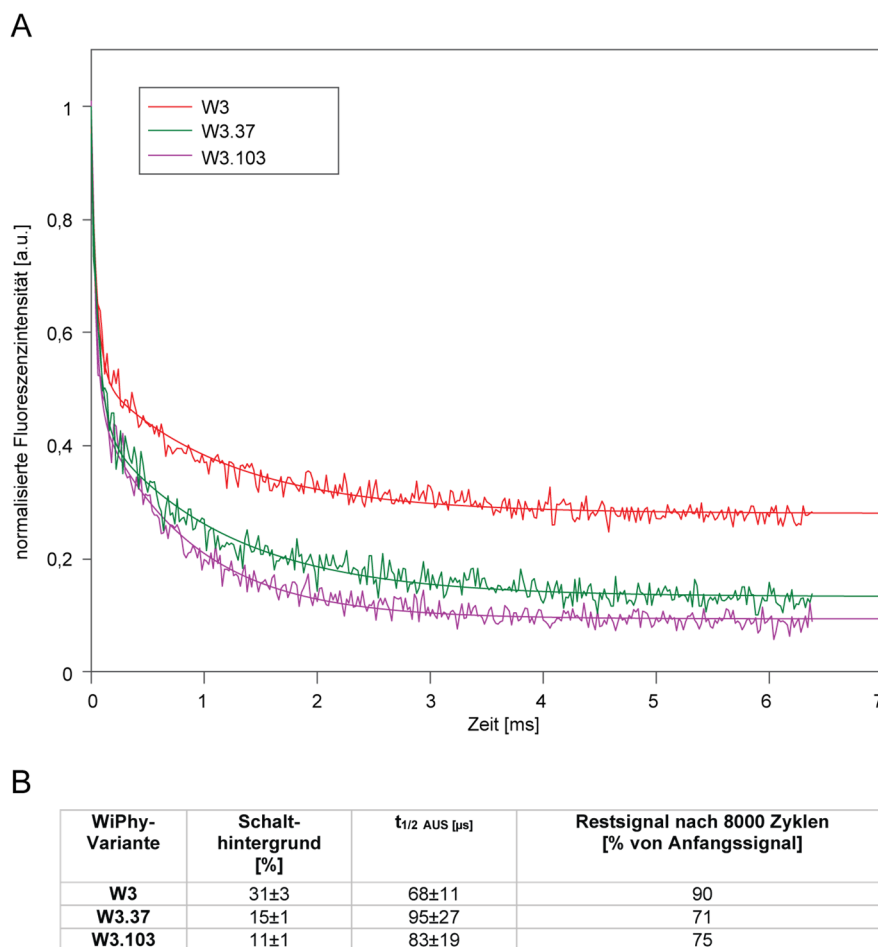
Um das Bleichverhalten der generierten Varianten zu bestimmen wurden auf einer Position in lebenden Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen 8000 Schaltzyklen mit den in den vorherigen Messungen bestimmten optimalen Schaltparametern durchgeführt. Jede Grafik (siehe Abbildung 3-27), basiert auf mindestens 15 unabhängigen Messungen. Das Bleichverhalten der Varianten W3 (A), W3.37 (B) und W3.103 (C) zeigt deutlich, dass die generierten Bakteriophytochrom-basierten NIR-RSFPs deutlich stabiler sind als die grünen sowie roten GFP-basierten RSFPs (Grotjohann et al., 2012; Lavoie-Cardinal et al., 2014). Die Abnahme des Maximalsignals nach 8000 Schaltzyklen ist mit 14 % bei der Ausgangsvariante W3 am geringsten. Diese Variante ist jedoch aufgrund des sehr hohen Schalthintergrunds nicht verwendbar für die RESOLFT-Nanoskopie. Beide Varianten mit reduziertem Hintergrund zeigen mit ungefähr 25 % Rückgang des Maximalsignals nach 8000 Schaltzyklen ein etwas verstärktes Bleichverhalten.



### 3.4.5.6 Vergleich von W3.37 und W3.103 mit W3 unter den ermittelten optimalen Bedingungen

Wie in den vorangegangenen Abschnitten zu sehen ist, weisen die generierten NIR RSFPs mit dem stark reduzierten Schalthintergrund unter konfokalen Bedingungen ein deutlich verbessertes Schaltverhalten gegenüber der Ausgangsvariante W3 auf.

Die in Abbildung 3-28 zusammengefassten Daten wurden mit den in den vorangegangenen Experimenten ermittelten optimalen Zeiten und Laserleistungen aufgenommen. Für das Ausschalten ergab sich hierbei eine Zeit von 6,4 ms bei einer Leistung des 660 nm Lasers von 3,8  $\mu\text{W}$  und für das Anschalten eine Zeit von 30 ms bei einer Leistung des 785 nm Lasers von 2,9  $\mu\text{W}$ . Wie in Abbildung 3-25 zu sehen ist, wäre hier auch eine auf 20 ms verkürzte Zeit ausreichend gewesen.



**Abbildung 3-28: Vergleich der Varianten W3, W3.37 und W3.103 unter konfokalen Bedingungen.**

A: Ausschaltkinetiken der Varianten W3, W3.37 und W3.103. Die Kinetiken wurden in lebenden Vimentinfusionsprotein-expressierenden HeLa-Zellen aufgenommen (660 nm Laser, 3,8  $\mu\text{W}$  für 6,4 ms). Die jeweilige Position wurde vorab angeschaltet (785 nm Laser, 2,9  $\mu\text{W}$  für 30 ms). In der Grafik dargestellt ist jeweils eine repräsentative Messung und der biexponentielle Fit der Daten. Jedem Graph liegen 20 aufsummierte Messungen auf einer Position zugrunde.

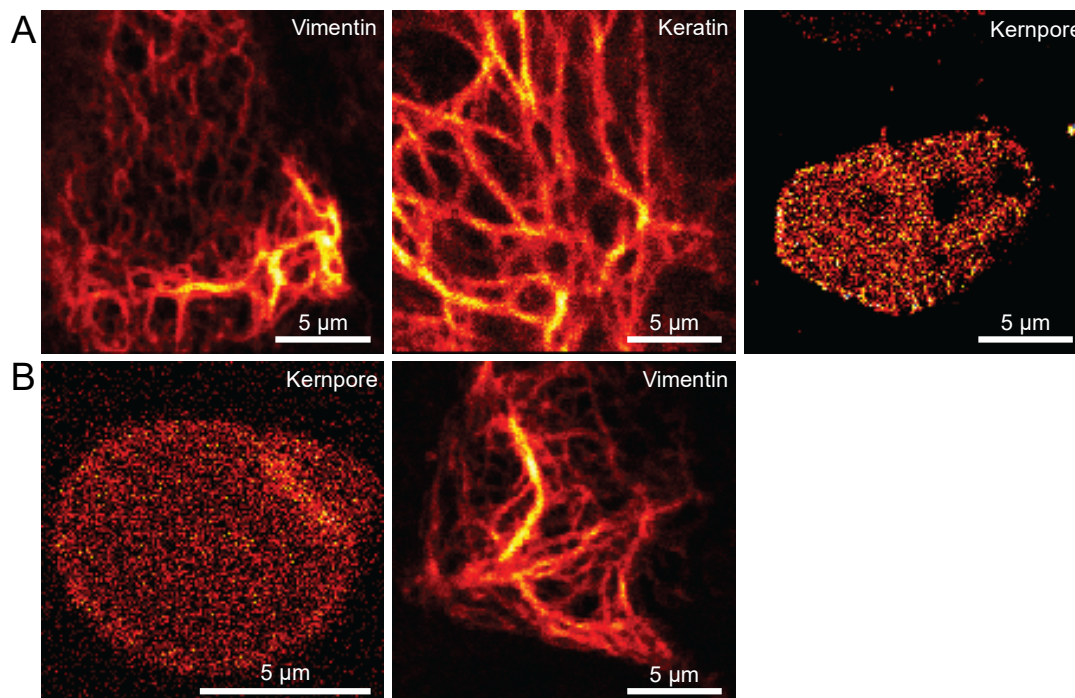
B: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten. Der Schalthintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik wurde anhand der Fits der jeweiligen Kinetik ermittelt. Jedem Wert liegen mindestens 15 unabhängige Messungen mit 20 Wiederholungen zugrunde. Die Fehler entsprechen der Standardabweichung. Das Restsignal nach 8000 Zyklen wurde durch Mittelung der zehn ersten und letzten Werte des gemittelten Maximalsignals über 8000 Schaltzyklen (siehe Abbildung 3-27) ermittelt.

Alle drei Varianten weisen eine sehr gute Bleichstabilität auf. Bei keiner der Varianten ist die Fluoreszenzintensität nach 8000 Zyklen auf die Hälfte des Maximums geblichen. Die Halbwertszeiten der Ausschaltkinetik unterscheiden sich nicht deutlich und liegen bei 68  $\mu\text{s}$  – 95  $\mu\text{s}$ . Der Parameter in dem sich die generierten NIR RSFPs sehr stark positiv von der Ausgangsvariante abheben ist der erreichte

Schalthergrund. Dieser ist bei W3.37 mit 15 % halbiert und bei W3.103 mit 11 % gedrittelt gegenüber W3. Diese Verbesserung sollte die Anwendung der Varianten in der RESOLFT-Nanoskopie ermöglichen.

### 3.4.6 Anwendung der generierten NIR RSFPs in der Mikroskopie

Wie vorab erwähnt, fehlte bei den in der Arbeitsgruppe vorhanden kommerziellen oder gruppenintern entworfenen Aufbauten bisher der langwelligere Anschaltlaser (785 nm), um das Mikroskopieren der NIR RSFPs zu ermöglichen. Mit dem auf NIR RSFPs spezialisierte, konfokale Aufbau (siehe Absatz 5.4.3) wurde erstmals die Mikroskopie der generierten NIR RSFPs ermöglicht. Somit konnte die für die Anwendung in der Mikroskopie erforderliche korrekte Lokalisierung der FPs an zellulären Zielproteinen getestet werden. Abbildung 3-29 ist eine repräsentative Zusammenstellung von lebenden Säugerzellen, welche Fusionsproteine mit den generierten NIR-RSFPs W3.37 und W3.103 exprimieren. Es wurden Konstrukte zur Lokalisierung der Proteine am Zytoskelett (W3.37-Vimentin, W3.37-Keratin 18, W3.103-Vimentin) und ein Konstrukt zur Lokalisierung in den Kernporen (W3.37-NUP50) generiert. Alle Konstrukte zeigen in Säugerzellen eine korrekte Lokalisierung.



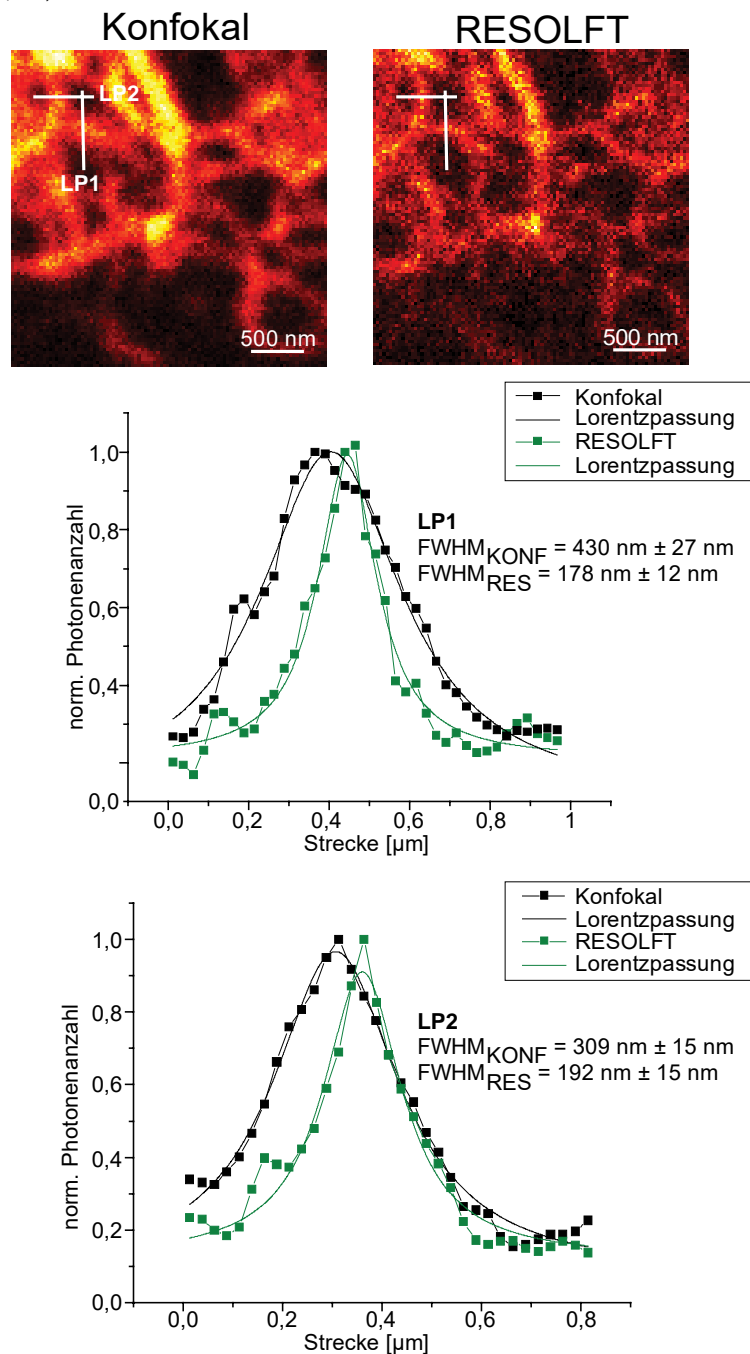
**Abbildung 3-29:** Repräsentative Zusammenstellung von in Säugerzellen exprimierten W3.37- beziehungsweise W3.103-Fusionsproteinen.

**A von links nach rechts:** Vimentin-Fusionsprotein (W3.37-Vimentin), Fusionsprotein mit Keratin 18 (W3.37-Keratin 18) und NUP50-Fusionsprotein (W3.37-Nup50-C10). **B von links nach rechts:** weiteres Beispiel für die Expression von W3.37-NUP50 und Vimentinfusionsprotein mit der Variante W3.103 (W3.103-Vimentin).

Alle Konstrukte wurden in HeLa-Zellen transfiziert. Alle Aufnahmen wurden an dem im Rahmen dieser Arbeit gruppenintern entworfenen NIR-Mikroskop aufgenommen (siehe Absatz 5.4.3). Etwa 2 Stunden vor dem Mikroskopieren wurde dem Zellmedium 25 µM BV hinzugefügt.

Mit der Variante W3.37 wurden darauffolgend erste Tests der RESOLFT-Nanoskopie durchgeführt. Als Probe dienten lebende, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen. Aufgrund des größeren Volumens des Doughnut-förmigen Laserspots wurde die Leistung des 660 nm Lasers zum Ausschalten des Doughnutvolumens angepasst und im Vergleich zu den als optimal ermittelten Bedingungen (siehe Abbildung 3-28) in etwa verdoppelt. Das Auslesen der Fluoreszenz wurde mit 66 µs kurz gewählt, da die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik der Fluorophore (siehe Abbildung 3-24) sehr schnell ist. Ein zu langes Auslesen der Fluoreszenz, würde dazu führen, dass die Sockelfluoreszenz, die durch den Schalthergrund der Fluorophore begründet ist, einer Auflösungsverbesserung entgegenwirken würde. Die Pulssequenz pro Pixel bestand demnach aus dem Anschalten (20 ms 785 nm, Gauss-förmig, 3,2 µW), Ausschalten (6,4 ms,

660 nm, Doughnut-förmig, 7,01  $\mu\text{W}$ ) und dem darauffolgenden Auslesen der Fluoreszenz (66  $\mu\text{s}$ , 660 nm, Gauss-förmig, 8,13  $\mu\text{W}$ ).



**Abbildung 3-30: RESOLFT-Nanoskopie unter Verwendung des NIR RSFPs W3.37.**

Konfokale Mikroskopie und RESOLFT-Nanoskopie einer W3.37-Vimentinfusionsprotein-exprimierenden, lebenden HeLa-Zelle. Die Linienprofile 1 und 2 wurden an den im Bild markierten Positionen gemessen. Die Daten basieren auf der Mittelung fünf benachbarter Pixel und dem Fit der Daten mittels Lorentzfit (durchgezogene Linien). Die Halbwertsbreite (*full width at half maximum*, FWHM) wurde anhand des Fits bestimmt. Die Aufnahmen sind  $5 \times 5 \mu\text{m}$  groß, mit einer Pixelgröße von 50 nm. Die Pulssequenz pro Pixel ist wie folgt: 20 ms 785 nm Gauss-Spot mit einer Leistung von 3,2  $\mu\text{W}$ , darauffolgendes Ausschalten des Doughnutvolumens für 6,4 ms mit 7,01  $\mu\text{W}$  des 660 nm Doughnut-förmigen Lasers und abschließendes Auslesen der Fluoreszenz für 66  $\mu\text{s}$  mit 8,13  $\mu\text{W}$  des 660 nm Lasers in Gauss-Form. Etwa 2 Stunden vor dem Mikroskopieren wurde dem Zellmedium 25  $\mu\text{M}$  BV hinzugefügt.

Wie in Abbildung 3-30 zu sehen ist, wurde bereits bei den ersten Tests der Variante W3.37 in der RESOLFT-Nanoskopie eine Auflösungsverbesserung um das bis zu 2,5-Fache erreicht. Die Aufnahme entstand während der ersten Tests und eine weitere Optimierung ist erforderlich.

Somit wurde erstmalig die Möglichkeit der RESOLFT-Nanoskopie mit den Wellenlängen 660 nm und 785 nm und einem NIR Bakteriophytochrom-basierten RSFP gezeigt.

## 4 Diskussion und Ausblick

Die hochauflösende Mikroskopie unter Verwendung von GFP-basierten (RS)FPs in lebenden Zellen war bisher auf den sichtbaren Bereich des Lichts begrenzt. Die in dieser Arbeit generierten NIR Bakteriophytochrom-basierten (RS)FPs heben diese Limitation auf. Mit der Variante W4.35 wurde erstmals mit einem Bakteriophytochrom-basierten FP STED-Nanoskopie durchgeführt.

Die spektralen Eigenschaften der im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Bakteriophytochrom-basierten NIR-RSFPs sind weiter in den nahen Infrarotbereich des Lichts verschoben, als alle bisher publizierten RSFPs. Die durchgeführte Positionsstudie ermöglicht zukünftig gezieltere Mutagenesen für die Generierung und Optimierung von NIR-RSFPs. Diese genauere Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen verhalf zu dem erstmaligen, erfolgreichen Test der Variante W3.37 in der RESOLFT-Nanoskopie.

### 4.1 Kombiniertes Screening

Für das Screening nach FPs mit einem externen Chromophor wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst ein neues, auf NIR (RS)FPs angepasstes, kombiniertes Screening in *E. coli*-Zellen und Säugerzellen etabliert (siehe Absatz 3.1). Der Transfer aus *E. coli*- in Säugerzellen erfolgte hierbei durch Virenpartikel.

Durch das kombinierte Screeningsystem ließen sich die zahlreichen Faktoren, von denen die zelluläre Helligkeit eines FPs mit externem Chromophor zusätzlich abhängt, wie die Affinität zum Chromophor, die Konzentration des Chromophors in der Zelle und die intrazelluläre Stabilität des Holo-proteins berücksichtigen (siehe Absatz 1.3.1.7 und 3.1, Shcherbakova et al., 2015b) und mit der Anforderung eines möglichst schnellen Screenings vereinbaren.

Der Nachteil des viralen Expressionssystems ist der Zeitaufwand, welcher sich durch die Erstellung der Virenpartikel ergibt. Eine normale Plasmidtransfektion wäre hier zeitsparender, jedoch bringt diese den Nachteil mit sich, dass immer mehrere Plasmide pro Zelle aufgenommen werden und dadurch immer ein Gemisch verschiedener Konstrukte exprimiert würde (Cohen et al., 2009). Eine Sortierung nach den Eigenschaften einzelner Varianten wäre somit unmöglich. Des Weiteren bringt die Transfektion eine große Varianz mit sich, da die Anzahl der während einer Transfektion pro Säugerzelle aufgenommenen Plasmide und das Expressionslevel stark schwanken können (Chen et al., 2011; Cohen et al., 2009; Cranfill et al., 2016; Kim und Eberwine, 2010). Das Expressionssystem des SF-Virus (siehe Absatz 5.2.5) wurde aufgrund des für diesen Virus bekannten Superinfektionsinhibitionsmechanismus‘ ausgewählt (DiCiommo und Bremner, 1998; Ehrenguber und Goldin, 2007; Singh et al., 1997). In Kombination mit den erstellten, stark verdünnt eingesetzten Viruspartikeln konnte somit davon ausgegangen werden, dass im Mittel nur ein Viruspartikel pro Zelle eindringt.

Das abwechselnde Screening in Säuger- und *E. coli*-Zellen ermöglicht die Fokussierung auf verschiedene Proteineigenschaften und verhindert die einseitige Verzerrung der Screeningergebnisse durch ein einseitiges System. Für die Generierung eines RSFPs ist die Möglichkeit des iterierenden Wechsels zwischen den Systemen essentiell, da es häufig Kopplungen zwischen Charakteristika der RSFPs gibt. Für die Varianten des GFP-basierten RSFPs rsGreen (Duwe et al., 2015) wurde beispielsweise eine Kopplung zwischen der Bleichstabilität und der Schaltgeschwindigkeit und zwischen der Quantenausbeute des Anschaltens und dem Extinktionskoeffizienten des Aus-Zustands beobachtet. Nach gruppeninternen Erfahrungswerten besteht häufig eine Kopplung zwischen der Verbesserung der Helligkeit und der Verlangsamung der Schaltkinetiken sowie der Erhöhung der Schalthintergrundwerte. Hinzu kommt, dass das Screening am FACS bisher noch die Limitation hat, dass RSFPs nur in ihrem Grundzustand sortiert werden können. Proteine, die im

Grundzustand nicht fluoreszierend sind, werden somit nicht erkannt. Der Einbau einer Vorschaltkammer zum Anschalten der Proteine würde diesen Mangel beheben und ist für zukünftige weitere Durchläufe empfehlenswert.

Für das Screening wurden die FPs in Säugerzellen zytosolisch exprimiert, um ein reines Screening nach der zellulären Helligkeit zu ermöglichen. Eine Fusion an zelluläre Zielproteine würde die Involvierung eines bildgebenden Verfahrens benötigen, da die reine Sortierung nach Helligkeit mithilfe des FACS-Gerätes zu einem erhöhten Risiko für Fehlsortierungen führen würde. Dieses Risiko ist durch Überexpressionsartefakte, wie beispielsweise helle, intrazelluläre Proteinaggregate begründet (Gibson et al., 2013; Rizzo et al., 2009). Ein Einbeziehen der carboxy- und aminoterminalen Fusionsfähigkeit an zelluläre Zielstrukturen wäre für eine zukünftige Weiterentwicklung eines Säugerscreenings denkbar. Die Verwendung von Zelllinien, welche das jeweilige FP-Fusionsprotein auf Expressionsleveln, ähnlich dem natürlichen Level, exprimieren wäre hierbei aufgrund der beschriebenen Überexpressionsartefakte notwendig. Mit einer Genom editierenden Methode wie CRISPR-Cas9 (Hsu et al., 2014; Sander und Joung, 2014) könnten auch Zelllinien erstellt werden, welche eine Bibliothek aus FP-Fusionsproteinvarianten auf endogenem Level exprimieren. Für das Sortieren solcher Bibliotheken würde sich zunächst das FACS-Gerät für die zelluläre Helligkeit und darauffolgend ein automatisiertes, bildgebendes Verfahren für die Auswahl von Varianten, welche eine korrekte Lokalisierung zeigen, anbieten. Ein solches Screening hätte den Nachteil der deutlich längeren Dauer pro Screeningrunde. Allein die Erstellung einer stabilen Zelllinie mittels CRISPR-Cas9 dauert drei bis vier Wochen (Ratz et al., 2015).

## 4.2 Generierte Ausgangsvarianten

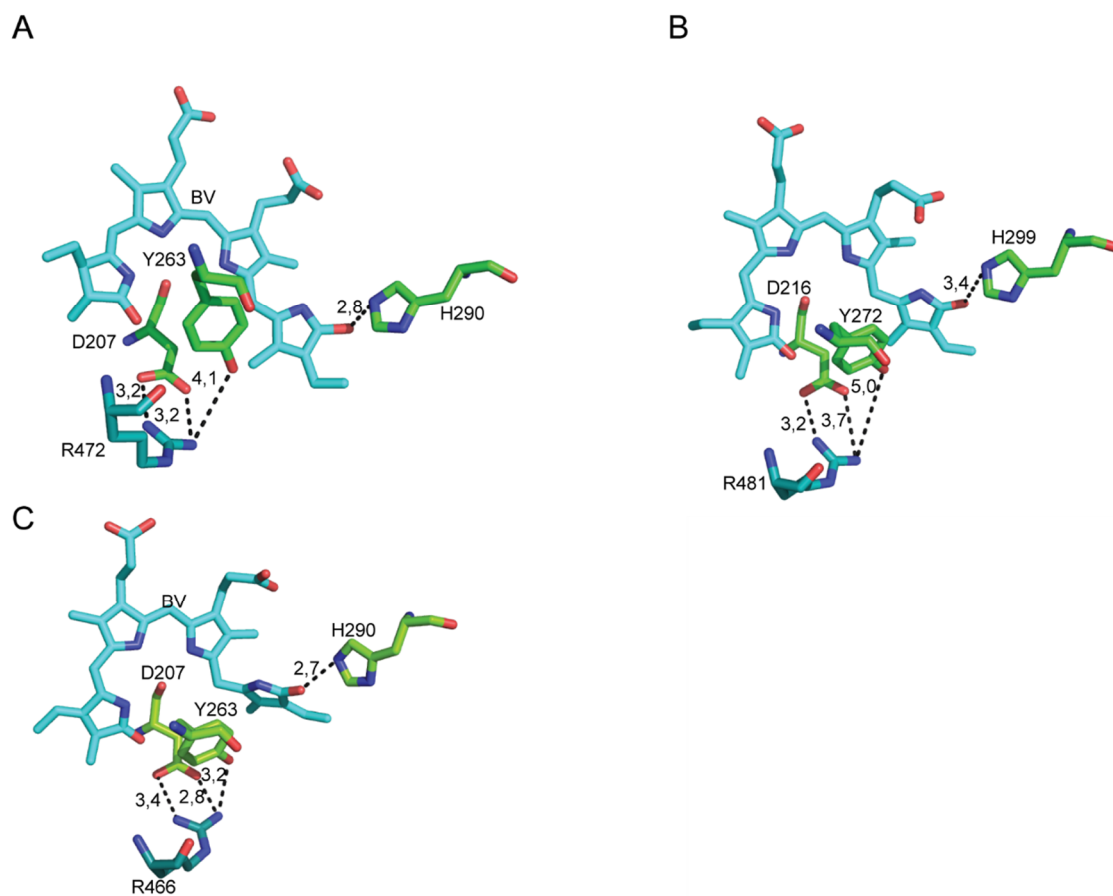
Für die Generierung eines NIR (RS)FPs wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die PAS-GAF-PHY-Domänen des Phytochroms von *Deinococcus radiodurans* als Basis ausgewählt. In bisherigen Veröffentlichungen wurden hingegen mit einer Ausnahme (Piatkevich et al., 2013c) lediglich die PAS-GAF-Domänen von verschiedenen Phytochromen als Grundlage für die Generierung von NIR FPs verwendet. Zur Generierung von NIR RSFPs gibt es zurzeit noch keine Veröffentlichungen.

Um den Einfluss der PHY-Domäne und des carboxyterminalen Endes der Aminosäuresequenz auf die spektralen Eigenschaften sowie insbesondere die Schaltcharakteristika zu evaluieren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst vier Varianten unterschiedlicher Größe generiert (siehe Absatz 3.2, Abbildung 3-2). W1 und W2 bestehen aus dem PCM (PAS-GAF-PHY) und W3 und W4 aus der CBD (PAS-GAF) des Phytochroms. Die Länge des carboxyterminalen Endes ist jeweils unterschiedlich. Im Vergleich der Varianten zeigte sich, dass diese Unterschiede keinen messbaren Einfluss auf die spektralen Eigenschaften, also das  $\pi$ -Elektronensystem, haben. Für die auf Basis der DrCBD entwickelten, nicht schaltenden FPs WiPhy, WiPhy2, IFP und IFP2.0 wurden Spektren publiziert, welche dem An-Zustand der hier generierten Ausgangsvarianten entsprechen (Auldridge et al., 2012; Lehtivuori et al., 2015; Piatkevich et al., 2013b; Shu et al., 2009a; Yu et al., 2014).

Im Gegensatz zu diesem nicht vorhandenen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften der Varianten, werden sowohl die zelluläre Helligkeit in *E. coli*-Zellen, als auch die Schalteigenschaften der Varianten stark durch die carboxyterminalen Unterschiede beeinflusst (siehe Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4). Hierbei sind die Varianten W1 und W2 aus dem kompletten PCM, diejenigen, die eine geringere zelluläre Helligkeit und einen höheren Schalthintergrund aufweisen.

## Unterschiede bezüglich der zellulären Helligkeit in *E. coli*-Zellen

Bei den Phytochromen 2 und 3 aus *Rhodospseudomonas palustris* wurde von Toh et al., 2011 für die Quantenausbeute, als einen der die Helligkeit bestimmenden Faktoren, Ähnliches beobachtet. Das Entfernen der PHY-Domäne oder das Substituieren der Asparaginsäure des hochkonservierten DIP-Motivs (siehe Absatz 1.3.1.4) führte zu einer Steigerung der Quantenausbeute und zu einer Verlängerung der Lebenszeit des angeregten Zustands. Dies wird von Toh et al., 2011 mit einer Störung des Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen den Stickstoffatomen der Pyrrolringe des BVs dem DIP-Motiv sowie der Phy-Domäne und einer hierdurch verursachten Verlangsamung des ESPTs erklärt. ESPT von den Stickstoffatomen der Pyrrolringe des BVs über die Asparaginsäure des DIP-Motivs zur Phy-Domäne wird hierbei als Weg zur Deaktivierung des Chromophors angenommen. Die Verlangsamung dieses Wegs führt zu einer Verlängerung der Lebenszeit des angeregten Zustands und zu einer Steigerung der Quantenausbeute (Toh et al., 2011).



**Abbildung 4-1: Vergleich der Verbindung zwischen Chromophor, GAF-Domäne und PHY-Domäne.**

A: cyanobakterielles Phytochrom Cph1 aus *Synechocystis sp. pcc 6803*, B: BphP3 aus *Rhodospseudomonas palustris*, C: Bakteriophytochrom aus *Deinococcus radiodurans*. Dargestellt ist jeweils das Chromophor und das konservierte Netzwerk zwischen diesem und den Positionen 472, 207, 263 und 290 beziehungsweise Analoga. Ausgewählte Abstände sind in Å angegeben. Die Farbcodierung für die Tertiärstruktur ist folgende: grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildungen wurden die pdb-Dateien 2VEA (A, Essen et al., 2008), 4R70 (B, Yang et al., 2015) beziehungsweise 4O0P (C, Takala et al., 2014) verwendet.

Die relevanten Reste des PCMs von *Synechocystis sp. pcc 6803* (D207, Y263 und R472), *Rhodospseudomonas palustris* (Y272, D216 und R481) und *Deinococcus radiodurans* (D207, Y263 und R466) sind in Abbildung 4-1, A-C vergleichend dargestellt, um diese Interaktionen und ihre Präsenz in verschiedenen Phytochromen zu veranschaulichen. Es ist zu sehen, dass auch im PCM von *D. radiodurans*, welches den im Rahmen dieser Arbeit generierten Varianten zugrunde liegt, entsprechende ESPT-Wege möglich wären. Demnach wäre denkbar, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede bezüglich der zellulären Helligkeit in *E. coli*-Zellen nach der Deletion der PHY-Domäne, durch eine Verlängerung der Lebenszeit

des angeregten Zustands und eine Steigerung der Quantenausbeute aufgrund von verlangsamtem oder vermindertem ESPT begründet sind. Die wichtige Rolle der Asparaginsäure des DIP-Motivs wurde auch in weiteren Studien bestätigt (beispielsweise Auldridge et al., 2012; Takala et al., 2014; Wagner et al., 2008).

Auch die Varianten W3 und W4, welche beide nur aus der CBD des Phytochroms bestehen und sich nur durch zehn carboxyterminale Aminosäuren unterscheiden, zeigen einen Unterschied in der zellulären Helligkeit in *E. coli*-Zellen. Vorstellbar wäre hier ein Einfluss auf die Faltung des Proteins. Außerdem wäre es denkbar, dass der längere Linker im Fall von W4 eine das Chromophor schützende Rolle einnimmt und somit zur Stabilität des Komplexes beiträgt. Diese Vermutung ließe sich durch die Bestimmung der Proteinstruktur der Varianten über Röntgenstrukturanalyse überprüfen.

### Unterschiede bezüglich des Schalthintergrunds

Wie oben erwähnt, führte das Entfernen der Phy-Domäne in den Varianten W3 und W4 nicht nur zu einer Steigerung der zellulären Helligkeit, sondern auch zu einer Verbesserung des Schalthintergrunds. In bisherigen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass das Entfernen der Phy-Domäne zu einer Beeinträchtigung des Photozyklus führt und die Varianten das Pfr-Stadium nicht mehr ausbilden können (Oka et al., 2004; Yang et al., 2008). Für die CBD von *D. radiodurans* wurde hingegen gezeigt, dass die monomerisierte Form der CBD die Fähigkeit zur Bildung des Pfr-Stadiums aufweist, die Dimer-Form hingegen nicht (Auldridge et al., 2012; Lehtivuori et al., 2015). Dies wird von Auldridge et al., 2012 durch die erhöhte Flexibilität erklärt, die sich durch das Fehlen des Sechserbündels aus  $\alpha$ -Helices der GAF-Domänen, die die Dimerisierungsfläche bilden, ergibt. Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Ausgangsvarianten enthalten die von Auldridge et al., 2012 publizierten Monomerisierungsmutationen (F145S/L311E/L314E). Hiermit lässt sich erklären, dass die Varianten W3 und W4, trotz Entfernung der PHY-Domäne, eine verbleibende Fähigkeit zur Photoisomerisierung aufweisen. Jedoch bleibt offen, warum sie einen niedrigeren Schalthintergrund aufweisen als die Varianten W1 und W2, die aus dem kompletten PCM bestehen. Auch bleibt offen, warum Variante W2, welche verglichen zu W1 um 19 carboxyterminale Aminosäuren verkürzt ist, einen deutlich schlechteren Schalthintergrund aufweist. Das carboxyterminale Ende, ob mit oder ohne PHY-Domäne, hat demnach einen erheblichen Einfluss auf das Schaltverhalten der Varianten. In weiterführenden Experimenten wäre es interessant, beispielsweise durch zeitlich hochaufgelöste Spektroskopie, zu evaluieren, ob die Varianten sich bis ins Pfr-Stadium schalten lassen oder eventuell nur Intermediate erreichen.

Diese deutlichen Effekte auf die zelluläre Helligkeit und die Schaltcharakteristika legen nahe, in zukünftigen Studien variierende carboxyterminale Enden in die Generierung einer Variantenbibliothek einzubeziehen.

## 4.3 Die Generierung von NIR FPs auf Basis der Variante W4

Für das Screening nach einer verbesserten, nichtschaltenden NIR FP-Variante diente die Variante W4 als Vorlage (siehe Absatz 3.2 und Absatz 3.3), da sie die größte zelluläre Helligkeit unter den generierten Ausgangsvarianten aufweist. Bei der gezielten Mutagenese und darauffolgendem Screening mithilfe des entwickelten, kombinierten Systems fiel die Substitution G270R aufgrund ihrer positiven Auswirkung auf die zelluläre Helligkeit der Varianten auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Varianten W4.20 (W4 Y263F), W4.33 (W4 Y263F, G270R), W4.34 (W4 Y263F, D207L) und W4.35 (W4 Y263F, D207L, G270R) generiert und vergleichend charakterisiert, um die für die (hochauflösende) Mikroskopie am besten geeignete Variante auszuwählen. Als Referenz, um die Ergebnisse mit publizierten Varianten vergleichen zu können, diente hierbei hauptsächlich das publizierte NIR FP mIFP (Yu et al., 2015). Für einen Vergleich zu GFP-basierten FPs wurde das tiefrote FP mCardinal gewählt (Chu et al., 2014).



## Vergleichende Charakterisierung der generierten Varianten

Alle vier generierten NIR FPs zeigen rot verschobene Spektren im Vergleich zu mIFP. Die Q-Bande der Varianten W4.20 und W4.33 ist jeweils um 16 nm und die der Varianten W4.34 und W4.35 um 10 nm gegenüber mIFP ins Rote verschoben. Alle gemessenen Spektren liegen somit in dem, für Bakteriophytochrom-basierte FPs charakteristischen, NIR Wellenlängenbereich des Lichts. Die Substitution G270R zeigt keinen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften, also das  $\pi$ -Elektronensystem. Die bereits publizierte Substitution D207L (Lehtivuori et al., 2015) führt zu einer leichten Verschiebung der Q-Bande um 6 nm ins Blaue. Auch das monomere Verhalten der Varianten sowie die Quantenausbeute wurden nicht durch die Mutation beeinflusst.

Wie bereits beschrieben, resultiert die zelluläre Helligkeit eines FPs und besonders eines FPs mit externem Chromophor aus vielen Parametern (siehe Absatz 1.3.1.6 und Absatz 3.1). Die letztendlich erreichte zelluläre Helligkeit ist jedoch der die Anwendung in der Mikroskopie am stärksten limitierende Faktor. Die Mutation G270R hat sowohl in W4.33, als auch in W4.35 einen positiven Einfluss auf die zelluläre Helligkeit in Säugerzellen. Das Ausmaß dieses Einflusses ist in Abwesenheit der Mutation D207L größer als in Anwesenheit dieser Substitution. Dies zeigt, dass der Einfluss einer einzelnen Mutation in Kombination mit einer weiteren Mutation variieren kann und ist somit ein Hinweis auf das komplexe Zusammenspiel aus Umgebungsparametern, das die Eigenschaften eines FPs bestimmt. Sowohl auf die pH-Stabilität als auch auf den Extinktionskoeffizienten als zur zellulären Helligkeit beitragende Faktoren wurde für die Substitution G270R ein positiver Einfluss nachgewiesen.

Ein zur zellulären Helligkeit beitragender Parameter, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht evaluiert wurde ist die BV-Affinität. Um die Verwendbarkeit des Proteins in Zellen zu evaluieren, ist nicht die reine Bindekinetik des Chromophors gemessen in Proteinlösung der die Anwendung bestimmende Parameter, sondern die Bindung des Chromophors in der Zielprobe. Aus diesem Grund wäre es in weiterführenden Experimenten sinnvoll, den Test der BV-Bindung in lebenden Säugerzellen zu bestimmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Variante W4.35 für ihre Anwendung in der Mikroskopie getestet (siehe Absatz 3.3.3). Hierbei ist besonders die hohe Bleichstabilität hervorzuheben, welche anhand der Anzahl an konfokalen Bildern, die auf einer Stelle aufgenommen werden können, bestimmt wurde. Mit dem generierten NIR FP W4.35 konnten sechs- bis neunmal mehr konfokale Aufnahmen durchgeführt werden als mit dem GFP-basierten FP mCardinal. Dies ist ein Vorteil für die Anwendung von W4.35 in der Mikroskopie und in der STED-Nanoskopie. Insbesondere für Anwendungen, die eine lange Belichtung der Fluorophore erfordern, wie beispielsweise Langzeit- oder Trackinganwendungen, ist W4.35 als überlegen gegenüber mCardinal anzusehen.

Aufgrund der verbesserten Eigenschaften ermöglichte die Variante W4.35 die Durchführung der STED-Nanoskopie mit der tiefrot verschobenen STED-Wellenlänge von 860 nm und eröffnet somit einen komplett neuen Wellenlängenbereich für die Nanoskopie. Klassischerweise wird diese Nanoskopiemethode mit STED-Wellenlängen zwischen 592 nm und 780 nm durchgeführt (Sednev et al., 2015). Unter der Berücksichtigung der größeren Punktstreufunction (PSF) aufgrund der längeren Wellenlänge ist die erreichte Auflösung von unter 80 nm hervorzuheben. Die Auflösungsverbesserung ist vergleichbar zu den Ergebnissen, welche für das weniger rot-verschobene GFP-basierte FP mGarnet publiziert wurden (Hense et al., 2015). Die durch die spektralen Eigenschaften von W4.35 als Marker ermöglichte Verwendung von Wellenlängen im NIR-Bereich des Lichts sollte jedoch eine bessere Mikroskopie und Nanoskopie in tieferen Gewebeschichten ermöglichen (Lecoq und Schnitzer, 2011; Shcherbakova et al., 2015b).



### 4.3.1 Rolle der substituierten Positionen

Die generierten Varianten unterscheiden sich in den Positionen 263, 207 und 270. Auf die Lage dieser Positionen und ihren möglichen Einfluss wird in diesem Abschnitt eingegangen.

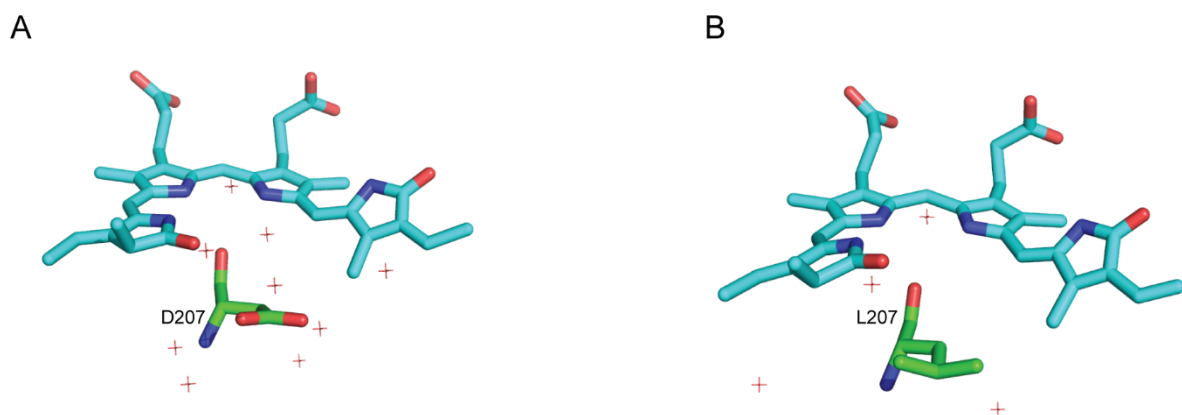
#### Position 263

Die Substitution Y263F, welche für die *D7*CBD bereits von Aldridge et al., 2012 publiziert wurde, war die erste Mutation, welche im Rahmen des Screenings auffiel. Die Photoisomerisierung zwischen dem An- und dem Aus-Zustand ist in der Variante W4 Y263F geblockt, das Protein liegt im An-Zustand vor und fiel im Screening aufgrund seiner gesteigerten zellulären Helligkeit auf.

Für das Phytochrom *Rp*BphP3 wurde gezeigt (Toh et al., 2011), dass die Mutation Y272F (analog zu Y263F) zu einer gesteigerten Quantenausbeute und einer verlängerten Fluoreszenzlebenszeit führt. Ebenso wurde eine gesteigerte Quantenausbeute und geblockte Photoisomerisierung im An-Zustand für Varianten mit der Mutation Y263F der *D7*CBD nachgewiesen. Dies wird mit der zentralen Lage der Position in der Bindetasche in direkter Umgebung des D-Rings des Chromophors und ihrer Verknüpfung mit der Phy-Domäne erklärt (siehe Absatz 1.3.1.4 und 1.3.1.5) (Aldridge et al., 2012; Toh et al., 2011; Yang et al., 2007). Durch im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Sättigungsmutagenesen konnte für die Position keine bessere Substitution in den W4-Varianten aufgedeckt werden.

#### Position 207

An der Position 207 wurde aufgrund der von Lehtivuori et al., 2015 publizierten Daten die natürlich auftretende Asparaginsäure durch ein unpolares Leucin ersetzt. Anhand der Kristallstrukturdaten zeigten die Autoren, dass die globale Struktur des Proteins durch diese Mutation nicht beeinflusst wird, das Wasserstoffbrückennetzwerk in der direkten Chromophorumgebung hingegen stark verändert wird. Durch das Einfügen der unpolaren Aminosäure an Position 207 wird die Menge an Wassermolekülen in der direkten Umgebung der Position 207 (Radius von 5 Å) von ursprünglich neun auf vier reduziert (siehe Abbildung 4-2). Eines der vier Wassermoleküle ist das Pyrrolwasser (siehe Abbildung 1-12, B). Diese Veränderung führt laut Lehtivuori et al., 2015 zu einer erhöhten Quantenausbeute und einer verlängerten Lebenszeit des angeregten Zustands aufgrund der verringerten Möglichkeit an Photoisomerisierung und/oder ESPT. Neben diesen Veränderungen verhindert das Einfügen des Leucins mit einer größeren Seitenkette an Position 207 die Bindung des alternativen Chromophors Protoporphyrin  $\alpha$  (PPIX $\alpha$ ) (Lehtivuori et al., 2015).



**Abbildung 4-2: Vergleich der Anzahl der Wassermoleküle in der Umgebung der Position 207.**

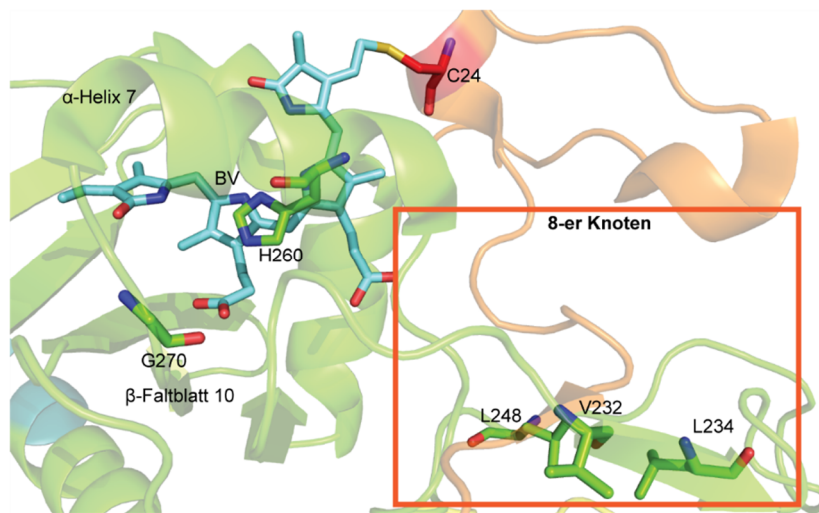
A: Wassermoleküle in der Umgebung von 5 Å der Position 207 in der *D7*CBD<sub>mono</sub>, B: Wassermoleküle in der Umgebung von 5 Å der Position 207 in WiPhy2. Die Wassermoleküle sind als Kreuze dargestellt. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff und blau für Stickstoff. Für die Abbildung wurden die von Aldridge et al., 2012 beziehungsweise Lehtivuori et al., 2015 Strukturdaten verwendet (pdb: 4IJG beziehungsweise 4ZRR).

Ein Einfluss der Substitution D207L auf die Fluoreszenzlebenszeit konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Dies lässt sich vermutlich durch die unterschiedlichen angewendeten Methoden zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit in der vorliegenden Arbeit beziehungsweise der Publikation von Lehtivuori et al., 2015 erklären. In der vorliegenden Arbeit wurde die Messung in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden Zellen durchgeführt, um den Bedingungen der Zielanwendung am nächsten zu sein. Die Literaturdaten von Lehtivuori et al., 2015 wurden hingegen auf Proteinlösung gemessen. Da die Fluoreszenzlebenszeit von Umgebungsparametern wie dem Brechungsindex, dem pH-Wert und der Anwesenheit von Fluoreszenz-Quenchern abhängig ist, können durch die unterschiedliche Probe stark abweichende Werte entstehen (Borst et al., 2005; Jung et al., 2012; Tregidgo et al., 2008). Im Fall von GFP-basierten FPs wird das Chromophor durch das ausgebildete  $\beta$ -Fass (siehe Absatz 1.2.1) von der Umgebung abgeschirmt (Day und Davidson, 2009). Im Fall der Bakteriophytochrom-basierten FPs, die BV als externes Chromophor binden, ist eventuell keine so effiziente Abschirmung des Chromophors von der Umgebung zu erwarten. Aus diesem Grund sollten die Fluoreszenzlebenszeiten insbesondere hier unter für die Zielanwendung passenden Bedingungen bestimmt werden.

### Position 270

Zu der im Rahmen des Screenings aufgedeckten Substitution G270R gibt es bisher noch keine Literaturdaten. Die Position ist am Rand der Chromophorbindetasche also in dem gezielt adressierten Bereich lokalisiert. Sie liegt in dem Verbindungsstück zwischen der  $\alpha$ -Helix 7 und dem  $\beta$ -Faltblatt 10 der GAF-Domäne (siehe Abbildung 1-8 und Abbildung 4-3). Damit ist sie relativ nah an dem Übergang der GAF-Domäne in die von ihr geformten Schlaufe lokalisiert, welche ein Bestandteil des hydrophoben 8er-Knotens ist (siehe auch Absatz 1.3.1.2). Diese Schlaufe liegt zwischen der  $\alpha$ -Helix 7 und dem  $\beta$ -Faltblatt 9 der GAF-Domäne. In ihr sind die hydrophoben Reste V232, L234 und L248 lokalisiert, die von der Seite der GAF-Domäne aus zu dem hydrophoben Kern des Knotens beigesteuert werden. Das Einfügen der Aminosäure Arginin mit deutlich größerer Seitenkette gegenüber dem ursprünglichen Glycin nahe dem zur Schlaufe führenden Strang könnte zu einer Veränderung der Spannung der die Schlaufe bildenden Polypeptidkette führen. Hierdurch käme es zu einer veränderten Lage der konservierten Aminosäuren zueinander und somit auch zu einer veränderten Packung des Knotens. Da dem Knoten unter anderem eine Funktion bei der Verminderung von Fehlfaltungen während der Proteinfaltung und die korrekte Positionierung der BV-Bindestelle zugeschrieben wird (Bornschnogl et al., 2009; Stepanenko et al., 2014; Wagner et al., 2005), wirkt er auf mehrere Faktoren, welche die zelluläre Helligkeit beeinflussen, ein. Sowohl eine bessere Bindung des Chromophors als auch eine effizientere Faltung in zellulärer Umgebung würden zur zellulären Helligkeit beitragen.

Eine weitere Begründung für die beobachteten Effekte der Mutation G270R könnte die Lage der Position in der Nähe des C-Rings des Chromophors sein. Wie in Absatz 1.3.1.4 beschrieben, liegen viele Interaktionen zwischen dem Chromophor und seiner direkten und indirekten Umgebung vor. Eine korrekte Einbettung des Chromophors in der Bindetasche sowie seine elektrostatischen Reaktionen mit seiner Umgebung sind eine Voraussetzung für seine kovalente Bindung (Wagner et al., 2008). Das Histidin an Position 260, welches in der  $\alpha$ -Helix 7 lokalisiert ist (siehe Abbildung 4-3), spielt hierbei unter anderen konservierten Aminosäureresten eine wichtige Rolle. Es ist über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Sauerstoffmolekülen der Propionsäure-Seitenketten und den Hydroxylgruppen der Aminosäuren S272 und S274 verbunden. Zusätzlich hierzu ist es in das Netzwerk des Pyrrol-Wassers involviert (siehe Abbildung 1-12). Die Substitution des Histidins an Position 260 durch ein Asparagin oder Lysin führt laut Wagner et al., 2008 zu der Unfähigkeit der *Dt*CBD, das Chromophor kovalent oder nicht-kovalent zu binden. Das Einfügen der Aminosäure Arginin mit großer Seitenkette an Position 270 in der in die  $\alpha$ -Helix 7 übergehenden Schlaufe könnte das empfindliche Netzwerk rund um das Chromophor verschieben und beispielsweise zu einer sich positiv auswirkenden, leichten Umpositionierung des Histidins an Position 260 führen.



**Abbildung 4-3: Lage der Positionen 270 und 260.**

Zu sehen ist ein Teil der PAS-GAF-PHY-Domänen des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans*. Die Farbcodierung ist wie folgt: orange aminoterminaler Extension, gelb PAS-Domäne, grün GAF-Domäne und türkis PHY-Domäne. Die Chromophorbindestelle (C24) ist in rot und das Chromophor (BV) in türkisen Stäbchen dargestellt. Die Lage der  $\alpha$ -Helix 7 und des  $\beta$ -Faltblatts ist angezeigt. Die im Text erwähnten Reste L232, L234, L248, H260 und G270 sind in Stäbchen, farblich passend zur Ursprungsdomäne dargestellt. Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturen des Pr-Stadiums verwendet (pdb 4O0P).

Generell kann zusammengefasst werden, dass die Position 270 aufgrund ihrer Lage sowohl den hydrophoben 8-er Knoten als auch die Positionierung der Aminosäure H260 oder die elektrostatische Umgebung des Chromophors und seine genaue Positionierung beeinflussen könnte. Alle diese Faktoren würden die Helligkeitseigenschaften der generierten Proteine beeinflussen.

### 4.3.2 Ausblick NIR-FPs

Mit der Variante W4.35 wurde erstmals Nanoskopie im NIR Bereich des Lichts in lebenden Säugerzellen unter Verwendung eines NIR FPs durchgeführt.

#### NIR Nanoskopie im Tiefengewebe

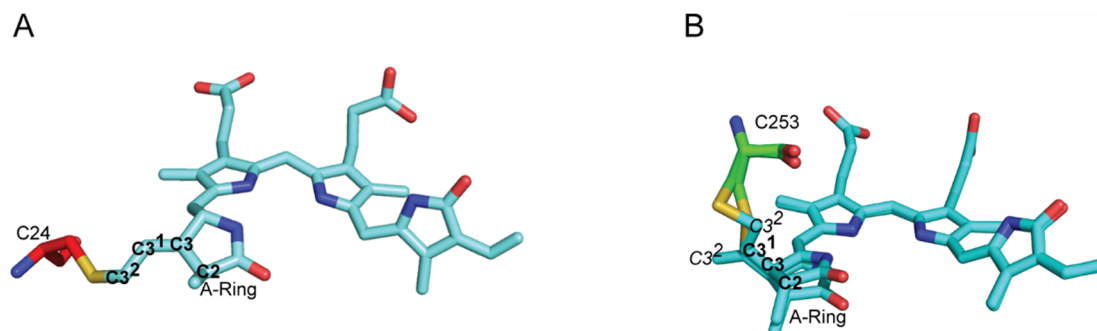
Der nächste Schritt sollte hier nun sein, die Vorzüge der verwendeten, stark rot verschobenen Wellenlängen für die Anwendung der STED-Nanoskopie in Geweben zu nutzen. Sowohl die geringere Energie des langwelligeren Lichts als auch das Minimum der Absorption von Hämoglobin und Wasser im Bereich zwischen 650 nm und 900 nm sollte Bakteriophytochrom-basierte FPs zu optimalen Markern für die Mikroskopie in (lebenden) Geweben machen. Bisher wurde dies nur für Volumenfärbungen und unter Nutzung herkömmlicher Mikroskopiemethoden gezeigt (Hock et al., 2017; Shcherbakova und Verkhusha, 2013; Yu et al., 2015). Für den ersten Test der Mikroskopie von Geweben und der Generierung eines transgenen Organismus, der das Protein W4.35 exprimiert, ist bereits die Herstellung eines transgenen Fliegenstamms in Arbeit. Der nächste Schritt wäre hier der Test der Anwendung von W4.35 in Säugergeweben.

#### Alternative Screeningansätze und Ausgangsvarianten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der erste Schritt gemacht, Bakteriophytochrom-basierte FPs in der Nanoskopie nutzbar zu machen. Für die weitere Optimierung der Variante W4.35 oder die neue Generierung von Bakteriophytochrom-basierten FPs ist insbesondere die Helligkeit ein Charakteristikum,

welches noch Raum zur Verbesserung offenlässt. Das konfokale Mikroskopieren von W4.35-exprimierenden Säugerzellen ist im Fall von hellen zellulären Strukturen, wie beispielsweise dem Zytoskelett, auch ohne die vorherige Zugabe von BV möglich (siehe Anhang, Abbildung 11-1). Für dunklere Strukturen wie beispielsweise die Markierung der Kernporen durch NUP50-Fusionen und für die optimierte Durchführung der STED-Nanoskopie muss jedoch vorher BV hinzugefügt werden. BV ist nicht zytotoxisch (Shu et al., 2009a und siehe Anhang Tabelle 11-1) und in Säugerzellen zellpermeabel. Auch die intravenöse Injektion von BV bei Mäusen wurde schon durchgeführt und resultierte in einer Steigerung der Fluoreszenz im Fall des viral exprimierten FPs IFP1.4 (Shu et al., 2009a). Anzustreben ist jedoch eine hohe Helligkeit unter endogenen Biliverdinkonzentrationen. Mit den IRFP-Varianten (Shcherbakova und Verkhusha, 2013) wurde bereits sowohl in Säugerzellen als auch in Mäusen gezeigt, dass keine exogene BV-Zugabe nötig ist. Diese Bakteriophytochrom-basierten FPs haben jedoch den Nachteil, dass sie Dimere sind.

Um eine höhere Biliverdinaffinität zu erreichen, könnten zunächst größere und im höheren Maße zufällig generierte Mutagenesebibliotheken hergestellt werden. Auch Mutationen, die in relativ weiter Entfernung vom Chromophor lokalisiert sind, können die Fluoreszenzeigenschaften des FPs maßgeblich beeinflussen. Dies lässt sich zum Beispiel durch auftretende Spannungen erklären, die das Proteingerüst leicht verschieben und so auch die Umpositionierung weit entfernter Aminosäuren verursachen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag die Gewichtung, zumindest was die Region der Mutagenesen angeht, auf gezielten Mutagenesen. Eine Ausweitung könnte die Chance erhöhen, weitere, unbekannte Positionen aufzudecken. Auch die Übertragung der aufgedeckten Substitution auf alternative Ausgangsvarianten beziehungsweise bereits publizierte NIR FPs sollte überprüft werden. Für eine nicht so weit in den tiefroten Wellenlängenbereich des Lichts verschobene Variante wäre es denkbar das entwickelte kombinierte Screening mit einem cyanobakteriellen Phycobiliprotein als Ausgangsvariante durchzuführen. Rodriguez et al., 2016 zeigten mit smURFP das Potential dieser Proteine als Ausgangsvarianten für die Generierung von FPs auf. smURFP ist zwar mit einem Anregungs- beziehungsweise Emissionspeak von 642 nm und 670 nm stark blau verschoben zu den Bakteriophytochrom-basierten FPs hat aber eine deutlich höhere Quantenausbeute.



**Abbildung 4-4: Chromophorbindestelle im Bakteriophytochrom von *D. radiodurans* beziehungsweise in BphP1 FP C20S.**

A: Chromophorbindestelle (C24) in der PAS-Domäne des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans*. B: Chromophorbindestelle (C253) in der GAF-Domäne der Variante BphP1 FP (C20S). Innerhalb der Aminosäuren steht rot für Sauerstoff, blau für Stickstoff und gelb für Schwefel. Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 (A, pdb 4O0P) beziehungsweise die von Shcherbakova et al., 2015a (B, pcb 4XTQ).

Zusätzlich hierzu wäre es interessant, die vorab beschriebenen Ansätze einer zweiten Chromophorbindestelle zu verfolgen (siehe Absatz 1.3.1.7 und Hontani et al., 2016; Shcherbakova et al., 2015a). Dies führt zwar zu einer Blauverschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren, aber auch zu einer Erhöhung der Helligkeit der Varianten. Die Varianten weisen nach Hontani et al., 2016 ein kleineres  $\pi$ -Elektronensystem auf, da bei der alternativen Bindestelle des Chromophors in der GAF-Domäne keine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C3 und C3<sup>1</sup> oder C2 des BVs ausgebildet wird. Das Chromophor und das Cystein an Position 253 liegen in zwei alternierenden Konformationen vor. Die Doppelbindung wird zwischen den Kohlenstoffatomen C3<sup>1</sup> und C3<sup>2</sup> ausgebildet und zählt somit nicht mehr zu dem  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors. Das Chromophor und die Chromophorbindestelle (C24)

des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans* (A) beziehungsweise die Chromophorbindestelle (C253) des FPs BphP1 FP1 C20S (B) sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Die Blauverschiebung ist zwar beträchtlich, führt aber beispielsweise im Fall von BphP1-FP (Shcherbakova et al., 2015a) mit einem Absorptions-/Emissionsmaximum bei 643 nm beziehungsweise 669 nm trotzdem nicht in einen Bereich, der gut durch die GFP-basierten FPs erschlossen ist. Außerdem bliebe zu testen, ob dieser Blauverschiebung durch Einfügen der Möglichkeit eines  $\pi$ -Stapels, wie es für GFP-basierte FPs beschrieben wurde (siehe Absatz 1.2.3 und Heim et al., 1994; Ormö et al., 1996), entgegen zu wirken ist.

Neben der Helligkeit ist insbesondere die Fluoreszenzlebenszeit des verwendeten Markers für die STED-Nanoskopie ein wichtiges Charakteristikum. Die für alle im Rahmen dieser Arbeit generierten NIR-FPs bestimmten Lebenszeiten (siehe Absatz 3.3.2.3) sind vergleichbar zu bereits publizierten Varianten (beispielsweise Lehtivuori et al., 2015; Bhattacharya et al., 2014; Hontani et al., 2016; Shcherbakova et al., 2015a; Toh et al., 2010, 2011; Zhu et al., 2015) und sehr kurz im Vergleich zu GFP-basierten FPs. Dies erfordert in der STED-Nanoskopie ein sehr schnelles Pumpen der Proteine im Volumen des STED-Doughnuts in den  $S_0$ -Zustand (siehe Absatz 1.1.1.2). Eine längere Fluoreszenzlebenszeit würde die technische Anforderung der STED-Nanoskopie vereinfachen. Hinzu kommt, dass eine längere Fluoreszenzlebenszeit häufig mit einer höheren Quantenausbeute einhergeht (Jung et al., 2012). Im Fall von Bakteriophytochrom-basierten FPs wurde, wie oben erwähnt, gezeigt, dass das Einfügen einer zweiten Chromophorbindestelle die Fluoreszenzlebenszeiten der FPs verlängert (Hontani et al., 2016; Shcherbakova et al., 2015a). Auch die Wichtigkeit des Wassernetzwerks der direkten Chromophorumgebung wurde bereits hervorgehoben (Lehtivuori et al., 2015). Der B- sowie der C-Ring des Chromophors sind relativ gut in der Bindetasche fixiert. Sowohl für den D-Ring, als auch für den A-Ring, wurde gezeigt, dass eine weitere Fixierung der Ringe zu einer höheren Quantenausbeute und zu einer Verlängerung der Fluoreszenzlebensdauer führen kann (siehe Absatz 1.3.1.7). Besonders diese Bereiche der Chromophorbindestasche bieten sich also für die gezielte Mutagenese der Chromophorbindestasche an.

Generell sind Bakteriophytochrom-basierte FPs, egal ob sie aus der PCM oder nur der CBD des Bakteriophytochroms bestehen, mit einem Molekulargewicht von 55-60 kDa beziehungsweise 35-38 kDa größer als GFP-basierte FPs mit einem solchen von ungefähr 28 kDa. Die Möglichkeit ein NIR-FP nur aus der GAF-Domäne der Variante W4 zu generieren wurde im Rahmen dieser Arbeit auch verfolgt (Daten nicht gezeigt), erwies sich aber auf dem rein rationalen Weg als erfolglos. Hierfür wurden Positionen in der GAF-Domäne ausgewählt, welche eine alternative Chromophorbindestelle darstellen könnten und Cysteine an diesen Positionen eingefügt. Die PAS-Domäne wurde darauffolgend entfernt. Das Einfügen eines Cysteins an den ausgewählten Positionen 259 und/oder 257 anstelle des ursprünglichen Methionins beziehungsweise Serins hat jedoch in allen drei Fällen zu nahezu nicht-fluoreszierenden Varianten geführt. In zukünftigen Experimenten wäre hier die großflächige Mutagenese der Varianten und ein Screening nach Helligkeit nötig. Auch das gezielte Einfügen von amino- und/oder carboxyterminalen Überhängen wäre denkbar, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass der Einfluss der carboxyterminalen Überhänge einen großen Einfluss auf die Helligkeitseigenschaften der generierten Varianten hat (siehe Absatz 3.2 und Absatz 4.2). Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit wurde von Romyantsev et al., 2015 (siehe Absatz 1.3.1.7) ein eben solches GAF-FP auf Basis der GAF-Domäne des Phytochroms von *R. palustris* publiziert. Dies zeigt, dass der Ansatz eines GAF-FPs grundsätzlich eine Option ist. Generell bieten sich durch die Domänenstruktur und das externe Chromophor der Bakteriophytochrome viele Ansatzpunkte für die Generierung und Mutagenese von NIR-FPs.

Zusammengefasst zeigt das im ersten Teil dieser Arbeit generierte und charakterisierte FP W4.35 verbesserte Eigenschaften bezüglich der zellulären und molekularen Helligkeit sowie der pH-Stabilität. Unter Anwendung dieses neuen NIR FPs wurde hier erstmals hochauflösende (STED)-Nanoskopie mit Bakteriophytochrom-basierten FPs an lebenden Zellen durchgeführt. Somit wird ein neuer, langwelligerer Wellenlängenbereich des Lichts für die Nanoskopie lebender Zellen zugänglich.

## 4.4 Die Generierung von NIR RSFPs auf Basis der Variante W3

Die bisher publizierten NIR Bakteriophytochrom-basierten FPs wurden auf möglichst hohe Helligkeit und konstitutive Fluoreszenz optimiert. Die einzigen Literaturdaten zu photomodulierbaren NIR FPs, sind die von Piatkevich et al., 2013c publizierten PaiRFPs sowie die Nutzung des natürlichen Schaltverhaltens des nicht fluoreszierenden Phytochroms von *R. palustris* in der photoakustischen Tomographie (siehe Absatz 1.3.1.7 und Piatkevich et al., 2013c; Yao et al., 2016). Zur Generierung und/oder Mutagenese von fluoreszierenden, reversibel schaltbaren NIR Bakteriophytochrom-basierten FPs gibt es jedoch noch keine Daten. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine ausführliche Positionsstudie zu den während des Screenings auffälligen Positionen durchgeführt (siehe Absatz 3.4.2).

### 4.4.1 Einfluss der aufgedeckten Positionen

Im Rahmen des Screenings nach Varianten mit verbesserten Eigenschaften bezüglich der zellulären Helligkeit und des Schalthintergrunds fielen die Positionen 9, 25, 115, 270 und 296 auf.

#### Position 25

Die Position 25 als direkt aminoterminal benachbarte Position zur Chromophorbindestelle (C24) wurde in Kombination mit der Position 27 auch schon von Wagner et al., 2008 adressiert, jedoch wurde hier die jeweils an dieser Position ursprünglich vorhandene Glutaminsäure lediglich durch die kleine, unpolare Aminosäure Alanin ersetzt. Dies führte zu keinem nennenswerten Einfluss auf die BV-Bindeeigenschaften oder die Pr/Pfr-Photokonvertierung. Auch die Deletion der ersten 20 Aminosäuren des Phytochroms zeigte hier keinen Einfluss auf die BV-Bindeeigenschaften. Jedoch erreichte diese Variante in der Photokonvertierung nur ein Intermediat und das Pfr-Stadium wurde nicht mehr gebildet (Wagner et al., 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Aminosäuren Glutamin (W3.12), Histidin (W3.13), Phenylalanin (W3.14), Lysin (W3.19) und Asparaginsäure (W3.21) an Position 25 genauer untersucht (siehe Abbildung 3-16). Auffällig ist, dass die Substitutionen der Glutaminsäure an Position 25 mit Aminosäuren mit größeren Seitenketten, wie Lysin oder Phenylalanin (W3.19 und W3.14), zu Varianten mit einer stark verschlechterten zellulären Helligkeit verglichen zu W3 führt. Bei der Substitution der ursprünglichen Glutaminsäure an Position 25 mit Aminosäuren einer ähnlichen Seitenkettengröße ist die Reduktion der zellulären Helligkeit nicht so stark. Dies lässt vermuten, dass die veränderte Seitenkettengröße beispielsweise die Bindetasche sterisch verändert oder die Bindung des Chromophors beeinflusst.

Da der Schalthintergrund zwischen den Varianten mit Aminosäuren verschiedener Seitenkettengröße (W3.12, W3.13, W3.14 und W3.19) nicht stark schwankt (10-12 % des Maximalsignals), jedoch bei Varianten mit Aminosäuren verschiedener Azidität beziehungsweise Basizität (W3.13 und W3.19 gegenüber W3 und W3.21) stärker variiert (10-12 % gegenüber 17 % und 14 % des Maximalsignals), ist zu vermuten, dass die Seitenkettengröße der Aminosäure an Position 25 einen geringeren Einfluss auf das Schaltverhalten hat als deren Säure-Basen-Verhalten. Aufgrund ihrer Lage beeinflusst die Azidität beziehungsweise Basizität der Aminosäure an Position 25 die direkte Reaktionsumgebung des Chromophors. Dieses liegt sowohl im An- als auch im Aus-Zustand protoniert vor, wird jedoch während des Übergangs von dem Meta-R<sub>A</sub> in das Meta-R<sub>C</sub> und von dem Meta-R<sub>C</sub> in den Aus-Zustand einmal deprotoniert und wieder protoniert (siehe Absatz 1.3.1.5 und Wagner et al., 2008).

Generell wäre es an dieser Position interessant, ein Glycin als kleinste und neutrale Aminosäure einzusetzen, um zu testen, ob sich dies positiv auf die zelluläre Helligkeit der Variante auswirkt und den Schalthintergrund verglichen zu Varianten mit sauren Aminosäuren an dieser Position verbessert.

### Position 115

Die nächste Aminosäureposition mit Auswirkungen auf das Schaltverhalten ist Position 115 (siehe Abbildung 3-17). Diese wurde durch zufällige Mutagenesen identifiziert. Von den ausgewählten, gezielt adressierten Bereichen ist sie dem hydrophoben 8-er Knoten am nächsten (siehe Abbildung 3-15), jedoch kann kein direkter Einfluss auf den Knoten angenommen werden. An dieser Position führt das Einfügen einer Aminosäure mit großer Seitenkette (Phenylalanin) im Vergleich zu der ursprünglich vorhandenen Aminosäure (Valin) zu einem höheren Schalthintergrund und einer geringeren zellulären Helligkeit. Aminosäuren mit kleineren Seitenketten wie Alanin oder Serin hingegen können die Schalteigenschaften verbessern, ohne die zelluläre Helligkeit im Grundzustand in *E. coli*-Zellen stark zu beeinflussen. Würde die Position nur die Helligkeitseigenschaften beeinflussen, so könnte man davon ausgehen, dass beispielsweise die Faltung des Proteins verändert wird. Die Tatsache, dass auch der Schalthintergrund verändert wird, lässt jedoch vermuten, dass die Veränderungen an Position 115 indirekt auch zu Veränderungen in der Chromophorbindetasche führen.

### Position 270

Die Position 270 wurde schon vorab in Absatz 3.3.2 und Absatz 4.3 bezüglich ihres Einflusses auf die Helligkeit in nicht schaltenden NIR FPs gezeigt und diskutiert. Auch bei den generierten NIR RSFPs W3.50 und W3.75 hat die Substitution G270R einen positiven Einfluss auf die zelluläre Helligkeit (siehe Abbildung 3-18). Der Schalthintergrund wird jedoch nur minimal beeinflusst. Dies ist positiv, da aufgrund der Kopplung der Prozesse, insbesondere bei Negativschaltern, eine Erhöhung der Helligkeit häufig an eine Erhöhung des Schalthintergrunds gebunden ist.

### Position 9

Die Substitution F9L führt zu einer weiteren Reduktion des Schalthintergrunds im Vergleich zu Variante W3.37 ohne die zelluläre Helligkeit zu beeinträchtigen. Die Position ist in dem der PAS-Domäne aminoterminal vorangehenden Polypeptid lokalisiert und somit der vorab diskutierten Position 25 und der Chromophorbindestelle (C24) am nächsten. Im Fall der Position 9 könnten kleine Veränderungen beispielsweise die Lage der Chromophorbindestelle leicht variieren und somit die Positionierung des Chromophors und die Schalteigenschaften beeinflussen.

### Einfluss des carboxyterminalen Endes

Die während des Screenings in Variante W3 zu Verbesserungen der Schalt- und Helligkeitseigenschaften führenden Mutationen E25Q und V115A wurden in der Folge in alle Ausgangsvarianten eingebracht. Dies sollte dazu dienen, erneut den Einfluss der Domänen und carboxyterminalen Überhänge zu evaluieren. Das Einbringen der Mutationen führt nicht in allen vier Varianten zu einer Verbesserung der Eigenschaften (siehe Anhang, Tabelle 11-2). Der beobachtete Unterschied zwischen den Varianten, welche nur aus der CBD bestehen, und W1 beziehungsweise zwischen W1 und W2 hebt hier den Einfluss des carboxyterminalen Endes der Varianten auf die Schalt- und Helligkeitscharakteristika hervor. Wie vorab beschrieben wurde auch bei dem Vergleich der Ausgangsvarianten W1-W4 ein starker Einfluss des carboxyterminalen Endes auf die Helligkeits- und Schaltcharakteristika nachgewiesen (siehe Absatz 3.2 und Absatz 4.2). Die hier geschilderten Beobachtungen bestärken dies nochmal.



Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neue Aminosäuresubstitutionen mit Einfluss auf das Schaltverhalten und die zelluläre Helligkeit der generierten NIR RSFPs identifiziert. Diese sollten bei zukünftigen Screenings berücksichtigt und adressiert werden. Auch ihre Übertragung auf Phytochrome aus anderen Bakterien oder anderen Organismengruppen wäre von Interesse. Da Variationen des carboxyterminalen Endes einen starken Einfluss auf die Eigenschaften des jeweiligen (RS)FPs haben können, wäre es sinnvoll variable, carboxyterminale Enden in die Erstellung von Variantenbibliotheken für das Screening zu involvieren.

#### 4.4.2 Vergleichende Charakterisierung der besten generierten NIR RSFPs

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Varianten W3.37, W3.50, W3.75 und W3.103 weisen verglichen mit der Ausgangsvariante W3 stark verbesserte Eigenschaften für die Anwendung in der RESOLFT-Nanoskopie auf. Insbesondere der Schalthintergrund als einer der hier wichtigsten Faktoren wurde maßgeblich verbessert. Diese Varianten wurden analog zu den generierten NIR-FPs vergleichend und detailliert charakterisiert. Als Referenz bei allen durchgeführten Charakterisierungsmessungen diente entweder, wie bei den generierten NIR FPs, das publizierte NIR FP mIFP (Yu et al., 2015) oder die Ausgangsvariante W3 (siehe Absatz 3.2).

Spektral unterscheiden sich die generierten Varianten nicht maßgeblich von der Ausgangsvariante W3 (siehe Abbildung 3-20). Somit liegen alle generierten RSFPs mit einem Absorptions- beziehungsweise Emissionsmaximum des An-Zustands zwischen 695 nm und 697 nm beziehungsweise 718 nm und 720 nm in dem für rote GFP-basierte (RS)FPs nicht erreichbaren spektralen Bereich des NIR Lichts (siehe Absatz 1.2.3). Die Verbesserung der Schalteigenschaften und folglich die Veränderungen der direkten Umgebung des Chromophors haben hier nicht zu einer Blauverschiebung der spektralen Eigenschaften geführt. Wie in Absatz 1.2.3 beschrieben, sind die spektralen Eigenschaften im Fall von roten GFP-basierten FPs, die gegenüber dem DsRed-Chromophor rotverschoben sind, hauptsächlich durch Umgebungsreaktionen begründet. Die in Absatz 1.2.5 beschriebenen Beobachtungen zeigen, dass dies im Fall der Generierung von RSFPs häufig zu einer Verschiebung der spektralen Eigenschaften in den kurzwelligeren Bereich des Lichts führt. Die hier generierten NIR RSFPs sind diejenigen mit den bisher am weitesten ins Rote verschobenen, spektralen Eigenschaften. Die bisher publizierten GFP-basierten RSFPs rsCherry, rsCherryRev, rsCherryRev1.4, asFP595 und rsTagRFP (Lavoie-Cardinal et al., 2014; Lukyanov et al., 2000; Stiel et al., 2008; Subach et al., 2010a) weisen alle Emissionsmaxima unterhalb von 610 nm auf und sind somit verglichen mit den hier generierten NIR RSFPs mehr als 100 nm in den kurzwelligen Wellenlängenbereich verschoben.

Bei der Messung der pH-Stabilität der Varianten fiel auf, dass die generierten NIR RSFPs einen deutlich stärkeren Fluoreszenzrückgang bei steigend basischen pH-Werten aufweisen als die generierten NIR FPs. Hierbei sind die generierten NIR RSFPs aber mit etwa 50 % Restfluoreszenzintensität bei einem pH-Wert von 7,5 etwas stabiler als die Ausgangsvariante W3 mit ungefähr 40 % Restfluoreszenzintensität bei einem pH-Wert von 7,5 (siehe Absatz 3.4.4.2). Normalerweise liegt das Chromophor im Photozyklus der Phytochrome sowohl im An- als auch im Aus-Zustand protoniert vor (siehe Absatz 1.3.1.5 und Wagner et al., 2008). Basische pH-Werte könnten hier dazu führen, dass das Chromophor nicht im An- oder Aus-Zustand vorliegt sondern in dem teilweise deprotonierten Intermediat Meta-R<sub>C</sub> oder an allen vier Pyrrol-Ringen deprotoniert wird. Dies würde zu einem Rückgang der Fluoreszenz führen. Um genauer zu evaluieren, ob es sich hier um einen reversiblen Prozess handelt, der von der Protonierung abhängt, oder das Protein bei basischen pH-Werten irreversibel degradiert wird, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Beispielsweise könnten Absorptionsspektren Aufschluss darüber geben, ob bei hohen pH-Werten und dem detektierten Rückgang der Fluoreszenz Absorptionsbanden in anderen Bereichen als dem der Absorptionsbande des An-Zustands erscheinen und somit gegen das irreversible Denaturieren des

Proteins sprechen. Auch könnte, um die Reversibilität des Prozesses zu überprüfen, evaluiert werden, ob sich die Fluoreszenz durch ein Umpuffern der Lösung zurückgewinnen lässt. Unabhängig von der Ursache und der Reversibilität der geringen pH-Stabilität im basischen Bereich ist sie als Nachteil zu sehen. Wie in Absatz 3.4.6 gezeigt ist, ist die Anwendung der Varianten als genetische Marker zellulärer Zielstrukturen trotzdem möglich.

#### 4.4.3 Charakterisierung der Schalteigenschaften unter konfokalen Bedingungen

Für die Anwendung der Fluorophore in der RESOLFT-Nanoskopie ist eine Charakterisierung der Schalteigenschaften und Bestimmung der möglichen Parameter für die RESOLFT-Methode unter Bedingungen, die der finalen Anwendung möglichst nahe sind, essentiell. Eine Übertragung der in *E. coli*-Zellen ermittelten Schaltparameter von einem nicht konfokalen Mikroskop auf die Schaltparameter in der RESOLFT-Nanoskopie lebender Säugerzellen ist nach gruppeninternen Erfahrungswerten nicht oder nur mit starken Veränderungen möglich. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein konfokaler Aufbau entworfen und konstruiert, der diese Charakterisierung ermöglicht.

Mithilfe dieses Aufbaus konnte die Anwendung der NIR RSFPs als Fusionsprotein in Säugerzellen gezeigt werden. Für den Test wurden die Varianten W3.37 und W3.103 ausgewählt, da sie die geringsten Schalthintergrundwerte am automatisierten Mikroskop aufweisen und somit unter den generierten Varianten am besten für die RESOLFT-Nanoskopie geeignet sind. Die generierten Konstrukte zeigten eine korrekte Lokalisierung in lebenden Säugerzellen (siehe Abbildung 3-29). Die Schaltcharakteristika dieser beiden Varianten wurden unter konfokalen Bedingungen getestet, um die Eignung der Varianten für die RESOLFT-Nanoskopie zu testen und die optimalen Parameter zu evaluieren (siehe Absatz 3.4.5). Im Rahmen der durchgeführten Messungen wurden die Einflüsse verschiedener Laserleistungen auf die Schaltcharakteristika der Varianten W3.37 und W3.103 unter konfokalen Bedingungen im Vergleich zu der Ausgangsvariante W3 evaluiert. Generell betrachtet man bei der Messung von Schaltkinetiken immer ein Molekülensemble und die Veränderung der Verhältnisse der einzelnen Subpopulationen dieses Ensembles zueinander. Diese Subpopulationen können neben dem An- und dem Aus-Zustand weitere Zwischenzustände einnehmen. Daher lässt sich anhand der Messungen nicht abschließend festlegen, ob es sich bei dem Schalthintergrund um eine Mischpopulation aus Molekülen im An- und Aus-Zustand handelt, oder ob weitere Subpopulationen hinzukommen oder ob der Aus-Zustand eine geringe Fluoreszenz zeigt.

#### Abhängigkeit der Schaltcharakteristika von der 660 nm Laserleistung

Bei den untersuchten Varianten sind sowohl der erreichte Schalthintergrund als auch die Halbwertskinetik der Ausschaltkinetik von der Laserleistung des 660 nm Lasers abhängig (siehe Abbildung 3-23 und Abbildung 3-24). Bei der Bestimmung der Abhängigkeit des Schalthintergrunds von der Laserleistung des 660 nm Lasers zeigte sich, dass sowohl bei niedriger Leistung ( $0,4 \mu\text{W}$ ) als auch bei hoher Leistung ( $8,2 \mu\text{W}$ ,  $17 \mu\text{W}$  und  $20,9 \mu\text{W}$ ) der Schalthintergrund der Varianten steigt (siehe Abbildung 3-23). Bei niedriger Laserleistung kann davon ausgegangen werden, dass die Leistung (Photonenanzahl) nicht ausreicht, um das Verhältnis des Gemisches zwischen An- und Aus-Zustand weiter in Richtung des bestmöglichen Verhältnisses der jeweiligen Variante, in welchem sich die maximal mögliche Anzahl der Proteine im Aus-Zustand befindet, zu drücken. Innerhalb der längeren Ausschaltzeiten bei niedrigen Leistungen wäre es möglich, dass schon zu viele Moleküle selbstständig wieder in einen fluoreszierenden Zustand übergehen und somit den Hintergrundwert erhöhen. Für Bakteriophytochrome ist eine thermische Relaxation aus dem Pfr- in das Pr-Stadium bekannt. Diese variiert zwischen den verschiedenen Bakteriophytochromen im Bereich zwischen Minuten und Stunden (siehe Absatz 1.3.1.5 und Piatkevich et al., 2013b).

Bei den hohen Leistungen könnte der steigende Hintergrund darauf hindeuten, dass ein Teil der Population in Zustände übertragen wird, die nicht mehr schaltbar sind und deren Lebensdauer den zeitlichen Rahmen der Messung übersteigt, so dass die Anzahl dieser nicht schaltbaren Proteine zunimmt.

Die Ausschaltkinetik (siehe Abbildung 3-24) ist in dem Bereich der getesteten Laserleistungen nur in geringem Maße leistungsabhängig. Bei den beiden niedrigsten Laserleistungen ( $0,4 \mu\text{W}$  und  $1,2 \mu\text{W}$ ) ist eine Verlangsamung der Halbwertszeit der Ausschaltkinetik erkennbar. Dies resultiert daraus, dass die Moleküle im Fokus aufgrund der geringeren Photonenzahl bei niedrigeren Laserleistungen seltener angeregt werden. Die Kinetik ist somit durch die Anzahl der absorbierten Photonen begrenzt. Messungen mit Leistungen unterhalb von  $0,4 \mu\text{W}$  konnten nicht ausgewertet werden, da diese signallimitiert waren. Bei den gemessenen Laserleistungen ab und oberhalb von  $3,8 \mu\text{W}$  ist keine Veränderung der Halbwertszeit mehr zu beobachten. Der Prozess des Ausschaltens scheint einen die Geschwindigkeit begrenzenden Schritt zu involvieren, der bei einer Leistung von  $3,8 \mu\text{W}$  dazu führt, dass das Schalten nicht weiter zu beschleunigen ist.

### Abhängigkeit der Schaltcharakteristika von der 785 nm Laserleistung

Da eine Anregung mit 660 nm konkurrierend zum Ausschalten der Proteine führt, konnte die Anschaltkinetik der NIR RSFPs nicht separat aufgenommen werden. Somit wurde die Anschaltzeit, wie in Absatz 3.4.5.3 beschrieben, durch Belichtung mit unterschiedlich langen Pulsen des 785 nm Lasers und anschließendem Auslesen der Fluoreszenz bestimmt. Die Kinetik des Anschaltens war weder bei W3.37 noch bei W3.103 maßgeblich von der Leistung des 785 nm Lasers abhängig. Lediglich bei der Ausgangsvariante W3 konnte eine Beschleunigung der Anschaltkinetik durch die Leistung des Lasers nachgewiesen werden. Dies passt zu der Beobachtung, dass sich das Ensemble der Variante W3.37 nach dem Ausschalten der Population ohne Laseranregung zu einem größeren Anteil in den An-Zustand verschiebt als bei der Variante W3 (siehe Abbildung 3-26). Die Differenz zwischen dem Kurzzeitequilibrium nach dem Ausschalten und dem An-Zustand des Ensembles ist bei W3 mit ungefähr 60 % größer als bei W3.37 mit ungefähr 20 %. Demzufolge ist die Population des Ensembles, welche sich durch den 785 nm Laser anregen und anschalten lässt, im Fall von W3 größer als bei W3.37. Eine Leistungsabhängigkeit der kleinen Population ist bei W3.37 schwerer nachzuweisen und wäre eventuell bei größeren Leistungsdifferenzen zwischen den Messungen der Anschaltsättigung ersichtlich. Dies könnte in zukünftigen Messungen überprüft werden.

### Stabilität und Absorptionscharakteristika des An- und des Aus-Zustands

Aus der jeweiligen Rückfallkinetik der Varianten geht hervor, dass der Aus-Zustand beider Varianten nur sehr kurzlebig ist. Bereits nach 2 ms fällt ein gewisser Anteil der Proteine, welcher bei W3.37 größer ist als bei W3, ohne Lasereinwirkung in einen fluoreszierenden Zustand zurück, der als (Kurzzeit)Equilibrium des Ensembles bezeichnet werden kann. Wie vorab erwähnt ist für Bakteriophytochrome eine thermische Relaxation von dem Pfr- in das Pr-Stadium, also von dem Aus- in den An-Zustand, bekannt. Diese scheint bei den generierten NIR RSFPs deutlich stärker auszufallen als die bisher beobachtete natürliche Dunkelrelaxation, welche zeitlich auf einer Skala von Minuten bis Stunden abläuft (Piatkevich et al., 2013b). Für Phytochrome im allgemeinen wurde beobachtet, dass dieser Prozess stark abhängig von Umgebungsparametern ist und sich durch Mutationen und Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflussen lässt (siehe Absatz 1.3.1.5 und Elich und Chory, 1997; Piatkevich et al., 2013b; Rockwell et al., 2006; Sweere et al., 2001). Dieses selbständige Zurückfallen sollte die Anwendung der Proteine in der RESOLFT-Nanoskopie nicht negativ beeinflussen, da das Auslesen der Fluoreszenz hier direkt nach dem Ausschalten der Fluorophore des Doughnut-Volumens erfolgt und keine Pause im Millisekundenbereich vorhanden ist. Aufgrund der sehr hohen Instabilität des Aus-Zustandes wurde auch die Stabilität des An-Zustandes bestimmt. Hier war während der Zeitskala der Messung von 6 Minuten keine Veränderung des Gleichgewichtszustands messbar. Dies ist für die RESOLFT-Nanoskopie wichtiger, da klassischerweise zwischen dem Einschalten der Moleküle und dem Auslesen der Fluoreszenz die Peripherie mit dem

Doughnut-förmigen Fokus ausgeschaltet wird. Demzufolge muss der An-Zustand mindestens für die Dauer des Ausschaltprozesses stabil sein.

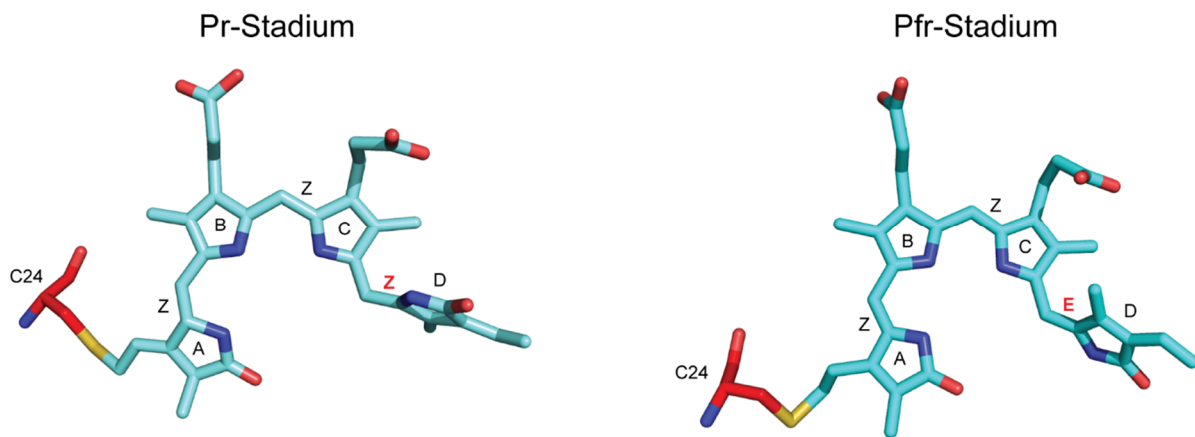
Des Weiteren hat sich gezeigt (siehe Abbildung 3-26), dass der 660 nm Laser mit hoher Leistung (17,7  $\mu$ W) ebenfalls den Aus-Zustand anregen kann und das Verhältnis des Ensembles zwischen An- und Aus-Zustand stärker verschiebt als eine Pause ohne Laserpulse, aber schwächer als ein entsprechender Anschaltimpuls mit dem 785 nm Laser. Nimmt man an, dass das beobachtete Ensemble nicht nur aus dem An-Zustand und dem Aus-Zustand der NIR RSFPs besteht, sondern noch weitere Subpopulationen vorliegen, welche sich beispielsweise in der Mikroumgebung des Chromophors unterscheiden, so wäre denkbar, dass sich diese nach der Absorption eines Photons unterschiedlich verhalten. Im Fall von W3 (siehe Abbildung 3-26, A) könnte dies heißen, dass sich ungefähr 20 % des Ensembles nach dem Ausschalten in einem Zustand befinden, der thermisch von dem Aus-Zustand in einen fluoreszierenden Zustand übergeht. Etwa 40 % der Moleküle befänden sich nach dem Ausschalten in einem Zustand, aus dem sie durch einen Puls des 660 nm Lasers mit hoher Energie in einen fluoreszierenden Zustand schalten lassen und etwa 80 % wären gezielt mit dem 785 nm Laser in den An-Zustand schaltbar. Die resultierende Anschlagkinetik wäre immer eine Mischkinetik aus gezieltem Anschalten und thermischem Rückfall der Proteine.

Wie vorab beschrieben, sind diese Unterschiede der sich einstellenden Gleichgewichtszustände nach einer Pause, einem 660 nm Laser Puls mit hoher Leistung inklusive einer darauffolgenden Pause oder nach einem 785 nm Laserpuls bei W3.37 deutlich kleiner als bei W3. Dies könnte bedeuten, dass durch die eingefügten Mutationen die Verhältnisse zwischen den Subpopulationen verschoben wurden beziehungsweise ihre Dynamik verändert wurde. Die Theorie, ob es sich um mehrere Subpopulationen handelt und ob diese stationär oder hoch dynamisch sind, ließe sich zum Beispiel mit einem Bleichexperiment überprüfen. Wenn das vorherige Bleichen der FP des Ensembles mit dem 660 nm Laser zu einer Veränderung der in Abbildung 3-26 gezeigten Verhältnisse führen würde, könnte dies heißen, dass die vorhandenen Subpopulationen stationär sind. Würde das Verhältnis gleichbleiben, könnte dies hingegen heißen, dass die Subpopulationen sehr dynamisch sind.

Wie in Absatz 1.3.1.5 beschrieben wird der natürliche Photozyklus der Phytochrome noch kontrovers diskutiert. So zeigten sich beispielsweise sowohl für den Übergang von dem Pr- in das Meta-R-Stadium als auch für denjenigen von dem Pfr- in das Lumi-F-Stadium multiexponentielle Kinetiken der Lebenszeiten der Zustände. Die Frage, ob es sich hierbei um ein homogenes oder ein heterogenes Modell handelt, ist noch nicht final geklärt. Ersteres würde für verschiedene Intermediate des Übergangs sprechen und letzteres für verschiedene Subpopulationen des Grundstadiums, die sich durch unterschiedliche Übergangskinetiken auszeichnen. Wang et al., 2016a, nehmen für beide Übergänge ein homogenes Modell an (Andel et al., 1996; Borucki et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2012; Heyne et al., 2002; Kim et al., 2012; Kneip et al., 1999; Rüdiger et al., 1983; Shcherbakova et al., 2015b; van Thor et al., 2007; van Wilderen et al., 2009; Wang et al., 2016a).

Der zeitlimitierende Prozess für die RESOLFT-Nanoskopie ist sowohl bei den generierten NIR RSFPs als auch bei der Ausgangsvariante W3 der Prozess des Anschaltens. Aufgrund des thermischen Übergangs in einen fluoreszierenden Zustand nach dem Ausschalten des Ensembles (siehe Abbildung 3-26) muss davon ausgegangen werden, dass der Prozess des Anschaltens sich immer mit diesem thermischen Rückfall vermischt. Die Halbwertszeit des Anschaltens, welche sich mindestens aus diesen beiden Prozessen zusammensetzt, liegt bei allen generierten NIR RSFPs sowie bei der Ausgangsvariante im Millisekundenbereich. Die Halbwertszeit des Ausschaltens liegt hingegen im Bereich unter 100  $\mu$ s. Dass der Anschlagprozess so lange benötigt, lässt sich teilweise damit erklären, dass dieser Prozess derjenige ist, welcher durch eine längere, also energieärmere, Wellenlänge ausgelöst wird. In Kombination damit, dass der Übergang in den An-Zustand eine Vermischung aus thermischem Übergang und gezieltem Anschalten ist, kann als weitere Begründung dafür angesehen werden, dass dieser Übergang der langsamere Prozess ist.

Bei den generierten NIR RSFPs zeigt der Aus-Zustand, passend zu bisher publizierten Daten (Piatkevich et al., 2013b), eine langwelligere Absorption als der An-Zustand. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das Chromophor im An-Zustand kationisch und als cis-Isomer und im Aus-Zustand ebenso kationisch und als trans-Isomer vorliegt. Die trans-Konformation wird durch die Rotation des D-Rings des BVs um die C15-C16-Doppelbindung erreicht. Der D-Ring des Chromophors ist weder im Pr- noch im Pfr-Stadium in der Ebene der drei übrigen Ringe des Chromophors und dreht sich während der Isomerisierung um  $180^\circ$  (siehe Abbildung 4-5). Auch der A-Ring rotiert leicht zwischen den beiden Stadien (Auldridge et al., 2012; Piatkevich et al., 2013b).



**Abbildung 4-5: Chromophor des Bakteriophytochroms von *D. radiodurans* im Pr- beziehungsweise Pfr-Stadium.**

Für die Abbildung wurden die von Takala et al., 2014 veröffentlichten Strukturdaten des Pr-Stadiums (A, pdb 4O0P) beziehungsweise die von Burgie et al., 2016 veröffentlichten Strukturdaten des Pfr-Stadiums (B, pdb 5C5K) verwendet. Die Buchstaben stehen für die Ringe A-D, beziehungsweise die Z oder E Konformation der jeweiligen Methindoppelbindung.

Es stellt sich die Frage, warum das Protein im Aus-Zustand langwelliger absorbiert als im An-Zustand. Dies könnte dadurch begründet sein, dass im Aus-Zustand Reaktionen zwischen dem Chromophor und seiner direkten Umgebung vorliegen, die das  $\pi$ -Elektronensystem erweitern. Außerdem könnte es sein, dass der A-Ring im Pfr-Stadium mehr zum  $\pi$ -Elektronensystem beiträgt als im Pr-Stadium. Es wäre interessant zu sehen, ob sich die kurzwellige Soret-Bande der NIR RSFPs zwischen dem An- und dem Aus-Zustand der Varianten stark verändert und ob sich durch ein Anregen dieser Bande ebenfalls ein Übergang zwischen den Zuständen induzieren lässt. Dies könnte darauf hindeuten, dass das Ensemble der nicht fluoreszierenden Proteine verschiedenen Aus-Zuständen zugrundeliegt. Für zukünftige Experimente ist hierfür geplant, das automatisierte Mikroskop (siehe Absatz 5.3.7.1) dahingehend umzubauen, dass kurzwellige Laser zur Anregung der Soret-Bande und Laser der Wellenlänge 671 nm und 785 nm gleichzeitig angesteuert werden können.

### Bleichstabilität der NIR RSFPs

Die Bleichstabilität eines RSFPs setzt sich immer aus dem An-Zustandsbleichen und der Schaltermüdung zusammen. Das Bleichverhalten der generierten NIR-RSFPs im Vergleich zu W3 ist in Abbildung 3-27 dargestellt. Keine der Varianten wurde nach 8000 Schaltzyklen auf die Hälfte des Maximalsignals der Fluoreszenz gebleichen. Diese hohe Bleichstabilität ist unter bisher publizierten RSFPs einmalig (beispielsweise Grotjohann et al., 2012; Lavoie-Cardinal et al., 2014). Die Experimente wurden mit den für die Varianten evaluierten optimalen Laserleistungen durchgeführt. Diese entsprechen ungefähr einer Intensität von etwa  $3,6 \text{ kW/cm}^2$  (660 nm) beziehungsweise  $3,1 \text{ kW/cm}^2$  (785 nm) (siehe Anhang, Tabelle 11-5). Für die Anwendung in der RESOLFT-Nanoskopie ist die höhere Bleichstabilität ein Vorteil. Sie sollte die Aufnahme von zahlreichen aufeinanderfolgenden Bildern ermöglichen und somit beispielsweise die *Time-lapse* Mikroskopie ermöglichen (Grotjohann et al., 2012). Auch für das nicht modifizierte Bakteriophytochrom *RpBphP1* wurde eine hohe Resistenz gegen das Bleichen gezeigt (Yao et al., 2016), was

ein weiterer Vorteil der Klasse der Bakteriophytochrome als Ausgangsvarianten für die Generierung von RSFPs ist.

### Unterschiede der Schaltcharakteristika unter konfokalen und nicht konfokalen Bedingungen

Im Rahmen der in Absatz 3.4.5 vorgestellten Charakterisierung der Schaltbedingungen unter konfokalen Bedingungen der Varianten W3.37 und W3.103 und W3 wurde deutlich, dass sich die Unterschiede zwischen den Varianten unter diesen Bedingungen stark vergrößert haben. Die Ausgangsvariante weist deutlich schlechtere Schalteigenschaften auf als am automatisierten, nicht konfokalen Mikroskop gemessen wurden (Vergleich Abbildung 3-19 und Abbildung 3-28). Dies bestätigt die vorab beschriebene Wichtigkeit der Charakterisierung der Schaltcharakteristika der generierten NIR RSFPs unter konfokalen Bedingungen und in der Zielprobe. Die Unterschiede der Messungen sind zum Teil mit der leicht verschobenen Anregungs- beziehungsweise Ausschaltwellenlänge zu erklären. Diese ist am automatisierten Mikroskop mit 671 nm um 11 nm in den langwelligeren Bereich verschoben als am konfokalen Mikroskop. Hier wird ein 660 nm Laser für das Anregen und Ausschalten der FPs verwendet. Des Weiteren ist am automatisierten Mikroskop keine perfekte Überlappung der Laserspots zu erwarten. Der Aufbau ist weder so gut justierbar wie der konfokale Charakterisierungsaufbau, noch ist, unter anderem aufgrund der fehlenden Konfokalität, anzunehmen, dass die Spots sich in Form und Größe gleichen. Hinzu kommt, dass am automatisierten Mikroskop immer eine Mischpopulation aus Fluoreszenzantworten von FPs verschiedener Zellen einer *E. coli*-Kolonie aufgenommen wird, die aufgrund der fehlenden Konfokalität und des folglich großen Detektionsvolumens in Z-Richtung mit unterschiedlichen Laserpowern angeregt beziehungsweise geschaltet wurden.

#### 4.4.4 Erste Anwendung der generierten Variante W3.37

Wie bei den konfokalen Messungen der Schalteigenschaften deutlich wurde, ist das Schaltverhalten der Varianten W3.37 und W3.103 maßgeblich verbessert gegenüber der Ausgangsvariante W3. Mit dem herausragenden Bleichverhalten der Varianten und den erreichten Schalthintergrundwerten von 11-15 % (W3.103 beziehungsweise W3.37) ist bereits eine Auflösungsverbesserung in der RESOLFT-Nanoskopie zu erwarten. Wie in Abbildung 3-30 zu sehen ist, konnte mit der Variante W3.37 eine Auflösungsverbesserung um das bis zu 2,5-Fache erreicht werden. Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur erstmals verbesserte NIR RSFPs generiert und charakterisiert, sondern auch erstmals die Anwendung in der RESOLFT-Nanoskopie mit diesen Varianten und überhaupt im NIR Wellenlängenbereich des Lichts gezeigt. Das Maß der Auflösungsverbesserung wird derzeit durch die vergleichsweise hohe Restfluoreszenz des Ensembles im Aus-Zustand begrenzt und ist verbesserungswürdig. Bezüglich der Verweildauer pro Pixel weisen die generierten NIR RSFPs mit ungefähr 25 ms ähnliche Zeiten wie das RSFP Dreiklang (Brakemann et al., 2011) auf und sind demnach benachteiligt gegenüber der Klasse der rsEGFPs (Chmyrov et al., 2013; Grotjohann et al., 2011; Grotjohann et al., 2012; Schnorrenberg et al., 2016). Insbesondere für die Aufnahme dynamischer Strukturen in lebenden Zellen, wie beispielsweise dem ER, ist dies ein limitierender Faktor. Hinsichtlich der Bleichstabilität und ihrer spektralen Eigenschaften im NIR Bereich des Lichts sind sie jedoch allen bekannten GFP-basierten RSFPs überlegen.

#### 4.4.5 Ausblick NIR RSFPs

##### Alternative RESOLFT-Schemata

Da der Anschaltprozess der zeitlimitierende Prozess ist und der An-Zustand stabil ist, könnte in zukünftigen Experimenten getestet werden, ob die Durchführung der RESOLFT-Nanoskopie mit NIR RSFPs durch eine Vereinheitlichung des Anschaltprozesses beschleunigt werden könnte. So könnte beispielsweise das Anschalten der Fluorophore vorab im Weitfeld oder linienweise durchgeführt werden, anstatt es, wie in der vorliegenden Arbeit und in der klassischen RESOLFT-Anwendung üblich, pro Pixel durchzuführen. Dies würde den Prozess der Bildaufnahme beschleunigen. Auch die Durchführung eines parallelisierten Schemas (Chmyrov et al., 2013; Wang et al., 2016b) wäre denkbar. In zukünftigen Screenings sollten die Parameter der Anschaltkinetik, des erreichten Schalthintergrunds und des thermischen Übergangs in einen fluoreszierenden Zustand nach dem Ausschalten des Ensembles besonders berücksichtigt werden. Wie in Abbildung 3-26 zu sehen ist, ist bei Variante W3.37 der thermische Übergang in einen fluoreszierenden Zustand stärker vorhanden als bei der Ausgangsvariante W3. Wenn dieser Übergang durch zukünftige Screenings noch weiter gesteigert werden kann, wäre eventuell die RESOLFT-Nanoskopie mit nur einer Laserwellenlänge möglich. Dies würde die technischen und finanziellen Anforderungen an den mikroskopischen Aufbau verringern und die Lichtmenge, welche auf die Probe einwirkt, reduzieren.

##### Alternative Screeningansätze und Ausgangsvarianten

Falls in zukünftigen Screenings Varianten auffallen, bei denen der selbständige Übergang in einen fluoreszierenden Zustand geringer ausfällt, wäre es interessant zu testen, ob sich der Aus-Zustand weiter stabilisieren lässt, indem man eine NTE aus pflanzlichen Phytochromen anfügt (Burgie et al., 2014a; Nagano, 2016).

Auch alternative Ausgangsvarianten sollten in das Screening einbezogen werden. Hier ist es empfehlenswert, die in der Positionsstudie vorgestellten Positionen (siehe Absatz 3.4.2 und Absatz 4.4.1) gezielt anzusteuern. Des Weiteren zeigen Positionen wie 115 und 296, dass auch Positionen in großer Entfernung zum Chromophor die Schalteigenschaften beeinflussen können. Eine Ausdehnung der zufälligen Mutagenesen ist demnach, wie für die generierten NIR FPs beschrieben (siehe Absatz 4.3.2), auch hier naheliegend. Aufgrund der vorgestellten Daten zu den generierten Ausgangsvarianten und dem Einfluss des carboxyterminalen Endes der Varianten auf die Charakteristika der FPs, sollten variable carboxyterminale Enden in die Generierung von Bibliotheken involviert werden.

Bei der Auswahl von neuen Ausgangsvarianten wäre es interessant, *bathy* Phytochrome (Giraud et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003; Karniol et al., 2005) hinzuzuziehen, welche sich im Grundzustand im Pfr-Stadium befinden.

Insbesondere für den Fall, dass es nicht möglich ist, die Hintergrundfluoreszenz des Ensembles im Aus-Zustand weiter zu verringern, wäre es interessant das Screening nach Positivschaltern auszudehnen. Hier wäre eine Verwendung der Varianten für geschütztes STED (siehe Absatz 1.1.1.1 und Danzl et al., 2016) denkbar. Dies ist mit den generierten negativschaltenden RSFPs aufgrund der langwelligen Anschaltwellenlänge nicht möglich, da die verwendete STED-Wellenlänge die Fluorophore auch anschaltet. Dies wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die generierten Varianten an dem in Absatz 5.4.2 beschriebenen Aufbau getestet und bestätigte sich (Daten nicht gezeigt). Eine Anwendung für geschütztes STED ist mit den generierten negativschaltenden Varianten demnach nicht denkbar, wäre aber für positivschaltende Varianten sehr interessant.



Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Bakteriophytochrom-basierte RSFPs, mit spektralen Eigenschaften im NIR Bereich des Lichts, generiert. Mittels (semi)rationaler Mutagenese-strategien konnten mehrere Positionen mit Einfluss auf die Charakteristika dieser neuen Untergruppe der RSFPs aufgedeckt werden. Diese Positionen waren entscheidend für die Generierung der NIR RSFPs und sind auch für die zukünftige Optimierung und Generierung von NIR RSFPs von großem Interesse. Durch die detaillierte Charakterisierung der Schalteigenschaften ausgewählter Varianten wurden wichtige Parameter für die RESOLFT-Nanoskopie festgelegt. Somit ist es ermöglicht worden RESOLFT-Nanoskopie im tiefroten Wellenlängenbereich des Lichts durchzuführen.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1 DNS-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNS aus *E. coli*-Zellen wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Mini beziehungsweise Midi-Prep Kits (Qiagen, NW, DE) durchgeführt. Hierbei wurde nach Kitanleitung vorgegangen. Die Isolierung der Plasmid-DNS aus *E. coli*-Zellen beruht hierbei auf der alkalischen Lyse der bakteriellen Zellwand.

#### 5.1.2 RNS-Isolierung aus Säugerzellen

RNS-Isolierung aus Säugerzellen war im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des kombinierten Screenings in *E. coli*- und Säugerzellen nötig (siehe Absatz 3.1). Hierfür wurden mit Virenpartikeln infizierte Säugerzellen (siehe Absatz 5.2.5) verwendet. Für die Isolierung der RNS wurde der peqGOLD Total RNA Kit (VWR-Firma, PEQLAB Biotechnologie GmbH, BY, DE) nach Protokoll verwendet.

#### 5.1.3 Restriktion und Ligation von DNS

Für die Restriktion von DNS wurden jeweils die genannten Restriktionsenzyme der Firma *New England Biolabs* (MA, USA) verwendet und weitestgehend nach Herstellerangaben vorgegangen. Für die jeweiligen Kombinationen aus Restriktionsenzymen wurden die optimalen Pufferbedingungen des Herstellers ausgewählt. Bei dem Verdau eines PCR-Amplifikats (siehe Absatz 5.1.5 oder 5.1.7) wurde der komplette PCR-Ansatz für den Verdau eingesetzt. Für den Verdau eines Vektorgerüsts wurden in der Regel zwischen 5 µg und 8 µg DNS eingesetzt. Dem Ansatz wurden neben den verwendeten Enzymen (je 1 µl) jeweils eine einfache Konzentration des entsprechenden Puffers für die Restriktionsenzyme und, je nach verwendeten Enzymen, die einfache Konzentration an Rinderalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) hinzugefügt. Nach dem Verdau eines Vektorgerüsts wurden die geschnittenen Vektorenden durch die alkalische Phosphatase (FastAP, *Thermo Fisher Scientific*, MA, USA) dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation zu minimieren. Hierfür wurde dem Verdauansatz 1 µl der FastAP hinzugefügt und 30 – 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Für die Ligation wurde die T4-DNS-Ligase (5 Weiss U/µl, *Thermo Fisher Scientific*, MA, USA) verwendet. Insert zu Vektor wurden in einem ungefähren, molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Ein Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x µl Insert  
x µl Vektor  
(Verhältnis 3:1)  
1 µl T4-DNS-Ligase (5 Weiss U/µl)  
2 µl 10x T4-DNS-Ligase-Puffer  
(*Thermo Fisher Scientific*, MA, USA)  
mit H<sub>2</sub>O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt

Die Ligation erfolgte für ungefähr drei Stunden bei RT und wurde durch Inaktivierung der Ligase mittels zehnmütiger Inkubation bei 65 °C beendet.

#### 5.1.4 Aufreinigung von DNS

Die Aufreinigung von DNS wurde je nach Ansatz und Anwendung nach einer Agarosegelelektrophorese durch Gelextraktion, durch eine PCR-Aufreinigung oder Dialyse durchgeführt.

Bei der Aufreinigung aus dem Agarosegel wurde die DNS zunächst über die Gelelektrophorese (1,2 % (w/v) Agarose gelöst in 1xTAE Buffer: 10x 400 mM Tris (Merck, HE, DE), 200 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA (AppliChem, HE, DE) pH 7,2; ungefähr 70 V für 30 Minuten) aufgetrennt (Laufpuffer: 40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2). Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNS aus den Gelfragmenten erfolgte nach Herstelleranweisung mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, NW, DE).

Die Aufreinigung von beispielsweise Verdauungsprodukten (siehe Absatz 5.1.3) erfolgte mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Herstelleranweisungen (Qiagen, NW, DE).

Ligationsansätze (siehe Absatz 5.1.3) oder Amplifikationen von kompletten Plasmiden (siehe Absatz 5.1.8) wurden vor der Elektroporation in *E. coli* (siehe Absatz 5.2.2) über Mikrodialyse (Membranfilter, 0.025 µm Porengröße, Merck Millipore, C, IRL) entsalzt.

#### 5.1.5 Klonierung von Konstrukten zur Expression in *E. coli*

Für die Expression in *E. coli* wurde im Fall der bakteriophytochrom-basierten FPs das Expressionssystem pBAD/His B verwendet. Für die Arbeiten mit mNeptune wurde das Expressionssystem pQE31 (Qiagen, NW, DE) verwendet. Da auf die Ergebnisse eines RSFPs auf Basis von mNeptune nur im Rahmen der Einleitung dieser Arbeit eingegangen wird, wird das hier verwendete Expressionssystem und diesbezügliche Klonierungsstrategien, nicht näher beschrieben.

Das Ursprungskonstrukt für die in dieser Arbeit verwendeten pBAD/His B-Konstrukte ist pBAD-mKalama1 und wurde von Robert Campbell (Addgene Plasmid # 14892) zur Verfügung gestellt. Für die Klonierung einer FP-Variante in pBAD/His B, wurde das FP mithilfe der Primer 6185 und 6361 (W1-Varianten), 6195 (W2-Varianten), 6196 (W3-Varianten) beziehungsweise 6197 (W4-Varianten) amplifiziert. Die Primer Sequenzen sind in Tabelle 11-3 (siehe Anhang) hinterlegt. Es wurden die folgenden Reagenzien zusammengefügt:

- 5 µl 10x PCR Puffer  
(100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; Merck, HE, DE)
- 1,5 µl *sense*-Primer (10 µM)
- 1,5 µl *antisense*-Primer (10 µM)
- 50 ng-100 ng Matrize
- 1 µl dNTP Stocklösung  
(jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
- 0,5 µl *Pfu*-DNA Polymerase (2,5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)
- aufgefüllt auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O

Die PCR wurde bei folgendem Programm mit an die Matrizenlänge angepasster Elongationszeit durchgeführt. Man geht hierbei davon aus, dass die *Pfu*-DNS-Polymerase 500 bB/Minute amplifiziert:

94°C	5'	} 30x
94°C	1'	
55°C	1'	
72°C	2'	
72°C	10'	

Nach der Amplifikation wurden die Amplifikate mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *Sall* verdaut und über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* in das vorab verdaute Vektorgerüst (pBAD-mKalama1) ligiert. Somit wurde mKalama1 mit der jeweiligen FP-Variante ausgetauscht. Hierfür wurde die T4-DNS-Ligase verwendet (siehe Absatz 5.1.3).

### 5.1.6 Klonierung von Konstrukten zur Expression in Säugerzellen

Für die Klonierung von Konstrukten zur Expression in Säugerzellen wurde für die Amplifikation des gewünschten FPs das im vorherigen Absatz beschriebene PCR-Protokoll verwendet. Die Primer variierten je nach Zielkonstrukt ebenso wie das Vektorgerüst. Die Primersequenzen sind in Tabelle 11-3 (siehe Anhang) hinterlegt.

#### FP-MAP2

Für die Erstellung von Konstrukten zur Expression von Fusionsproteinen mit dem Mikrotubuli-assoziierten Protein 2 (*microtubule-associated protein 2*, MAP2) wurde als Vektorgerüst ein innerhalb der Arbeitsgruppe erstelltes Konstrukt zur Expression eines Fusionsproteins aus dem FP rsFastLime mit MAP2 verwendet. Dieses wurde ursprünglich durch die Amplifikation der MAP2 Sequenz (Vorlage: pDONR223-MAP2; Lamesch et al., 2007) und den Austausch dieser Sequenz über die Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* mit der Sequenz von Tubulin in dem Plasmid pEGFP-Tub (BD Biosciences, NJ, USA) hergestellt. Die Amplifikation der gewünschten FP-Variante erfolgte mithilfe der Primer 7127 und 7128 (W4-Varianten). Zur Erstellung der in dieser Arbeit genutzten MAP2-FP Fusionskonstrukte wurde nun das amplifizierte FP mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *NheI* verdaut. Dieses Produkt wurde dann über dieselben Schnittstellen in das ebenso verdaute Konstrukt rsFastLime-MAP2 ligiert, wodurch die Sequenz von rsFastLime durch diejenige der jeweiligen FP-Variante ersetzt wurde.

#### pMito-FP

Um die zu charakterisierenden FP-Varianten in der mitochondrialen Matrix zu lokalisieren, wurde das FP DsRed in dem Konstrukt pMito-DsRed1 (Clontech, CA, USA, bereitgestellt von Peter Lipp, UKS Homburg) mit dem gewünschten FP ausgetauscht. Das FP wurde hierfür mithilfe der Primer 7133 und 5541 (W4-Varianten) amplifiziert und das resultierende Produkt mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *NotI* verdaut. Dieses wurde dann in das mit *AgeI* und *NotI* verdaute Vektorgerüst ligiert.

#### (RS)FP-Krt18

Für die Erstellung eines Konstrukts zur Expression des Fusionsproteins FP-Krt18 wurde das gewünschte FP mithilfe der Primer 6380 und 5540 (W3-Varianten) beziehungsweise 6380 und 5541 (W4-Varianten) amplifiziert. Nach der Restriktion mit den Enzymen *KpnI* und *NotI* wurde es in das ebenso verdaute Konstrukt pTagRFP-Keratin18 (Evrogen, Moskau, RU) ligiert. Dies führte zu dem Austausch von TagRFP mit der jeweiligen FP-Variante.

### Cav1-FP

Um die FP-Varianten fusioniert an Caveolin 1 (Cav 1) zu exprimieren wurde zunächst ein Konstrukt generiert, welches die aminoternale Fusion an das FP ermöglicht. Hierzu wurde das FP mithilfe der Primer 7130 und 7131 (W4-Varianten) amplifiziert. Das resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *NotI* geschnitten. Dann wurde es in das mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *NotI* geschnittene Konstrukt TagRFP-N (Evrogen, Moskau, RU) ligiert. Das resultierende Konstrukt war FP-N. Um nun das Konstrukt zur Expression eines FP-Cav 1 Fusionsproteins zu generieren, wurde zunächst die Sequenz von Cav 1 amplifiziert. Als Grundlage hierfür diente das Konstrukt pDONR223-CAV 1 (Lamesch et al., 2007). Für die Amplifikation wurden die Primer 4571 und 4572 verwendet. Das Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *BamHI* verdaut und in das ebenso verdaute Konstrukt FP-N ligiert.

### CEP 41-FP

Ein wie oben erstelltes Konstrukt FP-N agierte auch als Grundlage für die Generierung eines Fusionsproteins mit dem centrosomalen Protein 41 (CEP 41). Hierfür wurde die Sequenz des CEP 41 amplifiziert (Basis Konstrukt: pENTRA1A CEP41\_N\_fus; von Grazvydas Lukinavicius, Lausanne, bereitgestellt) und über die Schnittstellen *NheI* und *BamHI* in das Konstrukt FP-N ligiert.

### FP-PTS

Für die Herstellung eines Konstrukts zur Lokalisierung des gewünschten FPs in den Peroxisomen wurde ein vorab in der Arbeitsgruppe generiertes Konstrukt mit einer Lokalisierungs-Zielsequenz (*Peroxisomal Targeting Signal*, PTS) mit der Aminosäuresequenz S-K-L als Zielkonstrukt verwendet. Dieses wurde ursprünglich durch die Amplifizierung des gewünschten FPs mit einem Primerpaar erstellt, wobei der *anti-sense* Primer die Sequenz des PTS enthält. Durch darauffolgende Ligation in das Konstrukt pEGFP-Tub (BD Biosciences, NJ, USA) über die Schnittstellen *BamHI* und *NheI* entstand das Vektorgerüst pEGFP-PTS für die in dieser Arbeit durchgeführte Erstellung von FP-PTS-Fusionsproteinen. Das FP wurde wie vorab für die Erstellung eines MAP2-FP-Fusionskonstrukts amplifiziert und verdaut und in das gleichermaßen verdaute hier beschriebene Vektorgerüst pEGFP-PTS ligiert. Dies führte zum Austausch von EGFP mit dem gewünschten FP.

### (RS)FP-Vimentin

Die Generierung eines Konstrukts zur Expression eines Vimentin-Fusionsproteins wurde mithilfe des Vektors pmKate2-Vimentin (Evrogen, Moskau, RU) als Gerüst durchgeführt. Hierfür wurde die jeweilige FP-Variante zunächst mithilfe der Primer 6452 und 6004 (W4-Varianten), 6452 und 6003 (W3-Varianten), 2244 und 5534 (mCardinal) beziehungsweise 7968 und 6385 (mIFP) amplifiziert. Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *NotI* wurde es in den mit den Restriktionsenzymen *AgeI* und *NotI* verdauten Vektor ligiert. Somit wurde mKate2 durch das gewünschte FP ersetzt.

### (RS)FP-NUP50

Die Erstellung eines Konstrukts zur Expression eines Fusionsproteins mit dem Kernporenprotein NUP50 erfolgte mithilfe des Konstrukts mEmerald-Nup50-C-10 von Michael Davidson (Addgene Plasmid # 54209). Das gewünschte FP wurde mithilfe der Primer 7138 und 7128 (W4-Varianten) oder 7138 und 7129 (W3-Varianten) amplifiziert. Das resultierende Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *BglII* verdaut und im Anschluss in das ebenso verdaute Konstrukt mEmerald-NUP50-C-10 ligiert. Somit wurde das FP mEmerald mit der jeweiligen FP-Variante ausgetauscht.

### FP-H2bn

Für die Erstellung eines Konstrukts zur Expression eines Fusionsproteins aus dem gewünschten FP und Histon 1 wurde ein zuvor in der Arbeitsgruppe erstelltes Gerüst verwendet. Für dieses wurde die Sequenz von Histon 1 H2bn aus dem Konstrukt pDonR223-HIST1H2BN (Lamesch et al., 2007) herausamplifiziert.

Nach dem Verdau wurde es über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XhoI* und *BamHI* in den Vektor pEGFP-Tub (BD Biosciences, NJ, USA) ligiert. Es resultierte das Konstrukt pEGFP-Histon 1. Für die Amplifizierung des gewünschten FPs und den darauffolgenden Verdau des Produkts wurde wie vorab für die Generierung von Konstrukten für die Expression eines MAP2-FP- und eines PTS-FP-Fusionsproteins beschrieben vorgegangen. Somit wurde die jeweilige FP-Variante über die Schnittstellen *NheI* und *BglII* mit EGFP in dem beschriebenen pEGFP-Histon 1 Konstrukt ausgetauscht.

### FP-CENP C

Für die Erstellung eines Konstrukts zur Expression eines Fusionsproteins aus der jeweiligen FP-Variante und dem centromeren Protein C (CENP C) wurde ebenso eine vorab in der Arbeitsgruppe erstellte Grundlage verwendet. Die Sequenz von CENP C wurde von dem Konstrukt pDONR223 CENP C (Lamesch et al., 2007) gewonnen. Diese wurde dann über die Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* in das Konstrukt pEGFP-Tub BD (Biosciences, NJ, USA) ligiert. Somit entstand das Konstrukt pEGFP-CENP C. Das entsprechende FP wurde dann mithilfe der Primer 7127 und 7137 (W4-Varianten) amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *NheI* verdaut und in das mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NheI* verdaute Konstrukt pEGFP-CENP C ligiert. Dies führte zu dem Austausch des FPs EGFP mit dem gewünschten FP.

### FP-ER

Für die Lokalisierung der zu charakterisierenden FPs im endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde das Konstrukt pEF/myc/ER (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) als Basis verwendet. Das gewünschte FP wurde mithilfe der Primer 7139 und 7135 (W4-Varianten) beziehungsweise 916 und 917 (mCherry) amplifiziert und nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *NotI* in das ebenso verdaute Konstrukt pEF/myc/ER ligiert.

## 5.1.7 Zufällige Mutagenese

Die Methode der Error-Prone-Mutagenese diente der willkürlichen Einführungen von Mutationen in das gewünschte FP. Hierbei wird die *Taq*-DNS-Polymerase verwendet, welche aufgrund der nicht vorhandenen 3' Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Funktion) eine natürliche Fehlerrate von rund 1:9000 hat. Diese wird bei dem Protokoll der Error-Prone-Mutagenese durch die Zugabe von Mangan-Ionen ( $Mn^{2+}$ ) erhöht, welche mit den Magnesium-Ionen ( $Mg^{2+}$ ) um das aktive Zentrum der Polymerase konkurrieren. Die unterschiedliche Größe und Elektronegativität der Mangan-Ionen führt hierbei dazu, dass die Polymerase weniger exakt arbeitet. Zusätzlich wird der Polymerase eine ungleichmäßige Zusammensetzung an Nukleotiden zur Verfügung gestellt, wobei die Pyrimidin-Nukleotide in fünffach stärkerer Konzentration eingesetzt werden als die Purin-Nukleotide (EP-Stocklösung der dNTPs: 2mM dATP, 2mM dGTP, 10mM dCTP, 10mM dTTP, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Die Anzahl an fehlerhaft eingebauten Nukleotiden während des Replizierens der DNS kann über die Menge an hinzugefügten Mangan-Ionen und über die eingesetzte DNS-Menge beeinflusst werden.

Als Vorlagen für die Error-Prone-Mutagenese wurden die wie in Absatz 5.1.5 beschrieben erstellten pBAD-FP-Konstrukte verwendet. Die Primer wurden so entworfen, dass sie viel Überhang mit dem Vektor und nur einen kleinen oder keinen Überhang mit dem FP haben (W-Varianten Primer pBad: 3744 und 6185; W-Varianten Primer pSCA3: 5925 und 5540 für W3-Varianten beziehungsweise 5541 für W4-Varianten siehe Tabelle 11-4 (Anhang). Durch die Primeranlagerung kam es somit nicht zu einer überflüssigen Verringerung der Mutationsmöglichkeiten. Für eine Error-Prone-Reaktion wurden folgende Reagenzien zusammengefügt:

10 µl *sense*-Primer (10µM)  
 10 µl *antisense*-Primer (10 µM)  
 ungefähr 1 µg Matrize  
 10 µl 10x Error-Prone Puffer  
 (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 70 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck, HE, DE); 0,1 % (w/v) Gelatine;  
 pH 8,3)  
 10 µl dNTP EP-Stocklösung  
 1,5-3 µl MnCl<sub>2</sub> (10 mM Stocklösung, VWR, HE, DE)  
 2 µl *Taq*-DNS Polymerase (40 U/µl, Promega, WI, US)  
 Aufgefüllt auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O

Bevor der Ansatz in den Thermozykler überführt wurde, wurde er in 4 Aliquots a 25 µl aufgeteilt, um die Varianz der Mutationen zu erhöhen. Die Amplifikation erfolgte bei folgendem Programm, wobei die Elongationszeit an die Matrizenlänge angepasst wurde. Man geht hierbei davon aus, dass die *Taq*-DNS-Polymerase 1000 bp/Minute amplifiziert:

95°C	1'	} 30x
95°C	30''	
55°C	45''	
72°C	1'20''	
72°C	2'	

Nach der Vollendung der Zyklen wurden die 4 Aliquots vereint und für mindestens 2 Stunden bei 37°C mit *DpnI* (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) verdaut, um die methylierte Matrize zu entfernen. Anschließend wurde der Verdau über eine Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (siehe Absatz 5.1.4) und bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SalI* für mindestens zwei Stunden verdaut, um darauffolgend erneut aufgereinigt zu werden (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, NW, DE, siehe Absatz 5.1.4).

Die auf diese Weise erhaltenen mutagenisierten Gensequenzen des gewünschten Proteins wurden in den mit *EcoRI* und *XbaI* verdauten und mit der alkalischen Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) dephosphorylierten pBAD-Vektor ligiert (siehe Absatz 5.1.3 und 5.1.5). Nach der Mikrodialyse (Membranfilter, 0.025 µm Porengröße, Merck Millipore, C, IRL) der Ligationen wurden sie zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet (siehe Absatz 5.2.2).

## 5.1.8 (Ziel-)gerichtete Mutagenese

### 5.1.8.1 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese (*Site-directed mutagenesis*, SD) diente dazu, eine Mutation in ein spezifisches Codon einzubringen. Hierbei kann, je nach Zusammensetzung des zueinander komplementären Primerpaares, an einem gezielten Ort auf einem Plasmid entweder ein spezifisches Codon oder ein zufälliges Codon eingesetzt werden. Als Vorlage dienten die wie in Absatz 5.1.5 beschrieben erstellten pBAD-FP-Konstrukte. Die Primer wurden jeweils so gewählt, dass die zu mutierende Stelle ungefähr in der Mitte des Primers liegt und von ungefähr 15-20 Basenpaaren flankiert wird. Für das Einsetzen zufälliger Codons wurden die Primer an der gewünschten Stelle mit zufälligen Basen synthetisiert. Dies wurde in der Sequenz mit „N“ markiert (N=A, G, C oder T). Die für die ortsspezifischen Mutagenesen eingesetzten Primer sind



im Anhang in Tabelle 11-4 unter SD aufgelistet. Für die PCR-Reaktion wurden folgende Reagenzien zusammengefügt:

0,05-0,2 µg Matrize  
 5 µl 10x PCR-Puffer  
 (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; pH8.3, Merck, HE, DE)  
 1 µl dNTP Stocklösung  
 (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)  
 1 µl *sense*-Primer (10 µM)  
 1 µl *antisense*-Primer (10 µM)  
 1 µl *Pfu*-DNS-Polymerase (2.5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)  
 Aufgefüllt auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O

Die Amplifikation erfolgte bei folgendem Programm mit an die Matrizenlänge angepasster Elongationszeit. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die *Pfu*-DNS-Polymerase ungefähr 500 bp pro Minute amplifiziert:

95°C	30''	} 16x
95°C	1'	
55°C	1'	
68°C	10'30''	
68°C	10'	

Der im Anschluss durchgeführte mindestens zweistündige Verdau bei 37 °C mit 1µl *DpnI* (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) diente der Entfernung der methylierten Matrize. Da bei diesem PCR-Ansatz das komplette Plasmid amplifiziert wird, konnte das Produkt nach einer Aufreinigung über Mikrodiälyse (Membranfilter, 0.025 µm Porengröße, Merck Millipore, C, IRL) direkt in *E. coli*-Zellen transformiert werden. Die aus der PCR resultierenden zwei linearen DNS-Stränge (*sense* und *antisense*) werden darauffolgend in den Zellen zu zirkulärer DNS repariert.

#### 5.1.8.2 Multiple Ortsspezifische Mutagenese

Ähnlich der ortsspezifischen Mutagenese wurde die Multiple Ortsspezifische Mutagenese (MMM, Sawano und Miyawaki, 2000) ebenso durch Amplifikation des gesamten Plasmids, allerdings in zwei Reaktionen, durchgeführt. Als Vorlage dienten auch hier die, wie in Absatz 5.1.5 beschrieben, erstellten pBAD-FP-Konstrukte. Als Primer für den *sense*-Strang wurden bis zu 5 Primer einer Länge von ungefähr 30 Basenpaaren zur Einführung von Mutationen an verschiedenen Orten auf dem Plasmid entworfen, welche jeweils die zu mutagenisierende Position ungefähr in der Mitte trugen. Sie wurden mit einer Phosphorylierung am 5'-Ende hergestellt [Phos]. Dies ist nötig, um eine Ligation der amplifizierten Primerelongationen durch die hinzugefügte *Taq*-DNS-Ligase (40 U/µl, New England Biolabs, MA, USA) zu ermöglichen. Nach dieser ersten Reaktion erfolgte ein *DpnI*-Verdau (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), um die methylierte und hemimethylierte Matrize zu verdauen. Die hierbei entstehenden Fragmente sowie ein *antisense*-Primer, welcher ausserhalb des zu mutagenisierenden Gens bindet, dienten im zweiten Reaktionsschritt als Primer für die Amplifikation des komplementären Strangs. Der zusätzliche Primer ist hierbei nötig, um das Auftreten von Rückmutationen durch die Fragmente des *DpnI*-Verdau zu verringern. Lagen die Zielpositionen sehr nah beieinander, konnten bis zu drei mutierte Codons in einen Primer eingefügt werden. Die komplementären Überhänge des Primers mussten dementsprechend verlängert werden. Alle verwendeten Primer sind im Anhang in der Tabelle 11-4 unter MMM aufgelistet. Die Effizienz dieser Mutagenese-Strategie liegt bei bis zu 70 % (Sawano und Miyawaki, 2000).

Für die Amplifikation des *sense*-Stranges wurden folgende Reagenzien zusammengefügt:

etwa 50 ng Matrize  
 2,5 µl 10x PCR-Puffer  
 (100 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,3, Merck, HE, DE)  
 2,5 µl 10x *Taq*-Ligase Puffer  
 1 µl dNTP Stocklösung  
 (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)  
 1,4 µl *sense*-Primer (10 µM Stocklösung)  
 1,4 µl *antisense*-Primer (10 µM Stocklösung)  
 1 µl *Pfu*-DNS-Polymerase (2.5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)  
 0,5 µl *Taq*-DNS-Ligase (40 U/µl, New England Biolabs, MA, USA)  
 aufgefüllt auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O

Die erste Reaktion wurde bei folgendem Programm durchgeführt, wobei die Elongationszeit an die Länge der Matrize angepasst wurde. Hierbei geht man davon aus, dass die *Pfu*-DNS-Polymerase 500 bp pro Minute amplifiziert.

65°C	5'		}	18x
95°C	2'			
95°C	30''			
55°C	30''			
65°C	10'30''			
75°C	7'			

Nach dieser ersten Reaktion wurde dem Ansatz 1 µl *DpnI* (10 U/µl, New England Biolabs, MA, USA) und 1,5 µl eines *antisense*-Primers, welcher ausserhalb des zu mutagenisierenden Abschnitts bindet, hinzugefügt. Die hierauf folgende zweite Reaktion wurde bei folgendem Programm durchgeführt:

37°C	60'		}	2x
95°C	30''			
95°C	30''			
55°C	1'			
70°C	10'30''			

Da auch bei diesem PCR-Ansatz das komplette Plasmid amplifiziert wird, konnte das Produkt ebenso nach einer Aufreinigung über Mikrodialyse (Membranfilter, 0.025 µm Porengröße, Merck Millipore, C, IRL) direkt in *E. coli*-Zellen transformiert werden.

### 5.1.9 DNS-Sequenzierung

Durch zielgerichtete Mutagenesen erzeugte Varianten wurden häufig direkt zur Kontrolle sequenziert. Hierzu wurden die Dienste der Sanger-Sequenzierung der Firma SeqLab (FG, CH) über die Außenstelle in Göttingen in Anspruch genommen. Hierfür wurden die Proben wie vorgegeben vorbereitet. In einem Gesamtvolumen von 15 µl wurden 480 ng-1200 ng der Plasmid-DNS mit 3 µl einer 10 µM Primerlösung eingesendet. Das verbleibende Restvolumen wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

### 5.1.10 Reverse Transkriptase-PCR

Für die Verknüpfung zwischen dem Screeningsystem in *E. coli*-Zellen mit dem Screening in Säugerzellen (siehe Absatz 3.1) musste nach der RNS-Isolierung aus den viral infizierten Säugerzellen die isolierte RNS (siehe Absatz 5.1.2) in DNS umgeschrieben werden. Die hierfür nötige reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde mithilfe des AccuScript *PfuUltra* II RT-PCR Kits (Agilent Technologies, CA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde nach Anweisungen des Herstellers vorgegangen. Es wurden die Primer 6185 und 6363 (W3-Varianten beziehungsweise 6364 (W4-Varianten) verwendet (Primersequenzen siehe Tabelle 11-3 im Anhang).

## 5.2 Zellbiologische Methoden

### 5.2.1 *Escherichia coli*

Zur Kultivierung der Bakterien wurde entweder Flüssigmedium *lysogeny broth* Medium (LB-Medium; 0.5% Hefeextrakt (w/v), 0.5% NaCl (w/v), 1% Pepton (w/v, AppliChem, HE, DE), 0.5% NaOH 1N (v/v, Merck, HE, DE)) oder LB - Agar - Platten (LB-Medium mit 1.4% (w/v) Agar) verwendet. Beides wurde zur Gewährleistung der Selektion mit Ampicillin (50µg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA) beziehungsweise Kanamycin (50µg/ml; AppliChem, HE, DE) versetzt.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich der Stamm DH5α (Life Technologies, CA, USA; Hanahan, 1983) für die Plasmidvervielfältigung und die Stämme BL21-AI™ (Invitrogen, CA, USA) und Sure (Stratagene, CA, USA) für die Proteinexpression verwendet.

Zur Erstellung von Dauerkulturen, wurden 600 µl einer Übernachtsflüssigkultur mit 600 µl 80 % (v/v) sterilem Glycerin (Merck, HE, DE) in Kryo-Röhrchen gemischt und nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei - 80 °C gelagert.

#### 5.2.1.1 Expression der Häm-Oxygenase in *E. coli*-Zellen

*E. coli*-Zellen können BV nicht wie Säugerzellen aufnehmen. Aus diesem Grund wurde im Fall der Expression von Bakteriophytochromen zusätzlich ein Expressionssystem für die Häm-Oxygenase verwendet und dem Kultivierungsmedium Hämoglobinvorläufer, welche aufgenommen werden können, hinzugefügt, um die Verfügbarkeit des Chromophors zu gewährleisten.

Das pWA23h-Plasmid zur Expression der Häm-Oxygenase wurde uns von Shcherbakova und Verkhusha, 2013 zur Verfügung gestellt. Es enthält einen Rhamnose-Promotor aus dem pWA21 Plasmid (Wegerer et al., 2008), eine Kanamycin-Resistenz und Teile des COLA-Replikationsursprungs aus dem pCOLADuet-1-Plasmid (Novagen, HE, DE). Anstelle von EGFP enthält es das hmuO-Gen, welches für die Hämoxigenase des Stammes *Bradyrhizobium* ORS278 kodiert. 0,2 % (Flüssigmedium) beziehungsweise 0,02 % (Agarplatten) L(+)-Rhamnose (AppliChem, HE, DE) dienen der Induktion dieses Plasmids. Zusätzlich wurden dem Medium die Hämoglobinvorläufer Eisen(III)-chlorid (50 µM Endkonzentration) und δ-Aminolävulinsäure (100 µM Endkonzentration) (Sigma-Aldrich, MO, USA) hinzugefügt.

Somit wurde gewährleistet, dass die Hämoxigenase exprimiert wird und die *E. coli*-Zellen im Hämoglobinmetabolismus Biliverdin generieren. Um zu vermeiden bei der Proteinexpression stetig Doppeltransformationen durchführen zu müssen, wurde zur Herstellung der kompetenten Zellen (siehe Absatz 5.2.2), im Fall der für die Expression von Bakteriophytochromen verwendeten BL21-AI-Zellen, jeweils ein bereits mit dem pWA23h-Plasmid transformierter Klon verwendet.

### 5.2.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Zellen wurde ausschließlich das Verfahren der Elektroporation verwendet. Die Herstellung der hierfür benötigten elektrokompenten Bakterienzellen wurde angelehnt an das Protokoll von Dower et al., 1988 durchgeführt. Kulturen der gewünschten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium, bei 37 °C und 125 rpm bis zu der optischen Dichte bei 600 nm Anregung ( $OD_{600}$ ) von 0.6-1 angezogen, so dass sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Für die Erstellung von BL21-AI-Zellen zur Expression von Bakteriophytochromen wurde hier mit Zellen gearbeitet, welche das oben beschriebene pWA21- Plasmid (siehe Absatz 5.2.1.1) exprimieren. Dem Medium wurde zur Selektion Kanamycin (50 µg/ml; AppliChem, HE, DE) zugesetzt.

Nach einer Inkubation auf Eis für 30 Minuten wurden die Zellen bei 4°C und 5000 g für 15 Minuten pelletiert. Um die benötigte möglichst geringe Leitfähigkeit der Suspension zu erhalten, wurde diese mehrfach gewaschen. Nach einem Waschschrift in 1/1 Volumen eiskaltem Wasser, folgte ein Waschschrift in 1/2 Volumen eiskaltem Wasser, um die Zellen nach der letzten Zentrifugation in 1/25 Volumen 10% Glycerol (Merck, HE, DE) zu resuspendieren und aliquotiert (40 µl Aliquots) in flüssigem Stickstoff zu gefrieren und sie bei -80 °C zu lagern.

Für eine Transformation wurde ein Aliquot Zellen auf Eis aufgetaut. In eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 2mm Durchmesser wurden 20-40 ng Plasmid-DNS vorgelegt. Die aufgetauten Zellen wurden hinzugefügt. Um die benötigten Spannungspulse zu erreichen, wurde der Elektroporator (Biorad, CA, USA) auf 2.5 kV, 200 Ω und 25 µF eingestellt. Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß mit vorgewärmtem LB-Medium überführt und für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Hiernach wurde, je nach weiterer Anwendung, entweder eine Übernachtskultur mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit den Zellen angeimpft oder sie wurden per Impföse oder Spatel auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausgestrichen oder ausplattiert.

### 5.2.3 Säugerzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden mit HEK-, U2OS- und HeLa-Zellen drei verschiedene Säugerzelllinien verwendet. Diese wurden alle in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-Medium 4,5 g/L Glukose, GlutaMAX, Phenolrot) mit 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom, DE, BD), 1 mM Natrium-Pyruvat (Sigma-Aldrich, MO, USA), 100units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (beides von Biochrom, BE, DE) bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 % kultiviert.

Für die Mikroskopie wurden die Zellen in 6-Well-Platten (Sarstedt, NC, USA) auf Deckgläsern mit 18 mm Durchmesser (Katalognr. 0117580, Marienfeld Superior, BW, DE) ausgesät, am Folgetrag transfiziert (siehe Absatz 5.2.4) und am darauffolgenden Tag auf Objektträgern (Katalognr. 1320002, Marienfeld Superior, BW, DE) eingebettet. Die Mulde des Objektträgers wurde vorab mit HEPES (PanReac AppliChem, HE, DE) gepuffertem DMEM (HDMEM) ohne Phenolrot gefüllt. Im Fall von Bakteriophytochrom-basierten (RS)FPs wurde dem Medium etwa zwei Stunden vor dem Einbetten 25 µM BV (BV Hydrochlorid, Frontier Scientific, UT, USA; Stocklösung 8000 µM in DMSO, Merck, HE, DE) hinzugefügt.

### 5.2.4 Transfektion von Säugerzellen

Zur Transfektion von HEK 293-Zellen für die Virenpartikelherstellung (siehe Absatz 5.2.5) wurde TransIT-293 (Mirus Bio LLC, WI, USA) verwendet. Dieses Transfektionsreagenz ist für die Transfektion von HEK 293-Zellen und verwandte Linien optimiert. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in 10 cm-Petrischalen ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion zwischen 50 % und 70 % konfluent waren. Sowohl das serumfreie Medium als auch das gut gemischte Transfektionsreagenz wurde vor der Transfektion auf Raumtemperatur erwärmt. Bei der Doppeltransfektion für die Virenpartikelherstellung

wurden pro 10 cm-Petrischale 9 µg pSCA3-Plasmid mit 6 µg pSCA-Helper-Plasmid (DiCiommo und Bremner, 1998; Urban et al., 2011; Willig et al., 2014, siehe Absatz 5.2.5) und 1,5 ml serumfreien Medium sowie 45 µl TransIT 293-Reagenz durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt. Nach einer Inkubation von 15-30 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Gemisch tröpfchenweise über die Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel ist hierbei nicht nötig, da das Reagenz nicht toxisch ist. Die so transfizierten Zellen wurden, wie in Absatz 5.2.5 beschrieben, weiter behandelt.

Alle weiteren verwendeten Zelllinien wurden mit TurboFect (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) transfiziert. Hierzu wurden die Zellen am Vortag der Transfektion auf Deckglässchen ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion 70-90 % konfluent waren. Für die Transfektion eines Wells einer 6-Well-Platte wurden 2 µg Plasmid-DNS mit 400 µl serumfreiem Medium und 6 µl TurboFect-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubation von 20-30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Da das Reagenz nicht toxisch ist, musste das Medium nicht gewechselt werden.

Beide Ansätze sind polykationische Transfektionssysteme. Das Polymer formt positiv-geladene Komplexe mit der Plasmid-DNS, welche die DNS vor dem Abbau schützen und das Eindringen der Plasmid-DNS in die eukaryotischen Zellen ermöglicht.

### 5.2.5 Verwendete Viren und Virenpartikelherstellung

Ausgewählte FP-Varianten wurden zur Expression und Charakterisierung der Helligkeit in Säugerzellen mit Hilfe eines viralen Expressionssystems exprimiert. Hierzu wurde der Semliki-Forest Virus (SFV), ein einzelsträngiger RNA-Virus mit positiver Polarität, verwendet. Dieser hat eine Genomgröße von 11,4 kb. Für die Generierung der modifizierten Viren wurden die Konstrukte pSCA3-CMV-LA-EYFP und pSCA-Helper (DiCiommo und Bremner, 1998; Urban et al., 2011; Willig et al., 2014) verwendet. Das LA-EYFP wurde hierzu über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und NotI mit der gewünschten FP-Variante ausgetauscht. Das jeweilige FP wurde hierfür mit den Primer 5925 und 5540 (W3-Varianten) beziehungsweise 5541 (W4-Varianten) amplifiziert (Primersequenzen siehe Tabelle 11-3 im Anhang). Das pSCA-Helper Konstrukt codiert für die viralen Strukturproteine. HEK-293-Zellen wurden mit Hilfe von TransIT-293 (Mirus Bio LLC, WI, USA) (siehe Absatz 5.2.4) mit den zwei genannten Konstrukten transfiziert und vier bis fünf Tage unter normalen Bedingungen kultiviert (siehe Absatz 5.2.3). Dann wurden sie durch starkes Auf- und Ab-pipettieren gelöst, um im Folgenden die Lyse der Zellen durch mindestens zweimaliges Frieren (-80°C) und darauffolgendens Auftauen (37 °C) herbeizuführen. Nach der Entfernung der Zelltrümmer durch zehnmünütige Zentrifugation bei 3000 rpm und darauffolgende dreiminütige Zentrifugation bei 5000 rpm wurde der Überstand auf verbleibende flockige Rückstände geprüft und, falls nötig, erneut zentrifugiert. War er klar und ohne Rückstände, wurde er bei 20000 rpm für zwei Stunden bei 4 °C zentrifugiert, um die Viruspartikel zu pelletieren. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Sorvall RC 6 plus Zentrifuge und dem Rotor SS34 (durchgeführt. Das entstehende Pellet wurde darauffolgend in TBS-5 gelöst (130 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, Merck, HE, DE).

Durch drei Aminosäuresubstitutionen in dem viralen Strukturprotein p62 wird verhindert, dass die so hergestellten viralen Partikel direkt infektiös sind. Normalerweise würde das Vorläuferprotein p62 während des Transports zur Wirtszelloberfläche durch zelluläre Proteasen gespalten. Die so entstehenden funktionalen Proteine E2 und E1 agieren bei der Erkennung neuer Wirtszellen und bei der Membranfusion mit diesen. Wird p62 aufgrund der Aminosäuresubstitutionen nicht gespalten, so werden die Partikel fertig assembliert, sind jedoch nicht infektiös. Es ist nun möglich, sie gezielt und direkt vor der Anwendung mit α-Chymotrypsin (Sigma-Aldrich, MO, USA) zu aktivieren. Hierzu wurden der Partikellösung zunächst 1/20 der Chymotrypsin-Lösung hinzugefügt (PBS mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mg/ml α-Chymotrypsin). Nach einer Inkubation von 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Protease mit Aprotinin (Sigma-Aldrich, MO, USA) inhibiert (10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, PanReac AppliChem, HE, DE), pH8, 10 mg/ml Aprotinin). Hierzu wurde der aktivierten Lösung 1/15 der

Aprotinin-Lösung hinzugefügt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Partikel zur Infektion von Zellen verwendet. Hierfür wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie ungefähr zu 50 % – 70 % konfluent waren. Das Nährmedium wurde auf das notwendige Minimum reduziert, um dann die Partikellösung hinzuzugeben. Es wurden 5 µl Partikellösung zu 1 ml Nährmedium hinzugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen für die geplanten Versuche verwendet.

## 5.3 Charakterisierung von fluoreszierenden Proteinen

### 5.3.1 Kleine Proteinaufreinigung aus *E. coli*-Zellen

Zur schnellen und parallelen Aufreinigung kleiner Proteinmengen (bis ungefähr 4 mg) für den hauptsächlich spektroskopischen Vergleich verschiedener Fluoreszenzproteine wurde der His SpinTrap Kit (GE Healthcare, BKM, GB) verwendet. Hierfür wurden die Proteine zunächst in *E. coli*-Zellen exprimiert (siehe Absatz 5.2.2) und auf quadratischen Agar-Platten kultiviert. Der verwendete Expressionsvektor (pBAD, addgene, ursprünglich: pBAD-mKalama1) verfügt über einen poly-Histidin-Tag, was die Aufreinigung über das Ni<sup>2+</sup>-System ermöglicht. Nach 20-stündiger Inkubation bei 37 °C und einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mithilfe von Zellkratzern (Sarstedt, NC, USA) von den Platten geerntet und in 2 ml Lysepuffer (siehe unten) suspendiert. Nach gründlicher Durchmischung wurden 40 µl Lysozym (50 mg/ml, Serva, BW, DE) hinzugefügt und die Proben für mindestens 2 Stunden auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 80 µl eines Proteinase Inhibitoren Cocktails (EDTA freie Complete Lösung, Roche Diagnostics, BW, DE) hinzugefügt und anschließend mindestens fünf Frier-Tau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff und warmen Wasser durchgeführt. Die Zellfragmente wurden durch mehrstündige Zentrifugation (13 000 rpm, 4°C, Biofuge Fresco, Rotor #3324, Heraeus, HE, DE) von der Proteinlösung getrennt. Daraufhin folgte die Aufreinigung des proteinhaltigen Überstands nach Kit-Anweisung mithilfe der auf Ni<sup>2+</sup>-Affinität basierenden Säulen. Abweichend von den Hersteller-Anweisungen wurden alle Zentrifugationsschritte bei 0,1 g für eine Minute durchgeführt. Außerdem wurden die Säulen nach dem Auftragen des Proteinlysats 30 Minuten bei Raumtemperatur rotiert, um eine möglichst hohe Bindungseffizienz der getagten Proteine im Säulenmaterial zu gewährleisten. Zum Waschen der Säulen vor der Elution wurden sie zweimal mit Bindepuffer und zweimal mit Waschpuffer gespült. Für die Elution wurden sie zunächst drei Minuten mit Elutionspuffer inkubiert. Die Puffer bestehen alle aus 20 mM Natriumphosphat und 500 mM NaCl mit einer variierenden Imidazolkonzentration (pH7,4). Der Bindepuffer enthält hierbei 20 mM Imidazol, der Waschpuffer 50 mM Imidazol und der Elutionspuffer 500 mM Imidazol. Alle Stocklösungen wurden vom Hersteller bereitgestellt.

Die Proteinlösung wurde nach der Aufreinigung in 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 Puffer umgepuffert. Hierzu wurden NAP5-Säulen (Sephadex G-25 DNA Grade, GE Healthcare, BKM, GB) verwendet. Aufgrund ihrer hohen Stabilität konnten die Proteine bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Im Fall von Bakteriophytochrom-basierten FPs wurde die Proteinlösung nach Umpufferung dreifach mit BV übersättigt. Überschüssiges BV wurde durch mehrfaches Einkonzentrieren und Spülen der Lösung mithilfe von Säulen (Vivaspin 500, Sartorius, NI, DE) entfernt.

### 5.3.2 Semi-native PAGE

Um zu überprüfen, ob die zu charakterisierenden Proteine als Monomere, Oligomere oder Gemische vorliegen, wurden seminative Proteingele durchgeführt. Hierfür wurden 15 %ige (w/v) Polyacrylamidgele mit 5 %igen Sammelgelen hergestellt. Der vierfach konzentrierte Sammelgelpuffer ist eine 0,5 M Tris-Cl

Lösung mit einem pH-Wert von 6,8 und der vierfach konzentrierte Trenngelpuffer eine 1,5 M Tris-HCl Lösung mit einem pH-Wert von 8,8. Der zehnfach konzentrierte Laufpuffer mit einem pH-Wert von 8,3 setzt sich aus 0,25 M Tris, 1,925 M Glycin (Merck, HE, DE) und 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Serva, BW, DE) zusammen. Für ein 15 %iges Gel wurden folgenden Reagenzien verwendet:

Separationsgel (15 % ig):

- 1,73 ml MilliQ H<sub>2</sub>O
- 1,88 ml Trenngelpuffer
- 75 µl 10 % (w/v) SDS (SERVA, BW, DE)
- 3,75 ml Rotiphorese Gel 30 Lösung (Roth, BW, DE)
- 75 µl 10 % (w/v) Ammoniumperoxidsulfat (APS, PanReac AppliChem, HE, DE)
- 7,5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, PanReac AppliChem, HE, DE)

Sammelgel (5 % ig):

- 2,8 ml MilliQ H<sub>2</sub>O
- 1,25 ml Sammelgelpuffer (..)
- 50 µl 10% (w/v) SDS (SERVA, BW, DE)
- 0,85 ml Rotiphorese Gel 30 Lösung (Roth, BW, DE)
- 50 µl 10 % (w/v) APS (PanReac AppliChem, HE, DE)
- 5 µl TEMED (PanReac AppliChem, HE, DE)

Nach dem Gießen des Separationsgels wurde es während der Aushärtung mit wassergesättigtem Isopropanol abgedeckt, um eine ebene Oberfläche zu erhalten.

Den Proteinproben (4-10 µg Proteinlösung in 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7,5) wurde vor dem Beladen der Geltaschen 10 % (w/v) Saccharose-Lösung (Merck, HE, DE) hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mA/Gel durchgeführt. Als Größenstandards dienten Proben von bekannten Monomeren (rsEGFP2, mEGFP) oder Oligomeren (dTomato, dsRed). Zur Detektion der Fluoreszenz wurde ein gruppenintern gebautes Geldokumentationsgerät verwendet. NIR Fluoreszenz wurde bei 655/40 nm angeregt und bei 740/40 nm detektiert. Grüne Fluoreszenz (rsEGFP2) wurde durch Bestrahlung mit 470/10 nm angeregt und bei 525/60 nm detektiert und rote Fluoreszenz (dTomato) wurde durch Bestrahlung mit 545/20 nm angeregt und bei 617/37 nm detektiert.

Zur Anfärbung der Proteine wurde eine Proteinfärbelösung (Coomassie-Brillant-Blau, 0,05 % (w/v) Coomassie R250 (Sigma-Aldrich, MO USA), 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure (Merck, HE, DE)) verwendet. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurde das Gel für etwa 45 Minuten in 10 % (w/v) Essigsäure (Merck, HE, DE) geschwenkt.

### 5.3.3 Messung der Absorptionsspektren

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren diente ein Cary 4000 UV-VIS-Spektrometer (Varian, CA, USA). Hierbei wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 -1 cm verwendet. Die aufgereinigte Proteinlösung wurde so verdünnt (in 100 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl), dass die Absorption bei 280 nm mindestens bei 0,1 lag. Die Küvetten wurden mit Volumina zwischen 70 µl und 150 µl gefüllt.

Zum Schalten der Proteinlösung in der Küvette wurde eine 120 W Quecksilberdampfampe (Leica Microsystems, HE, DE) mittels einer Faser an das Spektrometer gekoppelt. Die Aufreinigung erfolgte über Filter der Bandbreite 661/20 nm beziehungsweise 769/41 nm.



### 5.3.4 Messung Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenz- und Anregungsspektren wurden mit einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer (Varian, CA, USA) aufgenommen. Es wurden dieselben Küvetten und Proteinmengen verwendet, wie in Absatz 5.3.3 beschrieben. Die Anregungswellenlänge wurde anhand des Absorptionsspektrums und möglichst blauverschoben gewählt, um die Aufnahme des kompletten Fluoreszenzspektrums zu ermöglichen. Die Signalstärke wurde über die Zeitauflösung der Messung und die Verstärkung des PMT's geregelt.

### 5.3.5 Bestimmung der pH-Stabilität

Für die Bestimmung der pH-Stabilität wurden die aufgereinigten Proteine (siehe Absatz 5.3.1) auf eine jeweilige Endkonzentration von 5  $\mu$ M im jeweiligen Puffer verdünnt. Es wurden folgende Puffer verwendet:

pH 3 – 5,75: 100 mM Zitronensäure, 150 mM NaCl

pH 6 – 7: 100mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl

pH 7,5 - 8,5: 100 mM Tris, 150 mM NaCl

pH 9-10: 100 mM Glycin, 150mM NaCl

Die Messung der Fluoreszenzintensität wurde an einem Multi-Detektionslesegerät des Typs Cytation 3 (BioTek, BW, DE) durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei 650/19 nm angeregt und bei 700/19 nm detektiert.

### 5.3.6 Bestimmung von Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient

Die Bestimmung der Quantenausbeute und des Extinktionskoeffizienten wurden jeweils einmal relativ mit der publizierten NIR FP Variante mIFP als Referenz bestimmt. Die Werte für mIFP wurden aus Yu et al., 2015 entnommen. Für die Messung der Absorptions- und Emissionsspektren (siehe Absatz 5.3.3 und Absatz 5.3.4) wurde aufgereinigtes Protein verwendet (siehe Absatz 5.3.1). Die Messungen müssen hierbei direkt hintereinander und in derselben Küvette vorgenommen werden. Im Fall der RSFPs wurde das Küvettenvolumen jeweils vor der Aufnahme des Spektrums für acht Minuten mit 661/20 nm bestrahlt (siehe Absatz 5.3.3), um das Ensemble der Proteinlösung bestmöglich in den An-Zustand zu schalten.

#### Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ )

Die Absorptionsspektren wurden mit Nulllinienkorrektur aufgenommen und auf das Proteinmaximum bei 280 nm normiert. Da der Extinktionskoeffizient von mIFP bekannt war, konnten die Werte der normalisierten Absorption korreliert werden und zur Bestimmung von  $\epsilon$  genutzt werden. Da die Absorption bei 280 nm sich hauptsächlich aus der Absorption der Aminosäuren Tryptophan, Phenylalanin und Methionin zusammensetzt, muss dies berücksichtigt werden und ein entsprechender Korrekturfaktor einbezogen werden.

#### Bestimmung der Quantenausbeute ( $\varphi$ )

Für die Bestimmung der Quantenausbeute wurde das Fluoreszenzspektrum gemessen. Für die Berechnung wurde das jeweilige Emissionsspektrum mit der Extinktion an der Stelle der Anregung, für welche das Emissionsspektrum aufgenommen wurde, korreliert. Das Integral dieser korrelierten Emission ist ein relativer Wert für die Emissionsmenge. Die Quantenausbeute des Referenzproteins wurde verwendet um die Quantenausbeute der Varianten zu bestimmen.

Neben dieser relativen Bestimmung der Quantenausbeute wurde für manche Varianten auch eine absolute Messung mithilfe eines Quantaaurus-QY (C11347, Hamamatsu, J), ebenso anhand von aufgereinigtem Protein, durchgeführt. Hierbei war jedoch kein vorheriges Schalten der Proteinlösung möglich. Hier wurde

die Proteinlösung in 100 mM Tris, pH7,5, 150 mM NaCl so verdünnt, dass die Absorption bei der jeweiligen Anregungswellenlänge, welche im Maximum des Anregungsspektrums gewählt wurde, ungefähr bei 0,1 lag.

### 5.3.7 Analyse der Fluoreszenzeigenschaften und ihrer Modulierbarkeit

#### 5.3.7.1 Automatisiertes Mikroskop und Screening in *E. coli*-Zellen

Zur Analyse des Schaltverhaltens wurden die FP-Varianten entweder in *E. coli*- oder in Säugerzellen exprimiert. Das Schaltverhalten wurde an zwei verschiedenen Aufbauten analysiert: Einem nicht konfokalen automatisierten Mikroskop und einem konfokalen *Pump-Probe* Aufbau (siehe Absatz 5.4.3). Für das automatisierte Mikroskop wurden die FP-Varianten in auf Agarplatten ausgestrichenen *E. coli*-Zellen zytosolisch exprimiert. Für den konfokalen Aufbau wurden Säugerzellen (HeLa) verwendet, welche die zu charakterisierende FP-Variante fusioniert an Vimentin exprimierten.

Das automatisierte Mikroskop basiert auf einem Leica-Epifluoreszenz-Stativ und wurde gruppenintern modifiziert und durch eine ebenfalls gruppenintern entworfene Software-Ansteuerung über LabView (IX, USA) automatisiert. Der Aufbau ist sehr modular gehalten und lässt sich vielfältig anwenden. Dieser Aufbau wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit vier Laserlinien verwendet. Für die nur kurz in der Einleitung angedeutete Generierung und Charakterisierung eines RSFPs auf Basis des FPs mNeptune wurden die Laserlinien 594 nm (Cobolt Mambo™, 50 mW, Solna, SE) und 445 nm (Cobolt 06 MLD, 50 mW, Cobolt, Solna, SE) verwendet. Die Überlagerung der Anregungswellenlängen erfolgte über einen Strahlenteiler (LaserMUX 439 - 458R, AHF Analysetechnik, BW, DE). Die Trennung des Anregungslichts vom Emissionslicht erfolgte über die Kombination eines Strahlenteilers (HC BS R594, AHF Analysetechnik, BW, DE) und eines Bandpassfilters (ET 645/75, AHF Analysetechnik, BW, DE).

Für die Charakterisierung der bakteriophytochrom-basierten FPs wurden zwei Laser mit einer Emission von 785 nm (OBIS 785 nm LX 100 mW, Coherent, NI, DE) beziehungsweise 671 nm (Monolas-671-300MM, Alphas, NI, DE) verwendet. Die Überlagerung der beiden Anregungswellenlängen erfolgte über einen Strahlenteiler. Das Anregungslicht wurde von dem Emissionslicht über die Kombination eines zweifachen dichroitischen Strahlenteilers (Spezialanfertigung, Reflexion 630 -730 nm und 750 nm-800 nm; Transmission 695-730 nm; AHF Analysetechnik, BW, DE) mit einem Bandpassfilter (HC 710/40, AHF Analysetechnik, BW, DE) getrennt. Auch hier wurde mit einem 20er Objektiv mit einer NA von 0,4 (Leica Microsystems, HE, DE) gearbeitet. Die Detektion der Emission erfolgte in beiden Fällen über einen PMT der Firma Hamamatsu (H10723-20; Hamamatsu, J). Für die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Daten, wurden die Laser unter maximaler Leistung verwendet. Dies entspricht einer ungefähren Intensität von 40 kW/cm<sup>2</sup> (785 nm) beziehungsweise 60 kW/cm<sup>2</sup> (671 nm).

Für die Suche nach neuen FP-Varianten wurden zwei Mutagenese-Wege (siehe Absatz 5.1.7 und 5.1.8) gewählt: Die (Ziel-)gerichtete und die zufällige Mutagenese. Nach dem gezielten Austausch von Aminosäureresten wurden die entstehenden FP-Varianten direkt nach beschriebenen Charakteristika (siehe Absatz 5.3.7.3-5.3.7.6) am automatisierten Mikroskop analysiert und mit Vorläufervarianten verglichen. Es wurde entschieden, ob aus den neuen Charakteristika zukünftige Strategien abgeleitet werden können oder, ob eine der neuen Varianten als Grundlage für den nächsten Screening-Durchlauf dienen kann.

Nach der Erstellung einer Plasmidbibliothek für die Sortierung mit dem automatisierten Mikroskop wurden *E. coli*-Zellen, welche die Plasmidbibliothek exprimierten, auf quadratischen Agarplatten (11 x 11 cm) ausplattiert, so dass sie einen minimalen Abstand von 1 mm aufwiesen. Bei näher aneinander lokalisierten Kolonien war eine saubere Isolierung nicht mehr möglich. Somit konnten in einem Durchgang auf einer Agarplatte mehr als 2000 Kolonien analysiert werden. Diese Analyse beruht auf den in den Absätzen 5.3.7.3-

5.3.7.6 beschriebenen Charakteristika. Hierbei waren im Fall der bakteriophytochrom-basierten FPs besonders der Schalthintergrund und die maximale Helligkeit von Bedeutung.

Mithilfe eines manuell definierten Fluoreszenz-Schwellenwerts wurde hierbei definiert, welche Positionen gemessen werden sollten. Hierfür wurde jede angesteuerte Position kurz mit einem Laserpuls der Anregungswellenlänge angeregt und geprüft, ob der Schwellenwert erreicht wurde. Dieser Schwellenwert wurde in den meisten Fällen knapp über der Hintergrundfluoreszenz der Agarplatte beziehungsweise nicht exprimierender *E. coli*-Zellen gesetzt. In bestimmten Screeningdurchläufen, bei welchen nur hellere Varianten als das Ausgangs-FP gesucht wurden, konnte er jedoch auch so gewählt werden, dass auch exprimierende aber nur schwach fluoreszierende Kolonien nicht gemessen wurden, um den Screeningdurchlauf zu beschleunigen. Überschritt eine Kolonie den vordefinierten Grenzwert wurde zunächst mit einem Autofokus in vorab definierter Reichweite und Schrittzahl der Fokus gewählt. Somit konnten die Auswirkungen von leichten Unebenheiten der Agarplatte oder ein teilweise beginnendes Austrocknen der Agarplatte während eines Screeningdurchlaufs ausgeglichen werden. Wurde der Fokus gefunden, so startete automatisch ein vordefinierter Ablauf von Laserpulsen. Dieser war meistens so definiert, dass mindestens ein kompletter Schaltzyklus in vielen Fällen aber mehrere komplette Schaltzyklen gemessen wurden. Die Parameter konnten hierbei zwischen den verschiedenen Zyklen variieren. Da die Ausschaltkinetik aufgenommen werden konnte, und somit Veränderungen der Schaltcharakteristika auch bei gleichbleibenden Zeiten anhand der Kinetik ersichtlich waren, wurden die Parameter für das Ausschalten zwischen den Sequenzen zumeist konstant gehalten. Die Anschaltkinetik kann hingegen aufgrund des Einflusses des Anregungslasers auf den Zustand des Proteinensembles nicht aufgenommen werden. Das Anschalten erfolgte daher immer ohne gleichzeitiges Anregen der Fluoreszenz und es konnte keine Kinetik aufgenommen werden. Aus diesem Grund wurden die Zeiten des 785 nm Lasers zwischen den Sequenzen variiert. Die komplette Pulssequenz konnte beliebig oft wiederholt werden. Nach Ablauf des Screenings der kompletten Agarplatte war es möglich die für jede Position, also Kolonie, gemessenen Werte aufzurufen und untereinander zu vergleichen. Werte wie Schaltgeschwindigkeiten, Signal- zu Hintergrund-Verhältnisse, maximale Helligkeiten zu verschiedenen Zeitpunkten der Pulssequenzen und Weitere konnten gegeneinander aufgetragen und ausgewertet werden. Die Auswertung der Daten erfolgte über ein gruppenintern entworfenes LabView-Programm. Die Ermittlung der Schaltparameter (siehe Absatz 5.3.7.3-5.3.7.6) erfolgte über einen exponentiellen Fit der Daten. Nach der Auswertung der Daten, war es möglich interessante Positionen erneut anzusteuern und bei Bedarf noch einmal zu messen und zu isolieren. Ein Beispiel für ein Screeningprotokoll ist in Tabelle 5-1 dargestellt.

Pulssequenzen		Wiederholungen
671 nm–3,5 ms	785 nm-0,5 ms	3
671 nm–3,5 ms	785 nm-5 ms	3
671 nm–3,5 ms	785 nm-10 ms	3
671 nm–3,5 ms	785 nm-20 ms	3
671 nm–3,5 ms	785 nm-30 ms	3
671 nm–3,5 ms	Pause-5 ms	3
671 nm–3,5 ms	Pause-10 ms	3
671 nm–3,5 ms	Pause-20 ms	3
671 nm–3,5 ms	Pause-30 ms	3

**Tabelle 5-1: Beispielhafte Pulssequenz pro Klon während des Screenings am automatisierten Mikroskop.**

Die Pulssequenzen wurden dem jeweiligen Screeningstand angepasst. Die Laser wurden jedoch immer bei maximaler Leistung verwendet. Diese entspricht ungefähren Intensitäten von 40 kW/cm<sup>2</sup> (785 nm) beziehungsweise 60 kW/cm<sup>2</sup> (671 nm). Die Pausen anstelle eines 785 nm Pulsen wurden eingefügt, um Relaxationszeiten in das Screening einbeziehen zu können.

So gewonnene Klone wurden entweder auf eine andere Agarplatte übertragen oder zum Animpfen einer Übernachtflüssigkultur zur Isolierung der Plasmid-DNS (siehe Absatz 5.1.1) verwendet. Nach erneuter Überprüfung der Charakteristika nach dem Überstreichen oder der Re-Transformation der Klone wurde

für interessante Klone die FP-Sequenz bestimmt (siehe Absatz 5.1.1 und 5.1.9). Nach einer solchen Runde folgte die erneute Analyse der Proteinstrukturen, die Auswahl neuer interessanter Positionen, welche durch das Screening offenbart wurden und eventuell die Auswahl neuer Ausgangs-FPs aus den neu generierten Varianten. Mithilfe dieser Überlegungen und eventuell neuer FP-Varianten wurden neue Bibliotheken erstellt, hierbei diente zum Teil auch ein Gemisch aus mehreren FP-Varianten als Grundlage für die Generierung der neuen Bibliothek. Zwischen diesen Screeningdurchläufen, welche vorrangig auf die Schaltcharakteristika der FP-Varianten ausgelegt waren, wurde häufig ein Screeningdurchlauf am FACS (siehe Absatz 5.3.7.2) durchgeführt. Hierbei wurden dann vorrangig die hellsten Varianten sortiert und häufig darauffolgend am automatisierten Mikroskop sortiert, um den Erhalt der Schalteigenschaften zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch ein modifiziertes Screeningsystem entwickelt, welches das Screening in *E. coli*-Zellen durch das Einbinden von Säugerzellen erweitert. Auf diesen wird im Ergebnisteil dieser Arbeit genauer eingegangen (siehe Absatz 3.1).

### 5.3.7.2 FACS

Für die Sortierung und den Vergleich von großen Proteinpopulationen nach ihrer Helligkeit wurde die Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung verwendet. Hierfür wurde ein innerhalb der Arbeitsgruppe modifiziertes FACS-Gerät (BD Influx™ cell sorter; BD Biosciences, NJ, USA) verwendet. Für die Sortierung von Zellen, welche Bakteriophytochrom-basierte FPs exprimieren, war eine passende Anregung mit einem Laser bei 671 nm (Shanghai Dream Laser SDL-671-300T) und die Detektion der Fluoreszenz in einem oder zwei gesplitteten Detektionsfenstern möglich. Diese lagen bei 698-766 nm beziehungsweise 690-720 nm und 720-766 nm.

### 5.3.7.3 Bestimmung der maximalen Helligkeit und des Schalthintergrunds

Die maximale Helligkeit eines FPs, insbesondere bei Proteinen, welche auf ein externes Chromophor angewiesen sind, hängt von vielen Faktoren ab und kann nicht als das bloße Produkt der Quanteneffizienz mit dem Extinktionskoeffizienten bezeichnet werden (siehe Absatz 1.3.1.6). Bei der Expression von Bakteriophytochromen in *E. coli*-Zellen ist nicht nur zu beachten, dass die intrazelluläre Stabilität des Protein-Chromophor-Komplexes in verschiedenen Zelltypen und Organismengruppen variieren kann. Auch die zwei weiteren variablen Faktoren der Aufnahme der Hämoglobinvorläufer und der Expression der Hämoxigenase, welche von Klon zu Klon variieren können, müssen in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grund wurden für die Bestimmung der maximalen Helligkeit in den meisten Fällen mehrere Methoden ausgeführt. Nach einer Vorbestimmung an dem vorab beschriebenen automatisierten Mikroskop (siehe Absatz 5.3.7.1) wurde zunächst die Helligkeit einer großen Population an *E. coli*- oder Säugerzellen, die das Protein zytosolisch exprimieren, mit Hilfe des FACS-Geräts (siehe Absatz 5.3.7.2) bestimmt. Die Helligkeitsbestimmung am konfokalen Aufbau wurde, wie alle hier durchgeführten Messungen anhand von Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt.

Die FACS-Daten zur zytosolischen Expression der Proteinvarianten dienten hierbei als Vergleichswert zwischen verschiedenen Proteinen. Die Daten des automatisierten Mikroskops sowie des konfokalen Aufbaus wurden zur Bestimmung des jeweilig erreichten Schalthintergrundes verwendet. Hierzu wurden nach dem Anschalten komplette Aus-Schaltzyklen der Proteinpopulation aufgenommen und die im Plateau erreichte Restintensität anteilig an der Maximalhelligkeit bestimmt und angegeben. Die Charakteristika wurden anhand von (bi)-exponentielle Fits der Schaltkinetiken bestimmt.

#### 5.3.7.4 Bestimmung der Relaxationszeit

Als Relaxationszeit wird hier die Zeit bezeichnet, welche ein Proteinensemble benötigt, um nach dem lichtinduzierten Schalten selbstständig ohne Bestrahlung in einen fluoreszierenden Zustand überzugehen. Diese Zeitspanne wurde an dem konfokalen Aufbau (siehe Absatz 5.4.3) bestimmt. Hierzu wurde das Protein-Ensemble zunächst komplett ausgeschaltet, um dann nach verschiedenen Zeitspannen mit kurzen Anregungspulsen die Emission zu messen. Schon kurze Pulse mit dem Anregungslicht können den Zustand des Ensembles beeinflussen und somit die Messung verfälschen.

#### 5.3.7.5 Bestimmung der Schaltgeschwindigkeiten

Die Schaltgeschwindigkeiten werden mit Hilfe der Halbwertszeiten angegeben. Diese beschreiben die Zeitspanne, die das Proteinensemble benötigt, um auf die halbe Intensität der maximalen Helligkeit geschaltet zu werden. Die Halbwertszeit wurde anhand eines (bi)-exponentiellen Fits der Schaltkinetiken bestimmt. Die Schaltgeschwindigkeiten hängen von der Intensität der jeweiligen Schaltwellenlänge ab und können folglich nur zwischen verschiedenen Varianten verglichen werden, wenn dieselben Intensitäten verwendet wurden.

#### 5.3.7.6 Bestimmung der (Schalt-)Bleichstabilität

Bei RSFPs ist die Bleichstabilität immer eine Kombination aus An-Zustandsbleichen und der Schaltermüdung durch wiederholtes Schalten zwischen dem An- und dem Aus-Zustand. Die Bleichstabilität eines RSFPs kann demnach durch das Messen der möglichen Schaltzyklen, bevor im An-Zustand nur noch ein bestimmter prozentualer Anteil der Maximalhelligkeit erreicht wird, bestimmt werden. Diese Größe wird demnach als Prozentwert der Maximalhelligkeit in Kombination mit der erreichten Zyklanzahl angegeben (siehe Abbildung 3-27). Sie ist stark abhängig von den verwendeten Lichtintensitäten und Bestrahlungsdauern.

Bei nicht schaltenden FPs wird die Bleichstabilität mit Hilfe der Anzahl an konfokalen Bilder, die bis zu einem definierten Zeitpunkt aufgenommen werden können, angegeben (siehe Abbildung 3-10).

#### 5.3.7.7 Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit

Die Fluoreszenzlebenszeiten wurden an dem in Absatz 5.4.2 beschriebenen Aufbau mit der zweiten APD als Detektor (Prototyp, Jitter 64 ps. MPD Micro Photon Devices, BZ, IT) in lebenden, Vimentinfusionsprotein-exprimierenden HeLa-Zellen gemessen. Für die Fluoreszenzregung wurde 676/10 nm verwendet. Die *instrument response function* (IRF) des Systems beträgt etwa 108 ps. Diese wurde mithilfe eines das Anregungslicht reflektierenden Spiegels und der Detektion dieser Reflektion auf dem Detektor bestimmt. Als Messelektronik diente eine PicoHarp 300 Einheit der Firma PicoQuant (BE, DE). Der Fluoreszenzabfall wurde mono-exponentiell gefittet. Je nach Messung war teils ein bi-/trixponentieller Fit nötig (Enderlein und Erdmann, 1997).

## 5.4 Mikroskopie

### 5.4.1 Konfokalmikroskopie

Zur Untersuchung der Lokalisierung von FP-Fusionsproteinen in Säugerzellen, wurde ein konfokales Laser-Raster-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) mit einem Objektiv des Typs HC PL APO 63x/1,4-0,7 OIL CS2-verwendet (Leica TSC SP8, Leica Microsystems, HE, DE). Alle Aufnahmen wurden bei Raumtemperatur mit einem Detektionspinhole von 1 Airy Einheit (*Airy Unit*, AU) und einer Anregung mit 644 nm und einer Detektion zwischen 650 nm und 800 nm durchgeführt.

### 5.4.2 STED-Nanoskopie

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten STED-Aufnahmen (siehe Abbildung 3-11, Abbildung 3-12 und Abbildung 3-13) sowie die Bleichexperimente (siehe Abbildung 3-10) der FPs W4.35 und mCardinal (Chu et al., 2014) wurden an einem gruppenintern von Dr. Haisen Ta entworfenen und gebauten STED-Mikroskop von Dr. Haisen Ta durchgeführt. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 5-1 dargestellt.

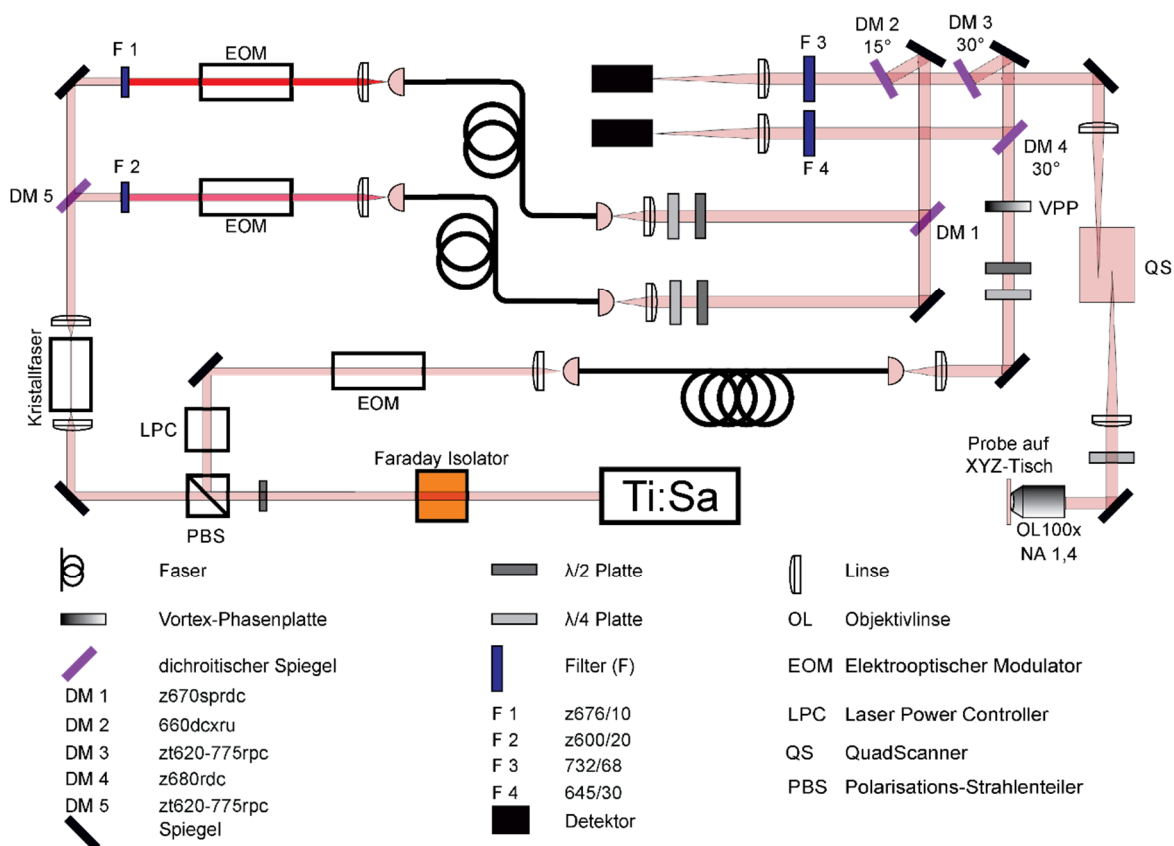


Abbildung 5-1: gruppenintern entworfener und gebauter Aufbau für NIR-STED. Schematische Darstellung der optisch relevanten Bauteile des konfokalen Aufbaus.

Sowohl das Anregungslicht (600/20 nm beziehungsweise 676/10 nm) als auch das STED-Licht (860 nm) stammt aus einem Titan:Saphir- Laser (Mai Tai - Spectra-Physics, CA, USA, Pulswiederholungsrate: 80 MHz, Pulsdauer ~150 fs). Der 806-820 fs gepulste Laserstrahl wird über einen Polarisations-Strahlenteiler (PBS) aufgeteilt. Hierbei werden erstens etwa 120 mW durch eine Kristallfaser geleitet, um Weißlicht zu

generieren. Zweitens werden mehr als 1 W abgezweigt, um sie in den Strahlpfad für die stimulierte Emissions-Depletion zu lenken.

Das Weißlicht wird über einen dichroidischen Spiegel nochmals aufgesplittet, um zwei Anregungspfade zu erhalten. Diese werden über die Bandpassfilter F1 beziehungsweise F2 geleitet. Beide Anregungspfade werden über elektrooptische Modulatoren geregelt (EOM, LM0202, Qioptiq Photonics, NI, DE). Somit wird es möglich während des Rasterns der Probe die Pfade für jeden Pixel unabhängig voneinander anzusteuern. Beide Anregungspfade werden jeweils durch eine polarisationserhaltende Einmodenfaser (11 m, PM-S405-XP, Thorlabs GmbH, DE, BY) geleitet.

Das STED-Licht wird durch eine lange Faser (120 m, PMJ-3U3A-633-4/125-3-120-HP, AMS Technologies AG, BY, DE) geleitet, um die Pulslänge auf ungefähr 120 ps auszubreiten. Vorab wurde ebenfalls das Einsetzen einer kürzeren Faser getestet (58 m, AMS Technologies AG, BY, DE). Hierbei werden die STED-Pulse ungefähr 60 ps lang. Nach der Faser wird der STED-Strahl über eine Vortex-Phasenplatte (VPP1b, RPC Photonics, NY, USA) geleitet, um das Doughnut-förmige Strahlprofil zu erhalten. Sowohl in den Anregungspfaden als auch im STED-Pfad dienen  $\lambda/4$  und  $\lambda/2$  Platten dazu, zirkular polarisiertes Licht zu erhalten.

Ein Ölobjectiv (HC PL APO 100x/1,4-0,7 OIL CS2, Leica Microsystems, HE, DE) wird dazu genutzt die Laserpfade auf die Probe zu fokussieren. Zur Detektion der Fluoreszenz wird dieses Objektiv in Kombination mit einer Linse (Brennweite 200 mm, Thorlabs, NJ, USA) verwendet. Das Rastern der Laserstrahlen über die Probe wird mit Hilfe eines gruppenintern gebauten QuadScanners durchgeführt. Dieser enthält vier galvanometrische Spiegel. Die Grobverstellung der Probe erfolgte über einen xyz-Tisch (NanoMax, Thorlabs, NJ, USA).

Das Fluoreszenzsignal wird mit zwei Multimode-Fasern gesammelt, welche einen Kerndurchmesser von 62,5  $\mu\text{m}$  haben. Dieser Durchmesser dient als konfokale Detektions-Lochblende (Airy Unit ungefähr 1). Für die Detektion der Fluoreszenz stehen zwei Avalanche-Photodioden zur Verfügung (erstens SPCM-AQRH-13, Excelitas, MA, USA und zweitens ein Prototyp der Firma MPD Micro Photon Devices, BZ, IT). Das APD-Signal wird über eine zeitlich korrelierte Karte zur Erfassung einzelner Photonen (TCSPC, *Time Correlated Single Photon Counting*) gesammelt (DPC 230, Becker & Hickl GmbH, BE, DE) und über gruppenintern entworfene Elektronik kontrolliert und angesteuert.

Für die Aufnahme der (helleren) Vimentinstrukturen (siehe Abbildung 3-11 und Abbildung 3-13), wurde die zweite APD verwendet und die Photonen, welche bereits während dem etwa 120 ps langen STED-Puls detektiert wurden elektronisch ausgeblendet. Für die Aufnahme der (dunkleren) NUP50-Strukturen (siehe Abbildung 3-12) wurde hingegen die erste APD, ohne elektronisches Ausblenden verwendet.

Die Justierung des Aufbaus wurde mithilfe eines herausnehmbaren Pellicle-Strahlenteilers (BP145B1, Thorlabs, NJ, USA) durchgeführt. Dieser wurde in den Strahlengang gestellt und das Laserlicht mithilfe von Gold-Nanokugeln reflektiert und über einen PMT detektiert (H10723-01, Hamamatsu Photonics, J). Die Ansteuerung des Aufbaus sowie die Datenauswertung erfolgte mithilfe einer gruppenintern von Dr. Haisen Ta entworfenen MATLAB-Software (MathWorks, MA, USA). Alle angegebenen Leistungen beziehen sich auf die Rückapertur der Objektivlinse. Zur Kalkulierung der aktuellen Leistung muss der Verlust durch das Objektiv beachtet werden.

### 5.4.3 Konfokalmikroskopie der NIR RSFPs und RESOLFT-Nanoskopie

Der mikroskopische Aufbau enthält zwei Laserlinien. 660 nm (Coherent, CA, USA; OBIS 660nm LX 100 mW) zur Anregung der Fluoreszenz und zum Ausschalten der Fluorophore und 785 nm (Coherent, CA, USA; OBIS 660nm LX 100 mW) zum Anschalten der Fluorophore. Das Licht des 660 nm-Lasers wird





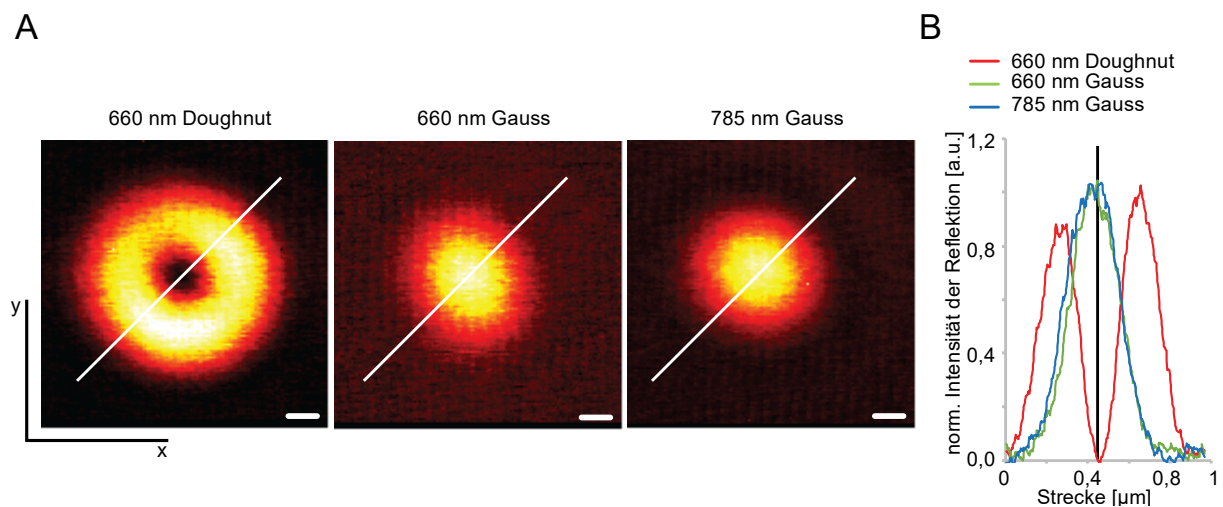
Das Licht des 785-nm Lasers wird über den Filter F 2 aufgereinigt (785/10 nm). Die Powereinstellungen beider Laser verläuft über die interne Modulierbarkeit der Lasermodelle und zusätzlich über in den jeweiligen Strahlengang gebaute Filterräder. Das Detektionsfenster reicht von 698 -766 nm (F 3) und deckt damit, wie in Abbildung 5-2, B zu sehen ist, das Emissionsspektrum der generierten NIR RSFPs weitestgehend ab.

Ein Ölobjektiv (HCX PL APO 100x/1,4-0,7 OIL CS, Leica Microsystems, HE, DE) wird dazu genutzt, die Laserpfade auf die Probe zu fokussieren. Zum Sammeln des Fluoreszenzsignals dient dieses Objektiv in Kombination mit einer Linse (Brennweite 200 nm, Thorlabs, NJ, USA). Die Grob- und Feinverstellung der Probe erfolgt über einen xyz-Tisch (NanoMax TS, Thorlabs, NJ, USA).

Das Fluoreszenzsignal wird mit einer Multimode-Faser gesammelt, welche einen Kerndurchmesser von 50  $\mu\text{m}$  hat (50/125 LSZH 12/08 0065M, Corning, NY, USA). Dieser Kerndurchmesser der Faser dient als konfokale Detektions-Lochblende und ist somit nicht verstellbar. Die Airy Unit liegt bei 0,8. Die kleinere Airy Unit verhindert die Detektion von Signal aus Ebenen, welche nicht im Fokus liegen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mit einer Avalanche-Photodiode (APD, SPCM-AQR-13-FC, Perkin Elmer, MA, USA). Der Aufbau wird über gruppenintern entworfene Elektronik angesteuert. Die Datenauswertung erfolgt über gruppenintern von Dr. Marcel Leutenegger entworfene MATLAB-basierte Software (MathWorks, MA, USA).

Dem Aufbau fehlt die Implementierung einer Weitfeldbeleuchtung mit beiden Laserlinien. Durch das optionale Einbauen einer 400-er Linse in den Strahlengang des 660 nm Lasers ist eine Aufweitung des Laserprofils und folglich eine Ausleuchtung eines größeren Bereichs der Probe für die Suche nach transfizierten Zellen möglich. Weitfeldaufnahmen mehrerer Zellen sind jedoch nicht möglich, da eine Weitfeldbeleuchtung mit der Laserlinie zum Anschalten der Fluorophore fehlt.

Zur Justierung des Aufbaus wurde ein herausnehmbarer Pellicle-Strahlenteiler (BP108, 8:92, Thorlabs, NJ, USA) in den Strahlengang gestellt und das Laserlicht mithilfe von Gold-Nanokugeln reflektiert. Zur Detektion wurde hier ein Photoelektronenvervielfacher (PMT, MD973 4210-D-107, Perkin Elmer, MY, USA) verwendet. Die PSFs der verschiedenen Laserpfade wurden in X- Y- sowie Z-Richtung übereinandergelegt. Abbildung 5-3 zeigt dies beispielhaft für die XY-Richtung.



**Abbildung 5-3: beispielhafte Darstellung der Justierung des Aufbaus anhand der XY-Richtung.**

A: Über einen PMT detektierte Reflexionen des 660 nm Doughnut-förmigen Strahls (links), des 660 nm Gauss-förmigen Strahls (Mitte) sowie des 785 nm Gauss-förmigen Strahls von 80 nm Gold-Nanokugeln. Die Probe wurde in XY-Richtung abgerastert. Die weißen Linien zeigen den Verlauf der in B angezeigten Linienprofile. Die Größenstandards entsprechen 50 nm. B: Linienprofile über die in A eingezeichnete Region. Es wurden jeweils drei benachbarte Pixel gemittelt. Wie zu sehen ist, wurden die Gauss-förmigen Strahlen genau über die Null-Region des Doughnut-förmigen Strahls gelegt.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Schematische Darstellung des STED-Prinzips	6
Abbildung 1-2:	Globale Struktur und Chromophorstruktur von GFP-Homologen anhand von EGFP.	10
Abbildung 1-3:	Chromophormaturation des DsRed-Chromophors	11
Abbildung 1-4:	Helligkeitsverteilung von Fluoreszenzproteinen abhängig von ihrer Emissionswellenlänge.	12
Abbildung 1-5:	Interaktionen in der Chromophorumgebung von mKate und mNeptune.	16
Abbildung 1-6:	Überblick über ausgewählte Eigenschaften von generierten, schaltbaren mNeptune-Varianten.	17
Abbildung 1-7:	Wellenlängen-spezifische Absorptions- und Streueigenschaften.	20
Abbildung 1-8:	Struktur der PAS-GAF-PHY Domänen von Bakteriophytochromen.	22
Abbildung 1-9:	Aminosäuren, welche Interaktionen zwischen der PAS- und der GAF-Domäne ermöglichen.	23
Abbildung 1-10:	Hydrophober, hochkonservierter 8-er Knoten.	25
Abbildung 1-11:	Struktur von Phycocyanobilin (PCB), Phycochromobilin (P $\phi$ B) und Biliverdin (BV).	26
Abbildung 1-12:	Chromophor und Chromophorbindetasche anhand der DrCBD.	28
Abbildung 1-13:	Schematische Darstellung des Photozyklus' von Phytochromen.	29
Abbildung 1-14:	Veränderung der Lasche der PHY-Domäne während des Photozyklus'.	31
Abbildung 1-15:	Schematische Darstellung der zwei postulierten Mechanismen der Signalweitergabe zur Effektor-domäne.	32
Abbildung 1-16:	Strukturelle Veränderungen während der Photokonvertierung des Phytochroms von D. radiodurans.	32
Abbildung 3-1:	Übersichtsschema zum kombinierten Screening in E. coli-Zellen und Säugerzellen.	39
Abbildung 3-2:	Sequenzvergleich der erstellten Ausgangsvarianten mit dem PCM von D. radiodurans.	42
Abbildung 3-3:	Spektren der auf der Basis der PAS-GAF-PHY-Domänen des Phytochroms von D. radiodurans generierten NIR Ausgangs-Varianten.	43
Abbildung 3-4:	Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Vorlagevarianten W1-W4.	44
Abbildung 3-5:	Übersicht zur Mutagenese-strategie.	46
Abbildung 3-6:	Lage der Positionen 263, 207 und 270 relativ zum Chromophor des Bakteriophytochroms von D. radiodurans.	47
Abbildung 3-7:	Spektren der generierten NIR FPs im Vergleich zu mIFP.	48
Abbildung 3-8:	Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten NIR FPs.	49
Abbildung 3-9:	Repräsentative Zusammenstellung von in Säugerzellen exprimierten W4.35-Fusionsproteinen.	52
Abbildung 3-10:	Bleichverhalten des generierten NIR FPs W4.35 im Vergleich zu dem GFP-basierten FP mCardinal.	53
Abbildung 3-11:	Repräsentative Gegenüberstellung von Konfokaler- und STED-Nanoskopie in einer lebenden W4.35-Vim exprimierenden Zelle.	54
Abbildung 3-12:	Repräsentative Gegenüberstellung von Konfokaler- und STED-Nanoskopie in einer lebenden W4.35-NUP50 exprimierenden Zelle.	55
Abbildung 3-13:	NIR und rote Zweifarbenmikroskopie einer W4.35-Vimentinfusionprotein und mCherry-ER-Fusionsprotein co-exprimierenden, lebenden HeLa-Zelle.	56
Abbildung 3-14:	Übersicht zur Mutagenese-strategie.	57
Abbildung 3-15:	Lage der Positionen 25, 115, 296 und 270 zum Chromophor.	59
Abbildung 3-16:	Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten mit variabler Position 25.	60
Abbildung 3-17:	Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten mit variabler Position 115.	61

Abbildung 3-18: Einfluss der Mutation G270R.	62
Abbildung 3-19: Eigenschaften der vier besten entwickelten RSFPs.	63
Abbildung 3-20: Spektren der auf der Basis von W3 generierten RSFPs.	65
Abbildung 3-21: Oligomerisierungsgrad und pH-Stabilität der generierten NIR RSFPs.	66
Abbildung 3-22: Schaltschema am konfokalen Aufbau zur Charakterisierung der NIR RSFPs.	68
Abbildung 3-23: Abhängigkeit des Schalthintergrunds von der Laserleistung des 660 nm Lasers.	69
Abbildung 3-24: Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Laserleistung des 660 nm Lasers.	70
Abbildung 3-25: Anschaltsättigung und Schalthintergrund der Varianten W3, W3.37 und W3.103 bei verschiedenen Leistungen des 785 nm Lasers.	71
Abbildung 3-26: Stabilität des Aus-Zustands.	73
Abbildung 3-27: Bleichverhalten der generierten Varianten W3.37 und W3.103 im Vergleich zu W3.	75
Abbildung 3-28: Vergleich der Varianten W3, W3.37 und W3.103 unter konfokalen Bedingungen.	76
Abbildung 3-29: Repräsentative Zusammenstellung von in Säugerzellen exprimierten W3.37- beziehungsweise W3.103-Fusionsproteinen.	77
Abbildung 3-30: RESOLFT-Nanoskopie unter Verwendung des NIR RSFPs W3.37.	78
Abbildung 4-1: Vergleich der Verbindung zwischen Chromophor, GAF-Domäne und PHY-Domäne.	81
Abbildung 4-2: Vergleich der Anzahl der Wassermoleküle in der Umgebung der Position 207.	84
Abbildung 4-3: Lage der Positionen 270 und 260.	86
Abbildung 4-4: Chromophorbindestelle im Bakteriophytochrom von <i>D. radiodurans</i> beziehungsweise in BphP1 FP C20S.	87
Abbildung 4-5: Chromophor des Bakteriophytochrom von <i>D. radiodurans</i> im Pr- beziehungsweise Pfr-Stadium.	95
Abbildung 5-1: gruppenintern entworfener und gebauter Aufbau für NIR-STED.	117
Abbildung 5-2: schematische Darstellung des gruppenintern zur Charakterisierung und Mikroskopie der NIR-RSFPs gebauten Aufbaus.	119
Abbildung 5-3: beispielhafte Darstellung der Justierung des Aufbaus anhand der XY-Richtung.	120
Abbildung 11-1: W4.35-Vimentinfusionsprotein-exprimierende lebende HeLa-Zellen ohne BV-Zugabe	139
Abbildung 11-2: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten mit variabler Position 296.	140

## 7 Formelverzeichnis

Formel 1:	laterale Auflösungsgrenze nach Abbe	4
Formel 2:	axiale Auflösungsgrenze nach Abbe	4
Formel 3:	Auflösungsgrenze für die beschriebenen Nanoskopieverfahren	5

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten.	50
Tabelle 3-2:	Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten.	67
Tabelle 5-1:	Beispielhafte Pulssequenz pro Klon während des Screenings am automatisierten Mikroskop.	114
Tabelle 11-1:	Zusammenfassung Zellverträglichkeit von BV und DMSO.	139
Tabelle 11-2:	Zusammenstellung des Einflusses der Mutationen E25Q/V115A auf die Varianten W1-W4.	141
Tabelle 11-3:	Liste der verwendeten Oligonukleotide.	141
Tabelle 11-4:	Liste der verwendeten Mutageneseprimer.	143
Tabelle 11-5:	berechnete Intensitäten am konfokalen Aufbau.	143

## 9 Abkürzungsverzeichnis

AU	Airy Unit
A	Alanin
BFP	blau fluoreszierendes Protein
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderalbumin
BV	Biliverdin
C	Cystein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBD	Chromophorbindedomäne
CENP C	centromeres Protein C
CEP 41	centrosomales Protein 41
CFP	<i>cyan fluoreszierendes Protein</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
D	Asparaginsäure
<i>dNTP</i>	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphat</i>
<i>DNS</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>D<sub>r</sub>CBD</i>	CBD des Bakteriophytochroms von <i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>D<sub>r</sub>PCM</i>	PCM des Bakteriophytochroms von <i>D. radiodurans</i>
(d)STORM	<i>(direct) Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
E	Glutaminsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>ESPT</i>	<i>excited state proton transfer</i>
F	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence Activated Cells Sorting</i>
FMN	Flavinmononukleotid
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FbFP	FMN-bindendes FP
FP	fluoreszierendes Protein
FWHM	<i>full width at half maximum</i>
(F)PALM	<i>(Fluorescence) Photo-Activation Localization Microscopy</i>
G	Glycin
<i>GFP</i>	<i>grün fluoreszierendes Protein</i>
GPCR	<i>G-Protein Coupled Receptors</i>
GSD	<i>Ground State Depletion</i>
GSDIM	<i>Ground State Depletion followed by Individual Molecule return</i>
H	Histidin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
LED	Leuchtdiode
<i>LSS</i>	<i>large stokes shift</i>
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>

M	Methionin
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MOST	<i>Multiple OFF-State Transitions</i>
N	Asparagin
NIR	<i>Near-InfraRed</i>
OD600	optische Dichte bei 600nm Anregung
P	Prolin
PALM	<i>Photo-Activation Localization Microscopy</i>
PCM	<i>PhotoSensory CoreModule</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEB	Phycoerythrobilin
P $\phi$ B	Phycocromobilin
PCB	Phycocyanobilin
PPI	Protein-Protein-Interaktion
Protoporphyrin $\alpha$	PPIX $\alpha$
PSF	Punktstreuungsfunktion
PTS	<i>Peroxisomal Targeting Signal</i>
Q	Glutamin
R	Arginin
RESOLFT	<i>Reversible Saturable Optical Linear FLuorescence Transitions</i>
R $\rho$ CBD	CBD von <i>Rhodospseudomonas palustris</i>
Rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse Transkriptase- PCR
S	Serin
Semliki-Forest Virus	SFV
STED	<i>STimulated Emission Depletion</i>
STORM	<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
T	Threonin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

## 10 Literaturverzeichnis

- Abbe, E., 1873, Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung: Arch. Mikroskop. Anat., v. 9, p. 413–420.
- Abbyad, P., Childs, W., Shi, X. H., und Boxer, S. G., 2007, Dynamic Stokes shift in green fluorescent protein variants: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, no. 51, p. 20189-20194.
- Adam, V., Berardozi, R., Byrdin, M., und Bourgeois, D., 2014, Phototransformable fluorescent proteins: Future challenges: Current Opinion in Chemical Biology, v. 20, p. 92-102.
- Aglyamova, G. V., Hunt, M. E., Modi, C. K., und Matz, M. V., 2011, Multi-colored homologs of the green fluorescent protein from hydromedusa Obelia sp: Photochemical & Photobiological Sciences, v. 10, no. 8, p. 1303-1309.
- Alieva, N. O., Konzen, K. A., Field, S. F., Meleshkevitch, E. A., Hunt, M. E., Beltran-Ramirez, V., Miller, D. J., Wiedenmann, J., Salih, A., und Matz, M. V., 2008, Diversity and Evolution of Coral Fluorescent Proteins: Plos One, v. 3, no. 7.
- Andel, F., Lagarias, J. C., und Mathies, R. A., 1996, Resonance Raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome: Biochemistry, v. 35, no. 50, p. 15997-16008.
- Ando, R., Mizuno, H., und Miyawaki, A., 2004, Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting: Science, v. 306, no. 5700, p. 1370-1373.
- Andresen, M., Stiel, A. C., Folling, J., Wenzel, D., Schonle, A., Egner, A., Eggeling, C., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2008, Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy: Nature Biotechnology, v. 26, no. 9, p. 1035-1040.
- Andresen, M., Stiel, A. C., Trowitzsch, S., Weber, G., Eggeling, C., Wahl, M. C., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2007, Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, no. 32, p. 13005-13009.
- Andresen, M., Wahl, M. C., Stiel, A. C., Grater, F., Schafer, L. V., Trowitzsch, S., Weber, G., Eggeling, C., Grubmüller, H., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2005, Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent protein: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, no. 37, p. 13070-13074.
- Arpino, J. A. J., Rizkallah, P. J., und Jones, D. D., 2012, Crystal Structure of Enhanced Green Fluorescent Protein to 1.35 angstrom Resolution Reveals Alternative Conformations for Glu222: Plos One, v. 7, no. 10, p. 8.
- Auldrige, M. E., und Forest, K. T., 2011, Bacterial phytochromes: More than meets the light: Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v. 46, no. 1, p. 67-88.
- Auldrige, M. E., Satyshur, K. A., Anstrom, D. M., und Forest, K. T., 2012, Structure-guided Engineering Enhances a Phytochrome-based Infrared Fluorescent Protein: Journal of Biological Chemistry, v. 287, no. 10, p. 7000-7009.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., und Tsien, R. Y., 2000, Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, no. 22, p. 11984-11989.
- Bellini, D., und Papiz, M. Z., 2012, Structure of a Bacteriophytochrome and Light-Stimulated Protomer Swapping with a Gene Repressor: Structure, v. 20, no. 8, p. 1436-1446.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., und Hess, H. F., 2006, Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution: Science, v. 313, no. 5793, p. 1642-1645.
- Bhattacharya, S., Auldrige, M. E., Lehtivuori, H., Ihalainen, J. A., und Forest, K. T., 2014, Origins of Fluorescence in Evolved Bacteriophytochromes: Journal of Biological Chemistry, v. 289, no. 46, p. 32144-32152.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., und Fischer, R., 2005, The Aspergillus nidulans phytochrome FphA represses sexual development in red light: Current Biology, v. 15, no. 20, p. 1833-1838.
- Bornschoegl, T., Anstrom, D. M., Mey, E., Dzubiella, J., Rief, M., und Forest, K. T., 2009, Tightening the Knot in Phytochrome by Single-Molecule Atomic Force Microscopy: Biophysical Journal, v. 96, no. 4, p. 1508-1514.

- Borst, J. W., Hink, M. A., van Hoek, A., und Visser, A., 2005, Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins: *Journal of Fluorescence*, v. 15, no. 2, p. 153-160.
- Borucki, B., von Stetten, D., Seibeck, S., Lamparter, T., Michael, N., Mroginski, M. A., Otto, H., Murgida, D. H., Heyn, M. P., und Hildebrandt, P., 2005, Light-induced proton release of phytochrome is coupled to the transient deprotonation of the tetrapyrrole chromophore: *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, no. 40, p. 34358-34364.
- Bossi, M., Folling, J., Dyba, M., Westphal, V., und Hell, S. W., 2006, Breaking the diffraction resolution barrier in far-field microscopy by molecular optical bistability: *New Journal of Physics*, v. 8, p. 10.
- Brakemann, T., Stiel, A. C., Weber, G., Andresen, M., Testa, I., Grotjohann, T., Leutenegger, M., Plessmann, U., Urlaub, H., Eggeling, C., Wahl, M. C., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2011, A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching: *Nature Biotechnology*, v. 29, no. 10, p. 942-U132.
- Brakemann, T., Weber, G., Andresen, M., Groenhof, G., Stiel, A. C., Trowitzsch, S., Eggeling, C., Grubmüller, H., Hell, S. W., Wahl, M. C., und Jakobs, S., 2010, Molecular Basis of the Light-driven Switching of the Photochromic Fluorescent Protein Padron: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, no. 19, p. 14603-14609.
- Branchini, B. R., Nemser, A. R., und Zimmer, M., 1998, A computational analysis of the unique protein-induced tight turn that results in posttranslational chromophore formation in green fluorescent protein: *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, no. 1, p. 1-6.
- Burgie, E. S., Bussell, A. N., Walker, J. M., Dubiel, K., und Vierstra, R. D., 2014a, Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, no. 28, p. 10179-10184.
- Burgie, E. S., Wang, T., Bussell, A. N., Walker, J. M., Li, H. L., und Vierstra, R. D., 2014b, Crystallographic and Electron Microscopic Analyses of a Bacterial Phytochrome Reveal Local and Global Rearrangements during Photoconversion: *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, no. 35, p. 24573-24587.
- Burgie, E. S., Zhang, J. R., und Vierstra, R. D., 2016, Crystal Structure of Deinococcus Phytochrome in the Photoactivated State Reveals a Cascade of Structural Rearrangements during Photoconversion: *Structure*, v. 24, no. 3, p. 448-457.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W., und Hendricks, S. B., 1959, DETECTION, ASSAY, AND PRELIMINARY PURIFICATION OF THE PIGMENT CONTROLLING PHOTORESPONSIVE DEVELOPMENT OF PLANTS: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 45, no. 12, p. 1703-1708.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., und Tsien, R. Y., 2002, A monomeric red fluorescent protein: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, no. 12, p. 7877-7882.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., und Prasher, D. C., 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression: *Science*, v. 263, no. 5148, p. 802-805.
- Chattoraj, M., King, B. A., Bublitz, G. U., und Boxer, S. G., 1996, Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: Multiple states and proton transfer: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, no. 16, p. 8362-8367.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T. J., Batschauer, A., und Ahmad, M., 2011, The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals, in Merchant, S. S., Briggs, W. R., and Ort, D., eds., *Annual Review of Plant Biology*, Vol 62, Volume 62: Palo Alto, Annual Reviews, p. 335-364.
- Chen, S. X., Osipovich, A. B., Ustione, A., Potter, L. A., Hipkens, S., Gangula, R., Yuan, W. P., Piston, D. W., und Magnuson, M. A., 2011, Quantification of factors influencing fluorescent protein expression using RMCE to generate an allelic series in the ROSA26 locus in mice: *Disease Models & Mechanisms*, v. 4, no. 4, p. 537-547.
- Chica, R. A., Moore, M. M., Allen, B. D., und Mayo, S. L., 2010, Generation of longer emission wavelength red fluorescent proteins using computationally designed libraries: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, no. 47, p. 20257-20262.
- Chmyrov, A., Keller, J., Grotjohann, T., Ratz, M., d'Este, E., Jakobs, S., Eggeling, C., und Hell, S. W., 2013, Nanoscopy with more than 100,000 'doughnuts': *Nature Methods*, v. 10, no. 8, p. 737-+.



- Christie, J. M., Hitomi, K., Arvai, A. S., Hartfield, K. A., Mettlen, M., Pratt, A. J., Tainer, J. A., und Getzoff, E. D., 2012, Structural Tuning of the Fluorescent Protein iLOV for Improved Photostability: *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, no. 26, p. 22295-22304.
- Chu, J., Haynes, R. D., Corbel, S. Y., Li, P., Gonzalez-Gonzalez, E., Burg, J. S., Ataie, N. J., Lam, A. J., Cranfill, P. J., Baird, M. A., Davidson, M. W., Ng, H.-L., Garcia, K. C., Contag, C. H., Shen, K., Blau, H. M., und Lin, M. Z., 2014, Non-invasive intravital imaging of cellular differentiation with a bright red-excitable fluorescent protein: *Nature Methods*, v. 11, no. 5, p. 572-578.
- Chudakov, D. M., Belousov, V. V., Zeraisky, A. G., Novoselov, V. V., Staroverov, D. B., Zorov, D. B., Lukyanov, S., und Lukyanov, K. A., 2003, Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling: *Nature Biotechnology*, v. 21, no. 2, p. 191-194.
- Chudakov, D. M., Verkhusha, V. V., Staroverov, D. B., Souslova, E. A., Lukyanov, S., und Lukyanov, K. A., 2004, Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking: *Nature Biotechnology*, v. 22, no. 11, p. 1435-1439.
- Clausen, M. P., Galiani, S., Bernardino de la Serna, J., Fritzsche, M., Chojnacki, J., Gehmlich, K., Langerholm, B. C., und Eggeling, C., 2013, Pathways to optical STED microscopy: *NanoBioImaging*, p. 1-12.
- Cohen, R. N., van der Aa, M., Macaraeg, N., Lee, A. P., und Szoka, F. C., 2009, Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection: *Journal of Controlled Release*, v. 135, no. 2, p. 166-174.
- Craggs, T. D., 2009, Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation: *Chemical Society Reviews*, v. 38, no. 10, p. 2865-2875.
- Cranfill, P. J., Sell, B. R., Baird, M. A., Allen, J. R., Lavagnino, Z., de Gruiter, H. M., Kremers, G. J., Davidson, M. W., Ustione, A., und Piston, D. W., 2016, Quantitative assessment of fluorescent proteins: *Nature Methods*, v. 13, no. 7, p. 557-+.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A., und Tsien, R. Y., 1995, Understanding, improving and using green fluorescent proteins: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 20, no. 11, p. 448-455.
- Danzl, J. G., Sidenstein, S. C., Gregor, C., Urban, N. T., Ilgen, P., Jakobs, S., und Hell, S. W., 2016, Coordinate-targeted fluorescence nanoscopy with multiple off states: *Nature Photonics*, v. 10, no. 2, p. 122-+.
- Day, R. N., und Davidson, M. W., 2009, The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging: *Chemical Society Reviews*, v. 38, no. 10, p. 2887-2921.
- Deheyn, D. D., Kubokawa, K., McCarthy, J. K., Murakami, A., Porrachia, M., Rouse, G. W., und Holland, N. D., 2007, Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus: *Biological Bulletin*, v. 213, no. 2, p. 95-100.
- Demaurex, N., 2002, pH homeostasis of cellular organelles: *News in Physiological Sciences*, v. 17, p. 1-5.
- DiCiommo, D. P., und Bremner, R., 1998, Rapid, high level protein production using DNA-based semliki forest virus vectors: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, no. 29, p. 18060-18066.
- Dower, W. J., Miller, J. F., und Ragsdale, C. W., 1988, HIGH-EFFICIENCY TRANSFORMATION OF ESCHERICHIA-COLI BY HIGH-VOLTAGE ELECTROPORATION: *Nucleic Acids Research*, v. 16, no. 13, p. 6127-6145.
- Duwe, S., De Zitter, E., Gielen, V., Moeyaert, B., Vandenberg, W., Grotjohann, T., Clays, K., Jakobs, S., Van Meervelt, L., und Dedecker, P., 2015, Expression-Enhanced Fluorescent Proteins Based on Enhanced Green Fluorescent Protein for Super-resolution Microscopy: *Acs Nano*, v. 9, no. 10, p. 9528-9541.
- Dyba, M., und Hell, S. W., 2002, Focal spots of size  $\lambda/23$  open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution: *Physical Review Letters*, v. 88, no. 16, p. 4.
- Ehrengruber, M. U., und Goldin, A. L., 2007, Semliki forest virus vectors with mutations in the nonstructural protein 2 gene permit extended superinfection of neuronal and non-neuronal cells: *Journal of Neurovirology*, v. 13, no. 4, p. 353-363.
- El Khatib, M., Martins, A., Bourgeois, D., Colletier, J. P., und Adam, V., 2016, Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for superresolution imaging of the bacterial periplasm: *Scientific Reports*, v. 6, p. 12.
- Elich, T. D., und Chory, J., 1997, Biochemical characterization of Arabidopsis wild-type and mutant phytochrome B holoproteins: *Plant Cell*, v. 9, no. 12, p. 2271-2280.
- Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P. E., Stock, J., und Leibler, S., 1997, Photoactivation turns green fluorescent protein red: *Current Biology*, v. 7, no. 10, p. 809-812.

- Enderlein, J., und Erdmann, R., 1997, Fast fitting of multi-exponential decay curves: Optics Communications, v. 134, no. 1-6, p. 371-378.
- Essen, L. O., Mailliet, J., und Hughes, J., 2008, The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, no. 38, p. 14709-14714.
- Filonov, G. S., Piatkevich, K. D., Ting, L. M., Zhang, J. H., Kim, K., und Verkhusha, V. V., 2011, Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging: Nature Biotechnology, v. 29, no. 8, p. 757-U133.
- Fischer, A. J., und Lagarias, J. C., 2004, Harnessing phytochrome's glowing potential: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, no. 50, p. 17334-17339.
- Fitzpatrick, A. E., Lincoln, C. N., van Wilderen, L., und van Thor, J. J., 2012, Pump-Dump-Probe and Pump-Repump-Probe Ultrafast Spectroscopy Resolves Cross Section of an Early Ground State Intermediate and Stimulated Emission in the Photoreactions of the Pr Ground State of the Cyanobacterial Phytochrome Cph1: Journal of Physical Chemistry B, v. 116, no. 3, p. 1077-1088.
- Fitzpatrick, J. A. J., Yan, Q., Sieber, J. J., Dyba, M., Schwarz, U., Szent-Gyorgyi, C., Woolford, C. A., Berget, P. B., Waggoner, A. S., und Bruchez, M. P., 2009, STED Nanoscopy in Living Cells Using Fluorogen Activating Proteins: Bioconjugate Chemistry, v. 20, no. 10, p. 1843-1847.
- Fölling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C. A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C., und Hell, S. W., 2008, Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return: Nature Methods, v. 5, no. 11, p. 943-945.
- Fradkov, A. F., Chen, Y., Ding, L., Barsova, E. V., Matz, M. V., und Lukyanov, S. A., 2000, Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence: FEBS Letters, v. 479, no. 3, p. 127-130.
- Franklin, K. A., und Whitelam, G. C., 2005, Phytochromes and shade-avoidance responses in plants: Annals of Botany, v. 96, no. 2, p. 169-175.
- Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J., und Dunlap, J. C., 2005, Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*: Eukaryotic Cell, v. 4, no. 12, p. 2140-2152.
- Gasser, C., Taiber, S., Yeh, C. M., Wittig, C. H., Hegemann, P., Ryu, S., Wunder, F., und Moglich, A., 2014, Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 111, no. 24, p. 8803-8808.
- Geissbuehler, S., Sharipov, A., Godinat, A., Bocchio, N. L., Sandoz, P. A., Huss, A., Jensen, N. A., Jakobs, S., Enderlein, J., van der Goot, F. G., Dubikovskaya, E. A., Lasser, T., und Leutenegger, M., 2014, Live-cell multiplane three-dimensional super-resolution optical fluctuation imaging: Nature Communications, v. 5, p. 7.
- Gibson, T. J., Seiler, M., und Veitia, R. A., 2013, The transience of transient overexpression: Nature Methods, v. 10, no. 8, p. 715-721.
- Giraud, E., Fardoux, L., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B., und Vermeglio, A., 2002, Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria: Nature, v. 417, no. 6885, p. 202-205.
- Gottfert, F., Wurm, C. A., Mueller, V., Berning, S., Cordes, V. C., Honigmann, A., und Hell, S. W., 2013, Coaligned Dual-Channel STED Nanoscopy and Molecular Diffusion Analysis at 20 nm Resolution: Biophysical Journal, v. 105, no. 1, p. L1-L3.
- Gross, L. A., Baird, G. S., Hoffman, R. C., Baldrige, K. K., und Tsien, R. Y., 2000, The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 97, no. 22, p. 11990-11995.
- Grotjohann, T., Testa, I., Leutenegger, M., Bock, H., Urban, N. T., Lavoie-Cardinal, F., Willig, K. I., Eggeling, C., Jakobs, S., und Hell, S. W., 2011, Diffraction-unlimited all-optical imaging and writing with a photochromic GFP: Nature, v. 478, no. 7368, p. 204-208.
- Grotjohann, T., Testa, I., Reuss, M., Brakemann, T., Eggeling, C., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2012, rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells: Elife, v. 1, p. 14.
- Gu, Z., Zhao, M. X., Sheng, Y. W., Bentolila, L. A., und Tang, Y., 2011, Detection of Mercury Ion by Infrared Fluorescent Protein and Its Hydrogel-Based Paper Assay: Analytical Chemistry, v. 83, no. 6, p. 2324-2329.
- Gurskaya, N. G., Verkhusha, V. V., Shcheglov, A. S., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, S., und Lukyanov, K. A., 2006, Engineering of a monomeric green-to-red

- photoactivatable fluorescent protein induced by blue light: *Nature Biotechnology*, v. 24, no. 4, p. 461-465.
- Hanahan, D., 1983, STUDIES ON TRANSFORMATION OF ESCHERICHIA-COLI WITH PLASMIDS: *Journal of Molecular Biology*, v. 166, no. 4, p. 557-580.
- Hanzawa, H., Inomata, K., Kinoshita, H., Kakiuchi, T., Jayasundera, K. P., Sawamoto, D., Ohta, A., Uchida, K., Wada, K., und Furuya, M., 2001, In vitro assembly of phytochrome B apoprotein with synthetic analogs of the phytochrome chromophore: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, no. 6, p. 3612-3617.
- Heim, R., Cubitt, A. B., und Tsien, R. Y., 1995, Improved green fluorescence [letter]: *Nature*, v. 373, no. 6516, p. 663-664.
- Heim, R., Prasher, D. C., und Tsien, R. Y., 1994, WAVELENGTH MUTATIONS AND POSTTRANSLATIONAL AUTOXIDATION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, no. 26, p. 12501-12504.
- Hein, B., Willig, K. I., und Hell, S. W., 2008, Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, no. 38, p. 14271-14276.
- Hein, B., Willig, K. I., Wurm, C. A., Westphal, V., Jakobs, S., und Hell, S. W., 2010, Stimulated Emission Depletion Nanoscopy of Living Cells Using SNAP-Tag Fusion Proteins: *Biophysical Journal*, v. 98, no. 1, p. 158-163.
- Hell, S. W., 2007, Far-field optical nanoscopy: *Science*, v. 316, no. 5828, p. 1153-1158.
- Hell, S. W., 2009, Microscopy and its focal switch: *Nature Methods*, v. 6, no. 1, p. 24-32.
- Hell, S. W., Dyba, M., und Jakobs, S., 2004, Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy: *Current Opinion in Neurobiology*, v. 14, no. 5, p. 599-609.
- Hell, S. W., Jakobs, S., und Kastrop, L., 2003, Imaging and writing at the nanoscale with focused visible light through saturable optical transitions: *Applied Physics a-Materials Science & Processing*, v. 77, no. 7, p. 859-860.
- Hell, S. W., und Wichmann, J., 1994, Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated emission depletion microscopy: *Opt. Lett.*, v. 19, no. 11, p. 780-782.
- Henderson, J. N., Ai, H. W., Campbell, R. E., und Remington, S. J., 2007, Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, no. 16, p. 6672-6677.
- Henderson, J. N., Osborn, M. F., Koon, N., Gepshtein, R., Huppert, D., und Remington, S. J., 2009, Excited State Proton Transfer in the Red Fluorescent Protein mKeima: *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, no. 37, p. 13212-13213.
- Hense, A., Prunsche, B., Gao, P., Ishitsuka, Y., Nienhaus, K., und Nienhaus, G. U., 2015, Monomeric Garnet, a far-red fluorescent protein for live-cell STED imaging: *Scientific Reports*, v. 5.
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., und Mason, M. D., 2006, Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy: *Biophysical Journal*, v. 91, no. 11, p. 4258-4272.
- Heyne, K., Herbst, J., Stehlik, D., Esteban, B., Lamparter, T., Hughes, J., und Diller, R., 2002, Ultrafast dynamics of phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*, reconstituted with phycocyanobilin and phycoerythrobilin: *Biophysical Journal*, v. 82, no. 2, p. 1004-1016.
- Hock, A. K., Cheung, E. C., Humpton, T. J., Monteverde, T., Paulus-Hock, V., Lee, P., McGee, E., Scopelliti, A., Murphy, D. J., Strathdee, D., Blyth, K., und Vousden, K. H., 2017, Development of an inducible mouse model of iRFP713 to track recombinase activity and tumour development *in vivo*: *Scientific Reports*, v. 7, no. 1837.
- Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., und Hell, S. W., 2005, Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, no. 49, p. 17565-17569.
- Hontani, Y., Shcherbakova, D. M., Baloban, M., Zhu, J., Verkhusha, V. V., und Kennis, J. T. M., 2016, Bright blue-shifted fluorescent proteins with Cys in the GAF domain engineered from bacterial phytochromes: fluorescence mechanisms and excited-state dynamics: *Scientific Reports*, v. 6, no. 37362.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., und Zhang, F., 2014, Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering: *Cell*, v. 157, no. 6, p. 1262-1278.

- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gartner, W., Wilde, A., und Borner, T., 1997, A prokaryotic phytochrome: *Nature*, v. 386, no. 6626, p. 663-663.
- Hunt, M. E., Scherrer, M. P., Ferrari, F. D., und Matz, M. V., 2010, Very Bright Green Fluorescent Proteins from the Pontellid Copepod *Pontella mimocerami*: *Plos One*, v. 5, no. 7, p. 8.
- Ikeuchi, M., und Ishizuka, T., 2008, Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria: *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 7, no. 10, p. 1159-1167.
- Inouye, S., und Tsuji, F. I., 1994, AEQUOREA GREEN FLUORESCENT PROTEIN - EXPRESSION OF THE GENE AND FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF THE RECOMBINANT PROTEIN: *Febs Letters*, v. 341, no. 2-3, p. 277-280.
- Jakobs, S., und Wurm, C. A., 2014, Super-resolution microscopy of mitochondria: *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 20, p. 9-15.
- Jensen, N. A., Danzl, J. G., Willig, K. I., Lavoie-Cardinal, F., Brakemann, T., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2014, Coordinate-Targeted and Coordinate-Stochastic Super-Resolution Microscopy with the Reversibly Switchable Fluorescent Protein Dreiklang: *Chemphyschem*, v. 15, no. 4, p. 756-762.
- Jung, G., Brockhinke, A., Gensch, T., Hötzer, B., Schwedler, S., und Veetil, S. K., 2012, Fluorescent Proteins I: *Springer Ser Fluoresc*, v. 11, p. 69-98.
- Jung, G., Wiehler, J., und Zumbusch, A., 2005, The photophysics of green fluorescent protein: Influence of the key amino acids at positions 65, 203, and 222: *Biophysical Journal*, v. 88, no. 3, p. 1932-1947.
- Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., und Miyawaki, A., 2004, Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer: *Biochemical Journal*, v. 381, p. 307-312.
- Karniol, B., und Vierstra, R. D., 2003, The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, no. 5, p. 2807-2812.
- Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M., und Vierstra, R. D., 2005, Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors: *Biochemical Journal*, v. 392, p. 103-116.
- Kennedy, M. J., Hughes, R. M., Peteya, L. A., Schwartz, J. W., Ehlers, M. D., und Tucker, C. L., 2010, Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells: *Nature Methods*, v. 7, no. 12, p. 973-U948.
- Kim, P. W., Freer, L. H., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., und Larsen, D. S., 2012, Femtosecond Photodynamics of the Red/Green Cyanobacteriochrome NpR6012g4 from *Nostoc punctiforme*. 1. Forward Dynamics: *Biochemistry*, v. 51, no. 2, p. 608-618.
- Kim, T. K., und Eberwine, J. H., 2010, Mammalian cell transfection: the present and the future: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397, no. 8, p. 3173-3178.
- Klar, T. A., und Hell, S. W., 1999a, Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy: *Optics Letters*, v. 24, no. 14, p. 954-956.
- Klar, T. A., und Hell, S. W., 1999b, Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy: *Optics Letters*, v. 24, no. 14, p. 954-956.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egner, A., und Hell, S. W., 2000, Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, no. 15, p. 8206-8210.
- Kneip, C., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S. E., Mark, F., und Schaffner, K., 1999, Protonation State and Structural Changes of the Tetrapyrrole Chromophore during the Pr Pfr Phototransformation of Phytochrome: A Resonance Raman Spectroscopic Study: *Biochemistry*, v. 38, no. 46, p. 15185-15192.
- Kogure, T., Karasawa, S., Araki, T., Saito, K., Kinjo, M., und Miyawaki, A., 2006, A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy: *Nature Biotechnology*, v. 24, no. 5, p. 577-581.
- Labas, Y. A., Gurskaya, N. G., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Lukyanov, S. A., und Matz, M. V., 2002, Diversity and evolution of the green fluorescent protein family: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, no. 7, p. 4256-4261.
- Lamesch, P., Li, N., Milstein, S., Fan, C. Y., Hao, T., Szabo, G., Hu, Z. J., Venkatesan, K., Bethel, G., Martin, P., Rogers, J., Lawlor, S., McLaren, S., Dricot, A., Borick, H., Cusick, M. E., Vandenhaute,

- J., Dunham, I., Hill, D. E., und Vidal, M., 2007, h0RFeome v3.1: A resource of human open reading frames representing over 10,000 human genes: *Genomics*, v. 89, no. 3, p. 307-315.
- Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G., und Abian, J., 2004, The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium phytochrome Agp1*: *Biochemistry*, v. 43, no. 12, p. 3659-3669.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F., und Esteban, B., 2002, Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, no. 18, p. 11628-11633.
- Lavoie-Cardinal, F., Jensen, N. A., Westphal, V., Stiel, A. C., Chmyrov, A., Bierwagen, J., Testa, I., Jakobs, S., und Hell, S. W., 2014, Two-Color RESOLFT Nanoscopy with Green and Red Fluorescent Photochromic Proteins: *Chemphyschem*, v. 15, no. 4, p. 655-663.
- Lecoq, J., und Schnitzer, M. J., 2011, An infrared fluorescent protein for deeper imaging: *Nature Biotechnology*, v. 29, no. 8, p. 715-716.
- Lehtivuori, H., Bhattacharya, S., Angenent-Mari, N. M., Satyshur, K. A., und Forest, K. T., 2015, Removal of Chromophore-Proximal Polar Atoms Decreases Water Content and Increases Fluorescence in a Near Infrared Phytofluor: *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 2, no. 65.
- Lehtivuori, H., Rissanen, I., Takala, H., Bamford, J., Tkachenko, N. V., und Ihalainen, J. A., 2013, Fluorescence Properties of the Chromophore-Binding Domain of Bacteriophytochrome from *Deinococcus radiodurans*: *Journal of Physical Chemistry B*, v. 117, no. 38, p. 11049-11057.
- Lemay, N. P., Morgan, A. L., Archer, E. J., Dickson, L. A., Megley, C. M., und Zimmer, M., 2008, The role of the tight-turn, broken hydrogen bonding, Glu222 and Arg96 in the post-translational green fluorescent protein chromophore formation: *Chemical Physics*, v. 348, no. 1-3, p. 152-160.
- Levskaya, A., Chevalier, A. A., Tabor, J. J., Simpson, Z. B., Lavery, L. A., Levy, M., Davidson, E. A., Scouras, A., Ellington, A. D., Marcotte, E. M., und Voigt, C. A., 2005, Engineering *Escherichia coli* to see light - These smart bacteria 'photograph' a light pattern as a high-definition chemical image: *Nature*, v. 438, no. 7067, p. 441-442.
- Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A., und Voigt, C. A., 2009, Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction: *Nature*, v. 461, no. 7266, p. 997-1001.
- Lin, M. Z., McKeown, M. R., Ng, H. L., Aguilera, T. A., Shaner, N. C., Campbell, R. E., Adams, S. R., Gross, L. A., Ma, W., Alber, T., und Tsien, R. Y., 2009, Autofluorescent Proteins with Excitation in the Optical Window for Intravital Imaging in Mammals: *Chemistry & Biology*, v. 16, no. 11, p. 1169-1179.
- Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., und Tsien, R. Y., 1998, Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, no. 12, p. 6803-6808.
- Losi, A., und Gartner, W., 2012, The Evolution of Flavin-Binding Photoreceptors: An Ancient Chromophore Serving Trendy Blue-Light Sensors, *in* Merchant, S. S., ed., *Annual Review of Plant Biology*, Vol 63, Volume 63: Palo Alto, Annual Reviews, p. 49-72.
- Lukinavicius, G., Umezawa, K., Olivier, N., Honigsmann, A., Yang, G. Y., Plass, T., Mueller, V., Reymond, L., Correa, I. R., Luo, Z. G., Schultz, C., Lemke, E. A., Heppenstall, P., Eggeling, C., Manley, S., und Johnsson, K., 2013, A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins: *Nature Chemistry*, v. 5, no. 2, p. 132-139.
- Lukyanov, K. A., Fradkov, A. F., Gurskaya, N. G., Matz, M. V., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Markelov, M. L., Zaraisky, A. G., Zhao, X. N., Fang, Y., Tan, W. Y., und Lukyanov, S. A., 2000, Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, no. 34, p. 25879-25882.
- Mailliet, J., Psakis, G., Feilke, K., Sineshchekov, V., Essen, L. O., und Hughes, J., 2011, Spectroscopy and a High-Resolution Crystal Structure of Tyr263 Mutants of Cyanobacterial Phytochrome Cph1: *Journal of Molecular Biology*, v. 413, no. 1, p. 115-127.
- Mallam, A. L., und Jackson, S. E., 2005, Folding studies on a knotted protein: *Journal of Molecular Biology*, v. 346, no. 5, p. 1409-1421.
- Mattis, J., Tye, K. M., Ferenczi, E. A., Ramakrishnan, C., O'Shea, D. J., Prakash, R., Gunaydin, L. A., Hyun, M., Fenno, L. E., Gradinaru, V., Yizhar, O., und Deisseroth, K., 2012, Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins: *Nature Methods*, v. 9, no. 2, p. 159-172.

- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A., 1999a, Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species: *Nature Biotechnology*, v. 17, no. 10, p. 969-973.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., and Lukyanov, S. A., 1999b, Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species: *Nature Biotechnology*, v. 17, no. 10, p. 969-973.
- Matz, M. V., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A., 2002, Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow: *Bioessays*, v. 24, no. 10, p. 953-959.
- Mazzarello, P., 1999, A unifying concept: the history of cell theory: *Nature Cell Biology*, v. 1, no. 1, p. E13-E15.
- Mizuno, H., Mal, T. K., Tong, K. I., Ando, R., Furuta, T., Ikura, M., and Miyawaki, A., 2003, Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein: *Molecular Cell*, v. 12, no. 4, p. 1051-1058.
- Montgomery, B. L., and Lagarias, J. C., 2002, Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light: *Trends in Plant Science*, v. 7, no. 8, p. 357-366.
- Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Gould, T. J., Zhang, J. H., Bewersdorf, J., and Verkhusha, V. V., 2010, Far-Red Fluorescent Protein Excitable with Red Lasers for Flow Cytometry and Superresolution STED Nanoscopy: *Biophysical Journal*, v. 99, no. 2, p. L13-L15.
- Nagano, S., 2016, From photon to signal in phytochromes: similarities and differences between prokaryotic and plant phytochromes: *Journal of Plant Research*, v. 129, no. 2, p. 123-135.
- Nägerl, U. V., Willig, K. I., Hein, B., Hell, S. W., and Bonhoeffer, T., 2008, Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, no. 48, p. 18982-18987.
- Nureki, O., Watanabe, K., Fukai, S., Ishii, R., Endo, Y., Hori, H., and Yokoyama, S., 2004, Deep knot structure for construction of active site and cofactor binding site of tRNA modification enzyme: *Structure*, v. 12, no. 4, p. 593-602.
- Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Suzuki, T., Tokutomi, S., and Nagatani, A., 2004, Functional analysis of a 450-amino acid N-terminal fragment of phytochrome B in *Arabidopsis*: *Plant Cell*, v. 16, no. 8, p. 2104-2116.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J., 1996, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein: *Science*, v. 273, no. 5280, p. 1392-1395.
- Pandelieva, A. T., Baran, M. J., Calderini, G. F., McCann, J. L., Tremblay, V., Sarvan, S., Davey, J. A., Couture, J. F., and Chica, R. A., 2016, Brighter Red Fluorescent Proteins by Rational Design of Triple-Decker Motif: *Acs Chemical Biology*, v. 11, no. 2, p. 508-517.
- Park, C. M., Shim, J. Y., Yang, S. S., Kang, J. G., Kim, J. I., Luka, Z., and Song, P. S., 2000, Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp PCC6803 phytochrome Cph1: *Biochemistry*, v. 39, no. 21, p. 6349-6356.
- Patterson, G. H., and Lippincott-Schwartz, J., 2002, A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells: *Science*, v. 297, no. 5588, p. 1873-1877.
- Pellett, P. A., Sun, X. L., Gould, T. J., Rothman, J. E., Xu, M. Q., Correa, I. R., and Bewersdorf, J., 2011, Two-color STED microscopy in living cells: *Biomedical Optics Express*, v. 2, no. 8, p. 2364-2371.
- Piatkevich, K. D., Malashkevich, V. N., Almo, S. C., and Verkhusha, V. V., 2010, Engineering ESPT Pathways Based on Structural Analysis of LSSmKate Red Fluorescent Proteins with Large Stokes Shift: *Journal of the American Chemical Society*, v. 132, no. 31, p. 10762-10770.
- Piatkevich, K. D., Malashkevich, V. N., Morozova, K. S., Nemkovich, N. A., Almo, S. C., and Verkhusha, V. V., 2013a, Extended Stokes Shift in Fluorescent Proteins: Chromophore-Protein Interactions in a Near-Infrared TagRFP675 Variant: *Scientific Reports*, v. 3, p. 11.
- Piatkevich, K. D., Subach, F. V., and Verkhusha, V. V., 2013b, Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals: *Chemical Society Reviews*, v. 42, no. 8, p. 3441-3452.
- Piatkevich, K. D., Subach, F. V., and Verkhusha, V. V., 2013c, Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome: *Nature Communications*, v. 4, p. 10.
- Pletnev, S., Pletneva, N. V., Souslova, E. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S., Wlodawer, A., Dauter, Z., and Pletnev, V., 2012, Structural basis for bathochromic shift of fluorescence in far-red

- fluorescent proteins eqFP650 and eqFP670: *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, v. 68, p. 1088-1097.
- Pletnev, S., Shcherbo, D., Chudakov, D. M., Pletneva, N., Merzlyak, E. M., Wlodawer, A., Dauter, Z., and Pletnev, V., 2008, A Crystallographic Study of Bright Far-Red Fluorescent Protein mKate Reveals pH-induced cis-trans Isomerization of the Chromophore: *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, no. 43, p. 28980-28987.
- Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K. E., and Buchs, J., 2012, Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor: *Bmc Biology*, v. 10, p. 13.
- Ratz, M., Testa, I., Hell, S. W., and Jakobs, S., 2015, CRISPR/Cas9-mediated endogenous protein tagging for RESOLFT super-resolution microscopy of living human cells: *Scientific Reports*, v. 5, p. 6.
- Reid, B. G., and Flynn, G. C., 1997, Chromophore formation in green fluorescent protein: *Biochemistry*, v. 36, no. 22, p. 6786-6791.
- Rizzo, M. A., Davidson, M. W., and Piston, D. W., 2009, Fluorescent Protein Tracking and Detection: Applications Using Fluorescent Proteins in Living Cells: *Cold Spring Harb Protoc*, v. 4, no. 12.
- Rockwell, N. C., Duanmu, D., Martin, S. S., Bachy, C., Price, D. C., Bhattacharya, D., Worden, A. Z., and Lagarias, J. C., 2014, Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, no. 10, p. 3871-3876.
- Rockwell, N. C., and Lagarias, J. C., 2010, A Brief History of Phytochromes: *Chemphyschem*, v. 11, no. 6, p. 1172-1180.
- Rockwell, N. C., Su, Y. S., and Lagarias, J. C., 2006, Phytochrome structure and signaling mechanisms: *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 837-858.
- Rodriguez, E. A., Tran, G. N., Gross, L. A., Crisp, J. L., Shu, X. K., Lin, J. Y., and Tsien, R. Y., 2016, A far-red fluorescent protein evolved from a cyanobacterial phycobiliprotein: *Nature Methods*, v. 13, no. 9, p. 763-769.
- Roldan-Salgado, A., Sanchez-Barreto, C., and Gaytan, P., 2016, LanFP10-A, first functional fluorescent protein whose chromophore contains the elusive mutation G67A: *Gene*, v. 592, no. 2, p. 281-290.
- Rüdiger, W., Thummler, F., Cmiel, E., and Schneider, S., 1983, CHROMOPHORE STRUCTURE OF THE PHYSIOLOGICALLY ACTIVE FORM (PFR) OF PHYTOCHROME: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, v. 80, no. 20, p. 6244-6248.
- Rumyantsev, K. A., Shcherbakova, D. M., Zakharova, N. I., Emelyanov, A. V., Turoverov, K. K., and Verkhusha, V. V., 2015, Minimal domain of bacterial phytochrome required for chromophore binding and fluorescence: *Scientific Reports*, v. 5, p. 10.
- Sander, J. D., and Joung, J. K., 2014, CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes: *Nature Biotechnology*, v. 32, no. 4, p. 347-355.
- Sawano, A., and Miyawaki, A., 2000, Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis: *Nucleic Acids Research*, v. 28, no. 16.
- Sawin, K. E., and Nurse, P., 1997, Photoactivation of green fluorescent protein: *Current Biology*, v. 7, no. 10, p. R606-R607.
- Schnorrenberg, S., Grotjohann, T., Vorbruggen, G., Herzig, A., Hell, S. W., and Jakobs, S., 2016, In vivo super-resolution RESOLFT microscopy of *Drosophila melanogaster*: *Elife*, v. 5, p. 11.
- Schroder, J., Benink, H., Dyba, M., and Los, G. V., 2009, In Vivo Labeling Method Using a Genetic Construct for Nanoscale Resolution Microscopy: *Biophysical Journal*, v. 96, no. 1, p. L1-L3.
- Schwentker, M. A., Bock, H., Hofmann, M., Jakobs, S., Bewersdorf, J., Eggeling, C., and Hell, S. W., 2007, Wide-field subdiffraction RESOLFT microscopy using fluorescent protein photoswitching: *Microscopy Research and Technique*, v. 70, no. 3, p. 269-280.
- Sednev, M. V., Belov, V. N., and Hell, S. W., 2015, Fluorescent dyes with large Stokes shifts for super-resolution optical microscopy of biological objects: a review: *Methods and Applications in Fluorescence*, v. 3, no. 4, p. 28.
- Shagin, D. A., Barsova, E. V., Yanushevich, Y. G., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Labas, Y. A., Semenova, T. N., Ugalde, J. A., Meyers, A., Nunez, J. M., Widder, E. A., Lukyanov, S. A., and Matz, M. V., 2004, GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: Evolution of functional features and structural complexity: *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, no. 5, p. 841-850.

- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N. G., Palmer, A. E., und Tsien, R. Y., 2004, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp red fluorescent protein: *Nature Biotechnology*, v. 22, no. 12, p. 1567-1572.
- Shcherbakova, D. M., Baloban, M., Emelyanov, A. V., Brenowitz, M., Guo, P., und Verkhusha, V. V., 2016, Bright monomeric near-infrared fluorescent proteins as tags and biosensors for multiscale imaging: *Nature Communications*, v. 7, p. 12.
- Shcherbakova, D. M., Baloban, M., Pletnev, S., Malashkevich, V. N., Xiao, H., Dauter, Z., und Verkhusha, V. V., 2015a, Molecular Basis of Spectral Diversity in Near-Infrared Phytochrome-Based Fluorescent Proteins: *Chemistry & Biology*, v. 22, no. 11, p. 1540-1551.
- Shcherbakova, D. M., Shemetov, A. A., Kaberniuk, A. A., und Verkhusha, V. V., 2015b, Natural Photoreceptors as a Source of Fluorescent Proteins, Biosensors, and Optogenetic Tools, in Kornberg, R. D., ed., Annual Review of Biochemistry, Vol 84, Volume 84, p. 519-550.
- Shcherbakova, D. M., Subach, O. M., und Verkhusha, V. V., 2012, Red Fluorescent Proteins: Advanced Imaging Applications and Future Design: *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 51, no. 43, p. 10724-10738.
- Shcherbakova, D. M., und Verkhusha, V. V., 2013, Near-infrared fluorescent proteins for multicolor in vivo imaging: *Nature Methods*, v. 10, no. 8, p. 751-+.
- Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., Lukyanov, K. A., Bogdanova, E. A., Zharitsky, A. G., Lukyanov, S., und Chudakov, D. M., 2007, Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging: *Nature Methods*, v. 4, no. 9, p. 741-746.
- Shcherbo, D., Shemiakina, I., Ryabova, A. V., Luker, K. E., Schmidt, B. T., Souslova, E. A., Gorodnicheva, T. V., Strukova, L., Shidlovskiy, K. M., Britanova, O. V., Zharitsky, A. G., Lukyanov, K. A., Loschenov, V. B., Luker, G. D., und Chudakov, D. M., 2010, Near-infrared fluorescent proteins: *Nature Methods*, v. 7, no. 10, p. 827-U1520.
- Shimomura, O., 1979, STRUCTURE OF THE CHROMOPHORE OF AEQUOREA GREEN FLUORESCENT PROTEIN: *Febs Letters*, v. 104, no. 2, p. 220-222.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., und Saiga, Y., 1962, EXTRACTION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF AEQUORIN, A BIOLUMINESCENT PROTEIN FROM LUMINOUS HYDROMEDUSAN, AEQUOREA: *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, v. 59, no. 3, p. 223-&.
- Shu, X. K., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A., und Tsien, R. Y., 2009a, Mammalian Expression of Infrared Fluorescent Proteins Engineered from a Bacterial Phytochrome: *Science*, v. 324, no. 5928, p. 804-807.
- Shu, X. K., Wang, L., Colip, L., Kallio, K., und Remington, S. J., 2009b, Unique interactions between the chromophore and glutamate 16 lead to far-red emission in a red fluorescent protein: *Protein Science*, v. 18, no. 2, p. 460-466.
- Sidenstein, S. C., D'Este, E., Bohm, M. J., Danzl, J. G., Belov, V. N., und Hell, S. W., 2016, Multicolour Multilevel STED nanoscopy of Actin/Spectrin Organization at Synapses: *Scientific Reports*, v. 6, p. 8.
- Singh, I. R., Suomalainen, M., Varadarajan, S., Garoff, H., und Helenius, A., 1997, Multiple mechanisms for the inhibition of entry and uncoating of superinfecting Semliki Forest virus: *Virology*, v. 231, no. 1, p. 59-71.
- Stepanenko, O. V., Bublikov, G. S., Stepanenko, O. V., Shcherbakova, D. M., Verkhusha, V. V., Turoverov, K. K., und Kuznetsova, I. M., 2014, A knot in the protein structure - probing the near-infrared fluorescent protein iRFP designed from a bacterial phytochrome: *Febs Journal*, v. 281, no. 9, p. 2284-2298.
- Stiel, A. C., Andresen, M., Bock, H., Hilbert, M., Schilde, J., Schonle, A., Eggeling, C., Egner, A., Hell, S. W., und Jakobs, S., 2008, Generation of monomeric reversibly switchable red fluorescent proteins for far-field fluorescence nanoscopy: *Biophysical Journal*, v. 95, no. 6, p. 2989-2997.
- Strack, R. L., Hein, B., Bhattacharyya, D., Hell, S. W., Keenan, R. J., und Glick, B. S., 2009, A Rapidly Maturing Far-Red Derivative of DsRed-Express2 for Whole-Cell Labeling: *Biochemistry*, v. 48, no. 35, p. 8279-8281.
- Strack, R. L., Strongin, D. E., Mets, L., Glick, B. S., und Keenan, R. J., 2010, Chromophore Formation in DsRed Occurs by a Branched Pathway: *Journal of the American Chemical Society*, v. 132, no. 24, p. 8496-8505.

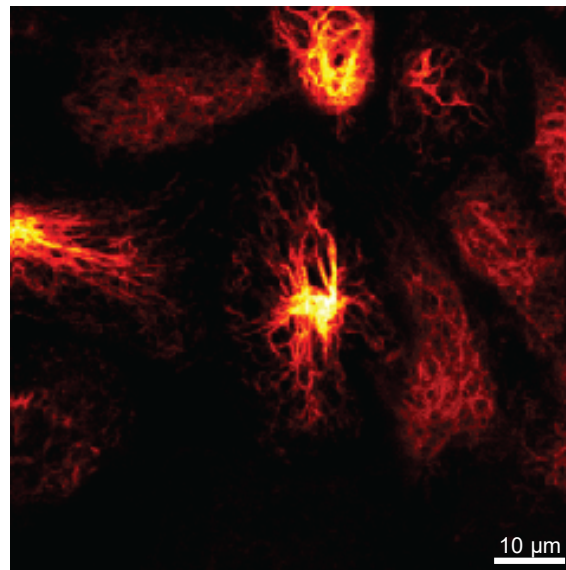


- Strickland, D., Moffat, K., und Sosnick, T. R., 2008, Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, no. 31, p. 10709-10714.
- Subach, F. V., Patterson, G. H., Manley, S., Gillette, J. M., Lippincott-Schwartz, J., und Verkhusha, V. V., 2009, Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy: *Nature Methods*, v. 6, no. 2, p. 153-159.
- Subach, F. V., und Verkhusha, V. V., 2012, Chromophore Transformations in Red Fluorescent Proteins: *Chemical Reviews*, v. 112, no. 7, p. 4308-4327.
- Subach, F. V., Zhang, L. J., Gadella, T. W. J., Gurskaya, N. G., Lukyanov, K. A., und Verkhusha, V. V., 2010a, Red Fluorescent Protein with Reversibly Photoswitchable Absorbance for Photochromic FRET: *Chemistry & Biology*, v. 17, no. 7, p. 745-755.
- Subach, O. M., Malashkevich, V. N., Zencheck, W. D., Morozova, K. S., Piatkevich, K. D., Almo, S. C., und Verkhusha, V. V., 2010b, Structural Characterization of Acylimine-Containing Blue and Red Chromophores in mTagBFP and TagRFP Fluorescent Proteins: *Chemistry & Biology*, v. 17, no. 4, p. 333-341.
- Sun, Y. F., Xu, J. G., Tang, K., Miao, D., Gartner, W., Scheer, H., Zhao, K. H., und Zhou, M., 2014, Orange fluorescent proteins constructed from cyanobacteriochromes chromophorylated with phycoerythrobilin: *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 13, no. 5, p. 757-763.
- Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Baurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schafer, E., und Harter, K., 2001, Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling: *Science*, v. 294, no. 5544, p. 1108-1111.
- Takala, H., Bjorling, A., Berntsson, O., Lehtivuori, H., Niebling, S., Hoernke, M., Kosheleva, I., Henning, R., Menzel, A., Ihalainen, J. A., und Westenhoff, S., 2014, Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors: *Nature*, v. 509, no. 7499, p. 245-+.
- Takala, H., Bjorling, A., Linna, M., Westenhoff, S., und Ihalainen, J. A., 2015, Light-induced Changes in the Dimerization Interface of Bacteriophytochromes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, no. 26, p. 16383-16392.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D. A., und Gomelsky, M., 2006, An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP: *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, no. 46, p. 34751-34758.
- Taylor, W. R., 2000, A deeply knotted protein structure and how it might fold: *Nature*, v. 406, no. 6798, p. 916-919.
- Terakita, A., 2005, The opsins: *Genome Biology*, v. 6, no. 3, p. 9.
- Tinnefeld, P., Eggeling, C., und Hell, S. W., 2015, *Far-Field Optical Nanoscopy*: Springer Ser Fluoresc, no. 14, p. 3-26.
- Tiwari, D. K., Arai, Y., Yamanaka, M., Matsuda, T., Agetsuma, M., Nakano, M., Fujita, K., und Nagai, T., 2015, A fast-and positively photoswitchable fluorescent protein for ultralow-laser-power RESOLFT nanoscopy: *Nature Methods*, v. 12, no. 6, p. 515-+.
- Toh, K. C., Stojkovic, E. A., van Stokkum, I. H. M., Moffat, K., und Kennis, J. T. M., 2010, Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, no. 20, p. 9170-9175.
- Toh, K. C., Stojkovic, E. A., van Stokkum, I. H. M., Moffat, K., und Kennis, J. T. M., 2011, Fluorescence quantum yield and photochemistry of bacteriophytochrome constructs: *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13, no. 25, p. 11985-11997.
- Tregidgo, C., Levitt, J. A., und Suhling, K., 2008, Effect of refractive index on the fluorescence lifetime of green fluorescent protein: *Journal of Biomedical Optics*, v. 13, no. 3.
- Tsutsui, H., Karasawa, S., Shimizu, H., Nukina, N., und Miyawaki, A., 2005, Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter: *Embo Reports*, v. 6, no. 3, p. 233-238.
- Ulijasz, A. T., Cornilescu, G., von Stetten, D., Kaminski, S., Mroginski, M. A., Zhang, J. R., Bhaya, D., Hildebrandt, P., und Vierstra, R. D., 2008, Characterization of two thermostable cyanobacterial phytochromes reveals global movements in the chromophore-binding domain during photoconversion: *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, no. 30, p. 21251-21266.
- Urban, N. T., Willig, K. I., Hell, S. W., und Nagerl, U. V., 2011, STED Nanoscopy of Actin Dynamics in Synapses Deep Inside Living Brain Slices: *Biophysical Journal*, v. 101, no. 5, p. 1277-1284.

- van Thor, J. J., Ronayne, K. L., und Towrie, M., 2007, Formation of the early photoproduct Lumi-R of cyanobacterial phytochrome Cph1 observed by ultrafast mid-infrared spectroscopy: *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, no. 1, p. 126-132.
- van Wilderen, L., Clark, I. P., Towrie, M., und van Thor, J. J., 2009, Mid-Infrared Picosecond Pump-Dump-Probe and Pump-Repump-Probe Experiments to Resolve a Ground-State Intermediate in Cyanobacterial Phytochrome Cph1: *Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, no. 51, p. 16354-16364.
- Verkhusha, V. V., Chudakov, D. M., Gurskaya, N. G., Lukyanov, S., und Lukyanov, K. A., 2004, Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins: *Chemistry & Biology*, v. 11, no. 6, p. 845-854.
- Verkhusha, V. V., und Sorkin, A., 2005, Conversion of the monomeric red fluorescent protein into a photoactivatable probe: *Chemistry & Biology*, v. 12, no. 3, p. 279-285.
- Violot, S., Carpentier, P., Blanchoin, L., und Bourgeois, D., 2009, Reverse pH-Dependence of Chromophore Protonation Explains the Large Stokes Shift of the Red Fluorescent Protein mKeima: *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, no. 30, p. 10356-+.
- Wachter, R. M., Elsliger, M. A., Kallio, K., Hanson, G. T., und Remington, S. J., 1998, Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein: *Structure with Folding & Design*, v. 6, no. 10, p. 1267-1277.
- Wachter, R. M., Watkins, J. L., und Kim, H., 2010, Mechanistic Diversity of Red Fluorescence Acquisition by GFP-like Proteins: *Biochemistry*, v. 49, no. 35, p. 7417-7427.
- Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T., und Vierstra, R. D., 2005, A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome: *Nature*, v. 438, no. 7066, p. 325-331.
- Wagner, J. R., Zhang, J. R., Brunzelle, J. S., Vierstra, R. D., und Forest, K. T., 2007, High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution: *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, no. 16, p. 12298-12309.
- Wagner, J. R., Zhang, J. R., von Stetten, D., Guenther, M., Murgida, D. H., Mroginski, M. A., Walker, J. M., Forest, K. T., Hildebrandt, P., und Vierstra, R. D., 2008, Mutational analysis of *Deinococcus radiodurans* bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, no. 18, p. 12212-12226.
- Wäldchen, S., Lehmann, J., Klein, T., van de Linde, S., und Sauer, M., 2015, Light-induced cell damage in live-cell super-resolution microscopy: *Scientific Reports*, v. 5.
- Wang, C., Flanagan, M. L., McGillicuddy, R. D., Zheng, H., Ginzburg, A. R., Yang, X., Moffat, K., und Engel, G. S., 2016a, Bacteriophytochrome Photoisomerization Proceeds Homogeneously Despite Heterogeneity in Ground State: *Biophysical Journal*, v. 111, no. 10, p. 2125-2134.
- Wang, S., Chen, X. Z., Chang, L., Xue, R. Y., Duan, H. F., und Sun, Y. J., 2016b, GMars-Q Enables Long-Term Live-Cell Parallelized Reversible Saturable Optical Fluorescence Transitions Nanoscopy: *Acs Nano*, v. 10, no. 10, p. 9136-9144.
- Wang, S. X., und Hazelrigg, T., 1994, IMPLICATIONS FOR BCD MESSENGER-RNA LOCALIZATION FROM SPATIAL-DISTRIBUTION OF EXU PROTEIN IN *DROSOPHILA* OOGENESIS: *Nature*, v. 369, no. 6479, p. 400-403.
- Wegerer, A., Sun, T., und Altenbuchner, J., 2008, Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations: *Bmc Biotechnology*, v. 8.
- Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Rocker, C., Salih, A., Spindler, K. D., und Nienhaus, G. U., 2004, EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, no. 45, p. 15905-15910.
- Wilks, J. C., und Slonczewski, J. L., 2007, pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: Rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry: *Journal of Bacteriology*, v. 189, no. 15, p. 5601-5607.
- Willig, K. I., Steffens, H., Gregor, C., Herholt, A., Rossner, M. J., und Hell, S. W., 2014, Nanoscopy of Filamentous Actin in Cortical Dendrites of a Living Mouse: *Biophysical Journal*, v. 106, no. 1, p. L01-L03.
- Wu, S. H., und Lagarias, J. C., 2000, Defining the bilin lyase domain: Lessons from the extended phytochrome superfamily: *Biochemistry*, v. 39, no. 44, p. 13487-13495.

- Yang, F., Moss, L. G., und Phillips, G. N., 1996, The molecular structure of green fluorescent protein: *Nature Biotechnology*, v. 14, no. 10, p. 1246-1251.
- Yang, X., Kuk, J., und Moffat, K., 2008, Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: Photoconversion and signal transduction: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, no. 38, p. 14715-14720.
- Yang, X., Stojkovic, E. A., Kuk, J., und Moffat, K., 2007, Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, no. 30, p. 12571-12576.
- Yang, X. J., Stojkovic, E. A., Ozarowski, W. B., Kuk, J., Davydova, E., und Moffat, K., 2015, Light Signaling Mechanism of Two Tandem Bacteriophytochromes: *Structure*, v. 23, no. 7, p. 1179-1189.
- Yao, J., Kaberniuk, A. A., Li, L., Shcherbakova, D. M., Zhang, R., Wang, L., Li, G., Verkhusha, V. V., und Wang, L. V., 2016, Multiscale photoacoustic tomography using reversibly switchable bacterial phytochrome as a near-infrared photochromic probe: *Nature Methods*, v. 13, no. 1, p. 67-+.
- Yarbrough, D., Wachter, R. M., Kallio, K., Matz, M. V., und Remington, S. J., 2001, Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-angstrom resolution: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, no. 2, p. 462-467.
- Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T., und Lagarias, J. C., 1997, A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system: *Science*, v. 277, no. 5331, p. 1505-1508.
- Yu, D., Baird, M. A., Allen, J. R., Howe, E. S., Klassen, M. P., Reade, A., Makhijani, K., Song, Y., Liu, S., Murthy, Z., Zhang, S.-Q., Weiner, O. D., Kornberg, T. B., Jan, Y.-N., Davidson, M. W., und Shul, X., 2015, A naturally monomeric infrared fluorescent protein for protein labeling in vivo: *Nature Methods*, v. 12, no. 8, p. 763-U106.
- Yu, D., Gustafson, W. C., Han, C., Lafaye, C., Noirclerc-Savoye, M., Ge, W. P., Thayer, D. A., Huang, H., Kornberg, T. B., Royant, A., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Weiss, W. A., und Shu, X. K., 2014, An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging: *Nature Communications*, v. 5, p. 7.
- Zarembinski, T. I., Kim, Y., Peterson, K., Christendat, D., Dharamsi, A., Arrowsmith, C. H., Edwards, A. M., und Joachimiak, A., 2003, Deep trefoil knot implicated in RNA binding found in an archaeobacterial protein: *Proteins-Structure Function and Genetics*, v. 50, no. 2, p. 177-183.
- Zhu, J. Y., Shcherbakova, D. M., Hontani, Y., Verkhusha, V. V., und Kennis, J. T. M., 2015, Ultrafast excited-state dynamics and fluorescence deactivation of near-infrared fluorescent proteins engineered from bacteriophytochromes: *Scientific Reports*, v. 5.

## 11 Anhang



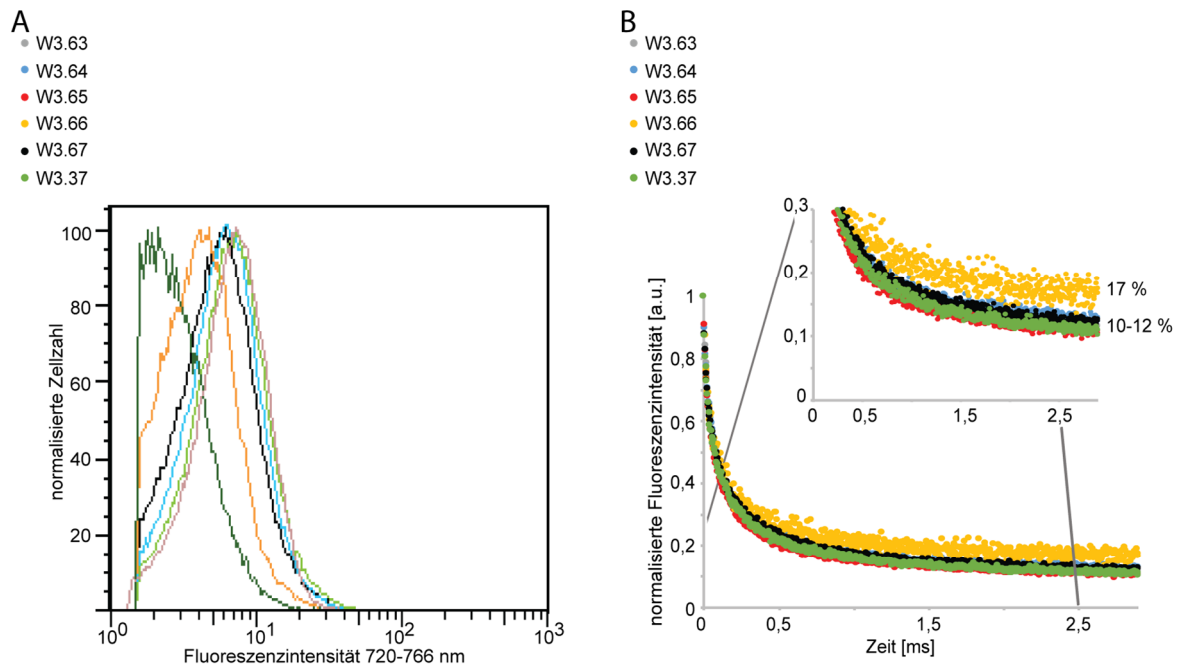
**Abbildung 11-1: W4.35-Vimentinfusionsprotein-exprimierende lebende HeLa-Zellen ohne BV-Zugabe**

Die W4.35-Vimentinfusionsproteinstrukturen innerhalb der HeLa-Zellen sind auch unter endogenen BV-Konzentrationen deutlich zu visualisieren. Die Aufnahme wurde an dem in Absatz 5.4.2 beschriebenen NIR-Aufbau mit einer Anregung bei 667/10 nm und einer Detektion bei 732/68 aufgenommen. Der Größenstandard entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Zellbehandlung		[% von Gesamtanzahl]	Anzahl
<b>Negativkontrolle</b>	Zellen		8486
	lebend	0,29	25
	tot	99,71	8461
<b>Positivkontrolle</b>	Zellen		6820
	lebend	98,43	6713
	tot	1,57	107
<b>24 Std. 1.5 % DMSO</b>	Zellen		7548
	lebend	95,95	7242
	tot	4,05	306
<b>24 Std. 125 <math>\mu\text{M}</math> BV</b>	Zellen		7836
	lebend	97,51	7641
	tot	2,49	195
<b>48 Std. 1.5% DMSO</b>	Zellen		7282
	lebend	96,98	7062
	tot	3,02	220
<b>48 Std. 125 <math>\mu\text{M}</math> BV</b>	Zellen		7834
	lebend	98,67	7730
	tot	1,33	104

**Tabelle 11-1: Zusammenfassung Zellverträglichkeit von BV und DMSO.**

Die Daten basieren auf der FACS-Analyse von jeweils über 6000 HEK-Zellen, nach unterschiedlicher Behandlung mit in DMSO gelöstem BV (siehe Absatz 5.2.3) und reinem DMSO. Die jeweiligen Zellproben wurden in 6-well-Platten ausgesät und nach 24-stündigem Hochwachsen für 24 beziehungsweise 48 Stunden mit 125  $\mu\text{M}$  BV beziehungsweise 1,5 % DMSO behandelt. Die getesteten Konzentrationen sind demnach fünfmal so hoch wie die in der Mikroskopie eingesetzten Konzentrationen. Nach der jeweiligen Inkubation mit DMSO beziehungsweise BV wurden die Proben mittels PI (Endkonzentration 30  $\mu\text{M}$ ) und Cell tracker green CMFDA (Endkonzentration 1  $\mu\text{M}$ , Thermo Fisher Scientific, MA, USA) gefärbt und darauffolgend mittels FACS sortiert. Die Proben wurden mit 488 nm beziehungsweise 560 nm angeregt. Als Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle dienten unbehandelte beziehungsweise mit Ethanol fixierte Zellen.



C

WiPhy-Variante	Mutationen verglichen zu W3	Schalt-hintergrund [%]	$t_{1/2}$ AUS [ $\mu$ s]	Helligkeit gemessen in <i>E. coli</i> - Zellen Det. 720-766 nm [% W.3.37]
W3.37	E25Q/V115A	11	56	100 $\pm$ 11
W3.63	E25Q/V115A/V296K	11	55	7 $\pm$ 4
W3.64	E25Q/V115A/V296T	13	60	5 $\pm$ 4
W3.65	E25Q/V115A/V296F	12	45	7 $\pm$ 4
W3.66	E25Q/V115A/V296G	17	50	3 $\pm$ 6
W3.67	E25Q/V115A/V296N	12	55	7 $\pm$ 19

**Abbildung 11-2: Zusammenfassung der Eigenschaften der generierten Varianten mit variabler Position 296.**

A: Helligkeitsverteilung der Varianten gemessen in *E. Coli*-Zellen durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Detektionsfenster von 720-766 nm, siehe Absatz 5.3.7.2). B: Ausschaltkurven der Varianten W3.63, W3.64, W3.65, W3.66 und W3.67 im Vergleich zu W3.37. Diese wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattierten, das jeweilige RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Zu sehen sind die Ausschaltkinetiken, welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) für 3 ms aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Die Kinetiken wurden auf das Maximum normiert. Jeder Messpunkt basiert auf mindestens vier unabhängigen Messungen. C: Zusammenfassung der Eigenschaften der Varianten W3.63, W3.64, W3.65, W3.66 und W3.67 im Vergleich zu W3.37. Der Schalthintergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik ( $t_{1/2}$  AUS) wurden anhand der in B dargestellten Kinetiken, wie in Absatz 5.3.7.3 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

	Mutationen verglichen zu DrPAS-GAF-PHY	Schalthergrund [%]	t <sub>1/2 AUS</sub> [µs]
W1	PAS-GAF-PHY komplett 530 AS	26	108
W1.2	W1 E25Q	33	83
W1.1	W1 E25Q/V115A	28	127
W2	PAS-GAF-PHY ohne 19 AS C-terminal 511 AS	51	138
W2.5	W2 E25Q	43	118
W2.4	W2 E25Q/V115A	42	90
W3	PAS-GAF 331 AS	17	71
W3.12	W3 E25Q	12	78
W3.37	W3 E25Q/V115A	11	65
W4	PAS-GAF ohne 10 AS C-terminal 321 AS	19	80
W4.38	W4 E25Q	13	68
W4.39	W4 E25Q/V115A	12	73

**Tabelle 11-2: Zusammenstellung des Einflusses der Mutationen E25Q/V115A auf die Varianten W1-W4.**

Die Daten wurden am automatisierten Mikroskop in auf Agarplatten ausplattieren, das jeweilige RSFP zytosolisch exprimierenden *E. coli*-Zellen aufgenommen. Sie wurden anhand von Ausschaltkinetiken ermittelt, welche bei Bestrahlung mit Licht von 671 nm (ungefähr 60 kW/cm<sup>2</sup>) für 3 ms aufgenommen wurden. Vorab wurden die Proteine angeschaltet (30 ms 785 nm, ungefähr 40 kW/cm<sup>2</sup>). Jeder Wert basiert auf mindestens vier unabhängigen Messungen. Der Schalthergrund und die Halbwertszeit der Ausschaltkinetik (t<sub>1/2 AUS</sub>) wurden, wie in Absatz 5.3.7.3 und Absatz 5.3.7.5 beschrieben, bestimmt.

Amplifikat	Primernummer	Sequenz (5' zu 3')
Caveolin 1	4571	TCCGCTAGCATGTCTGGGGGCAAT
	4572	CCGGTGGATCCCAGGGCCGCGGTATTTCTTTCTGCAAGTTGATG
W-Varianten	6185	TACGTCGACGATGTCCTGACCCCT
	6452	TCCCCGGGCGCCACCATGTCCCGTGACCCTCTCCCCT
	7127	ATCCGCTAGCGCTAATGTCCCCTGACCCTCTC
	7130	TCCCCGGGCGCCACCATGTCCCGTGACCCTCTCCCCTTCTT
	7133	CGCCCCGGGCGCCACCATGTCCCGTGACCCTCTC
	7138	TCCGCTAGCGCTACCGGTCCGCCACCATGTCCCGTGACCCTCT
W1-Varianten	6361	TACGAATTCTCACACAAAGCCGTATTGTCGCC
W2-Varianten	6195	ATTAGAATTCTCATCGTATCACGGACAATCTCTC
W3-Varianten	5540	AGCTGTGCGGCCGCTCAACTCTGGCGAAAGGCGGCAAC
	6003	TCAGCGGCCGCTCAACTCTGGCGAAAGGCGGCAA
	6196	ATTAGAATTCTCAACTCTGGCGAAAGGCGGCAAC
	6363	TCAGAATTCTCAACTCTGGCGAAAGGCGGCAA
	7129	CACTCGAGATCTGAGTCCGGAACCTGGCGAAAGGCGG
	7132	GTGCGGCCGCACTCTGGCGAAAGGCGGCA
W4-Varianten	5541	AGCTGTGCGGCCGCTCATTCTTTGACTTGCACCTGTTT
	6197	ATTAGAATTCTCATTCTTTGACTTGCACCTGTTT
	6364	TCAGAATTCTCATTCTTTGACTTGCACCTGTT
	7128	CACTCGAGATCTGAGTCCGATTCTTTGACTTGCACCTGT
	7131	GTGCGGCCGCTTCTTTGACTTGCACCTGT
mCherry	916	CTGCAGGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	917	TTCTGCGGCCGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGCCGGT
mIFP	6385	TCGCGGCCGCTCATTGGACTGAGACTGTGCAAAG
	7968	TCCACCGGTCGCCACCATGTCCGGTACCGCTGACTACC
mCardinal	2244	TCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
	5534	GTGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCATTAA
pBad	3744	CAGCCAAGCTTCGAATTTCTTA
pSCA3	5925	TGATTGGATCCCAGGCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCAT
		GTCCCGTGACCCTCTCCCCTTCTTC

**Tabelle 11-3: Liste der verwendeten Oligonukleotide.**

Amplifikat	Primernummer Position	+	Sequenz (5' zu 3')
SD Varianten	W- 5619 Pos.176		GATCGTGTAATGCTGNNNAAGTTGCGACCCGAT
	5620 Pos. 176		ATCGGGTGCGAACTTNNNCAGCATTACACGATC
	5623 Pos. 122		CGGGTTGGTGAGCTCNNNATCCTGGAGTTTGAG
	5624 Pos. 122		CTCAAACCTCAGGATNNNGAGCTCACCACCCG
	5627 Pos. 317		CTGTCCGAACAGGTGNNNGTCAAAGAAGCCGCG
	5628 Pos. 317		CGCGGCTTCTTTGACNNNCACCTGTTGCGACAG
	6120 Pos. 25		CGACTGAGAAGTGCNNNAGGGAACCCATCCA
	6121 Pos. 25		TGGATGGGTTCCCTNNNGCAGTTCTCAGTCG
	6122 Pos. 27		AGAACTGCGAGAGNNNCCATCCACATTCC
	6123 Pos. 27		GGAATGTGGATGGGNNNCCTCTCGCAGTTCT
	6124 Pos. 25+27		CGACTGAGAAGTGCNNNAGGNNNCCATCCACATTCC
	6125 Pos. 25+27		GGAATGTGGATGGGNNNCCTNNNGCAGTTCTCAGTCG
	6126 Pos. 35		ACATTCGGGAAGCNNNCAGCCTCATGGGGC
	6127 Pos. 35		GCCCCATGAGGCTGNNNGCTTCCCGGAATGT
	6128 Pos. 36		TTCCGGGAAGCATANNNCCTCATGGGGCACT
	6129 Pos. 36		AGTGCCCATGAGNNNTATGCTTCCCGGAA
	6130 Pos. 37		CGGGAAGCATACAGNNNCATGGGGCACTCCT
	6131 Pos. 37		AGGAGTGCCCATGNNNCTGTATGCTTCCCG
	6132 Pos. 35+36+37		CCCATCCACATTCCGGGAAGCNNNNNNNNNCATGGGGCACTCCTGACTGCCGAT
	6133 Pos. 35+36+37		ATCGGCAGTCAGGAGTGCCCATGNNNNNNNNNGCTTCCCGGAATGTGGATGGG
	6134 Pos. 208		TTCCGGCTTCTGACNNNCCCGCACAGCTAG
	6135 Pos. 208		CTAGCTTGTGCGGGNNNGTCAGAAGCCGGAA
	6136 Pos. 209		CGGCTTCTGACATTNNNGCACAAAGCTAGGGC
	6137 Pos. 209		GCCCTAGCTTGTGNNNAATGTCAGAAGCCG
	6138 Pos. 207+208+209		CTGGGGCATAGGTTCCCGCTTCTNNNNNNNNNGCACAAAGCTAGGGCCCTCTATACT
	6139 Pos. 207+208+209		AGTATAGAGGGCCCTAGCTTGTGNNNNNNNNNAGAAGCCGGAAACCTATGCCCCAG
	6140 Pos. 216		AAGCTAGGGCCCTCNNNACTCGCCATCTGCT
	6141 Pos. 216		AGCAGATGGCGAGTNNNGAGGGCCCTAGCTT
	6142 Pos. 254		GAGGGGCTGTGCTGNNNGCCACTAGCCCAT
	6143 Pos. 254		ATGGGGCTAGTGGCNNNCAGCACAGCCCTC
	6144 Pos. 260		CCACTAGCCCATGNNNATGCAGTACCTCCG
	6145 Pos. 260		CGGAGGTAAGTGCATNNNCATGGGGCTAGTGG
	6146 Pos. 290		TGATTGCCTGTACNNNCAGACACCTTACGT
	6147 Pos. 290		ACGTAAGGTGTCTGNNNGTACAGGCAATCA
	6473 Pos. 259		CTGCGGCCACTAGCCCTGCCACATGCAGTACCTCCGG
	6474 Pos. 259		CCGGAGGTAAGTGCATGTGGCAGGGGCTAGTGGCGCGCAG
	6475 Pos. 257		GCTGTGCTGCGGCCACTTGCCCATGCACATGCAGTAC
	6476 Pos. 257		GTAAGTGCATGTGCATGGGGCAAGTGGCGCGCAGCACAGC
	6477 Pos. 257+259		GGGGCTGTGCTGCGGCCACTTGCCCTGCCACATGCAGTACCTCCGG
	6478 Pos. 257+259		CCGGAGGTAAGTGCATGTGGCAGGGGCAAGTGGCGCGCAGCACAGCCCC
	6479 Pos. 25		ACGACTGAGAAGTCAAAGAGGGAACCCATCCACATT
	6480 Pos. 25		AATGTGGATGGGTTCCCTCTTGCAGTTCTCAGTCGT
	6776 Pos. 115		GGGCATCTCAGTCTGACTGTGNNNCGGGTTGGTGAGCTCTTG
	6777 Pos. 115		CAAGAGCTCACCAACCCGNNNGACAGTCAGACTGAGATGCC
	6778 Pos. 114		GGGCATCTCAGTCTGACTTNNNCATCGGGTTGGTGAGCTCTTG
	6779 Pos. 114		CAAGAGCTCACCAACCCGATGNNNAGTCAGACTGAGATGCC
	6781 Pos. 310		ACTCTCAGATATCTGGGNNNGAACTGTCCGAACAGGTG
	6782 Pos. 310		CACCTGTTCCGACAGTTTNNNCCCAGATACTCGAGAGT
	6784 Pos. 296		TCACCACAGACACCTTACNNNCTTCTCTGATCTGAGG
	6785 Pos. 269		CCTCAGATCAGGAGGAAGNNNGTAAGGTGCTGGTGCTGTA
	6786 Pos. 298		CCAGACACCTTACGTGCTTNNNCTGATCTGAGGACAAC
	6787 Pos. 298		AGTTGCTCTCAGATCAGNNNAAGCACGTAAGGTGTCTGG
	6807 Pos. 116		CTCAGTCTGACTGTGNNNCGGGTTGGTGAGCTCTTG
	6808 Pos. 116		CAAGAGCTCACCAACCCGNNNGACAGTCAGACTGAG
	6809 Pos. 73		GTGCTTCAGGGGAGNNNCTGGCGGCCCTCCTGCCT
	6810 Pos. 73		AGGCAGGAGGGCCGCCAGNNNCTGCCCTCGAAGCAC
	6811 Pos. 232		ACAAGAGCCGCGAGCTNNNCTCTGGACCCAGTCTGAAT
	6812 Pos. 232		ATTAGGACTGGGTCCAGAGNNNAGCTGCGGCTCTTGT
	6813 Pos. 232		ACAAGAGCCGCGAGCTATGCCTTGGACCCAGTCTGAAT
	6814 Pos. 232		ATTAGGACTGGGTCCAGAGGCATAGCTGCGGCTCTTGT
	6815 Pos. 158		CTGAGAGCTCTGGCCNNNGTCCGAACCCAGACCGTG
	6816 Pos. 158		CACGGTCTGGGTTGCGACNNNGGCCAGAGCTCTCAG
	6817 Pos. 158		CTGAGAGCTCTGGCCGTGGTCCGAACCCAGACCGTG
	6818 Pos. 158		CACGGTCTGGGTTGCGACCACGGCCAGAGCTCTCAG
	6819 Pos. 275		GGGTCCTCACTGACNNNAGTGTGGTGGTAGGAGGG
	6820 Pos. 275		CCCTCTACCACCACACTNNNGCTCAGTGAGGACCC
	6821 Pos. 275		GGGTCCTCACTGAGCATCAGTGGTGGTAGGAGGG
	6822 Pos. 275		CCCTCTACCACCACACTGATGCTCAGTGAGGACCC
6823 Pos. 218		AGGGCCCTTATACTNNNCATCTGCTGCGGCTTACC	
6824 Pos. 218		GGTAAGCCGCGAGCAGATGNNNAGTATAGAGGCCCT	
6825 Pos. 8		CGTGACCCTCTCCCNNTTCCCTCCCTGTACTTG	
6826 Pos. 8		CAAGTACAGGGGAGGGAANNNGGGGAGAGGGTACCG	
6827 Pos. 270		CGGAATATGGGCGTNNNCTCTCACTGAGCGTAAGT	
6828 Pos. 270		ACTTACGCTCAGTGAGGANNNCAGCCCATATTCCG	
6829 Pos. 270		CGGAATATGGGCGTGGGTCCTCACTGAGCGTAAGT	
6830 Pos. 270		ACTTACGCTCAGTGAGGACCTCACGCCATATTCCG	
6831 Pos. 177		CGTGTAACTGCTGACNNNTTCCACCCGATGCTACA	
6832 Pos. 177		TGTAGCATCGGGTGCGAANNNGTACAGCATTACAGC	
6833 Pos. 305		GATCTGAGGACAACCTNNNAGTATCTGGGGCGTGA	
6834 Pos. 305		TCACGCCCCAGATACTNNNAGTGTCTCTCAGATC	
6835 Pos. 315		CGTGAAGTGTCCGAANNNGTCAAGTCAAAGAAGCC	

	6836 Pos. 315	GGCTTCTTTGACTTGCACNNNTTCGGACAGTTCACG
	6837 Pos. 148	AACGCCATGTCAGCTCTCANNNTTGCACCAAACCTGAGA
	6838 Pos. 148	TCTCAGGTTTGGTGCAGANNNGAGAGCTGACATGGCGTT
	6839 Pos. 224	CATCTGCTGCGGCTTNNNGCTGACACAAGAGCCGCA
	6840 Pos. 224	TGCGGCTCTTGTGTCAGCNNNAAGCCGCAGCAGATG
	6977 Pos. 207	CATAGGTTTCCGGCTTCTCTGATTCCCGCACAAAGC
	6978 Pos. 207	GCTTGTGCGGGAATCAGAGAAGCCGGAACCTATG
	6979 Pos. 207	CATAGGTTTCCGGCTTCTCACATTCCCGCACAAAGC
	6980 Pos. 207	GCTTGTGCGGGAATGTGAGAAGCCGGAACCTATG
	6981 Pos. 298	CAGACACCTTACGTGCTTGAACCTGATCTGAGGACA
	6982 Pos. 298	TGTCCTCAGATCAGGTTCAAGCACGTAAGGTGTCTG
	7155 Pos. 9	GACCCTCTCCCCTTCNNNCCTCCCCTGTACTTGG
	7156 Pos. 9	CCAAGTACAGGGGAGGNNNGAAGGGGAGAGGGTC
	7157 Pos. 9	GACCCTCTCCCCTTCCTGCCTCCCCTGTACTTGG
	7158 Pos. 9	CCAAGTACAGGGGAGGCAGGAAGGGGAGAGGGTC
<b>W-Varianten MMM</b>	5666 Pos. 176	[Phos]CGTGTAATGCTGNNAAGTTCGCACCC
	5667 Pos. 203	[Phos]GTTGGTGAAGCTCANNATCTGGAGTTT
	6346 Pos. 173+175	[Phos]CTGACGGGCTTCGATCGGTANNCTGNNAAG GTTCCGACCCCGATGCTACA
	6347 Pos. 173+175+186	[Phos]GCTTCGATCGGTANNCTGNNAAGTTCGCACCC GATGCTACAGGGGAGNNATCGCTGAAGC
	6348 Pos. 198+201+203+206	[Phos]GGACTGCACGCGNNNTGGGGNNNAGGNNNCCGGC TTCTNNNATTCCCGCACAAGCTAGGGGCCCT
	6349 Pos. 263+267+269	[Phos]ACTAGCCCATGCACATGCAGNNCTCCGGAATNNN GGCNNNGGGTCTCACTGAGCGTA
	6350 Pos. 288+290	[Phos]CAACTGTGGGGCCTGATTNNNTGNNNCACAGACA CCTTACGTGCTT
	6351 Pos. 272+274+258	[Phos]GGTCCNNNTGNNGTAAGTGTGGTGGTAGGAGGGC AACTGTGGGGCANNATTGCCT
	6352 Pos. 254+256+257+259+260	[Phos]CCCCTCGGAGGGGCTGTGCTGNNGCCNNNNNCCC NNNNNTGCAGTACCTC
	6353 Pos. 222+223+224	[Phos]CTGCTGNNNNNNNNGCTGACACAAGAGCCGCAGCTGTGCCTCTG
	6354 Pos. 206+208+209+212+216	[Phos]TTTTCTGGGGCATAGGTTTCCGGCTNNNGACNNNNNGCA CAANNAGGGCCCTCNNNACTC
	6631 Pos. 122	[Phos]CGACTGAGAACTGCNNNAGGGAACCCATCCA
	6632 Pos. 25	[Phos]CGACTGAGAACTGCNNNAGGGAACCCATCCA
	6633 Pos. 25	[Phos]ACGACTGAGAACTGCAAGAGGGAACCCATCCACATT
	6634 Pos. 216	[Phos]AAGCTAGGGCCCTCNNNACTCGCCATCTGCT
	6635 Pos. 216	[Phos]AAGCTAGGGCCCTCTTCACTCGCCATCTGCT
	6635 Pos. 317	[Phos]CTGTCCGAACAGGTGNNGTCAAAGAAGCCGCG
	6636 Pos. 317	[Phos]CTGTCCGAACAGGTGAGCGTCAAAGAAGCCGCG
	6780 Pos. 115+114	[Phos]GGGCATCTCAGTCTGACTNNNNNCGGGTGGTGAGCTCTTG
	6783 Pos. 310	[Phos]ACTCTCGAGTATCTGGGGNNNGAACTGTCCGAACAGGTG
	6788 Pos. 296+298	[Phos]TGTCACCACCAGACACCTTACNNCTTNNNCCTGATCTGAGGACAACCTC
	7537 Pos. 115	[Phos]CAGTCTGACTGCCCATCGGGTTG
	7538 Pos. 25	[Phos]GAGAACTGCCAGAGGGAACCCA

Tabelle 11-4: Liste der verwendeten Mutagenesprimer.

Laser	Leistung [μW]	Intensität [kW/cm <sup>2</sup> ]
660	0,4	0,4
	1,2	1,1
	3,8	3,6
	7,0	6,5
	8,2	7,7
	17,3	16,2
	17,7	16,6
	20,9	19,6
785	Leistung [μW]	Intensität [kW/cm <sup>2</sup> ]
	0,6	0,6
	2,3	2,4
	2,5	2,6
	2,9	3,1
	3,2	3,4
	8,3	8,8

Tabelle 11-5: berechnete Intensitäten am konfokalen Aufbau.

Die Intensitäten wurden anhand der Laserleistung in der Rückapertur des Objektivs, der Wellenlänge, der Fokusgröße und der Auslöschung durch das Objektiv berechnet und sind als Näherungen zu betrachten.



## Lebenslauf

Maria Kamper

### Hochschulstudium

- 11/2012 – 07/2017      Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abteilung für Nanobiophotonik, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien, Dissertation/Gesamtprädikat: magna cum laude, Disputation: summa cum laude  
  
„Gerichtete Evolution und Charakterisierung von Bakteriophytochromen für die tiefrote, hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie.“
- 05/2011 – 12/2011      Masterarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg, AG Heussler (Malaria), Note 1,3  
  
„Visualisierung von Phosphoinositiden während der Leberphase von *Plasmodium berghei* zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation der mitogen-aktivierten Proteinkinase 1“
- 10/2009 – 12/2011      Master-Studiengang Biologie  
TU Dresden
- 04/2009 - 07/2009      Bachelorarbeit am Zoologischen Institut der Universität zu Köln, AG Elert (Aquatische, chemische Ökologie), Note 1,1  
  
„Zur Rolle der Glutathion-S-Transferase bei der Microcystintoleranz von *Daphnia magna*“
- 10/2006 - 07/2009      Bachelor-Studiengang Biologie  
Universität zu Köln

### Schulbildung

- 06/2006      Allgemeine Hochschulreife, Erasmus-Gymnasium, Grevenbroich  
Note 1,7

## Konferenzbeiträge

### **International Symposium 2016: Biological Dynamics from Microscopic to Mesoscopic Scales (2016)**

Poster:

Maria Kamper, Stefan Jakobs, Simone Techert

*Structure-dynamics-function in photo-switchable proteins for RESOLFT nanoscopy.*

### **Janelia Conference: Fluorescent Proteins and Biological Sensors IV (2014)**

Poster:

Kemper, M., Lavoie-Cardinal, F., Jensen, N. A., Testa, I., Andresen, M., Grotjohann, T., Brakemann, T.1, Hell, S. W. and Jakobs, S.

*Red Photoswitchable fluorescent proteins.*

## Danksagung

Danke!

Zuallererst, vielen Dank an Prof. Dr. Stefan Hell und Prof. Dr. Stefan Jakobs, für die Möglichkeit an diesen spannenden Projekten zu arbeiten, ihr Interesse und ihre Unterstützung sowie die hervorragenden Forschungsbedingungen.

Prof. Dr. Stefan Jakobs gilt hierbei mein besonderer Dank für seine engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit und seine stetige Bereitschaft zur Unterstützung!

Prof. Dr. Kai Tittmann für die fortwährende unterstützende Begutachtung dieser Arbeit. Ebenso Dr. Till Ischebeck insbesondere für seine spontane und hilfsbereite Übernahme des Amtes des Zweitbetreuers sowie seine Begutachtung und Unterstützung.

Prof. Dr. Helmut Grubmüller, Prof. Dr. Stefan Hell, Prof. Dr. Michael Müller und PD Dr. Thomas Teichmann danke ich herzlich für die Bereitschaft Mitglieder meiner erweiterten Prüfungskommission zu sein.

Dr. Marcel Leutenegger für die hervorragende Anleitung und Unterstützung von physikalischer Seite. Ich durfte und konnte viel lernen.

Dr. Haisen Ta, für die großartige Zusammenarbeit im STED-Projekt und die gute Zeit und den Sprachkurs.

Dr. Nickels Jensen und Dr. Martin Andresen für ihre allzeitbereite Unterstützung, hilfreiche Diskussionen und Motivation die Kiste zuzumachen! Das gilt auch für die lieben ehemaligen Doktoren der RSFPLer Tanja und Tim!

Danke an Sylvia, Ellen, Tanja, Rita, Steffi, Sarah und Jay für eure tolle Unterstützung.

Liebe (Teil)Korrekturleser: Sylvia, Tanja B., Nickels, Martin, Peter, MC, Tim, Andi und Annika (besonders fürs Schöne) danke, danke, danke!!

Liebe RSFPLer und Mitos und alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Abteilung für Nanobiophotonik – danke für die super Arbeitsatmosphäre!

Ohne euch wären nicht alle Tage so sonnig gewesen. Danke für gute Laune, schöne Pausen, Flurumarmungen, Feierabendbiere und sämtliche Aktivitäten in und um Gö: .....Nickels, Peter, Daniel, Tanja und nochmal Tanja, Sven, Steffi, Sylvia, Martin, Jennifer, Philipp, MC, Haisen, Lena, Timo, Tim + Flavie.....

Und zu guter Letzt allen meinen Freunden außerhalb von Göttingen, die so manch Treulosigkeit erdulden mussten...nun bin ich wieder die Alte!

Tim, Annika, Mama, Papa + ANDI! Danke –das hier aufzuzählen macht nun wirklich keinen Sinn!