

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Physik
der Freien Universität Berlin

Fluoreszierende Membranspannungssensoren zur
Quantifizierung des Membranpotentials der Cytochrom-c-
Oxidase und der Analyse von essenziellen Aminosäuren zum
Aufbau des Membranpotentials

Vorgelegt von

Jens Balke

Berlin 2024

Mentorin: Frau Prof. Dr. Ulrike Alexiev

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Joachim Heberle

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Holger Dau

Tag der Disputation: 27.02.2025

Selbstständigkeitserklärung

Name: Balke

Vorname: Jens

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Berlin, 06.03.2025

Jens Balke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Motivation	1
1.2 Zielsetzung und Lösungsansatz	3
2. Grundlagen.....	6
2.1 Zelluläre Atmungskette und Cytochrom-c-Oxidase	6
2.2 Genetisch veränderte fluoreszierende Spannungssensorproteine	9
2.3 Bacteriorhodopsin	13
2.4 Physikalische Grundlagen	13
2.4.1 Absorption.....	13
2.4.2 Fluoreszenz.....	14
2.4.3 Fluoreszenzlöschung	16
2.4.4 Förster Resonanz Energie Transfer	18
3. Material und Methoden	22
3.1 Cytochrom-c-Oxidase Varianten	22
3.2 Arch3 Varianten.....	23
3.3 Bacteriorhodopsin	24
3.4 Fluorophore	24
3.4.1 Iodacetamidofluorescein	25
3.4.2 Fluorescein Isothiocyanat	26
3.4.3 Atto 647N Maleimid	26
3.4.4 Atto 565 Maleimid.....	27
3.4.5 Indocarbocyanin3- Polyethylenglycol-biotin	27
3.5 Proteoliposome	28
3.6 Fluoreszierende DNS-Referenzprobe	30
3.7 Präparation und Markierung von Cytochrom-c-Oxidase	30
3.8 Präparation und Markierung von Arch3 Varianten.....	32
3.9 Absorption und Fluoreszenz Spektroskopie.....	32
3.10 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie.....	33
3.11 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie und Mikroskopie.....	35
3.12 Totale interne Reflektionsmikroskopie mit Einzelmolekül Fluoreszenz	37
3.13 Messung zur zeitabhängige Spannungsänderung in Proteoliposomen	40
3.14 Fluoreszierende pH Indikatoren	40

4.	Ergebnisse und Diskussion I: Arch3-Varianten als fluoreszierende Spannungssensoren zur Untersuchung des Membranpotentials	42
4.1	Spektroskopische Charakterisierung von Arch3 Varianten in vitro	42
4.1.1	Stationäre spektroskopische Untersuchungen	42
4.1.2	Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie.....	45
4.1.3	Spektroskopische Charakterisierung von Archon1	46
4.2	Spektroskopische Charakterisierung von Archon-Varianten in <i>E. coli</i> Zellen	50
4.3	Charakterisierung von oberflächenaktivierten Mikroskopie Gläser	57
4.4	Etablierung des Einzelproteoliposomen Assays mit Archon1	58
4.4.1	Mikroskopische Untersuchung der Proteoliposome mit Archon1	63
4.4.2	Fluoreszenz Lebenszeit Untersuchung der Proteoliposome	64
4.5	Mechanismus der Kopplung der Membranspannung und dem Fluoreszenzsignal in Retinal Proteinen.....	67
4.6	Zusammenfassung und Diskussion.....	68
5.	Ergebnisse und Diskussion II: Untersuchung der Integration von Cytochrom-c-Oxidase in den Einzelmolekül Assays.....	74
5.1	Untersuchung der Ausrichtung der Cytochrom-c-Oxidase in Proteoliposomen	74
5.2	Untersuchung der liposomalen Konzentration von Cytochrom-c-Oxidase	80
5.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	85
6.	Resultate und Diskussion III: Entwicklung eines Einzelliposomen-Assays zur Messung der Membranspannung von CcO-haltigen Proteoliposomen	88
6.1	Kontrollexperimente zur Bestimmung der Verwendung des vollständigen Membranpotentials Assays	89
6.2	Untersuchung des Protonpumpverhalten von CcO mittels Cytochrom-c im Membranspannung sensitiven liposomalen Assay	91
6.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	94
7.	Resultate und Diskussion IV: Etablierung eines neuen Flashlaser-Aufbaus.....	96
7.1	Überarbeitung des FLASH-Aufbaus und Kalibrierungsmessungen mit bR.....	96
7.2	CcO Elektron-Transfer Messungen im Transient Absorptions Aufbau	98
7.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	99
8.	Resultate und Diskussion V: Anwendung des Proteoliposom-Assays zur Untersuchung des Protonentransfers	100
8.1	Untersuchung des Pumpverhaltens von Mutationen auf den N- und P-Seiten.....	100
8.2	Das Pumpverhalten von Cytochrom-c-Oxidase in Gegenwart eines Inhibitors.....	103
8.3	Zusammenfassung und Diskussion.....	105
9.	Zusammenfassung und Ausblick.....	108

10.	Referenzen	112
11.	Appendix.....	118

Abbreviationen:

Absorptionskoeffizient	ϵ
Adenosindiphosphat	ADP
Adenosintriphosphat	ATP
Akustooptischen Modulator	AOM
Amplitudenumwandler	TAC
Analog zu Digital Umwandler	ADC
Archaerhodopsin-3	Arch3
Asparagin	N
Aspartat	D
Bacteriorhodopsin	bR
Binukleare Zentrum	BNC
Cystein	C
Cystein Oberflächen frei Variante	CS
Cytochrom-c	Cyt-c
Cytochrom-c-Oxidase	CcO
Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin	DMPC
Dithiothreitol	DTT
Dodecyldimethylaminoxid	LDAO
Flavin-Adenin-Dinukleotid	FADH ₂
5-Iodacetamidofluorescein	IAF
Fluorescein Isothiocyanat	FITC
Fluoreszente Quantenausbeute	FQA
Fluoreszenzlebenszeit	τ
Fluoreszierende Spannungssensoren	GEVI
(Einzelmolekül) Förster Resonanz Energie Transfer	(sm)FRET
Halbwertsbreite	FWHM
Indocarbocyanin	Cy3
Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie	TIRFM
Iodacetamidofluorescein	IAF
Kaliumphosphatbuffer	KPP
Konstanter Fraktions-Diskriminator	CFD
Konstanter Wellenlängen Modus	CW-Modus
Kupfer-Ion	Cu
Membranpotential	$\Delta\Psi$
n-Decyl-beta-maltoside	β -DM
Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat	NADPH ₂
Optisch parametrischer Oszillator	OPO
Polyethylenglycol	PEG
Protonen	H ⁺
Protonen induzierte Membranspannungsaufbaukraft	pmf
Sichtfeld (Engl.: Field of View)	FOV
Signal zu Rausch Verhältnis (Engl.: Signal to Noise Ratio)	SNR
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris
Übergangsraten	k
Wildtyp	WT
Zeit korrelierten Einzelphotonenzählung	TCSPC
Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie	FLASH
Zeitaufgelöste Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie	FLIM

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird ein proteoliposomaler membran Spannungssensitiver Assay mittels biophysikalischer Methoden entwickelt, charakterisiert und angewendet. Dieser Assay ermöglicht die direkte Untersuchung der Membranpotentialentwicklung von membranständigen Ionenpumpen, wie der Cytochrom-c-Oxidase. Dazu wurden einige Fluoreszenzaufbauten neu konzipiert, um diese Methoden anwenden zu können. Zur molekularen Charakterisierung des Assays wurde ein geeigneter membranständiger Spannungssensor identifiziert, hier Varianten von Archærhodopsin-3 aus *Archæbakterien*. Der Mechanismus, der die Abhängigkeit der Spannungssensitivität und der Fluoreszenzänderung bewirkt, wurde mittels Absorption- und Fluoreszenztechniken untersucht. Nach Auswahl einer geeigneten Variante, Archon 1, wurde dieses Protein in Bakterien und Proteoliposomen mittels (zeitaufgelöster) Fluoreszenztechniken weiterführend charakterisiert. Anschließend wurde sein Einbau und seine Funktionsweise mittels Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie und totaler interner Reflektion Fluoreszenzmikroskopie (TIRF) im proteoliposomalen Assay untersucht, und der Mechanismus der Signalweiterleitung anhand von zwei Punktmutationen weiter untersucht. Dabei konnte der Mechanismus als statisches Quenching identifiziert werden, wahrscheinlich bedingt durch benachbarte Tryptophane. Als zu untersuchendes spannungsgenerierendes System diente die Cytochrom-c-Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*. Vor der Verwendung im liposomalen Assay wurde der Einbau in Liposomen analysiert und charakterisiert. Hierzu wurde ein alternierendes Laseranregungssystem aufgebaut, um Einzelmolekül-FRET zu etablieren. Basierend auf diesen Untersuchungen konnte der Assay genutzt werden, um den Aufbau der Membranspannung durch den Protonentransport der Cytochrom-c-Oxidase zu untersuchen. Die initiale Aufnahme eines Elektrons von Cytochrom-c und der Elektronenweiterleitung an das aktive Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase wurde mittels zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie untersucht. Hierfür wurde der Spektroskopie-Aufbau durch ein neues Anregungssystem und einer Erweiterung der Software verbessert, um das schwache Elektronensignal am Häm a der Cytochrom-c-Oxidase zu registrieren.

Der Assay wird auf Varianten der Cytochrom-c-Oxidase angewendet, um mögliche Einwirkungen auf Protonenaufnahme und -abgabe zu untersuchen. Die Mutationsstellen dieser Varianten befinden sich an der Oberfläche der Cytochrom-c-Oxidase. Die Untersuchung von einigen Varianten zeigen ein verändertes Membranpotential im Vergleich zum Wildtyp. Ebenso wird die direkte Interaktion von Doxorubicin, einem Krebsmedikament das auch Veränderungen in der zellulären Atmungskette hervorruft, mit Cytochrom-c-Oxidase zum ersten Mal identifiziert. Ich konnte hierbei die Veränderung der generierten Membranspannung bedingt durch Mutationen und Inhibitor zeigen und mögliche zugrunde liegende Mechanismen der Funktionalität aufzeigen.

Abstract

In this work, a proteoliposome membrane voltage-sensitive assay is developed using biophysical methods. This assay aims to directly enable the investigation of membrane potential development of membrane-bound ion pumps, such as cytochrome *c* oxidase. As part of this thesis, several fluorescence setups had to be reconceptualized to facilitate the application of these methods. To first understand the functionality of the assay at the molecular level, a suitable membrane-bound voltage sensor was identified. The voltage sensor used, protein variants derived from Archaeorhodopsin-3, and its physical coupling of the voltage-sensitive protein group and its fluorescence group were examined. After selecting a suitable mutant, Archon 1, this protein was investigated and characterized in bacteria and proteoliposomes using temporally resolved fluorescence techniques. Subsequently, its integration and functionality were examined in the proteoliposome assay using fluorescence lifetime microscopy and total internal reflection fluorescence microscopy, and the mechanism of signal transduction was further investigated using point mutations. In this context, I was able to identify the mechanism as static quenching most likely due to neighboring tryptophans. Based on the characterization, the assay could be used to investigate cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. Prior to its use in the liposomal assay, its incorporation behavior into liposomes was investigated and characterized. For this purpose, an alternating laser excitation system was set up to enable single-molecule FRET to analyze the protein's incorporation behavior. Based on these determinations, I was able to utilize the assay to investigate the establishment of membrane voltage generation through the active proton transport of cytochrome *c* oxidase. This was accompanied by measurements of electron uptake and transmission to the active center of cytochrome *c* oxidase. In this process, the FLASH setup was improved by a new excitation system and software to register the weak electron-induced absorption change of heme *a* of cytochrome *c* oxidase.

The assay is applied to mutants of cytochrome *c* oxidase to investigate potential effects on proton uptake and release. Additionally, the evaluation of surface mutants reveals a significant impact on the generation of required membrane potential. Furthermore, the interaction of cytochrome *c* with an inhibitor is identified. In this context, I was able to demonstrate the alteration of generated membrane potential due to mutations and inhibitor and elucidate potential underlying mechanisms.

1. Einleitung

1.1 Motivation

Jede Form des Lebens benötigt für seinen Erhalt und (Weiter-)Entwicklung eine Energiequelle. Die Energiegewinnung erfolgt bei allen Organismen durch eine Umwandlung von Energie aus einer primären Energiequelle (wie z.B. Sonnenenergie oder Nahrung) in ihre jeweilig nutzbaren und speicherbaren Energieformen. Hierbei nutzen Zellen vorwiegend energiereiche phosphorylierte Verbindungen wie Adenosintriphosphat (ATP) und Nicotinsäureamidadenin-dinucleotidphosphat (NADPH₂) als speicherbare Energieformen. Die gespeicherte Energie wird dann für energieverbrauchende Stoffwechselprozesse und weitere Reaktionen in der Zelle durch Dephosphorylierung zur Verfügung gestellt (Fritsche 2015).

Um eine kontrollierte Produktion dieser energiereichen Verbindungen zu gewährleisten, verwendet die Zelle ihre Lipidmembranen und darin eingebaute Proteine zur Umwandlung und Speicherung der Energie aus ihrer bevorzugten Primärquelle. Eine biologische Membran kann vereinfacht, als Kondensator betrachtet werden, der zwei wässrige Phasen mit hoher Dielektrizitätskonstante (z.B. Cytoplasma und Extracytoplasma) mittels einer lipophilen (hydrophoben) Phase mit niedriger Dielektrizitätskonstante voneinander trennt. Durch die Trennung der wässrigen Phasen können unterschiedlich hohe Elektrolytkonzentrationen auf beiden Seiten der Membran generiert werden. Dadurch entsteht eine Potentialdifferenz zwischen den wässrigen Phasen. Die unterschiedlichen Elektrolytkonzentrationen in den beiden wässrigen Phasen werden durch spezielle Membranproteine erzeugt, die einen kontrollierten Fluss von Ionen durch die Membran erlauben. Einige Proteine transportieren Ionen gegen den Ionengradienten und vergrößern damit das Membranpotential. Dieser aktive Transport entgegen den elektrochemischen Gradienten benötigt Energie.

Abhängig von ihrem Lebensraum und ihrer Fähigkeit zur Aufnahme von Rohstoffen, kann die Zelle aus unterschiedlichen primären Quellen ihre benötigte Energie beziehen. Die Archaeobakterien nutzen als einfache primäre Quelle die Sonnenenergie, um mittels ihres Proteins Bacteriorhodopsin einen Protonengradienten über die Membran zu erzeugen. Komplexere Organismen wie Pflanzen und Tiere benötigen eine primäre Energie, die auch die inneren Gewebsstrukturen erreicht. Aus energiereichen Nährstoffen kann mittels Glykolyse, Citratzyklus und Fettsäure-Oxidation die benötigte Energie zu diesen Zellen transportiert werden. Bei der chemischen Umwandlung entstehen Reduktionsmittel wie zum Beispiel Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH₂). Diese werden von Proteinkomplexen in der sogenannten Atmungskette genutzt, um ein elektrostatisches und konzentrationsabhängiges Potential über der Membran aufzubauen. Mittels der membranständigen ATP-Synthase wird die Energie aus dem Membranpotential genutzt, um ATP zu produzieren. Die Kopplung aus Elektronen- und Protonentransport zur Erzeugung von energiereichen chemischen Verbindungen wurde bereits von Mitchell (Mitchell 1961) als Teil seiner chemiosmotischen Theorie postuliert und in zahlreichen Studien seitdem untersucht und weiterentwickelt. In höheren Organismen sind die Proteinkomplexe der Atmungskette in den Mitochondrienmembranen lokalisiert und formen Superkomplexe, die in dieser Form eine erhöhte Stabilität und verbesserte Kinetik aufweisen (Genova and Lenaz 2014).

Das Membranprotein Cytochrom-c-Oxidase (CcO) in seiner Funktion als redox-getriebene Protonenpumpe ist als Komplex IV ein wichtiger Teil der Atmungskette in den Mitochondrien (Wikstrom 1977). Durch das Protein Cytochrom-c (Cyt-c) wird ein Elektron von Komplex III an die CcO übergeben. Aufgrund der hohen Homologie von Cyt-c kann eukaryotisches Cyt-c diverse bakterielle und eukaryotische CcO aktivieren (Berg 2018). Dies deutet ebenfalls an, dass fundamentale Strukturen der Atmungskette sich evolutionär nicht verändert haben. Das abgegebene Elektron bewegt sich vom Kupferatom im Cyt-c entlang eines CcO Kupferatoms zum katalytischen Zentrum der CcO. Die Elektronen werden verwendet, um Wasser durch die Reaktion mit Sauerstoff und Protonen zu erzeugen. Die dabei freie Energie des Vorgangs wird genutzt, um weitere Protonen entgegen dem aufgebauten Membranpotential aktiv zu transportieren (siehe Abbildung 2.1).

Veränderungen in den Proteinen, die zur Energiegewinnung benötigt werden oder zu Änderungen der Struktur der Mitochondrienmembran führen, können einen schwerwiegenden Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette haben. Kleine Veränderungen an den Genen der CcO können die Energiegewinnung der Zelle reduzieren und sind Teil von schwerwiegenden Krankheitsbildern (Wedatilake 2013, Vogt 2018). Einige dieser Defekte deuten auf eine unzureichende Protonenaufnahme oder –abgabe durch CcO hin. Dadurch wird der Aufbau des elektrochemischen Gradienten reduziert oder durch einen Protonenrückfluss sogar abgebaut und führt somit zu einer messbaren reduzierten Aktivität (Fornuskova 2010, Brischigliaro 2021). Hierbei sind jedoch Mutationen an oder in der Nähe der katalytischen Zentren als Grundlage von Krankheiten sehr selten, da diese schon in embryonalen Entwicklungsstadien zum Zelltod führen (Brischigliaro 2021). Aber auch einige Medikamente zeigen eine dosisabhängige Interaktion mit der gesamten Atmungskette. Zum Beispiel kann das chemotherapeutische Medikament Doxorubicin durch Interaktion mit CcO im Herzen eine Kardiomyopathie auslösen (Wang 2018). Die Regulation der CcO Expression spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Bekämpfung solcher Krebsarten, die eine erhöhte Glykolyse (Warburg Effekt) oder eine erhöhte CcO Aktivität (inverser Warburg Effekt) aufweisen. Durch diese Effekte erreicht die betroffene Zelle eine erhöhte ATP-Produktion (Whitaker-Menezes 2011), die die gesamte Ausbreitung der Krebszellen im Organismus beschleunigen.

In den letzten Jahren wurden verschiedenste Untersuchungen an der CcO vorgenommen, um noch besser die Protonenaufnahme und –abgabe durch das Enzym zu verstehen. CcO wurde ebenfalls in verschiedenen Einzelliposomen-Assays (Li 2015, Beales 2017, Hugentobler 2020) verwendet, um eine nativnahe Membrenumgebung zu erzeugen und mögliche Heterogenität in der Funktion der CcO zu untersuchen, wie zum Beispiel den Protonenrückfluss. Ebenso wurde ein neues Mutagenese- und Expressionssystem für CcO entwickelt (Wolf 2020), welches unter anderem erlaubt, Einzel-Cystein-Varianten für ortsspezifische Markierung zu erzeugen. Diese Varianten wurden dann verwendet, um elektrostatische und Proteindynamik-Effekte auf den Protonentransport zu untersuchen (Wolf 2020). Hierbei wurden ortsspezifisch an das Protein gebundene optische Reportergruppen verwendet, die eine örtliche Auflösung mit „Aminosäure-Genauigkeit“ erlauben. Bis heute bleiben die genauen Transferwege und der Mechanismus der Elektron-Proton-Interaktion und die Korrelation von chemischen und gepumpten Protonen ungeklärt (Brischigliaro 2021).

Im Rahmen dieser Dissertation werden folgende Experimente, Ergebnisse und Interpretationen vorgestellt:

- die Etablierung des 7-Helix-Membranproteins Archon und seiner Varianten als fluoreszierende Spannungssensoren (GEVI, engl. genetically encoded voltage indicator) für *in vitro* und *in vivo* Messungen,
- die Entwicklung und Anwendung von Einzelproteoliposomen-Assays zur Untersuchung der Funktion, des Protonentransfers und der Kinetik des Membranspannungsaufbaus (engl. proton motive force (pmf)) des terminalen Enzyms (CcO) der Atmungskette,
- die Untersuchung der Elektronentransferkinetik von CcO mit einem neuen Flashlaser-Aufbau und dessen Entwicklung,
- die Anwendung dieser Techniken zur Untersuchung von CcO-Varianten und der CcO-Krebsmedikament-Interaktion in Bezug auf Enzymfunktion und Generierung der Membranspannung.

Hierbei wird eine Kombination von (bio-) physikalischen (zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie (FLASH), zeitaufgelöster Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (FLIM), Interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM)) und molekularbiologischen und biochemischen Methoden verwendet.

1.2 Zielsetzung und Lösungsansatz

In dieser Arbeit soll ein Assays zur Untersuchung der Aktivität und Generierung der Membranspannung von CcO Varianten in Membranumgebung entwickelt werden. Hierzu wird ein Einzelproteoliposomen-Assay konzipiert, um das erzeugte Membranpotential zu quantifizieren. Die Änderung der Membranspannung der Proteoliposome soll dabei bestimmt werden. Dadurch soll die Protonenpumpfähigkeit der CcO und ihrer Varianten möglichst unbeeinflusst zeitaufgelöst untersucht werden. Nach erfolgreicher Etablierung des Assays können die Protonenwege innerhalb der CcO durch zielgerichtete Punktmutationen mit diesem Assay identifiziert werden. Auch die Untersuchung von Interaktionen mit anderen Molekülen, wie zum Beispiel Krebsmedikamenten, soll Bestandteil des Assays werden. Hierzu stellten sich folgende Zielsetzungen und die gewählten Lösungsansätze dar:

1. **Entwicklung eines Einzelmolekül Assays zur Untersuchung der Funktionalität von CcO und des Protonentransfers mittels oberflächen-gekoppelter-pH Indikatoren an CcO in Membranumgebung (Proteoliposome):** Um eine Membranumgebung für CcO zu gewährleisten, muss das Protein nach Expression und Aufreinigung in eine Membran eingebaut werden. Hierfür wurde ein proteoliposomal Ansatz gewählt. Dabei muss zuerst die Ausrichtung und Funktionalität der CcO in der Membran überprüft werden. Hierzu wird an eine Einzel-Cystein-Variante der CcO (Wolf 2020) ein fluoreszierender pH-Indikator, Fluorescein, gekoppelt. Die Ausrichtung der CcO in der Proteoliposommembran kann nach ihrem Einbau durch die pH-abhängige Fluoreszenz des Sensors bestimmt werden. Um die generelle Funktion der eingebauten CcO zu

kontrollieren, wird die Protonenpumpfähigkeit über die Signaländerung des Proteingekoppelten pH-Sensors mit Hilfe von FLIM und TIRFM gemessen. Der mikroskopische Ansatz erlaubt die Untersuchung einzelner Proteoliposomen. Dabei muss weiterhin gewährleistet sein, dass eine eindeutige Zuordnung der Proteoliposomen im Experimentablauf erfolgt. Hierzu wird die Verwendung einer Oberflächenfixierung der Proteoliposome an die Objektträger verwendet. Mit Hilfe von Einzelmolekül Förster Resonanz Energie Transfer (smFRET, engl. single molecule FRET) kann die Stöchiometrie von CcO zu Liposom direkt bestimmt werden, sodass ein Verhältnis gewählt werden konnte, in dem statistisch überwiegend eine CcO pro Liposom eingebaut wurde.

2. **Entwicklung eines Einzelliposom-Assays zur Untersuchung des Membranspannung**

Aufbaus mit Hilfe von GEVIs: Ein Ziel dieser Arbeit ist es, den Aufbau des Protonengradienten als Folge des CcO Redox-Zyklus direkt als Potentialänderung über die Membran zu messen. Hier soll der in Punkt 1 entwickelte Einzelmolekül-Assay mit GEVIs als Spannungssensoren kombiniert werden. Als GEVI wird das sieben Helix Protein Archon 1 genutzt. Die Etablierung und Charakterisierung eines GEVI-Spannungssensors ist unter anderem von Vorteil, wenn Experimente in Zukunft in Zellen und Geweben durchgeführt werden sollen, da die GEVIs direkt in der Zelle exprimiert werden können. Der Vorteil gegenüber kleinen organischen Molekülen ist hier, dass der Sensor direkt in der Membran lokalisiert ist und somit direkt in der Zielzelle bzw. Gewebe bereits vorhanden ist. Da Archon1 im roten Wellenlängenbereich angeregt wird, eignet er sich gut für das Gewebe aufgrund der hohen Penetrationstiefe der Anregungslichtes und sollte ebenfalls keinen erhöhten zellulären Stress verursachen.

In den letzten Jahren wurden GEVIs in der Elektrophysiologie etabliert. Aufgrund der komplexen und mannigfaltigen Signalübersetzung von einem Spannungssignal zu einem Fluoreszenzsignal ist eine sehr genaue Untersuchung der fluoreszierenden Eigenschaften der Spannungssensoren unabdingbar. Da die Verwendung dieser Sensoren für den CcO Assay sehr wichtig sind, wird die Untersuchung und Auswahl des gewählten GEVI aus mehreren verschiedenen GEVI-Varianten in dieser Arbeit zuerst mittels Absorption Spektroskopie, Emissionsspektroskopie und Fluoreszenz Mikroskopie Techniken untersucht. Die möglichen molekularen Mechanismen der Spannungsdetektion und Anwendungsmöglichkeiten werden diskutiert.

3. **Etablierung eines neuen Flashlaser-Aufbaus für die Untersuchungen von Elektron-**

Transfer: Die Verwendung von CcO Varianten kann durch Veränderung in dem katalytischen Zyklus unterschiedliche Protonentransferraten erzeugen und somit das Membranpotential beeinflussen. So kann auch bereits die Aufnahme der benötigten Elektronen aus Cyt-c geändert sein. Zur Aufklärung der Ursachen der veränderten Protonentransferrate in CcO ist die Untersuchung der Elektronenaufnahme durch das Häm a und die anschließende Kopplung aus Elektronen- und Protonentransport notwendig. Mit Hilfe von zeitabhängiger Absorptionsspektroskopie kann die Reduktionsdynamik von Häm a durch Einzelelektroneninjektion mittels eines lichtangeregten Elektronendonors (Rutheniumkomplex) gemessen werden. Aufgrund der sehr schwachen Absorptionsänderung durch die Elektronenaufnahme muss der

zeitaufgelöste Absorption Spektroskopie Aufbau (Flashlaser-Aufbau) umgebaut werden, und ein optisch parametrischer Oszillator (OPO-System) mit genügender Anregungsenergie implementiert werden. Durch die Bereitstellung von ausreichender Anregungsenergie kann ein Ruthenium-Komplex Licht getriggert ein Elektron in die CcO (Kirchberg 2013) injizieren. Teil dieser Arbeit sind die Entwicklung und Bereitstellung des dafür benötigten Flashlaser-Aufbaus.

4. **Anwendung des entwickelten Einzelliposom-Assays zur Untersuchung des Protonentransfers zur P-Seite an ausgewählten CcO Varianten und eines möglichen Inhibitors:** Nach erfolgreicher Etablierung der beiden kombinierten Proteoliposomen-Assays sollen verschiedene Varianten von CcO und ein möglicher Inhibitor der CcO Aktivität untersucht werden. Dabei werden die Methoden aus Punkt 2 für die Charakterisierung angewendet.

2. Grundlagen

2.1 Zelluläre Atmungskette und Cytochrom-c-Oxidase

Organismen benötigen Energie, um lebensnotwendige Prozesse aufrechtzuerhalten und zu erweitern. Die Energiegewinnung aus Nahrung erfolgt mittels Redoxreaktionen. Hierbei werden Kohlenstoffverbindungen mittels Glykolyse, Citrat Zyklus und Fettsäure-Oxidation final zu Kohlenstoffdioxid oxidiert, um Energielieferanten und -speicher als energiereichere Verbindungen chemisch in der Zelle zu produzieren. Hierbei spielt das durch die ATP Synthase hergestellte Adenosintriphosphat (ATP) eine der wichtigsten Funktionen als Energielieferant (Fritsche 2015). Die Herstellung von ATP wird als finaler Schritt der Atmungskette in den Mitochondrien bezeichnet, während im Zuge der Atmungskette andere Reduktionsäquivalente Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH₂) oxidiert werden. Final werden die Elektronen zur Erzeugung von Wasser in der chemischen Reaktion mit molekularem Sauerstoff und Protonen benutzt. Die freie Energie in diesen chemischen Prozessen wird genutzt, um einen Protonen-gradienten über die innere Membran der Mitochondrien zu erzeugen. Hierfür werden Protonen durch die Membran mittels Proteinen wie die Cytochrom-c-Oxidase transportiert. Der elektrochemische Gradient wird von der ATPase zur Synthese von ATP genutzt. Die Atmungskette (Abbildung 2.1) setzt sich aus vier Enzymkomplexen (Komplex I bis IV) zusammen, die für den Elektronentransport und den Aufbau des Gradienten verantwortlich sind. Die ATP-Synthase wird häufig als Komplex V bezeichnet. Die Komplexe können anhand ihrer Funktion in der Atmungskette aufgeteilt werden: 1) in Komplex II (Succinat:Ubichinon1-Oxidoreduktase) mit einer Elektronentransportfunktion und 2) in die Komplexe I (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase), III (Cytochrom-c-Reduktase) und IV (Cytochrom-c-Oxidase) mit der Funktion zum Aufbau des Protonengradienten. Dieses Zusammenspiel von Elektronen- und Protonentranslokation zur Erzeugung von ATP wurde ebenfalls erstmals 1961 von Mitchell im Rahmen seiner chemiosmotischen Theorie vorgeschlagen (Mitchell 1961). Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase, CcO) überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff unter der Bildung von Wasser. Als finales Glied der Atmungskette ist ein genaues Verständnis der CcO und dem Zusammenspiel aus Elektronenaufnahme, Verstoffwechslung und dem Pumpen von Protonen unabdingbar.

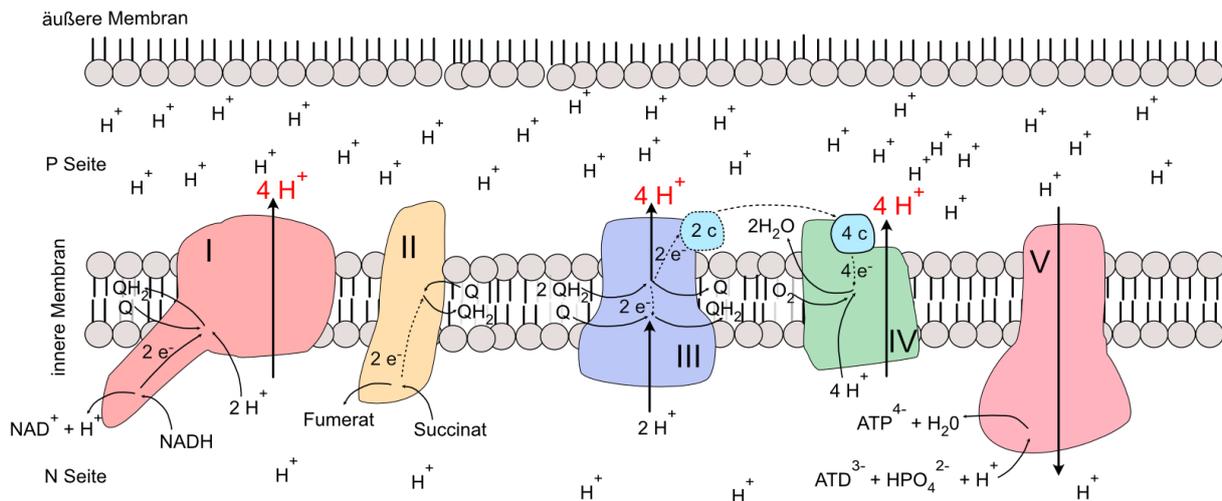


Abbildung 2.1 Schema der Atmungskette (Komplexe I bis IV) in der inneren Mitochondrienmembran und der ATP-Synthase (Komplex V). Komplex I: NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex II: Succinat: Ubichinon1-Oxidoreduktase, Komplex III: Cytochrom-c-Reduktase, Komplex IV: Cytochrom-c-Oxidase, c: Cytochrom-c, e: Elektron, H⁺: Proton.

Die in dieser Arbeit verwendete aa₃-Cytochrom-c-Oxidase von *Paracoccus denitrificans*, ein gram-negatives Bakterium (Beijerinck and Minkman 1910) mit umfangreichen Elektronentransport-Netzwerk, besteht aus vier Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 126 kDa. Neben der aa₃-CcO besitzt *Paracoccus denitrificans* aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit zu seiner Umgebung ebenfalls die Oxidasen cbb₃-CcO und ba₃-Ubiquinol-Oxidase, wobei alle drei Oxidasen zur Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen mit einem binuklearem Zentrum (high-spin Häm und Kupferion; BNC) und ein low-spin Häm zur Weiterleitung des Elektrons von Cyt-c zum BNC gehören (Brzezinski and Gennis 2008). Dadurch kann zusätzlich zu dem finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff auch alternativ unter anaeroben Bedingungen verschiedene Stickstoffverbindungen genutzt werden. Dies wird als Denitrifikation bezeichnet. Obwohl die humane mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase aus 13 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von über 400 kDa besteht, zeigen die Kristallstrukturen beider Oxidasen (Säugetier und *P. denitrificans*) eine große Übereinstimmung für die Untereinheiten I bis III auf. Bei *P. denitrificans* sind die Untereinheiten strukturell weniger komplex aufgebaut (Koepke 2009), wobei gezeigt wurde, dass Untereinheiten I und II als minimale Funktionseinheit (Nicoletti 1998) funktionsfähig sind, da alle am Elektronentransport beteiligten Redox Zentren vorhanden sind (Wikström 2018). Die Untereinheit I beinhaltet die Häm a Moleküle (a und a₃) und ein Kupfer-Ion (Cu_B). In der Untereinheit II befindet sich das Cu_A Zentrum, welches aus zwei weiteren Kupfer-Ionen besteht (Iwata 1995). Die Untereinheit III ist nicht zwingend für die Protonenpumpaktivität notwendig, es zeigte sich aber ein starker Einfluss auf die Stabilität der Untereinheiten I und II. Untereinheit IV beeinflusst scheinbar weder die Struktur noch die Funktion des Enzymkomplexes. Ebenso wenig besitzt sie ein Homolog in der humanen mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase (Iwata 1995).

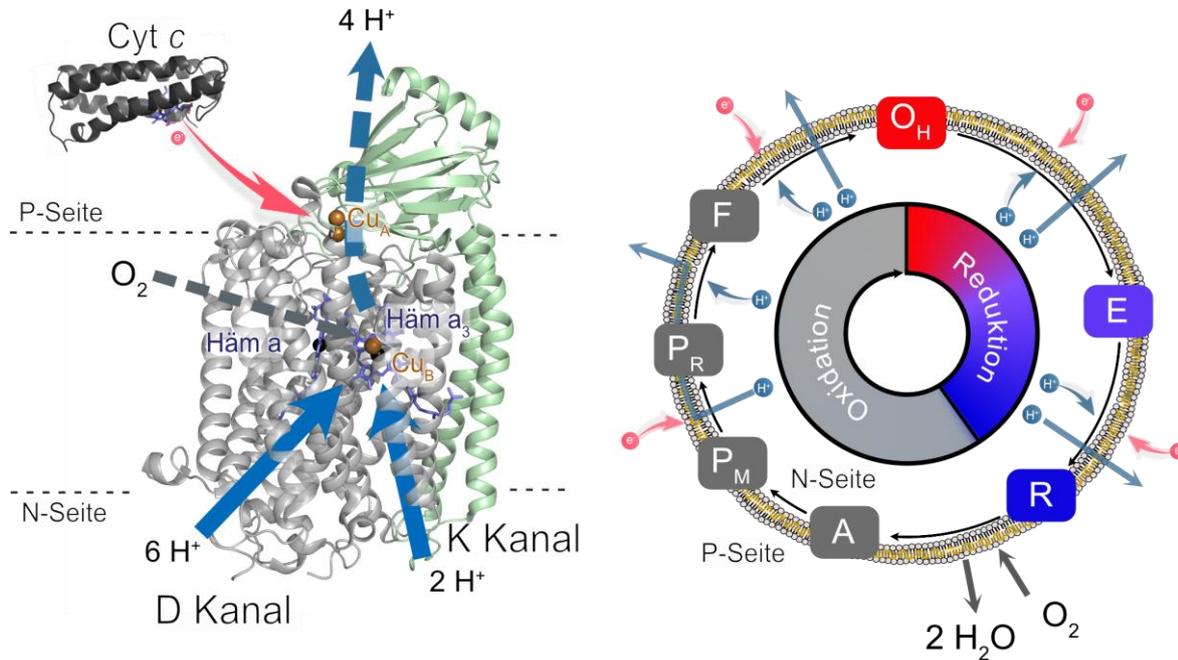


Abbildung 2.2: Kristallstruktur von *P. denitrificans* CcO Untereinheit 1 und 2 mit Kofaktoren und stilisierten Kanälen (pdb: 3HB3) und Redox Zyklus. Untereinheit 1 ist in grau und Untereinheit 2 in grün dargestellt. Die Kupfer Kofaktoren in braun, die Häme in lila mit schwarzem Eisencenter. Der K und D Kanal sind mit blauen Pfeilen angedeutet. Da direkte O_2 und H_2O Wege in CcO nicht bekannt sind, sind diese nur angedeutet. Elektronenabgabe von Cyt-c zu Cu_A ist mit einem roten Pfeil angedeutet. Im Redox Zyklus sind die aufgenommen und gepumpten Protonen und aufgenommenen Elektronen von N- und P-seite über die Membran gezeigt. Zyklus ist aufgeteilt in Reduktion und Oxidation der CcO. Die Übergangszustände sind nach der jeweiligen Aufnahme und Abgabe von Protonen/Elektronen gezeigt.

Die aa_3 -Cytochrom-c-Oxidase von *P. denitrificans* katalysiert, als Teil der Atmungskette, die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser in mehreren Schritten und nutzt die freie Energie dieses Prozesses zum Transport von insgesamt vier Protonen unter der Bildung eines Gradienten über die Membran mit einer Protonenüberschussseite (P-Seite) und auf der anderen Seite mit einem Protonenmangel (N-Seite). Der Protonengradienten wird nicht nur durch die Pumpeigenschaft der CcO erreicht, sondern auch durch die benötigten Elektronen von der P-Seite und der Verwendung der „chemischen“ Protonen von der N-Seite für die Redoxreaktion. Die daraus resultierende Reaktion lässt sich wie folgt zusammenfassen:



Cytochrom-c (Cyt-c) fungiert als Elektronendonator und gibt die Elektronen über das Cu_A -Zentrum, an die Oxidase ab. Mittels des Häm a wird das Elektron an das binukleare Zentrum (bestehend aus Häm a_3 und Cu_B) weitergegeben (Abbildung 2.2). Hier bindet der molekulare Sauerstoff als letzter Elektronenakzeptor, nachdem das BNC vollständig reduziert ist.

Die Protonen gelangen durch zwei Kanäle in das katalytische Zentrum. Diese Kanäle sind der sogenannte D-Kanal, nach Aspartat in Position 124 (D124) benannt und der K-Kanal, nach dem Lysin in Position 354 (K354) (Konstantinov 1997) (Abbildung 2.2). Der K-Kanal ist im reduzierten Zustand des Enzyms aktiv und liefert zwei der für die Redoxreaktion erforderlichen Protonen in diesem Teil des Zyklus.

Herr Dr. Wolf entwickelte in der AG Alexiev ein neuartiges Expressionssystem für CcO in von *P. denitrificans* und etablierte eine von reaktiven Cysteinen freie CcO Variante. Basierend auf

dieser Variante wurden mehrere Einzelcystein-Varianten auf der P-Seite und N-Seite konstruiert (Wolf 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Varianten mit Cysteinen auf der P- und der N-Seite exprimiert, zur Kopplung von Fluoreszenzsonden genutzt und in dem Proteoliposomen-Assay verwendet.

Durch den aktiven Transport der Protonen durch die Membran wird nicht nur ein Protonen Gradient und somit ein pH Differenz ΔpH erzeugt, sondern auch aufgrund der positiven Ladung des Protons ein Membranpotential $\Delta\Psi$ erzeugt. Diese beiden Komponenten liefern die protonenmotorische Kraft (*pmf*), die von den Zellen benutzt wird, um ATP aus ADP zu erzeugen mittels der ATPase.

$$pmf = \Delta\psi - 2,3 \left(\frac{R T}{F} \right) \Delta pH \quad (2)$$

2.2 Genetisch veränderte fluoreszierende Spannungssensorproteine

In dieser Arbeit wird eine Membranspannungsmethode etabliert und charakterisiert, um eine sensitive Bestimmung der Funktionalität der CcO in zell-ähnlicher Umgebung durch die Membranspannung zu bestimmen. Hierfür werden genetisch veränderte Spannungssensorproteine (GEVIs) untersucht, die aufgrund der anliegenden Membranspannung unterschiedliche fluoreszierenden Eigenschaften zeigen. Die Expression und Verwendung der GEVIs in den gewünschten Zellen wurde durch neue Methoden der Genetik in den letzten Jahren möglich (Siegel and Isacoff 1997) und bewies sich als neue Technik der nicht-invasiven Elektrophysiologie (Hochbaum 2014).

Spannungssensorproteine werden durch die Zelle selbst in die Membran der Zielzellen eingebaut und verändern aufgrund der anliegenden Membranspannung ihre Fluoreszenzeigenschaften. Derzeitig werden die Spannungssensor Proteine in drei Klassen unterteilt, abhängig von ihrem generellen Aufbau des spannungsdetektierenden Teils und dem daran gekoppelten fluoreszierenden Proteinanteil. Es gibt Sensoren, die eine direkte Verbindung der spannungsempfindlichen Proteindomänen und dem fluoreszierenden Proteinanteil besitzen (Chanda 2005). Als zweite Klasse gibt es hybride Spannungssensorproteine, die auf bekannten fluoreszierenden Farbstoffen beruhen (Chanda 2005). Des Weiteren existieren auf Opsin basierenden Spannungsmesserproteine, bei denen der gebundene Chromophor die Spannungssensitivität des Proteins vermittelt (Kralj 2011, St-Pierre 2015). Im Unterschied zu Bacteriorhodopsin (bR) und den meisten anderen Rhodopsinen sind einige Arhearhodopsine schwach fluoreszierend und zeigen ein variables fluoreszierendes Verhalten abhängig von der anliegenden Membranspannung.

Opsine sind Membranproteine mit sieben Transmembran-Helices. Ein konserviertes Lysin bildet eine kovalente Bindung mittels einer Schiff'schen Base mit all-trans Retinal im Fall von mikrobiellen Rhodopsinen wie Bacteriorhodopsin aus. Opsine werden von Mikroben in der

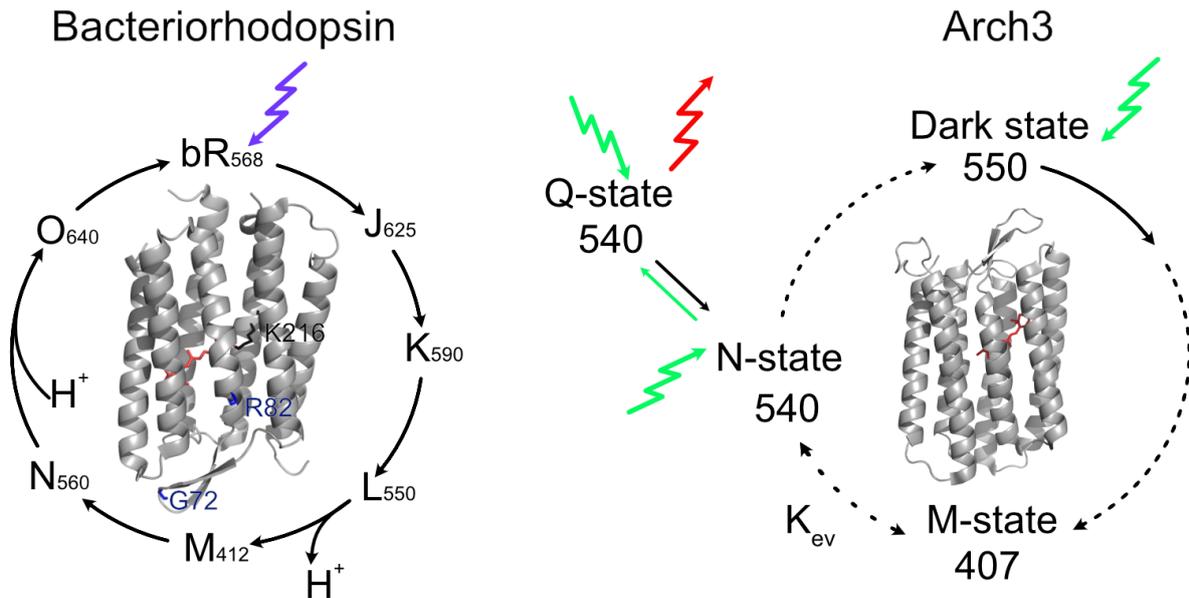


Abbildung 2.3: Photozyklus von bR und Arch3 mit Intermediaten und ihren Absorptionsmaxima in nm. Links die Kristallstruktur von bR (pdb: 1kgb) mit den in blau markierten Aminosäuren G72 und R82, das Retinal in Rot mit der Schiff'schen Base Bindung zum K216 (schwarz) und der bR Photozyklus angepasst aus (Schubert 2022). Rechts die Kristallstruktur (Homologes Modell basierend auf Archaerhodopsin-2, pd:3WQJ) (Kouyama 2014) und der postulierte Arch3 Photozyklus (Maclaurin 2013). Als Teilergebnis dieser Arbeit wird postuliert (Silapetere 2022), dass das Gleichgewicht zwischen N- und M-Zustand abhängig von der anliegenden Spannung ist. Durch ein weiteres Photon bei 540 nm wird der fluoreszierende Q Zustand erreicht, der im roten emittiert mit einem Emissionsmaximum bei 710 nm.

Zellmembran für diverse adaptierende Prozesse benutzt (Berthold 2008), produzieren einen Protonengradienten (Lozier 1975) und können die Genexpression in Hungerzeiten der Zelle regulieren (Gómez-Consarnau 2010). In der vorliegenden Arbeit werden Varianten des Archaerhodopsin-3 (Arch3) aus *Halorubum sodomense* genutzt. Arch3 ist sensitiv zu Änderungen in der Membranspannung und reagiert mit Veränderungen seiner schwachen Fluoreszenz im NIR Bereich mit Submillisekunden Reaktionszeit (Kralj 2011). Studien untersuchten Varianten von Arch3, um die Spannungssensitivität oder die Fluoreszenzintensität zu optimieren (Hochbaum 2014, Piatkevich 2018). In dieser Arbeit wird eine Auswahl der Arch3 Varianten genutzt, um deren Verwendung in dem Proteoliposomen-Assay zu untersuchen. Hierbei ist zu erwähnen, dass Wildtyp (WT) Arch3 nur durch einen Drei-Photonenanregungsprozess in einen fluoreszierenden Zustand gebracht wird. Hierzu wird mit dem ersten Photon der Photozyklus angeregt und bei der zweiten Absorption im Intermediate N eine Aufteilung des Zyklus erreicht. Hierbei wird erst der fluoreszierende Q Zustand erreicht wie in Abbildung 2.3 zu sehen ist (Maclaurin 2013). Für die verwendeten Varianten wurde gezeigt, dass Fluoreszenz bereits durch einen Ein-Photonen-Prozess bei Anregung des Grundzustandes auftritt, wobei noch nicht bekannt ist, ob der dunkeladaptierte Grundzustand fluoresziert oder eine Mischung aus Grundzustand und fluoreszierenden Q Zustand bereits existiert (Hochbaum 2014).

Folgende Arch3 Varianten mit unterschiedlichen spannungssensitiven und fluoreszierenden Eigenschaften für eine mögliche Applikation als Membranspannungssensoren für die Bestimmung des Protonengradienten von CcO werden untersucht: Quasar1, Quasar2, Archon1 und Archon2. Folgende Mutationen in Arch3 generieren diese Varianten (Aminosäure Nummerierung anhand UniProtKB P96787 für Arch3): Quasar1 (Arch3 P60S-

T80S-D95H-D106H-F161V) (Hochbaum 2014, Xu 2017), QuasAr2 (Quasar1 H95Q) (Hochbaum 2014, Xu 2017), Archon 1 (Arch3 T20S-G41A-V44E-P60S-T80P-D86N-D95Q-D106H-A136T-F161V-T183I-L197I-G241Q) (Piatkevich 2018), Archon 2 (Arch3 T56P-P60S-T80P-D95H-T99S-T116I-F161V-T183I-L197I-A225C) (Piatkevich 2018).

Die Konstrukte haben diverse Mutationen im Vergleich zu Arch-3. Besonders hervorzuheben ist die Mutation an der Position des Gegen Ion der Schiff'schen Base D95H/Q, die zu einer starken Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften führt. Auch in Studien an einem anderen Archaeobakterium, *Gloeobacter violaceus*, (Mclsaac 2014) zeigte dieser Aminosäureaustausch in dem Archaeorhodopsin eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Die Mutation zu einem positiv geladenen Histidin (D95H) in Quasar1 und Archon2 führte zu einer Verbesserung der Fluoreszenzquantenausbeute und einer schnellen, aber moderaten Reaktion auf Änderungen der anliegenden Spannung (Hochbaum 2014).

Die Mutation zu der neutralen Glutamin Aminosäure (D95Q) an dieser Stelle führte zu stärkerer Sensitivität der Änderung der Spannung mit einer leichten Erhöhung der Quantenausbeute. Der Vergleich der Sekundärstruktur von bR und Arch3 Varianten (Abbildung 2.4) zeigt, dass Mutationen in der Umgebung von D95 (D85 in bR) und R92 (R82 in bR) den größten Effekt auf die Fluoreszenzeigenschaften zu haben scheinen. Die Varianten von Arch3 wurden bisher untersucht, um entweder die Quantenausbeute oder die Spannungssensitivität zu erhöhen (Hochbaum 2014, Piatkevich 2018). Die größte Erhöhung der Quantenausbeute wurde in einer Variante Arch-7 von 0,04% zu 1,2% erreicht (Mclsaac 2014) mit jedoch einer verminderten Spannungssensitivität. Jedoch eine weiterführende Charakterisierung der Fluoreszenz in den Zielzellen fand bis jetzt nicht statt. Nach eingehender Literaturrecherche ist kein weiterer Fluoreszenzparameter genutzt worden, um die Änderungen der Membranspannung mittels Fluoreszenz zu charakterisieren oder um eine Verbesserung der Visualisierung und einhergehender Diskriminierung der Membranspannungsänderung der Arch-3 Varianten in Zellen zu erreichen. Die in dieser Arbeit verwendeten Arch3 Varianten wurden von Arita Silapetere (AG Hegeman, HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

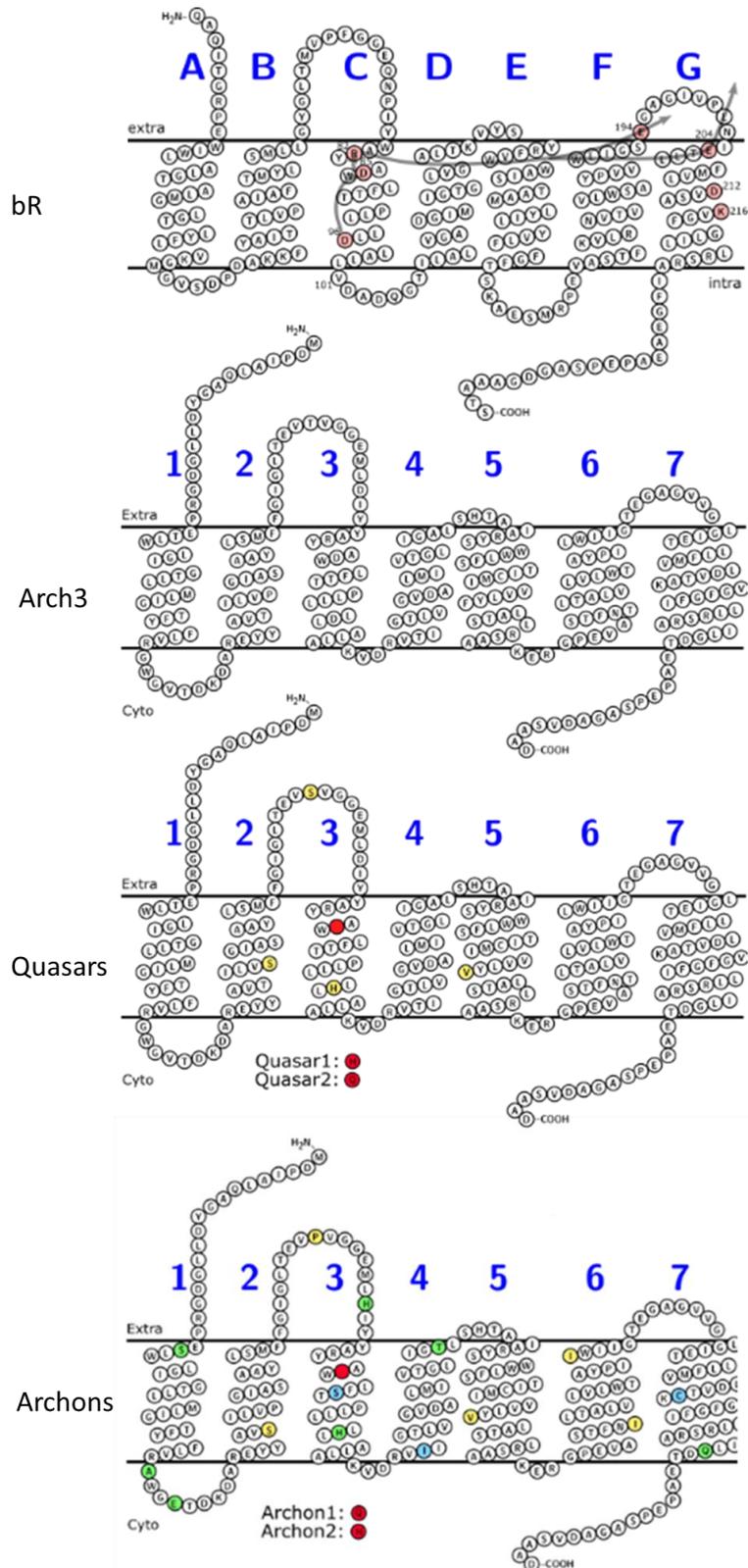


Abbildung 2.4: Sekundärstruktur von Bacteriorhodopsin und ausgewählten Arch3 Varianten (Archon1/2, Quasar1/2). (A) Sekundärstruktur von bR mit Protonenweg mit Pfeilen angedeutet. (B) Sekundärstruktur von Arch3, (C) den Varianten Quasar1 und Quasar2 und (D) Archon1 und Archon2. Mutationen, die gleichbleibend sind im Vergleich zu Arch3, sind gelb markiert. Die Gegenionenposition 95 der Schiff'schen Base ist in rot markiert. Unterschiedliche Mutationen in Archon1 (grün) und Archon2 (blau) sind markiert. Blaue Zahlen/Buchstaben zeigen die Nummerierung der Transmembranhelices.

2.3 Bacteriorhodopsin

Bacteriorhodopsin (bR) ist eine lichtgetriebene Protonenpumpe, die in den Archaeobakterien *Halobacterium salinarium* vorkommt. Das Protein hat eine Größe von 24 kDa und ist von intensiv violetter Farbe. Durch den Protonengradienten wird entweder mittels einer ATP-Synthase ATP produziert oder mittels eines Antiportersystems ein Natrium- oder Kaliumgradient über der Membran aufgebaut. bR ist ein Protein mit sieben transmembranen Helices und einem kovalent gebundenem Retinal. Es gehört zu den membranständigen lichtgetriebenen Protonenpumpen (Oesterhelt and Stoeckenius 1971). Die Aminosäuresequenz wurde bereits 1979 bestimmt (Khorana 1979) und die erste Kristallstruktur einige Jahre später (Pebay-Peyroula 1997). Das Retinal ist am Lysin in Position 216 des bR über eine protonierte Schiff'schen Base (PSB) gebunden und liegt als Chromophor im Inneren des Proteins zwischen den Helices. Durch die Bindung ist das Absorptionsmaximum des Retinales von 380 nm nach 570 nm verschoben. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Arch-3 und seiner guten Stabilität auch in aufgereinigtem Zustand, wird bR in dieser Arbeit als Modellsystem und zur Kalibrierung der neu konzipierten Aufbauten genutzt. Ebenso ist es von Vorteil für die Kalibrierung des Flash Laser Aufbaus, dass bR nach Anregung in den Photozyklus wieder nach kurzer Zeit in seinen Grundzustand zurückgeht und somit als Modellsystem verwendet werden kann. Ebenso kann der Neuaufbau durch den Vergleich der ermittelten Zeitkonstanten der Intermediate im Photozyklus mit Literaturwerten (Alexiev 2000) überprüft werden.

2.4 Physikalische Grundlagen

In dieser Arbeit werden (bio-)physikalische Methoden verwendet, die hauptsächlich die Interaktion von Photonen und Materie zur Untersuchung verwenden. Aus der Wechselwirkung von Licht mit Materie in Form von Absorption und Emission lassen sich direkte (zum Beispiel durch die Veränderung der Absorption des Chromophors eines Proteins) oder indirekte (zum Beispiel durch fluoreszierende Sonden) Informationen über die Änderung der beteiligten Proteine oder ihrer Umgebung gewinnen. Hierzu wird in diesem Kapitel auf die physikalischen Grundlagen der Interaktion von Materie mit Licht eingegangen.

2.4.1 Absorption

Licht kann durch Materie beeinflusst werden. Absorption nennt man den Prozess, dass Photonen durch in der Materie enthaltenen Elektronen absorbiert werden und die Elektronen dadurch in ein höheres Energieniveau angeregt werden. Hieraus ergibt sich die Bedingung, dass die Energie des Photons der Differenz der Energieniveaus des Elektron ΔE entsprechen muss.

$$\Delta E = E' - E = hc/\lambda \quad (3)$$

Die Energie der Photonen ist invers proportional zu der Wellenlänge λ des Lichtes. Die Energie von Licht im ultravioletten oder sichtbaren Licht ist ausreichend, um Valenzelektronen oder Bindungselektronen zweier Atome anzuregen. Für Elektronen in tieferen Orbitalen werden höhere Energien zur Anregung benötigt.

Um die Anregungsenergien für ein größeres Molekül zu erklären, wird mittels der Molekülorbitaltheorie alle Atomorbitale eines Moleküls gemeinsam betrachtet. Hieraus ergeben sich Hybridorbitale, deren elektronische Wechselwirkung auf bindenden und antibindenden Zustände basieren. Analog zu den Atomorbitalen s, p und d, werden die Molekülorbitale als σ , π und δ (bindend) und σ^* , π^* und δ^* (antibindend) bezeichnet. Hierbei können Elektronen über einen gesamten Bereich von mehreren Atomen delokalisiert sein und ein konjugiertes System bilden. Je größer die Delokalisierung ist, desto geringer ist die Aufspaltung der Energieniveaus. Viele biologische Moleküle mit konjugierten aromatischen Ringen absorbieren Photonen mit Wellenlängen im sichtbaren Licht (380-800 nm).

2.4.2 Fluoreszenz

Die Emission von Photonen durch die elektronische Relaxation eines Stoffes aus einem angeregten Elektronenzustand in den Grundzustand nennt man Lumineszenz. Erfolgt die Relaxation aus einem Singulett-Zustand S (häufige Relaxationszeit von 10^{-7} bis 10^{-9} s), nennt man es Fluoreszenz. Erfolgt sie aus einem Triplett-Zustand T wird sie Phosphoreszenz genannt (häufige Relaxationszeit von 10^{-3} s bis mehrere Minuten). Ein Molekül, das seine Energie durch Aussenden eines Photons bei der Relaxation aus dem angeregten Singulett abgibt, wird als Fluorophor bezeichnet. Die beteiligten internen Übergänge und die benötigten Energien können stark durch äußere Einflüsse oder physikochemische Eigenschaften des Fluorophoren beeinflusst werden. Dabei werden die Übergangsraten k der möglichen Übergänge verändert. Dies führt zu einer Änderung der Fluoreszenzparameter wie Intensität oder Fluoreszenzlebensdauer. Aufgrund der veränderten Fluoreszenz können Rückschlüsse auf den Zustand des Fluorophors geführt werden. Bei fixierten Fluorophoren können somit kleinste Änderungen der Umgebung des Fluorophors untersucht und identifiziert werden. Die sensitiven Sonden sind durch ihre Biokompatibilität zur Einbringung in biologische Systeme hervorragend geeignet, um mit Hilfe von Fluoreszenz Spektroskopie und Mikroskopie als wichtigem Werkzeug in der biophysikalischen und medizinischen Forschung verwendet zu werden.

Die diversen elektronischen und Vibrations-Zustände eines solchen Moleküls können vereinfacht im Jablonski Diagramm, Abbildung 2.5 dargestellt werden, um die energetischen Übergänge zwischen den Molekülzuständen zu verdeutlichen. Ein Molekül befindet sich, wenn es durch die Absorption eines Photons angeregt wird, meist zuvor im Grundzustand S_0 . Nach der Absorption des Photons wird ein Elektron in seinen angeregten Singulett-Zustand S_1 oder einen höheren angeregten Zustand versetzt. Durch höhere Photonenenergie wird das Elektron zwar in höhere elektronische und/oder Vibrationszustände verschoben, jedoch meist durch schnelle interne Umwandlungsprozesse, z.B. Stoßprozesse mit anderen Molekülen, in den vibronischen Grundzustand des elektronischen S_1 Zustand gebracht. Die Rate der internen Umwandlungsprozesse ist als Kollisionsprozess abhängig von der Dichte der

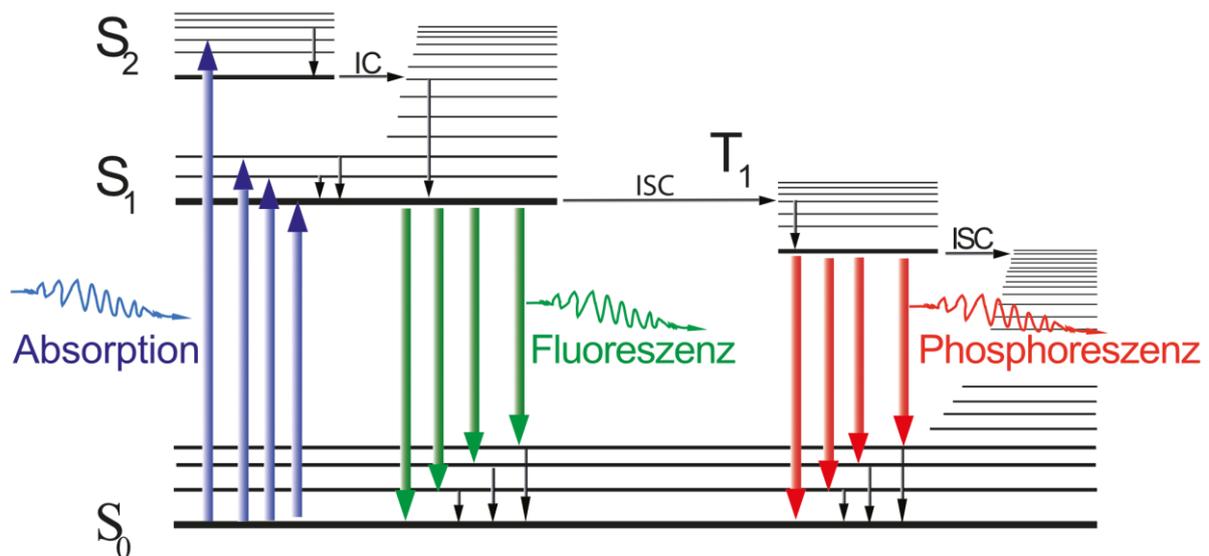


Abbildung 2.5 Jablonski Diagramm. Die elektronischen Zustände (Singulett S bzw. Triplett T) des Elektrons sind gezeigt (dickere Linien). Die dünnen Linien sind die korrespondierenden Vibrationszustände. Strahlende Übergänge, die Strahlung involvieren, sind mit blauen (Absorption), grünen (Fluoreszenz) oder roten (Phosphoreszenz) Linien dargestellt. Strahlungsfreie Übergänge sind durch schwarze dünne Pfeile (interne Umwandlungsprozesse, Internal Konversion (IC) und Intersystem Crossing (ISC)) Linien dargestellt.

Übergangszustände und ist bei Raumtemperatur und in Lösung wesentlich schneller bei höheren elektronischen Zuständen als andere Prozesse ($\sim 10^{-13}$ - 10^{-11} s). Somit gilt bei den meisten fluoreszierenden Prozessen der S₁ Grundzustand als Ausgangspunkt, da diese mit typischen Raten von $\sim 10^{-12}$ - 10^{-8} s deutlich langsamer ist. Dies wird als Kasha's Gesetz bezeichnet. Die mittlere Zeit, die nun nach Anregung bis zum Aussenden eines Fluoreszenz-Photons verstreicht, wird als Fluoreszenzlebensdauer τ bezeichnet. Vertikale Übergänge können mittels der Born-Oppenheimer Approximation erklärt werden und aufgrund des Franck-Codon Prinzips werden bestimmte Übergänge aufgrund der Lage der Kern-Koordinaten bevorzugt, was zu den spezifischen Absorptionen und Emissionen der fluoreszierenden Moleküle führt.

Die Stokes-Verschiebung wird durch die Proportionalität der Vektorenlängen und Energien deutlich, da durch den Verlust von Energie durch die strahlungslosen Prozesse die Fluoreszenz-Photonen energieärmer (im Spektrum rot verschoben) sind, im Vergleich zu den absorbierten Photonen. Ein weiterer Übergang kann durch den klassisch verbotenen Übergang von S₁ zum Triplett Zustand T₁ erfolgen. Aufgrund das die Änderung der Gesamtspinquantenzahl $\Delta S=0$ bei erlaubten Übergängen sein muss, ist dieser Übergang, der Phosphoreszenz genannt wird, stark verzögert in der Zeit.

Um zu beschreiben, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Energie eines absorbierten Photons für einen fluoreszierenden Prozess verwendet wird, wird die Rate der Fluoreszenz k_r im Verhältnis zu der Summe der Raten aller nicht fluoreszierenden Prozesse k_{nr} als sogenannte Quantenausbeute Φ gesetzt.

$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = \frac{N_E}{N_A} \quad (4)$$

Die Quantenausbeute beschreibt somit ebenfalls das Verhältnis der Anzahl der Absorbierten Photonen N_A und der emittierten Photonen N_E , solange keine Multiphotonenanregung genutzt wird.

Basierend auf den Raten der fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Rate kann die Fluoreszenzlebensdauer τ bestimmt werden. Die Fluoreszenzlebensdauer beschreibt die mittlere Zeit, die ein Elektron im angeregten Zustand verbleibt, bis es wieder in den Grundzustand zurückfällt unter Aussendung eines Photons.

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (5)$$

2.4.3 Fluoreszenzlöschung

Unter dem Begriff Fluoreszenzlöschung (engl. Fluorescence Quenching) werden alle Prozesse zusammengefasst, die zu einer zusätzlichen Reduzierung der Fluoreszenzintensität eines Moleküls durch äußere Einflüsse führen. Hierbei wird unterschieden, ob dabei der Übergang in den angeregten Zustand unterbunden wird (statisches Quenching) oder durch neue strahlungslose Prozesse das Molekül wieder in den Grundzustand geführt wird (dynamisches Quenching).

Beim statischen Quenching bildet der Quencher einen Komplex mit dem Fluorophoren. Dieser Komplex kann nun nicht mehr fluoreszierend sein oder neue fluoreszierende Eigenschaften mit verschobenen Absorptions- und Emissionsbanden haben. Beim dynamischen Quenching wird die durch die Absorption aufgenommene Energie an den Quencher abgegeben. Dies muss in der Lebenszeit des angeregten Zustandes stattfinden. Hierbei kann die Energie mittels einer Dipol-Dipol Interaktion, wie zum Beispiel bei Förster Resonanzenergie Transfer (FRET) oder den Austausch von angeregten Elektronen, dem sogenannten Dexter Elektronentransfer übertragen werden. Da diese Prozesse mit ihrer Rate (k_q) in Konkurrenz zu dem Fluoreszenz-Prozess stehen und die Interaktion mit dem Fluorophor notwendig ist, ist die Stärke des Quenching-Prozesses abhängig von der Konzentration des Quenchers ($[Q]$). Das Verhältnis von Verlust von Fluoreszenzintensität und $[Q]$ ist durch die Stern-Volmer Gleichung beschrieben.

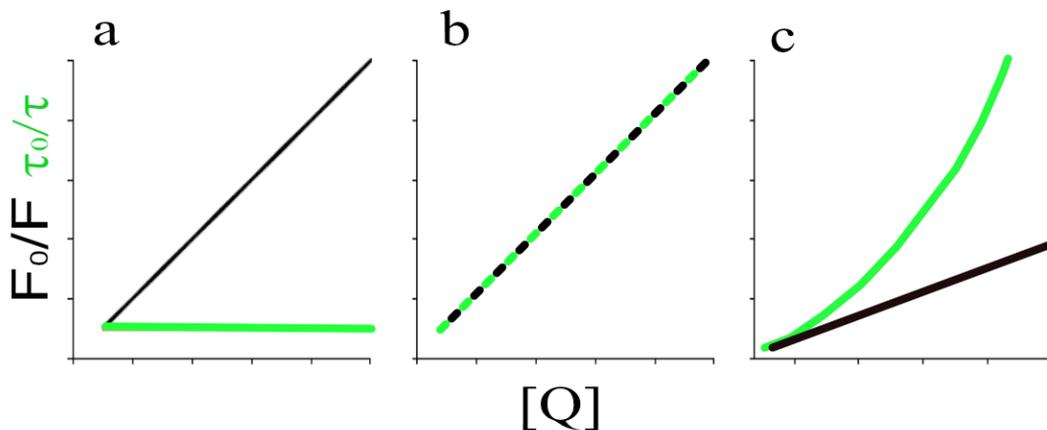


Abbildung 2.6: Stern Volmer Schema für a) statisches Quenching, b) dynamisches Quenching und c) eine mögliche Kombination. In schwarz das Verhältnis von Fluoreszenzintensität mit Quencher F und ohne F_0 und in Grün die Fluoreszenzlebenszeit in Abhängigkeit der Quencher Konzentration $[Q]$.

Da beim statischen Quenching nur Moleküle im Grundzustand verändert werden, ist die Fluoreszenzlebensdauer (τ) gleich der Lebensdauer ohne Quencher τ_0 , jedoch die Intensität mit Quencher (F) reduziert im Vergleich zu der Intensität ohne Quencher (F_0). Das Verhältnis der Intensitäten ist linear abhängig von $[Q]$ und der statischen Quencher-spezifischen Stern-Volmer Konstante (K_s).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q] \quad \text{und} \quad \tau = \tau_0 \quad (6)$$

Beim dynamischen Quenching wird aufgrund der konkurrierenden Raten im angeregten Zustand nicht nur die Intensität verändert, sondern ebenso die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von τ_0 und der dynamischen Quencher-Konstante k_q

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \tau_0 k_q [Q] \quad (7)$$

und

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_q [Q]. \quad (8)$$

Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 2.6 schematisch für beide Fälle und einer Kombination gezeigt.

2.4.4 Förster Resonanz Energie Transfer

Die nach Theodor Förster benannte Form des Energietransfers (Förster 1946) erlaubt einem angeregten fluoreszierenden Farbstoff (Donor genannt) nach Abgabe seiner Energie an ein anderes fluoreszierendes Molekül (Akzeptor) selbst ohne Aussendung eines Photons wieder in seinen Grundzustand zurückzukehren. Diese Paarbildung wird als Donor-Akzeptor Paar bezeichnet. Hierbei geschieht der Energietransfer mittels einer Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Der nun angeregte Akzeptor kann durch Fluoreszenz in seinen Grundzustand zurückkehren. Die Energieübertragung kann durch eine Indizierung von Oszillationen im Akzeptor Molekül beschrieben werden. Bei dieser Form des Energie Transfers wird kein Elektron zwischen den Molekülen ausgetauscht, jedoch bleibt die Spin Ausrichtung (Singulett-Singulett-Transfer) erhalten, wie in Abbildung 2.7 gezeigt.

Aufgrund der zugrundeliegenden quantenmechanischen Prinzipien ist die Energieübertragung von mehreren Faktoren abhängig. Allgemein kann sie als weitere strahlungslose Rate k_{FRET} betrachtet werden. Die Effizienz dieses Energietransfers wird beschrieben als Verhältnis von der Donor Absorption zu dem erfolgten Energietransfer:

$$E = \frac{\text{Energietransfer}}{\text{Donorabsorption}} = \frac{k_{FRET}}{k_{r,D} + k_{FRET} + k_{nr}}, \quad (9)$$

wobei $k_{r,D}$ und k_{nr} wie schon beschrieben die Raten der Fluoreszenz und der nicht strahlenden Prozesse des Donors sind. Die Rate k_{FRET} ist selbst abhängig von der Lebenszeit des Donors im angeregten Zustand τ_D und von dem Abstand r der Fluorophore

$$k_{FRET} = \frac{k_{r,D} * R_0^6}{r^6} = \frac{R_0^6}{\tau_D r^6}. \quad (10)$$

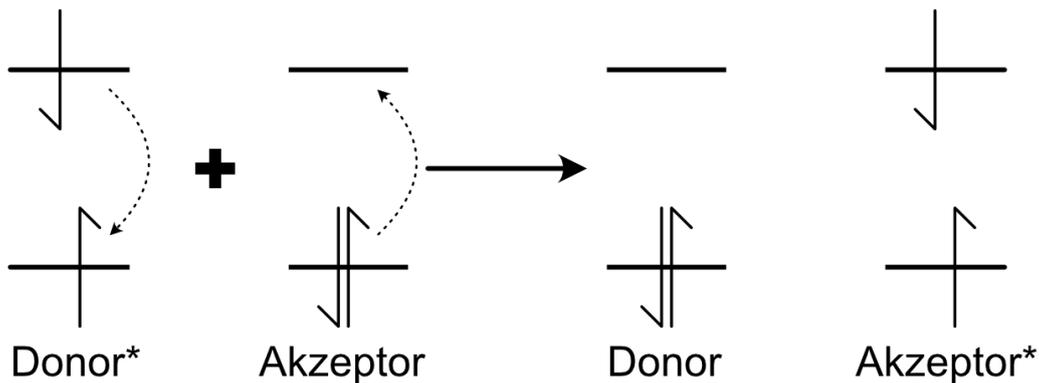


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Energietransfers bei FRET. Energietransfer findet ohne Austausch des Elektrons statt. Der angeregter Donor (Donor*) gibt durch einen nicht strahlenden Prozess seine Energie an den Akzeptor ab. Der Spin der Elektronen ist durch die Ausrichtung des Pfeils symbolisiert und wird nicht verändert.

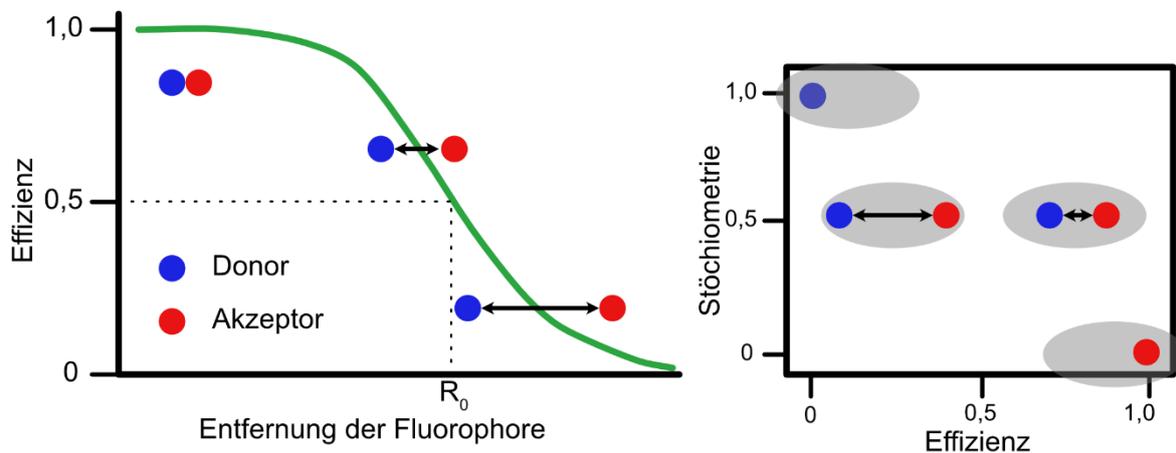


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Entfernung. Hierbei ist die Entfernung R_0 bei der eine 50% Effizienz besteht eingezeichnet. Exemplarischer Darstellung der Effizienz und der bestimmten Stöchiometrie von Donor und Akzeptor zur Betrachtung der Effizienz und die zugrunde liegende Stöchiometrie von Donor und Akzeptor Molekülen.

Für ein Donor-Akzeptor-Paar entspricht der konstante Förster-Radius R_0 einer Entfernung, bei der die Effizienz bei 50% liegt. Mit der Verwendung von der Formel 9,10 und 11 kann die Effizienz in Abhängigkeit der Entfernung und des spezifischen Förster-Radius beschrieben werden als

$$E = \frac{1}{\left(1+r/R_0\right)^6} \cdot \quad (11)$$

Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 2.8 schematisch dargestellt. Die Stöchiometrie S gibt das relative Verhältnis von Donor und Akzeptor an, wobei bei 1 nur Donor Moleküle und bei 0 nur Akzeptor Moleküle zu finden sind.

Bei einem Donor-Akzeptor Paar liegt die Stöchiometrie S bei 0,5, da zu jedem Donor ein Akzeptor Molekül im Energietransfer zugeordnet wird. Abweichung von diesem Wert zeigen mögliche Interaktionen von mehr als zwei Molekülen, wie es bei der Interaktion von mehreren Proteinen z.B. bei Aggregation geschehen kann. Schematisch ist die Einsortierung von FRET-Signalen in einem Effizienz/Stöchiometrie Plot in Abbildung 2.8 ohne Aggregation gezeigt.

Zur Bestimmung des Förster-Radius wird nach der Theorie von Förster das Überlappintegral $J(\lambda)$ von Donor Emission und Akzeptor Absorption benötigt. Ebenso die Quanten Ausbeute des Donors Φ_D und der Refraktionsindex des verwendeten Mediums n und dem Orientierungsfaktor κ^2 zwischen Donor und Akzeptor:

$$R_0 = 0.211 \cdot \sqrt[6]{\kappa^2 n^{-4} Q_D J(\lambda)} \quad (12)$$

Das Überlappintegral kann bei einer Normalisierung des Emissionsspektrums des Donors

$$\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda = 1 \quad (13)$$

mittels Extinktionskoeffizient des Akzeptors $\epsilon_A(\lambda)$ bestimmt werden und man erhält

$$J(\lambda) = \int_0^\infty F(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda. \quad (14)$$

Exemplarisch sind in Abbildung 2.9 die Spektren von Alexa 568 und Alexa 647 (Sigma Aldrich, Germany) gezeigt. Das Überlapp Integral ist hierbei in Rosa eingefärbt. Der Orientierungsfaktor ist abhängig von der Orientierung der Dipole des Donors und Akzeptors zueinander, da eine Energieübertragung zwischen zwei Elektronen nur bei richtiger Ausrichtung ihrer Dipole zueinander möglich ist. Hierbei sind die Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donors und dem Absorptionsdipol θ_{DA} und die Winkel zwischen dem Verbindungsvektor des Donors und Akzeptors und dem Donor θ_D und dem Akzeptor θ_A entscheidend.

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cdot \cos \theta_A)^2 \quad (15)$$

Zur Verdeutlichung der Winkel sind diese schematisch in Abbildung 2.10 aufgetragen. κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen. Bei einer Orthogonalität aller Winkel wird $\kappa^2 = 0$ und es wird somit auch kein FRET-Signal erreicht. Der Maximale Wert von 4 wird bei absoluter Kollinearität erzeugt und 1 bei parallelen Dipolen. Bei Untersuchungen in Lösung und somit einem Ensembledurchschnitt (schnelle Rotation) wird ein $\kappa^2 = 2/3$ erzielt.

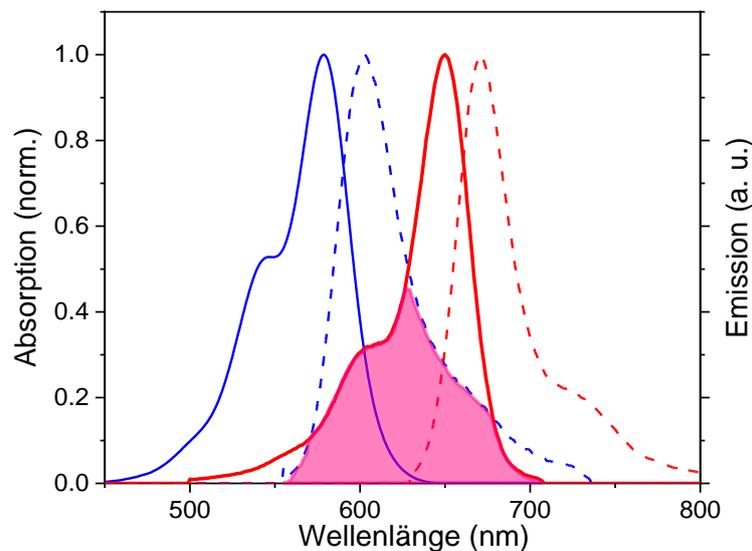


Abbildung 2.9: Normiert Absorption (durchgehende Linie) und Emission (gestrichelte Linie) von Alexa 568 (blau) und Alexa 647 (rot) und das entstehende Überlappintegral J (rosa Fläche).

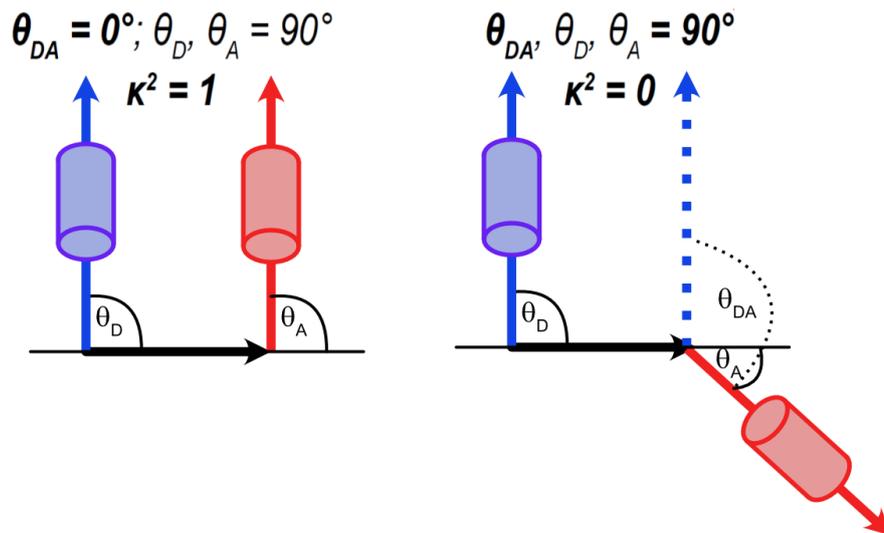


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Dipolmomente von Donor (blau) und Akzeptor (rot). Die Extrema bei paralleler und orthogonal liegenden Dipolen sind gezeigt. Die Winkel zur Bestimmung von κ^2 sind angedeutet.

Aufgrund dieser Annahme kann für die verwendeten Donor-Akzeptor-Paare R_0 bestimmt werden. Diese stellen eine Approximation da, da die Kopplung an die Proteine und Einbettung in die Membran den κ^2 Wert beeinflussen können. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Wert von $\kappa^2 = 2/3$ auch bei gebundenen Farbstoffen eine gute Approximation zur Bestimmung der Abstände darstellt (dos Remedios 1987, Clegg 1992, van der Meer 2002, Majumdar 2005). Die berechneten Werte für Alexa 568 und Alexa 647N (Sigma Aldrich, Germany) und Atto 568 und Atto 647N (Atto Tec, Germany) sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: FRET-Parameter für die verwendeten Donor-Akzeptor-Paare. Quantenausbeute und Extinktionskoeffizient ϵ sind von den Herstellern von Alexa 568 und Alexa 647N (Sigma Aldrich, Germany) und von Atto 568 und Atto 647N (Atto Tec, Germany) angegeben.

Donor	Akzeptor	QY_{Donor}	$\epsilon_{\text{Akzeptor}}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	$J(\lambda)$ $10^{15} M^{-1}cm^{-1}nm^{-4}$	R_0 (\AA)
Alexa 568	Alexa 647	0,69	270 000	15,89	76,83
Atto 565	Atto 647N	0,9	150 000	7,04	70,11

3. Material und Methoden

3.1 Cytochrom-c-Oxidase Varianten

In dieser Arbeit werden CcO Varianten aus *P. denitrificans* verwendet. Hierzu wurde in der AG Alexiev von Herrn Dr. Wolf ein neues Expression System entwickelt (Wolf 2020). In diesem System wurde der Wildtyp (WT) und eine Cystein-Oberflächen-freie (CS) Variante (mit neuen Vektor pAW16) entwickelt. Weitere Varianten wurden basierend in diesem Vektor von Victor Loyo Cruz und mir entwickelt und mittels des etablierten Protokolls zur Mutagenese, Transformation und Protein Aufreinigung erzeugt. Die Kristallstruktur von Untereinheit I und II von CcO mit den Mutationsstellen ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

Vektoren und folgende Proteine werden in der Arbeit verwendet:

Wildtyp (WT): Das WT-Protein ist von Herr Dr. Wolf in der Arbeitsgruppe Alexiev mittels seines neuen Expression Systems hergestellt worden. Die Untereinheiten I, II und III sind hierbei auf dem Vektor pAW13 lokalisiert. Herstellung und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll in (Wolf 2020).

Reaktive Cysteinen freie Variante (CcO-CS): Basierend auf dem WT-Vektor pAW13 wurde eine von reaktiven Cysteinen freie CcO Vektor pAW16 von Herrn Dr. Wolf generiert. Diese Variante wurde für die weiteren Mutationen verwendet. Herstellung und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll in (Wolf 2020).

pAW16-P301C (CcO-P301C): Basierend auf dem CS-Vektor pAW16 (s.o.) wurde an Position 301 ein Prolin durch ein Cystein ersetzt. Die Position befindet sich in der Nähe des K-Kanals Eingangs auf der N-seite der CcO. Herstellung und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll in (Wolf 2020).

pAW16-A259C (CcO-A259C): Basierend auf dem CS-Vektor pAW16 (s.o.) wurde an Position 259 ein Alanin durch ein Cystein ersetzt. Die Position befindet sich an der Oberfläche auf der P-Seite der CcO. Herstellung und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll in (Wolf 2020).

pAW16-D156N (CcO-D156N): Basierend auf dem CS-Vektor pAW16 (s.o.) wurde an Position 156 ein Alanin durch ein Asparagin ersetzt. Die Position befindet sich an der Oberfläche auf der P-Seite der CcO. Herstellung und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll in (Wolf 2020).

pAW16-D156C (CcO-D156C): Basierend auf dem CS-Vektor pAW16 (s.o.) wurde an Position 156 ein Alanin durch ein Cystein ersetzt. Die Position befindet sich an der Oberfläche auf der P-Seite der CcO. Herstellung und Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll in (Wolf 2020).

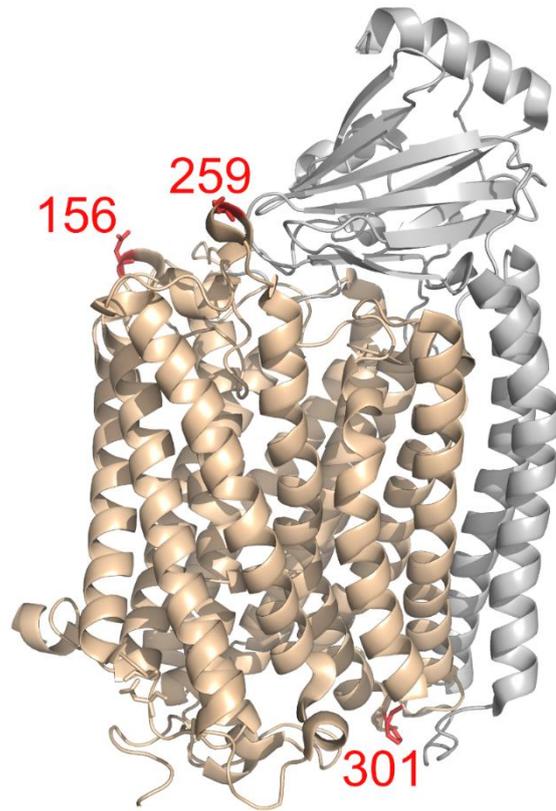


Abbildung 3.1 Kristallstruktur von CcO aus *P. denitrificans* (pdb 3HB3). Untereinheit I ist in Orange und Untereinheit II in Grau gezeigt. Die Mutationsstellen der Varianten sind mit Rot und ihrer jeweiligen Position gekennzeichnet. Diese Untereinheiten stellen die kleinste funktionale Einheit der CcO dar.

3.2 Arch3 Varianten

In dieser Arbeit werden zeitaufgelösten Fluoreszenzeigenschaften von mikrobiellen Rhodopsinen untersucht um das Zusammenspiel von spannungssensitiven Domänen und dem resultierenden fluoreszierenden Signal zu untersuchen. Hierfür habe ich diverse Aufbauten benutzt um sowohl die Änderungen in der Fluoreszenzintensität als auch der Fluoreszenzlebenszeit in Abhängigkeit der Änderung des Membranpotentials in einzelnen Zellen zu untersuchen. Die Kombination aus diesen beiden Parametern ermöglicht die Identifizierung molekularer Mechanismen, die zu einer Änderung der Fluoreszenz führen, wie beispielsweise statisches oder dynamisches Quenching (Alexiev and Farrens 2014).

Zuerst wurden die Fluoreszenzeigenschaften der aufgereinigten Arch3 Varianten untersucht und danach die Membranpotential abhängigen Fluoreszenzänderungen in einem *E.coli* Zell Test mittels zweier Ionophore, Gramicidin (Sigma Aldrich, Germany) (Kelkar and Chattopadhyay 2007, Te Winkel 2016) und dem Protonophor (2,6-dihydroxy-1,1,1,7,7,7-hexafluoro-2,6-bis(trifluoromethyl)heptane-4-one (1799) (Sigma Aldrich, Germany) (Tittor 1994) untersucht. Durch diese Ionophore wurde das Membranpotential der Zellen von \sim -140 mV auf 0 mV über die Zeit verändert.

Die Proteine wurden in *E. coli* C41 (DE3) exprimiert und vermessen. Für *in vitro* Messungen wurden die Varianten aus *E. coli* C41 (DE3) aufgereinigt und als Protein/Detergens Mizellen in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,02% Dodecyl-beta-D-maltosid (DDM) (Sigma Aldrich,

Germany), 0,004% Cholesterylhemisuccinat Tris-salz (CHS) (Sigma Aldrich, Germany) und 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Sigma Aldrich, Germany) untersucht. Quasar1, Quasar2, Archon1 und Archon2 wurden in SMA-Nanodisks mit einer Pufferlösung 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl rekonstituiert. Die gezielte Mutagenese, die Expression in *E. coli* und Aufreinigung wurde von Frau Arita Silapetere (AG Hegemann, HU Berlin) nach bestehenden Protokollen durchgeführt (Penzkofer 2019).

Die Spannungssensorproteine Archon1 und Archon2 werden in den von mir entwickelten proteoliposomalen Assay (Siehe Kapitel 4.4) verwendet um eine Charakterisierung der Änderung des Membranpotentials als Änderung des Fluoreszenzsignals zu erhalten. Archon1 wird in den Proteoliposomen in Kombination mit den CcO Varianten verwendet (siehe Kapitel 6).

3.3 Bacteriorhodopsin

Die Präparation der Bakterien und die Expression von Bacteriorhodopsin wurde durchgeführt wie in (Krebs and Khorana 1993, Alexiev 1995) beschrieben. Die Isolation der Purpurmembranen erfolgte durch Ab-Zentrifugation der Bakterien, Lysieren mit deionisiertem Wasser und mehrmaligen Zentrifugationsschritten. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 3°C gelagert. Danach wurde ein Pufferaustausch mittels Gravity Flow Sephadex G25 Säule (1ml) zu 10mM Tris 40mM NaCl pH 7 erreicht und die Probe via Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 Minuten mit Filtern (Porengröße bis zu 5 kDa) konzentriert. Für die Untersuchung im Flash Laser Aufbau wird der WT aus (Alexiev 2000) verwendet.

3.4 Fluorophore

Zur Untersuchung von Eigenschaften und strukturellen Ausrichtungen werden organische Fluorophore verwendet werden, die mittels biochemischer Verfahren an Cystein- oder Lysinreste der verwendeten Proteine gekoppelt werden. Dazu wurde zwei Fluorescein Derivate, 5-Iodacetamidofluorescein (IAF) und Fluorescein Isothiocyanat (FITC) als Fluoreszenz-Reportergruppen gewählt. Des Weiteren wurden für die Kollokalisierungs Experimente von CcO zwei organische Fluorophore (Atto 568 und Atto 647N) benutzt, die durch eine Überlappung ihrer Emission und Absorptionsbanden FRET Experimente ermöglichten.

Um ein Protein mit einem Farbstoff zu markieren, werden das Protein und der Farbstoff zusammen inkubiert, wodurch es bei optimierten Lösungsbedingungen wie pH und Salzkonzentration zu einer biochemischen Reaktion bzw. Bindung kommt. Das optimale Verhältnis zwischen Protein und Farbstoff und den umgebenden Faktoren wird für jedes Paar experimentell bestimmt. Bei der Reaktion mit den Thiolgruppen der Cysteine wird zusätzlich Dithiothreitol (DTT) während der Inkubation hinzugegeben. DTT reduziert die Thiolgruppen und bricht somit mögliche intermolekulare Disulfidbrücken auf, die eine Koppeln des Farbstoffes verhindern würden.

Nach der Reaktion wird der noch freie Farbstoff, mittels Gelchromatographie abgetrennt. Dazu wurden die Proben auf eine mit 5 ml Sephadex G25 (Fine) (GE Healthcare) gefüllten Säule gegeben, die mit dem jeweiligen Probenpuffer vorab equilibriert wurde. Das markierte Protein wird in verschiedenen Fraktionen aufgefangen.

Zur Bestimmung der Label Stöchiometrie wird das Verhältnis von gebundenen Farbstoff c_F und Protein c_{Prot} durch die die Absorptionsmaxima des gebundenen Farbstoffes A_F und des Proteins A_{Prot} und deren Absorptionskoeffizienten ϵ wie folgt bestimmt

$$\frac{c_F}{c_{Prot}} = \frac{A_F \cdot \epsilon_{Prot}}{A_{Prot} \cdot \epsilon_F} \quad (16)$$

Bei einer Überlagerung der Absorbanzen von Protein und Farbstoff wird ein Differenzspektrum aus markiertem und nicht markiertem Protein berechnet und die daraus erhaltenen Absorptionsmaxima verwendet.

3.4.1 Iodacetamidofluorescein

Fluorescein ist ein Xanthen Farbstoffderivat und besitzt im pH-Bereich von pH 1 bis pH 10 drei Protonierung und Deprotonierungs Übergänge (Zanker and Peter 1958). Bei stark sauren pH-Werten um 2 liegt das Fluorescein als reines Kation vor und besitzt phosphoreszierende Eigenschaften (Lewis 1941). Dagegen sind der neutrale und die anionischen Zustände fluoreszierend. Somit unterscheiden sich die Zustände des Fluoresceins in ihren Absorptions- und Emissionseigenschaften. In der dianionischen Form zeigt sich das Absorptionsmaximum bei 490nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Protonierungs Übergänge und die daraus resultierenden pKa können mittels der Henderson-Hasselbalch Gleichung zu 2,2, 4,4 und 6,3 (Alexiev 2003) bestimmt werden. Bei der Kopplung an Proteine können diese pKa Werte durch lokale Oberflächenpotentiale, Ladungen und die Nähe zur wässrigen Lösung beeinflusst werden und somit als lokale pH Sonde eingesetzt werden (Alexiev 2003). Die Kopplung mit Proteinen wird mittels der Iodoacetamid Gruppe erreicht, die eine kovalente Bindung mit den Cysteinresten von Proteinen eingeht.

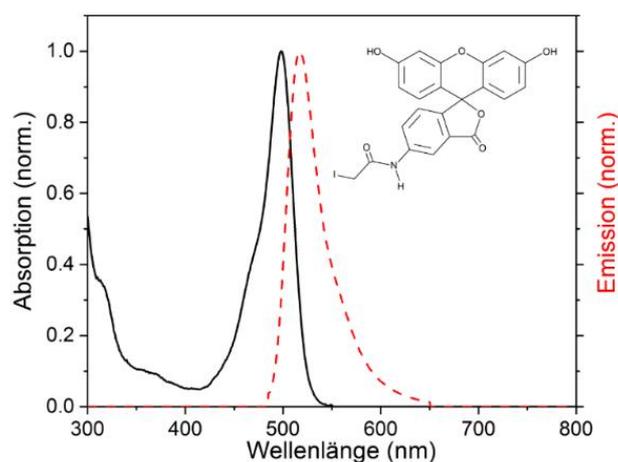


Abbildung 3.2 Normierte aufgenommene Spektren der Absorption und Emission von IAF bei pH 9 und dessen chemische Struktur.

3.4.2 Fluorescein Isothiocyanat

Bei diesem Fluorophor handelt es sich ebenfalls bei der fluoreszierenden Gruppe um ein Fluorescein, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Die Linker Gruppe besteht bei diesem Derivat aus einem Isothiocyanat, das an Lysinreste von Proteinen gekoppelt werden kann. In seiner deprotonierten Form besitzt Fluorescein Isothiocyanat (FITC) einen Extinktionskoeffizienten ϵ von $73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

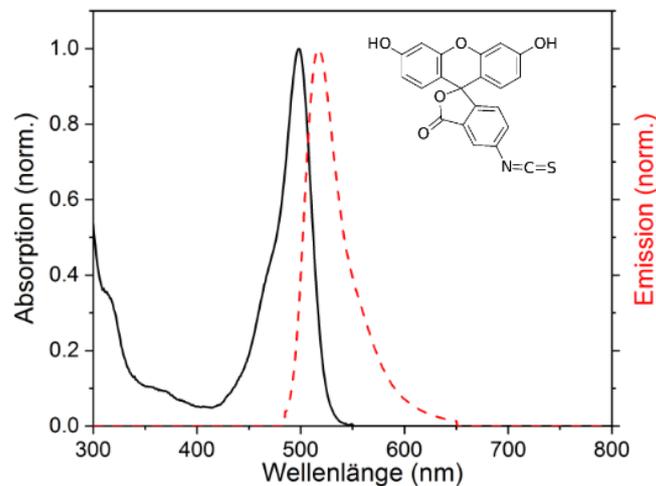


Abbildung 3.3 Normierte aufgenommene Spektren der Absorption und Emission von FITC und dessen chemische Struktur.

3.4.3 Atto 647N Maleimid

Der Fluoreszenzfarbstoff Atto 647N (ATTO-TEC GmbH, Deutschland) ist ein Carbopyronin-Carboxy Farbstoffderivat mit einem Absorptionsmaximum bei 646 nm und einem Emissionsmaximum bei 664 nm. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{664\text{nm}}$ ist $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In dieser Arbeit wird dieser Farbstoff zur Kollokalisierung von CcO in den Proteoliposomen genutzt. Der Farbstoff wird mittels einer Maleimid Gruppe an ein Cysteinrest kovalent gekoppelt.

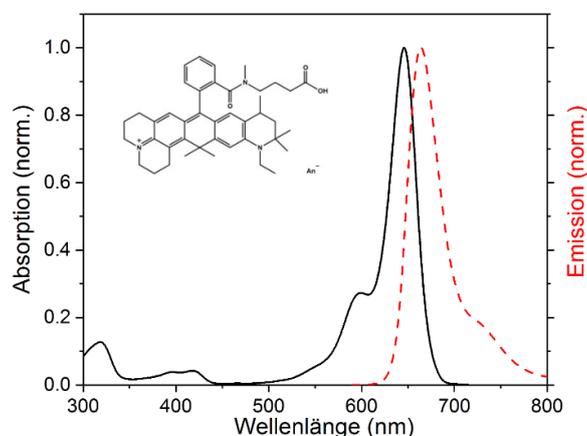


Abbildung 3.4 Normierte aufgenommene Spektren der Absorption und Emission von Atto 647N und dessen chemische Struktur.

3.4.4 Atto 565 Maleimid

Der Fluoreszenzfarbstoff Atto 565 (ATTO-TEC GmbH, Deutschland) ist ein Rhodamin Farbstoffderivat mit einem Absorptionsmaximum bei 564 nm und einem Emissionsmaximum bei 590 nm. Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{664\text{nm}}$ ist $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. In dieser Arbeit wird dieser Farbstoff zur Kollokalisierung von CcO in den Proteoliposomen genutzt. Der Farbstoff wird mittels einer Maleimid Gruppe an ein Cysteinrest kovalent gekoppelt.

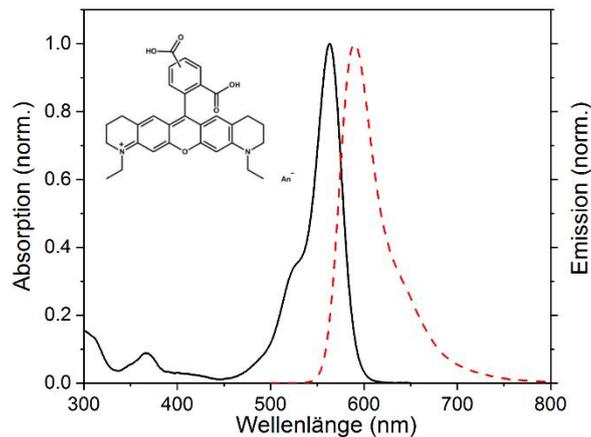


Abbildung 3.5 Normierte aufgenommene Spektren der Absorption und Emission von Atto 565 und dessen chemische Struktur.

3.4.5 Indocarbocyanin3- Polyethylenglycol-biotin

Indocarbocyanin3 (Cy3) gehört zu der Gruppe der Cyanin Farbstoffen. Aufgrund seiner Struktur mit zwei Indolgruppen verbunden durch eine Polymethin Kette ist eine Rotation möglich. Durch eine Photoisomerisierung können verschiedene Isomere des Farbstoffes entstehen. Im Grundzustand ist Cy3 im all-trans (0°) Zustand und wechselt nach Photon Absorption in den gedrehten (90°) oder cis (180°) Zustand. Relaxation in den Grundzustand findet entweder durch Fluoreszenz Emission, Interne Umwandlung oder weitere Photoisomerisierung statt. Abhängig durch äußere Einflüsse, die das Molekül schneller isomerisieren lassen, ist die Fluoreszenzlebensdauer verkürzt (Boreham 2017, Ober 2019). Das in dieser Arbeit verwendete Cy3-PEG-Biotin ist zusätzlich mit einer Polyethylenglycol (PEG) Molekülgruppe als Abstandshalter zu der Linker Gruppe Biotin versehen, um die ungehinderte Koppelung an die oberflächenaktivierten Objektträger zu erlauben.

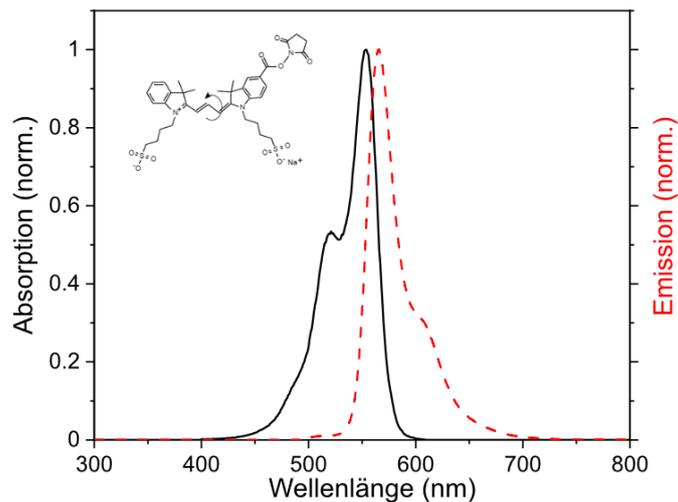


Abbildung 3.6 Normierte aufgenommene Spektren der Absorption und Emission von Cy3 und dessen chemische Struktur mit angedeuteter Torsionsachse an der Polymethin Kette.

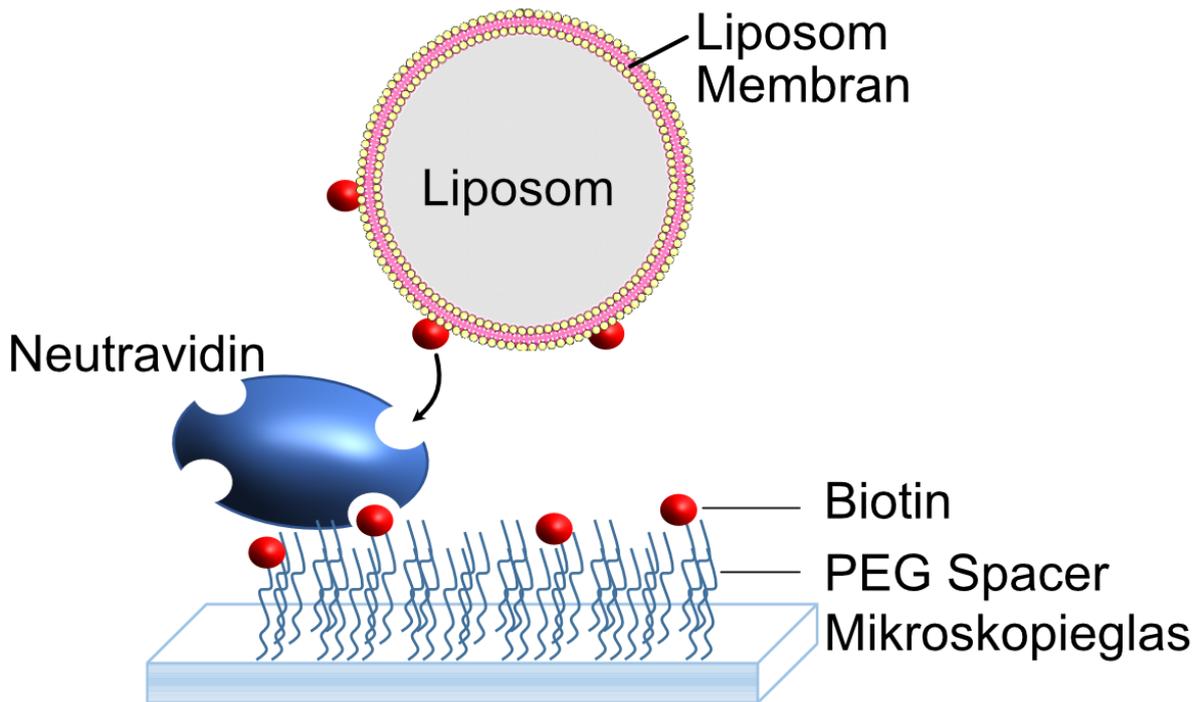
3.5 Proteoliposome

Für die Erstellung der Proteoliposome mit einem Durchmesser von ~ 100 nm wird eine von mir angepasste Dünn Film Verdampfungstechnik (Olson 1979, Ober 2019) verwendet. Die Lipide werden in einer 1:1000 DSPE-Biotin PEG:DMPC (Avantis Polar Lipids, USA) Mischung in Chlorform mit einer DMPC-Konzentration von 1mg/ml angesetzt und unter Stickstoffatmosphäre auf Glas gedampft. Das DSPE-Biotin wird zur späteren Kopplung via Neutravidin-Biotin als Anker-molekül an die vorbereiteten oberflächenaktivierten Mikroskopie Gläser verwendet. Restliche Flüssigkeit wird für 3 Stunden mit einem Vakuum Exsikkator entfernt. Danach wird hochreines Wasser zugegeben, um eine Konzentration von 1,5 mM DMPC zu erreichen. Zur ersten Erstellung von großen Multilamellaren Vesikeln (MLV) wird die Lösung bei 90°C für 30 Minuten ausgebacken und bei 65°C für 8 Stunden stehen gelassen. Danach erfolgte die weitere Lagerung unter Schutzatmosphäre bei 3°C .

Zur Formierung von unilamellaren Proteoliposomen mit einer durchschnittlichen Größe von 100 nm wird ein Extruder (Avanti Polar Lipids, USA) verwendet. Hierzu wird die MLV-Lösung bei 35°C , die sich über der Übergangstemperatur von DMPC zur flüssigkristallinen Phase befindet, gebracht und 10-mal durch eine Membrane mit Porengröße von 100 nm mechanisch gedrückt.

Die MLVs werden kurz vor dem Extrudieren mit dem jeweiligen Protein mit relativer angestrebter Konzentration zu den Vesikeln vermischt. Da die verwendeten Proteine Membranproteine sind, muss mittels Bio-Beads SM-2 Absorber (Bio-Rad, Deutschland) das verwendete Tensid β -DM der Protein-Lösung entzogen werden. Die Proteine orientieren sich dabei spontan neu in die MLV-Membranen.

Das Protokoll zur Oberflächenfunktionalisierung der Mikroskopie Gläser mittels eines Biotin-Neutravidin Anker ist von mir angepasst verwendet worden aus (Schmid 2016).



Die Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Kopplung der Proteoliposome mit Biotin (rot Kugel) an die oberflächenaktivierten Mikroskopie Gläser mittels Neutravidin (blau) und der Kopplung von Neutravidin an die Mikroskopie Gläser mit Biotin verankert auf einem PEG Spacer zum Mikroskopie Glas.

Proteoliposome werden auf den vorbereiteten aktivierten Gläsern fixiert. Hierzu werden die Gläser vorab mit 0.5mg/ml Neutravidin (Neutravidin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 2 Minuten benetzt. Nach drei Waschschrritten mit dem jeweiligen Puffer wird die Liposom-Lösung für weitere 2 Minuten auf die Gläser gegeben und ebenfalls danach mit dem Puffer 5 mM Tris pH 7.5, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid gewaschen.

Um die unterschiedlichen Membranpotentiale zu erreichen wird der externe Puffer mit veränderter KCl Konzentration (0.5, 10 and 150mM) ausgetauscht. Hierbei wird die gesamte Ionenkonzentration von 150 mM durch angepasste Tetraethylammoniumchlorid Konzentration konstant gehalten. Mittels der Nernst-Gleichung wurde das Membranpotential $E_{Membran}$ aus dem Kaliumkonzentrationsunterschied bestimmt,

$$E_{Membran} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[K]_{au\beta en}}{[K]_{innen}} \right) \quad (17)$$

mit R der Idealen Gaskonstanten, T Temperatur, z Valenzzahl des Ions, F Faraday Konstante und der jeweiligen Kalium Konzentration innen $[K]_{innen}$ und außen $[K]_{au\beta en}$. Hierbei wurden als Membranpotentiale für die unterschiedlichen Kalium Konzentration im äußeren Medium mit -75 mV, 0 mV und 68 mV bestimmt.

3.6 Fluoreszierende DNS-Referenzprobe

Zur Justage des ALEX-FRET Aufbau wird eine Fluoreszenz markierte dsDNS verwendet. Diese wurde von der Firma IBA GmbH hergestellt mit dem Farbstoffen Alexa 568 und Alexa 647 mit zwei spezifischen Entfernungen (Basenpaarentfernung 15 oder 23) verbunden. Die DNS ist am 5'ende des Akzeptoren Stranges mit Biotin verknüpft und erlaubt somit eine Bindung mit Neutravidin (Sigma Aldrich, Deutschland). Selbst vorbereitete mit mPEG und Biotin-PEG (Rapp Polymer, Deutschland) oberflächenaktivierte Mikroskopie Gläser werden für 2 Minuten mit 0.5mg/ml Neutravidin gekoppelt und danach mit Puffer (20mM MgCl, 5mM NaCl, 5mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die dsDNS wird in einer Konzentration von 20 pM für 2 Minuten auf die Gläser gegeben und danach mit dem Puffer drei Mal gewaschen und analysiert.

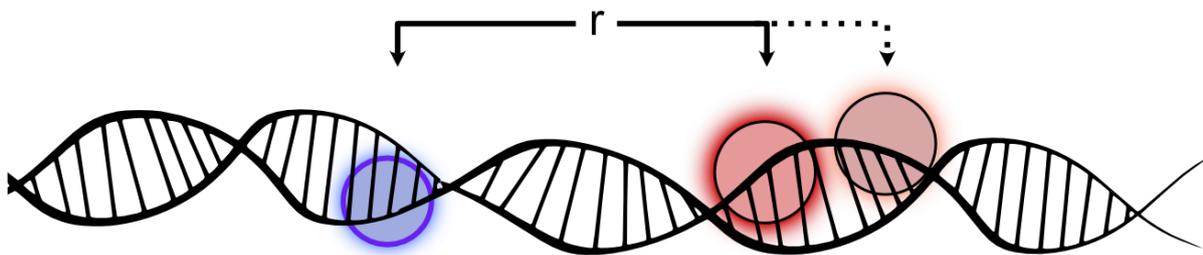


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der dsDNS Proben mit Donor (blau) und Akzeptor (rote) als Kugeln stilisiert. Die Proben besitzen an unterschiedlichen Basenpaaren die Verbindung zum Akzeptor, womit eine Unterschiedliche Distanz zwischen Donor und Akzeptor ermöglicht wird.

3.7 Präparation und Markierung von Cytochrom-c-Oxidase

Die Mutation, die Expression der Varianten und Aufreinigung wurde durch Alexander Wolf, Victor Loyo Cruz und mir nach dem bestehenden Protokoll (Wolf 2020) durchgeführt. Das Markieren mit den Fluoreszenzfarbstoffen erfolgte in aufgereinigter vier Untereinheiten Form in 60 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,05% β -DM. Die CcO Variante CcO-P301C wurde mit den Farbstoffen Atto 647N, Atto 565 und IAF jeweils bei 21°C für eine Stunde markiert.

Bei der Markierung mit IAF wurde bei einem 100-fachen Farbstoffüberschuss und 20-fachen Dithiothreitol (DTT) (Sigma Aldrich, Germany) Überschuss alle Proteine markiert (Stöchiometrie von 100%).

Bei der Markierung von CcO-P301C wurde bei einem 60-fachen Farbstoffüberschuss bei Atto 568 eine Stöchiometrie von 55% und bei Atto647N eine Stöchiometrie von 100% erreicht.

Nach der Markierung wurde das Protein vom freien Farbstoff wie in Kapitel 3.4 beschrieben gereinigt und zusätzlich die Untereinheiten III und IV abgetrennt, da diese eine unspezifische Markierung mit den Farbstoffen zeigten. Hierzu wurde die Probe mit dem starken Detergens Dodecylmethylaminoxid (LDAO) versetzt um die Abtrennung von Untereinheiten III und IV

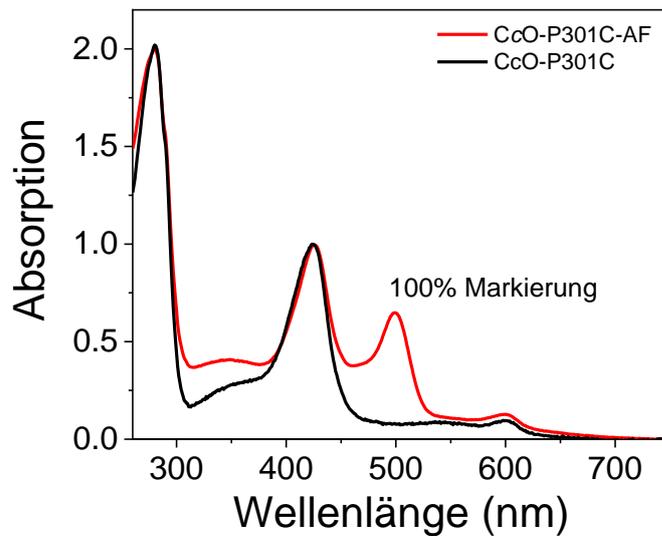


Abbildung 3.9: Markierung von CcO-P301C mittels IAF. CcO-P301C wurde bei 21°C für 1 Stunde mit 100-fachen Überschuss an IAF markiert und danach mittels Gravity Flow in einer Sephadex G25 Säule aufgereinigt und mittels weiterer Präparation mit den Untereinheiten I und II aufgereinigt. Puffer in 60 mM Tris (pH 8,0), 60 mM NaCl, 0,05% β -DM. In Schwarz die unmarkierte Probe, in Rot die Probe nach Markierung und Aufreinigung. Bestimmung der Markierung erfolgte aus der Konzentrationsbestimmung des gebundenen Farbstoffes und der CcO Konzentration.

zu erreichen. Dabei wurde 3% LDAO für 90 Minuten bei 4°C bei starkem Schütteln der Probe zugesetzt. Danach wurde die Untereinheiten I und II durch Kopplung an eine Ni-NTA Säule von den restlichen Untereinheiten getrennt und durch 10 mM Imidazol Zugabe im Puffer wieder abgetrennt. Mittels Zentrifugation bei 5000 rpm in Filtern mit einer Membran (Durchlass von Partikeln unter 50kDa) wurde ein Pufferaustausch zu 20 mM KPP pH 8,0 20 mM NaCl und 0,05% β -DM durchgeführt und die Probe bei -80°C gelagert.

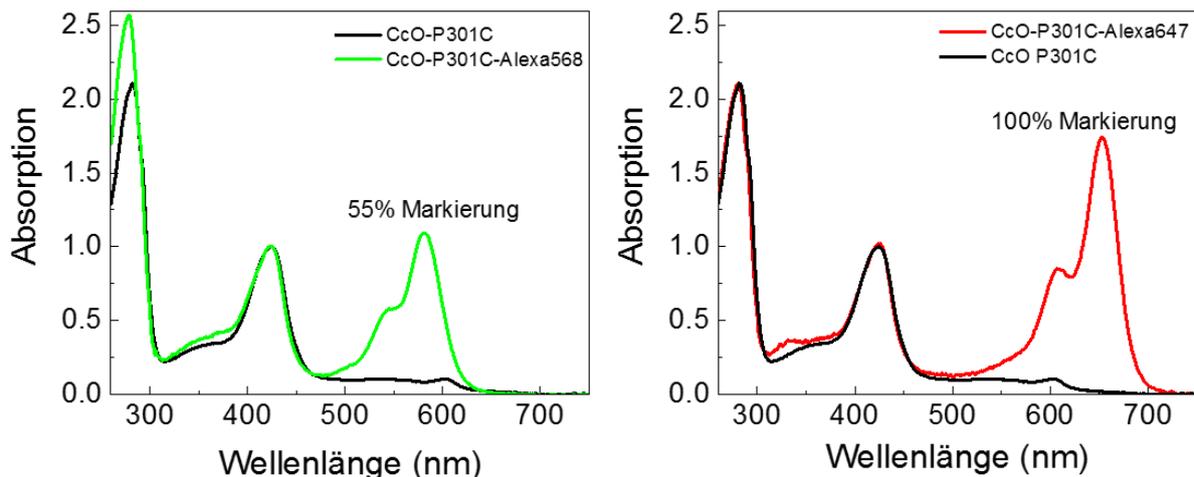


Abbildung 3.10: Markierung von CcO-P301C mittels Atto Farbstoffen. CcO-P301C wurde bei 21°C für 1 Stunde mit 60-fachen Überschuss an Atto Farbstoffen markiert und danach mittels Gravity Flow in einer Sephadex G25 Säule aufgereinigt und mittels weiterer Präparation mit den Untereinheiten I und II aufgereinigt. Puffer in 60 mM Tris (pH 8,0), 60 mM NaCl, 0,05% β -DM. In Schwarz die unmarkierte Probe, in grün, bzw. rot die Probe nach Markierung und Aufreinigung. Bestimmung der Markierung erfolgte aus der Konzentrationsbestimmung des gebundenen Farbstoffes und der CcO Konzentration.

3.8 Präparation und Markierung von Arch3 Varianten

Die gezielte Mutagenese, die Expression in *E. coli* und Aufreinigung in Mizellen oder in Nanodisks wurde von Arita Silapetere (AG Hegemann, HU Berlin) nach bestehenden Protokollen durchgeführt (Penzkofer 2019) für alle Arch3 Varianten durchgeführt. Das Markieren mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC der Arch3 Variante Archon1 erfolgte in 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% β -DM in 10-fachem Überschuss von FITC für eine Stunde bei 21°C. Durch die Konzentrationsbestimmung des gebundenen Farbstoffes an Archon1 wird eine Markierungsstöchiometrie von 22% bestimmt.

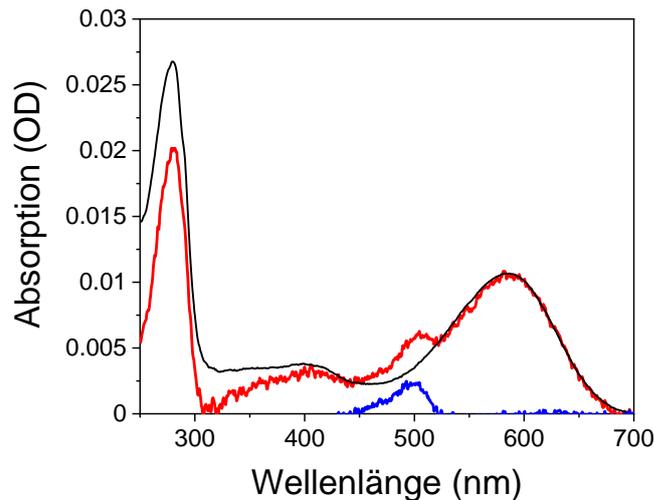


Abbildung 3.11: **Markierung von Archon1 mittels FITC.** Archon1 wurde bei 21°C für 1 Stunde mit 10-fachen Überschuss an FITC gelabelt und danach mittels Gravity Flow in einer Sephadex G25 Säule aufgereinigt. Puffer in 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,02% DDM, 0,004% CHS und 0,1 mM PMSF. In Schwarz die unmarkierte Archon1 Probe, in Rot die Probe nach Markierung und Aufreinigung und in blau das Differenzspektrum.

3.9 Absorption und Fluoreszenz Spektroskopie

Absorptionsmessungen wurden mit einem UV2450 (Shimadzu, Kyoto, Japan) Spektrometer mit einer Spektralen Auflösung von 0,5 nm durchgeführt. Die Proben wurden in Küvetten (Helma, Germany) mit einer Weglänge d von 0,3 cm untersucht. Abhängig von der Probe wurde ein Wellenlängenabschnitt zwischen 250 und 800 nm untersucht. Konzentrationen c von absorbierenden Proben wurden mittels des Lambert-Beers Gesetzes durch die Absorption A_λ durch bekannte Extinktionskoeffizienten ϵ_λ bestimmt.

$$A_\lambda = d \cdot \epsilon_\lambda \cdot c \quad (18)$$

Intensitätsbasierende Untersuchung von Proben in wässriger Umgebung wurden mit einem Spektrometer Fluoromax-3 (Horiba Jobin Yvon, Kyoto, Japan) aufgenommen. Hierzu befand sich der Aufbau in einer L Konfiguration. Die Proben wurden mittels eines Peltier Elements temperiert.

Die Anregung und Emissions-Matrix-Scans für die Arch3 Varianten wurden bei 20°C aufgenommen. Für die Anregungsspektren wurde die Anregung zwischen 380 und 700 nm in 1 nm Schritten and 1s Aufnahmezeit verändert und bei 710 nm die Emission aufgenommen. Für den Matrix Scan wurden die Proben angeregt von 500 bis 650 nm in 5 nm Schritten und

die Fluoreszenzemission zwischen 600 und 800 nm in 1 nm Schritten and 1s Aufnahmezeit detektiert.

3.10 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde ein neuer zeitaufgelöster Aufbau konzipiert und aufgebaut.

Zur Detektion schnelllebiger Intermediate von lichtsensitiven Proben und deren charakteristischen Aufbau- oder Zerfall Zeiten wurde im Zuge dieser Arbeit ein bestehender Flash Laser Aufbau umgebaut und erweitert. Mithilfe dieses Aufbaus wird die Änderung der Absorption von photoaktiven Proteinen bis in den 100 ns Bereich bestimmt. Hierdurch können z.B. Photozyklen bestimmt werden, oder Änderungen der Kinetik durch Mutationen untersucht werden. Hierzu wird mit einem kurzen intensiven Laserpuls (20 bis 90 mJ in 3 ns) eine Probe angeregt, deren zeitliche Absorptionsänderung ΔA nach dem Laserflash bei einer Wellenlänge λ_i detektiert wird. Um die zeitliche Auflösung zu gewährleisten, wird ein Photomultiplier Tube (PMT S4710, Hamamatsu) verwendet. Die ausgelesene Spannung $U(t)$ kann in Beziehung zur Absorptionsänderung gesetzt werden, wenn die ausgegebene Spannung vor Laseranregung U_0 bekannt ist:

$$\Delta A = \ln \frac{U_0}{U(t)} \quad (19)$$

Um verschiedene lichtsensitive Proben oder eine dynamische Anregung einer Probe in verschiedenen Zuständen zu ermöglichen wurde als Teil dieser Arbeit ein durch einen Nd:YAG Laser (Surelite EX, Amplitude) gepumpter optisch nicht linearer Kristall (Horizon OPO, Amplitude) in den bestehenden Aufbau integriert. Dieser ermöglicht Anregungspulse von bis zu 80 mJ bei einer Pulslänge von 3 ns in einem spektralen Bereich von 400 bis 2750 nm zu generieren. Der Laser wird mittels in der AG Alexiev geschriebener LabView-Software und

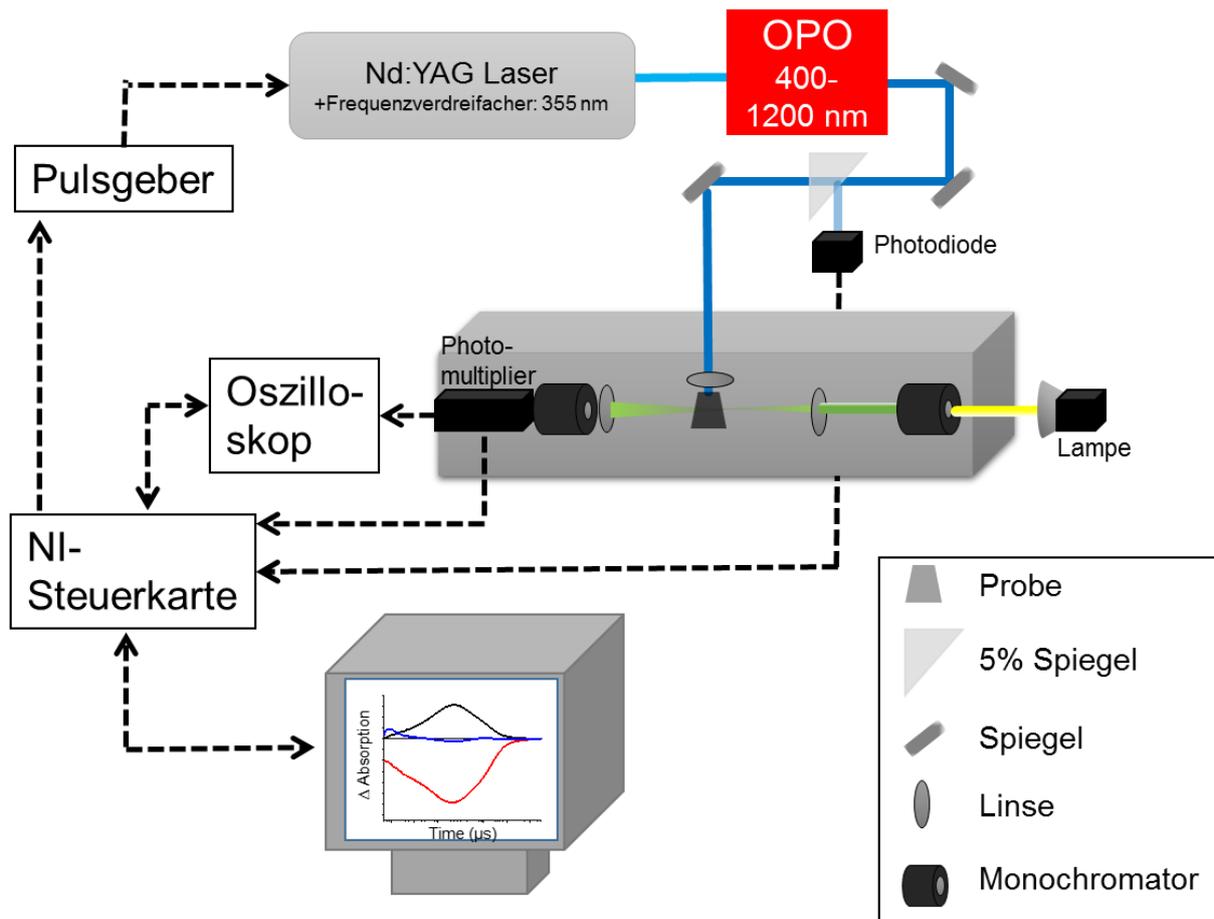


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des umgebauten FLASH Aufbaus. Laserstrahlengang sind als blaue Linien gezeigt. Elektronische Steuerung in schwarz mit Signalrichtung als Pfeile angedeutet. Ein Speicher-Oszilloskop ist zur schnellen Detektion ($<1\text{ms}$) zwischengeschaltet. Langsamere Änderungen ($>1\text{ms}$) wird direkt durch die NI-Steuerkarte aufgezeichnet. Fokussillinsen in der Probenkammer sind in grau dargestellt. Der Laserpuls wird mittels einer Photodiode als Startsignal an die Steuerkarte gegeben. Ein Pulsgeber koordiniert die Zeit zwischen Flashlampenentladung des Lasers und Öffnung des Q-switch um eine konstante Energie des Nd:YAG zu erreichen. Mittels Frequenzverdreifachung wird ein optisch parametrischer Oszillator (OPO) bei 355 nm angeregt. Aufgrund der verwendeten Optiken kann derzeit die Probe zwischen 400 und 1200 nm angeregt werden mit einer Maximalenergie pro Puls von 90 mJ.

einer Steuerkarte (NI-6009, NI) angesteuert und im Einzelschuss-Modus mittels kontinuierlicher Blitzlampenauslösung und getriggerten Q-switch Auslösung betrieben. Hierzu wird die korrekte Q-switch Verzögerung durch einen Pulsverzögerer (9200+ Sapphire, Quantum Composers) ermöglicht, der durch ein Gate-Signal der Steuerkarte den auf die Blitzlampe abgestimmte verzögerten Puls (maximale Energie bei $211\ \mu\text{s}$ Verzögerung) generiert. Der Start der Messung der Absorptionsänderung wird durch die Auskopplung von 5% des Anregungslichtes zu einer Photodiode (DET 210, Thorlabs) im Laserstrahlengang initiiert. Dieses Signal wird durch dieselbe Steuerkarte an den Messcomputer geleitet. Der Aufbau ist in Abbildung 3.13 schematisch gezeigt.

Die Änderung der Absorption wird durch einen in der AG aufgebauten Messstrahlengang detektiert. Das cw-Messlicht einer 100W Halogenlampe wird durch einen IR-Filter und mittels eines Monochromators spektral separiert und durch eine Linse auf die Probe fokussiert. Eine weitere Linse und ein weiterer Monochromator nach der Probe sichern eine gute Ausleuchtung des Photomultipliers (S4710, Hamamatsu) und verhindern, dass etwaiges Streulicht auf den Detektor fällt. Die resultierende Photospannung des Photomultipliers wird

über zwei Messkanäle ausgelesen, um eine hohe Zeitauflösung (<10 ns) und etwaige langlebige Zustände (>1s) zu detektieren. Jeder dieser Kanäle wird separat verstärkt und ausgelesen. Hierbei wird für kurze Zeiten (ns bis μ s-Bereich) das Spannungssignal des Flashphotolyse-Messaufbaus durch ein Speicheroszilloskop (9350M, LeCroy) registriert, welches die Spannungsänderungen mit bis zu 500 MHz aufzeichnen kann. Die Detektion für längere Zeiten wird durch die NI-Steuerungskarte mit bis zu 48 kHz gemessen. Die Spannungswerte V beider Kanäle werden in dem LabView Programm mittels einer vor dem Anregungslicht detektierten Spannung V_0 nachfolgender Gleichung in eine zeitliche Änderung der Absorption $\Delta A(t)$ ausgegeben, da diese proportional zu der gemessenen Lichtintensität I ist:

$$\Delta A(t) = \ln \frac{I_0}{I(t)} = \ln \frac{U_0}{U(t)} \quad (20)$$

Die zeitliche Veränderung der Absorption des Chromophoren eines Photorezeptors nach Anregung durch den Laserpuls resultiert aus dem Aufbau bzw. Zerfall verschiedener Photointermediate und den damit einhergehenden Veränderungen im Protein, z. B. eine Protonierung bzw. Deprotonierung des Chromophors. Die Veränderungen der Absorbanz der Probe durch den Anregungslaser resultieren aus dem Aufbau/Zerfall von Photointermediate. Diese lassen sich mit exponentiellen Modellfunktionen anpassen, wobei sich alle Photointermediate als Summe von exponentiellen Funktionen darstellt mit den Zeitkonstanten τ_n der einzelnen Photointermediate.

$$\Delta A(t) = \sum_n A_n e^{-t/\tau_n} \quad (21)$$

Der Aufbau wurde in dieser Arbeit neu konzipiert und unter anderem für Messungen in (Nagano 2022) verwendet. Die Software zur Detektion und Auswertung wurde in LabView angepasst und erweitert.

3.11 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie und Mikroskopie

In dieser Arbeit wird zur Detektion der Fluoreszenzlebenszeit die Technik der Zeit korrelierten Einzelphotonenzählung (englisch Time correlated single photon counting (TCSPC)) verwendet. Hierbei wird mittels gepulster Laser und Hybriddetektoren mit Einzelphotonen Sensitivität genutzt. Die Zeit zwischen Laserpuls und Reaktion des Detektors auf das erste Fluoreszenzphoton wird aufgenommen und in ein Histogramm aufgenommen. Durch hohe Repetitionsraten (im MHz Bereich) kann in kürzester Zeit die fluoreszente Zerfallskurve dargestellt werden. In dem verwendeten Aufbau wird ein Konfokales Laser Scanning Mikroskop verwendet, um zu dem konfokalen Bild auch die Fluoreszenzlebensdauer pro gescannten Pixel aufzunehmen (FLIM).

In dem verwendeten Aufbau wird ein invertiertes Start-/Stopp- System verwendet. Das Startsignal wird durch das registrierte Photon ausgelöst und das nächste Stoppsignal durch den synchronisierten Laser. Diese werden durch einen konstanten Fraktion Diskriminator (CFD) aufgenommen, um ein Amplitudenunabhängiges Zeitsignal zu erzeugen. Der Zeit zu Amplituden Umwandler (TAC) ist ein Kondensator, der ausgehend vom Startsignal bis zum

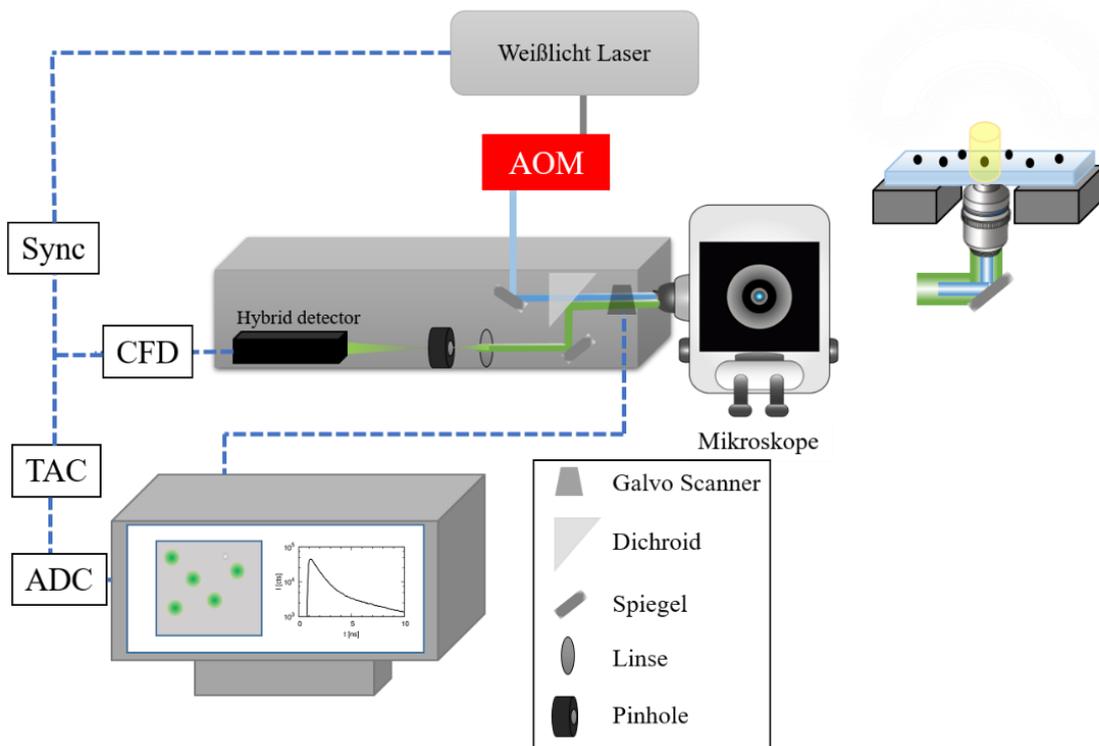


Abbildung 3.13: Schema des FLIM-Aufbaus. Einzelne Laserwellenlängen des verwendete Weißlichtlaser werden mittels eines Akustooptischen Modulators (AOM) ausgewählt und durch einen Galvo Scanner in der Probe gelenkt. Die Fluoreszenz wird mittels eines Dichroidens auf den Hybriddetektor gelenkt. Das Signal wird mittels eines Konstanten Fraktionen Diskriminator (CFD) an der Zeit zu Amplituden Umwandler (TAC) gegeben. In Kombination mit dem Stopp Signal bereitgestellt durch das Synchronisationssignal (Sync) des Lasers wird dann das analoge Amplituden Signal in ein digitales Zeit Signal (ADC) überführt und an den Messrechner übergeben.

Stoppsignal aufgeladen wird. Ein Analog zu Digital Umwandler (ADC) wandelt das Spannungssignal in ein digitales Computer Signal um.

Dieser Aufbau kombiniert TCSPC und ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (Alexiev 2017, Balke 2018, Volz 2018). Ein gepulster Pikosekunden Weißlichtlaser SuperK Extreme EXU-3 (NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) mit einer Wiederholungsrate von 19,5 MHz mit angeschlossenem akustischem einstellbarem Filter System (AOM) UV-VIS Select (NKT Photonics, Birkerød, Dänemark) erlaubt eine direkte Auswahl von Laserpulsen bei einer bestimmten Wellenlänge. Der Aufbau wird Abbildung 3.14 schematisch dargestellt. Einzelne Laserwellenlängen des verwendete Weißlichtlaser werden mittels eines Akustooptischen Modulators (AOM) ausgewählt und durch einen Galvo Scanner in die Probe gelenkt. Die Fluoreszenz wird mittels eines Dichroidens auf den Hybriddetektor gelenkt. Das Signal wird mittels eines Konstanten Fraktionen Diskriminator (CFD) und den Zeit zu Amplituden Umwandler (TAC) gegeben. In Kombination mit dem Stopp Signal, bereitgestellt durch das Synchronisationssignal (Sync) des Lasers, wird dann das analoge Amplituden Signal in ein digitales Zeit Signal (ADC) überführt und an den Messrechner übergeben.

Der Laserstrahl wird mittels eines 60x Wasser Immersionsobjektiv UPLAPO60XW (Olympus, Tokyo, Japan) auf die Probe fokussiert und durch die DCS-120 (Becker & Hickl, Germany) wird die Probe auf dem IX71 Mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) lateral gescannt. Die Fluoreszenzemission wird mittels Lang Pass Filter und eine Laserlinien-Notch Filter Stopp Line 405/488/532/635 nm (Semrock, USA) gefiltert und mit einem Hybrid PMT Detektor HPM-100-

40 (Becker & Hickl, Germany) detektiert. Die temporale Laser Pulslänge bei 640 nm wurde auf 60 ps (FWHM) bestimmt; die Instrumentenfunktion (IRF) des FLIM Aufbaus ist durch den Hybriddetektor auf 120 ps FWHM limitiert (Volz 2018). Die registrierten Photonenzeiten werden in 1024 Zeitkanäle aufgeteilt. In dieser Arbeit wird eine Kanalbreite von 19,5 ps verwendet. Die Registrierung erfolgt mittels des TCSPC Moduls SPC-160 (Becker & Hickl, Germany).

Die erhaltenen FLIM-Daten wurden mittels einer in der Arbeitsgruppe geschriebenen Software in C++ ausgewertet. Fluoreszenzzerfälle in jedem Pixel werden in Cluster durch eine multivariante Strukturanalyse Methode (Brodwolf 2020) sortiert. Der Fluoreszenzzerfall wurde mittels folgender Gleichungen (Alexiev and Farrens 2014) nach Entfaltung der Fluoreszenz Kurven und der Instrumentenantwortfunktion bestimmt. Hierbei werden die zeitabhängigen Zerfallsprofile $I(t)$ mit einer multiexponentiellen Modelfunktion angepasst

$$I(t) = \sum_i^n \alpha_i e^{-t/\tau_i} . \quad (22)$$

Hier ist n die Anzahl der Zerfall Komponenten, τ_i und α_i sind die Fluoreszenzlebenszeit und die zugehörige Amplitude der jeweiligen Komponente i . Die Komponenten gewichtete mittlere Fluoreszenzlebenszeit $\bar{\tau}_{pop}$ mit der fraktionellen Amplitude β_i

$$\beta_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i^n \alpha_i \tau_i} \quad (23)$$

wurde bestimmt mit

$$\bar{\tau}_{pop} = \sum_i^n \beta_i \tau_i. \quad (24)$$

3.12 Totale interne Reflektionsmikroskopie mit Einzelmolekül Fluoreszenz

Die Erweiterung des existierenden Einzelmolekül totalen internen Reflexionsmikroskopie (TIRFM) Aufbaus der Arbeitsgruppe ist ein Teil dieser Arbeit (der ursprüngliche Aufbau ist in (Boreham 2017) beschrieben). Hierzu wurde eine alternierende Laser Anregung (englisch Alternating Laser Excitation, ALEX) mittels eines Akustooptischen veränderbaren Filters (AOTF) etabliert, um Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) Untersuchungen zu ermöglichen. Dies erlaubt Kolokalisierungs Experimente in den Proteoliposomen durchzuführen und die Anzahl von CcO Molekülen pro Liposom zu bestimmen.

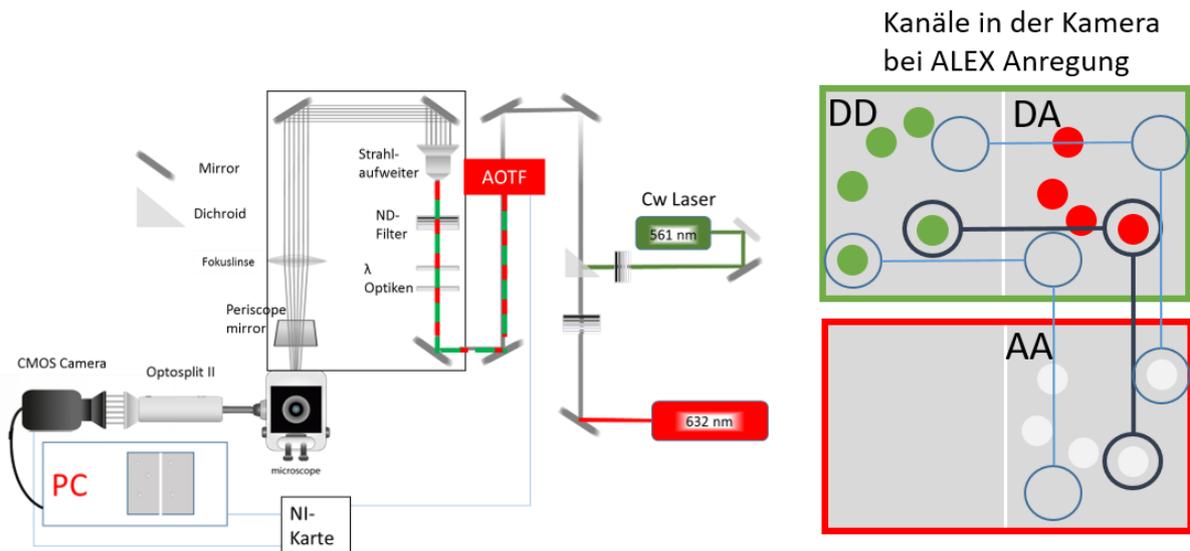


Abbildung 3.15 TIRFM Aufbau mit erweiterten ALEX/FRET Aufbau. Laserstrahlengang der eingekoppelten cw Laser in Rot (Akzeptor Laser) und grün (Donor Laser) dargestellt, bei überlagerten Strahlengängen in grau. Zur Zirkularpolarisierung sind λ Optiken eingebaut. Zur Anpassung der Intensität der Laser werden Neutraldichtefilter (ND-Filter) verwendet. Elektronische Signale zur Schaltung der Kamera und des AOTFs sind in blau dargestellt und werden durch eine NI-Steuerkarte koordiniert. Schematische Darstellung der registrierten Fluoreszenz bei der Anregung von Partikeln im ALEX-Modus mit möglicher Beladung mit Donor, Akzeptor Fluorophoren oder beiden. Das Kamerabild wird durch den Optosplit lateral in die zwei Kanäle (Donor D und Akzeptor A) aufgeteilt. Aufgrund alternierender Anregung gibt es somit bei Donor Anregung Signal im Donor Kanal DD und im Akzeptor Kanal DA und bei Akzeptor Laser im Akzeptor Kanal AA. Nur bei einer Aktivierung in allen Kanälen wird ein FRET-Paar identifiziert.

Hierzu wird ein Helium-Neon Laser mit durch Neutraldichtefilter angepasster Intensität bei 633 nm verwendet durch eine $\lambda/2$ und $\lambda/4$ Wellenplatte und einen 10x Laserstrahlaufler (bm.x, Qioptiq, Frankreich) in den Backport des Mikroskops (IX-71, Olympus, Japan) mit einem 60x TIRF-Objektiv (NA=1.45, PLAPON, 60XOTIRFM, Olympus, Japan) gelenkt. Ein Dioden-Laser mit 561 nm wird mittels eines Laser-Strahlenteilers (zt561RDC, Chroma, USA) in den bestehenden Strahlengang eingekoppelt (Abbildung 3.16). Da beide Laser in CW-Modus betrieben werden, wird mittels eines AOTFs (MDSnC, A.A. Sa, Frankreich) die jeweilige Wellenlänge geblockt bzw. durchgelassen. Die zeitliche Umstellung der in Kanälen gespeicherten Oszillationen Frequenzen für Durchlass von 633 und 561 nm wird durch ein elektrisches Gating durch eine National Instrument Karte (NI6800, NI, USA) mit der Framerate der Kamera (OrcaFlash V2, Hamamatsu, Japan) abgeglichen. Die Kamera erlaubt eine Minimale Bildrate von 10 ms pro Bild bei einer maximalen 2048 x 2048 Pixel mit einer Pixellänge von 108 nm bei 60-facher Vergrößerung. Somit wird pro Frame der Kamera nur eine Anregungswellenlänge auf die Probe gelenkt und deren Emission detektiert. Hierzu wird der Laserstrahl auf die hintere Brennebene des Objektivs mittels einer Fokuslinse (750 mm, N-BK7, Thorlabs, USA) fokussiert, um den TIRFM Modus zu ermöglichen.

In dem TIRF-Modus wird mittels eines an dem Glasträger reflektierenden Laserstrahles einzelne Fluorophore in naher Umgebung des Glasträger angeregt und somit eine mögliche Hintergrundfluoreszenz reduziert. Diese Anregung erfolgt durch das Einstrahlen des evaneszenten Feldes des Lasers, welches mit nur sehr kurzer Reichweite in die Probe eindringt (<100nm). Der Aufbau des evaneszenten Feldes wird durch die vollständige Brechung des Laserstrahles an dem Glasträger erreicht. Dies geschieht, wenn der Einfallswinkel θ größer als

der kritische Winkel θ_0 ist, was im klassischen Brechungsgesetz von Snellius einer Total Reflexion an zwei Medien mit den Brechungsindexen n_1 und n_2 entspricht.

$$\theta_0 = \sin^{-1}(n_1/n_2) \quad (25)$$

In der Wellenoptik besteht in Analogie zum quantenmechanischen Tunneleffekt eine Wahrscheinlichkeit, dass eine Intensität $I(z)$ innerhalb der wässrigen Lösung mit Abstand z in Abhängigkeit von der Eindringtiefe d und der Wellenlänge λ_0 des Lasers zu messen ist. Die Entstehung des evaneszenten Feldes mit einem exponentiellen Abfall kann durch einen komplexen Brechungsindex $\tilde{n} = i \times n$ erklärt werden. Hierbei ändert sich die Welle des ankommenden Laserstrahls mit Intensität $I(0)$ innerhalb des klassischen verbotenen Bereichs wie folgt:

$$e^{ikrn} \rightarrow e^{ikr\tilde{n}} = e^{-krn} \quad (26)$$

Hieraus ergibt sich für die Intensität I als Amplitudenquadrat des Feldes

$$I(z) = I(0)e^{-z/d} , \quad (27)$$

wobei die Eindringtiefe nun in Abhängigkeit der Materialien, Winkel und verwendeten Laserwellenlänge berechnet werden kann als

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-1/2}. \quad (28)$$

Zur Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenz wird ein Laser-Strahlenteiler (BS-z488/543/633, Chroma, USA) im Filterrad des Mikroskops verwendet. Die Fluoreszenz wird spektral in einem Bildteiler (Optosplit-II, Cairn, UK) mit einem Strahlenteiler (HC BS 660, AHF, Deutschland) in die zwei benötigten Kanäle aufgeteilt. Um etwaige Laserdurchschläge zu reduzieren, wird ein Band Pass (BrightLine HC 600/52, AHF, Deutschland) im Donor Kanal eingesetzt. Das spektral getrennte Fluoreszenzbild wird durch Aperturen Einstellungen im Bildteiler auf die Kamera projiziert.

Die Bilder der Kamera wurden mittels einer in dieser Arbeit selbstgeschriebenen Routine in LabView (Version 2017, National Instrument, USA) aufgenommen. Dies war nötig, da eine Synchronisation der Framerate der Kamera mit dem AOTF für ALEX unabdingbar ist. Die Auswertung der Daten erfolgte im ersten Schritt mit der Lokalisationssoftware iSMS (Preus et al, Nature Methods 2015). Hierbei wurde die Paare zwischen Donor und Akzeptor Kanal gefunden und die resultierenden apparenten Intensitäten bestimmt und die resultierende apparenten FRET Stöchiometrie S_{app} und Effizienz E_{app} :

$$S_{app} = (DD+DA) / (DD+DA+AA) \quad E_{app} = (DA / (DD+DA)), \quad (29)$$

wobei DD-Intensität aus nur Donor Kanal, AA-Intensität aus nur Akzeptor Kanal bei Akzeptor Anregung und DA Intensität bei Donor Anregung in Akzeptor Kanal ist. Um eine mögliche Überblendung von DD-Intensität in den Akzeptor Kanal und mögliche Anregung des Akzeptors durch den Donor Laser zu kompensieren, wird ein Überblendungsfaktor und ein direkter

Anregungsfaktor nach der Methode in (Hohlbein 2014) von mir angewendet, und korrigiert somit die DA Intensität zu

$$DA_{\text{Korr}} = DA - DD \cdot \text{Überblendungsfaktor} - AA \cdot \text{direktAnregungsfaktor} \quad (30)$$

Zur Bestimmung des Korrekturfaktors γ , wird eine Referenzprobe aus bekannter Stöchiometrie und Abstand genutzt. Die Zentren der beiden Populationen im S/E Diagramm werden bestimmt und die Steigung und Achsenabschnitt des linearen Fits von S^{-1}/E Plot nach (Hellenkamp, Nature Methods, 2018) genutzt, um γ zu bestimmen:

$$\gamma = (\text{Achsenabschnitt} - 1) / (\text{Achsenabschnitt} + \text{Steigung} - 1) \quad (31)$$

Dieser wird nun angewendet, um die korrigierten FRET Effizienz E_{Korr} und S_{Korr} zu erhalten

$$E_{\text{Korr}} = DA_{\text{Korr}} / (DA_{\text{Korr}} + \gamma \cdot DD) \quad (32)$$

$$S_{\text{Korr}} = (\gamma \cdot DD + DA_{\text{Korr}}) / (\gamma \cdot DD + DA_{\text{Korr}} + AA)$$

3.13 Messung zur zeitabhängige Spannungsänderung in Proteoliposomen

Teil dieser Arbeit ist die Aufnahme und Interpretation der Änderung der Fluoreszenz von spannungssensitiven Proteinen bei Änderung der anliegenden Membranspannung. Die Intensität der Fluoreszenz wird sowohl im TIRFM Aufbau als auch im FLIM-Aufbau untersucht. Im TIRFM Aufbau wird die Position der einzelnen Emitter mittels des Programms Localizer identifiziert und die vom Hintergrund bereinigte integrierte Intensität der einzelnen Emitter in ein Histogramm aufgetragen. Die mittlere Intensität I_c wird mittels einer Log Normalverteilung bestimmt.

$$N(I) = \frac{A}{\sqrt{2\pi}\omega I} e^{\left(-\frac{\ln\left(\frac{I}{I_c}\right)^2}{2\omega^2}\right)}, \quad (33)$$

wobei N die Anzahl der jeweiligen Emitter mit einer Intensität I sind bei einer Log Standard Abweichung ω .

Im FLIM wird sowohl die Änderung der Fluoreszenzintensität als auch des Fluoreszenzzerfalls bei Änderung der Membranspannung untersucht. Die Intensitäten aller zu einer Lebenszeitpopulation zugehörigen Pixeln (Clustering) werden aufsummiert und daraus eine mittlere Clusterpixelintensität bestimmt. Die Lebenszeiten werden, wie in Kapitel 3.12 angegeben bestimmt.

3.14 Fluoreszierende pH Indikatoren

In dieser Arbeit ist es essenziell die Ausrichtung von Proteinen in den Proteoliposommembranen zu identifizieren, da dies zum Beispiel die Transportrichtung der Protonen durch CcO definiert. Da die wässrige Phase in und außerhalb der Proteoliposome separat voneinander verändert werden kann, werden zur Bestimmung oberflächenmarkierte Proteine verwendet, deren kovalent gebundene Sonde ein pH-abhängiger Farbstoff ist. Solche

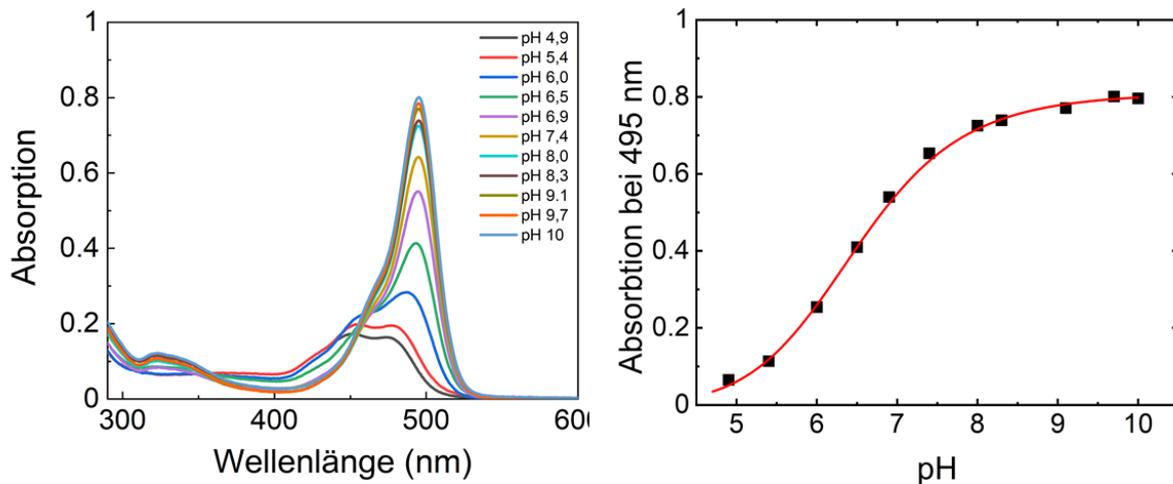


Abbildung 3.16: pH Titration von FITC und Bestimmung des pK_A Wertes. Absorptionsmessungen von FITC in 1 mM TRIS durch Zugabe von konzentrierter HCl oder NaCl erfolgte die Einstellung der gezeigten pH-Werte bei minimaler Probenverdünnung (<2%). Absorbanz bei 495 nm mit einer Küvettenlänge von 0,3cm sind gegen den pH-Wert der Lösung aufgetragen und mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung angepasst (in rot). Ein pK_A Wert von 6.5 ± 0.1 wurde für FITC bestimmt.

Farbstoffe ändern ihr Absorptionsverhalten in Abhängigkeit von dem umgebenden pH-Wert. In dieser Arbeit werden auf Fluorescein basierende pH-Sonden verwendet (siehe Kapitel 3.4).

Diese Sonden liegen aufgrund der Protonenkonzentration in der Umgebung, dem pH-Wert, protoniert oder deprotoniert vor und haben ein pH-abhängiges Absorptionsverhalten. Dies kann mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung beschrieben werden, die sich aus dem Massewirkungsgesetz und der Konzentration der freien Protonen in Relation zum pK_A der protonierbaren Gruppen ergibt:

$$pH = pK_A + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (34)$$

Hierbei ist $[A^-]$ die molare Konzentration der deprotonierten und $[HA]$ die molare Konzentration der protonierten Form. Aus der Formel lässt sich ebenfalls ableiten, dass bei einem pH-Wert der gleich dem pK_A ist, gleiche Konzentration an protonierter und deprotonierter Form vorliegen muss. Besitzen wie im Falle von Fluorescein die beiden Formen unterschiedliche Absorptionseigenschaften, kann der pK_A Wert anhand der Absorptionsspektren bestimmt werden. Mittels pH-Titration kann der pK_A Wert durch die angepasste Henderson-Hasselbalch-Gleichung

$$A = \frac{\Delta A_{\max}}{1 + 10^{pK_A - pH}} + offset \quad (35)$$

anhand der gemessenen Absorbanz A bei einer Wellenlänge bestimmt werden. Ebenso zeigt sich bei der Titration der isobestische Punkt, an dem die Absorbanz konstant in beiden Formen ist. Die Titration erfolgte durch Zugabe von kleinen Mengen von entsprechend konzentrierter NaOH oder HCl-Lösung, um das Gesamtvolumen nur minimal zu verändern. Bestimmt wurde der pH mit einer pH-Elektrode (Biotrode, Metrohm) in der Messküvette vor der jeweiligen Absorptionsmessung.

4. Ergebnisse und Diskussion I: Arch3-Varianten als fluoreszierende Spannungssensoren zur Untersuchung des Membranpotentials

In dieser Arbeit wird die Möglichkeit untersucht, fluoreszierende Spannungssensoren als Sensoren für die Proton-bewegende Kraft, die durch Aktivierung von CcO entsteht, zu messen. Hierzu werden die in Kapitel 3.2 beschriebenen Arch3 Varianten Fluoreszenz-spektroskopisch *in vitro* untersucht. Archon1 wird dann in *E. coli* Zellen bei veränderter Membranspannung mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Danach erfolgt der Einbau in Proteoliposome und dessen Charakterisierung zur späteren Verwendung in Kombination mit CcO.

Teile der Ergebnisse dieses Kapitel sind in der Publikation (Silapetere 2022) veröffentlicht. Hierbei war mein Beitrag die Untersuchung des zellulären Fluoreszenzsignals von Archon 1 in *E. coli* mittels FLIM bei veränderbarem Membranpotential. Ebenso meine Untersuchung in Liposomen von Archon 1 und dessen Varianten D125N und T100S und der Quenching Experimente mit Tryptophan sind in der Veröffentlichung diskutiert.

4.1 Spektroskopische Charakterisierung von Arch3 Varianten *in vitro*

4.1.1 Stationäre spektroskopische Untersuchungen

Für die Verwendung von geeigneten Arch3 Varianten für spätere Zelleexperimente und den Proteoliposomen Assay wurden die Varianten Archon1, Archon2, Quasar1, Quasar2 in Detergens Lösungen und in SMA-Nanodisks mittels Absorptions-, Emissions- und Anregungsspektroskopie charakterisiert. Die aufgenommenen Spektren und Matrixscans sind in Abb. 4.1 und Abb. 4.2 gezeigt. Die bestimmten Absorptionsmaxima in Lösung sind für Archon1 und Archon2 bei 584 ± 1 nm, für Quasar1 bei 580 ± 1 nm und für Quasar2 bei 588 ± 1 nm. Aus dem Matrixscan der Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungswellenlänge wird das Anregungsspektrum bei 705 nm bestimmt. Die bestimmten Anregungsmaxima in Lösung sind für Archon1 bei 582 ± 1 nm, und Archon2 bei 578 ± 2 nm, für Quasar1 bei 578 ± 1 nm, für Quasar2 bei 585 ± 2 nm.

Die Anregungsspektren zeigen eine leichte blauverschobene Verbreiterung der Kurve und können nicht mit einer einfachen Log-Normal Funktion angepasst werden. Um mögliche unterschiedliche fluoreszierende Spezies der Varianten zu identifizieren, wird eine Linearkombination von Log-Normal Funktionen zur Untersuchung der Fluoreszenzspektren genutzt (Burstein and Emelyanenko 1996).

$$I_i(\vartheta) = I_{max,i} \times e^{-\left(\frac{\ln 2}{\ln 2 \rho_i}\right) \times \ln^2\left(\frac{a_i - \vartheta}{a_i - \vartheta_{max,i}}\right)}, \quad \vartheta < a_i \quad (36)$$

$$I_i(\vartheta) = 0, \quad \vartheta \geq a_i \quad (37)$$

Hierbei kann die maximale Intensität $I_{max,i}$ für jede fluoreszierende Spezies i mit der zugehörigen Wellenzahl $\vartheta_{max,i}$ und dem Band Asymmetrie Parameter ρ_i und dem Funktionsgrenzwert a_i identifiziert werden. Es konnte jedoch mit der Untersuchung mittels der Linearkombination keine Kombination an Subspezies identifiziert werden. Auch bei der

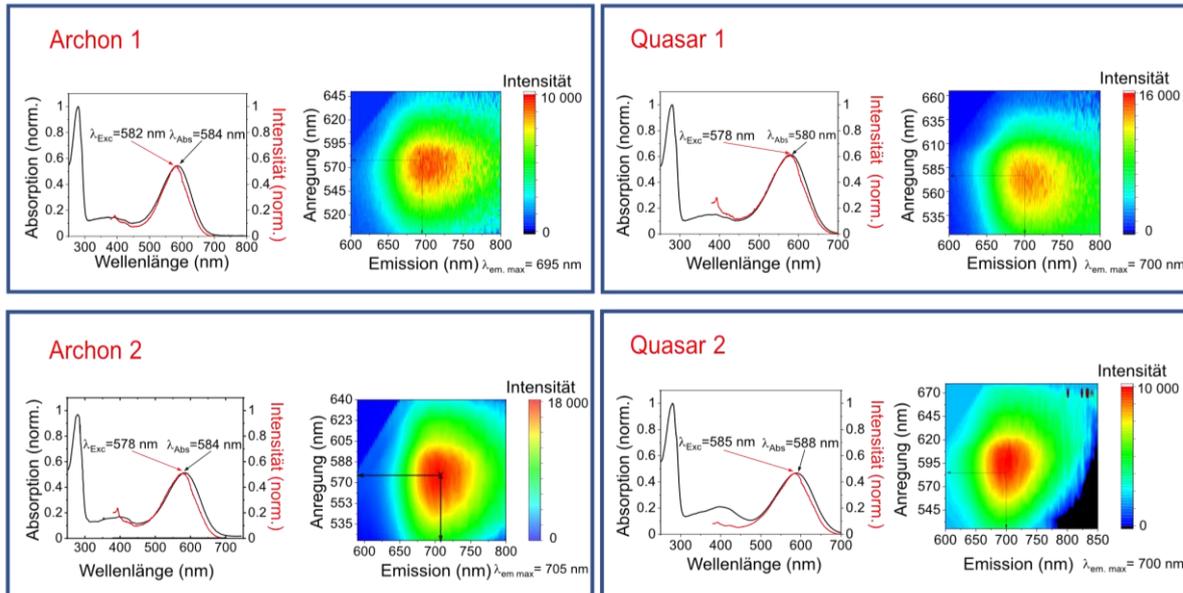


Abbildung 4.1: **Absorption und Emission von Arch3 Varianten in Detergenzlösung.** Archon1, Archon2, Quasar1 und Quasar2 wurden in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,02% DDM, 0,004% CHS und 0,1 mM PMSF aufgereinigt und vermessen. Für die Anregungsspektren wurde die Emission bei 710 nm aufgenommen. Für die Emissions-Matrix-Scans wurde die Anregung von 500 bis 650 nm in 5 nm Schritten verändert und die Emission jeweils von 600 bis 800 nm in 1 nm Schritten bei 19°C detektiert. Die jeweiligen Maxima der Absorption und Emission sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Untersuchung der Absorptions- und Anregungsspektren in Nanodisks ist keine eindeutige Identifikation von Subspezies möglich.

Die bestimmten Absorptionsmaxima in Nanodisks sind für Archon1 bei 585 ± 1 nm und Archon2 bei 583 ± 2 nm, für Quasar1 bei 580 ± 1 nm und für Quasar2 bei 590 ± 1 nm. Aus dem Matrixscan der Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungswellenlängen wird das Anregungsspektrum bei 705 nm bestimmt. Die bestimmten Anregungsmaxima in Lösung sind für Archon1 bei 583 ± 1 nm, für Archon2 bei 583 ± 2 nm, für Quasar1 bei 584 ± 1 nm und für Quasar2 bei 586 ± 2 nm.

Eingebettet in Nanodisks zeigt sich eine geringere Stokes-Verschiebung der Anregungswellenlänge zur Absorptionswellenlänge. Um den Einfluss durch eine membranartige Umgebung weiter zu untersuchen wird das Differenzspektrum der Anregungen mit $\Delta\text{Anregung} = (\text{Anregung}_{\text{SMA}} - \text{Anregung}_{\text{Detergenz}})$ in Abb. 4.3 gezeigt. Ohne ein bestehendes Membranpotential, führt die Einbettung der Proteine in eine Lipidumgebung im Vergleich zu einer wässrigen Umgebung bereits zu einer eindeutigen Änderung der statischen Fluoreszenzeigenschaften der Arch3 Varianten. Hierbei zeigt Archon1 die stärkste Rotverschiebung. Diese Änderung in den spektroskopischen Eigenschaften kann bereits durch den erhöhten lateralen Druck in den Nanodisks geschehen. Aufgrund dieses Ergebnisses werden die weiteren zeitaufgelösten *in vitro* Untersuchungen ebenfalls mit Nanodisks durchgeführt um eine Veränderung des Fluoreszenzverhalten aufgrund einer Membran ähnlichen Umgebung zu berücksichtigen, ohne dass ein Membranpotential anliegt.

gereinigte Proteine in Nanodisk:

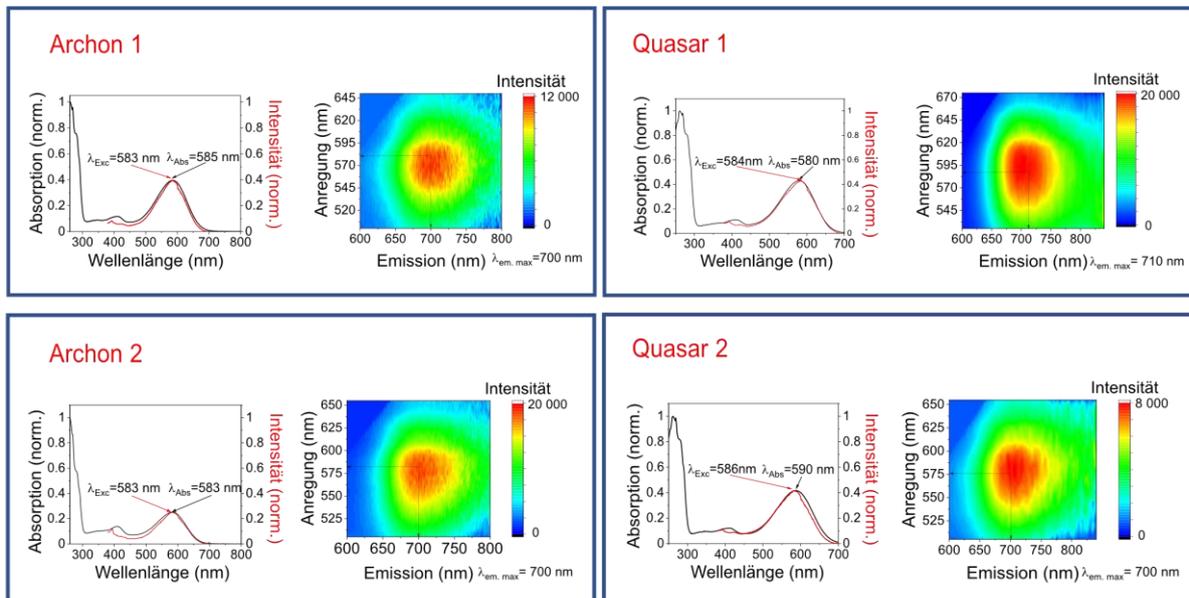


Abbildung 4.2 **Absorption und Emission von Arch3 Varianten in SMA-Nanodisks.** Archon1, Archon2, Quasar1 und Quasar2 wurden in SMA Nanodisc in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl rekonstituiert und gemessen. Für die Anregungsspektren wurde die Emission bei 710 nm aufgenommen. Für die Emissions-Matrix-Scans wurde die Anregung von 500 bis 650 nm in 5 nm Schritten verändert und die Emission jeweils von 600 bis 800 nm in 1 nm Schritten bei 19°C detektiert. Die jeweiligen Maxima der Absorption/Anregung und Emission sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

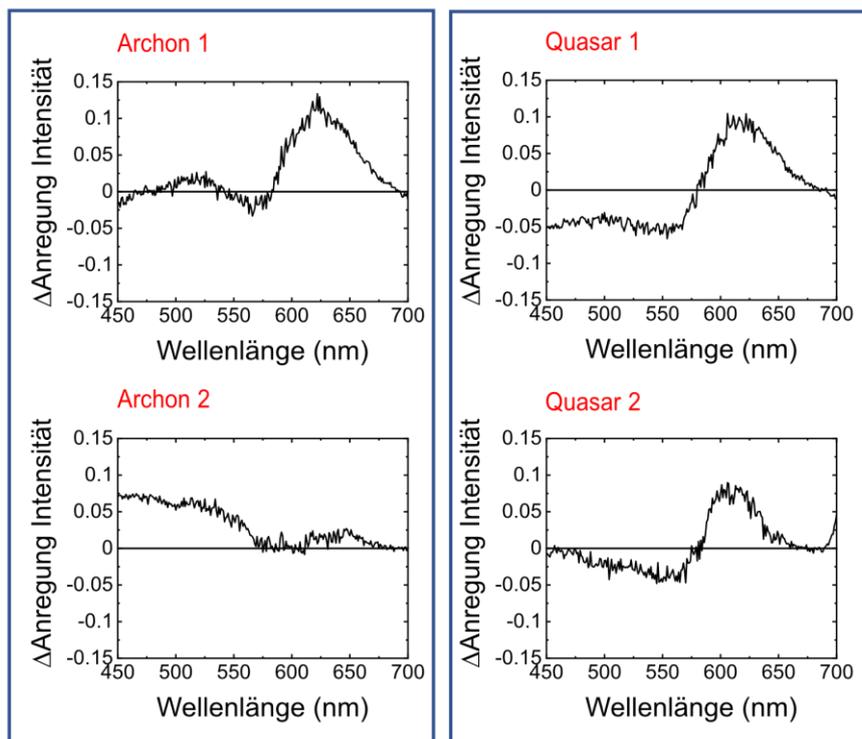


Abbildung 4.3 **Differenzspektrum der Fluoreszenzanregung der Arch3 Varianten in SMA-Nanodisks und in Detergenzlösung.** Aus Abbildung 4.1 und 4.2 werden die Anregungsspektren der Proteine in Nanodisks und Detergens verglichen. Die Differenzspektren der jeweiligen Anregungsspektren (Messung der Emission beim 705 nm) in Nanodisks und Detergens wurden für die vier Proteine gebildet. Die positiven Intensitätswerte weisen auf ein rot-verschobenes Anregungsspektrum für die Arch3 Varianten Archon1, Quasar1 und Quasar2 in SMA-Nanodisks hin.

4.1.2 Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die zuvor mittels Absorption und Emission Spektroskopie untersuchten Varianten von Arch3 wurden in dieser Arbeit ebenfalls mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie charakterisiert. Die aufgereinigten Proben wurden hierzu im FLIM-Aufbau vermessen. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm Calia (siehe Kapitel 3.12) und sind in Tab. 4.1 dargestellt. Die dabei erhaltenen Daten wurden mittels eindimensionaler erweiterter Fehleranalyse in dem Programm Globals (University of California, USA) wiederholt untersucht. Um einen Vergleich zwischen den Konstrukten zu visualisieren sind in Abb. 4.4 die Zerfallskurven der Varianten miteinander in allen möglichen Kombinationen ebenfalls verglichen. Ebenso in der Fluoreszenzlebenszeitanalyse zeigt sich ein Unterschied aufgrund der Umgebung in Lösung oder SMA. Alle Varianten zeigen eine vergleichbare schnelle Fluoreszenzlebenszeitkomponente mit 70-80 ps und eine etwas langsamere Komponente mit 190 bis 260 ps. Die Fluoreszenzlebenszeiten wurden ohne anliegendes Membranpotential bestimmt.

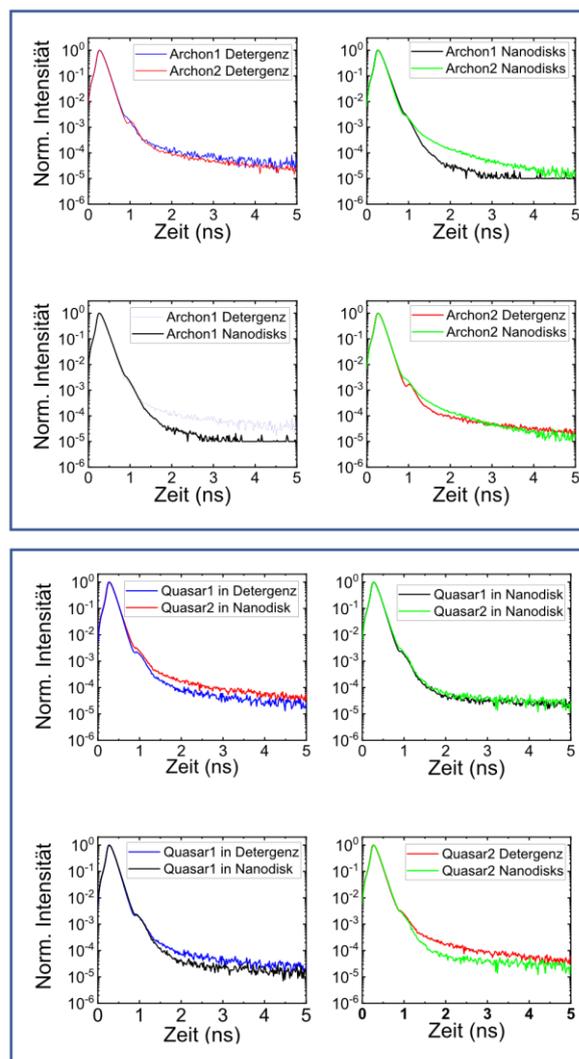


Abbildung 4.4 Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen von Arch3 Varianten in SMA-Nanodisks und Detergens Lösung. Die Fluoreszenzlebensdauerkurven sind normiert dargestellt. Die dazugehörigen Fluoreszenzlebenszeiten (Fluoreszenzzerfallskomponenten) sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Messbedingungen: FLIM-Setup mit Weißlich Laser, Anregungswellenlänge bei 640 nm, die Fluoreszenz wurde mittels eines Langpassfilter (HQ-LP 665 nm) und einem Quad-Notch Filter (405/480/530/640 nm) für 180 Sekunden bei 19°C gemessen. Die Fitparameter sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Fit Daten der Fluoreszenzzerfälle der Arch3 Varianten in SMA- Nanodisks und Detergens Lösung. Die gemessenen Fluoreszenzzerfälle aus Abbildung 4.4 wurden nach Gleichung 23 und 25 angepasst. Die Fitparameter der Fluoreszenzlebenszeiten τ_i mit ihren prozentual anteiligen Fraktionen ϕ_i und τ_{pop} sind angegeben. Das reduzierte χ^2 des Fits ist ebenfalls angegeben, um die Güte des Fits anzuzeigen.

Probe	τ_1 (ns)	ϕ_1 (%)	τ_2 (ns)	ϕ_2 (%)	τ_3 (ns)	ϕ_3 (%)	τ_{pop} (ns)	χ^2
Archon 1 in Detergens	0.07	96	0.23	3	2.70	1	0.10	1,4
Archon 1 in SMA	0.08	93	0.20	7	--	--	0.09	2,0
Archon 2 in Detergens	0.07	97	0.25	2	1.70	1	0.09	1,8
Archon2 in SMA	0.07	98	0.25	3	0.99	1	0.09	2,3
Quasar 1 in Detergens	0.07	97	0.26	3	--	--	0.08	2,1
Quasar 1 in SMA	0.07	96	0.22	4	--	--	0.08	2,0
Quasar 2 in Detergens	0.07	96	0.26	4	--	--	0.08	1,4
Quasar 2 in SMA	0.07	93	0.19	7	--	--	0.08	2,2

4.1.3 Spektroskopische Charakterisierung von Archon1

Aufgrund seiner verbesserten Fluoreszenzintensität und Spannungssensitivität (Piatkevich 2018) wird Archon1 weiter untersucht. Basierend auf MD-Simulationen (Silapetere 2022) sind die Aminosäuren Threonin an Position 100 (T100) und Aspartat an Position 125 (D125) wichtig für die Membranspannungssensitivität. Um die Interaktion zum Fluoreszenzverhalten zu untersuchen, werden zwei weitere Varianten von Archon1 weiterführend mittels FLIM untersucht.

Archon1 und dessen Varianten D125N und T100S werden in Detergens untersucht, um die Effekte der Spannungssensitivität und den Mechanismus der Fluoreszenzänderung bei bestehender Membran Spannung zu spannungslosem Verhalten zu analysieren. Hierzu werden in Detergens Archon 1 und die beiden Varianten bei nicht vorhandenem Potential untersucht. Abbildung 4.5 zeigt die Absorption und die Fluoreszenzzerfälle der Varianten. Die Absorption der Archon1 Varianten besitzen eine geringe Blauverschiebung bei der Chromophor Absorptionsbande und eine geringere Absorptionsintensität im Vergleich zu Archon1. Im Vergleich dazu zeigen die Varianten einen langsameren Fluoreszenzzerfall. Dies zeigt sich ebenfalls in den aus den drei Zerfall Komponenten (siehe Tabelle 4.2) bestimmten mittleren Lebenszeiten $\tau_{pop, Archon1} = 0.16 \pm 0.02$ ns, $\tau_{pop, Archon1-D125N} = 0.24 \pm 0.03$ ns und $\tau_{pop, Archon1-T100S} = 0.63 \pm 0.04$ ns. Die Änderung der mittleren Lebenszeit wird durch die relative Erhöhung der dritten Komponenten von 1.3 zu 3.1 und 13.3% erreicht. Die Zeitkonstanten der Zerfälle bleiben hierbei im Rahmen des Fehlers des Aufbaus von 10% konstant.

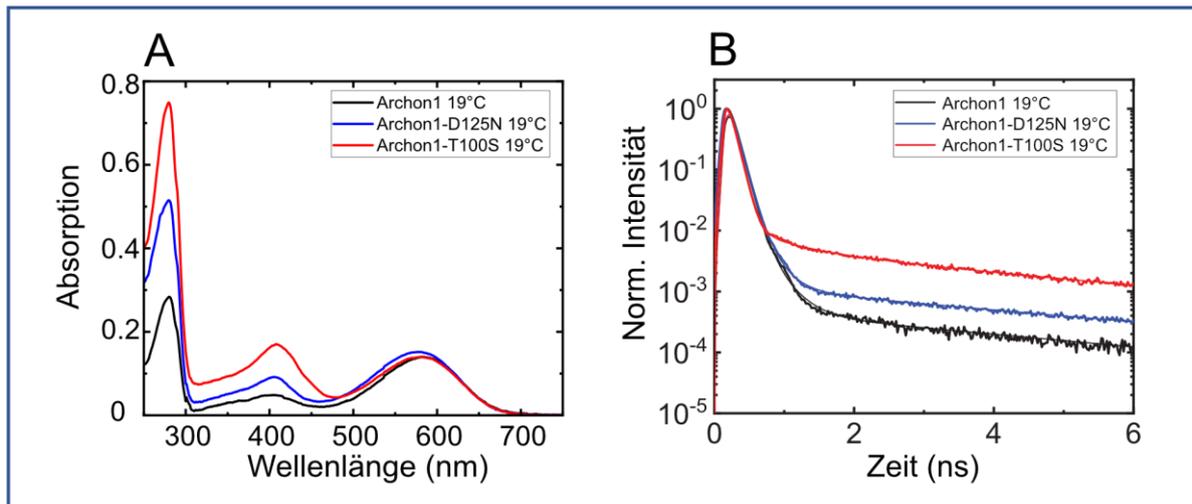


Abbildung 4.5 **Absorption und Fluoreszenzzerfälle von Archon1 und Varianten.** (A) Absorptionsspektren der Proteine bei gleicher Absorption bei 640 nm sind bei 19°C gemessen worden. (B) Die Fluoreszenzzerfälle der Proteine sind im FLIM-Aufbau aufgenommen worden und die Fits mittels der Formel 24 angepasst. Messbedingungen: FLIM-Setup mit Weisslichtlaser, Anregungswellenlänge bei 640 nm, die Fluoreszenz wurde mittels eines Langpassfilter (HQ-LP 665 nm) und einem Quad-Notch Filter (405/480/530/640 nm) für 180 Sekunden bei 19°C gemessen.

Um das unterschiedliche Verhalten der Fluoreszenzeigenschaften der Archon1 Varianten zu untersuchen, werden zuerst statische Emissionsuntersuchungen durchgeführt. Diese Untersuchungen und die bestimmten mittleren Lebenszeiten werden genutzt, um die Fluoreszenz Quantenausbeute FQA zu untersuchen. Ebenso wird die Anregung von Archon1 bei 580nm und 640nm variiert um mögliche Unterschiede in der FQA aufgrund der Anregung zu untersuchen. Ebenso ist der FQA bei 580 nm von 0.5% bekannt (Silapetere 2022). Mittels bekannter FQA kann anhand des Vergleiches der Emissionsspektren und der Absorption die FQA bei einer Anregung von 640 nm bestimmt werden. Die beiden Spektren bei unterschiedlicher Anregung sind in Abbildung 4.6 gezeigt. Unter Verwendung der integrierten Fluoreszenzintensitäten und dem relativen Absorptionsunterschied bei 580 und 640 nm wird ein $FQA_{640nm} = 0.11\%$ bestimmt. Diese Berechnung wird benötigt, da Fluoreszenzlebenszeitmessungen im FLIM bei einer Anregung von 640 nm durchgeführt werden.

Tabelle 4.2 Die im FLIM gemessenen Fluoreszenzzerfälle aus Abbildung 4.5 B sind mittels Cluster-FLIM Software ausgewertet und die bestimmten Fluoreszenzlebenszeiten mit ihren prozentual anteiligen Fraktionen dargestellt. Die Fitparameter der Fluoreszenzlebenszeiten τ_i mit ihren prozentual anteiligen Fraktionen ϕ_i und τ_{pop} sind angegeben. Das reduzierte χ^2 des Fits ist ebenfalls angegeben, um die Güte des Fits anzuzeigen.

Probe	τ_1 (ns)	ϕ_1 (%)	τ_2 (ns)	ϕ_2 (%)	τ_3 (ns)	ϕ_3 (%)	τ_{pop} (ps)	χ^2
Archon1	0,10	94,6	0,27	4,1	4,12	1,3	160 ± 20	1,1
D125N	0.10	92,3	0,25	4,6	4,35	3,1	240 ± 30	1,2
T100S	0.09	83,9	0,65	3,0	4,10	13,1	630 ± 20	1,1

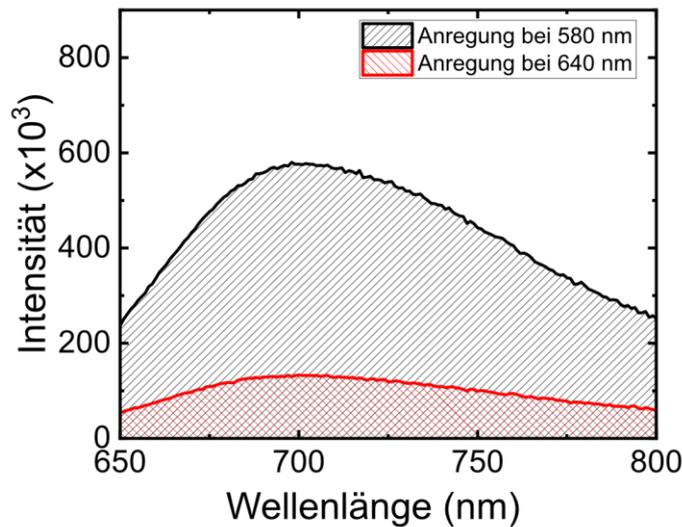


Abbildung 4.6 **Fluoreszenzspektren von Archon1 in Detergenzlösung in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bei 580 nm und 640 nm.** Da die Fluoreszenzquantenausbeute (FQA) von Archon1 bei einer Anregungswellenlänge von 580 nm bekannt ist (FQA 0.5% (Silapetere 2022)), kann anhand des Quotienten der integrierten Fluoreszenzintensitäten der Fluoreszenz Spektren mit Anregung bei 580 nm und 640 nm der FQA der Archon 1 Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 640 nm zu 0.11% bestimmt werden. Messbedingungen: Archon1 in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,02% DDM, 0,004% CHS, 0,1 mM PMSF. Das Fluoreszenzspektrum wurde von 650 bis 800 nm mit einer Anregung bei 580 nm (grau) und bei 640 nm (rot) bei 19°C aufgenommen.

Nach der Bestimmung der FQA bei 640 nm für Archon1 wird ebenfalls das Temperaturverhalten der FQA in Archon1 und dessen Varianten untersucht. Hierbei wurde 10°C, 19°C und 37°C ausgewählt, da diese der Aufbewahrung, Umgebungstemperatur und der Gewebetemperatur entsprechen. Die Emission Spektren sind in Abbildung 4.7 für alle Temperaturen bei einer Anregung von 640nm gezeigt. Hierbei zeigt sich eine generelle Reduzierung der Fluoreszenzintensität bei zunehmender Temperatur. Dieser Effekt tritt am stärksten bei der Variante D125N und nur in sehr geringem Maße bei der Variante T100S und Archon1 auf.

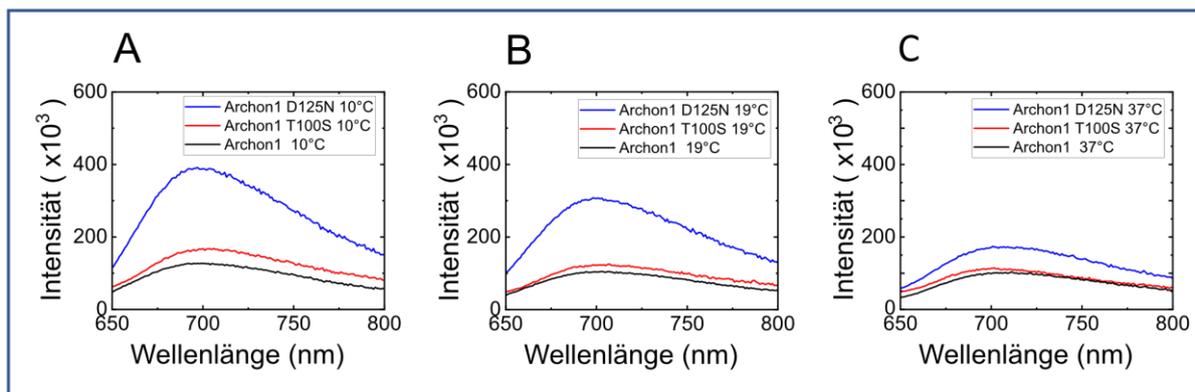


Abbildung 4.7 **Fluoreszenzspektren von Archon1 und den Varianten D125N und T100S in Detergens in Abhängigkeit von der Temperatur.** Archon1 (schwarz), D125N (blau) und T100S (rot) sind in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,02% DDM, 0,004% CHS und 0,1 mM PMSF aufgereinigt. Die Fluoreszenzanregungswellenlänge ist bei 640 nm. Die Fluoreszenz wurde im Bereich von 650 nm bis 800 nm und bei 10°, 19° und 37° C aufgenommen.

Tabelle 4.3 Integrierte Fluoreszenzintensitäten und daraus bestimmte Fluoreszenzquantenausbeuten (FQA) bei 640 nm Anregung von Archon1, D125N und T100S bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Messdaten sind in Abbildung 4.7 gezeigt. Als Referenz zur Berechnung wurde die bei 19°C bestimmte FQA von Archon1 benutzt (siehe Abbildung 4.6).

Probe	Integrierte Intensität ($\times 10^6$)			FQA (%)		
	10° C	19° C	37° C	10° C	19° C	37° C
Archon1	14,3 ± 0,1	12,1 ± 0,2	11,6 ± 0,2	0,14 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,02
D125N	41,8 ± 0,2	33,7 ± 0,1	19,7 ± 0,1	0,40 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,19 ± 0,01
T100S	18,9 ± 0,1	14,4 ± 0,2	12,9 ± 0,1	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,01

In Tabelle 4.3 sind die aus Abbildung 4.7 bestimmten integrierten Intensitäten der Emissionsspektren bei unterschiedlichen Temperaturen aufgetragen. Aus diesen Intensitäten wird nun basierend auf dem FQA von Archon1 bei 19°C bei einer Anregungswellenlänge von 640 nm die FQA der Varianten und Temperaturen bestimmt. Diese sind ebenfalls in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Die Variante D125N zeigt bei 10°C den höchsten FQA mit $0.4 \pm 0,01\%$, fällt jedoch zu 37°C auf einen Wert von $0.19 \pm 0,01\%$ ab. Die beiden anderen Proben zeigen einen leichteren Abfall der FQA zu höheren Temperaturen. In Abbildung 4.8 sind diese Änderung der FQA in Abhängigkeit der Temperatur für jede Probe dargestellt. Hierbei ist ebenfalls zu beachten, dass Archon1 die schwächste Änderung des FQA aufweist. T100S hat bei 10°C einen höheren FQA-Wert von $0,18 \pm 0,01\%$, ist, jedoch bei 37°C mit 0.12% nahezu identisch mit dem FQA von Archon1 mit $0.11 \pm 0,02\%$.

Basieren auf den bestimmten FQA von Archon1 und dessen Varianten können nun die Raten des strahlenden Überganges und der nicht strahlenden Übergänge bestimmt werden.

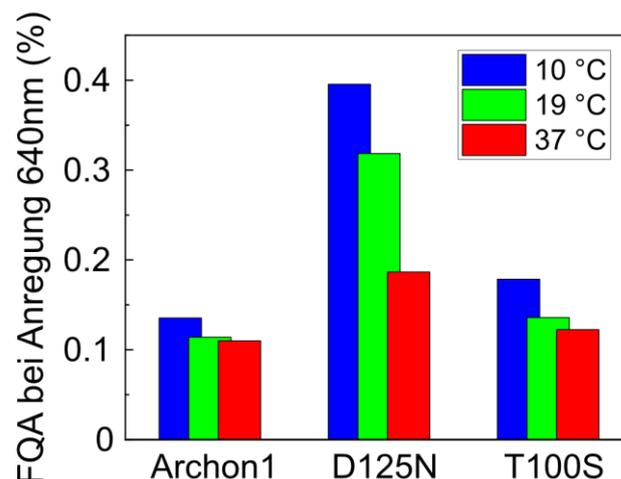


Abbildung 4.8 FQA von Archon1, D125N und T100S in Detergenzlösung bei verschiedenen Temperaturen. Die bestimmten FQA der Daten in Abhängigkeit zur Temperatur sind dargestellt. Die FQAs wurden mittels bekannter FQA und dem Integral der Fluoreszenzintensität bestimmt.

Unter der Bedingung, dass der FQA ebenfalls anhand der strahlenden Rate k_r und der bestimmten mittleren Lebenszeit τ für das Ensemble der fluoreszierenden Probe berechnen lässt,

$$FQA = k_r \cdot \tau \quad (38)$$

kann aufgrund der bekannten FQA und Lebenszeit die strahlende Rate berechnet werden.

Ebenso kann die nicht strahlende Rate k_{nr} mittels

$$k_{nr} = k_{\text{flu0}} - k_r \quad (39)$$

mit $k_{\text{flu0}} = \frac{1}{\tau}$

bestimmt werden. Die hierbei bestimmten Raten sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Diese Raten sind vergleichbar zu anderen schwach fluoreszierenden rot emittierenden Proteinen wie mCherry und mKate2 (Prangma 2020).

Tabelle 4.4 FQA und Bestimmung der strahlenden (k_r) und nicht-strahlenden (k_{nr}) Raten der Archon1, Archon1-D125N und Archon1-T100S Fluoreszenz. Die in Tabelle 4.3 bestimmten FQA der Archon1 Proteine Wildtyp, D125N und T100S werden benutzt, um mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzlebensdauer τ_{mean} (Tabelle 4.2) die Raten k_{nr} und k_r nach Gleichung 39 und 40 zu bestimmen.

Probe	FQA (640 nm) (%)	τ_{pop} (ps)	k_r ($\times 10^9$ 1/s)	k_{nr} ($\times 10^9$ 1/s)
Archon 1	0,11 \pm 0,02	160 \pm 20	0,007 \pm 0,002	6 \pm 1
D125N	0,32 \pm 0,01	240 \pm 30	0,013 \pm 0,002	4,2 \pm 0,6
T100S	0,14 \pm 0,02	630 \pm 20	0,0020 \pm 0,0003	1,6 \pm 0,3

4.2 Spektroskopische Charakterisierung von Archon-Varianten in *E. coli* Zellen

Die zuvor charakterisierten Arch3 Varianten Archon1 und Archon2 werden in *E. coli* Zellen exprimiert und das Fluoreszenzverhalten in den Zellen bei Änderung des Membranpotentials untersucht. Hierzu wurde das Membranpotential von -140 mV auf 0 mV mittels verschiedener Ionophore ausgeglichen und die Veränderung der Fluoreszenz der Zellen detektiert. Die Arch3 Varianten wurden direkt in den *E. coli* Zellen im Dunkeln exprimiert und nach Zugabe der Ionophoren auf CellView Schalen transferiert. In diesen Schalen wurde die Zellen mittels FLIM auf ihre Fluoreszenz Intensität und Lebenszeit pro Pixel untersucht und mögliche Änderung der Fluoreszenzparameter über die Zeit registriert.

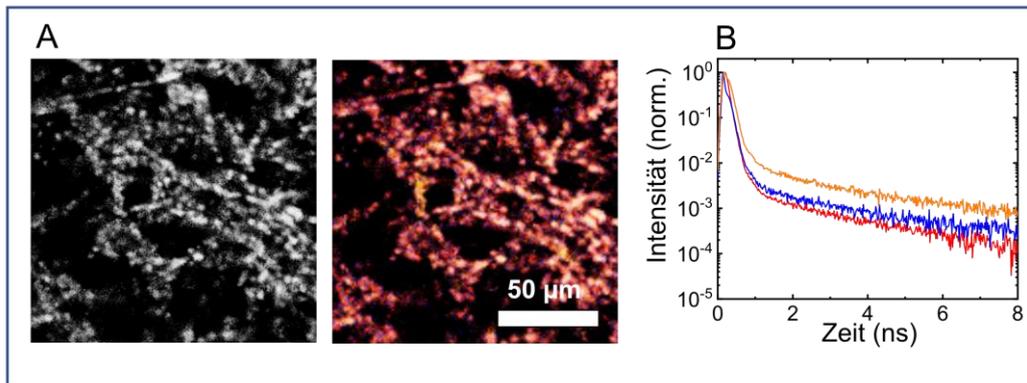


Abbildung 4.9 **FLIM Mikrographen Fluoreszenz von Archon1 in lebenden *E. coli* Zellen C41 (DE3)**. Die *E. coli* Zellsuspensionen wurde direkt vor der Messung in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl überführt und bei 19°C gemessen. A) Intensitäts-Aufnahme der Fluoreszenz ohne und mit Falsch-Farbenzuweisung, b) Intensitäts-Aufnahme von *E. coli* Zellen, die Archon1 über exprimieren. Die Fluoreszenzzerfallskurven wurden mit Falschfarben dargestellt und entsprechen dem Farbcode der Fluoreszenz Zerfallskurven in b). Messbedingungen: Fluoreszenzanregungswellenlänge bei 640 nm. Die zeitaufgelöste Fluoreszenz wurde mit einem Langpassfilter (HQ LP 665 nm) und einem Quad-Notch Filter für 300 Sekunden gemessen.

Die mit Archon1 überexprimierten *E. coli* Zellen wurden zuerst ohne die Zugabe von Ionophoren in ihrem Ruhemembranpotential (bei ~ -140 mV) im FLIM vermessen. In Abbildung 4.9 sind die FLIM-Bilder und die mittels Calia bestimmten normierten fluoreszenten Zerfälle gezeigt. Der Falsch-Farbencode der Lebenszeiterfälle wird genutzt, um die FLIM-Bilder entsprechend des Clusters per Pixel einzufärben wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist. Die Archon1 in *E. coli* zeitaufgelöste Fluoreszenz kann in den Zellexperimenten mit vier exponentiellen Komponenten angepasst werden. In Abbildung 4.10 ist zu sehen, dass bei einer Angleichung der Zerfälle mit 3 Komponenten der Zerfall nicht vollständig wiedergegeben werden kann, kenntlich gemacht durch die stark schwankenden Residuen.

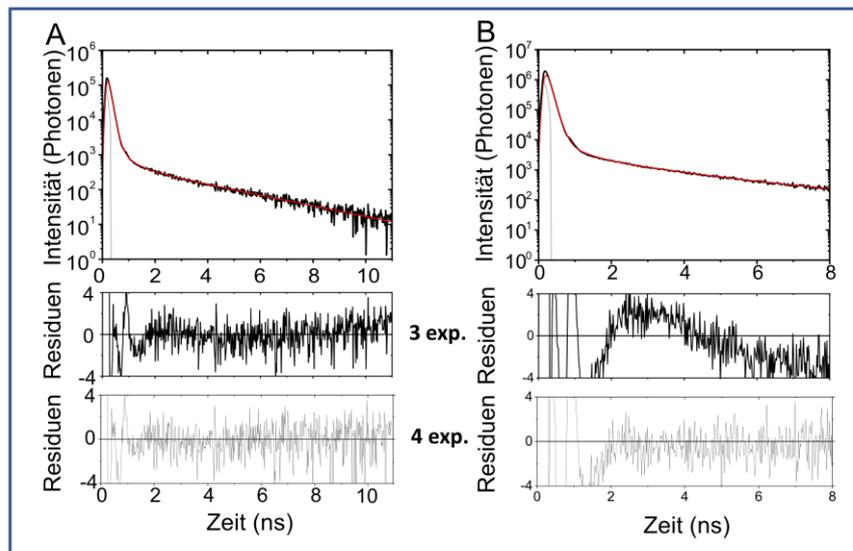


Abbildung 4.10 **Fluoreszenzlebenszeit Zerfälle von Archon1 in lebenden *E. coli* Zellen nach Zugabe von Gramacidin nach 1 und 15 Minuten mit FLIM**. Nach Zugabe von 10 µM Gramacidin zu der *E. coli* C41 (DE3) Suspension mit überexprimierter Archon1 in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, die Fluoreszenzlebensdauerzerfall bei ~ -140 mV Membranpotential nach 1 Minute Zugabe A) und nach vollständiger Abklang des Potentials ~ 0 mV nach 15 Minuten B) sind dargestellt. Eine Modelfunktion mit 4 Exponentialkomponenten ist anhand der gezeigten reduzierten X^2 Werte besser zur Beschreibung des Fluoreszenzzerfalles geeignet.

Der zeitliche Fluoreszenzzerfall kann somit nur mit vier Komponenten angepasst werden. Nach Zugabe von Gramicidin wurde der Zerfall nach 1 Minute und 15 Minuten nach Zugabe untersucht. Nach 1 Minute zeigen sich ebenfalls vier Komponenten mit leicht veränderter Lebenszeit: $\tau_1 = 29 \pm 1$ ps (53 \pm 1%), $\tau_2 = 105 \pm 1$ ps (46 \pm 1%), $\tau_3 = 640 \pm 60$ ps (0,14 \pm 0,02%), $\tau_4 = 3200 \pm 200$ ps (0,03 \pm 0,01%) mit $\bar{\tau}_{pop} = 150 \pm 20$ ps. Nach 15 Minuten und einem erwarteten Ausgleich des Membranpotentials zu 0mV werden folgende Komponente $\tau_1 = 27 \pm 1$ ps (48 \pm 1%), $\tau_2 = 105 \pm 1$ ps (51 \pm 1%), $\tau_3 = 610 \pm 20$ ps (0,18 \pm 0,01%), $\tau_4 = 3200 \pm 300$ ps (0,04 \pm 0,02%) mit $\bar{\tau}_{pop} = 160 \pm 20$ ps bestimmt. Die Unterschiede der Fluoreszenzlebenszeitenkurven sind dabei so gering, dass bei einer gemeinsamen Untersuchung der Daten bei einer und 15 Minuten nach Gramicidin Zugabe keine Unterscheidung der Cluster mittels der gegebenen Software mehr möglich ist wie in Abbildung 4.11 zu sehen ist. Hierbei ist die Zunahme der Intensität jedoch zwischen einer und 15 Minuten deutlich erkennbar.

Die mit Archon1 überexprimierten *E. coli* Zellen sind ebenfalls in dieser Arbeit mit einem weiteren Ionophoren 1799 untersucht worden, um eine direkte Interaktion mit dem gewählten Ionophoren auf die Fluoreszenz auszuschließen. Hierbei zeigt sich ebenfalls eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zwischen einer und 15 Minuten nach Zugabe von 1799. Ebenso zeigt sich bei einer gemeinsamen Analyse der Daten bei einer und 15 Minuten, dass der Fluoreszenzlebenszeitzerfall unabhängig vom Ionophoren nicht als unterschiedliche Cluster nach Reduzierung der Membranspannung identifiziert werden können.

Nach 1 Minute zeigen sich drei Komponenten mit leicht veränderter Lebenszeit: $\tau_1 = 100 \pm 2$ ps (83 \pm 2%), $\tau_2 = 580 \pm 5$ ps (46 \pm 1%), $\tau_3 = 2800 \pm 100$ ps (9 \pm 1%), mit $\bar{\tau}_{pop} = 160 \pm 20$ ps. Nach 15 Minuten verändern sich die Lebenszeit zu $\tau_1 = 100 \pm 2$ ps (92 \pm 2%), $\tau_2 = 480 \pm 2$ ps (3 \pm 1%),

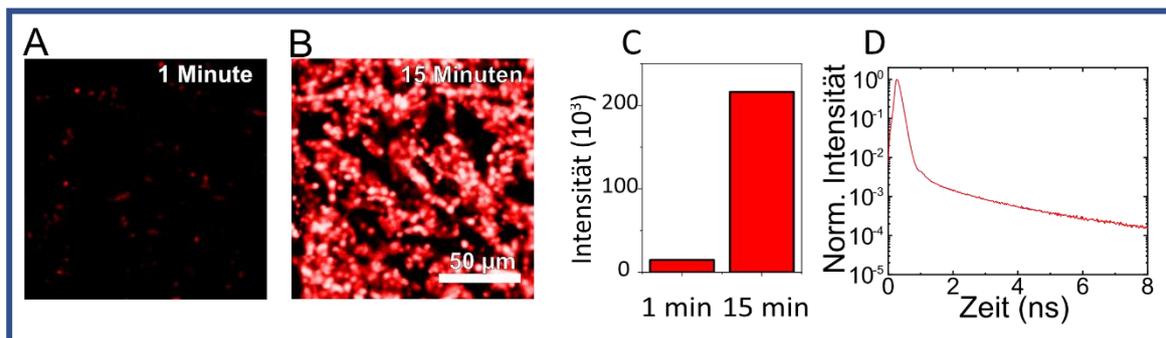


Abbildung 4.11 **FLIM-Aufnahme der *E. coli* Membrane Depolarisation mittels Gramicidin.** Die Fluoreszenz Lebenszeit Bilder der *E. coli* C41 (DE3) Suspension mit überexprimierter Archon1 in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl nach Zugabe von 10 µM Gramicidin nach 1 und 15 Minuten gezeigt a). Die bestimmte Fluoreszenzintensität als Anzahl der detektierten Photonen ist als Balkendiagramm in b) und die normierte unveränderte fluoreszente Lebenszeit Zerfall in c) gezeigt. Die Anregung erfolgte bei 640 nm und die Fluoreszenz wurde mittels 665 nm Langpassfilter und Quad-Notch Filter für 300 Sekunden Detektion bei 19°C gemessen.

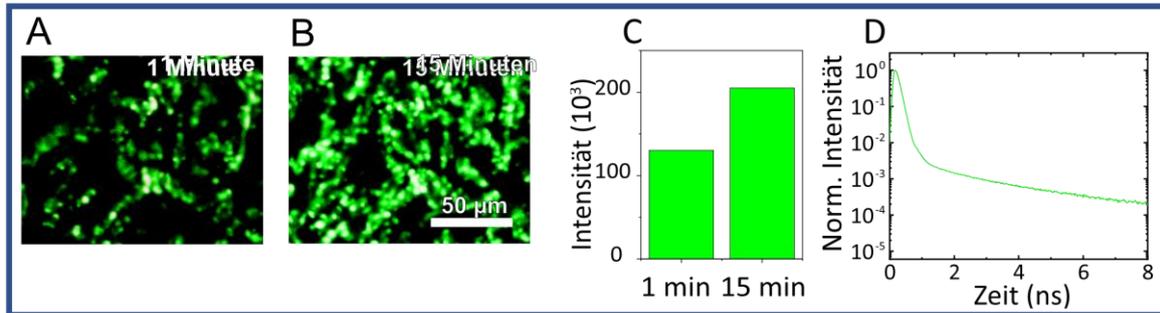


Abbildung 4.12 **FLIM-Aufnahme der *E. coli* Membrane Depolarisation mittels 1799**. Die Fluoreszenz Lebenszeit Bilder der *E. coli* C41 (DE3) Suspension mit überexprimierter Archon1 in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl nach Zugabe von 10 μ M 1799 nach 1 und 15 Minuten gezeigt a). Die bestimmte Fluoreszenzintensität als Anzahl der detektierten Photonen ist als Balkendiagramm in b) und die normierte unveränderte Fluoreszenz Lebenszeit Zerfall in c) gezeigt. Die Anregung erfolgte bei 640 nm und die Fluoreszenz wurde mittels 665 nm Langpassfilter und Quad-Notch Filter für 300 Sekunden Detektion bei 19°C gemessen.

$\tau_3 = 3300 \pm 300$ ps (5 \pm 1%) mit $\bar{\tau}_{pop} = 180 \pm 60$ ps. Die aus der Analyse erhaltenen Daten für die überexprimierten Archon1 *E. coli* Zellen vor und nach Zugabe von Gramicidin und 1799 sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Ein Vergleich der Lebenszeiten zeigt ein ähnliches Verhalten unabhängig von dem gewählten Ionophoren. Die absoluten Werte für $\bar{\tau}_{pop}$ sind im Rahmen des Fehlers identisch. Für weitere FLIM-Experimente mit *E. coli* Zellen wird der Ionophore Gramicidin weiterverwendet, um eine Änderung des Membranpotentials zu erzielen.

Bei der Betrachtung der FLIM-Bilder zeigt sich über die Zeit ein Absetzen von *E. coli* Zellen auf dem Glaträger. Dies führt während der Messung im FLIM zu einer steigende summierten Gesamtintensität. Auch bei unbehandelten *E. coli* C41 Suspension mit überexprimierter Archon1 ist dieses Verhalten zu sehen. Um diesen Anstieg der gesamten Intensität nicht in die Veränderung der Intensität durch ein verändertes Membranpotential mit einfließen zu lassen, wird die Intensität pro Pixel untersucht. Mittels Cluster-FLIM werden nur die Pixel bedacht, die die Fluoreszenz Signatur von Archon1 zeigen und damit die Fluoreszenzintensität pro Cluster-Pixel ermittelt.

Tabelle 4.5 **FLIM-Auswertung der *E. coli* Membrane Depolarisation mittels Gramicidin und 1799**. Die Fluoreszenz Lebenszeit Auswertung mittels Cluster-FLIM der *E. coli* C41 (DE3) Suspension mit überexprimierter Archon1 in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl der Autofluoreszenz und nach Zugabe von 10 μ M Gramicidin und 1799 nach 1 und 15 Minuten gezeigt aus den FLIM-Aufnahmen. Die Fitparameter der Fluoreszenzlebenszeiten τ_i mit ihren prozentual anteiligen Fraktionen ϕ_i und τ_{pop} sind angegeben. Das reduzierte χ^2 des Fits ist ebenfalls angegeben.

Probe in <i>E. coli</i> Zellen	Cluster (%)	τ_1 (ns)	ϕ_1 (%)	τ_2 (ns)	ϕ_2 (%)	τ_3 (ns)	ϕ_3 (%)	τ_{pop} (ns)	χ^2
Archon 1	56	0.09	93	0.39	3	2.80	4	0.21	1,3
	28	0.11	83	0.78	6	4.20	11	0.60	2,0
	16	0.12	92	1.80	4	7.90	4	0.50	2,1
+ Gramicidin 1 Minuten	100	0.11	98	0.64	1	3.20	1	0.15	1,5
+ Gramicidin 2 Minuten	100	0.11	98	0.60	1	3.10	1	0.14	1,7
+ Gramicidin 15 Minuten	100	0.11	98	0.61	1	3.20	1	0.15	1,4
+ 1799 1 Minute	100	0.10	83	0.58	8	2.80	9	0.16	1,6
+ 1799 15 Minuten	100	0.10	92	0.48	3	3.30	5	0.18	1,3

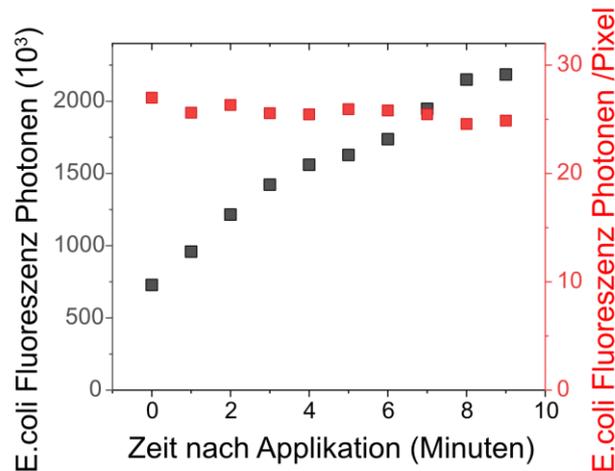


Abbildung 4.13 **Entwicklung der Auswertung der FLIM-Intensität Assay mittels Pixel basierter Intensität.** Die Fluoreszenz Intensität der *E. coli* C41 (DE3) Suspension mit überexprimierter Archon1 in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl nach aufsummiert für 1 Minute (grau) und mittels Cluster-FLIM korrigierte Fluoreszenzintensität pro Cluster-Pixel. Die Anregung erfolgte bei 640 nm und die Fluoreszenz wurde mittels 665 nm Langpassfilter und Quad-Notch Filter für insgesamt 10 Minuten Detektion bei 19°C gemessen.

Hier zeigt sich in Abbildung 4.13, dass keine Intensitätssteigerung der Fluoreszenz pro Pixel innerhalb von 10 Minuten sichtbar ist, wenn kein Ionophor hinzugegeben wird. Wird die Gesamtintensität des FLIM-Bildes berücksichtigt, zeigt sich ein stetiger Anstieg in diesem Zeitraum. Somit werden alle Untersuchungen, die eine Änderung der Intensität der *E. coli* Zellen untersuchen, als Clusterintensität pro Pixel dargestellt. Hierbei wird die gemittelte Intensität derjenigen Pixel verwendet, die mittels Calia aufgrund ihrer Lebenszeitsignatur der Arch3 Variante zugeordnet wird.

Als Zeitreihenuntersuchung der Veränderung der Fluoreszenzintensität wird nach Zugabe von Gramicidin zu *E. coli* C41 Suspensionen mit überexprimierter Archon1 pro Minute eine FLIM-Messung für 15 Minuten durchgeführt. Die dabei aufgenommenen FLIM-Bilder sind in Abbildung 4.14 gezeigt.

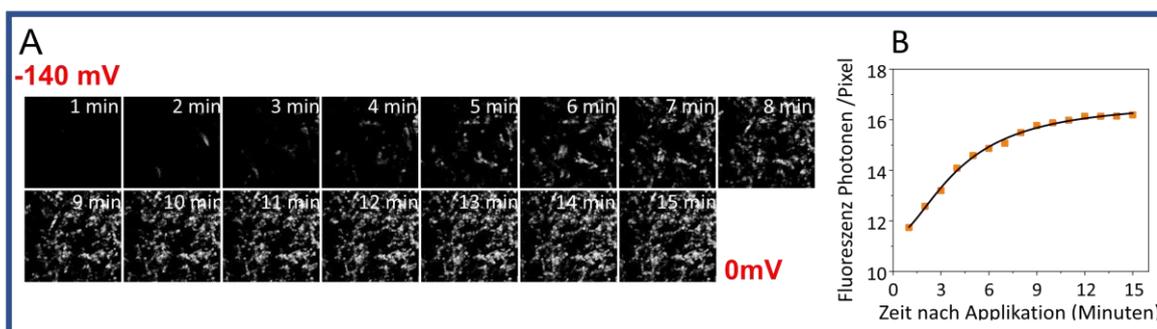


Abbildung 4.14 **Fluoreszenzlebenszeit Messungen von Archon1 in lebenden *E. coli* Zellen nach Zugabe von Gramicidin mit FLIM.** Nach Zugabe von 10 μ M Gramicidin zu der *E. coli* C41 Suspension mit überexprimierter Archon1 in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 15 aufeinanderfolgende FLIM-Bilder mit jeweiliger Detektionszeit von 1 Minute wurden aufgenommen a). Die mittels Cluster-FLIM korrigierte Fluoreszenzintensität pro Cluster-Pixel von Archon1 als zeitliche Funktion der Membrandepolarisation ist dargestellt b). Mittels des Hill-Modells kann eine Zeitkonstante von 4 Minuten für die Membrandepolarisation mittels Gramicidin bestimmt werden.

Die Auswertung der Intensitäten erfolgte analog zu der Auswertung der Daten in Abbildung 4.11. Die gemittelte Fluoreszenzintensitäten pro Clusterpixel zeigen nach Zugabe von Gramicidin einen kontinuierlichen Anstieg. Durch die Anpassung mit einem Hill Fit mit Hillkonstante $n=1$

$$I = \frac{1}{1 + k_I/t} \cdot I_{max} \quad (40)$$

kann die Zeitkonstante zur Halbintensitätszunahme k_I mit 4 ± 1 Minuten bestimmt werden. Nach ca. 12 Minuten zeigt die gemittelte Fluoreszenzintensität pro Clusterpixel keine signifikante Zunahme mehr. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Zellen ein Membranpotential von 0 mV erreicht haben (Silapetere 2022).

Zur genaueren Betrachtung der Veränderung der Intensität über die Zeit nach Zugabe von Gramicidin werden ausgewählte *E. coli* Zellen direkt in den FLIM-Bildern identifiziert und deren Intensität Linienprofile dargestellt. In Abbildung 4.15 sind die Profile in zwei Bereichen für 3 bis 7 Minuten nach Gramicidin Zugabe repräsentativ gezeigt. Beide Profile zeigen eine Zunahme über die Zeit bei gleichbleibender Position der Maxima. Somit zeigen auf dem Glasträger befindliche *E. coli* eine Veränderung ihrer Archon1 Intensität aufgrund der Membranspannung. Auch bei den auf der Glasoberfläche liegenden Zellen findet eine Reduzierung des Membranpotentials statt und dieser wird durch Arch3 Varianten aufgrund ihren veränderten Fluoreszenzeigenschaften registriert. Dies wurde in dieser Arbeit sowohl mittels einzelnen Zellen, als auch mittels statistischer Analyse bestimmt.

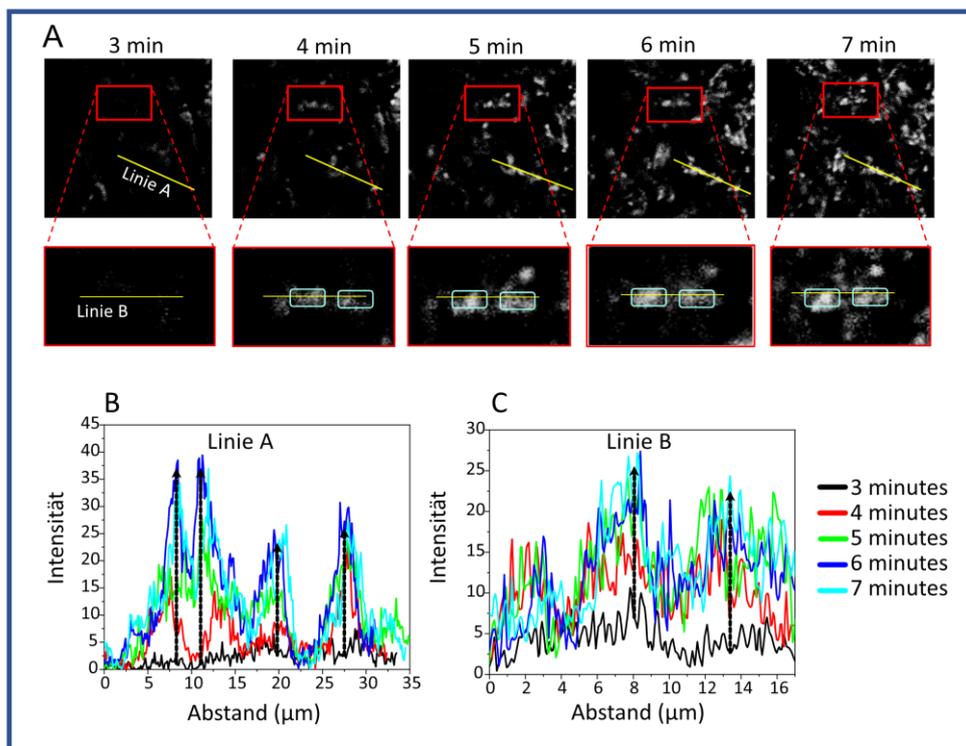


Abbildung 4.15 **Untersuchung von einzelnen *E. coli* Zellen nach Zugabe von Gramicidin.** Aus der Messreihe von Abbildung 4.14 sind die FLIM-Bilder zwischen Minute 3 bis 7 ausgewählt worden und zwei exemplarische Linienscans durch *E. coli* Zellen über die Zeit durchgeführt worden. Die Intensitätsprofile sind als Profilelinien A und B über die Zeit dargestellt in B und C.

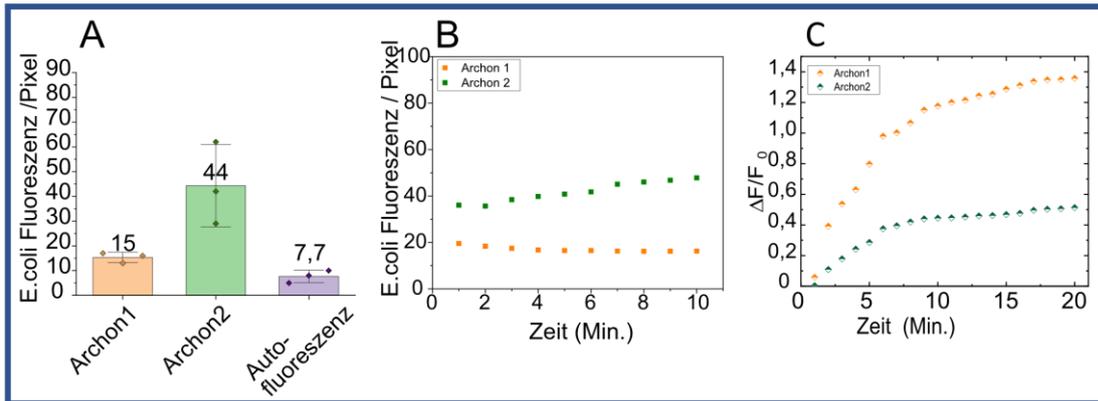


Abbildung 4.16 **Vergleich der Fluoreszenzintensität pro Pixel in den *E. coli* Zellen mit überexprimierten Archon1 und Archon2.** Fluoreszenzintensität von Archon1 und Archon2 und der Autofluoreszenz der *E. coli* Zellen in ihrem Ruhezustand A) als Mittelwert aus jeweils drei Experimenten (Einzelmessung als Punkte dargestellt). In B) Mittels Cluster-FLIM ausgewertete Zeitreihe von 10 Minuten ist kein Bleaching Effekt im Ruhezustand von Archon1 und Archon2 sichtbar. C) Zeitreihen nach Zugabe von 10 μM Gramicidin und damit einhergehender Membrandepolarisation dargestellt als Änderung der Fluoreszenz in $\Delta F/F_0$.

Der zuvor entwickelte *E. coli* Assay mit Archon1 wird nun auch auf *E. coli* Zellen mit überexprimierten Archon2 angewendet und analysiert. In Abbildung 4.16 sind von drei unterschiedlichen Experimenten die Ruheintensitäten von Archon1, Archon2 und die Autofluoreszenz der Zellen aufgetragen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die Autofluoreszenz eine andere Lebenszeitsignatur als die Arch3 Varianten trägt und somit bei der Bestimmung der Clusterintensitäten zusätzlich nicht berücksichtigt wird. Bei der Betrachtung der Zellen mit Archon1 und Archon2 zeigt sich bei Anregung durch den im FLIM verwendeten Weißlichtlaser nur eine geringe Änderung der Clusterintensität pro Pixel und ein Anregungslicht basierendes Ausbleichen des Fluorophoren ist nicht zu erkennen. Bei der Betrachtung der relativen Fluoreszenzintensitätsänderung pro Pixel ΔF , normiert mit der Intensität nach direkter Zugabe von Gramicidin F_0 ist in Abbildung 4.16 für Archon1 ein Intensitätszuwachs auf 1,38 und für Archon2 auf 0,4 zu sehen. Die in diesen Messungen bestimmten Lebenszeiten für Archon1 und Archon2 sind vor und nach 20 Minuten Gramicidin Zugabe in Tabelle 4.6 zusammengefasst und zeigen nur geringe Änderungen. Aufgrund der erhöhten Spannungssensitivität wird in dem zu etablierenden Assay Archon1 verwendet und in die Proteoliposome integriert.

Tabelle 4.6 **Vergleich der Fluoreszenzlebenszeit in den *E. coli* Zellen mit überexprimierten Archon1 und Archon2.** Fluoreszenzlebenszeit von Archon1 und Archon2 in ihrem Ruhezustand vor und nach 20 Minuten Zugabe von 10 μM Gramicidin in 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl. Die fraktionalen Amplituden der einzelnen Komponenten sind in Klammern in Prozent angegeben.

Probe	τ_1 (ns)	ϕ_1 (%)	τ_2 (ns)	ϕ_2 (%)	τ_3 (ns)	ϕ_3 (%)	τ_{pop} (ns)	χ^2
Archon 1 (ohne Gramicidin)	0.11	96	0.67	2	3.70	2	0,20	2.30
Archon 1 (20 Min. nach Gramicidin)	0.10	95	0.39	3	3.29	2	0,17	2.49
Archon 2 (ohne Gramicidin)	0.08	96	0.28	3	5.58	2	0,20	2.91
Archon 2 (20 Min. nach Gramicidin)	0.09	96	0.80	3	5.00	1	0,17	2.34

4.3 Charakterisierung von oberflächenaktivierten Mikroskopie Gläser

Teil dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Proteoliposomen Assays der in den erweiterten Fluoreszenzmikroskopie Aufbauten verwendet werden kann. Um über einen längeren Zeitraum gleiche Proteoliposome zu untersuchen, wird wie in Kapitel 3.5 beschrieben, eine Fixierung mittels Biotin-Neutravidin Verbindung gewählt. Bevor die Proteoliposome an die Mikroskopiegläser gekoppelt werden, wird die Bindung des Biotin-Neutravidin Komplexes auf Funktionsfähigkeit der gekoppelten Gruppe und Erreichbarkeit durch das Medium untersucht.

Zuerst wird das Bindungsverhalten mit einem biotinylierten Farbstoff (Atto647N-biotin) untersucht. Bei nicht vorhandener Funktionalisierung der Glasträger ist nach einmaligen Waschvorgang mit Puffer kein Farbstoff mehr auf dem Glasträger im FLIM zu erkennen, wie in Abbildung 4.17 gezeigt. Erst nach Funktionalisierung der Glasträger, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, sind die einzelnen Bindungen auch nach dreifachem Waschvorgang mit Puffer stabil. Nach einer Korrektur der Intensitäten nach Abzug des Hintergrundes sind die Emitter anhand ihrer korrigierten Intensität I_{corr} in ein Häufigkeitsdiagramm eingetragen. Da Neutravidin vier mögliche Bindungstaschen aufweist und eine zur Verknüpfung an die Glasoberfläche verwendet wird, können theoretisch bis zu drei Bindungen mit dem biotinylierten Farbstoff eingegangen werden. Mit Hilfe einer Summe aus drei Normalverteilungen mit dem jeweiligen Erwartungswert μ und Varianz σ_i

$$Anzahl = \sum_{i=1}^3 \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_i^2}} e^{-\frac{(I_{corr}-\mu_i)^2}{2\sigma_i^2}} \quad (41)$$

kann die jeweilige Intensität bei bis zu drei möglichen Farbstoffbindungen zu dem Neutravidin identifiziert werden in Abbildung 4.17. Somit erfolgt eine Kopplung des biotinylierten Farbstoffes via Neutravidin an der Oberfläche des Glasträger.

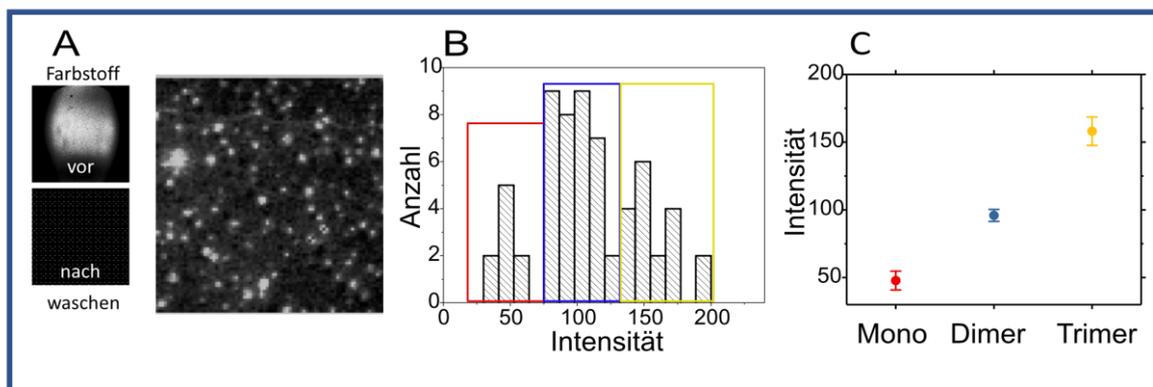


Abbildung 4.17 **Bindungsverhalten eines biotinylierten Farbstoffes an den oberflächenaktivierten Objektträger.** A) Biotinyliertes Atto647N vor und nach Waschen ohne vorherige Oberflächenaktivierung der Objektträger. B) TIRFM Aufnahme nach 3-mal waschen mit 10 mM Tris pH 8 des oberflächenaktivierten Objektträgers und vorher 2 Minuten mit Atto-647N inkubiert. C) Baseline korrigierte Intensitäten der Punktemitter sind mittels Localizer identifiziert und deren Intensität als Balkendiagramm dargestellt. Drei Maxima wurden identifiziert und mittels der Summe von drei Gaußschen Funktionen bestimmt und in C) als mögliche Mehrfachbindung an ein Neutravidin Molekül aufgetragen. Der angegebene Fehler resultiert aus der Standardabweichung. 500 Bilder mit Bildfrequenz von 100 ms/Bild sind mittels einer Anregung bei 632 nm und einem Fluoreszenzfilter 660 nm Bandstopp im TIRFM Aufbau aufgenommen.

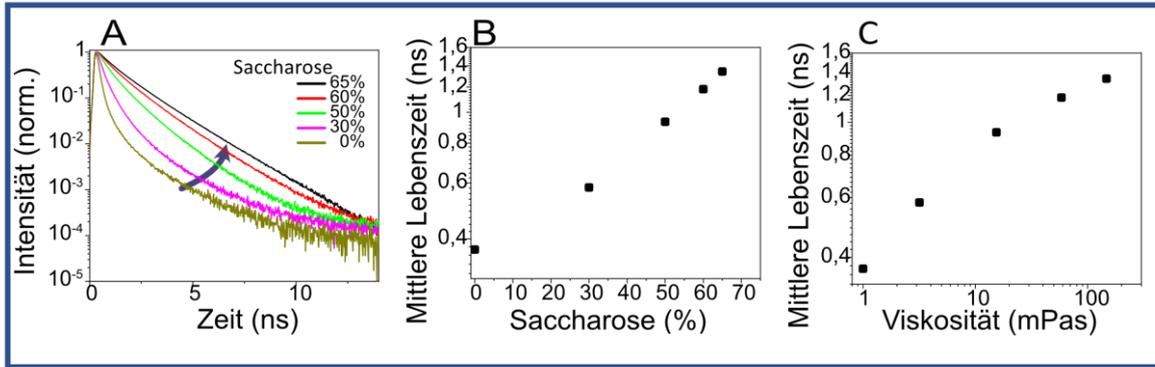


Abbildung 4.18: **Kontrolle der Interaktionsfähigkeit von oberflächengebundenen Cy3-PEG-biotin mit Saccharose im FLIM.** A) Fluoreszenter Lebenszeitenzerfall von Cy3-PEG-biotin nach Bindung und waschen an oberflächenaktivierten Objektträger bei veränderter Saccharose Konzentration in Wasser mit den nach Formel X bestimmten gemittelten Lebenszeiten B). C) aus (Ober 2019) bestimmte Viskosität bei angewandeter Saccharose Konzentration verwendet, um die Viskosität als Funktion der mittleren Lebenszeit darzustellen. Anregung im FLIM bei 530 nm für 180s Aufnahmezeit der Fluoreszenz mit 565 Langpass Filter.

Nach erfolgreicher Bindung und Kopplung des Farbstoffes ist es wichtig den Erhalt der Interaktionsfähigkeit der gekoppelten Moleküle zu untersuchen. Hierzu wird der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 mit einem PEG-Biotin Linker (siehe Kapitel 3.4) benutzt. Nach erfolgter Kopplung an die oberflächenaktivierten Glasträger, wird im FLIM bei unterschiedlicher Saccharose Konzentration die Fluoreszenz Lebenszeit untersucht. In Abbildung 4.18 ist die Änderung aufgrund der unterschiedlichen viskösen Umgebung die unterschiedlichen Fluoreszenzzerfallskurven zu sehen. Die bestimmte mittlere Lebenszeit aus der Komponentenanalyse wird im Vergleich zur Saccharose Konzentration im Stern Volmer Graph aufgetragen. Mittels der in (Ober 2019) erstellten Eichkurve von Saccharose Konzentration und Viskosität im FLIM, wird der Stern Volmer Graph in Abhängigkeit der Viskosität des umliegenden Mediums dargestellt. Hierbei ist bei steigender Viskosität des Mediums eine Steigerung der mittleren Fluoreszenzlebenszeit für das gekoppelte Cy3-PEG-Biotin zu sehen. Somit bleiben gekoppelte Gruppen an das Neutravidin in dem gewählten Aufbau weiterhin gut durch die Lösung und darin enthaltene Stoffe erreichbar.

4.4 Etablierung des Einzelproteoliposomen Assays mit Archon1

Die in Kapitel 3.5 verwendeten Proteoliposome sollen in dieser Arbeit mittels der zuvor untersuchten Kopplungsgruppe Biotin/Neutravidin auf den Glasträgern fixiert werden. Bei der Einbringung von Archon1 in die Proteoliposome muss sowohl die Einbringung als auch die Ausrichtung der Proteine in der Membran untersucht werden. Hierbei ist es nun unklar, in welcher Ausrichtung die Proteine in die Proteoliposome eingebracht werden. Dies ist aber für die spätere Messung der Fluoreszenz entscheidend, um korrekt die Fluoreszenzänderung als Änderung des Membranpotentials zu identifizieren.

Archon 1 mit markierten Lys (rot)

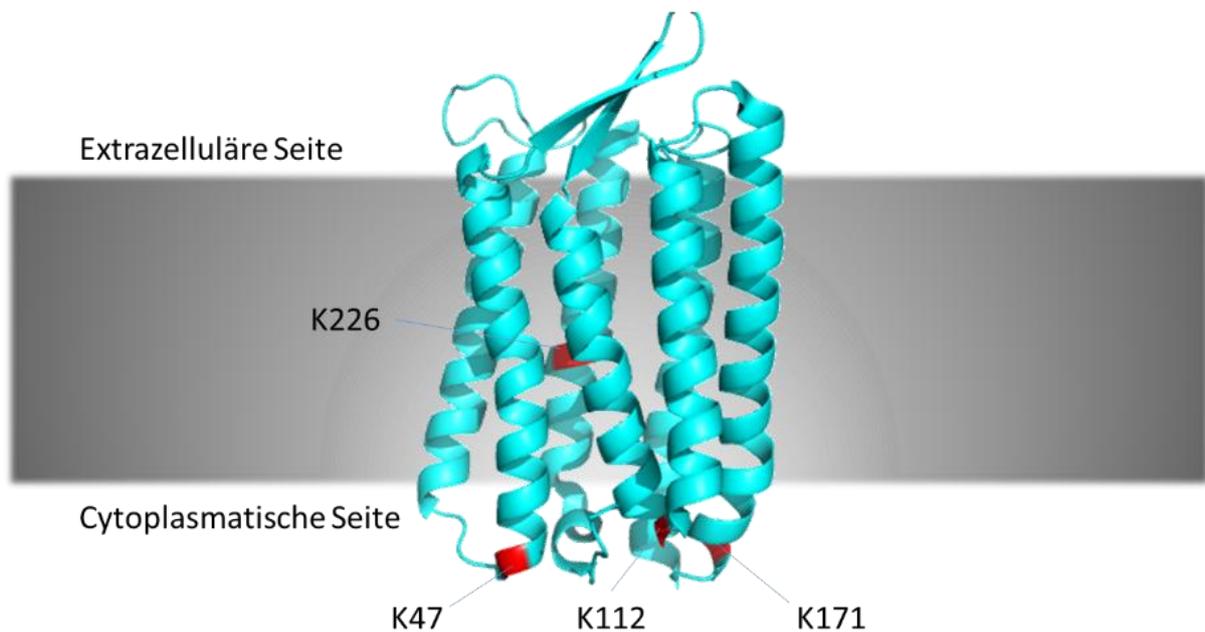


Abbildung 4.19: Archon1 in einer Modellmembran mit vorhandenen Lysin Resten dargestellt in Rot. Mögliche Bindungspartner für fluorescein-5-isothiocyanate befinden sich somit auf der zytoplasmatischen Seite von Archon1.

Hierzu wird oberflächenexponiertes Lysin mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Abbildung 4.19 zeigt die Oberflächenlysine bei der Archon1 Variante. Bei genauerer Betrachtung der Arch-3 Varianten zeigt sich, dass sich an der Oberfläche zugängliche Lysinreste nur auf der zytoplasmatischen Seite befinden. Somit wird eine Sonde die spezifisch an Lysinreste (K) bindet, nur an einer Seite dieser Proteine binden. Hierfür wurde ein Isothiocyanat Derivat von Fluorescein, FITC, gewählt, da diese Linkergruppe unter physiologischen Puffer Bedingungen an Lysin bindet (Tuls 1989). Das Molekül ist in Kapitel 3.4 beschrieben. Diese Sonde besitzt zusätzlich die Eigenschaft auf den umgebenden pH mit einer Änderung seiner Absorption zu reagieren (siehe Kapitel 3.15). Ebenso wird dadurch die Fluoreszenzintensität beeinflusst, wie in Abbildung 4.21 zu sehen ist. Durch Veränderung der wässrigen Phase innerhalb und außerhalb der Proteoliposome kann nun die Ausrichtung anhand der Änderung der Fluoreszenz untersucht werden. Die Schematische Darstellung hierzu ist in Abbildung 4.20 gezeigt. Aufgrund dieser Überlegung wurde die ortsspezifische Markierung von Archon-1 mit FITC durchgeführt. Die Markierung ist wie in Kapitel 3.8 hierfür durchgeführt worden.

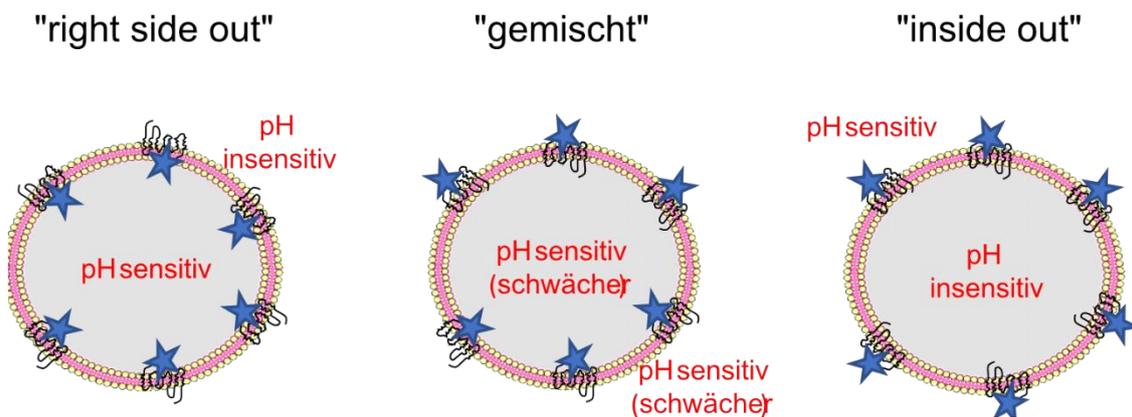


Abbildung 4.20: Mögliche Inkorporation von FITC markierten Archon1 in Proteoliposom und der durch den pH sensitiven Farbstoff Identifikation der Einbaurichtung von Archon1 in den Liposomen. Drei mögliche Ausrichtungen sind möglich: 1) „right side out“ mit der pH Reportergruppe nur in das Lumen der Proteoliposome zeigend und somit die Cyt-c Bindungsstelle nach Außen; 2) „inside out“ mit den Reportergruppen nach Außen zeigend oder 3) eine „gemischte“ Orientierung aus den beiden.

Nach Kopplung und bestimmter Markierungsstöchiometrie erfolgte der Einbau der markierten Moleküle in die Proteoliposome und die Kopplung der Proteoliposome an die Oberfläche wie in Kapitel 3.5 beschrieben. Hierbei werden zwei Puffer mit unterschiedlichen pH verwendet, 50 mM Tris, 150 mM NaCl mit pH 6 oder pH 9. Dadurch wird der pH innerhalb der Proteoliposome jeweils zu pH 6 oder 9 eingestellt. Nach Vermessung der Proben im TIRFM

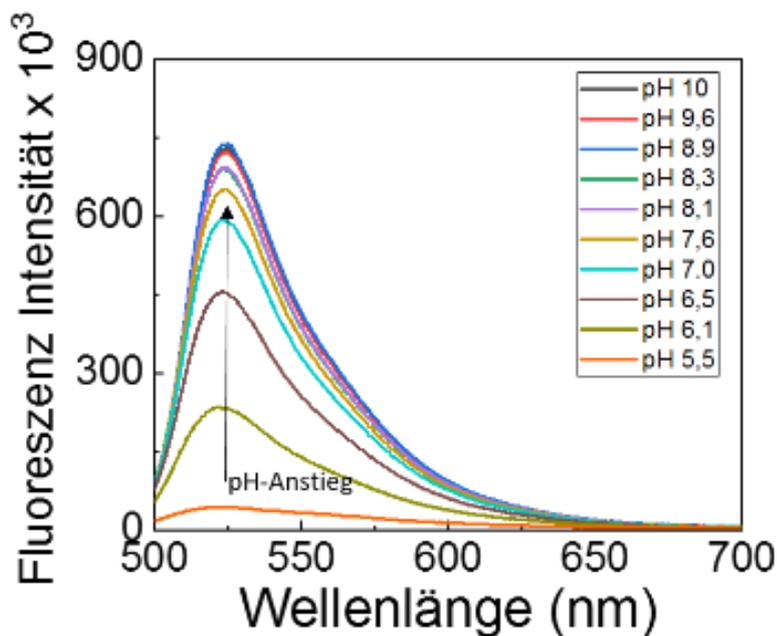


Abbildung 4.21: pH Titration und Fluoreszenzintensitätsmessungen von FITC in 1 mM TRIS durch Zugabe von konzentrierter HCL oder NaCl erfolgte die Einstellung der gezeigten pH-Werte bei minimaler Probenverdünnung (<2%). Fluoreszenz Intensität ist bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm gemessen worden.

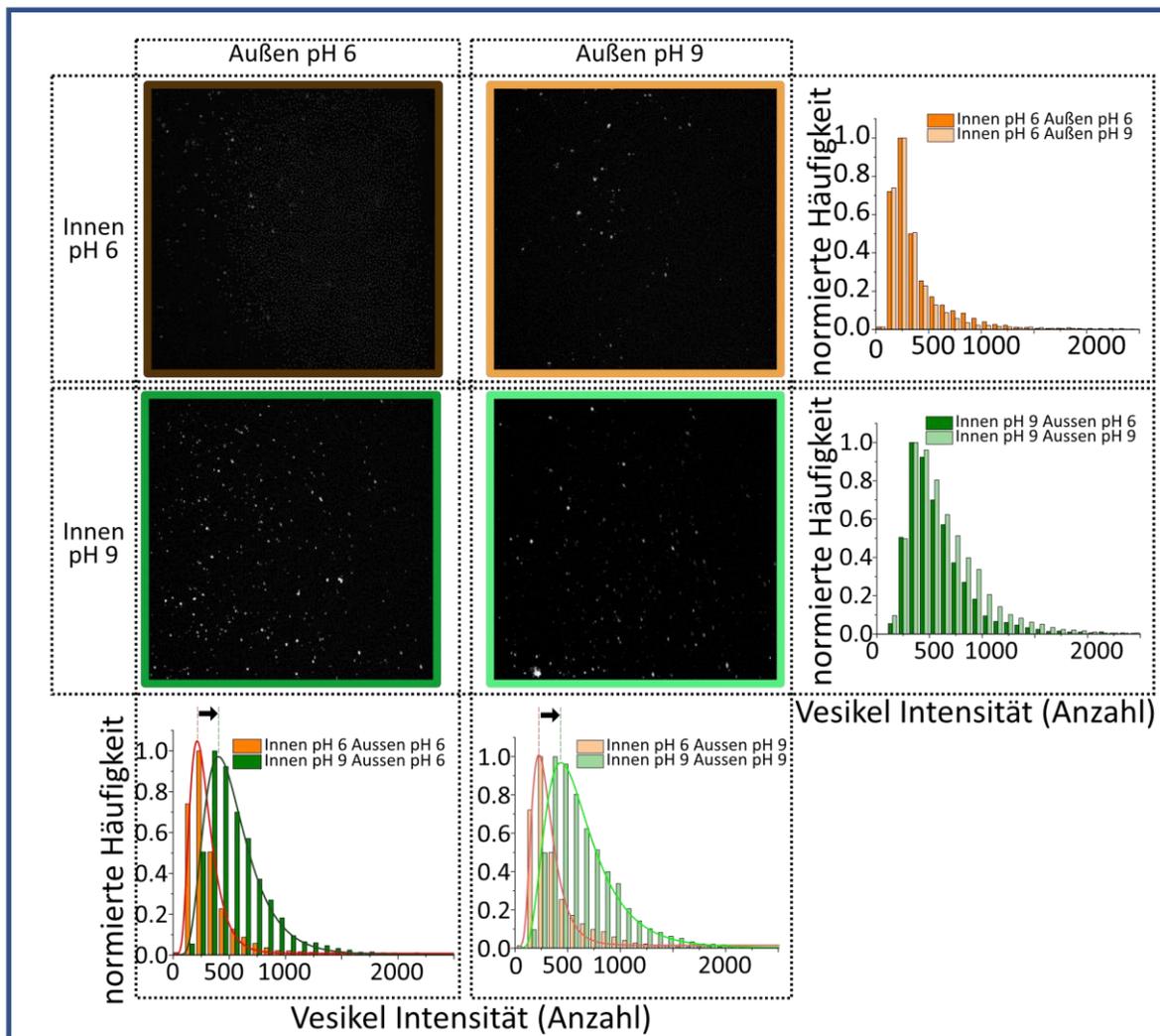


Abbildung 4.22: **Bestimmung der Einbaurichtung der pH sensitiven Archon1-FITC beladenen Vesikel im TIRFM.** Biotinylierte Vesikel mit innerem Puffer 50 mM Tris-HCl (jeweils entweder pH 6 oder 9), 150 mM NaCl mit Archon1-FITC beladen (1:10) sind an oberflächenaktivierte Mikroskopie Gläser gebunden für 2 Minuten und danach 3-mal mit Puffer 50 mM Tris-HCl (pH 6,0), 150 mM NaCl gewaschen und danach vermessen. Danach erfolgte der externe Pufferaustausch zu 50 mM Tris-HCl (pH 9,0), 150 mM NaCl. TIRFM Bilder sind als Maximalintensitätsbilder von 1000 Bildern bei 200ms/Bild Aufzeichnungszeit bei einer Anregung bei 488nm dargestellt, um die einzelnen Vesikel zu identifizieren. Die Lokalisation einzelner Vesikel und deren Hintergrund korrigierten Intensitäten pro Bild erfolgte mittels Localizer und sind als normierte Häufigkeit jeweils im Balkendiagramm dargestellt.

Aufbau wird der externe Puffer jeweils ausgetauscht. Somit kann wie in Abbildung 4.22 gezeigt der gekoppelte pH sensitive Farbstoff FTIC untersucht werden. Der Vergleich der Histogramme der Häufigkeit von Emittlern/Proteoliposommembranen gefüllt mit Archon1-FITC zeigt bei einem externen Pufferaustausch nur sehr geringe Verschiebung der Häufigkeit der Emittter zu höheren Intensitäten bei einer Erhöhung des externen pHs.

Erst bei der Betrachtung der Häufigkeitshistogramme bei einem pH Austausch innerhalb der Proteoliposomen ist eine eindeutige Verschiebung des Maximums der Häufigkeit zu höheren Intensitäten bei höherem pH zu sehen. Diese Verschiebung ist sowohl bei einem externen pH von 6 oder 9 zu erkennen. Somit zeigt sich, dass nahezu alle markierten Archon1-FITC Proteine mit ihrer markierten zytoplasmatischen Seite (siehe Abbildung 4.21) nach innen in den Proteoliposommembran eingelagert sind.

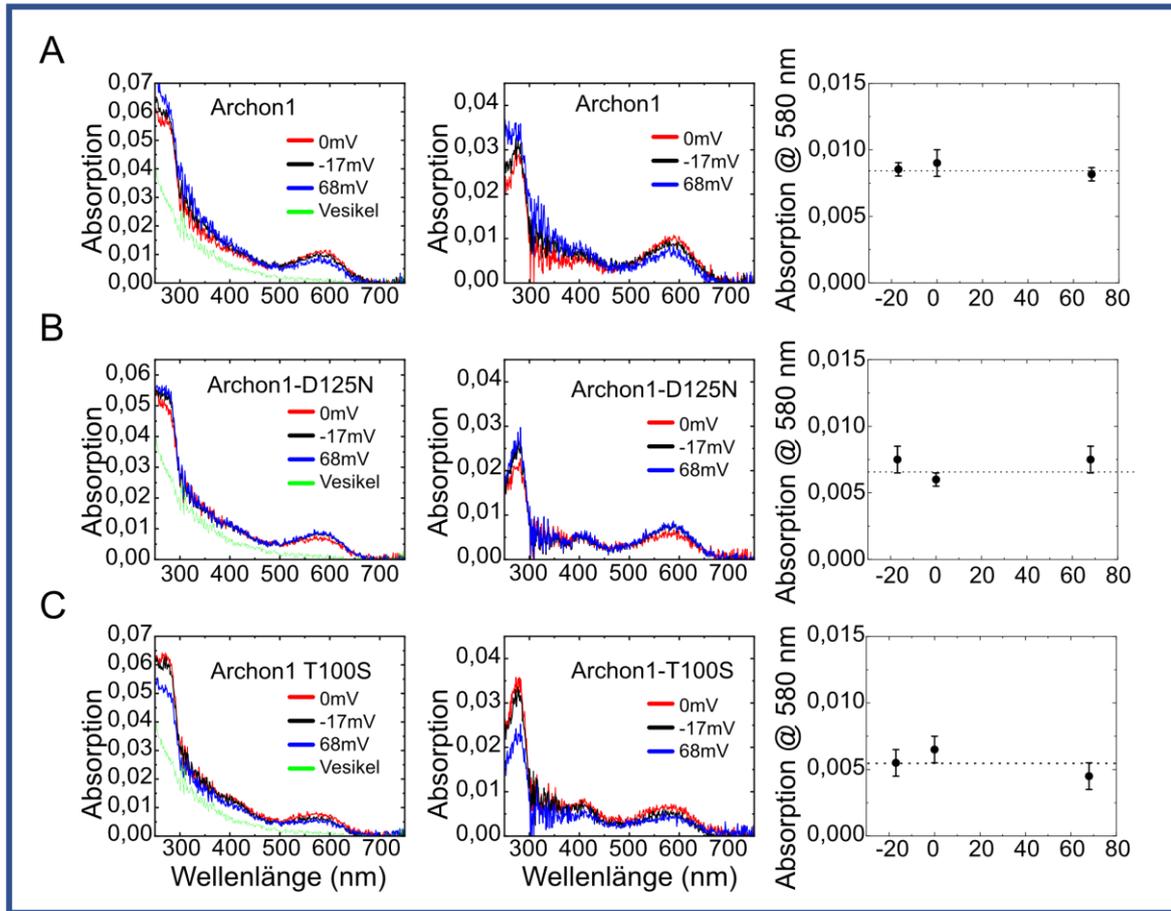


Abbildung 4.4.23 **Bulk Absorption der Archon1 Varianten in 100nm Vesikel.** Biotinylierte Vesikel mit innerem Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid mit Archon1 und Varianten beladen (1:10) sind an oberflächenaktivierte Mikroskopie Gläser gebunden für 2 Minuten und danach 3-mal mit Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid gewaschen. Zur Änderung der Membranspannung der Vesikel wurde der externe Puffer ausgetauscht mit 5 mM und 150 mM KCl Konzentration. Absorptionsspektren mit Kugeleinsatz zur Reduzierung der Streuung durch die Vesikel wurden von den beladenen und unbeladenen Vesikeln aufgenommen und das Differenzspektrum ermittelt. Das Differenzabsorptionsspektrum von beladenen und nicht beladenen Vesikeln zeigt bei 580 nm keine Membranspannungsabhängige Absorptionsänderung für Archon 1 (A), D125N (B) und T100S (C).

Nach Überprüfung des Einbaus von Archon1 in Proteoliposomen wird nun das Fluoreszenzverhalten durch eine induzierte Membranspannung untersucht. Hierzu wird zuerst Archon1 und dessen Varianten T100S und D125N eingebettet in Proteoliposomen auf ihr Absorptionsverhalten bei unterschiedlichen Membranspannungen untersucht. Die Einstellung des Membranpotentials erfolgt, wie in Kapitel 3.5 beschrieben über die Veränderung der externen Kaliumionenkonzentration. Die Umrechnung von Kaliumionenkonzentration zu Membranpotential erfolgt mittels der Nernst Gleichung. Nach Beladung der Proteoliposome mit Archon1 und dessen Varianten wird die Absorption der Proben in freien Vesikeln untersucht. Hierbei wird wie in Abbildung 4.23 gezeigt die Absorption analog zu den Messungen in Abbildung 4.1 in den Proteoliposomen durchgeführt. Aufgrund der Größe der Proteoliposome mit einem Durchmesser von $\sim 100\text{nm}$ zeigt sich eine signifikante Streuung bei den Absorptionsmessungen. Deswegen werden unbeladene Proteoliposome vermessen und ein Differenzspektrum mit den beladenen Proteoliposomen bestimmt. Die beladenen Proteoliposome werden bei drei unterschiedlichen Membranspannungen (-17mV, 0mV und 68mV) vermessen. Es zeigten sich nur geringe

Abweichungen bei allen drei Varianten und die Absorptionsmaxima bei 580 nm zeigen für alle Varianten im Rahmen des Fehlers keine Abweichung. Das Fluoreszenzverhalten von Archon1 und dessen Varianten wird in den folgenden Kapiteln im TIRFM und FLIM fixiert auf Glaträgern untersucht.

4.4.1 Mikroskopische Untersuchung der Proteoliposome mit Archon1

Zur Bestimmung des Fluoreszenzverhalten von Archon1 in Proteoliposomen mit veränderter Membranspannung werden die zuvor beladenen Proteoliposome mittels der Neutraavidin-Biotin Verankerung an die zuvor funktionalisierten Glaträger befestigt.

Zur Untersuchung der Intensitätsabhängigen Fluoreszenzänderung werden die fixierten mit Archon1 in der Membran beladen Proteoliposome im TIRFM untersucht. Hierbei wird die externe Kaliumkonzentration variiert und bei zwei unterschiedlichen Anregungswellen die Fluoreszenz im TIRF Mikroskop Aufbau untersucht. Die dabei mit dem Programm Localizer identifizierten Emitter mit integrierter Intensität werden vom Hintergrundsignal bereinigt und sind für die beiden Anregungswellenlängen in Abbildung 4.24 in Abhängigkeit der anliegenden Membranspannung als gemittelte Intensitätswerte dargestellt. Bei beiden Anregungen ist ein Anstieg der Fluoreszenz von Archon1 zu erkennen, wobei bei einer Anregung von 633 nm ein linearer Anstieg der Intensität im vermessenen Bereich von -75 mV bis 68 mV zeigt.

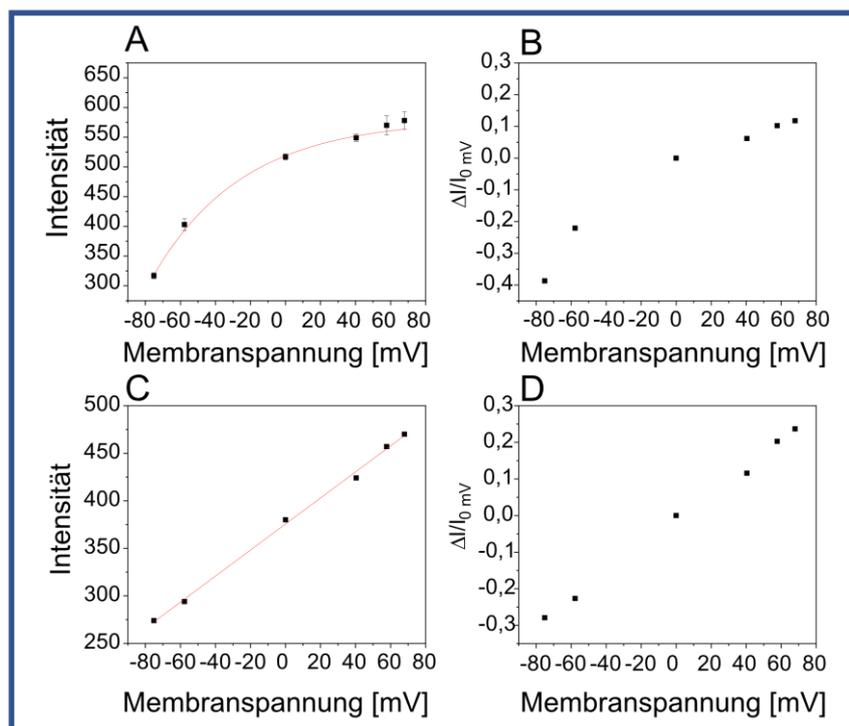


Abbildung 4.24 Membranspannungsabhängige Fluoreszenz der Archon1 Varianten in 100nm Vesikel. Biotinylierte Liposome mit innerem Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid mit Archon1 beladen (1:10) sind an oberflächenaktivierte Mikroskopie Gläser gebunden für 2 Minuten und danach 3-mal mit Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid gewaschen. Zur Änderung der Membranspannung der Vesikel wurde der externe Puffer ausgetauscht mit 0,5, 1, 50, 100 und 150 mM KCl. Aufnahmen im TIRFM bei entweder A) 561 oder C) 633 nm Anregung wurden 1000 Bilder mit einer Bildrate von 100ms/Bild aufgenommen bei jeder KCl Konzentration. Die mittels Localizer bestimmten Hintergrund korrigierten Intensitäten der Vesikel sind als Häufigkeitsdiagramm ermittelt und die mittels einer Log-Normalfunktion bestimmten Mediane Intensität als Funktion der Membranspannung dargestellt. Die Intensitäten $I_{i\text{ mV}}$ sind als auf die Intensität bei keiner anliegenden Membranspannung $I_{0\text{ mV}}$ normiert dargestellt $\Delta I/I_{0\text{ mV}} = (I_{i\text{ mV}} - I_{0\text{ mV}}) / I_{0\text{ mV}}$ für die Anregung bei entweder B) 561 oder D) 633 nm.

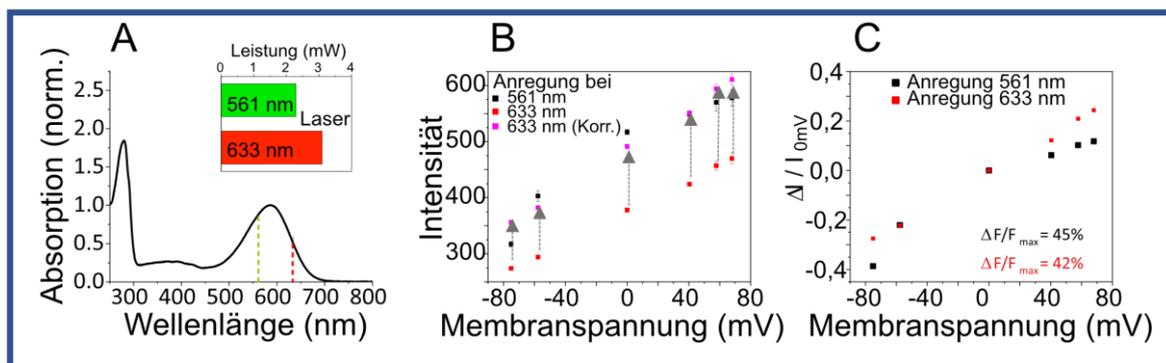


Abbildung 4.25 **Vergleich der Fluoreszenz von Archon1 in 100nm Vesikel bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge im TIRFM.** A) Das Absorptionsspektrum von CcO mit angedeuteter Anregungswellenlänge der Laser. Die in Bild 4.24 bestimmten Intensitäten mit Anregung bei 561 (grün) und 633 nm (rot) von Archon1 in Vesikel bei unterschiedlicher Membranspannung sind in (B) zusammen dargestellt. Bei Verwendung der bestimmten Leistung der Laser am Mikroskop und den unterschiedlichen Absorptionen von Archon1 bei den Wellenlängen ergibt sich eine Korrektur der Intensitäten bei 633 nm (Magenta). In (C) sind die normierten $\Delta I/I_{0mV} = (I_{i,mV} - I_{0mV}) / I_{0mV}$ bei 561 und 633 nm (gleicher Farbcode wie in (B)) dargestellt.

Bei einer Anregung von 561 nm zeigt sich ein logarithmischer Anstieg. Bei dem Vergleich der normierten Intensitäten zu $(I - I_{0mV}) / I_{0mV}$ zeigt sich bei 561 nm und 633 nm eine relative Erhöhung bei 68 mV um 16% bzw. 23%. Bei negativer Membranspannung von -75mV reduziert sich zu 0mV das Fluoreszenzsignal um 39% und 29% bei 561 und 633 nm Anregung.

Die unterschiedlichen absoluten Intensitäten müssen zum direkten Vergleich, mit dem im Kapitel 3.13 beschriebenen Korrektur der Laserleistung und der unterschiedlichen Absorption von Archon1 bei 561 und 633 nm korrigiert werden. Die Anpassung der Intensität ist in Abbildung 4.25 gezeigt und zeigt ein wesentlich ähnlicheres Intensitätsverhalten auch in den absoluten Werten. Ein direkter Vergleich der relativen Intensitäten in Abbildung 4.25 zeigt die unterschiedliche Sensitivität von Archon1 basierend auf der Anregungswellenlänge.

Um einen besseren Vergleich zu Zellexperimenten mit anfänglicher negativer Membranspannung zu haben, wird in Abbildung 4.25 die relative Änderung Fluoreszenz bei beiden Anregungswellenlängen dargestellt. Hier zeigt sich eine ähnliche Erhöhung der Fluoreszenz bei 561 und 633nm mit 42% und 45% von -75 zu 68 mV.

Die hier bestimmten Eichkurven aus relativer Intensität und Membranspannung werden genutzt, um spätere Intensitätsunterschiede durch Aktivierung der CcO als Veränderung der Membranspannung zu identifizieren.

4.4.2 Fluoreszenz Lebenszeit Untersuchung der Proteoliposome

Für die Untersuchung der Kopplung von Membransensitivität und Fluoreszenz Signal ist die Untersuchung der Fluoreszenzlebenszeit notwendig. Hierzu wird Archon1 und dessen Varianten T100s und D125N im FLIM untersucht. Die Untersuchung im FLIM erfolgte bei 640 nm Anregungswellenlänge. Aufgrund des Energieprofils des verwendeten gepulsten Weißlichtlasers ist eine Analyse der Fluoreszenzlebenszeit bei 560 nm aufgrund schwächerer Intensität nicht möglich.

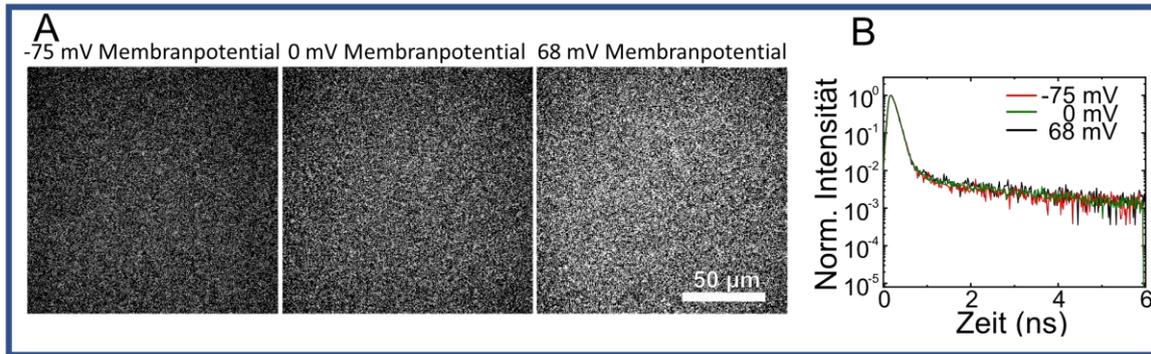


Abbildung 4.26 **Untersuchung der Fluoreszenzlebenszeitänderung von Archon1 in 100nm Vesikel bei unterschiedlicher Membranpotential im FLIM.** Biotinylierte Proteoliposome mit innerem Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid mit Archon1 beladen (1:10) sind an oberflächenaktivierte Mikroskopie Gläser gebunden für 2 Minuten und danach 3-mal mit Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid gewaschen. Zur Änderung der Membranpotential der Vesikel wurde der externe Puffer ausgetauscht mit veränderter KCl Konzentration von 0,5, und 150 mM. Proben sind bei einer Anregungswellenlänge von 640 nm für 5 Minuten im FLIM aufgenommen und mittels Calia ausgewertet worden. Die aus den FLIM-Bildern extrahierte Fluoreszenzlebenszeit Zerfall ist in b) gezeigt.

Bei einer Anregung von 640 nm sind die fixierten Proteoliposome mit Archon1 Varianten bei drei eingestellten Membranpotentialen untersucht worden. Exemplarisch sind in Abbildung 4.27 die Proteoliposome beladen mit Archon1 bei -75, 0 und 68 mV als Intensitätsbild und die aus den FLIM-Bildern bestimmten Fluoreszenzzerfallskurven gezeigt. Hierbei ist keine Änderung der Zerfallskurven innerhalb des gewählten Bereiches der Membranpotentialen zu erkennen.

Aufgrund der schwachen Intensität von durchschnittlich 10 Archon1 Molekülen pro Proteoliposom wurde eine längere Aufnahme von 5 Minuten gewählt. Dies erlaubte eine Änderung der Intensität in Abhängigkeit der Membranpotential zu registrieren. Gleichzeitig ist weiterhin keine Änderung des Fluoreszenzlebenszeit Zerfalls erkennbar. Unter diesen Bedingungen werden die Archon1 Varianten T100S und D125N ebenfalls untersucht.

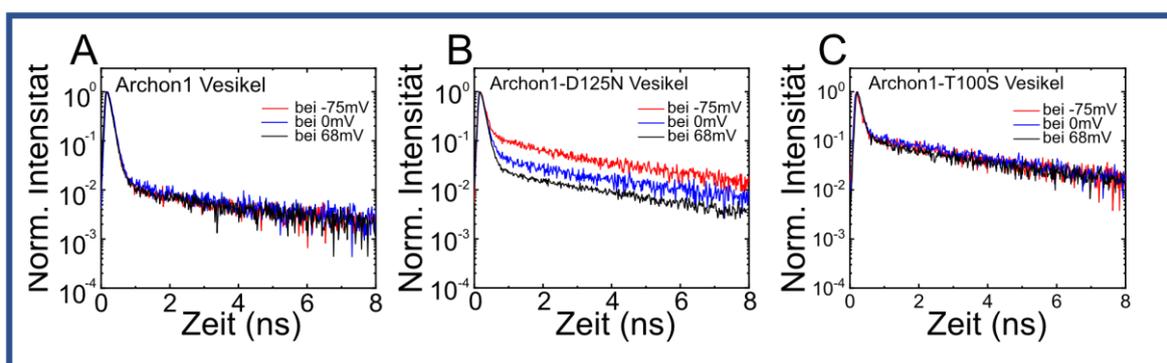


Abbildung 4.27 **Untersuchung der Fluoreszenzlebenszeitänderung von Archon1 Varianten in 100nm Vesikel bei unterschiedlicher Membranpotential im FLIM.** Biotinylierte Vesikel mit innerem Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid mit Archon1 Varianten beladen (1:10) sind an oberflächenaktivierte Mikroskopie Gläser gebunden für 2 Minuten und danach 3-mal mit Puffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM KCl, 140 mM Tetraethylammoniumchlorid gewaschen. Zur Änderung der Membranpotential der Vesikel wurde der externe Puffer ausgetauscht mit veränderter KCl Konzentration von 0,5, und 150 mM. Proben sind bei einer Anregungswellenlänge von 640 nm für 5 Minuten im FLIM aufgenommen und mittels Calia ausgewertet worden.

In Abbildung 4.28 sind die Fluoreszenzzerfälle von Archon1, T100S und D125N bei unterschiedlichen Membranspannungen dargestellt. Bei Archon1 und T100S sind keine Änderung der Fluoreszenzlebenszeit zu erkennen und eine mittlere Lebenszeit von 0.96 ns und 3.44 ns wird bestimmt. Bei der Variante D125N ist eine Änderung des Fluoreszenzzerfalles zu erkennen. Dies führt zu einer Änderung der mittleren Lebenszeit von 3.77 ns zu 2.22 ns bei einer Änderung der Membranspannung von -75mV zu 68mV. Zur Bestimmung der mittleren Lebenszeit werden drei exponentielle Komponenten verwendet nach Formel 3.12. Die bestimmten Lebenszeitkomponenten und deren relativen Amplituden sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Hierbei ist zu erkennen, dass eine Änderung der mittleren Lebenszeit hauptsächlich durch die Veränderung der relativen Amplituden der Komponenten entsteht. Bei der gemeinsamen Betrachtung von Fluoreszenzintensität und Lebenszeitveränderung der Archon1 Varianten in Abbildung 4.29 ist bei allen Varianten eine Erhöhung der Intensität zu erkennen (Archon1 51%, T100S 36% und D125N 73%), jedoch kaum eine Veränderung der mittleren Lebenszeit bei Archon1 und T100S, bei D125N sogar eine Verringerung der mittleren Fluoreszenzlebenszeit erkennbar ist.

Tabelle 4.7 Clusterauswertung der Fluoreszenzlebenszeitänderung der Archon1 Varianten in 100nm Vesikel bei unterschiedlicher Membranspannung im FLIM. Mittels Calia bestimmte Fluoreszenzlebenszeiten aus Abbildung 4.25 mit fraktionellen Amplituden und die daraus bestimmte Mittlere Lebenszeit. Pfeile weisen auf die Änderung der jeweiligen Größe bei veränderter Membranspannung bei der Variante D125N hin. Die Fitparameter der Fluoreszenzlebenszeiten τ_i mit ihren prozentual anteiligen Fraktionen ϕ_i und τ_{pop} sind angegeben. Das reduzierte χ^2 des Fits ist ebenfalls angegeben, um die Güte des Fits anzuzeigen.

Probe	Spannung (mV)	τ_1 (ns)	ϕ_1 (%)	τ_2 (ns)	ϕ_2 (%)	τ_3 (ns)	ϕ_3 (%)	τ_{pop} (ns)	χ^2
Archon 1	-75, 0, 68	0.10	77.6	1.24	6.6	5.06	15.8	0.96	1.15
T100S	-75, 0, 68	0.11	26.2	2.29	31.9	6.40	41.9	3.44	1.10
D125N	-75	0.09	18.1	1.05	18.1	5.58	63.8	3.77	1.26
	0	0.09	46.0	1.05	10.7	5.58	43.3	2.57	1.23
	68	0.09	56.3	1.05	6.0	5.58	37.7	2.22	1.07

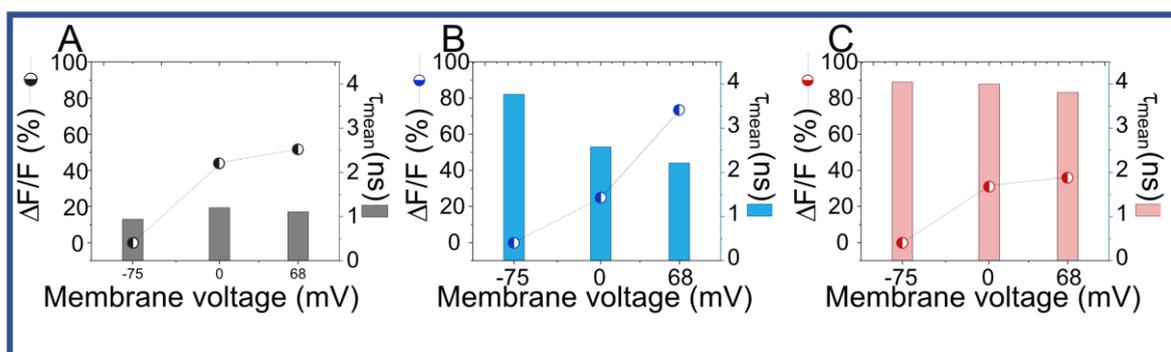


Abbildung 4.28 Untersuchung der Fluoreszenzlebenszeitänderung und Intensität von Archon1 Varianten in 100nm Vesikel bei unterschiedlicher Membranspannung im FLIM. Die aus Bild gezeigten FLIM-Lebenskurven sind mittels Calia ausgewertet und die bestimmten mittleren Lebenszeiten (Punkte) und die normierte Fluoreszenzintensität der Clusterpixel (Balken) für die Archon1 Varianten bei unterschiedlichen Membranspannungen gezeigt. A) Archon 1, B) T100S und C) D125N.

4.5 Mechanismus der Kopplung der Membranspannung und dem Fluoreszenzsignal in Retinal Proteinen

Aufgrund des ungewöhnlichen Verhaltens der Fluoreszenz Eigenschaften von Archon1 und dessen Varianten bei gleichbleibender bzw. sinkender mittlerer Fluoreszenzlebenszeit eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität zu haben, ist es notwendig, mögliche Mechanismen der Fluoreszenz Löschung zu untersuchen. Hierzu soll in einem Modellsystem das Verhalten des Chromophors Retinal untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass biologische Fluoreszenzfarbstoffe durch die Anwesenheit von Tryptophan (Trp) ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern (Marmé 2003). In dieser Arbeit wird die Fluoreszenzlöschung eines Bovinen Serum Albumin (BSA) –Retinal Komplexe mit variierender Trp Konzentration untersucht. In Abbildung 4.30 wird die Fluoreszenzintensität und die Fluoreszenzlebenszeitkurven bei unterschiedlichen Trp Konzentrationen gezeigt.

Hierbei ist eine Reduzierung der Fluoreszenzintensität bei steigender Trp Konzentration zu erkennen, aber keine Veränderung der Lebenszeit. Dies zeigt ein ähnliches Verhalten wie Archon1 und T100S in Abbildung 4.29. Aufgrund des Konzentrationsverhältnisses von $0.8 \mu\text{M}$ Retinal und $32 \mu\text{M}$ BSA und erfolgter gelchromatographischer Separation wie in Kapitel 3.4 beschrieben, ist davon auszugehen, dass Retinal nur im Komplex mit BSA vorliegt. Zur Untersuchung der Fluoreszenzintensität F und der Fluoreszenzlebenszeit sind die Daten aus Abbildung 4.30 in einem Stern Volmer Graphen in Abbildung 4.31 zusammengestellt. Hierbei ist bei der statischen Intensität die integrierte Intensität von 430 bis 600 nm verwendet worden. Als F_0 und τ_0 ist die Intensität und mittlere Lebenszeit ohne Trp Zugabe definiert. Die relative Fluoreszenz F_0/F steigt linear bis zu einer Trp Konzentration von 5 mM an und zeigt ein nahezu gleichbleibendes Verhältnis bei 15 und 30 mM Trp Konzentration. Der beginnende lineare Anstieg der Intensität ist durch eine rote Kurve skizziert. Das relative Verhältnis der mittleren Fluoreszenzlebenszeit ändert sich nicht.

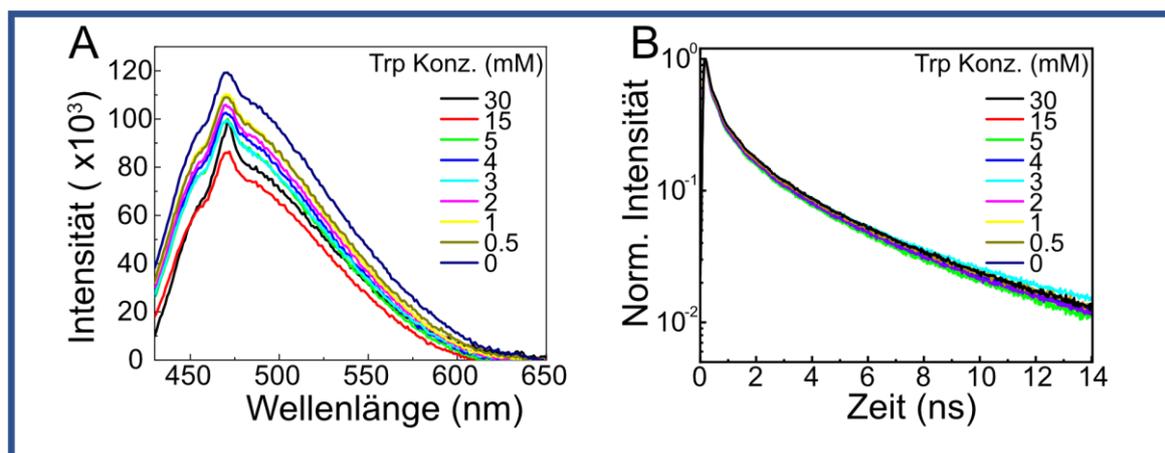


Abbildung 4.29 **Untersuchung des Fluoreszenz Quenching von Retinal mittels Tryptophans in einem BSA-Retinal Komplex anhand der Intensität und Lebenszeit.** $0.8 \mu\text{M}$ Retinal und $32 \mu\text{M}$ BSA sind bei einer Anregung von 450 nm statisch a) und im FLIM b) aufgenommen. Vor der Messung sind Trp Konzentrationen von 0 bis 30 mM zugegeben worden. Die Fluoreszenzintensität von 435 bis 650 nm ist bei unterschiedlichen Trp Konzentrationen dargestellt. In b) die Fluoreszenzlebenszeit aus 5 Minuten Aufnahmen im FLIM sind dargestellt.

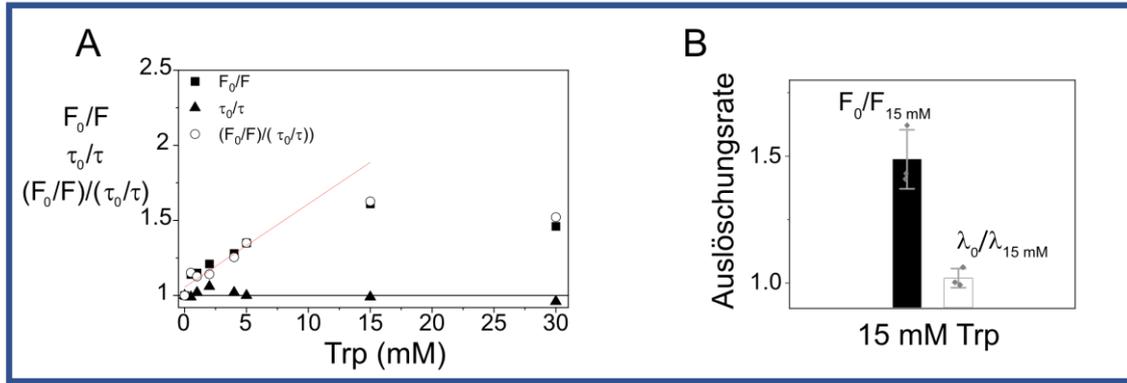


Abbildung 4.30 A **Statisch und dynamischer Stern Volmer Graph des Retinal-BSA Komplexes mit Tryptophan.** Die aus Abbildung 4.27 gezeigten integrierten Intensitäten und die mittlere Fluoreszenzlebenszeiten sind normiert dargestellt und gegen die Trp Konzentration aufgetragen. Der initiale lineare Anstieg (rote Kurve) von F_0/F ist skizziert. B Auswertung der elektronischen Transferrate mittels Fluoreszenz-Auslöschung von Retinal mittels 15 mM Tryptophan im BSA-Retinal Komplex. Vergleich der Auslöschungsrate bestimmt durch die Intensität und die mittlere Lebenszeitänderung zur Bestimmung der elektronischen Transferrate $k_{ET,F}$.

Zur Untersuchung der elektronischen Transferrate $k_{ET,F}$ des BSA-Retinal Komplexes mittels Fluoreszenz Auslöschung wird das Verhältnis der Intensität bei 15 mM Trp ($F_{15\text{mM}}$) und bei 0mM Trp Konzentration mit folgender Formel untersucht

$$k_{ET,F} = \left(\frac{F_0}{F_{15\text{mM}}} - 1 \right) / \tau_0. \quad (42)$$

Die hierbei verwendeten Werte sind in Abbildung 4.31 als Balkendiagramm dargestellt. Aufgrund dieser Daten wird die $k_{ET,F}$ Rate zu $(160 \pm 10) \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ von BSA-Retinal Komplex mit 15 mM Trp als Fluoreszenzlöcher Molekül bestimmt.

4.6 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel werden Varianten des in Archeabakterien *Halorubum sodomense* gefundenen Arch3 Proteins als mögliche Spannungssensoren für einen Proteoliposomalen Assay zur Untersuchung des Protonentransportes von CcO untersucht. Ebenso wird in diesem Kapitel der biophysikalische Mechanismus untersucht, der zur Koppelung der anliegenden Membranspannung und der Fluoreszenz von spannungssensitiven Rhodopsinen führt.

Hierbei wurde zuerst in aufgereinigter Form in Mizellen und in Nanodisks die Varianten Archon1, Archon2, Quasar1 und Quasar2 Absorption und Fluoreszenz spektroskopisch untersucht. Quasar1 und Quasar2 wurden bereits in Mizellen auf ihre FQA untersucht (Hochbaum 2014). Eine genauere Untersuchung der Absorption und Emission Spektren zur Erklärung des Mechanismus von Spannungssensitivität und Fluoreszenz ist bis jetzt noch nicht durchgeführt worden. Da aktuelle Untersuchungen von spannungssensitiven Rhodopsin Varianten nur eine FQA von bis zu 1.4% (McIsaac 2014) zeigen, aber andere Rhodopsin Varianten bis zu 20% FQA zeigten (Broser 2020) ist das Verständnis der Kopplung von spannungssensitiven und fluoreszierenden Einheiten zur Verbesserung solcher Systeme unabdingbar. Teile dieser in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind in der Publikation (Silapetere 2022) in Kombination mit anderen Methoden verwendet worden, um

die Verknüpfung der spannungssensitiven und fluoreszierenden Eigenschaften zu identifizieren.

Die dunkeladaptierten Proteine sind sowohl in ihrer Absorption als auch Emission vermessen worden. Hier zeigten sich Maxima für Archon1 und Archon2 bei 584 ± 1 nm, für Quasar1 bei 580 ± 1 nm und für Quasar2 bei 588 ± 1 nm. Matrix Scans der Emission erlaubten die Anregungsmaxima für Archon1 bei 582 ± 1 nm, und Archon2 bei 578 ± 2 nm, für Quasar1 bei 578 ± 1 nm, für Quasar2 bei 585 ± 2 nm zu bestimmen. Um etwaige Einflüsse durch eine membranartige Umgebung zu untersuchen, wurden die Proteine in Nanodisks eingebaut und ebenfalls spektroskopisch untersucht. Hier zeigte sich im Differenzspektrum zwischen Lösung und Nanodiskumgebung eine eindeutige Verschiebung der Anregung bzw. eine zusätzliche Komponente in der Anregung. Diese Änderung der Anregungsspektren kann durch erhöhten lateralen Druck der Umgebung erklärt werden und ist ein bekanntes Phänomen, das bereits verwendet wird, um einen lateralen Druck in den Membranen zu quantifizieren (Fulford and Peel 1980) oder sogar Membranen neu zu strukturieren (Fakhree 2019). Untersuchungen der Fluoreszenzlebenszeit der aufgereinigten Proteine und deren Resubstitution in Nanodisks zeigten nur geringfügige Änderungen in den mittleren Lebenszeiten. Somit zeigt sich keine signifikante Änderung der fluoreszierenden Raten abhängig von dem bestehenden Umgebungsdruck. Ebenso zeigten sich zwischen den unterschiedlichen Varianten Archon1, Archon2, Quasar1 und Quasar2 nur geringe Änderungen der mittleren Lebenszeit. Diese Raten sind vergleichbar zu anderen schwach fluoreszierenden rot emittierenden Proteinen wie mCherry und mKate2 (Prangma 2020).

Aufgrund seiner erhöhten Spannungssensitivität im Vergleich zu den anderen Arch3 Varianten wird Archon1 weiterführend untersucht. Hierzu werden die Archon1 Varianten T100S und D125N ebenfalls untersucht, da MD-Simulationen (Silapetere 2022) die Aminosäuren an diesen Positionen als wichtige funktionale Gruppen für die Spannungssensitivität identifiziert haben. Hierbei zeigt die Variante T100S durch die eingefügte Hydroxymethyl Seitengruppe eine Erhöhung ihrer Spannungssensitivität. Ebenso zeigte die Variante D125N diese verbesserte Spannungssensitivität. Die Absorption der Archon1 Varianten besitzen eine geringe Blauverschiebung bei der Chromophor Absorptionsbande und eine geringere Absorptionsintensität im Vergleich zu Archon1. Die Varianten zeigen einen langsameren Fluoreszenzzerfall mit einer mittleren Lebenszeit $\tau_{\text{pop, Archon1}} = 0.16 \pm 0.02$ ns, $\tau_{\text{pop, Archon1-D125N}} = 0.24 \pm 0.03$ ns und $\tau_{\text{pop, Archon1-T100S}} = 0.63 \pm 0.04$ ns. Aufgrund der bekannten FQA von Archon1 mit 0.11% konnte sowohl bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge als auch temperaturabhängig die Raten der strahlenden und nicht strahlenden Relaxationsprozesse bestimmt werden. Die bestimmten anregungsabhängige FQA werden durch MD-Simulationen in (Silapetere 2022) unterstützt, die eine unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitätserhöhung bei unterschiedlicher Anregungswellenlängen und Membranspannungen vorhersagen. Somit sind die in dieser Arbeit bestimmten Änderungen in qualitativer Übereinstimmung mit den MD-Simulationsdaten. Bei der Betrachtung der strahlenden und nicht strahlenden Raten ist eine Reduzierung der nicht strahlenden Rate zu erkennen in den Varianten T100S und D125N. Bei der Erhöhung der mittleren Fluoreszenzlebenszeit ist zu erwähnen, dass diese am stärksten durch die Änderung der langsamsten fraktionalen Amplitude von 0.5% bei Archon1 zu 13% bei T100S entsteht. Somit

erfolgt die erhöhte Fluoreszenzintensität aufgrund einer Verschiebung des Gleichgewichtes der fluoreszenten Spezies der Variante. Eine Veränderung der Fluoreszenzlebenszeit in diesen Varianten scheint jedoch nicht das Gleichgewicht der fluoreszierenden Population zu verschieben. Bei allen Arch3 Varianten ist zwar nach Anstieg des Membranpotentials eine Erhöhung der Intensität der Fluoreszenz zu sehen, aber die Fluoreszenzlebenszeit wird dadurch nicht beeinflusst. Somit liegt der Schluss nahe, dass durch die eingebrachten Mutationen an den Positionen 100 und 125 in Archon1 eine weiterreichende Umstrukturierung des Proteins stattfindet. Diese Hypothese wird durch Messungen in (Silapetere 2022) unterstützt.

Um die Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit von spannungsabhängigen Fluoreszenzsignalen der Arch3 Varianten zu untersuchen, wurden in *E. coli* Zellen mit überexprimierten Archon1 und Archon2 zwei verschiedene Ionophore, Gramicidin und 1799, verwendet, um eine Änderung des Membranpotentials zu erreichen. Diese wurden in dem FLIM-Aufbau auf Intensitätsänderung und Fluoreszenzlebenszeitänderung aufgrund der von nativen -140mV *E. coli* Membranspannung zu 0mV nach Zugabe der Ionophore untersucht. Die Autofluoreszenz der Zellen selbst ist im Vergleich sehr schwach und kann ebenso aufgrund unterschiedlichem Fluoreszenzzerfallszeiten durch die verwendete clusterbasierten Analysetechnik von den Arch3 Varianten separiert werden. Die Zellen werden ohne und nach Zugabe der Ionophoren vermessen. Hierbei zeigt sich eine nur sehr geringe Änderung in den Fluoreszenzzerfällen. Jedoch ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Da aufgrund des dynamischen Verhaltens der Zellen nach Zugabe von Ionophoren nicht eine Intensitätserhöhung der gesamten Intensität der Fluoreszenz im gewählten Bildausschnitt durch z.B. weitere räumliche Absenkung von Zellen geschieht, werden Referenzmessungen im selben Zeitraum durchgeführt. Bei der Betrachtung der Intensität gemittelt auf die Pixel, die ein Fluoreszenz der Arch3 Varianten zeigen, ist hier über das Messzeitfenster keine signifikante Änderung der Intensität zu bestimmen. Bei der Betrachtung der Intensitätsänderung nach Zugabe der Ionophore ist eine eindeutige Steigerung der Intensität sowohl als gemittelte Intensität als auch in exemplarisch ausgewählten Pixeln mit Arch3 Varianten zu sehen. Hierbei konnte bei den verwendeten Ionophoren und den gewählten Bedingungen eine Zeitkonstante zur Halbintensitätszunahme k_1 mit 4 Minuten bestimmt werden. Diese Zeit ist in guter Übereinstimmung mit der Zeit des Einbaus und Ausgleiches der Kaliumionen von Gramicidin in *E. coli* Membranen, das in früheren Studien (Katsu 1986) bestimmt wurde. Die Beobachtung in diesen Experimenten, Änderung der Fluoreszenzintensität, aber keiner Änderung der zeitlichen Fluoreszenzzerfälle deutet auf einen Mechanismus der Fluoreszenzlöschung hin, der den Grundzustand der fluoreszenten Spezies beeinflusst (Alexiev and Farrens 2014).

Nach der Etablierung des *E. coli* Assays mit Arch3 Varianten wird die Anwendbarkeit der Resubstitution der Varianten in Proteoliposome untersucht. Dabei wird pH sensitives markiertes Archon1 verwendet, um die Ausrichtung der Proteine in der proteoliposomalen Membran zu untersuchen. Die Proteoliposome werden zur Untersuchung im FLIM und TIRFM Aufbau an die Oberfläche der Mikroskopie Gläser mittels einer Biotin/Neutravidin Verbindung verankert. Da auch spätere Untersuchungen mit einzelnen Proteoliposomen bei wechselnden Bedingungen untersucht werden, ist eine Überprüfung der Verankerung an die Glasträger

nötig. In dieser Arbeit werden die Bindungskapazität und die Interaktionsmöglichkeit nach erfolgter Bindung getestet. Hierbei zeigt sich bei dem gewählten Protokoll zu Herstellung der Funktionalisierung der Glaträger ein ausreichender Abstand zwischen den Biotin Bindungsplätzen, um einzelne Emitter klar voneinander zu trennen. Mittels eines fluoreszierenden Viskositätssensors (Ober 2019) kann gezeigt werden, dass nach erfolgreicher Bindung weiterhin eine ausreichende Interaktion mit dem Medium stattfinden kann. Durch den Austausch der externen und internen Puffer wird eine klare Vorzugsrichtung mit zytoplasmatischer Seite des Proteins zur Innenseite der Proteoliposome gezeigt. Zur Untersuchung des Mechanismus der Fluoreszenzlöschung der Archon1 Varianten aufgrund der anliegenden Membranspannung wird Archon1, T100S und D125N in die proteoliposomalen Membran eingebracht. Die Messung der Absorption bei unterschiedlichen Membranspannungen zeigt keine Änderung. Somit ist ein Mechanismus der Fluoreszenzlöschung durch Veränderung des elektronischen Grundzustandes der Arch3 Varianten durch Komplexbildung mit interagierenden Fluoreszenzlöschermolekülen nicht wahrscheinlich. Untersuchungen der Varianten im FLIM zeigt für alle Varianten eine Intensitätsänderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der anliegenden Membranspannung. Die mittlere Lebenszeit war in beiden Varianten erhöht, bei D125N mit 240 ps und bei T100S mit 630 ps. Nur bei der Archon1 Variante D125N zeigte sich zusätzlich eine leichte Veränderung der Fluoreszenzlebenszeit basierend auf der anliegenden Membranspannung. Diese Änderung trat durch eine Verschiebung des relativen Anteils der fraktionalen Amplituden hervor, jedoch nicht durch eine Änderung der Fluoreszenzlebenszeitkomponenten. Die Veränderung der Anteile der jeweiligen Populationen deutet auf eine spannungssensitive Subpopulation hin. Hierbei ist jedoch ungewöhnlich, dass bei steigender Intensität eine Reduzierung der mittleren Lebenszeit stattfindet. Durch Berechnung der strahlenden k_r und nicht strahlenden k_{nr} Raten in Tabelle 4.4 ist zu erkennen, dass eine Reduzierung der nicht strahlenden Rate in beiden Varianten zu sehen ist. Ebenso wurde nach Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute bei 640 nm Anregung in Archon1 die Ausbeute der Varianten bei 10°C, 19°C und 37°C bestimmt.

Archon1 zeigt somit wohl in den Zellexperimenten in *E. coli* als auch in aufgereinigter Form und Resubstituierung in Proteoliposomen nur eine fluoreszierende intensitätsbasierende Änderung aufgrund der anliegenden Membranspannung. Dies legt den Schluss nahe, dass in den Arch3 Varianten aufgrund der anliegenden Membranspannung eine statische Fluoreszenzlöschung erfolgt. Hierbei scheint durch eine Änderung der Struktur der Varianten ein Grundzustandkomplex, der nicht fluoreszent ist, gebildet zu werden. Bei der Betrachtung der 3D Struktur der Arch3 Varianten sind Tryptophane (W96 und W192) in der Nähe des Chromophoren lokalisiert. Trp besitzt als natürlich vorkommende Aminosäure die am energetisch einfachsten oxidierbare Seitenkette mit $E_{ox} \sim 0.8$ V mit einer Graphit Elektrode bei pH 8 (Tasić 2022). Hierbei wurde gezeigt, dass bei einigen organischen Farbstoffen ein Intramolekularer Elektronentransfer mit Trp stattfinden kann (Marmé 2003). Hierbei erfolgt der photoinduzierte Elektronentransfer zwischen dem angeregten Singlet Zustand des Chromophoren und dem Grundzustand S_0 von Trp. Nach diesem Elektronentransfer wird im Radikal Ionenpaar $Trp^{+•}$, Chromophor $^{-•}$ eine umgekehrte Elektronenabgabe an das Trp

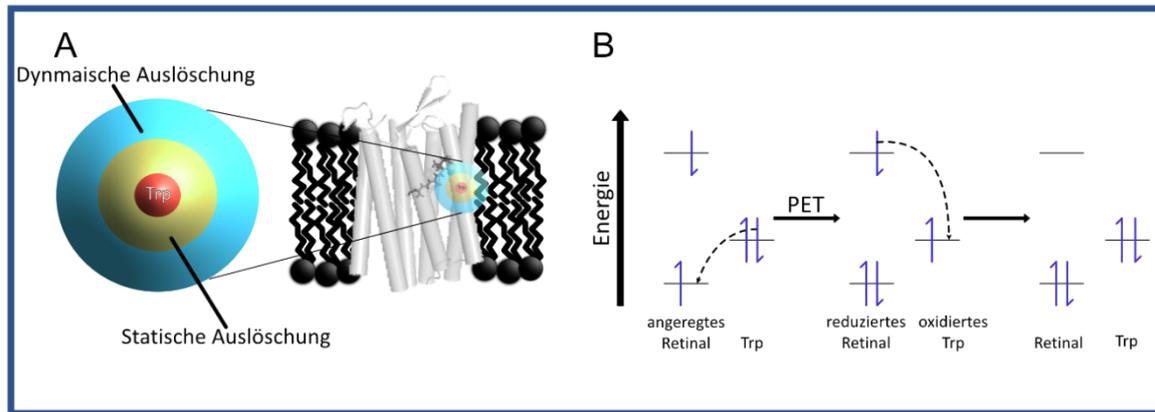


Abbildung 4.31: Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung Sphären von Trp und der strahlungslosen Übergänge des Retinals durch photoinduzierten Elektronentransfer als möglicher Quencher der Fluoreszenz in Arch3 Varianten.

durchgeführt. Dadurch wird ein strahlungsfreier Übergang des Chromophoren in den Grundzustand ermöglicht. Dies ist in Abbildung 4.32 schematisch dargestellt. Somit ist die Änderung der Fluoreszenz abhängig von der Rate des Elektronentransfers zu Trp. Kollisionen zwischen Trp und einem angeregten Chromophoren würden zu einer Änderung der Fluoreszenzlebenszeit und der Quanteneffizienz führen. Somit muss ein nicht fluoreszierender Trp/Chromophore Komplex bereits gebildet sein und eine Grundzustand Fluoreszenzlöschung erfolgen (Alexiev and Farrens 2014). Die Hypothese, dass auch der Chromophor Retinal solche Komplexe mit Trp bilden kann, wurde mit einem Modellprotein, BSA, untersucht. Diese besitzt eine Bindungstasche für das Retinal (Belatik 2012, Gao 2018), die durch die umgebende Flüssigkeit weiterhin erreichbar ist. Bei einer Änderung der Konzentration von Trp in Lösung zeigt sich eine Veränderung der Fluoreszenzintensität von Retinal. Auch in diesem Modellsystem zeigt sich keine Änderung der Fluoreszenzlebenszeit in Abhängigkeit der Trp Konzentration. Bei der Bestimmung der Elektronentransferrate k_{ET} nach (Mansoor 2002) mit $155 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ zeigt eine effiziente Elektronentransferrate, die bis zu 30 Mal höher ist, als Transferraten zwischen organischen Farbstoffen und Trp (Mansoor 2002). Die Fluoreszenzlöschungsrate von $F_0/F_{15\text{mM Trp}}=1.6$ ist in guter Übereinstimmung mit der bestimmten Fluoreszenzlöschungsrate von Archon1 in *E. coli* Zellen bei einer Membranspannungsänderung zwischen 0 und -140mV von $F_{0\text{mV}}/F_{-140\text{mV}}=1.45$.

Somit konnte in diesem Kapitel meiner Arbeit erfolgreich die Verwendung von Arch3 Varianten als Membransensoren in Proteoliposomen untersucht werden. Die variablen fluoreszierenden Eigenschaften von Archon1 aufgrund der anliegenden Membranspannung konnte in Zellen und Proteoliposomen in FLIM und TIRFM gezeigt werden. Auch ein möglicher Mechanismus für die Kopplung der Spannungssensitivität mit Fluoreszenzänderung wurde untersucht und ein möglicher Mechanismus weiterführend untersucht. In meiner weiteren Arbeit wird nun Archon1 als Spannungssensor verwendet und die Möglichkeit untersucht, diesen als quantitativen Sensor für das Pumpen von Protonen durch CcO einzusetzen. Hierzu wurde in TIRFM sowohl bei einer Anregung von 561 nm und 633 nm Kalibrierungsexperimente mit definierten Membranspannungen durchgeführt, um in späteren Experimenten mit CcO die Fluoreszenzintensitätsänderung in eine Membranspannung umzurechnen und die Pumpleistung der CcO Varianten zu untersuchen. Die Unterschiede in dem Anstieg der

spannungsabhängigen Fluoreszenz zur Anregungswellenlänge ist auch in elektrochemischen Verfahren bestätigt worden (Silapetere, 2022).

5. Ergebnisse und Diskussion II: Untersuchung der Integration von Cytochrom-c-Oxidase in den Einzelmolekül Assays

Ein zentraler Teil dieser Arbeit ist die Inkorporation von CcO in Proteoliposome, um eine kontrollierte Umgebung für die Untersuchung von CcO Varianten und deren Protonenpumpverhalten zu erhalten. Zuerst muss untersucht werden, mit welcher Orientierung sich die aufgereinigte CcO in die Membranen der Proteoliposome einbaut und deren Funktion nach diesem Einbau bestehen bleibt. Hierzu wurde, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, CcO mit dem Fluorophor IAF gekoppelt und dessen pH Sensitivität genutzt. Die Proteoliposome mit oberflächengekoppelter-pH Indikatoren werden hierzu in FLIM und TIRFM untersucht. Zusätzlich wird der TIRFM Aufbau wie in Kapitel 3.13 beschrieben erweitert, damit mittels zwei Farben Einzelmolekül FRET die Konzentration der CcO Moleküle in der Liposom Membran bestimmt werden können.

5.1 Untersuchung der Ausrichtung der Cytochrom-c-Oxidase in Proteoliposomen

Zur Untersuchung der Funktionalität von CcO und des Protonentransfers wird CcO-P301C mit dem pH sensitiven Farbstoff IAF, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, gekoppelt. Die mit der pH Sonde gekoppelte CcO Variante CcO-P301C-AF wird, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, in die vorbereitete Proteoliposome vor den jeweiligen Experimenten eingebracht und auf zuvor funktionalisierte Glasträger mittels Biotins/Neutravidin Anker fixiert. Hierbei wurde ein relatives Konzentrationsverhältnis von 0,25:1 (CcO:Proteoliposom) verwendet.

Die Proben wurden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm für jeweils 300 s im FLIM vermessen, um ein ausreichendes SNR zu gewährleisten. Der externe pH wurde durch den Pufferaustausch des verwendeten 1 mM Kaliumphosphatbuffer (KPP) mit zuvor eingestellten pH-Werten von 5,6,7,8 und 9 nach jeder Messung verändert. Um das Verhalten der einzelnen Proteoliposome zu untersuchen, wurde der Pufferaustausch so durchgeführt, dass das Sichtfeld (englisch *field of view*, FOV) nur sehr gering verschoben wird. Um kleine Bewegungen im FOV auszugleichen, wurden die Positionen der Proteoliposome durch das Programm Localizer (Dedecker 2012) bestimmt. Eine selbstgeschriebene Routine in Python 3.0 korrigierte geringe Verschiebung zwischen den Messungen durch den Vergleich der Positionen unter Anwendung der Theorie des Nächsten Nachbarn zwischen zwei Messungen. Die für die jeweilige Messung konstante Verschiebung in x-y Richtung bezogen auf die erste Messung wird auf alle Positionen angewendet. Die nun ausgerichteten Intensitätsbilder werden mittels des Programms Igor Pro (Igor Pro V. 6, Additive) und Localizer untersucht und die Emitter bei allen pH-Werten identifiziert. Die Fluoreszenzintensität von jedem Proteoliposom wird als integrierte Intensität I_{Proteo} gemessen. Hierzu wird eine runde Integrationsfläche mit einem Durchmesser von 5 Pixel verwendet und daraus die unkorrigierte Intensität I_{unkor} bestimmt. Der Mittelpunkt wird mit einer 2D Gauß Kurve identifiziert. Eine zweite umgebende Integrationsfläche mit gleicher Fläche wird verwendet, um den Hintergrund $I_{\text{Hintergrund}}$ zu bestimmen und die korrigierte I_{Proteo} zu berechnen

$$I_{Proteo} = I_{unkor} - I_{Hintergrund} \quad (43)$$

Die nun bestimmten Intensitäten bei den pH Werten 5, 6,7,8 und 9 werden genutzt um pro Vesikel den pKa Wert zu ermitteln. In Abbildung 5.1 sind 122 identifizierten Emitter bei den unterschiedlichen pKa-Werten aufgetragen, die eine Änderung ihrer Fluoreszenzintensität zeigen. Hierbei sind auch zwei exemplarische Proteoliposome gezeigt, die eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität der markierten CcO-P301C-AF mit höheren pH-Werten zeigen.

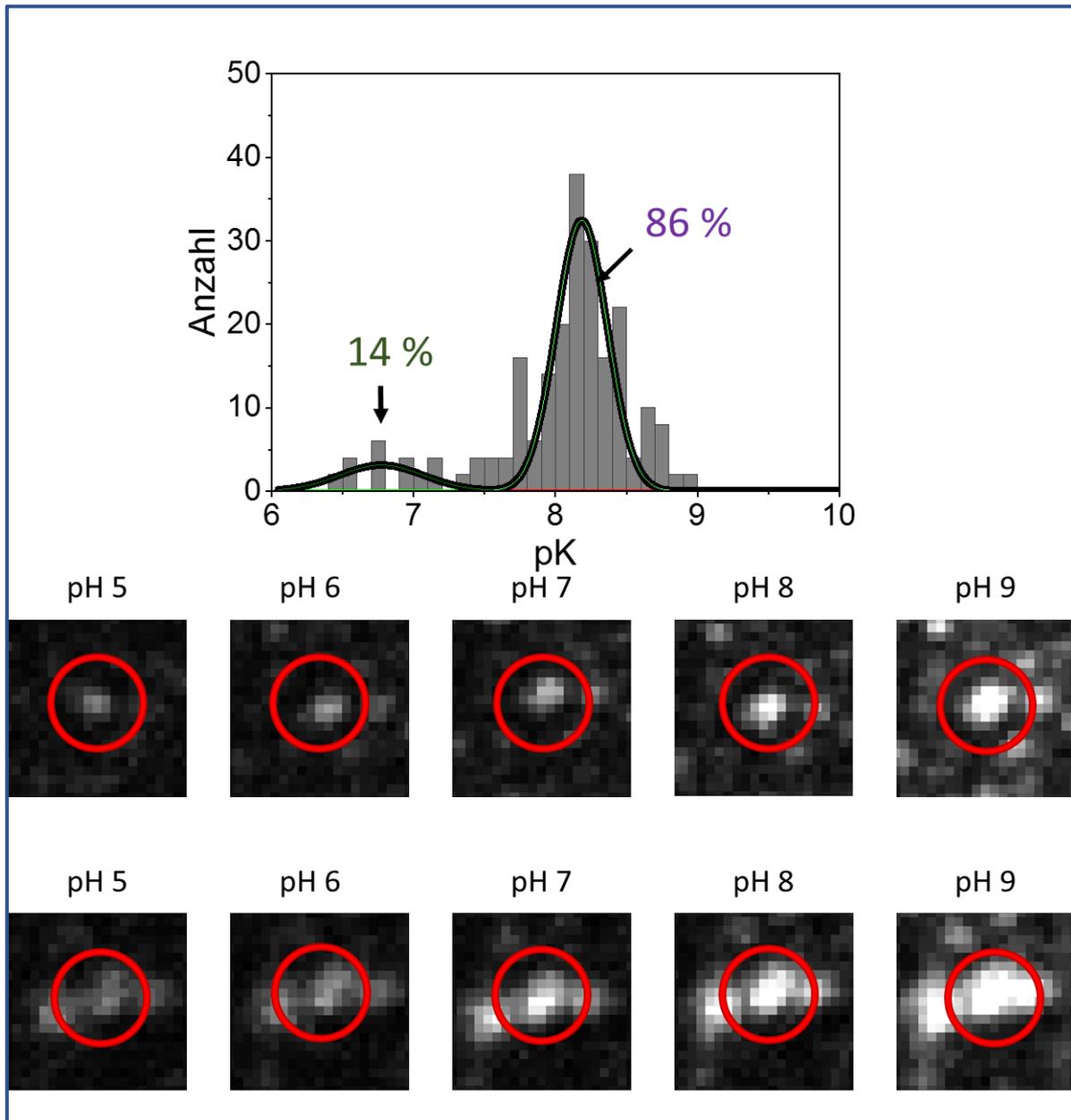


Abbildung 5.1: **Untersuchung der mit CcO beladenen Proteoliposome im FLIM.** Exemplarisch sind zwei Proteoliposome bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Der für jedes Proteoliposom bestimmte pK Wert ist in einem Histogramm aufgetragen. Mittels zweier Normalverteilungen ist ein Verhältnis von 14 zu 86% der Proteoliposome mit CcO-P301C-AF mit einem pK Wert von 7,0 bzw. 8,1 bestimmt worden. Proteoliposome sind wie in Kapitel 3.5 beschrieben vorbereitet worden und im FLIM mit einer Anregung von 488 nm für 300 s vermessen worden. Die Emission ist durch einen LP 515 nm (Chroma) gefiltert worden. Die Messung und Datenauswertung erfolgten zusammen mit M. Lach (Lach 2019).

Die Fluoreszenz Intensitätsänderung jedes Proteoliposoms wurde mit der Henderson-Hasselbach Gleichung

$$I_{Proteo,pH} = \frac{I_{Proteo,max}}{1+10^{n(pK-pH)}} \quad (44)$$

zur Bestimmung des pK Wertes des gebundenen IAFs angeglichen, wobei $I_{Proteo,max}$ die berechnete höchste Intensität darstellt. Hierbei wurden zwei Populationen von Proteoliposomen mittels einer Angleichung von zwei Normalverteilungen an das Häufigkeit Histogramm der bestimmten pK Werte identifiziert mit pK Wert von $(6,8 \pm 0,3)$ mit 14% relativer Amplitude und $(8,2 \pm 0,2)$ mit 86% relativer Amplitude. Ebenfalls eine Fluoreszenzlebenszeit Untersuchung zeigt eine durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit mit $(2,3 \pm 0,2)$ ns für Proteoliposome mit höherem pK Wert und eine Lebenszeit von $(1,9 \pm 0,3)$ ns für diejenigen mit niedrigen pK Wert. Titration der UV/Vis-Absorption von CcO-P301C-AF (in Mizellen in 1 mM KPP, 5mM NaCl, 0,05% β -DM) zeigt ein apparenten pK Wert von $6,9 \pm 0,1$. Die normierten Absorbanzen bei 499 nm sind in Abbildung 5.2 gezeigt.

Der Austausch des externen Puffers zeigt in dieser Untersuchung die Proteoliposome, deren fluoreszierende Sonde in die Lösung gerichtet sind und nicht in das Lumen der Proteoliposome. Um eine Bestimmung der Ausrichtung der CcO in der Membran durchzuführen, werden die Intensitäten aller Emitter verwendet. Hierzu wurde bei pH 6 und pH 9 die korrigierten Intensitäten jedes Emitters voneinander subtrahiert und in ein Häufigkeitsdiagramm in Abbildung 5.3 einsortiert. Mittels einer Summe von zwei Normalverteilungen

$$y_{Häufigkeit} = \sum_{i=1}^2 \frac{A_i}{\omega_i \sqrt{\pi/2}} e^{-2(I-I_{c,i}/\omega_i)^2} \quad (45)$$

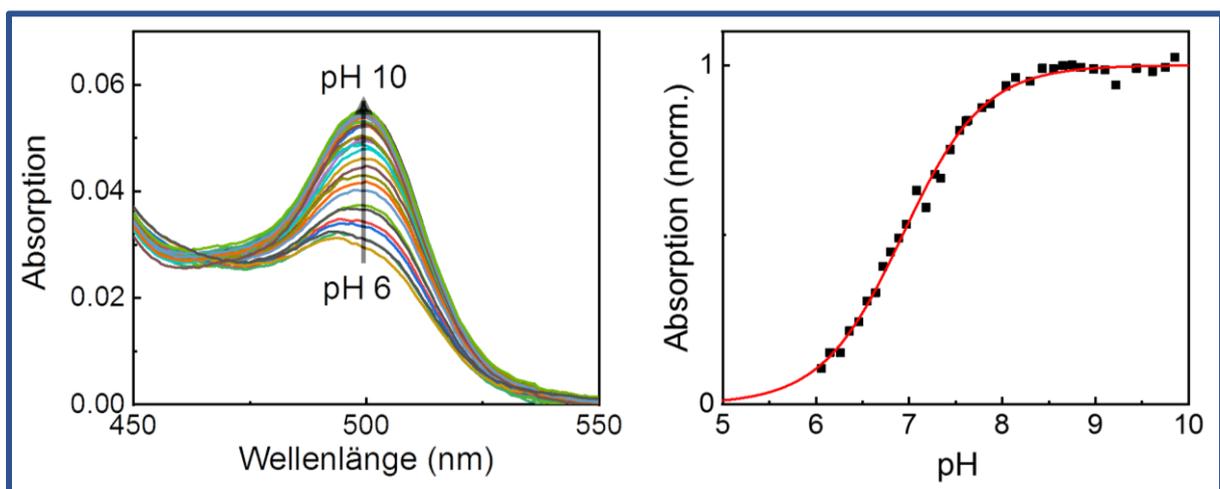


Abbildung 5.2: **pH Titration der CcO-P301C-AF in Mizellen.** Absorptionsspektren der pH sensitiven Sonde durch Zugabe von HCl bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die auf das Maximum normierten Absorptionswerte bei 499 nm sind gezeigt. Die Anpassung der Henderson-Hasselbalch Gleichung ist in Rot eingetragen. Die Probe ist in 1 mM KPP, 5mM NaCl, 0,05% β -DM Puffer in einer Küvette mit Durchmesser 0,3cm vermessen.

wird die Position des Zentrums $I_{c,i}$ und die Fläche A_i der zwei Populationen von Emittlern bestimmt. Hierbei zeigt die erste Population ein Zentrum bei $I_{c,1} = (0 \pm 1)$ integrierte Intensität und eine zweite Population bei $I_{c,2} = (-57 \pm 1)$ integrierte Intensität. Aufgrund des Verhältnisses der bestimmten Flächen der beiden Populationen hat die erste Population ein relatives Verhältnis von 35% zu 65% der zweiten Population. Somit zeigen 35% der Emittler keine Änderung ihrer Fluoreszenz Intensität bei einer Veränderung des externen pH. Dies deutet auf ein relatives Verhältnis von 65% CcO Proteine mit einer externen zugänglichen Bindungsstelle für Cyt-c in den angewendeten Protokollen. Dieses Verhältnis steht im genauen Gegensatz zu Experimenten, die die Ausrichtung von CcO aus anderen Organismen in Vesikeln mit einer fluoreszierenden Sonde bestimmt haben (Berg 2017).

Nach der Verwendung der an CcO-P301C gekoppelten pH sensitiven Sonde IAF zur Bestimmung der Integration in die proteoliposomale Membran und Ausrichtung der CcO wird nun die markierte CcO Variante in die Proteoliposome integriert und mittels bovinen Cyt-c aktiviert. Die Probe wird mit pH 5 und pH 8 in der externen KPP-Lösung vermessen.

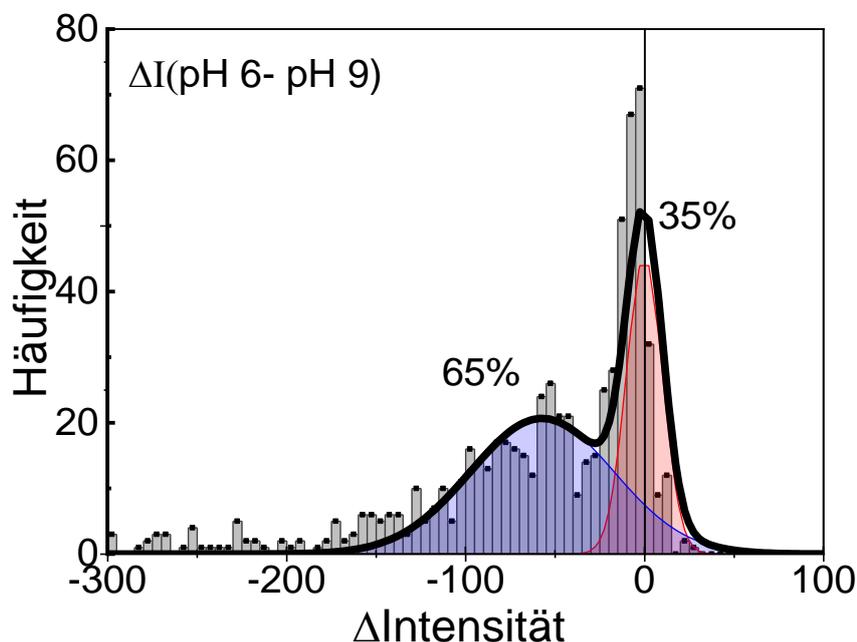


Abbildung. 5.3: Häufigkeitshistogramm der Differenzintensität von Proteoliposomen im FLIM. Die Intensitäten einzelner Proteoliposome mit CcO-P301C-AF sind bei pH 6 und pH9 des externen Puffers bestimmt worden und die Differenz in ein Häufigkeitsdiagramm eingetragen. Mittels der Summe zweier Normalverteilungen sind zwei Populationen an Proteoliposomen bestimmt. Proteoliposome sind wie in Kapitel 3.5 beschrieben vorbereitet worden und im FLIM mit einer Anregung von 488 nm für 300 s vermessen worden. Die Emission ist durch einen LP 515 nm (Chroma) gefiltert worden. Die Messung erfolgte zusammen mit M. Lach.

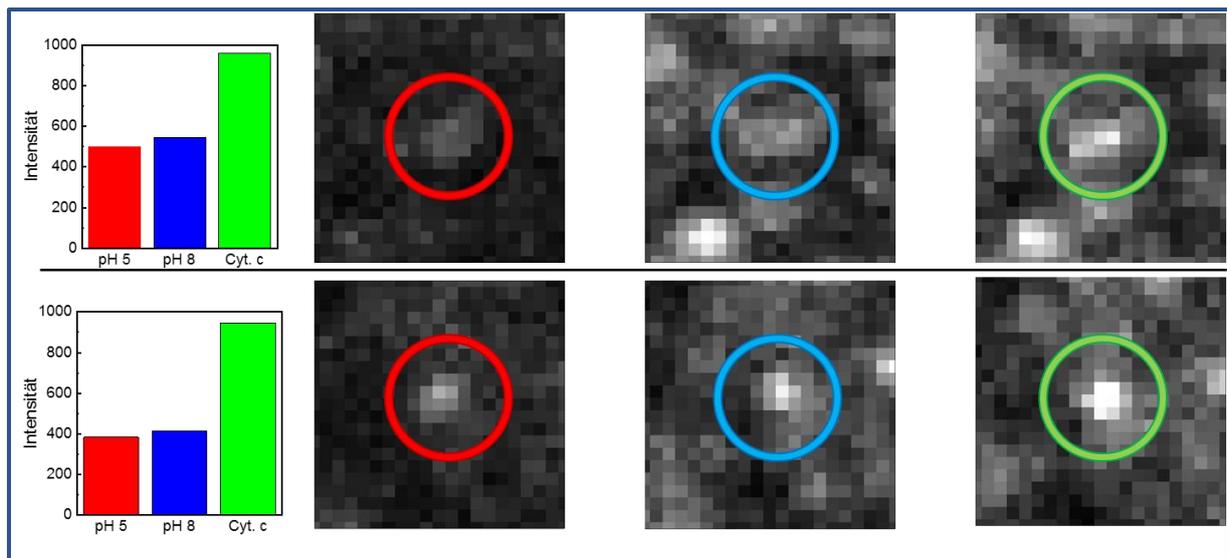


Abbildung 5.4: **Aktivitätsuntersuchung von Cco-P301C-AF in Proteoliposomen im FLIM.** Beispielhafte Intensitätsänderung der von beladenen Proteoliposomen, deren Sonden keine Änderung bei externen Pufferaustausch zeigen. Erst nach Zugabe von Cyt-c (in grün) zeigt sich eine eindeutige Intensitätssteigerung. Proteoliposome sind wie in Kapitel 3.5 beschrieben vorbereitet worden und im FLIM mit einer Anregung von 488 nm für 300 s vermessen worden. Die Emission ist durch einen LP 515 nm (Chroma) gefiltert worden. Die Messung erfolgte zusammen mit M. Lach.

Nach erfolgter Messung bei pH 8 wird Cyt-c zugegeben. In Abbildung 5.4 sind exemplarisch die Fluoreszenzintensitäten in zwei Proteoliposomen dargestellt. Aufgrund der Ausrichtung und der Kopplungsgruppe des Proteins für die pH Sonde, werden Emitter ausgewählt, die nach einem externen pH Wechsel keine Änderung der Fluoreszenz Intensität zeigen. Die ausgewerteten Liposome zeigen eine konstante Intensität bei 420 ± 50 in dem 300 s Messzeitfenster bei saurem und basischen pH. Nach Zugabe von Cyt-c erhöht sich die Fluoreszenzintensität auf 970 ± 30 . Diese Erhöhung wird durch die Reduzierung der Protonenkonzentration im Lumen der Proteoliposome durch den aktiven Transport von Protonen durch die CcO erreicht.

Aufgrund der Funktionsweise des Aufbaus sind die über den Messzeitraum summierten Intensitäten im FLIM verwendet worden. Um eine für die Fluoreszenz Intensität sensitivere Aufbau zu verwenden, werden die Experimente bei pH 6 und pH 9 in dem TRIFM-Aufbau ebenfalls durchgeführt. Zur Anregung der Sonde wird ein 488 nm Diodenlaser verwendet und 100 Bilder mit einer Bildrate von 100 ms pro Experiment aufgezeichnet. Die Emitter werden analog zu den Untersuchungen im FLIM ausgewertet. Zusätzlich werden zu dem Austausch des externen KPP-Puffers auch bei der Herstellung der Proteoliposome die zwei unterschiedlichen pH-Werte für den internen Puffer verwendet.

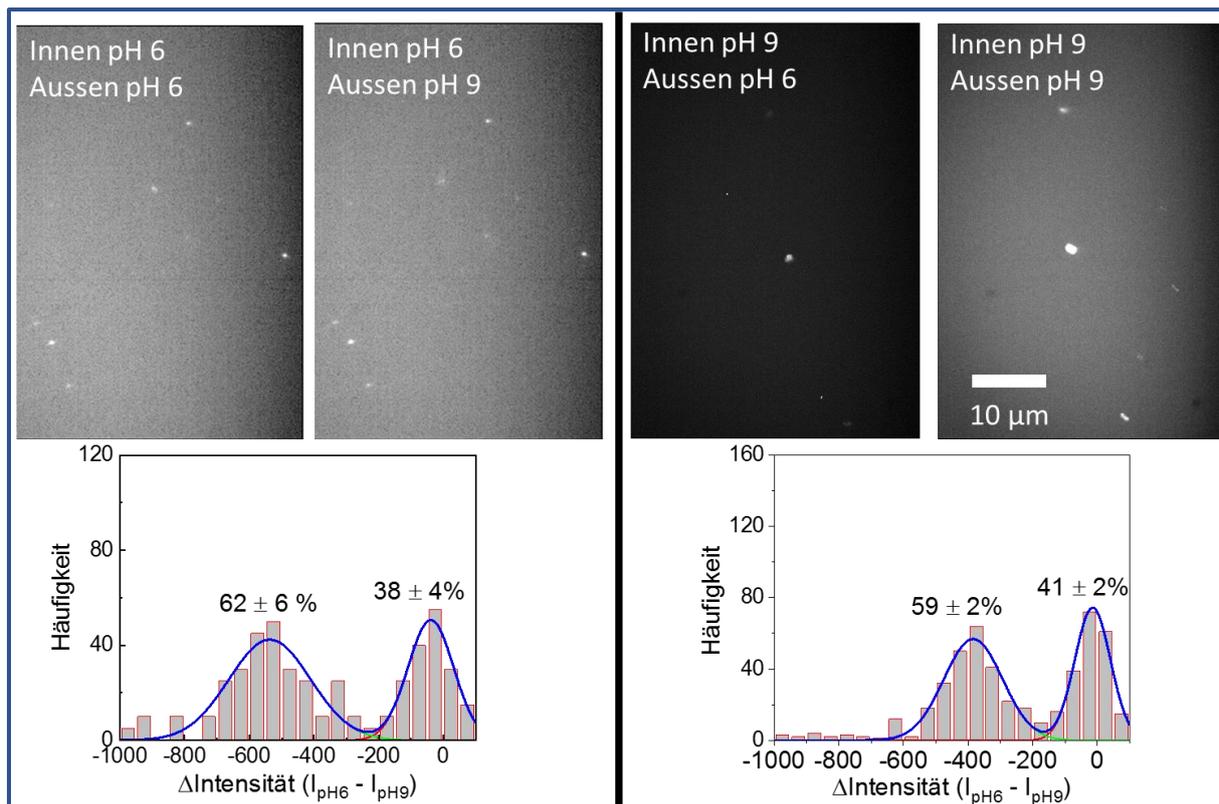


Abbildung 5.5: **Häufigkeitshistogramm der Differenzintensität von Proteoliposomen im TIRFM.** Die Intensitäten einzelner Proteoliposome mit CcO-P301C-AF sind bei pH 6 und pH9 des externen Puffers bestimmt worden und die Differenz in ein Häufigkeitsdiagramm eingetragen. Dies wurde bei einem inneren pH-Wert von 6 und 9 durchgeführt. Mittels der Summe zweier Normalverteilungen sind zwei Populationen an Proteoliposomen für die jeweiligen internen pH-Werte bestimmt. Proteoliposome sind wie in Kapitel 3.5 beschrieben vorbereitet worden und im TIRFM mit einer Anregung von 473 nm in 100 Bildern bei einer Bildrate von 100 ms vermessen worden. Die Emission ist durch einen LP 515 nm (Chroma) gefiltert worden.

In Abbildung 5.5 sind die gemittelten Intensitätsbilder der Messungen gezeigt. Hierbei ist die bestehende Lokalisation im gezeigten Ausschnitt nach Pufferaustausch gut erkennbar. Bei der Betrachtung der Differenz der Emitter Intensitäten vor und nach Pufferaustausch zeigen sich ebenfalls zwei Populationen mit vergleichbaren relativen Anteilen der Emitter. Die Daten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Hierzu ist zu bedenken, dass die absoluten Intensitätswerte nur qualitativ vergleichbar sind zwischen den Aufbauten, aufgrund unterschiedlicher Zählrate, Detektor und Laser und somit nur ein qualitativer Vergleich genutzt werden kann. Hierbei zeigt sich ein ähnliches Verhältnis der nach innen und außen gerichteten Fluoreszenz Sonden, wobei eine leichte Verschiebung zu negativen Werten im TIRFM auch bei $I_{c,1}$ zu sehen ist.

Tabelle 5.1: **Vergleich der Populationen der mit CcO-P301C-AF beladenen Proteoliposomen aus FLIM und TIRFM Experimenten.** Die aus Abbildung 5.3 und 5.5 bestimmten mittleren Intensitäten und die dazugehörigen relativen Amplituden der Normalverteilungen sind gezeigt.

	$I_{c,1}$ (relative Amplitude)	$I_{c,2}$ (relative Amplitude)
FLIM: innen pH 7,5	0 ± 1 ($35 \pm 4\%$)	-57 ± 1 ($65 \pm 5\%$)
TIRFM: innen pH 6	-50 ± 10 ($38 \pm 4\%$)	-530 ± 20 ($62 \pm 6\%$)
TIRFM: innen pH 9	-23 ± 4 ($41 \pm 2\%$)	-380 ± 10 ($59 \pm 2\%$)

5.2 Untersuchung der liposomalen Konzentration von Cytochrom-c-Oxidase

Weiterhin wurde im FLIM untersucht, ob aufgrund des veränderten Verhältnisses von Liposomen und CcO Molekülen eine Veränderung in der Aufteilung der Populationen aus Kapitel 5.1 beschrieben stattfindet. Bei einem reduzierten relativen Konzentrationsverhältnis von 0,125:1 (CcO:Proteoliposom), zeigte sich eine starke Änderung der Verhältnisse und eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Um die mögliche Bildung von Dimeren oder Komplexen höherer Ordnungen von CcO in den Proteoliposomen zu untersuchen, war es Teil dieser Arbeit eine Einzelmolekülanalyse zu etablieren. Ein unbekannter Grad der Oligomerisierung wird die Auswertung der Pumpleistung einer einzelnen CcO nahezu unmöglich machen.

Zur Untersuchung von Komplexen von Molekülen, die sich in Abständen unter der optischen Auflösungsgrenze bilden, ist Zwei Farben Einzelmolekül FRET eine Methode zur Identifizierung solcher Dimeren. Hierzu wird, wie in Kapitel 3.13 beschrieben, der bereits bestehende TIRFM Aufbau als Teil dieser Arbeit erweitert. Kurz zusammengefasst, wurde ein AOTF in den Anregungsstrahlengang eingebaut, um eine alternierende Anregung der Probe durch zwei Laser zu ermöglichen. Dieser wurde mittels einer selbstgeschriebenen LabView Steuerung mit der Bildrate der benutzten Detektionskamera elektronisch verknüpft. Somit konnte jeweils abwechselnd die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge pro Bild detektiert werden. Die Emission wurde zusätzlich mittels optischer Bauteile spektral getrennt und auf jeweils die Hälfte des Aufnahmegebietes der Kamera gelenkt. Somit konnte der TIRFM Aufbau mit alternierender Laser Anregung (ALEX) für Einzelmolekül FRET erweitert werden. Zur Kalibrierung und Überprüfung des Aufbaus sind die in Kapitel 3.6 beschriebenen DNS-Stränge mit unterschiedlich langen Basenpaarabständen mit fluoreszierenden Farbstoffen verwendet worden. Proben mit denselben Abständen der beiden fluoreszierenden Farbstoffen sind in (Hellenkamp 2018) mit verschiedenen FRET-Methoden analysiert worden. Die Proben wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. Claus Seidel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die dsDNS Proben besitzen eine Biotin Molekül das mittels des Biotin/Neutravidin-Ankersystems beschrieben in Kapitel 3.6 an die Glasträger befestigt wurde. Die Proben wurden bei zwei Anregungswellenlängen mit 561 nm und 633 nm alternierend durch den AOTF angeregt. Die Emission wurde mittels eines Band Stopp Filter 660 nm und Bandpassfilter 600/52 (Chroma) auf dem Kamerachip getrennt. Die aufgenommenen Daten werden mittels der Software iSMS (Preus 2015) analysiert. Hierbei wird ein direkter Vergleich der gefundenen Emitter in Akzeptor und Donor Kanälen mit einer kreisförmigen Integrationsfläche mit einem Durchmesser von 5 Pixel verwendet und daraus die unkorrigierte Intensität DA_{unkor} , DD_{unkor} und AA_{unkor} bestimmt. Eine zweite umgebende Integrationsfläche mit gleicher Fläche wird verwendet, um den Hintergrund $DD_{\text{Hintergrund}}$ zu bestimmen und die korrigierte Intensität im Donorkanal DD zu berechnen

$$DD = DD_{\text{unkor}} - DD_{\text{Hintergrund}} \quad (46)$$

Analog erfolgt die Korrektur auch für die weiteren Intensitäten. Mittels Formeln 29 wird aus diesen Größen die apparente Stöchiometrie und apparente Effizienz bestimmt. Die mögliche Überblendung und direkte Anregung des Akzeptor Fluorophor wird nach Gleichung 30 korrigiert. Die so korrigierten Datensätze aus Stöchiometrie und Effizienz werden für alle identifizierten Paare in ein Histogramm eingetragen. Zwei Datensätze sind exemplarisch in Abbildung 5.6 auf der linken Seite dargestellt und die korrigierten Daten auf der rechten Seite.

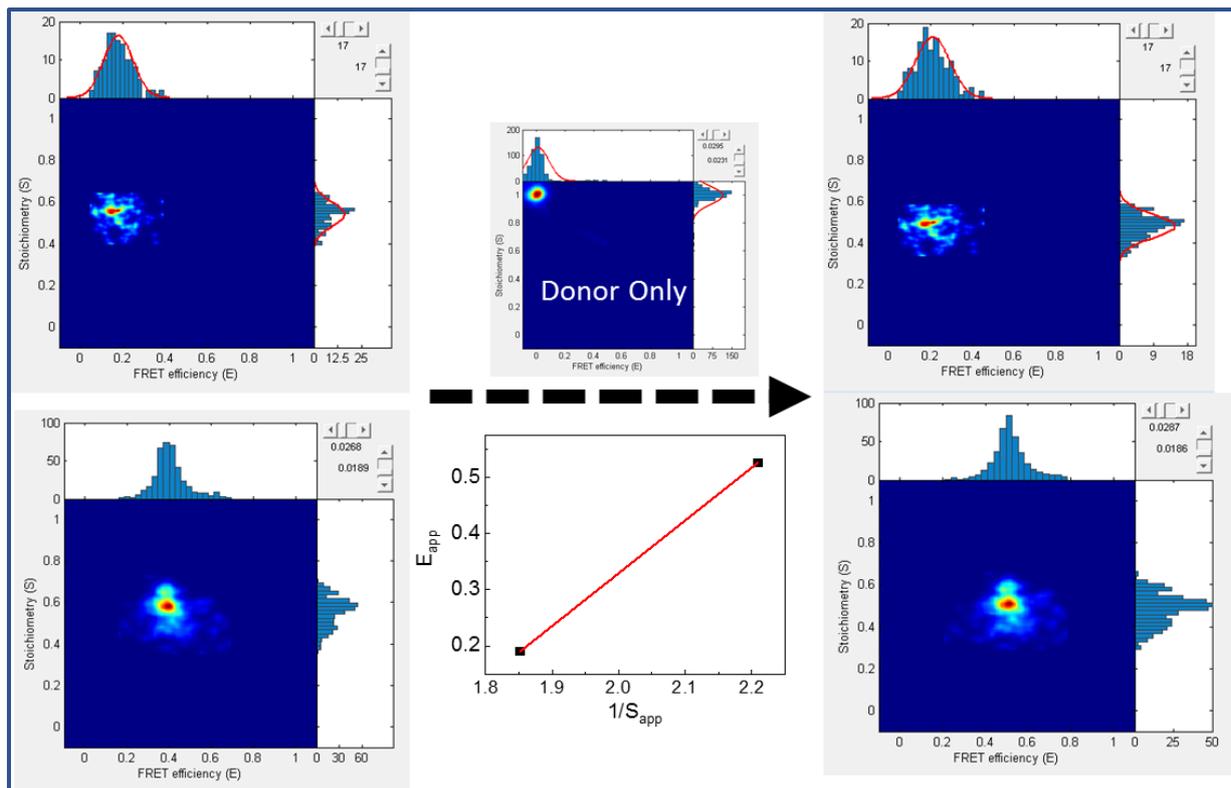


Abbildung 5.6: **Kalibrierungsexperiment des entwickelten Einzelmolekül FRET Aufbaus.** Die in Kapitel 3.6 beschriebenen Proben sind als Hoch und Tief FRET-Proben (mit unterschiedlichem Abstand der Moleküle) und einer mit nur Donorfarbstoff vorhandenen Probe im FRET mit ALEX-Anregung vermessen worden. Die Korrektur der Intensitäten und der FRET-Parameter erfolgten, wie in Kapitel 3.13 beschrieben. Die resultierenden Werte vor und nach Kalibrierung sind gezeigt. Die Proben wurden bei zwei Anregungswellenlängen mit 561 nm und 633 nm abwechselnd angeregt. Die Emission wurde mittels eines Band Stopp Filter 660 nm und Bandpassfilter 600/52 (Chroma) getrennt. Es wurden jeweils 200 Bilder mit 100ms Bildrate aufgenommen. Die aufgenommenen Daten werden mittels der Software iSMS analysiert.

Eine weitere Messung mit einer dsDNS Probe die nur den Farbstoff Atto561 beinhaltet, ist als Referenzprobe „Donor Only“ gezeigt. Da keine Intensität im Akzeptorkanal zu sehen ist, ist nach erfolgter Kalibrierung eine Stöchiometrie von 1 und eine Effizienz von 0 zu erwarten. Unter Verwendung zweier Proben mit gleichen Fluorophoren aber unterschiedlichen konstanten Abstand, kann der Korrekturfaktor γ nach Formel 31 aus der Steigung der Ausgleichsgerade der apparenten Werte bestimmt werden. Dieser erlaubt nach Formel 32 die korrigierte Stöchiometrie und Effizienz zu bestimmen. Diese sind für die verwendete Probe auf der rechten Seite in Abbildung 5.6 zu sehen. Die bestimmten FRET-Parameter sind in Tabelle 5.2 als Tief und Hoch Parameter in Abhängigkeit der Entfernung der fluoreszierenden Moleküle benannt. Ebenso sind die Referenzdaten aus (Hellenkamp 2018) angegeben. Da bei den Proben stets ein Donor- und Akzeptorfluorophor vorliegt wird dort eine Stöchiometrie von $S=0,5$ erwartet. Bei dem Vergleich der Daten ist nach Korrektur die bestimmten Daten für die dsDNS Proben gleich zu dem Literaturwert.

Tabelle 5.2: Bestimmte FRET-Parameter aus Abbildung 5.6 und aus (Hellenkamp 2018) im Vergleich gezeigt.

	Apparenter Parameter	Korrigierte Parameter	Aus (Hellenkamp 2018)
E_{tief}	$0,18 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,05$
S_{tief}	$0,54 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,01$	0,5 (Erwartung)
E_{hoch}	$0,41 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,08$
S_{hoch}	$0,56 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,02$	0,5 (Erwartung)

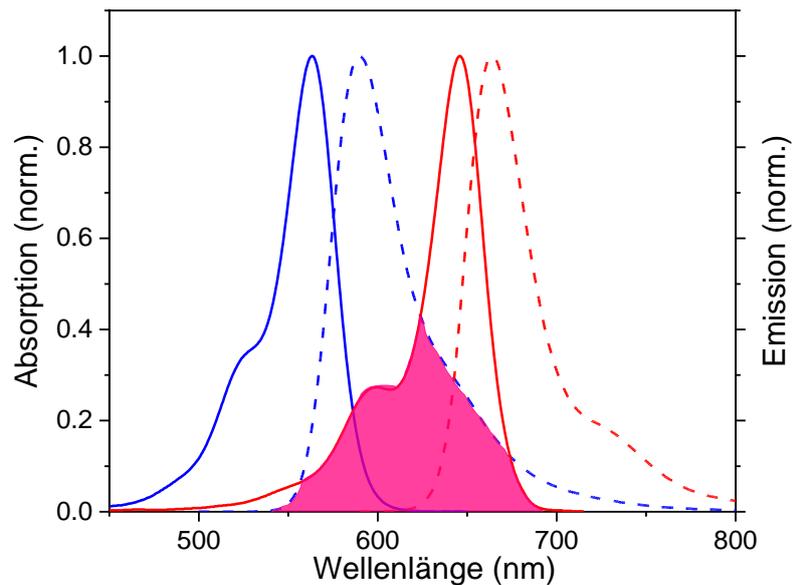


Abbildung 5.7: **Absorptions- und Emissionsspektren der Fluorophoren Atto 565 und mit Atto 647N.** Das Überlappintegral (rosa) von Atto 565 (blau) Emission (gestrichelt) und der Absorption von Atto 647N (rot) ist dargestellt.

Nach erfolgreichem Aufbau und Kalibrierung des Zwei Farben Einzelmolekül FRET Aufbaus wird der konzentrationsabhängige Einbau von CcO in die Proteoliposome untersucht und die mögliche Oligomersisierung. Für spätere Untersuchungen der Aktivität und Protonenpumpfähigkeit der CcO ist es unabdingbar die CcO Konzentration in den Liposomen zu kennen. Hierzu wird, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, CcO-P301C mit Atto 565 und Atto 647 jeweils markiert und in einem 1:1 Verhältnis (CcO-P301C-atto565: CcO-P301C-atto647) vermischt (weiterhin als CcO-P301C-atto benannt). CcO-P301C-atto wird dann in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (1:1; 0,5:1; 0,25:1; 0,125:1) in die proteoliposomale Membran nach dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Protokoll eingebracht. Die Anregung erfolgt mit abwechselnder Anregung bei 561nm und 633nm. Im Mikroskop wird der dichroitische Spiegel BS z488/543/633 (Chroma) verwendet, um Anregung und Emission zu trennen. Die Emission wurde mittels eines dichroitischen BandStop Filters 660 nm und einem Bandpassfilter 600/52 (Chroma) getrennt und wie zuvor beschrieben auf den Kamerachip aufgeteilt. Die Bildrate der Kamera ist mit dem Anregungswechsel durch den AOTF synchronisiert. Es werden pro Experiment 1000 Bilder mit einer Bildrate von 200 ms aufgenommen.

In Abbildung 5.8 sind die durch das Programm iSMS erzeugten Overlays für die unterschiedlichen Konzentrationen exemplarisch gezeigt. Hierbei sind die Donor Kanal Intensitäten in grün eingefärbt und die Akzeptor Kanal Intensität in Rot.

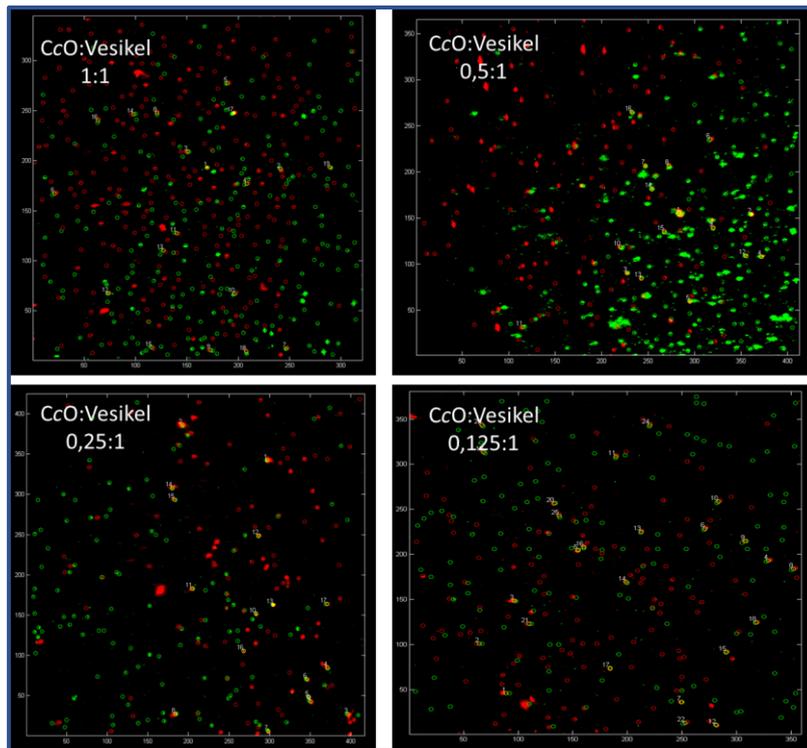


Abbildung 5.8: Ausgewählte Bereiche der Overlays des Donor und Akzeptorkanals von FRET markierten CcO-P301C-Atto in Proteoliposomen bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen. Die Overlays sind durch das Programm iSMS aufgrund der Identifizierung des Donor (grün) und Akzeptor (rot) Kanals bestimmt. Die FRET-Paare (gelb) sind hier bereits angedeutet. Die Anregung erfolgt mit abwechselnder Anregung bei 561nm und 633nm. Im Mikroskop wird der Dichroitische Spiegel BS z488/543/633 (Chroma) verwendet, um Anregung und Emission zu trennen. Die Emission wurde mittels eines dichroitischen BandStop Filter 660 nm und einem Bandpassfilter 600/52 (Chroma) getrennt. Pro Experiment sind 1000 Bilder mit einer Bildrate von 200 ms aufgenommen worden.

In der Untersuchung der Anzahl der Donor-Akzeptor-Paare ist ein Anstieg der identifizierten Paare zu erkennen. Somit steigt die relative Anzahl von Paaren bei sinkender CcO-P301C-atto Konzentration. Ab einem Konzentration Verhältnis von 0,25:1 und 0,125:1 zeigen sich ähnliche relative Anzahl von FRET-Paaren. Die Anzahl der gefundene Emitter und die der identifizierten Paare sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Da mit dieser Methode nur die Paare identifiziert werden, die einen Akzeptor und einen Donorfarbstoff besitzen, müssen weitere Kombinationen von CcO Moleküle mit gleichem Farbstoff berücksichtigt werden, unter der Annahme, dass die Dimerisierung statistisch unabhängig von dem verwendeten Farbstoff erfolgt. Dies ergibt einen Faktor von vier. Der berechnete relative Anteil von Dimeren bei unterschiedlichem CcO:Liposom Verhältnis ist in Tabelle gezeigt. Die kleinste Anzahl an Dimeren ist bei dem höchsten Verhältnis von CcO und Liposom zu erkennen.

Tabelle 5.3: Die in Abbildung 5.8 gefundene Anzahl an Emitter und als FRET-Paaren identifizierte Emitter und daraus berechnete relative Anzahl an Dimeren in den Proteoliposomen.

C[CcO]/c[Liposom]	Gefundene Paare	Emitter	Relative Anzahl FRET-Paare	Rechnerische Anzahl von Dimeren
1	19	276	0,07	0,28
0,5	16	200	0,08	0,32
0,25	17	140	0,12	0,48
0,125	25	146	0,17	0,68

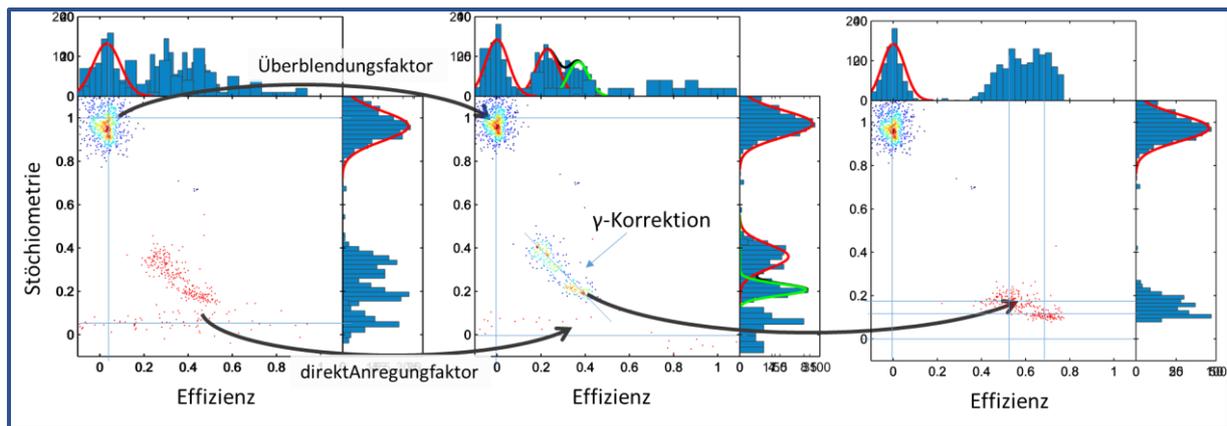


Abbildung 5.9: **Exemplarische Auswertungsschritte der FRET-Analyse.** Nicht korrigierte FRET-Parameter sind zuerst aufgrund der Auswertung der nur im Donor Kanal und Akzeptor Kanal vorkommende Emitter, durch den in Kapitel 3.13 beschriebene Überblendungsfaktor und die direkte Anregung im korrigiert worden. Aufgrund der bestimmten γ -Korrektur ergeben sich die korrigierte Effizienz und Stöchiometrie Werte. Die Anregung erfolgt mit abwechselnder Anregung bei 561nm und 633nm. Im Mikroskop wird der Dichroitische Spiegel BS z488/543/633 (Chroma) verwendet, um Anregung und Emission zu trennen. Die Emission wurde mittels eines dichroitischen BandStop Filter 660 nm und einem Bandpassfilter 600/52 (Chroma) getrennt. Pro Experiment sind 1000 Bilder mit einer Bildrate von 200 ms aufgenommen worden.

Die Analyse der FRET-Paare erfolgte nach der in Kapitel 3.13 beschriebenen Methode. Zur Bestimmung des Überblendungsfaktors und der direkten Anregung in den Akzeptorkanal werden Emitter mit analysiert, die keine Donor Akzeptor Paare zeigen. Nach Korrektur durch diese Faktoren wird die zuvor bestimmte γ Korrektur verwendet, um die bereinigte Effizienz und Stöchiometrie zu bestimmen. Diese Schritte sind exemplarisch in Abbildung 5.9 gezeigt. Diese schrittweise Datenauswertung erfolgte bei allen untersuchten Konzentrationsverhältnissen. Die korrigierten FRET-Daten sind für die Konzentrationsverhältnisse in Abbildung 5.10 dargestellt. Hierbei zeigte sich bei einem CcO zu Liposom Verhältnis von 1:1 eine einzelne Population mit einer Effizienz von $E=0,59 \pm 0,05$ und einer Stöchiometrie von $S=0,24 \pm 0,02$. Bei den Konzentrationsverhältnissen 0,5:1 und 0,25:1 zeigen sich zwei FRET-Populationen mit FRET-Parameter von jeweils $E_{1;0,5} = (0,28 \pm 0,04)$, $S_{1;0,5} = (0,35 \pm 0,02)$ und $E_{2;0,5} = (0,47 \pm 0,03)$, $S_{2;0,5} = (0,20 \pm 0,01)$ bei 0,5:1 und $E_{1;0,25} = (0,31 \pm 0,02)$, $S_{1;0,25} = (0,49 \pm 0,02)$ und $E_{2;0,25} = (0,48 \pm 0,02)$, $S_{2;0,25} = (0,30 \pm 0,02)$ bei 0,25:1. Aufgrund der Normalverteilungsbestimmung lässt sich bei 0,5:1 für die erste Population ein relativer Anteil von $(71 \pm 4\%)$ bestimmen und bei dem Konzentrationsverhältnis von 0,25:1 bei der ersten Population mit $(63 \pm 2\%)$. Bei einem Verhältnis von 0,125:1 kann nur eine Population mit einer Effizienz von $E=0,37 \pm 0,05$ und einer Stöchiometrie von $S=0,46 \pm 0,03$ bestimmt werden. Aufgrund der FRET-Parameter sind mit den aus Kapitel 3.13 bestimmten R_0 und der Gleichung 12 die Abstände R der Donoren und Akzeptoren berechnet und in Tabelle 5.4 zusammengefasst und eine Entfernung von $r_{\text{tief}} = (87 \pm 3) \text{ \AA}$ und $r_{\text{hoch}} = (76 \pm 2) \text{ \AA}$ berechnet worden.

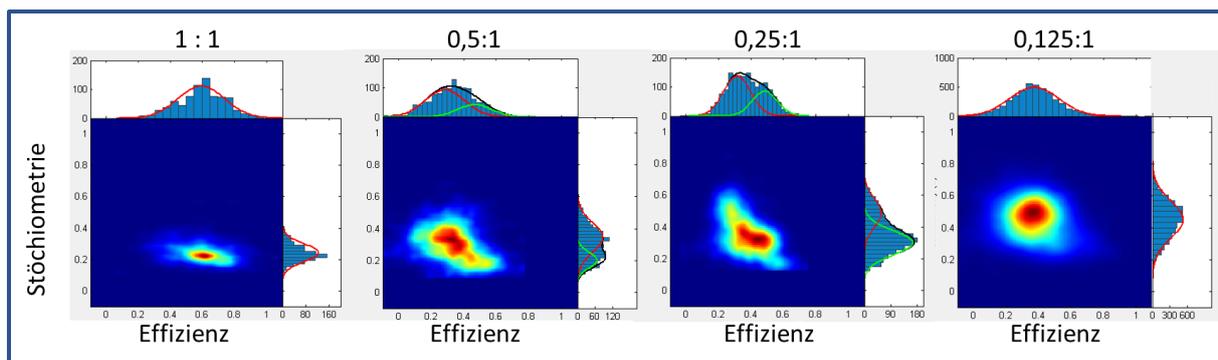


Abbildung 5.10: Korrigierte FRET-Parameter von CcO-P301C-Atto bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zu den Proteoliposomen. Wie in Abbildung 5.9 exemplarisch für das Verhältnis 1:1 gezeigt, sind hier für alle untersuchten Konzentrationsverhältnisse alle FRET-Paare gezeigt. Die Anregung erfolgt mit abwechselnder Anregung bei 561nm und 633nm. Im Mikroskop wird der Dichroitische Spiegel BS z488/543/633 (Chroma) verwendet, um Anregung und Emission zu trennen. Die Emission wurde mittels eines dichroitischen BandStop Filter 660 nm und einem Bandpassfilter 600/52 (Chroma) getrennt. Pro Experiment sind 1000 Bilder mit einer Bildrate von 200 ms aufgenommen worden.

Tabelle 5.4: Die bestimmten FRET-Parameter für verschiedene Konzentrationsverhältnisse von CcO-P301C-Atto und Proteoliposom sind aufgetragen. Die hieraus berechneten Abstände R der Paare sind angegeben.

CcO/Liposom	E ₁	S ₁	R ₁ (Å)	E ₂	S ₂	R ₂ (Å)
1	-----	-----	-----	0,59 ± 0,05	0,24 ± 0,02	72 ± 2
0,5	0,28 ± 0,04	0,35 ± 0,02	89 ± 2	0,47 ± 0,03	0,20 ± 0,01	78 ± 1
0,25	0,31 ± 0,02	0,49 ± 0,02	88 ± 2	0,48 ± 0,02	0,30 ± 0,02	78 ± 1
0,125	0,37 ± 0,05	0,46 ± 0,03	84 ± 3	-----	-----	-----

5.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel meiner Arbeit wird die Integration von CcO in Proteoliposommembranen untersucht. Hierzu wurde die Ausrichtung und Funktionalität mit der an die Oberfläche der Proteine gekoppelten pH Sonde, Fluorescein, bestimmt. Die Ausrichtung wurde sowohl im FLIM als auch im TRIFM durch Pufferaustausch durchgeführt. Die Experimente im FLIM und TIRFM zeigen eine Population von ca. 60% Anteil, die den Fluorophor in Richtung der freien Lösung aufweist. Da sich die Kopplungsstelle mit P301C auf der N-Seite des Proteins befindet, sind somit die meisten CcO Moleküle mit der Bindungsstelle für Cyt-c nach innen gerichtet (60-65% inside out). Diese Ergebnisse sind konträr zu Untersuchungen in Quinol Oxidase bo₃ (70% right side out) (Berg 2017) und der aa₃-CcO aus *Rhodobacter sphaeroides* (80% right side out) (Salomonsson 2005). Die Abweichung kann auf die unterschiedlichen CcO Varianten und die Art der Bestimmung der Orientierung zurückgeführt werden. Ebenso hat die Komposition der verwendeten Lipide in den Proteoliposomen einen starken Einfluss auf den Einbau der CcO in die Membran (Hugentobler 2020). Bei der aa₃-CcO aus *Rhodobacter sphaeroides* wird die Ausrichtung aufgrund des Reduktionsverhältnisses der CcO durch das nur außen wirkende

Reduktionsmittel und ein Reduktionsmittel, das sowohl außen und innen wirkt, bestimmt. Diese Messungen erfolgten in Bulkmessungen und die Ausrichtung in einzelnen Liposomen wird nicht erfasst. Die Ausrichtung von Quinol Oxidase bo_3 wurde in Liposomen mit dem Fluorophor HPTS in dem Lumen analysiert. Hierbei wurden durch Aktivierung von Ubiquinol beide Ausrichtungen von CcO aktiviert und nur die Änderung durch den in Lösung befindlichen Fluorophor registriert. Im Gegensatz zu diesen Experimenten wurde in dieser Arbeit die Ausrichtung vor Aktivierung durch eine fest gekoppelte Sonde untersucht. Danach durchgeführte Aktivierungen mittels Cyt-c zeigen die Aktivierung der nach innen gerichteten pH SONDENSEITE. Eine Titration der pH Sonde zeigte zwei unterschiedliche Populationen mit pK Werten von $6,8 \pm 0,24$ und $8,2 \pm 0,2$. Im Vergleich zu dem bestimmten pK Wert von CcP-P301C-AF in Mizellen scheint eine kleine Fraktion von 14% von undichten Vesikel vorzuliegen, da hier ein vergleichbarer pKa zum pKa in Mizellen von 6,9 vorliegt.

Zu den weiteren Untersuchungen der Anzahl von CcO Proteinen pro Liposom wurden in dieser Arbeit Messungen mit unterschiedlichem Verhältnis von Liposomen und CcO durchgeführt. Hierbei zeigte sich qualitativ eine Veränderung der Anzahl von CcO Proteinen pro Liposom in ersten Messungen im FLIM-Aufbau. Zur genauen Untersuchung wurde als Teil dieser Arbeit ein Einzelmolekül FRET Aufbau konzipiert und in den bestehenden TIRFM Aufbau integriert. Referenzmessungen liefern gleiche Ergebnisse, die in der Literatur zu den verwendeten Proben bestimmt wurden (Hellenkamp 2018) und erlaubten dadurch eine Kalibrierung des Aufbaus und der Bestimmungen von Korrekturfaktoren.

Bei der Untersuchung von unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen wurde bei abnehmender Konzentration der CcO vermehrt Dimere in den Proteoliposommembranen identifiziert. Dies deutet auf eine konzentrationsabhängige Polymerisierung bei geringen Proteinkonzentrationen hin, was auch durch Aggregationsverhalten bei geringer Konzentration in Absorptionmessungen zu erkennen ist. Aufgrund der Stöchiometriebestimmung sind bei höheren Konzentrationsverhältnissen nicht nur einzelne Donor Akzeptor Paare in den Liposomen zu finden, sondern auch einzelne Donoren und Akzeptoren zu finden. Somit ist eine absolute Reduzierung des Konzentrationsverhältnisses nicht von Vorteil bei Untersuchungen, die nur eine CcO pro Vesikel benötigen. Eine Untersuchung der Dimerisierung oder Aggregation in Einzelmolekül Assay von CcO ist gerade bei der geringen Konzentration unabdingbar und ist notwendig um ein optimales Verhältnis zwischen einzelnen CcO Molekülen ohne Dimer Bildung in den Proteoliposomen zu erreichen.

Bei einem Konzentrationsverhältnis von 0,125:1 CcO:Liposom wird eine Stöchiometrie von 0,5 bestimmt, die bei FRET-Messungen somit auf einzelne Donor-Akzeptor-Paare hinweist. Bei den anderen Verhältnissen ist eine reduzierte Stöchiometrie zu sehen, die Interaktionen von mehr als einem einfachen Donor-Akzeptor-Paar aufzeigt (Hoppe 2002). Aufgrund von unterschiedlichen Verhältnissen von Donor und Akzeptor ist hier auch bei gleichbleibender Entfernung eine Veränderung der FRET-Effizienz zu erwarten (Mattioli 2018), welche sich auch in den FRET Messungen zeigt. Somit kann aus dem Konzentrationsverhältnis von 0,125:1 die Entfernung von $R = 84 \pm 3$ nm für einzelne Dimere angenommen werden. Eine rudimentäre Untersuchung der Abstände der Position P301C zweier Moleküle mittels der Kristallstruktur, legt nahe, dass die gefundenen Dimere antiparallel angeordnet sind, wie in Abbildung 5.11 zu

sehen ist. Dies bedarf jedoch weiterführender genauerer Untersuchung, um eine mögliche Vorzugsorientierung des Dimers zu analysieren.

Aufgrund der Untersuchung der Häufigkeit von Dimeren werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit ein Verhältnis von 1:1 (CcO:Liposom) verwendet, damit der größte Anteil an Einzelmolekülen in den Proteoliposomen erfasst werden kann und ein möglichst geringer Fehler durch die Reduzierung von gebildeten Dimeren erreicht wird.

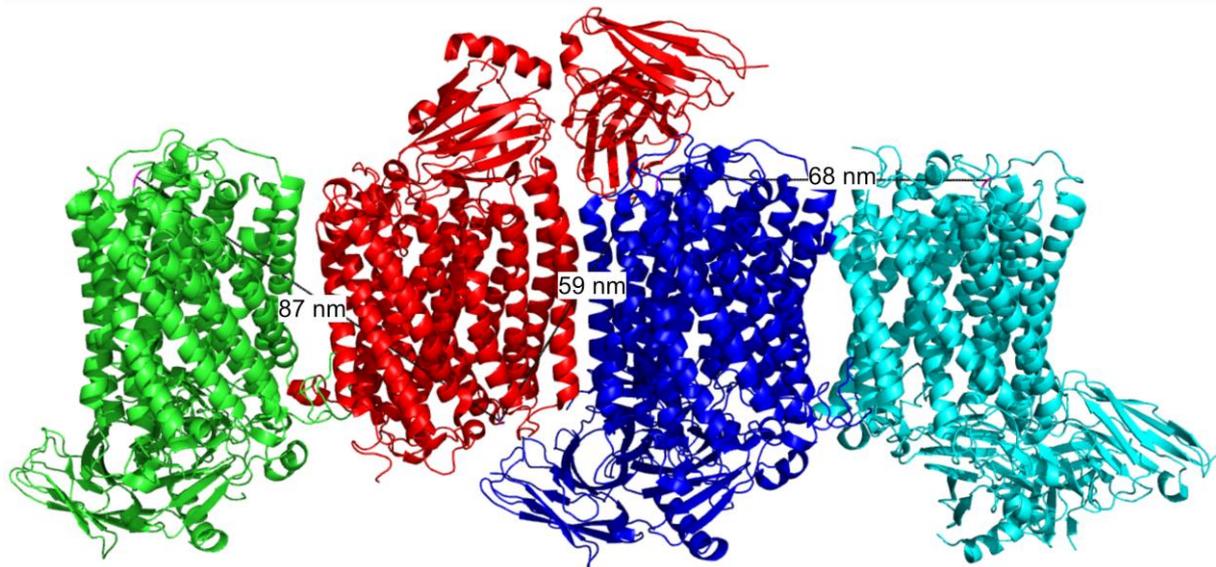


Abbildung 5.11: Einfache Entfernungsabschätzung der Position 301 in CcO in unterschiedlichen Konfigurationen aufgrund der in der PDB vorliegenden Symmetrie Angaben (pdb:3hb3). Die Auswertung der Entfernung erfolgte mit dem Programm Pymol (Pymol Version 2.8).

6. Resultate und Diskussion III: Entwicklung eines Einzelliposomen-Assays zur Messung der Membranspannung von CcO-haltigen Proteoliposomen

In den vorherigen Kapiteln wurde sowohl Archon1 und CcO separat in Liposomen betrachtet, um die einzelnen Komponenten des liposomalen Assays zu untersuchen. In diesem Kapitel werden beide Proteine nun zusammen in den Liposom Assay eingesetzt und untersucht, ob die Aktivierung von CcO mittels Cytochrom-c und dem daraus resultierenden Pumpen von Protonen durch Fluoreszenzänderungen von Archon1 bestimmt werden kann. Hieraus soll die pmf identifiziert werden. Um das Fluoreszenzsignal von Archon1 mit der Eichkurve in Kapitel 4 in eine anliegende Membranspannung umzuwandeln, muss berücksichtigt werden, dass die pmf aus einem Protonen Gradienten entsteht, der eine pH Differenz ΔpH und ein Membranpotential $\Delta\Psi$ erzeugt. Die entwickelte Eichkurve unter Verwendung der Nernst Gleichung von Archon1 berücksichtigt nur das Membranpotential. Um ein reines Membranpotential zu erzeugen, werden die Liposome mit den beiden Proteinen wie zuvor beschrieben erzeugt und dazu wird Nigericin (100nM) zu den beladenen Vesikeln gegeben. Nigericin ist ein K^+/H^+ -Antiporter, der aufgrund des Ausgleiches der zuvor gepumpten Protonen ein Kaliumionen Gradienten aufbaut, der im Austausch ein entkoppeltes reines Membranpotential über die Vesikel Membran aufbaut (Kömlödi and Tretter 2022) und nun mittels der Sonde Archon1 gemessen werden kann.

Da der Sensor Archon1 bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm mit 3 mW Leistung eine sensiblere Fluoreszenzänderung aufgrund der anliegenden Spannung zeigt, wird diese Wellenlänge in dem weiteren Assay zur Untersuchung verwendet. Auch zeigt sich diese Anregung von Vorteil, da das verwendete Cytochrom-c keine Absorptionsbande bei 633 nm besitzt, wie in Abbildung 6.1 zu sehen ist. Somit erfolgt keine Änderung der Absorption und Emission von Archon1 durch die Zugabe von Cytochrom-c.

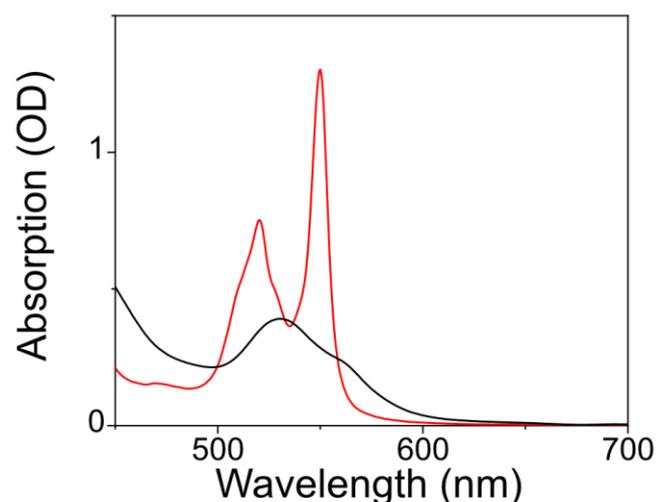


Abbildung 6.1: Absorptionsspektren von Cytochrom-c. In Rot das oxidierte und in schwarz das reduzierte Cytochrom-c. Das Protein wird bei einer Konzentration von 10 μM in Puffer (10 mM TRIS-Puffer pH 7.5 mit 100 mM KCl) vermessen.

6.1 Kontrollexperimente zur Bestimmung der Verwendung des vollständigen Membranpotentials Assays

Zuerst werden die erstellten Liposome mit der bereits verwendeten Biotin/Neutraavidin Technik auf den Glasträgern verankert (siehe Kapitel 4). Zur Kontrolle der Photostabilität von Archon1 im vollständigen liposomalen Assay wird unter den gleichen Parameter im TIRFM Aufbau die Probe für 200 Sekunden untersucht. Hierbei ist, wie bei allen weiteren Messungen, eine Framerate von 100 ms pro Frame gewählt worden, um das beste Verhältnis von Intensität und zeitlicher Auflösung zu erreichen. Die Messung zeigt in Abbildung 6.2 keine Instabilität oder Bleichen von Archon 1 über den gewählten Messzeitraum. Die Intensität wird als Mittel aller gefundenen Liposome in Abbildung 6.2 dargestellt. Die Auswertung erfolgt mittels der gewählten Programme analog zu Kapitel 4.

Um die Funktionalität der Spannungssonde im fertigen Assay zu untersuchen wird der externe Puffer mit reduzierter Kalium Konzentration ausgetauscht. Hierdurch wird eine unterschiedliche KCl Konzentration verwendet, um ein Membranpotential zu erzeugen. Dabei ist eine Reduzierung der Intensität der Fluoreszenz von Archon1 zu sehen (Abbildung 6.3), die in der gewählten Bildratenauflösung instantan erscheint (<100ms).

Dieser Test wurde vor jeder weiteren Messung durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine Änderung der Membranspannung durch die Veränderung der Archon1 Fluoreszenz detektiert wird und das Reporterprotein korrekt eingebaut wurde.

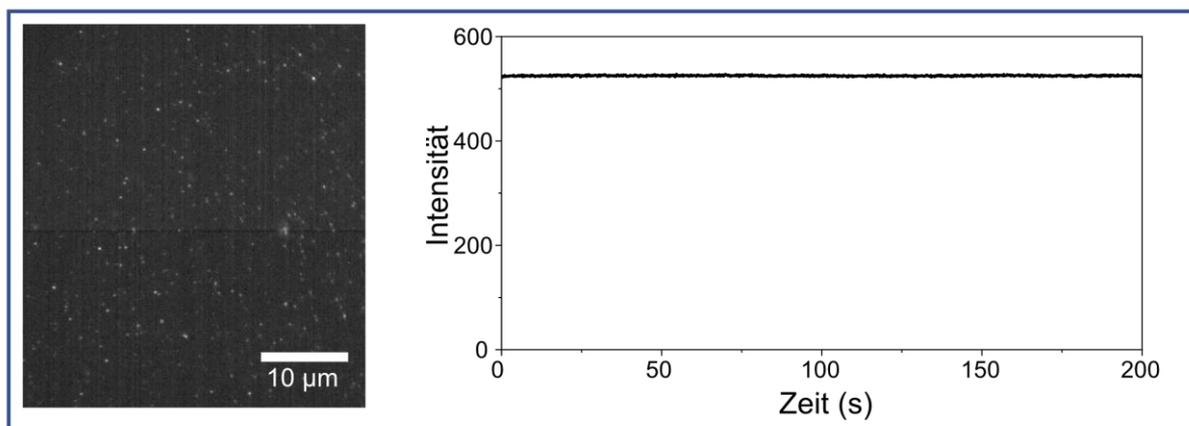


Abbildung 6.2: Exemplarische Messung zur Untersuchung der Photostabilität im TIRFM Aufbau bei einer Anregung von 633nm. Das gemittelte Intensitätsbild ist gezeigt und die mittlere Intensität der lokalisierten Vesikel über den Messzeitraum von 200s (Bildrate von 100 ms/Bild).

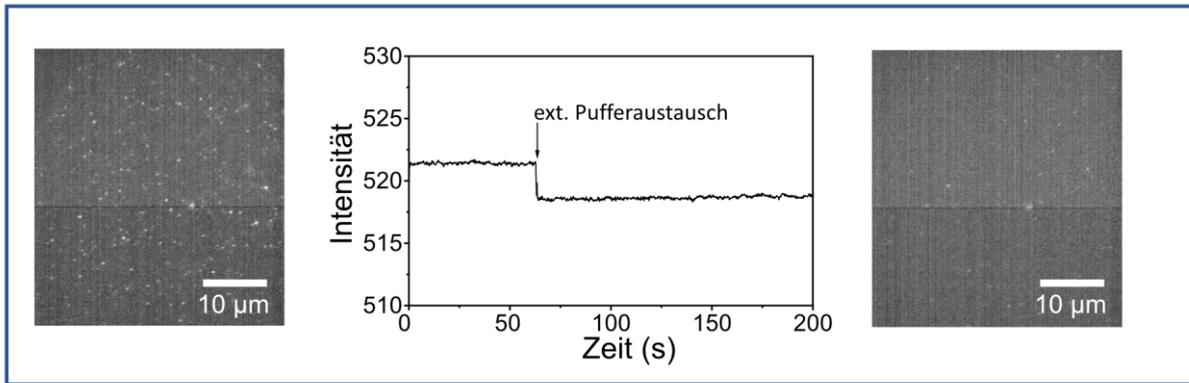


Abbildung 6.3: Fluoreszente Reaktion von Archon 1 aufgrund von externen Pufferaustausch mit unterschiedlicher KCl Konzentration. Links das gemittelte Intensitätsbild vor Zugabe und rechts nach Pufferaustausch. In der Mitte ist die mittlere Intensität aller gefundenen Vesikel über den Messzeitraum dargestellt mit einem Pufferaustausch bei ca. 60s.

Auch ist es wichtig, dass bei dem verwendeten liposomalen Assay die Zugabe von Volumen und Cytochrom-c keine Auswirkung auf die Fluoreszenzeigenschaften von Archon 1 hat. Hierzu werden liposomale Vesikel nur mit Archon1 beladen untersucht. Dazu wird in einer Messung, exemplarisch in Abbildung 6.4 zu sehen, nach Start der Messung Puffer mit gleichbleibender KCl Konzentration, Cytochrom c und Valinomycin gegeben. Keine der genannten Komponenten hat einen Effekt auf die Fluoreszenz der Sonde gezeigt. Bei der Zugabe von Valinomycin ist ein kurzer Anstieg der Fluoreszenzintensität zu sehen, der aber nach wenigen Sekunden wieder verschwindet. Hierbei wird jedoch nur eine sehr geringe Menge an Probe verwendet (1-2µl), was dazu führt, dass die Pipettenspitze in die Probenflüssigkeit eingetaucht werden musste und die Flüssigkeiten vermischt werden mussten. Andere Messungen zeigen beim Eintauchen der Spitze ein ähnliches kurzen Anstieg der Fluoreszenz. Jedoch ist dies nur ein kurzes temporäres Signal, welches die weiteren Intensitäten nicht beeinflusst.

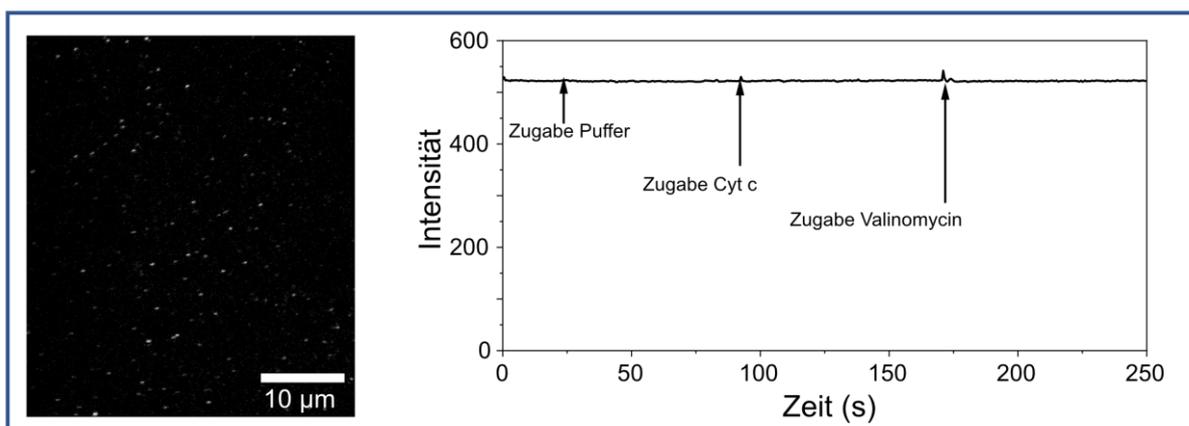


Abbildung 6.4: Untersuchung des Einflusses der zuzugebenden Komponenten des Assay auf die Fluoreszenz von Archon1. Das gemittelte Intensitätsbild ist gezeigt und die mittlere Intensität der lokalisierten Vesikel über den Messzeitraum von 250s (Bildrate von 100 ms/Bild). Die jeweiligen Zugaben von 100 µl Puffer, 50µl Cyt-c Lösung und 2 µl Valinomycin Lösung sind im Intensität/Zeit Diagramm eingezeichnet.

6.2 Untersuchung des Protonenpumpverhalten von CcO mittels Cytochrom-c im Membranspannung sensitiven liposomalen Assay

Mit den vorherigen Kontrollexperimenten wird nun der vollständige Assay angewendet. Hierzu werden für jede Untersuchung jeweils 3 Vesikel Lösungen bei pH 7.5 und 15mM KCl angesetzt und wie in Kapitel 3.5 beschrieben, behandelt. Hierzu werden im 10-fachen Überschuss zu den Vesikeln Archon1 gegeben. Ebenso wird in einem 1:1 Mengenverhältnis zu den Vesikeln CcO WT gegeben und mittels Biobeads in die Vesikel integriert. Dies geschieht, um eine möglichst geringe Anzahl von Oligomeren in den Vesikeln zu erzeugen, wie in Kapitel 5 beschrieben. Vor den Messungen wird jeweils 10nM Nigericin zu den Lösungen gegeben. Die fixierten Vesikel in Lösung werden nun im TIRFM untersucht bei einer Anregung von 633 nm mit 3 mW Leistung. Die fixierten Vesikel werden im TIRFM für ~150s aufgezeichnet, dann mit 20µM Cytochrom-c versetzt und die Fluoreszenz für weitere 250s aufgezeichnet. In Abbildung 6.5 ist exemplarisch eines der drei Experimente zu sehen. Hierbei zeigt sich eine Fluoreszenzerhöhung direkt nach Zugabe von Cytochrom-c. Diese Erhöhung sinkt leicht nach der initialen Erhöhung wieder ab. Durch die Zugabe von 100 nM Valinomycin wird ein Ausgleich der Kaliumkonzentration innerhalb und außerhalb erreicht. Dies führt auch in der Fluoreszenzintensität zu einem Absinken zum ursprünglichen Wert vor Zugabe von Cytochrom-c. Diese Messung zeigt, dass eine geringe Menge von Vesikeln sowohl mit Archon 1 als auch CcO beladen sind.

Nach dieser ersten Messung wird die Gesamtkonzentration von Vesikeln und respektiv der Proteine um den Faktor 10 erhöht, um eine verbesserte Abdeckung der gemessenen Oberfläche der Glasträger zu erreichen. Die relativen Verhältnisse der Proteine zu Vesikel sind dabei nicht verändert worden. Dies führte nach Anpassung der Inkubationszeit wie in Kapitel 3.5 beschrieben zu einer verbesserten Abdeckung der Glasträger. Es wurden im weiteren Proben untersucht die 80 bis 150 Vesikel in einem Sichtfenster zeigten, um eine statistische Untersuchung zu ermöglichen.

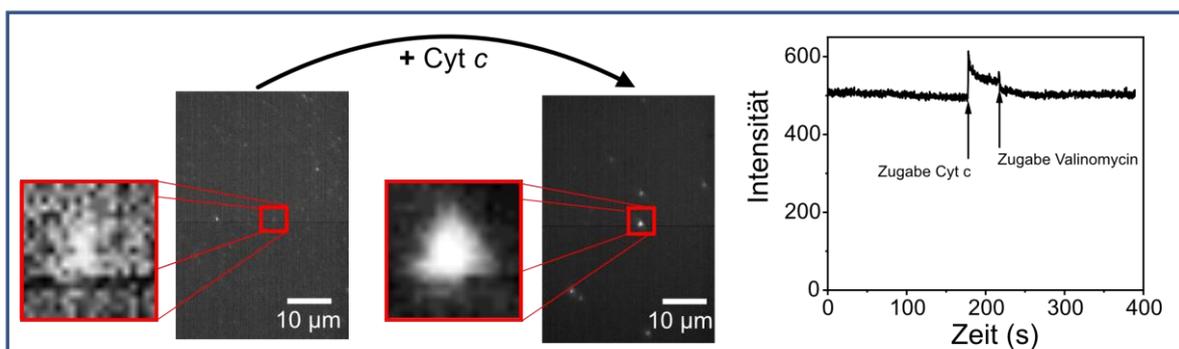


Abbildung 6.5: Untersuchung der Fluoreszenzintensitätsänderung des vollständigen Assays. Vesikel mit 1:1 CcO und 1:100 Archon1 beladen werden im TIRFM Aufbau bei einer Anregung von 633 nm untersucht. Der K^+/H^+ Antiporter Nigericin wird verwendet, um eine reine Membranspannung zu erzeugen.

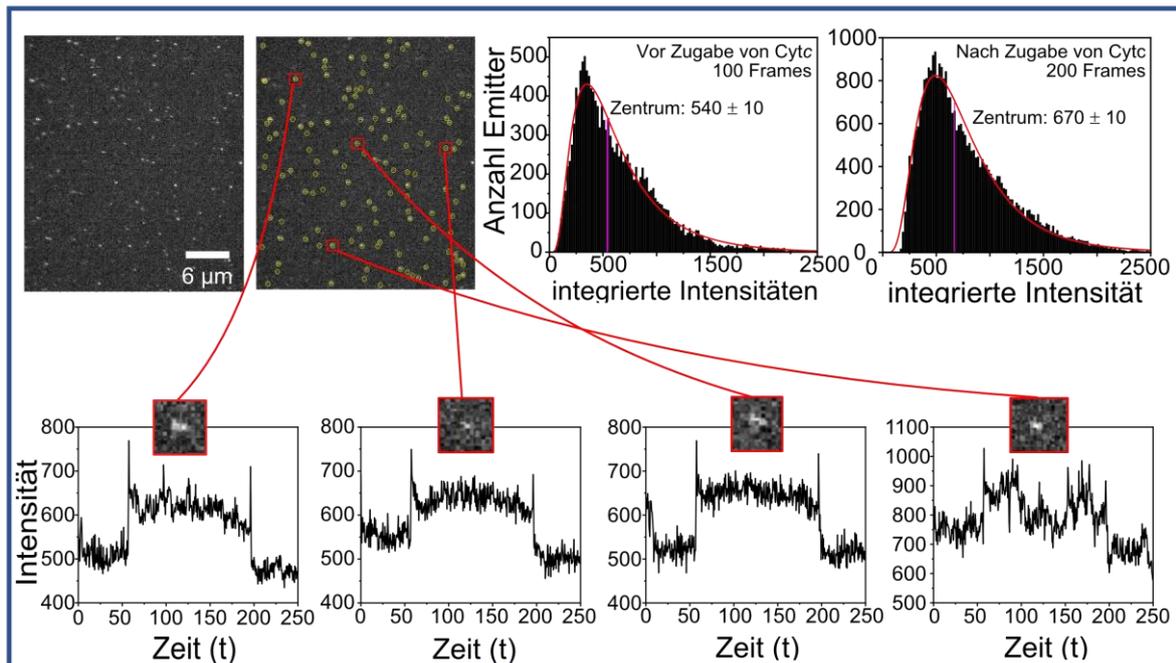


Abbildung 6.6: Auswertung des proteoliposomalen Assays. Die identifizierten fluoreszierenden Vesikel werden mittels dem Programm Localizer lokalisiert und deren integrierte Intensität pro Bild exemplarisch für 4 Emitter dargestellt. Eine statistische Auswertung der Emitter vor und nach Zugabe von Cyt-c mit einer Log Normal Funktion und dem bestimmten Zentrumswert ist dargestellt. Die Vesikel Lösung wird bei pH 7.5 mit einer Kaliumchlorid Konzentration von 15 mM verwendet.

In Abbildung 6.6 ist eine Auswertung der optimierten Experimente dargestellt. Hierbei sind die Fluoreszenzintensitäten von vier Vesikeln exemplarisch gezeigt. Alle identifizierten Vesikel zeigen nach Zugabe von Cytochrom-c bei ungefähr 65 Sekunden einen Anstieg der Fluoreszenz. Dieser ist in drei Vesikeln stabil, zeigt aber bei einem Vesikel ein häufiges Abfallen und wieder Ansteigen der Intensität. Dieses Vesikel kann somit die aufgebaute *pmf* nicht aufrechterhalten, was auf eine durchlässige Membranschicht zurückgeführt werden kann. Nach 200 Sekunden wird Gramicidin zugegeben und bei allen Vesikeln ist ein Abfall der Intensität auf den ursprünglichen Wert zu erkennen. Ebenso wird die Intensität aller Vesikel in allen zugehörigen Frames vor und nach Zugabe von Cytochrom-c als Histogramm der Häufigkeit dargestellt. Hierbei zeigt sich ein Zentrumswert der Log Normal Kurve vor Zugabe von Cytochrom-c bei 540 ± 10 und danach eine Intensität von 670 ± 10 . Die Anzahl der gefundenen Vesikel ist aufgrund der unterschiedlichen Zeit vor und nach Zugabe von Cytochrom-c nicht direkt vergleichbar, zeigt aber eine relative gleichbleibende Anzahl pro Bild.

Um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu unterschiedlichen Proben und zu der Referenzmessung aus Kapitel 4 zu erhalten, wird die mittlere Intensität der Vesikel pro Frame berechnet und für jede Messung eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Vesikel pro Frame ermittelt. Diese wird auf die durchschnittliche Intensität vor Zugabe von Cytochrom-c F_0 normiert dargestellt als F/F_0 . Hierbei stellt F_0 die Intensität bei einer anliegenden Membranspannung von 0 V dar, da ein Ausgleich aller Ionen zu diesem Zeitpunkt vorliegt.

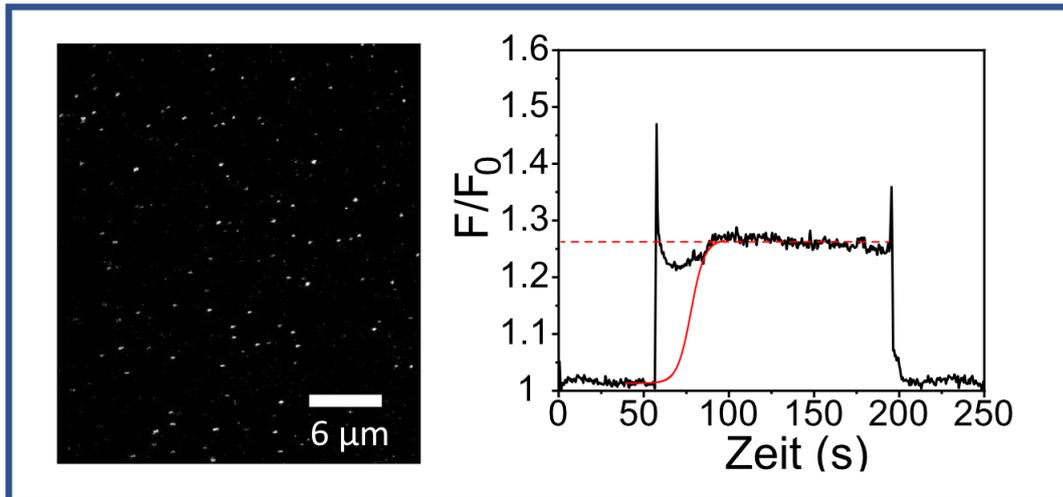


Abbildung 6.7: Auswertung des proteoliposomalen Assays als normierte Intensitätsänderung F/F_0 . Die identifizierten fluoreszierenden Vesikel werden mittels dem Programm Localizer lokalisiert und deren integrierte Intensität pro Bild gemittelt dargestellt.

In Abbildung 6.7 ist diese Auswertung exemplarisch dargestellt. Dabei wird bei allen Messungen auf eine nahezu gleichzeitige Gabe jeweils von Cytochrom-c und Gramicidin geachtet. Hierbei zeigt sich eine mittlere normierte Intensitätsänderung von $1,26 \pm 0,04$. Diese Auswertung wird für alle Messungen durchgeführt, um eine statistische Auswertung der Daten zu ermöglichen. Hierbei wird für die Intensitätsänderung eine mittlere Intensitätsänderung für Cytochrom-c-Oxidase WT von $1,25 \pm 0,03$ bestimmt.

Dieser Wert wird in Abbildung 6.8 mit der zuvor in Kapitel 4.4 gezeigten Eichkurve von Archon1 bei unterschiedlichen Kaliumchlorid Konzentrationen verglichen. Hierbei kann eine Membranspannungsänderung von $\Delta\Delta\Psi = 72 \pm 6 \text{ V}$ zugeordnet werden. Dieser Wert liegt leicht unter dem in Wert in Mitochondrien von lebenden Zellen von 100-140 mV (Ramzan 2010).

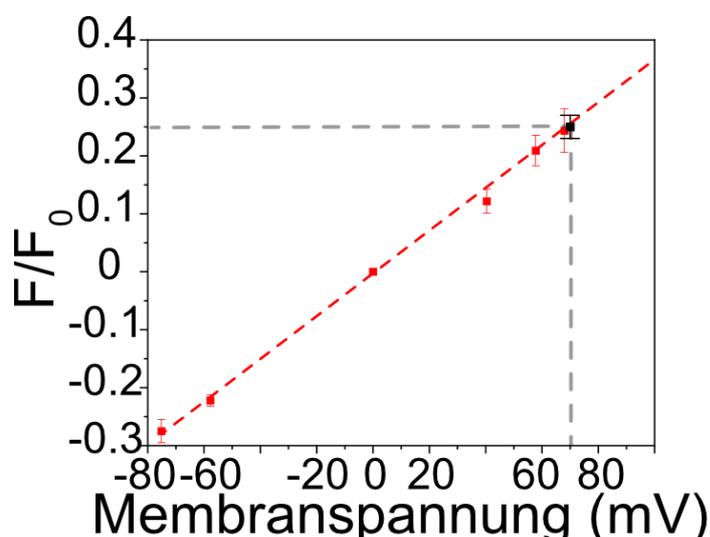


Abbildung 6.8: Bestimmung der anliegenden Membranspannung nach Zugabe von Cytochrom-c zu dem Vesikel Assay aus der Fluoreszenzintensitätsänderung aus Abbildung 6.6 mit der Kalibrierung aus Abbildung 4.28.

6.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Funktionalität des vollständigen liposomalen Assays untersucht. Hierzu werden Referenzmessungen durchgeführt, um die Auswirkungen der zugegebenen Komponenten auf das Fluoreszenz Verhalten von Archon 1 zu untersuchen. Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität, die im Assay berücksichtigt werden muss. Diese Robustheit des Signals ist von mir auch in Zellen untersucht worden (Silapetere 2022) und zeigt auch in dem isolierten Vesikel keine Anfälligkeit für die gewählten Messparameter. Gleichzeitig kann, wie auch in Kapitel 4 beschrieben, die Fluoreszenzintensität durch den Austausch der externen Kaliumionenkonzentration verändert werden. Dadurch kann auch in dem vollständig zusammengesetzten Assay Archon 1 als zuverlässiger Sensor verwendet werden.

Nach Zugabe aller Komponenten des Assays wird CcO durch die Zugabe von Cytochrom-c aktiviert. Die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals von Archon 1 durch die Änderung der Membranspannung erfolgt an der Grenze der Auflösung der gewählten Bildrate von 100 ms. Somit ist die zeitliche Verzögerung im vollständigen Assay nicht auf den Sensor, sondern auf das Aufbauen des Membranpotentials zurückzuführen. Das initiale Überschießen der Intensität geschieht aufgrund der Zugabe und kurzem Mischen der Vesikel Lösung mit Cytochrom-c. Hier könnte ein verbessertes Mischsystem ein besseres Signal liefern. Um eine Untersuchung der Kinetik des Aufbaues der Membranspannung zu ermöglichen, wird die Zeit mittels einer exponentiellen Aufbauzeit abgeschätzt. Hierbei wird ein Aufbauzeit von 4 ± 1 s bestimmt. Es ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der fehlenden Information am Beginn des Potentialsaufbaus hier nur eine grobe Abschätzung mit hohem Fehler gegeben werden kann. Unter der Annahme, dass das Vesikel eine Kugel ist, kann eine Menge von Kaliumionen mit $[K^+] = 15 \times 10^{-3}$ mol/l bzw. 5000 Kaliumionen pro Vesikel bestimmt werden. Aufgrund des Antiporters Nigericin werden Kaliumionen und Protonen ausgetauscht (Kömlödi, 2018) (Kömlödi and Tretter 2022), d.h. die Menge der gepumpten Protonen entspricht der Menge der Kaliumionen. Somit kann die Bestimmung der gepumpten Protonen direkt durch die Änderung des Nernst Potential aufgrund der Kaliumionenänderung berechnet werden (Zorova 2018),

$$\Delta\Delta\psi = \frac{RT}{F} \left(\ln \frac{[K^+]_{nach\ Cyt\ c, außen}}{[K^+]_{nach\ Cyt\ c, innen}} - \ln \frac{[K^+]_{vor\ Cyt\ c, außen}}{[K^+]_{vor\ Cyt\ c, innen}} \right) \quad (47)$$

Mit der Annahme, dass aufgrund des großen Volumens außerhalb der Vesikel (1 ml) die Konzentration der Ionen nahezu identisch bleibt ($[K^+]_{nach\ Cyt\ c, außen} \approx [K^+]_{vor\ Cyt\ c, außen}$) kann die Formel vereinfacht werden zu

$$\Delta\Delta\psi = \frac{RT}{F} \left(\ln \frac{[K^+]_{vor\ Cyt\ c, innen}}{[K^+]_{nach\ Cyt\ c, innen}} \right) \quad (48)$$

Die Berechnung liefert eine Änderung des Verhältnisses der Konzentration $\frac{[K^+]_{vor\ Cyt\ c, innen}}{[K^+]_{nach\ Cyt\ c, innen}}$ von Ionen von 14 ± 2 nach Zugabe von Cytochrom-c. Somit kann die durchschnittliche Pumpleistung auf 4600 ± 500 Ionen pro Vesikel bestimmt werden und entspricht somit den gepumpten Protonen. Durch die Berechnung der benötigten Zeit, um diese

Membranspannung aufzubauen kann eine initiale durchschnittliche Pump Rate von 1200 ± 300 Protonen pro Sekunde ermittelt werden. Dies entspricht aus der Literatur bekannten Werten für die Pumpleistung von CcO von 1000 Protonen pro Sekunde (Han 2006, Hugentobler 2020). Somit kann der Assay verwendet werden, um die Entwicklung der *pmf* zu untersuchen und Veränderung auf veränderte Pumpleistung der CcO zurückgeführt werden.

Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass in den letzten Jahren auch die Lipidzusammensetzung der Vesikel untersucht wurde (Hugentobler 2020), um die Effekte des Einbaus der CcO in liposomale Assays zu untersuchen. Hierbei wurde gezeigt, dass Phosphaatidylglycerol und Cardiolipin zu einem verbesserten Einbau der Proteine führte. Da in meiner Arbeit gerade ein Einzel Protein Assay erreicht werden sollte, war die Verwendung von Phospatidylcholin von Vorteil, auch wenn die mögliche gesamte Effizienz der Rekonstitution nicht optimal ist. Auch scheint die Verwendung von neutral geladenen Lipiden bei dem verwendeten pH keinen Einfluss auf die Pumpfähigkeit der CcO zu haben, wie es auch Studien zeigen, die negative geladenen Lipide aus den CcO haltigen Membranen entfernt haben (Zhang 2011, Zhang 2011). Dies ist in Einklang mit den aus meiner Arbeit bestimmten Pumpleistungen der CcO, die keinen Unterschied zu anderen Pumpleistungen zeigt.

Eine Veröffentlichung der Ergebnisse werden in einer Publikation in Kooperation mit Prof. Ville Kaila vorbereitet.

7. Resultate und Diskussion IV: Etablierung eines neuen Flashlaser-Aufbaus

Teil dieser Arbeit war der Aufbau eines neuen transienten Absorptionaufbaus. Dieser soll genutzt werden, um die Elektronen Aufnahme von CcO durch Cytochrom-c zu untersuchen. Hierzu sollen in weiteren Studien von Herrn Victor Loyo Cruz Varianten entwickelt werden, die Aufschlüsse über den Elektronentransport und mögliche Veränderungen durch gezielte Mutationen ermöglichen. Da jedoch die resultierende Absorptionsänderung von Häm a sehr klein ist (Alexiev 2000) und eine ausreichende Menge an Licht getriggertem Elektronen pro Messung zur Verfügung gestellt werden muss, war es Teil dieser Doktorarbeit den Aufbau dahingehend zu verbessern, dass eindeutige Erkenntnisse über die Elektronenaufnahme in den erstellten Varianten gewonnen werden können.

7.1 Überarbeitung des FLASH-Aufbaus und Kalibrierungsmessungen mit bR

Hierbei wurde das alte Anregungssystem, ein durch einen Excimerlaser gepumpten Farbstofflaser, durch ein Nd:YAG gepumpten OPO-System ersetzt. Dazu musste sowohl die elektronische Ansteuerung des Lasers als auch die Integration in die bereits bestehende Auswertungssoftware erreicht werden. Der finale Aufbau mit den verwendeten Teilen ist in Kapitel 3.10 bereits beschrieben. Im Einzelnen wurde eine Ansteuerung durch einen externen Pulsgenerator erreicht, wobei dieser ein konstantes 10 Hz Signal für die Blitzlampe des Nd:YAG-Lasers liefert und durch eine in die Messsoftware von mir integriertes Modul einen weiteren Q-switch-Signal sendet. Dieser ist zeitlich an den ersten Puls angepasst, um durch die Verzögerung zwischen Blitzlampenauslösung und Q-switch die Energie des Laserpulses zu steuern. Aufgrund des zeitlich variablen Pulses wird der Start der Messung nicht durch den Laser, sondern durch eine im Anregungsstrahlengang des Lasers eingebaute Photodiode erzielt. Diese startet die Messung des kurzen Zeitkanals durch ein Speicheroszilloskop und den langsameren Zeitkanal in der NI-Messkarte. Die Daten werden dann im Messprogramm zusammengeführt und dekadisch gemittelt. Hierbei musste das Zusammenspiel von Laserpuls und Auslösung der Messkarten optimal eingestellt werden. Dies wurde durch einen Zusatz in der Software erreicht, der eine variablen Verzögerung erlaubt. Des Weiteren muss eine Deckung beider Kanäle im überlappenden Zeitbereich erreicht und stets eingehalten werden. Hierzu erfolgt die Abstimmung beider Kanäle vor der Messung, die Kontrolle beider Spannungen im zeitlich überlappenden Bereich und eine nach der Messung erfolgende Überprüfung der Spannungswerte in beiden Kanälen, die in die Software von mir integriert wurde.

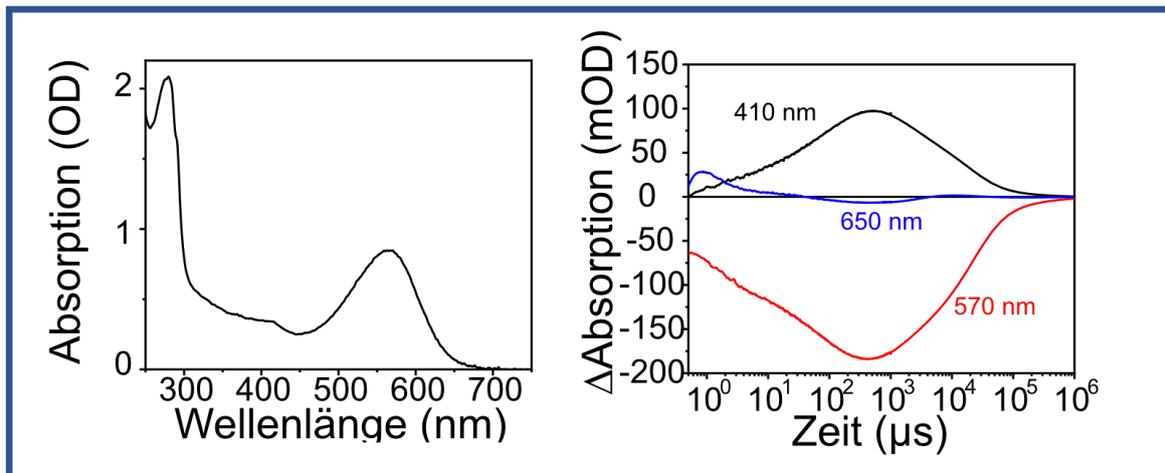


Abbildung 7.1: Referenzabsorptionsspektrum der im FLASH Aufbau verwendeten bR WT-Probe nach Aufreinigung. Die zeitlichen Absorptionsänderungen im neu konzipierten Aufbau bei den 3 charakteristischen Wellenlängen 410 (schwarz), 570 (rot) und 650 (blau) nm sind gezeigt. Der maximale Abfall bei 570 nm von 180 ± 2 mOD wird genutzt mit der Referenzabsorption bei 570 nm, um die anteilige Aktivierung von bR bei einer Anregung zu bestimmen.

Nach erfolgter Justage wurde bR als Referenzprotein genutzt, um den fertiggestellten Aufbau zu überprüfen. Hierzu wurden die Proben wie in Kapitel 3.3 beschreiben genutzt. Die Absorptionsänderung von 3 charakteristische Wellenlängen wurde untersucht. Hierbei werden die Änderung der Absorption bei 410, 570 und 650 nm untersucht. Hierbei zeigt die Änderung bei 410 nm den Aufbau und Abbau des M intermediates, 570 nm den Ab- und Aufbau des Grundzustandes und 650 nm die Entwicklung der O und K Intermediate. Da bR wie in Abbildung 7.1 gemessen ein Absorptionsmaximum bei 564 nm im Grundzustand besitzt und auch zur Aktivierung von bR, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, führt, wird der OPO des Flashaufbaus auf 590 nm eingestellt. Hierbei wird sichergestellt, dass bR aktiviert wird und gleichzeitig die Absorptionsänderung bei 570 nm untersucht werden kann, ohne eine Beschädigung des Detektors zu riskieren. Der Laserpuls hat eine zeitliche Breite von 3 ns und eine Pulsenergie von 60 mJ. Zusätzlich wird bei der Absorption bei 570 nm ein Bandpassfilter 550/49 (550/49, Chroma) vor dem Detektor verwendet, um den Durchschlag des Lasers zu reduzieren. Je untersuchter Wellenlänge werden 30 Messungen durchgeführt und als gemittelte Messung in Abbildung 7.1 dargestellt. Hierbei werden die Kinetik des M-Intermediates mittels 3 exponentieller Komponenten untersucht und mit Literaturwerten in Tabelle 7.1 verglichen.

Tabelle 7.1: Vergleich der 3 exponentiellen Zeitkonstanten bei 410 nm zum Auf- und Abbau des M-Intermediates des neuen Aufbaus und Literaturwerten.

	τ_1 in μs (rel. Amp in %)	τ_2 in μs (rel. Amp in %)	τ_3 in μs (rel. Amp in %)
bR-wt (Alexiev 2000)	1.2 (7)	41 (44)	138 (49)
bR-wt	1.14 ± 0.04 (11 ± 1)	49 ± 7 (37 ± 2)	120 ± 20 (52 ± 2)

Bei Betrachtung der maximalen Änderung der Absorption bei 570 nm von -180 ± 2 mOD und einer ursprünglichen Probenkonzentration von $40 \mu\text{M}$, bestimmt durch die Absorption bei 564 nm mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{564\text{nm}} = 63\,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, kann eine relative Aktivierung von $25 \pm 1 \%$ bR errechnet werden.

7.2 CcO Elektron-Transfer Messungen im Transient Absorptions Aufbau

Nach erfolgter Justage und Überprüfung mittels der bekannten Protein Probe bR, wird eine erste Testmessung zur Bestimmung des initialen Elektronensignals in CcO durchgeführt. Hierzu wird WT CcO verwendet. Zur Aktivierung und Bereitstellung wird ein Rutheniumkomplex (Ruthenium (2,2'-bi-pyridine) 2) 2quarterpyridin, Ru₂D) verwendet, welcher von C. Bamann synthetisiert wurde (Kirchberg 2012). $10 \mu\text{M}$ CcO WT wird vor den Flash Messungen mit $25 \mu\text{M}$ Ru₂D, 10 mM Anilin (als Elektronendonator für Ruthenium) und 1 mM 3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy (3CP, gegen eine Übersäuerung durch die Protonenabgabe durch Anilin (Belevich 2007)) in 50 mM KCl pH 7.5 versetzt. Die Absorbanz Änderung bei 605 nm wird aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Pulsenergie von 80 mJ. Die in Abbildung 7.2 gezeigte Absorptionsänderung wird mittels einer zweifachen exponentiellen Funktion angepasst. Hierbei sind die ermittelten Zeitkonstanten $\tau_1 = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 16 \pm 4 \mu\text{s}$.

Eine Wiederholung der Experimente mit einem Rutheniumkomplex, der auf dem freien Markt zu Verfügung stand, lieferte kein ausreichendes Elektronensignal, trotz ihrer in der Literatur bestätigten Funktion als Elektronendonator (Pannwitz and Wenger 2016).

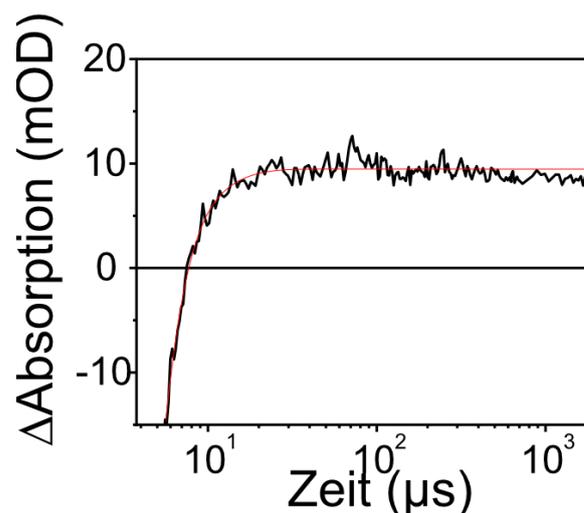


Abbildung 7.2: Zeitliche Absorptionsänderung bei 605 nm des Elektronensignals von CcO nach Aktivierung von Ru₂D bei 490 nm. In rot ist der exponentielle Fit mit 2 Populationen gezeigt. Zeitkonstanten $\tau_1 = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 16 \pm 4 \mu\text{s}$ Die angegebenen Fehler sind die ermittelte Standardabweichung.

7.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wird die Verbesserung des ursprünglichen in der Gruppe existierenden FLASH Aufbaus beschrieben und Referenzmessungen mit bR und CcO WT durchgeführt. Hierbei wurde der Aufbau durch eine neue Anregungsquelle und den daraus resultierenden elektronischen Elementen und Softwareimplementierungen in den bestehenden Aufbau integriert. Mittels einer aufgereinigten bR Probe wurde die Justage und verbesserte Leistung untersucht. Hierbei zeigten die bestimmten Zeitkonstanten des M-Intermediates $1.14 \pm 0.04 \mu\text{s}$ ($11 \pm 1 \%$ Amplitude), $49 \pm 7 \mu\text{s}$ ($37 \pm 2 \%$ Amplitude), und $120 \pm 20 \mu\text{s}$ ($52 \pm 2 \%$ Amplitude) im Rahmen des Fehlers die gleichen Werte wie in der Literatur (Alexiev 2000). Die Untersuchung aufgrund der Reduzierung der Absorption bei 570 nm lieferte eine relative Aktivierungsmenge von bR von $25 \pm 1 \%$. Messungen, die vor dem Umbau mit bR in dem Flash Aufbau durchgeführt wurden, zeigten eine maximale Anregungsanteil von 12% (Alexiev 1995). Somit konnte aufgrund der neuen Anregungsquelle mehr als eine Verdopplung der Anregung erreicht werden.

Um ein ausführlicheres Bild der Aktivierung von CcO zu erreichen war es ein Teil der Arbeit den nun verbesserten Flash Aufbau zu nutzen, um das Elektronensignal zu untersuchen. Hierbei wird durch die Abgabe des Elektronendonors das Elektron an Cu_A zuerst übertragen und danach in einem zweiten Schritt an Häm a (Tan 2004). Um die Injektion des Elektrons durch eine Aktivierung zu erreichen, wird anstatt der Cytochrom-c ein Rutheniumkomplex als Elektronendonor verwendet (Kirchberg 2012). Hierbei können zwei Zeitkonstanten identifiziert werden $\tau_1 = 1,4 \pm 0,2 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 16 \pm 4 \mu\text{s}$. Diese sind im Rahmen des Fehlers ähnlich zu den Literaturwerten von $1.5 \pm 0,1 \mu\text{s}$ und $\tau_2 = 13.2 \pm 0,7 \mu\text{s}$. Jedoch weisen sie aufgrund des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses einen hohen Fehler auf. Ebenso ist aufgrund der Komplexität der Messungen und der verwendeten Chemikalien (Anilin und C3P) sehr schwierig die Proben vorzubereiten und kleinere Änderungen erzeugten bereits schnell eine starke Reduzierung des Signals. Ebenso zeigten weitere Messungen, dass ein Austausch des Ru_2D Komplexes zu kaufbaren Alternativen unter den ursprünglichen Bedingungen kein verwertbares Signal zeigt. Das verwendete Ru_2D konnte ebenso im Zuge dieser Arbeit nicht neu synthetisiert werden. Weiterführende Arbeiten müssen durchgeführt werden, um mit dem neuen Rutheniumkomplex verbesserte Signale im Flash Aufbau zu erhalten. Trotzdem konnte in diesem Kapitel durch die Verbesserung des Aufbaus gezeigt werden, dass eine Messung der Elektronenbewegung zu Cu_A und Häm a in CcO möglich ist und durch Mutagenese Experimente genauere Zusammenhänge der Elektrostatik erreicht werden können. Ebenso konnte der Aufbau bereits in anderen Publikationsthemen erfolgreich genutzt werden (Nagano 2022).

8. Resultate und Diskussion V: Anwendung des Proteoliposom-Assays zur Untersuchung des Protonentransfers

Nach der Untersuchung der Funktionalität des proteoliposomalen Assays in Kapitel 6 werden in diesem Kapitel einige Punktmutationen an der CcO mittels des entwickelten Assays untersucht. Ebenso wird die Einwirkung eines möglichen Inhibitors, Doxorubicin, auf das Pumpverhalten der CcO untersucht. Hierbei wird die Elektronenaufnahme mittels etablierter Methoden untersucht (Wolf 2020) und dann mit dem neu entwickelten proteoliposomalen Assay verglichen. Durch die Untersuchung mittels beider Techniken können Aussagen zu den Einwirkungen auf den anfänglichen Zyklus mit der Elektronen Aufnahme und oder spätere Auswirkungen auf das Pumpverhalten der CcO aufgrund von z.B. funktionalen Varianten oder Inhibitoren getroffen werden. Somit kann dies zu einem besseren Verständnis der Kopplung der einzelnen enzymatischen Schritte und der Identifizierung von Protonenwegen genutzt werden.

8.1 Untersuchung des Pumpverhaltens von Mutationen auf den N- und P-Seiten

Die untersuchten Varianten wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Victor Manuel Loyo Cruz entwickelt und hergestellt. Die einzelnen Mutationen sind in Kapitel 3.1 aufgezeigt und dargestellt. Hierbei werden Mutationen auf der N-Seite in der Nähe des Einganges des K Kanals und der einer möglichen Ausgangsseite der Protonen auf der P Seite untersucht.

Die Aktivität der Varianten sind wie in Wolf 2020 beschrieben aufgrund ihrer Elektronenaufnahme durch Cytochrom-c untersucht worden. Hierbei wird die zeitliche Veränderung der Absorption von Cytochrom-c nach Zugabe von CcO bei 530 nm aufgezeichnet. Die erste Ordnung der Veränderung der Absorption wird genutzt um aus der bestimmten Steigung ΔA die Aktivität nach

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta A}{d \varepsilon_{Cyt\ c} c_{CcO}} \quad (49)$$

zu bestimmen (Wolf 2020). Hierbei ist $d = 0.3\text{ cm}$ die Schichtdicke der gewählten Küvette und $\varepsilon_{Cyt\ c} = 18.7\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ der Absorptionskoeffizient von Cytochrom-c und c_{CcO} die gewählte Konzentration von CcO. Die Veränderung der Absorption von Cytochrom-c vor und nach Zugabe von WT CcO ist in Abbildung 8.1 exemplarisch zu sehen. Ebenso die zeitliche Veränderung der Absorption im gewählten Messzeitraum von 400 s mit einer Abtastrate von 0.5s. Aus der initialen Steigung wird eine Aktivität für WT CcO von $530 \pm 30\text{ s}^{-1}$ bestimmt. Hierzu wird der Aktivitätstest pro Probe dreifach wiederholt.

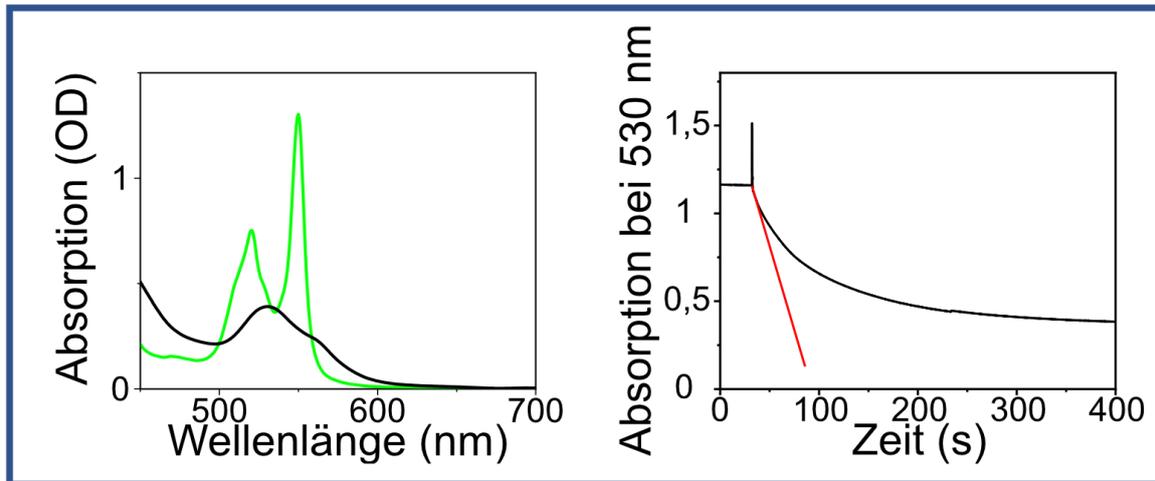


Abbildung 8.1: Absorption von Cytochrom-c im reduzierten (grünen) und oxidierten (schwarz) Zustand nach Abgabe des Elektrons an CcO. Die zeitliche Absorptionsänderung bei 530 nm nach Zugabe von CcO wird in der ersten Näherung (roter Fit) genutzt, um die initiale Aktivitätsrate der CcO zu bestimmen.

Der bestimmte Wert für WT CcO ist im Rahmen des Fehlers identisch mit zuvor bestimmten Aktivitäten von CcO (Wolf 2020). Die in dieser Arbeit untersuchten Varianten der CcO werden nach demselben Protokoll untersucht und die Aktivität bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten der Varianten sind in Abbildung 8.2 zusammengefasst. Die in der Abbildung gezeigten Aktivitäten werden weiterhin normiert verglichen. Hierbei ist die Aktivität von WT als 100% normiert. Hierbei zeigt die Variante P301C, mit einer Veränderung auf der P Seite in der Nähe des K Kanaleingangs, eine gleiche Aktivität im Fehlerintervall. Die Mutationen an der N Seite zeigen eine eindeutige Abweichung der Aktivität im Vergleich zum WT. Hierbei ist die Mutation an der Position D156 zu Cystein (D156C) stark reduziert zu $63 \pm 4\%$, eine Mutation zu Asparagin (D156N) jedoch stark erhöht mit $280 \pm 20\%$. Ebenso die Mutation an der Position 259 von Alanin zu Cystein zeigt eine Reduzierung der Aktivität zu $70 \pm 5\%$.

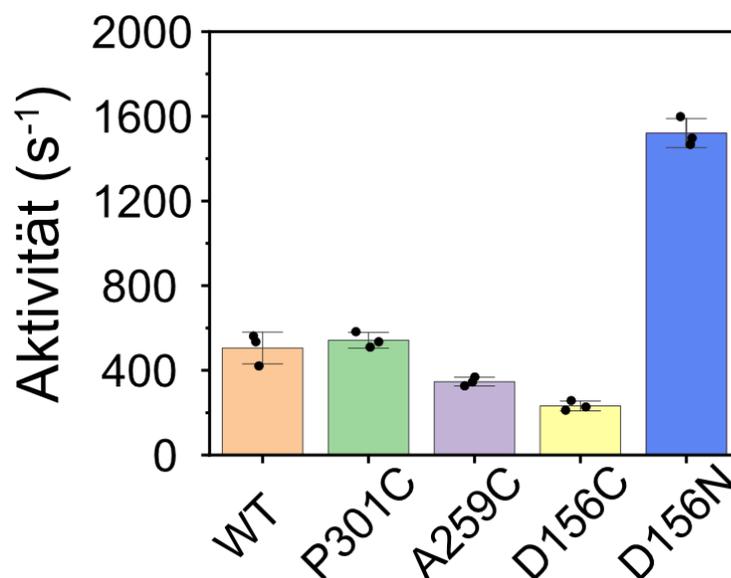


Abbildung 8.2: Die Aktivitätsraten von CcO WT und ausgewählten Varianten sind mittels der in (Wolf 2020) benutzten Methode bestimmt worden. Die unabhängigen Einzelmessungen sind als Punkte dargestellt und die daraus resultierende mittleren Werte als Balkendiagramm mit der Standardabweichung als Fehler.

Diese Varianten werden in dem neu entwickelten liposomalen Assay nun benutzt, um deren Eigenschaft zur Erzeugung der *pmf* zu untersuchen. Die Herstellung der Proben erfolgt analog zu Kapitel 6, um eine Vergleichbarkeit mit der WT-Probe zu ermöglichen. Auch hier werden jeweils 3 Proben verwendet zur Bestimmung der Membranspannung. Die zeitliche Änderung der normierten Intensitäten, wie sie bereits für WT in Abbildung 6.6 gezeigt sind, sind für die Varianten in Abbildung 8.3 gezeigt.

Bis auf den Assay der Variante D156C zeigen alle Assays eine ähnliche Änderung der Fluoreszenzintensität. Nach Zugabe von Cytochrom-c kommt es zu einem initialen starken Anstieg der Änderung der Fluoreszenz, die sich bei den Mutationen P301C und A259C auf einem konstanten Wert stabilisiert. Bei der Mutation D156N zeigt sich eine langsame Abnahme des Signals über die Zeit. Nach Zugabe von Valinomycin fällt die Veränderung wieder vollständig ab. Der Assay mit D156C zeigt über den gesamten Zeitraum keine Veränderung der Intensität.

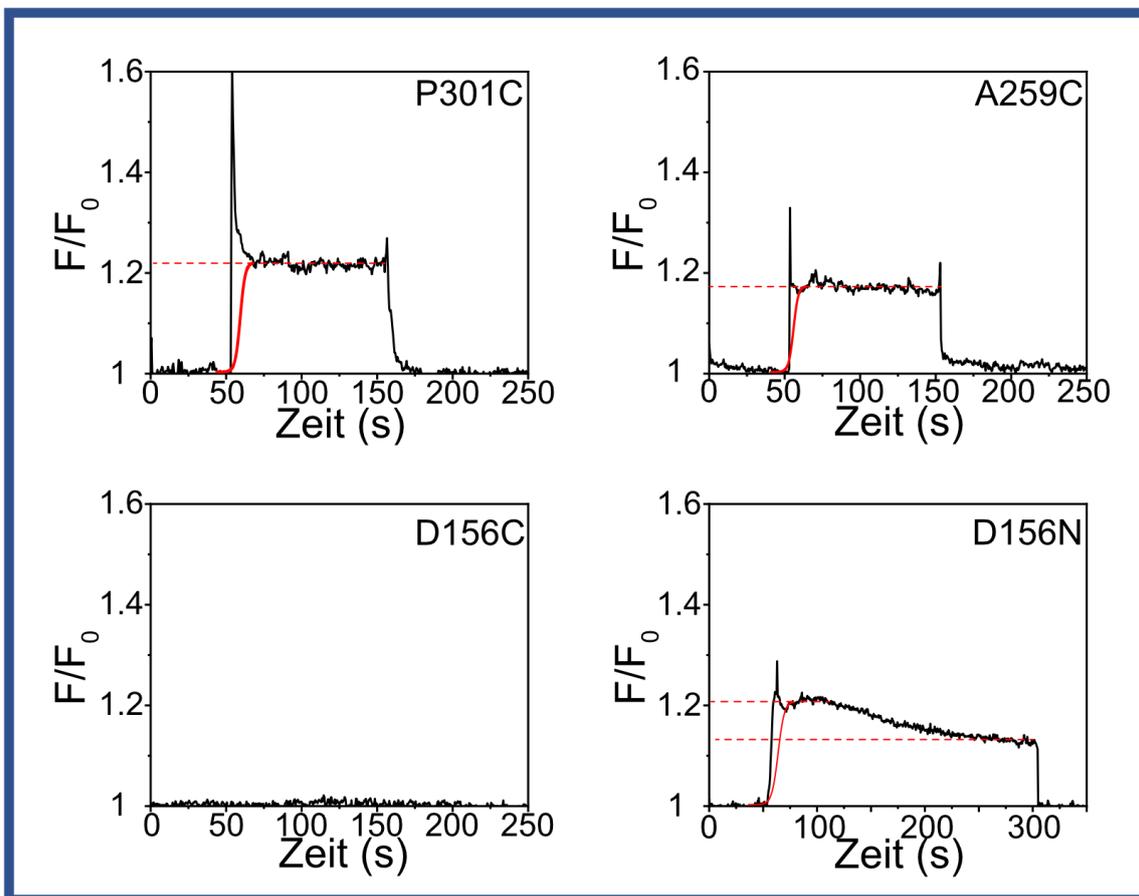


Abbildung 8.3: Auswertung des proteoliposomalen Assays als normierte Intensitätsänderung F/F_0 . Die identifizierten fluoreszierenden Vesikel werden mittels dem Programm Localizer lokalisiert und deren integrierte Intensität pro Bild gemittelt dargestellt analog, wie in Kapitel 6 beschrieben für den WT. Es sind die Traces für jede Variante exemplarisch gezeigt.

Die aus der Veränderung der Fluoreszenzintensität bestimmten Membranspannungsänderungen sind in Tabelle 8.1 zusammengefasst. Hierbei wird der Mittelwert der Änderung der Fluoreszenzänderung während der aufgebauten Membranspannung $\overline{F/F_0}$ errechnet. Ebenso wird die Kalibrierung aus Abbildung 6.4 verwendet, um die Membranspannungsänderung darzustellen. Bei der Variante D156N wird der Wert direkt nach Zugabe von Cytochrom-c und kurz vor dem Spannungsausgleich angegeben.

Tabelle 8.1: Mittelwerte der Änderung der Fluoreszenzänderung während der aufgebauten Membranspannung $\overline{F/F_0}$ und mittels der Kalibrierung aus Abbildung 6.4 bestimmte Membranspannungsänderung $\Delta\Delta\Psi$ für die untersuchten CcO Varianten im Assay.

Variante	WT	P301C	A259C	D156C	D156N Anfang	D156N Ende
$\overline{F/F_0}$	1,25 ± 0,03	1,22 ± 0,02	1,17 ± 0,02	1,000 ± 0,006	1,21 ± 0,02	1,12 ± 0,02
$\Delta\Delta\Psi$ (mV)	72 ± 6	64 ± 5	50 ± 5	0 ± 2	61 ± 5	37 ± 3

8.2 Das Pumpverhalten von Cytochrom-c-Oxidase in Gegenwart eines Inhibitors

Teil dieser Arbeit ist die Untersuchung, ob der Assay auch dazu verwendet werden kann, Inhibitoren der membranspannungserzeugenden Proteine zu identifizieren und zu untersuchen. Hierbei wurde als möglicher Inhibitor ein Krebsmedikament, Doxorubicin (DOX) gewählt. Es wird zur Bekämpfung von hämatologischen und festen Tumoren in der Klinik angewendet (Damiani 2016, Murabito 2020). Hierbei zeigt leider das Medikament eine dosisabhängige Schädigung der Mitochondrien in der Herzmuskulatur (Renu 2018). Die genaue Wirkung auf die Mitochondrien ist bisher nicht ausreichend geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass eine Interaktion mit der Atmungskette wahrscheinlich ist, da eine Reduktion der Membranspannung und der ATP Produktion erfolgt und eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezien (ROS) (Maleki 2022) beobachtet wurde. Die erhöhte Produktion von ROS bei Zugabe von DOX zu Zellen konnte ich durch meinen entwickelten FLIM-ROX Assay selbst bestätigen (Balke 2018).

Da DOX ein fluoreszierender Wirkstoff ist, habe ich zuerst die Fluoreszenzlebenszeit im FLIM untersucht. Aufgrund des Absorptionsspektrums von DOX, gezeigt in Abbildung 8.4, wird eine Anregungswellenlänge von 530 nm und ein Langpass Emissionsfilter bei 545 nm gewählt. Die FLIM-Aufnahmezeit wurde auf 2 Minuten eingestellt. Danach wurde zu der 1 μ M DOX-Probe 1 μ M CcO WT hinzugegeben und die Lebenszeitmessung wiederholt. Die beiden Fluoreszenzzerfallskurven sind in Abbildung 8.4 dargestellt. Hierbei reduzierte sich die mittlere Lebenszeit von 1.61 ± 0.05 auf 1.42 ± 0.03 ps nach Zugabe von CcO. Dies weist auf eine mögliche Interaktion von DOX mit CcO hin.

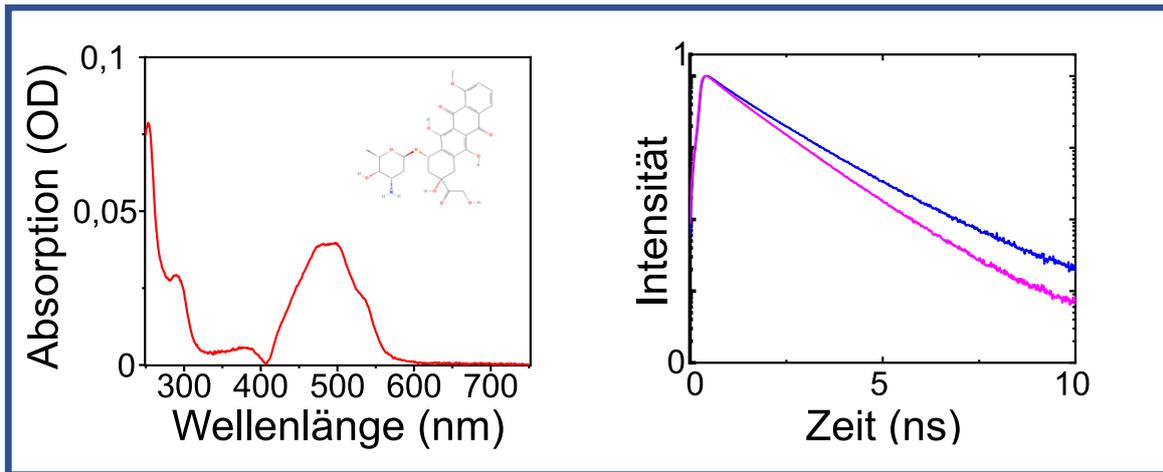


Abbildung 8.4: Absorption von DOX und dessen chemische Formel mit Absorptionsmaximum bei 496 nm in Tris pH 7.5 50 mM NaCl. Fluoreszenzlebenszeitmessung mit 1 μM DOX ohne (Blau) und mit Zugabe von 1 μM CcO (Magenta) im FLIM mit einer Laseranregung von 530 nm.

Zur Untersuchung der möglichen Auswirkung auf CcO wird der bereits in Kapitel 8.1 beschriebene Aktivitätstest erweitert. Hierzu wird zu 50 μM Cytochrom-c in verschiedenen Konzentrationen DOX hinzugegeben und danach in gleicher Weise der Test durch die Zugabe von 5nM CcO WT gestartet. Die dabei bestimmten Aktivitäten sind als relative Aktivitäten (WT ohne DOX normiert zu 100%) angegeben. Es zeigt sich eine dosisabhängige Reduzierung der Aktivität, die bei ca. 55% Aktivität ein Minimum erreicht mit einer exponentiellen Halbwerts Konzentration bei $\sim 78\%$ Aktivität von 60 ± 10 nM. Es zeigt sich, dass nach genügend Zeit ($\sim 300\text{s}$) derselbe finale Absorptionswert mit und ohne DOX einstellt und somit die gleiche Menge an Cytochrom-c reduziert wird.

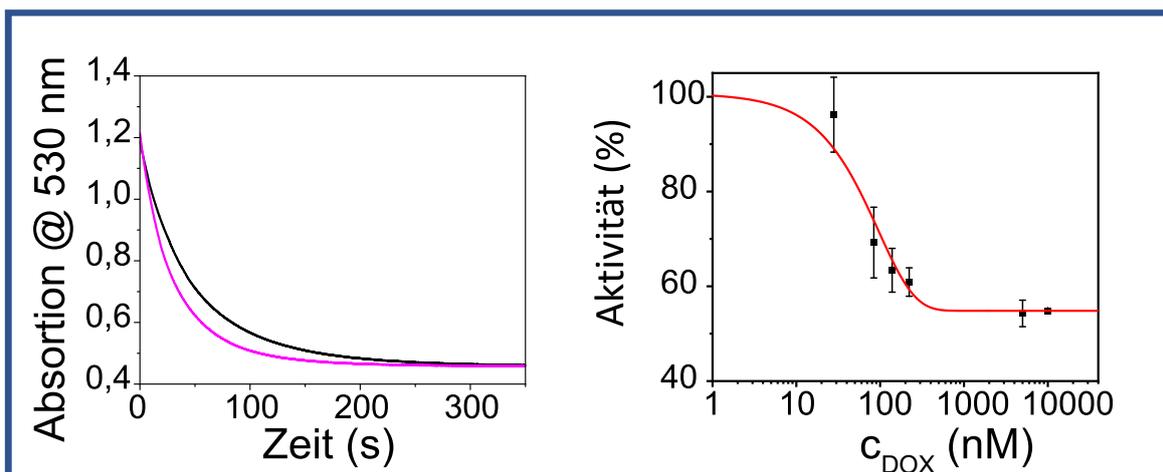


Abbildung 8.5: Die zeitliche Absorptionsänderung bei 530 nm nach Zugabe von CcO wird in der ersten Näherung genutzt, um die initiale Aktivitätsrate der CcO zu bestimmen. Die Änderung wird für 30 μM und 300 μM DOX gezeigt. Die bestimmten Aktivitäten bei unterschiedlicher DOX-Konzentration sind aufgezeigt. Ein Sigmoidaler Fit (rot) mit einer Halbwerts Konzentration bei $\sim 78\%$ Aktivität von 60 ± 10 nM ist eingezeichnet. Die Messbedingungen waren in Tris pH 7.5 50 mM NaCl bei 20°C.

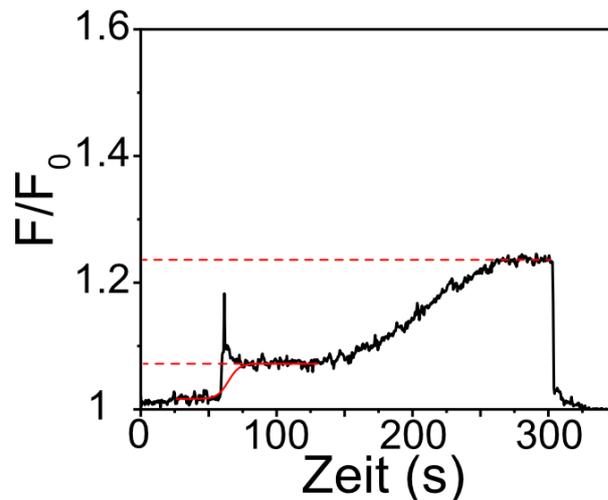


Abbildung 8.6: Auswertung des proteoliposomalen Assays als normierte Intensitätsänderung F/F_0 . Die identifizierten fluoreszierenden Vesikel werden mittels dem Programm Localizer lokalisiert und deren integrierte Intensität pro Bild gemittelt dargestellt analog, wie in Kapitel 6 beschrieben für den WT. Zusätzlich sind in diesem Experiment 100 nM DOX in die Vesikel Lösung geben.

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Änderung der Membranspannung bei Zugabe von DOX wird der in Kapitel 6 entwickelte liposomale Assay verwendet. Hierzu wird zu der Vesikel Lösung 100 nM DOX hinzugegeben. Der restliche Aufbau des proteoliposomalen Assays wird so durchgeführt, wie in Kapitel 6 beschrieben. Hierbei zeigt sich nach Zugabe von Cytochrom-c ein Anstieg der Fluoreszenz wie in Abbildung 8.6 zu sehen ist. Jedoch steigt die relative Intensität F/F_0 zuerst auf $1,07 \pm 0,02$. Erst nach einer längeren Zeit von über 200 Sekunden erreicht die Intensität einen maximalen Wert von $1,24 \pm 0,02$, um dann nach Zugabe von Valinomycin wieder auf F_0 abzusinken. Der finale Wert entspricht dem zuvor bestimmten Wert von CcO WT ohne Zugabe von DOX.

8.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Anwendbarkeit des proteoliposomalen Assays zur Untersuchung der Änderung der Membranspannung von Varianten der CcO und eines Inhibitors untersucht. Hierbei konnten die Varianten P310C, A259C, D156C und D156N untersucht werden. Hierbei handelte es sich um Punktmutationen. Die P301C wurde bereits in eigenen Publikationen der Arbeitsgruppe (Wolf 2020) verwendet. Diese Position wurde aufgrund der Nähe zum Eingang des K-Kanals gewählt, ohne dabei durch die Mutation eine Änderung der Funktion der CcO hervorzurufen. Dieser Aminosäureaustausch erlaubt die Bindung von fluoreszenten Reportergruppen zur Untersuchung am K-Kanal und dessen näherer Umgebung. Da hier sowohl der Aktivitätstest als auch der proteoliposomale Assay keine Änderung im Vergleich zu dem WT zeigt, bestätigt dies die Wahl der Position als Reporterposition. Die Aufnahme des Elektrons durch Cytochrom-c zeigt keine Reduzierung der *Turn Over Rate* des Proteins, als auch eine dem WT gleichen Aufbau einer Membranspannungsänderung von $\Delta\Delta\Psi_{P301C} = 64 \pm 5$ mV. Die Mutation der Position 259 an der P-Seite der CcO zeigt ein etwas anderes Bild. Hierbei reduziert sich die Aktivität zu 70 ± 5 %. Das kann durch die veränderte Oberflächenladung und

daher eingehende Änderung des Bindungsverhalten von CcO und Cytochrom-c erklärt werden. Es gibt Hinweise, dass die kurzzeitige Interaktion von beiden Proteinen durch eine geringe Oberflächenladungsdifferenz ermöglicht wird (Shimada 2017). Durch den Austausch einer neutralen Aminosäure hin zu einer polaren Aminosäure, kann dies das Oberflächenpotential beeinflussen und somit eine Auswirkung auf die Bindungskinetik der beiden Proteine haben. Werden hierzu die Ergebnisse des liposomalen Assays betrachtet, die eine geringfügige Unterschied der Membranspannungsänderung von $\Delta\Delta\Psi_{A259C} = 50 \pm 5$ mV zum WT ergab und somit eine leichte Reduzierung der pmf zeigt, unterstützt das diese Überlegung. Es ist bekannt, dass Oberflächenmutationen an der P-Seite der CcO zu Problemen in der Proteinfaltung führen (Tsukihara 1996). Dass jedoch auch P-Seiten Mutationen einen direkten Einfluss auf die Aktivität und die pmf Erzeugung haben, ist bis jetzt nicht hinreichend erforscht. Ob die Mutation an Position 259 aufgrund einer falschen Faltung, einer reduzierten Interaktion mit Cytochrom-c oder der Möglichkeit der Protonen die CcO zu verlassen die Aktivität und die pmf Erzeugung reduziert, kann nicht abschließend geklärt werden. Da aber eine reduzierte Aktivität weiterhin besteht, ist die Behinderung der Bindung von Cytochrom-c am wahrscheinlichsten, da die Mutation näher zu CuA und somit der Cytochrom-c Interaktion Stelle liegt, als postulierte Protonen Ausgänge via der Propionate der Häm Moleküle. Ursprüngliche Ideen diese Stelle in weiterführenden Experimenten als Reporter Ankerposition zu verwenden, wurden aufgrund dieser Erkenntnisse verworfen.

Eine weitere Mutationsstelle an der Position D156 wurde untersucht. Hierbei war bereits bekannt, dass eine Mutation zu Asparagin an dieser Position im Loop 3-4 auf der P-Seite der CcO Aktivitätsmessungen eine starke Erhöhung zeigten (Witt 1998) bis zu einer Aktivität von 1000 s^{-1} in Abhängigkeit der anliegenden Ionenkonzentration. Da der Loop 3-4 im Vergleich zu Strukturdaten anderer Organismen, z.B. der bovinen CcO (pdb Eintrag 2OCC, (Yoshikawa 1998)) andere Sekundärstrukturen besitzt, ist es überraschend, dass an dieser Position eine Punktmutation von Aspartat zu Asparagin zu solch einer drastischen Anstieg der Aktivität führt. Eigene Aktivitätsmessungen in dieser Arbeit zeigen sogar eine Turn Over Rate von $1400 \pm 200 \text{ s}^{-1}$. Es wurde postuliert, dass diese Mutation die Interaktion mit Cytochrom-c signifikant erhöht, aufgrund der Veränderung der Oberflächenladungsdichte. Interessanterweise zeigt der proteoliposomale Assay eine gleiche initiale Membranspannungsänderung von $\Delta\Delta\Psi_{D156N}$, Anfang = 61 ± 5 mV und ist somit nicht erhöht im Vergleich zu WT. Jedoch zeigt die Variante eine stetige Reduzierung der Membranspannung auf $\Delta\Delta\Psi_{D156N, \text{Ende}} = 37 \pm 3$ mV und bleibt dann konstant. Dies spricht für einen spannungsabhängige Protonenrückfluss durch die CcO. Dies weist aber auch auf eine Interaktion mit der Protonenpumpfunktion von CcO und nicht nur eine mögliche Interaktionsänderung mit Cytochrom-c hin. Eine weitere Mutation zu Cystein (D156C) wurde durchgeführt, da ein Austausch der Asparaginsäure durch Cystein in einem Protein zu drastischeren Unterschieden führt. Zusätzlich zu der Umwandlung einer negativen zu einer ungeladenen polaren Aminosäure, kann Cystein Disulfidbrücken eingehen und die Größe der Aminosäure ist ebenfalls reduziert. Bei den durchgeführten Experimenten ist die Turn Over Aktivität dabei reduziert zu 63 ± 4 % des WTs, was dafür spricht dass nicht nur die Oberflächenladungsverteilung eine Rolle spielt. Bei der Untersuchung mittels des liposomalen Assays wird dies noch eindeutiger, da kein pmf generiert wird. Hierbei scheint eine basale Turn Over Rate durch eine Elektronenaufnahme zu erfolgen, aber das gerichtete Pumpen von

Protonen durch diese P-Seiten Mutation unterbunden zu sein. Hier zeigt sich, dass eine Untersuchung der Turn Over Rate und der Untersuchung des *pmfs* zusammen wichtig sind.

Des Weiteren wurde ein möglicher Inhibitor der CcO, das Krebsmedikament Doxorubicin, untersucht, um die Anwendbarkeit des Assays zu untersuchen. Hierbei ist bekannt, dass bei stärkeren Dosen eine Schädigung der Mitochondrien auftritt (Renu 2018), was ich auch mit meinen Assay zur ROS Untersuchung nachweisen konnte (Balke 2018). Da Doxorubicin fluoresziert, kann es mittels FLIM untersucht werden. Hierbei konnte aufgrund der Veränderung der Fluoreszenzlebenszeit eine Interaktion mit CcO festgestellt werden. Durch die Untersuchung der Turn Over Rate in Abhängigkeit von der DOX-Konzentration scheint ein kompetitiver Mechanismus der Oxidation von Cytochrom-c vorzuliegen. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass Porphyrin mit DOX kompetitiv als Antagonist agieren (Kurokawa and Matsui 2021). Da Cytochrom-c ein Porphyrin Ringsystem nutzt für die Übertragung der Elektronen an CcO, unterstützen diese Experimente meine Hypothese. Ebenso zeigt der proteoliposomale Assay ein ähnliches antagonistisches Verhalten. Zu Beginn des Assays wird ein schwächere Membranspannung $\Delta\Delta\Psi_{\text{DOX, Anfang}} = 19 \pm 1 \text{ mV}$ erzeugt, die erst nach einiger Zeit einen ähnlichen Wert des WTs mit $\Delta\Delta\Psi_{\text{DOX, End}} = 66 \pm 2 \text{ mV}$ erreicht. Somit wird anscheinend die Geschwindigkeit des Aufbaus der Membranspannung stark reduziert, jedoch schlussendlich die gleiche *pmf* erreicht. Geschieht dies in einem so fein abgestimmten System wie der innere Atmung der Zellen in Mitochondrien, kann dies schnell zu einer Erhöhung von schädigenden Spezies wie ROS führen bis hin zum Zelltod (Maleki 2022), ohne dass dabei direkte Reaktionen mit der CcO und der restlichen Atmungskette stattfinden.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Anwendung von Membranproteinen als fluoreszierende Membranspannungssensoren zur Quantifizierung des Membranpotentials der Cytochrom-c-Oxidase. Hierbei wurden membranspannungssensitive Varianten des Proteins Archon1 und Archon2 bei 584 ± 1 nm, für Quasar1 bei 580 ± 1 nm und für Quasar2 bei 588 ± 1 nm. Matrix Scans der Emission erlaubten die Anregungsmaxima für Archon1 bei 582 ± 1 nm, und Archon2 bei 578 ± 2 nm, für Quasar1 bei 578 ± 1 nm, für Quasar2 bei 585 ± 2 nm zu bestimmen. Die Änderung der Anregungsspektren aufgrund der Proteinumgebung kann durch erhöhten lateralen Druck der Membran erklärt werden (Fulford and Peel 1980). Die fluoreszierenden Raten sind vergleichbar mit anderen schwach fluoreszierenden Proteinen (Prangma 2020). Archon 1 wurde weiterführend untersucht und zwei Varianten, T100S und D125N, charakterisiert um Aufschluss über den zugrunde liegenden Mechanismus aus Kopplung der Fluoreszenz und der Spannungssensitivität zu erhalten. Hierbei zeigt die Variante T100S durch die eingefügte Hydroxymethyl Seitengruppe eine Erhöhung ihrer Spannungssensitivität. Ebenso zeigte die Variante D125N diese verbesserte Spannungssensitivität. Die bestimmen anregungsabhängigen FQA werden durch MD-Simulationen in (Silapetere 2022) unterstützt, die eine unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitätserhöhung bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Membranspannungsbereichen vorhersagen. Untersuchung in *E. coli* und in Vesikeln zeigten, dass eine Änderung der Fluoreszenzintensität, aber keine Änderung der zeitlichen Fluoreszenzzerfälle entsteht. Die Messung der Absorption bei unterschiedlichen Membranspannungen zeigt keine Änderung. Das deutet auf einen Mechanismus der Fluoreszenzlöschung der den Grundzustand der fluoreszenten Spezies beeinflusst (Alexiev and Farrns 2014) hin. Hierbei scheint durch eine Änderung der Struktur der Varianten ein Grundzustand Komplex, der nicht fluoreszent ist, gebildet zu werden, durch eine räumliche Annäherung von benachbarten Tryptophanresten. Der photoinduzierte Elektronentransfer erfolgt zwischen dem angeregten Singlet Zustand des Chromophoren und dem Grundzustand S_0 von Trp. Nach diesem Elektronentransfer wird im Radikal Ionenpaar $\text{Trp}^{+\bullet}$, $\text{Chromophor}^{-\bullet}$ eine umgekehrte Elektronenabgabe an das Trp durchgeführt. Hierbei könnten weitere Studien von weiteren Varianten Aufschluss liefern, ob diese Hypothese des Mechanismus auf einen generellen Mechanismus in Spannungssensoren mit Retinal hindeutet. Die Hypothese, wurde mit einem Modelprotein, BSA, gefestigt. Auch in diesem Modellsystem zeigt sich keine Änderung der Fluoreszenzlebenszeit in Abhängigkeit der Trp Konzentration. Bei der Bestimmung der Elektronentransferrate k_{ET} nach (Mansoor 2002) mit $155 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ zeigt sich eine effiziente Elektronentransferrate, die bis zu 30 Mal höher ist, als Transferraten zwischen organischen Farbstoffen und Trp (Mansoor 2002). Die Fluoreszenzlöschungsrate von $F_0/F_{15\text{mM Trp}}=1.6$ ist in guter Übereinstimmung mit der bestimmten Fluoreszenzlöschungsrate von Archon1 in *E. coli* Zellen bei einer Membranspannungsänderung zwischen 0 und -140mV von $F_{0\text{mV}}/F_{-140\text{mV}}=1.45$.

Nach erfolgreichem Einbau und Charakterisierung des spannungsabhängigen Reporterproteins wurde die Entwicklung eines Einzelmolekül Assays zur Untersuchung der Funktionalität von CcO und des Protonentransfers mittels an CcO oberflächen-gekoppelter pH Indikatoren in nativ-naher Umgebung untersucht. Im ersten Schritt wurden an die CcO Oberfläche gekoppelte fluoreszierende pH Indikatormoleküle genutzt, um den Einbau in Proteoliposome zu untersuchen. Zuerst wurde die Ausrichtung der in die Proteoliposomen eingebrachten CcO bestimmt. Die meisten CcO Moleküle sind mit der Bindungsstelle für Cytochrom-c nach innen gerichtet (60-65% inside out). Diese Ergebnisse sind konträr zu Untersuchungen in Quinol Oxidase bo_3 (70% right side out) (Berg 2017) und der aa_3 -CcO aus *Rhodobacter sphaeroides* (80% right side out) (Salomonsson 2005). Die Abweichung kann auf die unterschiedlichen CcO Varianten und die Art der Bestimmung der Orientierung zurückgeführt werden. Ebenso hat die Komposition der verwendeten Lipide in den Proteoliposomen einen starken Einfluss auf den Einbau der CcO in die Membran (Hugentobler 2020). Um die Anzahl und die vorherrschende Konfiguration der Proteine genauer zu untersuchen, wurde als Teil der Arbeit ein TIRFM Aufbau um eine alternierende Laseranregung zur FRET-Bestimmung erweitert. Hierbei zeigte sich ein 1:1 Verhältnis zwischen Proteoliposome und CcO als Anteil mit den geringsten Protein Dimer Bildung und wurde in der weiteren Messung verwendet. Somit ist eine absolute Reduzierung des Konzentrationsverhältnisses nicht von Vorteil bei Untersuchungen, die nur eine CcO pro Vesikel benötigen. Warum eine erhöhte Dimerisierung bei geringer Konzentration stattfindet, konnte nicht abschließend geklärt werden. Bei den anderen Verhältnissen ist eine reduzierte Stöchiometrie zu sehen, die Interaktionen von mehr als einem einfachen Donor Akzeptor Paar aufzeigt (Hoppe 2002). Jedoch zeigt sich bei einem 1:1 Verhältnis die höchste Zahl an einzelnen Akzeptor und Donor Molekülen. Es ist aus der Literatur bekannt, dass CcO in der dimeren Form inaktiv ist und erst als Monomer aktiv ist (Ramzan 2019, Shinzawa-Itoh and Muramoto 2021), weswegen dieses Verhältnis für weitere Messungen gewählt wurde.

Nach dem erfolgreichen Einbau beider Hauptkomponenten des liposomalen Assays wird der Assay auf CcO WT und Varianten (P301C, A259C, D156C und D156N) angewendet. Hierbei konnte eine Änderung der Fluoreszenz nach Aktivierung gezeigt werden und anhand der Kalibrierungskurve die Änderung der Membranspannung quantifiziert werden. Die durchschnittliche Pumpleistung von WT konnte auf 4600 ± 500 Protonen pro Vesikel bestimmt werden mit einer durchschnittliche Pump Rate von 1200 ± 300 Protonen pro Sekunde. Dies entspricht aus der Literatur bekannten Werten von 1000 Protonen pro Sekunde (Han 2006, Hugentobler 2020). Daraufhin wurde das Pumpverhalten der Varianten untersucht. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Verhalten in den bestimmten Turn Over Raten und der erzeugten *pmf*. Die Mutationen an den Stellen 259 und 156 zeigen eine Änderung im Vergleich zum WT. Hierbei konnte argumentiert werden, dass dies nicht nur durch die Änderung der Oberflächenladung das Bindungsverhalten mit Cytochrom-c beeinflusst wird, sondern auch noch andere Mechanismen existieren. Ob die Mutation an Position 259 aufgrund einer falschen Faltung, einer reduzierten Interaktion mit Cytochrom-c oder der Möglichkeit der Protonen die CcO zu verlassen die Aktivität und die *pmf* Erzeugung reduziert, kann nicht abschließend geklärt werden. Da aber eine reduzierte Aktivität weiterhin besteht, ist die Behinderung der Bindung von Cytochrom-c am wahrscheinlichsten, da die Mutation näher zu dem CuA und somit der Cytochrom-c Interaktionsstelle liegt. Gerade bei der Mutation von D156C zeigen

sich unerwartete Auswirkungen auf die Entwicklung der *pmf*. Obwohl die Mutationsstelle in einem Loop zwischen zwei Membranhelices (3 und 4) liegt, wird der Protonentransport dadurch beeinflusst. Da der Loop im Vergleich zu Strukturdaten anderer Organismen, z.B. der bovinen CcO (pdb Eintrag 2OCC, (Yoshikawa 1998)) eine andere Sekundärstruktur besitzt, ist es überraschend, dass an dieser Position eine Punktmutation von Aspartat zu Asparagin zu solch einer drastischen Anstieg der Aktivität führt. Der proteoliposomale Assay zeigt eine initiale Membranspannungsänderung von $\Delta\Delta\Psi_{D156N, \text{Anfang}} = 61 \pm 5 \text{ mV}$ und ist somit nicht erhöht im Vergleich zu WT. Jedoch zeigt die Variante eine stetige Reduzierung der Membranspannung während der Messungen auf $\Delta\Delta\Psi_{D156N, \text{Ende}} = 37 \pm 3 \text{ mV}$ und bleibt dann erst konstant. Dies spricht für einen spannungsabhängigen Protonenrückfluss durch die CcO. Dies weist aber auch auf eine Interaktion mit der Protonenpumpfunktion von CcO und nicht nur eine mögliche Interaktionsänderung zu Cytochrom-c hin. Eine weitere Mutation zu Cystein (D156C) wurde durchgeführt, da ein Austausch der Asparaginsäure durch Cystein in einem Protein zu drastischen Unterschieden führt. Zusätzlich zu der Umwandlung einer negativen zu einer ungeladenen polaren Aminosäure, kann Cystein Disulfidbrücken eingehen und die Größe der Aminosäure ist ebenfalls reduziert. Bei den durchgeführten Experimenten ist die Turn Over Aktivität dabei reduziert zu $63 \pm 4 \%$ des WTs, was dafür spricht das nicht nur die Oberflächenladungsverteilung eine Rolle spielt. Bei der Untersuchung mittels des liposomalen Assays wird dies noch eindeutiger, da kein *pmf* generiert wird. Hierbei scheint eine basale Turn Over Rate durch die Elektronenaufnahme zu erfolgen, aber das gerichtete Pumpen der CcO durch diese P-Seiten Mutation unterbunden zu sein. Weitere Mutationen in dieser Region bzw. Untersuchungen eines möglichen Protonenausganges würden weiterführende Erklärungen ermöglichen. Auch die genauere Untersuchung der Elektronenaufnahme und die Bindung des Elektrons an CuA und Häm a wäre von Vorteil. Hierzu wurde als Teil dieser Arbeit ein neuer FLASH Aufbau realisiert. Aufgrund der sehr schwachen Absorptionsänderung, hervorgerufen durch die Elektronenaufnahme von CuA und Häm a, konnte in ersten Experimenten gezeigt werden, dass ein solches Signal aufgelöst werden kann. Jedoch war es nicht mehr möglich im Rahmen dieser Arbeit die lichtgesteuerte Elektronenübergabe an CcO so weit zu optimieren, dass die mit frei verfügbaren Elektronendonoren realisierbar war. Weiterführende Arbeiten müssen durchgeführt werden, um mit dem neuen Rutheniumkomplex verbesserte Signale im Flash Aufbau zu erhalten.

Zuletzt wurde die Anwendbarkeit des Assays zur Untersuchung möglicher Inhibitoren der CcO untersucht. Hierbei wurde das Medikament Doxorubicin verwendet, welches als Krebsmedikament in höheren Dosen schwere Schäden an Mitochondrien verursacht. Ich konnte hierbei die kompetitive Interaktion zwischen DOX und Cytochrom-c zu CcO nachweisen und somit einen Hinweis auf die erhöhte Produktion von ROS-Populationen in den beschädigten Zellen erhalten. Zu Beginn des Assays wird ein schwächere Membranspannung $\Delta\Delta\Psi_{DOX, \text{Anfang}} = 19 \pm 1 \text{ mV}$ erzeugt, die erst nach einiger Zeit einen ähnlichen Wert des WTs mit $\Delta\Delta\Psi_{DOX, \text{End}} = 66 \pm 2 \text{ mV}$ erreicht. Somit wird scheinbar die Geschwindigkeit des Aufbaus der Membranspannung stark reduziert, jedoch schlussendlich die gleiche *pmf* erreicht. Geschieht dies in einem so fein abgestimmten System wie der inneren Atmung der Zellen in Mitochondrien, kann dies schnell zu einer Erhöhung von schädigenden Spezies wie ROS führen

bis hin zum Zelltod (Maleki 2022), ohne dass dabei direkte Reaktionen mit der CcO und der restlichen Atmungskette stattfinden.

Somit kann der in dieser Arbeit etablierte Assay genutzt werden, um die Pumpfähigkeit verschiedener CcO Varianten zu untersuchen, um weitere Einblicke in die noch nicht vollständig aufgedeckten Mechanismen der CcO zu untersuchen. Des Weiteren kann der Assay in abgewandelter Form genutzt werden, um andere Membranproteine zu untersuchen, die durch den Transport von Ladungsträgern eine Änderung der Membranspannung erzeugen. Dies wird durch den eigenständigen Membranspannungssensitiven Reporter Archon 1 ermöglicht, der in dieser Arbeit dafür charakterisiert wurde.

10. Referenzen

- Alexiev, U. and D. L. Farrens (2014). "Fluorescence spectroscopy of rhodopsins: Insights and approaches." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1837**(5): 694-709.
- Alexiev, U., et al. (2000). "Evidence for Long Range Allosteric Interactions between the Extracellular and Cytoplasmic Parts of Bacteriorhodopsin from the Mutant R82A and Its Second Site Revertant R82A/G231C*." Journal of Biological Chemistry **275**(18): 13431-13440.
- Alexiev, U., et al. (1995). "Rapid long-range proton diffusion along the surface of the purple membrane and delayed proton transfer into the bulk." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(2): 372-376.
- Alexiev, U., et al. (2003). "Elucidation of the nature of the conformational changes of the EF-interhelical loop in bacteriorhodopsin and of the helix VIII on the cytoplasmic surface of bovine rhodopsin: a time-resolved fluorescence depolarization study." Journal of Molecular Biology **328**(3): 705-719.
- Alexiev, U., et al. (2017). "Time-resolved fluorescence microscopy (FLIM) as an analytical tool in skin nanomedicine." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **116**: 111-124.
- Balke, J., et al. (2018). "Visualizing Oxidative Cellular Stress Induced by Nanoparticles in the Subcytotoxic Range Using Fluorescence Lifetime Imaging." Small **14**(23): 1800310.
- Beales, P. A., et al. (2017). "Durable vesicles for reconstitution of membrane proteins in biotechnology." Biochem Soc Trans **45**(1): 15-26.
- Beijerinck, M. and D. Minkman (1910). "Bildung und verbrauch von stickoxydul durch bakterien." Zentbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, Hygiene, Abt. II **25**: 30-63.
- Belatik, A., et al. (2012). "Binding sites of retinol and retinoic acid with serum albumins." Eur J Med Chem **48**: 114-123.
- Belevich, I., et al. (2007). "Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(8): 2685-2690.
- Berg, J., et al. (2017). "Single Proteoliposomes with E. coli Quinol Oxidase: Proton Pumping without Transmembrane Leaks." Isreal Journal of Chemistry **57**(5): 437-445.
- Berg, J. M., et al. (2018). Die oxidative Phosphorylierung. Stryer Biochemie. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 613-660.
- Berthold, P., et al. (2008). "Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in Chlamydomonas by Immediate Light-Induced Depolarization." The Plant Cell **20**(6): 1665-1677.
- Boreham, A., et al. (2017). "Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy for Characterization of Dendritic Polymer Nanoparticles and Applications in Nanomedicine." Molecules **22**(1): 17.
- Brischigliaro, M., et al. (2021). "Modelling of BCS1L-related human mitochondrial disease in Drosophila melanogaster." J Mol Med (Berl) **99**(10): 1471-1485.
- Brodwolf, R., et al. (2020). "Faster, sharper, more precise: Automated Cluster-FLIM in preclinical testing directly identifies the intracellular fate of theranostics in live cells and tissue." Theranostics **10**(14): 6322-6336.
- Broser, M., et al. (2020). "NeoR, a near-infrared absorbing rhodopsin." Nature Communications **11**(1): 5682.
- Brzezinski, P. and R. B. Gennis (2008). "Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries." J Bioenerg Biomembr **40**(5): 521-531.

Burstein, E. A. and V. I. Emelyanenko (1996). "Log-Normal Description of Fluorescence Spectra of Organic Fluorophores." Photochemistry and Photobiology **64**(2): 316-320.

Chanda, B., et al. (2005). "A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons." Nature Neuroscience **8**(11): 1619-1626.

Clegg, R. M. (1992). Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. Methods in Enzymology, Academic Press. **211**: 353-388.

Damiani, R. M., et al. (2016). "Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone." Archives of Toxicology **90**(9): 2063-2076.

Dedecker, P., et al. (2012). "Localizer: fast, accurate, open-source, and modular software package for superresolution microscopy." J Biomed Opt **17**(12): 126008.

dos Remedios, C. G., et al. (1987). "Fluorescence resonance energy transfer measurements of distances in actin and myosin. A critical evaluation." J Muscle Res Cell Motil **8**(2): 97-117.

Fakhree, M. A. A., et al. (2019). "Shaping membranes with disordered proteins." Archives of Biochemistry and Biophysics **677**: 108163.

Fornuskova, D., et al. (2010). "Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b." Biochem J **428**(3): 363-374.

Forster, T. (1946). "Energiewanderung und Fluoreszenz." Naturwissenschaften **33**(6): 166-175.

Fritsche, O. (2015). Leben ist konzentriert und verpackt. Biologie für Einsteiger: Prinzipien des Lebens verstehen. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 21-40.

Fulford, A. J. C. and W. E. Peel (1980). "Lateral pressures in biomembranes estimated from the dynamics of fluorescent probes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **598**(2): 237-246.

Gao, S., et al. (2018). "Retinal-chitosan Conjugates Effectively Deliver Active Chromophores to Retinal Photoreceptor Cells in Blind Mice and Dogs." Molecular Pharmacology **93**(5): 438-452.

Genova, M. L. and G. Lenaz (2014). "Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 427-443.

Gómez-Consarnau, L., et al. (2010). "Proteorhodopsin Phototrophy Promotes Survival of Marine Bacteria during Starvation." PLOS Biology **8**(4): e1000358.

Han, D., et al. (2006). "Replacing Asn207 by Aspartate at the Neck of the D Channel in the aa3-Type Cytochrome c Oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* Results in Decoupling the Proton Pump." Biochemistry **45**(47): 14064-14074.

Hellenkamp, B., et al. (2018). "Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements—a multi-laboratory benchmark study." Nature methods **15**(9): 669-676.

Hochbaum, D. R., et al. (2014). "All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins." Nature methods **11**(8): 825-833.

Hohlbein, J., et al. (2014). "Alternating-laser excitation: single-molecule FRET and beyond." Chemical Society Reviews **43**(4): 1156-1171.

Hoppe, A., et al. (2002). "Fluorescence resonance energy transfer-based stoichiometry in living cells." Biophysical Journal **83**(6): 3652-3664.

Hugentobler, K. G., et al. (2020). "Lipid Composition Affects the Efficiency in the Functional Reconstitution of the Cytochrome c Oxidase." International Journal of Molecular Sciences **21**(19).

Hugentobler, K. G., et al. (2020). "Lipid Composition Affects the Efficiency in the Functional Reconstitution of the Cytochrome c Oxidase." International Journal of Molecular Sciences **21**(19): 6981.

Iwata, S., et al. (1995). "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Nature **376**(6542): 660-669.

Katsu, T., et al. (1986). "Mode of action of gramicidin S on Escherichia coli membrane." Biochim Biophys Acta **860**(3): 608-619.

Kelkar, D. A. and A. Chattopadhyay (2007). "The gramicidin ion channel: A model membrane protein." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1768**(9): 2011-2025.

Khorana, H. G., et al. (1979). "Amino acid sequence of bacteriorhodopsin." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(10): 5046-5050.

Kirchberg, K., et al. (2012). "Net proton uptake is preceded by multiple proton transfer steps upon electron injection into cytochrome c oxidase." J Biol Chem **287**(11): 8187-8193.

Kirchberg, K., et al. (2013). "Exploring the entrance of proton pathways in cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans: surface charge, buffer capacity and redox-dependent polarity changes at the internal surface." Biochim Biophys Acta **1827**(3): 276-284.

Koepke, J., et al. (2009). "High resolution crystal structure of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1787**(6): 635-645.

Komlódi, T. and L. Tretter (2022). "The protonmotive force—not merely membrane potential." Bioenergetics communications **16**.

Konstantinov, A. A., et al. (1997). "The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(17): 9085-9090.

Kouyama, T., et al. (2014). "Structure of archaerhodopsin-2 at 1.8 Å resolution." Acta Crystallographica Section D **70**(10): 2692-2701.

Kralj, J. M., et al. (2011). "Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin." Nature methods **9**(1): 90-95.

Krebs, M. P. and H. G. Khorana (1993). "Mechanism of light-dependent proton translocation by bacteriorhodopsin." J Bacteriol **175**(6): 1555-1560.

Kurokawa, H. and H. Matsui (2021). "The Cytotoxicity of Doxorubicin Can Be Accelerated by a Combination of Hyperthermia and 5-Aminolevulinic Acid." Antioxidants (Basel) **10**(10).

Lewis, G. N., et al. (1941). "Reversible Photochemical Processes in Rigid Media. A Study of the Phosphorescent State." Journal of the American Chemical Society **63**(11): 3005-3018.

Li, M., et al. (2015). "Single Enzyme Experiments Reveal a Long-Lifetime Proton Leak State in a Heme-Copper Oxidase." J Am Chem Soc **137**(51): 16055-16063.

Lozier, R. H., et al. (1975). "Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in Halobacterium Halobium." Biophys J **15**(9): 955-962.

Maclaurin, D., et al. (2013). "Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5939-5944.

Maclaurin, D., et al. (2013). "Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(15): 5939-5944.

Majumdar, Z. K., et al. (2005). "Measurements of Internal Distance Changes of the 30S Ribosome Using FRET with Multiple Donor–Acceptor Pairs: Quantitative Spectroscopic Methods." Journal of Molecular Biology **351**(5): 1123-1145.

Maleki, F., et al. (2022). "Mitotherapy in doxorubicin induced cardiotoxicity: A promising strategy to reduce the complications of treatment." Life Sciences **304**: 120701.

Mansoor, S. E., et al. (2002). "Mapping Proximity within Proteins Using Fluorescence Spectroscopy. A Study of T4 Lysozyme Showing That Tryptophan Residues Quench Bimane Fluorescence." Biochemistry **41**(8): 2475-2484.

Marmé, N., et al. (2003). "Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan." Bioconjugate Chemistry **14**(6): 1133-1139.

Mattiroli, F., et al. (2018). "FRET-based Stoichiometry Measurements of Protein Complexes in vitro." Bio Protoc **7**(3).

Mclsaac, R. S., et al. (2014). "Directed evolution of a far-red fluorescent rhodopsin." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(36): 13034-13039.

Mclsaac, R. S., et al. (2014). "Synthetic biology tools for programming gene expression without nutritional perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*." Nucleic Acids Res **42**(6): e48.

Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.

Murabito, A., et al. (2020). "Mechanisms of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Is Mitochondrial Dysfunction the Answer?" Frontiers in Cardiovascular Medicine **7**.

Nagano, S., et al. (2022). "Improved fluorescent phytochromes for in situ imaging." Scientific Reports **12**(1): 5587.

Nicoletti, F., et al. (1998). "Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: a kinetic study on the two- and four-subunit complexes." Biochim Biophys Acta **1365**(3): 393-403.

Ober, K., et al. (2019). "Expanding the Scope of Reporting Nanoparticles: Sensing of Lipid Phase Transitions and Nanoviscosities in Lipid Membranes." Langmuir **35**(35): 11422-11434.

Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius (1971). "Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*." Nature New Biology **233**(39): 149-152.

Olson, F., et al. (1979). "Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes." Biochim Biophys Acta **557**(1): 9-23.

Pannwitz, A. and O. S. Wenger (2016). "Proton coupled electron transfer from the excited state of a ruthenium(ii) pyridylimidazole complex." Physical Chemistry Chemical Physics **18**(16): 11374-11382.

Pebay-Peyroula, E., et al. (1997). "X-ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from Microcrystals Grown in Lipidic Cubic Phases." Science **277**(5332): 1676-1681.

Penzkofer, A., et al. (2019). "Photocycle Dynamics of the Archaerhodopsin 3 Based Fluorescent Voltage Sensor QuasAr1." International Journal of Molecular Sciences **21**(1).

Piatkevich, K. D., et al. (2018). "A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters." Nat Chem Biol **14**(4): 352-360.

Prangma, J. C., et al. (2020). "Quantitative Determination of Dark Chromophore Population Explains the Apparent Low Quantum Yield of Red Fluorescent Proteins." The Journal of Physical Chemistry B **124**(8): 1383-1391.

Preus, S., et al. (2015). "iSMS: single-molecule FRET microscopy software." Nature methods **12**(7): 593-594.

Ramzan, R., et al. (2019). "Reversible dimerization of cytochrome c oxidase regulates mitochondrial respiration." Mitochondrion **49**: 149-155.

Ramzan, R., et al. (2010). "Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1797**(9): 1672-1680.

Renu, K., et al. (2018). "Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update." European Journal of Pharmacology **818**: 241-253.

Salomonsson, L., et al. (2005). "The timing of proton migration in membrane-reconstituted cytochrome c oxidase." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(49): 17624-17629.

Schmid, S., et al. (2016). "Single-Molecule Analysis beyond Dwell Times: Demonstration and Assessment in and out of Equilibrium." Biophysical Journal **111**(7): 1375-1384.

Schubert, L., et al. (2022). "Protein conformational changes and protonation dynamics probed by a single shot using quantum-cascade-laser-based IR spectroscopy." The Journal of Chemical Physics **156**(20).

Shimada, S., et al. (2017). "Complex structure of cytochrome c-cytochrome c oxidase reveals a novel protein-protein interaction mode." Embo j **36**(3): 291-300.

Shinzawa-Itoh, K. and K. Muramoto (2021). "Biochemical and crystallographic studies of monomeric and dimeric bovine cytochrome c oxidase." Biophys Physicobiol **18**: 186-195.

Siegel, M. S. and E. Y. Isacoff (1997). "A genetically encoded optical probe of membrane voltage." Neuron **19**(4): 735-741.

Silapetere, A., et al. (2022). "QuasAr Odyssey: the origin of fluorescence and its voltage sensitivity in microbial rhodopsins." Nature Communications **13**(1): 5501.

St-Pierre, F., et al. (2015). "Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators." Curr Opin Chem Biol **27**: 31-38.

Tan, M.-L., et al. (2004). "Dynamics of Electron Transfer Pathways in Cytochrome c Oxidase." Biophysical Journal **86**(3): 1813-1819.

Tasić, Ž. Z., et al. (2022). "Electrochemical determination of L-tryptophan in food samples on graphite electrode prepared from waste batteries." Scientific Reports **12**(1): 5469.

Te Winkel, J. D., et al. (2016). "Analysis of Antimicrobial-Triggered Membrane Depolarization Using Voltage Sensitive Dyes." Front Cell Dev Biol **4**: 29.

Tittor, J., et al. (1994). "Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N." Biophysical Journal **67**(4): 1682-1690.

Tsukihara, T., et al. (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science **272**(5265): 1136-1144.

Tuls, J., et al. (1989). "Fluorescein Isothiocyanate Specifically Modifies Lysine 338 of Cytochrome P-450_{sc} and Inhibits Adrenodoxin Binding*." Journal of Biological Chemistry **264**(28): 16421-16425.

van der Meer, B. W. (2002). "Kappa-squared: from nuisance to new sense." Reviews in Molecular Biotechnology **82**(3): 181-196.

Vogt, S., et al. (2018). "Myocardial insufficiency is related to reduced subunit 4 content of cytochrome c oxidase." Journal of Cardiothoracic Surgery **13**(1): 95.

Volz, P., et al. (2018). "White-Light Supercontinuum Laser-Based Multiple Wavelength Excitation for TCSPC-FLIM of Cutaneous Nanocarrier Uptake." Zeitschrift für Physikalische Chemie **232**(5-6): 671-688.

Wang, F., et al. (2018). "Aerobic Exercise During Early Murine Doxorubicin Exposure Mitigates Cardiac Toxicity." J Pediatr Hematol Oncol **40**(3): 208-215.

Wedatilake, Y., et al. (2013). "SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study." Orphanet Journal of Rare Diseases **8**(1): 96.

Whitaker-Menezes, D., et al. (2011). "Evidence for a stromal-epithelial "lactate shuttle" in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts." Cell Cycle **10**(11): 1772-1783.

Wikström, M., et al. (2018). "Oxygen Activation and Energy Conservation by Cytochrome c Oxidase." Chem Rev **118**(5): 2469-2490.

Wikstrom, M. K. (1977). "Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria." Nature **266**(5599): 271-273.

Witt, H., et al. (1998). "Cytochrome-c-binding site on cytochrome oxidase in *Paracoccus denitrificans*." Eur J Biochem **251**(1-2): 367-373.

Wolf, A., et al. (2020). "The redox-coupled proton-channel opening in cytochrome c oxidase." Chemical Science **11**(15): 3804-3811.

Wolf, A., et al. (2020). "Electronation-dependent structural change at the proton exit side of cytochrome c oxidase as revealed by site-directed fluorescence labeling." The FEBS Journal **287**(6): 1232-1246.

Xu, Y., et al. (2017). "Voltage imaging with genetically encoded indicators." Curr Opin Chem Biol **39**: 1-10.

Yoshikawa, S., et al. (1998). "Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase." Science **280**(5370): 1723-1729.

Zanker, V. and W. Peter (1958). "Die prototropen Formen des Fluoresceins." Chemische Berichte **91**(3): 572-580.

Zhang, X., et al. (2011). "Combined Genetic and Metabolic Manipulation of Lipids in *Rhodobacter sphaeroides* Reveals Non-Phospholipid Substitutions in Fully Active Cytochrome c Oxidase." Biochemistry **50**(19): 3891-3902.

Zhang, X., et al. (2011). "Cardiolipin Deficiency in *Rhodobacter sphaeroides* Alters the Lipid Profile of Membranes and of Crystallized Cytochrome Oxidase, but Structure and Function Are Maintained." Biochemistry **50**(19): 3879-3890.

Zorova, L. D., et al. (2018). "Mitochondrial membrane potential." Analytical Biochemistry **552**: 50-59.

11. Appendix

Veröffentlichungen

Gottwald, J., **Balke, J.**, Stellmacher, J., van Vorst, K., Ghazisaeedi, F., Fulde, M and Alexiev, U. Cy3-based nanoviscosity determination of mucus: Effect of mucus collection methods and antibiotics treatment. *Macromolecular Bioscience*, 2300437, 2024

Balke, J., DíazGutiérrez, P., Rafaluk-Mohr, T., Proksch, J., Kokschi, B. and Alexiev, U. Osmolytes Modulate Photoactivation of Phytochrome: Probing Protein Hydration. *Molecules*, 28, 16: 6121, 2023

Wolf, A., Volz-Rakebrand, P., **Balke, J.** and Alexiev, U. Diffusion Analysis of NANoscopic Ensembles: A Tracking-Free Diffusivity Analysis for NANoscopic Ensembles in Biological Samples and Nanotechnology *Small*, 19, 2206722, 2023

Sadeghi, M., **Balke, J.**, Rafaluk-Mohr, T. and Alexiev, U. Long-Distance Protonation-Conformation Coupling in Phytochrome Species. *Molecules*, 27, 23: 8395, 2022

Silapetere, A., Hwang, S., Hontani, Y., Fernandez Lahore, R.G., **Balke, J.**, Escobar, F.V., Tros, M., Konold, P.E., Matis, R., Croce, R., Walla, P.J., Hildebrandt, P., Alexiev, U., Kennis, J.T.M., Sun, H., Utesch, T. and Hegemann, P. QuasAr Odyssey: the origin of fluorescence and its voltage sensitivity in microbial rhodopsins. *Nature Communications*, 13, 1: 5501, 2022

Nagano, S., Sadeghi, M., **Balke, J.**, Fleck, M., Heckmann, N., Psakis, G. and Alexiev, U. Improved fluorescent phytochromes for in situ imaging. *Scientific Reports*, 12, 5587, 2022

Wolf, A., Dragelj, J., Wonneberg, J., Stellmacher, J., **Balke, J.**, Woelke, A., Hodoscek, M., Knapp, E. and Alexiev, U. The redox-coupled proton-channel opening in cytochrome c oxidase. *Chemical Science*, 11, 3804-3811, 2020

Sadeghi, M., **Balke, J.**, Schneider, C., Nagano, S., Stellmacher, J., Lochnit, G., Lang, C., Weise, C., Hughes, J. and Alexiev, U. Transient Deprotonation of the Chromophore Affects Protein Dynamics Proximal and Distal to the Linear Tetrapyrrole Chromophore in Phytochrome Cph1 *Biochemistry*, 59,9, 1051-1062, 2020

Wolf, A., Wonneberg, J., **Balke, J.** and Alexiev, U. Electronation-dependent structural change at the proton exit side of cytochrome c oxidase as revealed by site-directed fluorescence labeling. *FEBS J*, 2019

Balke, J., Volz, P., Neumann, F., Brodewolf, R., Wolf, A., Pischon, H., Radbruch, M., Mundhenk, L., Gruber, A., Ma, M. and Alexiev, U. Visualizing Oxidative Cellular Stress Induced by Nanoparticles in the Subcytotoxic Range using Fluorescence Lifetime Imaging *Small* 14 (23), 18700106, 2018

Volz, P., Schilrreff, P., Brodewolf, R., Wolff, C., Stellmacher, J., **Balke, J.**, Morilla, M., Zoschke, C., Schäfer-Korting, M., and Alexiev, U. Pitfalls in using fluorescence tagging of nanomaterials: tecto-dendrimers in skin tissue as investigated by Cluster-FLIM. *Ann N Y Acad Sci.* 1405(1), 202-214, 2017.

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen, um Prof. Dr. Ulrike Alexiev zu danken für die Möglichkeit in Ihrer Arbeitsgruppe dieses Forschungsvorhaben zu verwirklichen. Der vielfältige Austausch von Ideen, Ratschlägen und Anregungen mit ihr haben diese Arbeit erst ermöglicht. Es erfüllt mich mit Trauer, dass Sie so frühzeitig verstorben ist. Viele weitere junge Wissenschaftler hätten von ihrem Mentoring, Wissen und Leidenschaft für die Wissenschaft profitieren können und die Biophysik hat eine hervorragende Wissenschaftlerin an diesem Tag verloren.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Joachim Heberle und Prof. Dr. Holger Dau bedanken, dass sie in der schwierigen Zeit sofort bereit waren mich zu unterstützen und diese Arbeit begutachten.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem SFB 1078 und der DFG. Ein Dank gebührt auch dem Verwaltungsbüro des SFBs 1078 für die schnelle Unterstützung in allen Fragen der Universitären Verwaltung. Auch möchte ich Marion Badow für ihre stetige Hilfe bei allen weiteren universitären Fragen und für den gelegentlichen Kaffee danken.

Ich danke allen (ehemaligen) Kollegen und Mitstreiter aus unserer Arbeitsgruppe für die Bereicherung durch sowohl fachlich als auch persönlich Gespräche. Besonders danke ich Maryam Sadeghi, Victor Loyo Cruz, Priscilla Schilrreff, Jacqueline Gottwald, Johannes Stellmacher, Pierre Volz-Rakebrand und Florian Telschow. Danke für die gemeinsamen Stunden bei Regen und Sonnenschein.

Für die Zeit außerhalb der Uni möchte ich allen Freunden danken, die mich unterstützt haben oder mich an das Leben außerhalb erinnert haben. Ich danke Christian, Laura, Tarsis, Eli, Carsten, Kato, und so viele weitere einzigartige Menschen, die ich hier unmöglich alle aufzählen kann.

Zuletzt möchte ich meiner ganzen Familie danken, die zu jeder Zeit für mich da ist. Vielen Dank an Erwin für den letzten Schliff der Arbeit und Sabine für die Unterstützung. Meiner Mutter Birgit und meinem Bruder Mark danke ich, die mich unentwegt unterstützt haben. Ich danke meiner wunderbaren Frau Viktoria, für ihre Liebe und Vertrauen und den gelegentlichen notwendigen Schubs. Mein größter Dank geht an meine wunderbaren Kinder Malin und Lena, die mir immer wieder aufs Neue zeigen, was wirklich wichtig ist im Leben und mir schon durch ihre Anwesenheit Kraft geben. Ich liebe euch Alle.

Selbständigkeitserklärung

Name: Balke

Vorname: Jens

Ich erkläre gegenüber der Freien Universität Berlin, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit ist frei von Plagiaten. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch in keinem früheren Promotionsverfahren eingereicht.

Mit einer Prüfung meiner Arbeit durch ein Plagiatsprüfungsprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Datum: _____

Unterschrift: _____

Daten der Arbeit

Die verwendeten Rohdaten und berechneten Daten in dieser Arbeit sind im Daten Repository *Figshare* unter folgender Adresse zugänglich gemacht:

<https://figshare.com/s/20cd9f92764841b0a56b>

Ebenso sind die etablierten Programme für die modifizierten Aufbauten FLIM, TRIFM und FLASH dort hinterlegt. Nachfolgend sind die Anleitungen für die neu konzeptionierten Aufbauten angegeben.

Quellcode/Anleitung der (um-)geschriebenen Messprogramme/Aufbauten:

FLASH Aufbau

- 0.1 Important matters
- 0.2 Starting components
- 0.2.1 Laser settings
- 0.3 Measurements
- 0.3.1 Labview
- 0.4 Turn off the components
- 0.4.1 Shutdown the Laser
- 0.4.2 Shutdown the optical setup

0.1 Important matters

1. Do not operate the Laser if room temperature passes $25 \pm$ Celsius
2. Always switch on the "Laserlight" on the door before operating
3. Keep Beam Shutter closed, unless you 're actively operating the Laser
4. Be careful, Laser Safety first!

0.2 Starting components

1. The Laser setup:

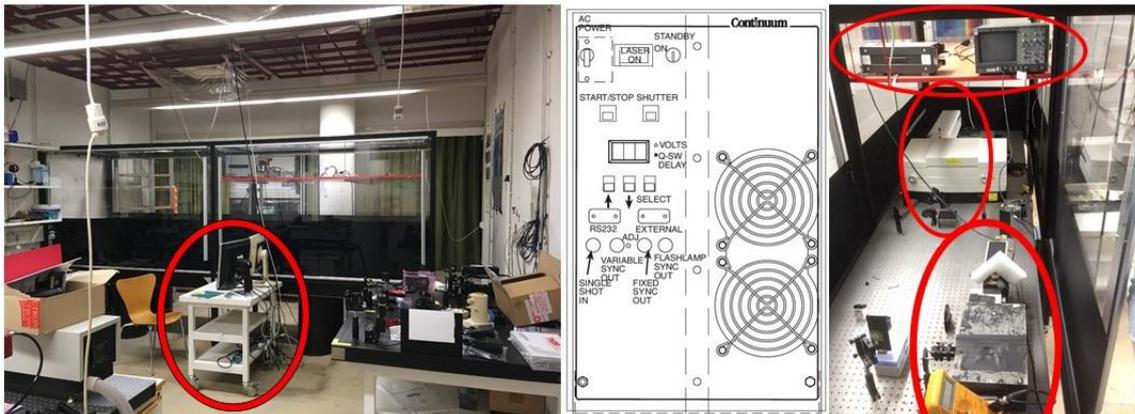


Figure: The Flash-Photolysis setup is located at the back of the room. The laser computer can be found at the bottom of the Laser safety building block. The computer to start the measurements is on the front side of the setup. The complete setup consists of the laser, the OPO-System, the Photoyls setup and the shelf with operating devices.

2. Check the water reservoir. Don 't use the laser if the room temperature is too high or if there is not enough water in the water-cooling system
3. After the last usage the AC POWER should be left on. Otherwise, turn it on now. After turning on the AC POWER you need to wait 20 min to unblock the Shutter option or you overwrite it.
4. Turn key to "ON" position

5. The readout LED will display the following information which you need to write down in your lab book:

The readout will display a series of 3 numbers which represents the total number of flash-lamp discharges. The number should not cross 20 million in total. The first series is for millions, the second for thousands and the third one for hundreds. Example: 005 246 123 are 5.246123 flash-lamp discharges. "Flo" displays until the water flow sets up and stabilizes and F10 (flash-lamp frequency in Hz).

6. Check with the SELECT button the following settings. (0.2.2)

7. Important: select EoF

8. Close Beam Shutter



Figure: Beam Shutter in its open or closed position.

9. Press Start/Stop button. The flash-lamp will start flashing. Let the flash-lamp stabilize for about 15-20 minutes

10. Go to Photolysis setup and close the laser-lid and Iris, cover up the lamp

11. Press the "ON" button on the lamp for the Photolysis setup. Let this lamp stabilize for same amount of time

12. Press Start/Stop button once more to stop the flash-lamp from flashing. Press SELECT to switch EoF to EoN. The Laser will now operate via computer commands

13. Press the "ON" button from the wavetek function generator



Figure: left: function generator and temperature measurement device. On the other side of the shelf, you find the voltage supply for the lamp (here shown on the right) and the oscilloscope.

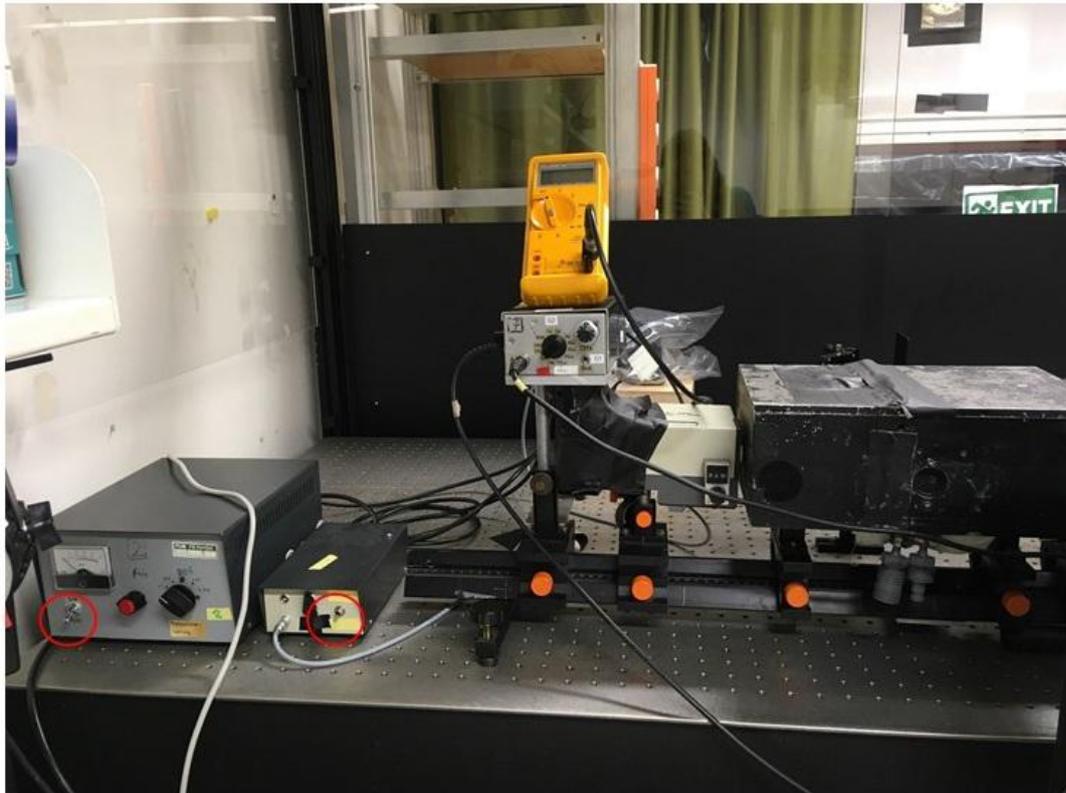


Figure : Photolysis setup. From left to right: Voltage supply for the Photomultiplier. Optical setup with cuvette mount and at last the lamp.

14. For the Photolysis setup
15. If desired, turn on the chiller and set the temperature
16. Turn on the oscilloscope
17. Turn on the Photo-multiplier
18. Turn on the Photo-multiplier supply
19. When measuring low-temperature samples, install nitrogen cylinder
20. Check temperature setting and adjust if needed
21. If ALL the other components are setup as well and you want to start measuring, open the Beam Shutter

0.2.1 Laser settings

By pressing the SELECT button you can choose different settings

1. Rep Rate: flash-lamp frequency is 10 Hz (do not change!)
2. Q-Switch delay: Q-switch delay setting in microseconds. The red light labeled Q-SW DELAY next to LED display should also be on. This value indicates the time between the command to fire the flashlamp and the command to fire the Pockels cell. Do not go higher than 211 to assure safe operations with the OPO crystal.
3. Pulse Division: laser Output frequency
4. Pump Voltage: flash-lamp discharge voltage. Keep it at 1,38 V! Do not change it!
5. Serial Mode: SoF/SoN (OFF/ON)
6. External Mode: EoF/EoN (OFF/ON)

0.3 Measurements

1. Start up the computer
2. Open Labview and Horizon
3. If you are setting the wavelength with Horizon, the wavelength ranges from 400 to 709 nm. To provide a broader range, the current installed optical elements need to be changed. Don't do this by yourself, get professional help
4. Always keep Beam Shutter closed while changing the wavelength setting



Figure 5: Horizon program for adjusting the wavelength.

0.3.1 Labview

The Labview instructions are next to this manual.

0.4 Turn off the components

0.4.1 Shutdown the Laser

1. Close Beam Shutter
2. Press Start/Stop button
3. Turn key to "OFF" position

0.4.2 Shutdown the optical setup

1. Close Laserlid
2. Turn off Photo-multiplier supply
3. Turn off lamp
4. Turn off Photo-multiplier
5. Turn off the oscilloscope
6. If used, turn off chiller supplies

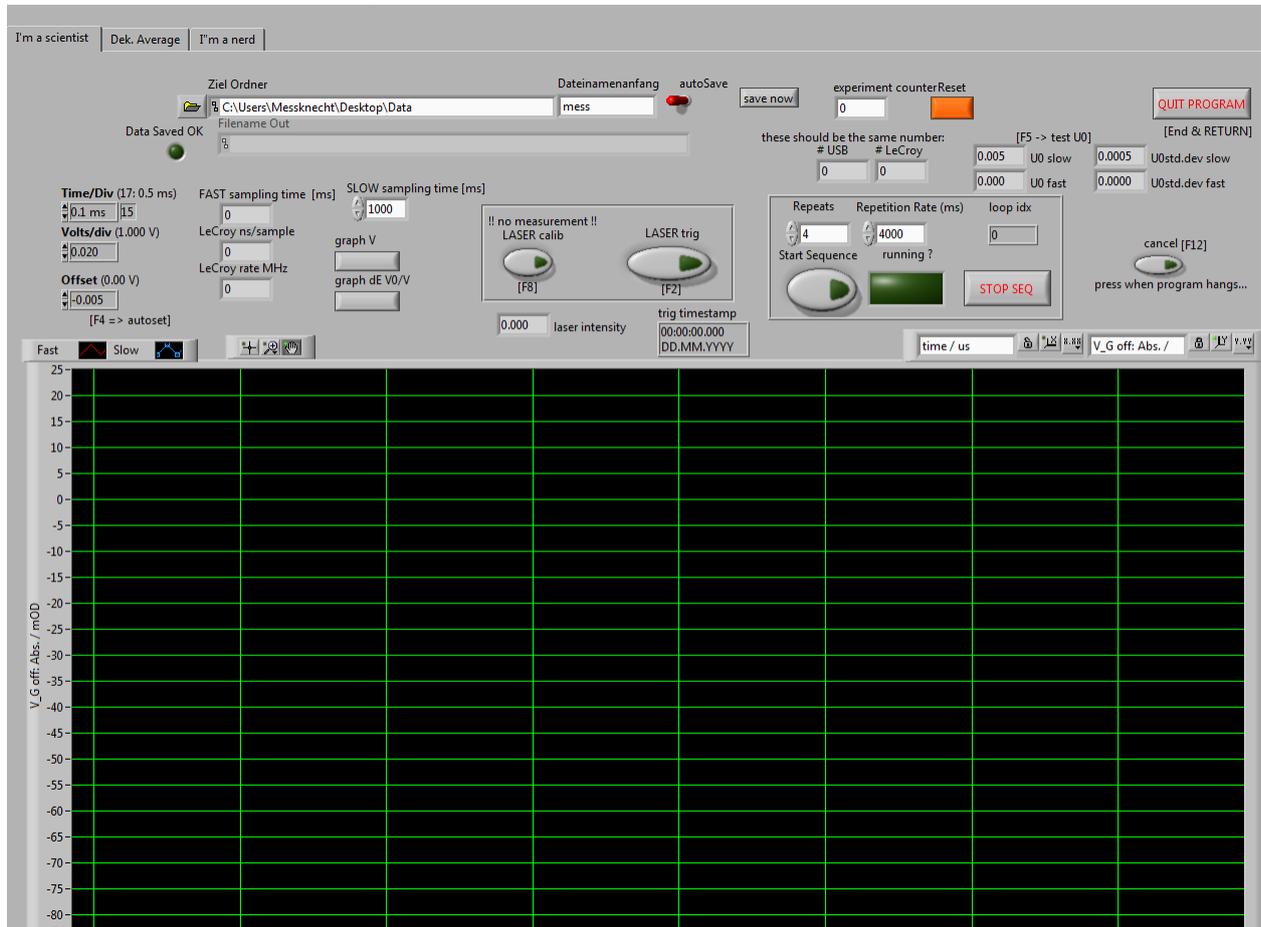
The software is written in LabView 2015: (Program in repository deposited):

Extract Vis in one Folder (Flash-Setup.zip)

Start:

- flashPhotolyse.vi

- Klick "RUN"

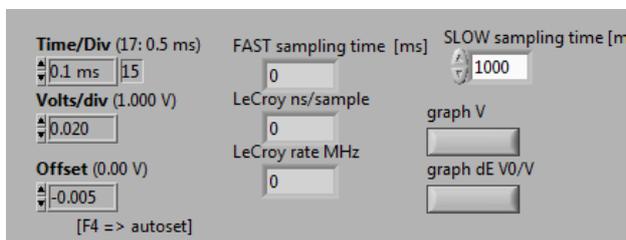


Setting the File Save



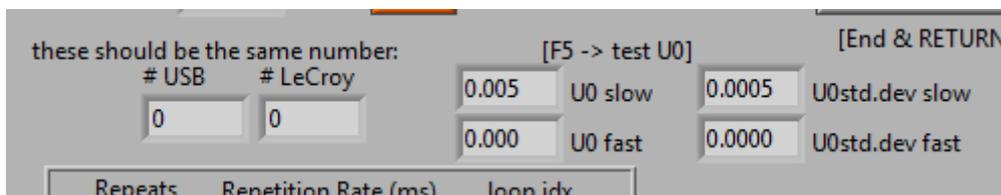
- Klick on  to choose file location.
- Choose file name (program will automatically add counter "001")
- Auto Save: click to be green: Active
 - otherwise choose "save now" for each experiment individual.
- Saving feedback by green "Saved OK".

Adjusting fast channel



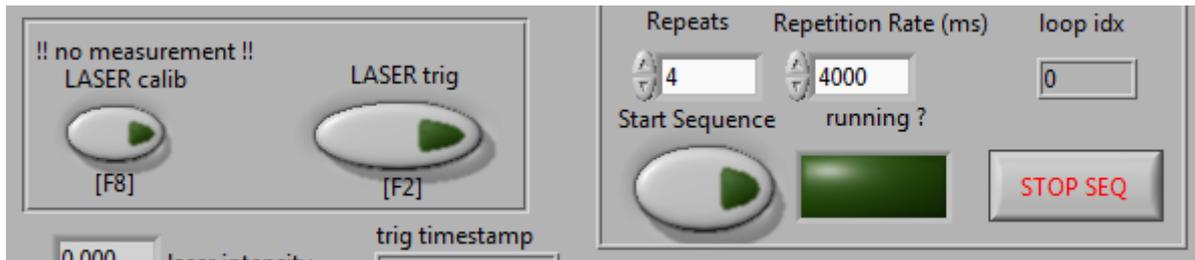
- Time/Div: Time resolution of the LeCroy
 - Stable at 500 MHz rate
- Volts/Div.: only fixated numbers of div possible
 - Problem of overflow
 - Thick samples ~ 0.08
 - In chapter 3 test of U_0 for fast channel:
 - INF: overflow
 - Cut off fast curve measurement window.
- Offset: use "F4" to measure and adjust for U_0 in chapter 3

Test of U_0



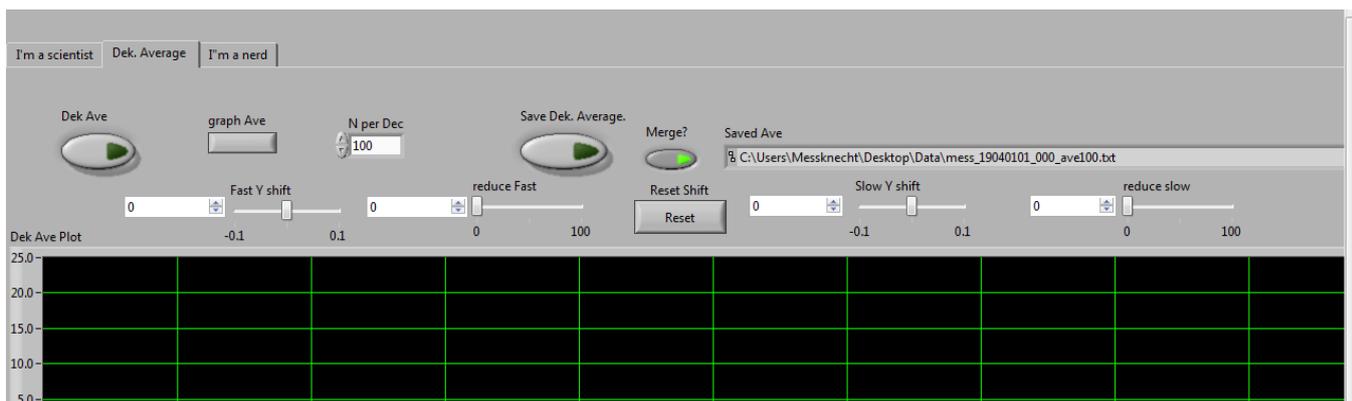
- Intern test of the same counting of slow NI-card (USB) and the fast channel
- Setting U_0 for fast channel with "F5"
 - If "INF" shows the Volts/Div in chapter 2 must be adjusted

Starking of measurements



- For Laser flash WITHOUT recording
 - F8
- For single measurement
 - F2
- For repetitive measurements
 - Set number of Repeats
 - Time delay between repetition flashes
- Click start sequence:
 - Raw data will be automatic saved!
 - **For averaged data saving see next chapter**

Decade averaging



Data can be saved individual as decadic averaged and merged data:

- Choose Data to be saved merged or not by “Merge?”
- Save Dek. Average
 - Same name for save; does NOT depend on if merged or not.
 - Change first saved data by hand to save again!
- Shifting fast and slow channel with shift option

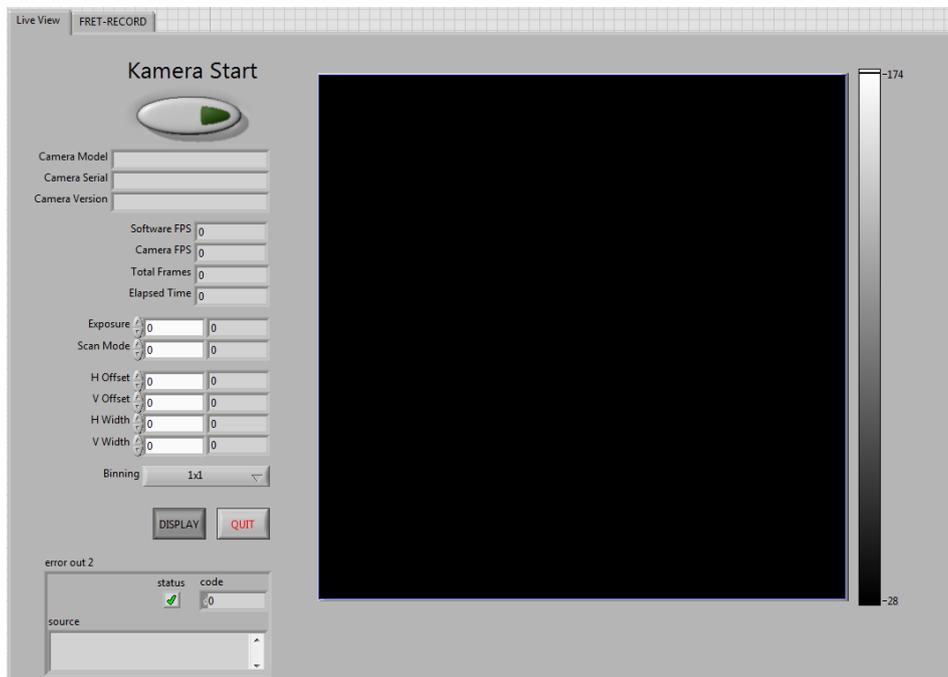
For repetitive measurements:

- Decide if data should be saved additionally merged or not: ticker Merge? Button for that.
- Data will be saved raw and chosen decadic average.

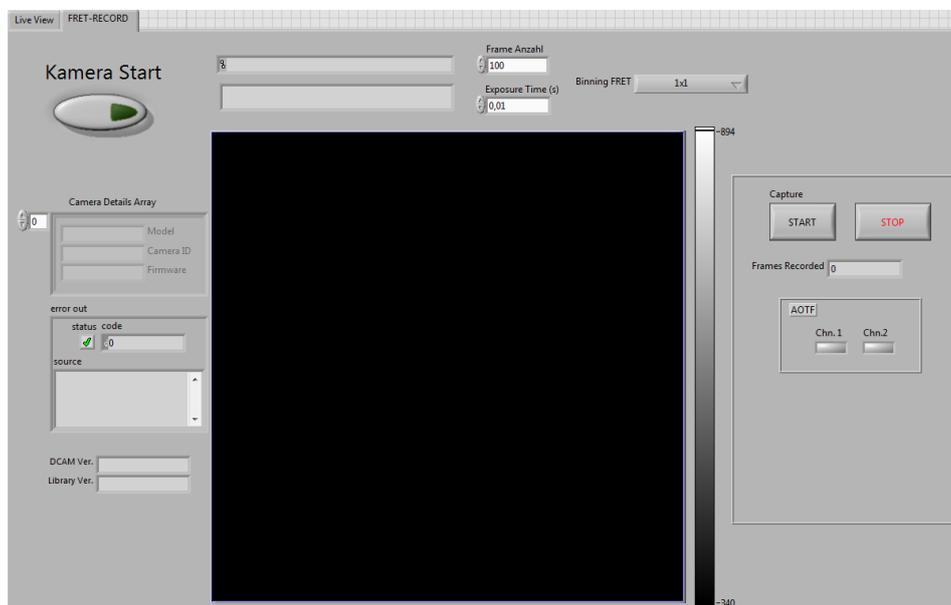
TIRFM Aufbau mit Alex Steuerung

Vis: FRET-Modus.vi

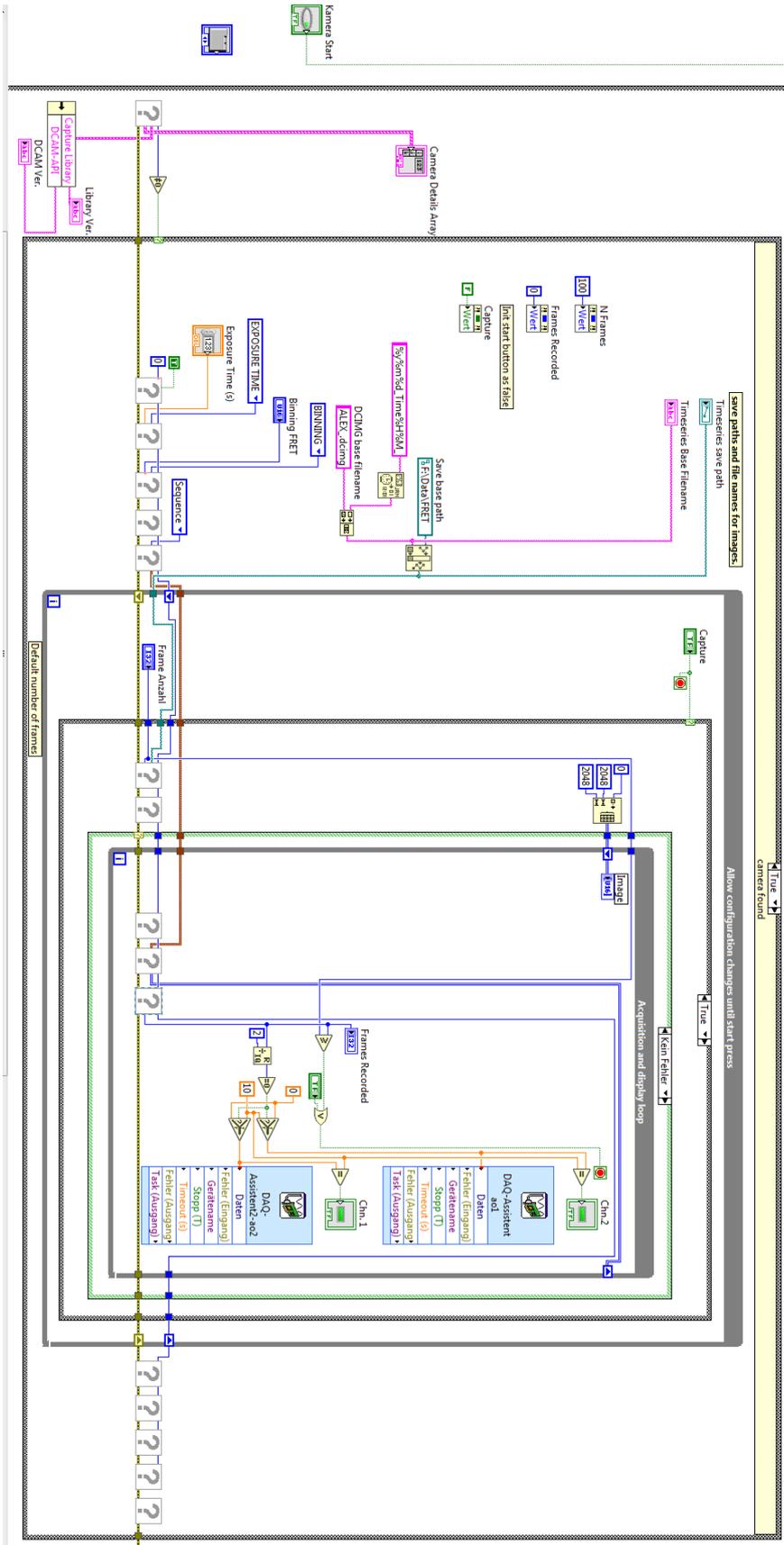
Parameter der Kamera (Test mit OrcaV2, Hamamatsu) werden automatisch geladen.



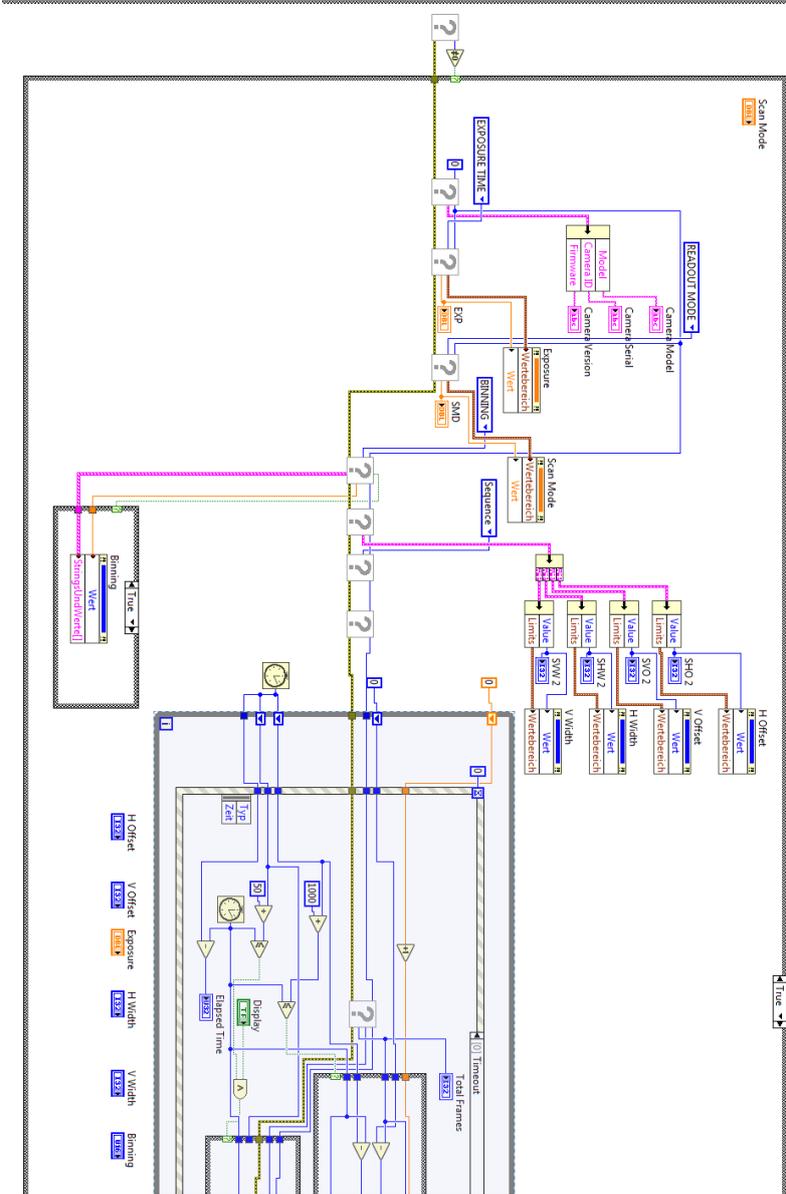
Im FRET-Modus wird der Frame Wechsel gleichzeitig mit dem Kanalwechsel des AOTFs verbunden und ebenso angezeigt während der Messung.



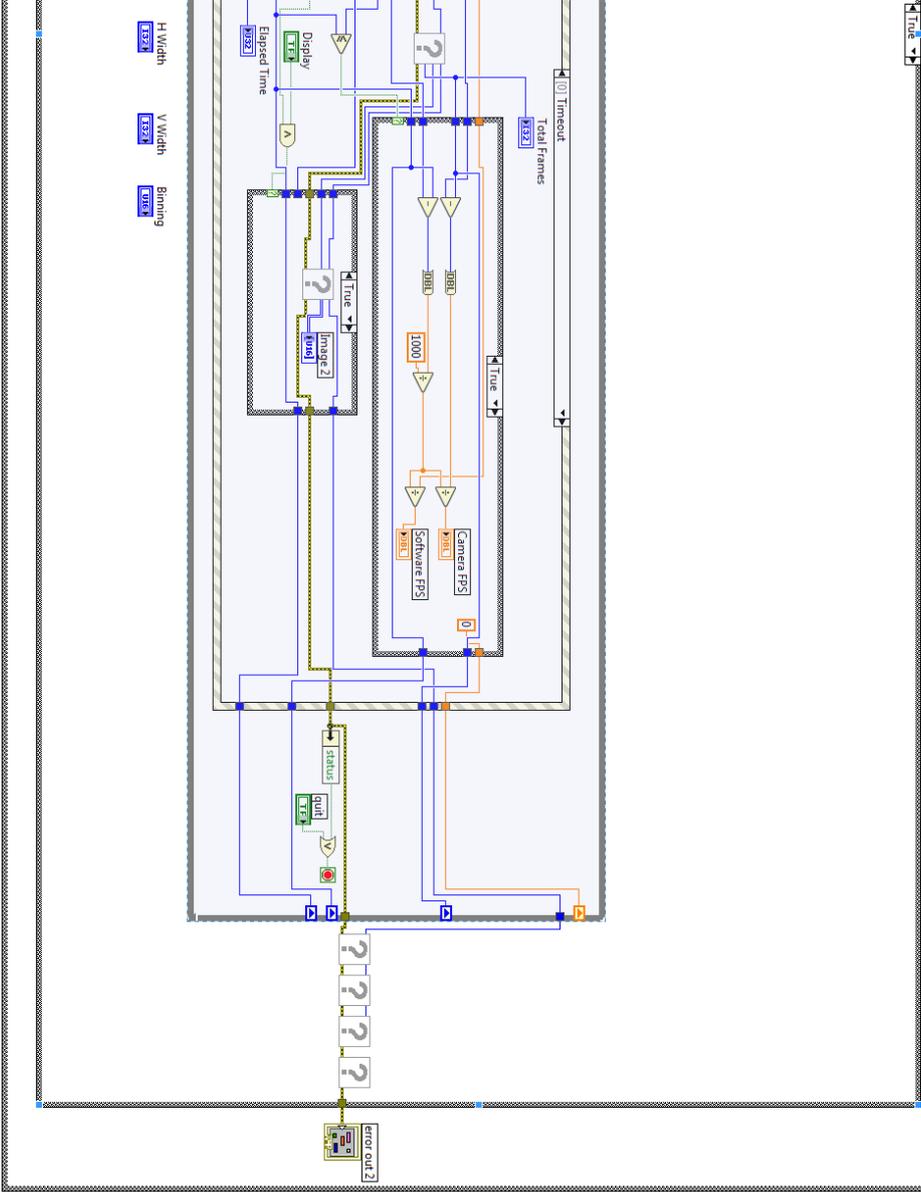
Datenstruktur zu Aufnahme im FRET-Modus (Programm im Repository hinterlegt):



Kamerakontrolle: Auslesen und Verändern der Parameter (Teil 1):



Kamerakontrolle: Auslesen und Verändern der Parameter (Teil 2):



Weißlichtlaser Geräte

1.) Weißlicht Laser Quelle: SuperK Extreme



2.) Steuereinheiten für AOTF: External RF Driver



3.) AOTF: SuperK Select



Einschalten der Hardware:



Vorderseite

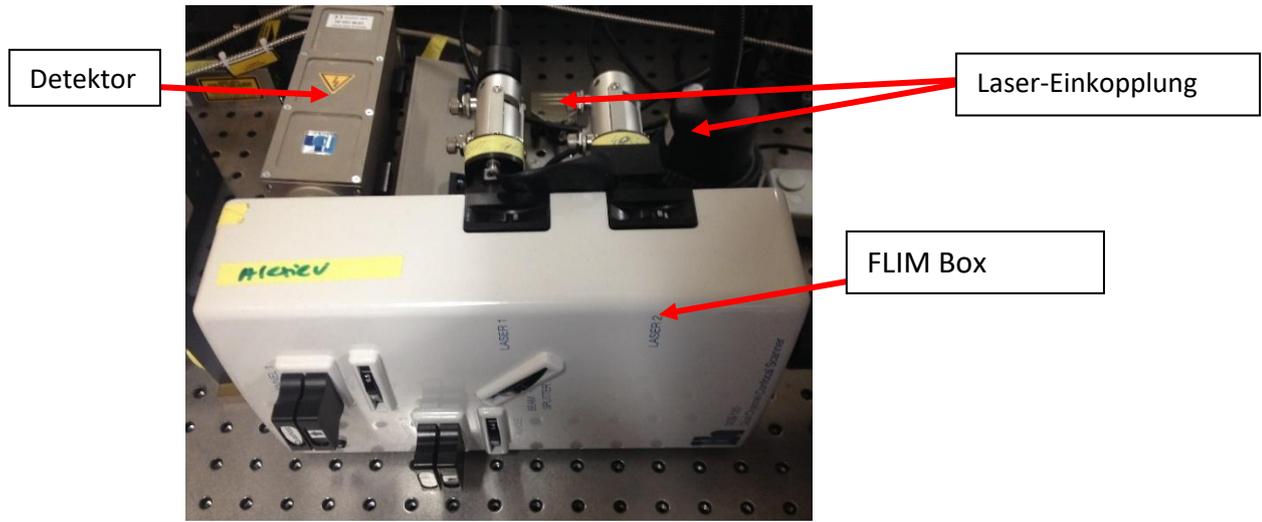
Rückseite



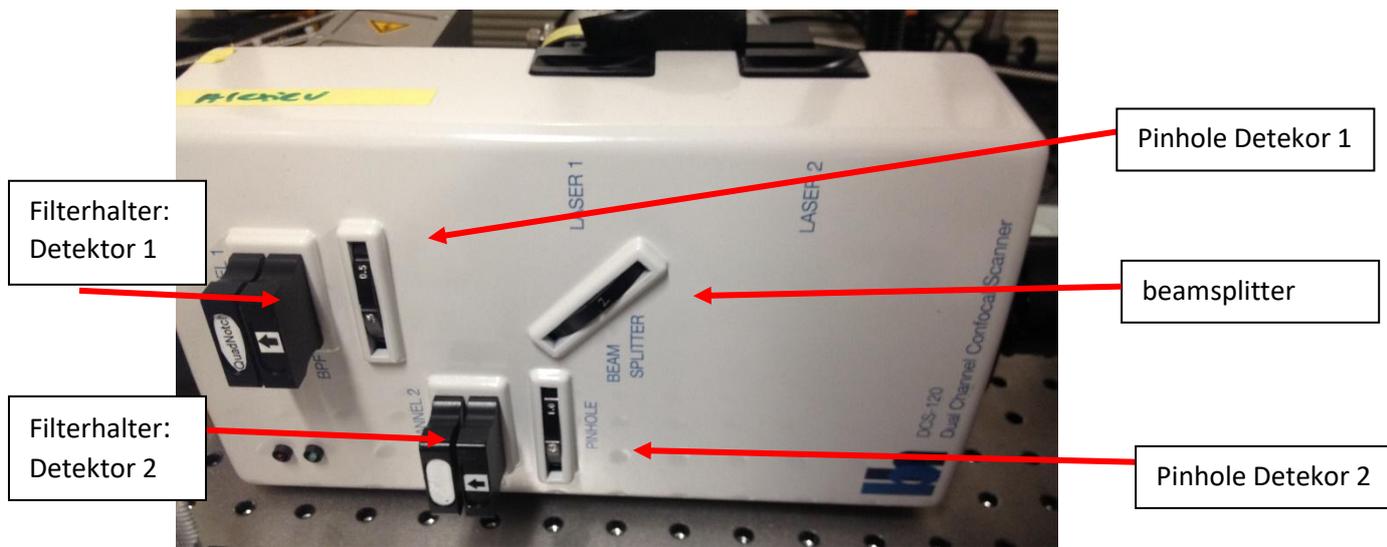
- A) Shutter am AOTF schließen
- B) Kaltgerät-schalter auf der Rückseite des Weißlichtlasers anstellen
- C) Schlüssel auf der Vorderseite auf On
- D) Beide External RF Driver auf der Rückseite anschalten
- E) Scanner Control

Detektor und FLIM-Box

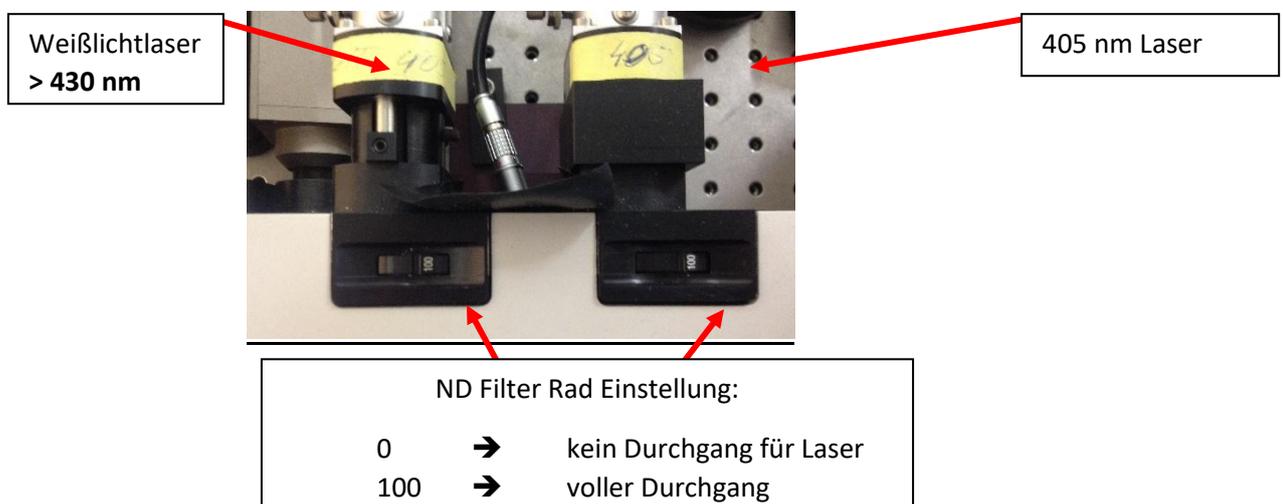
Überblick:



Frontansicht:

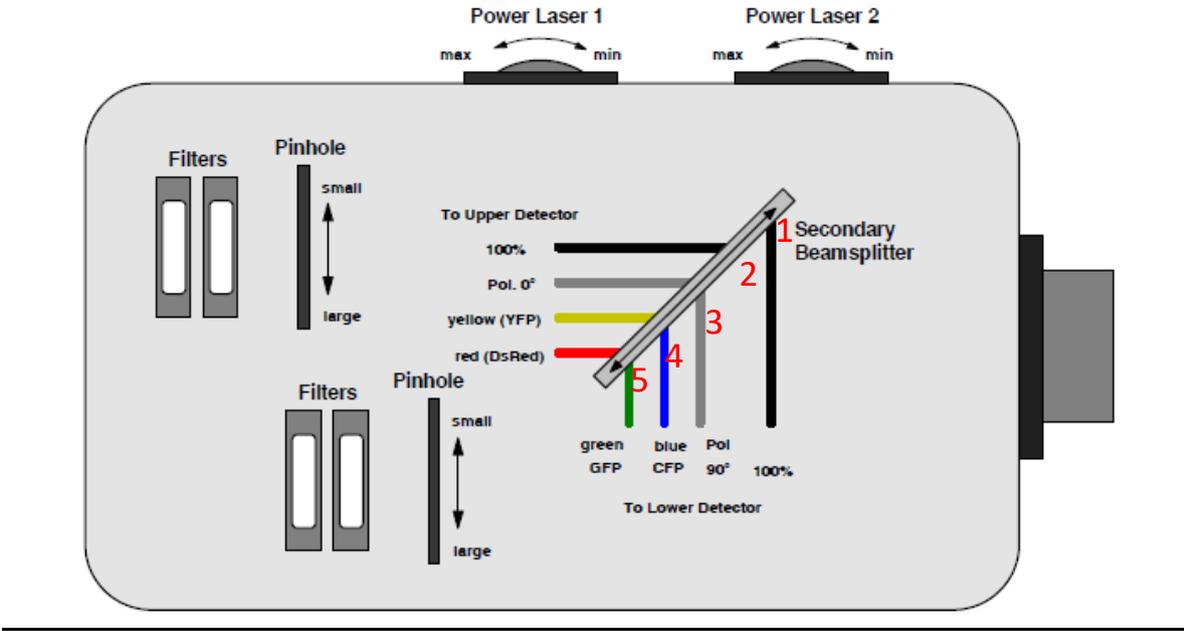
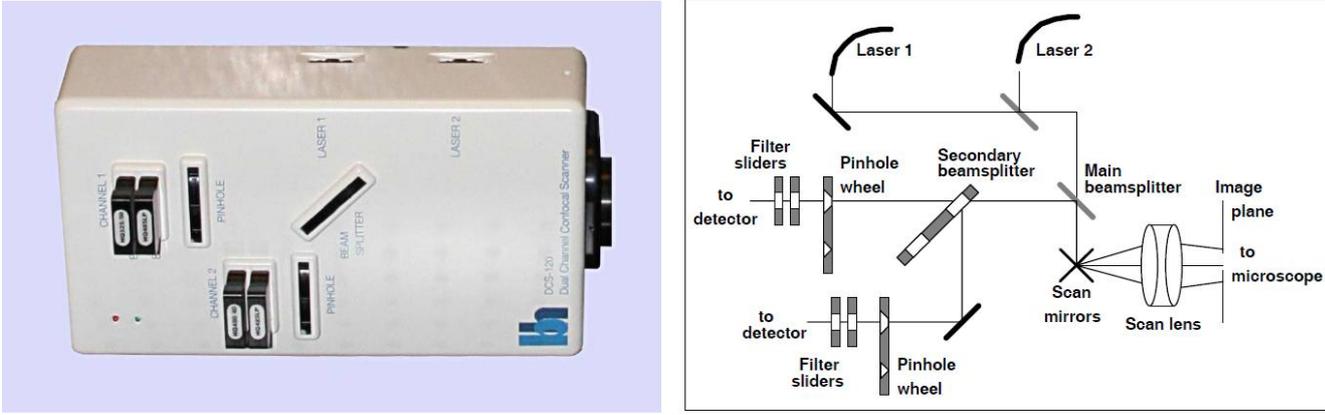


Laser-Einkopplung in FLIM-Box:



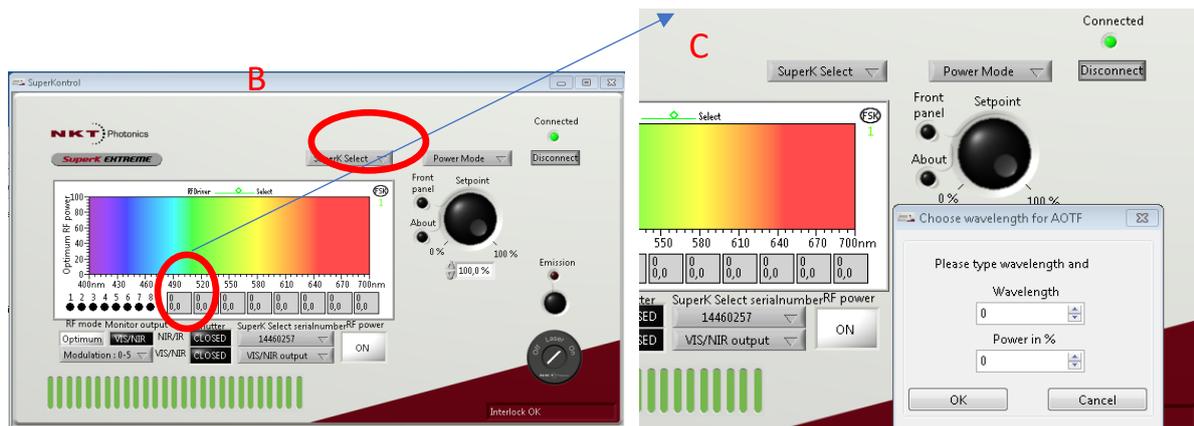
Filter und Beamsplitter an der FLIM-Box

Zeichnung von Manual DCS-120 Becker & Hickl GmbH

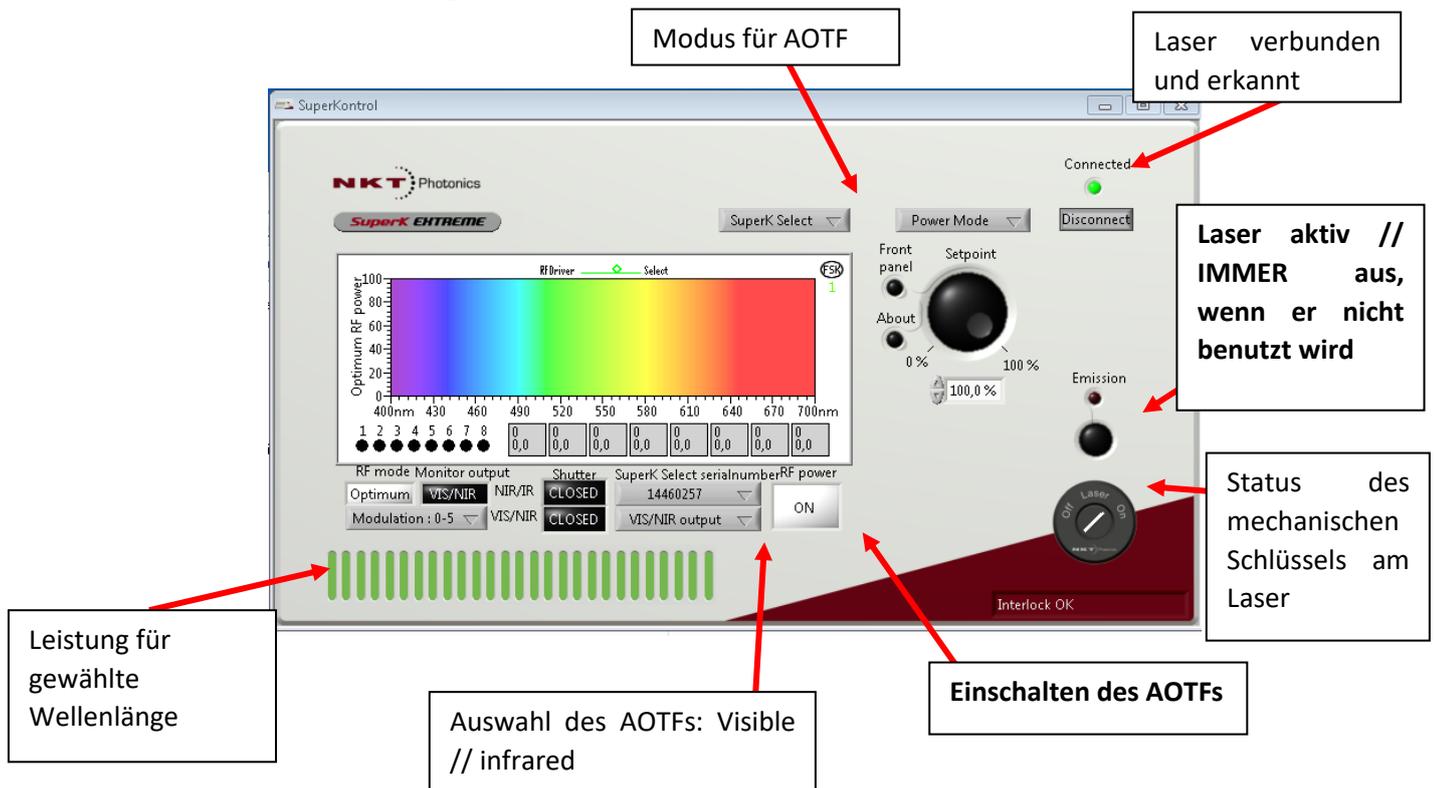


Software:

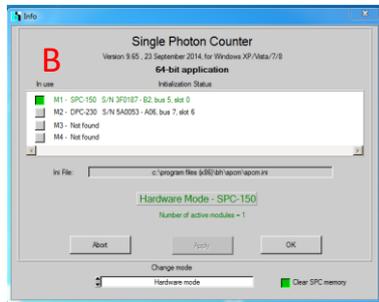
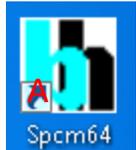
Laserkontrolle: Zuständig für Weißlichtlaser und den AOTF



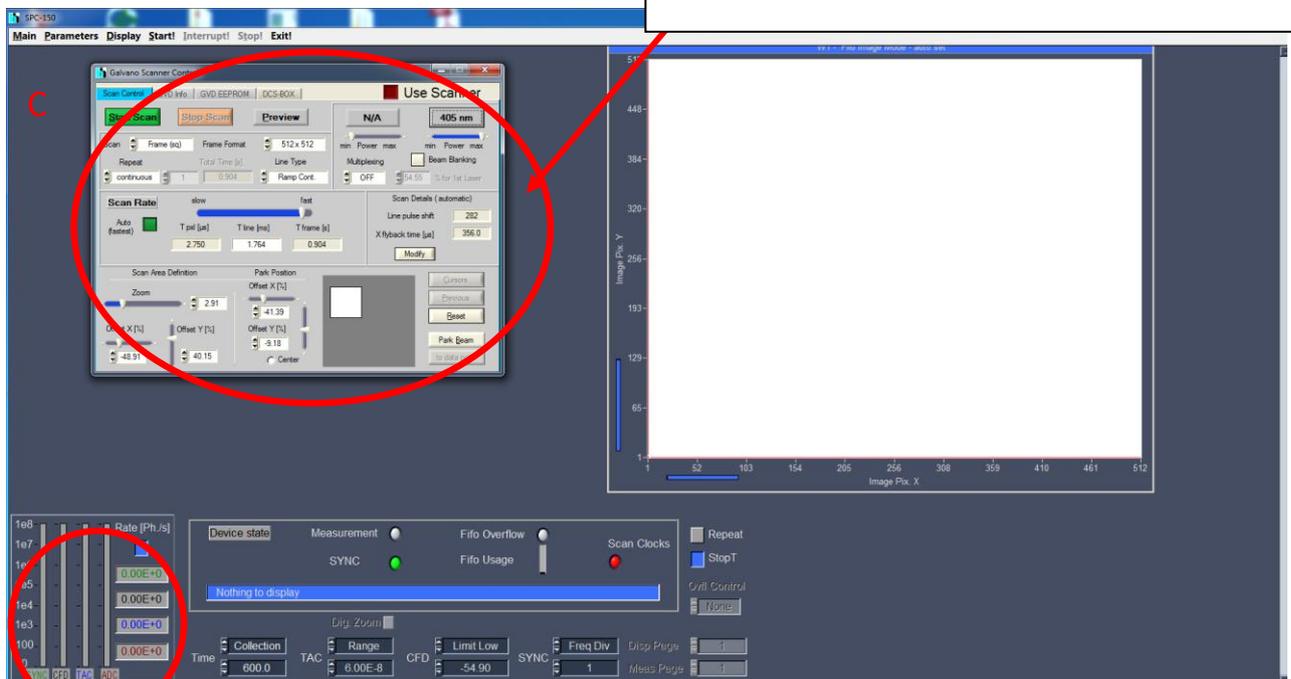
- A) Starte das Programm „SuperKontrol“
- B) Nach Verbindung mit dem Laser erscheint das Kontrollfenster
- C) Auf „SuperK Select“ MODUS wechseln
 - I. Durch Klicken auf einen der möglichen Kanäle (in B), kann die Wellenlänge und die Intensität eingestellt werden



Becker & Hick Software: Detektor- und Aufnahmesteuerung



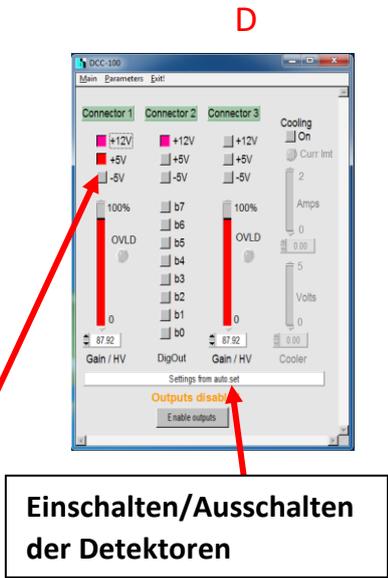
Einstellungen für Messung:
Zoom // Bereich Auswahl // Scan
Geschwindigkeit



Intensität für Sync: aus Laser (muss stabil sein)
// CFD // TAC: bei aktiven detektor

- A) Starte das Programm „Spcm64“
- B) SPC-XXX (Detektor) auswählen und mit OK bestätigen
- C) Oberfläche für Steuerung der Detektoren und Aufnahme
- D) Anzeige für die Detektorsteuerung

Overload:
Bei zu hoher
Intensität
AUSSCHALTEN



**Einschalten/Ausschalten
der Detektoren**

Einstellungen für Messungen:

Vorab:

Geräte angeschaltet (wie auf Seite 136) beschrieben

Software gestartet

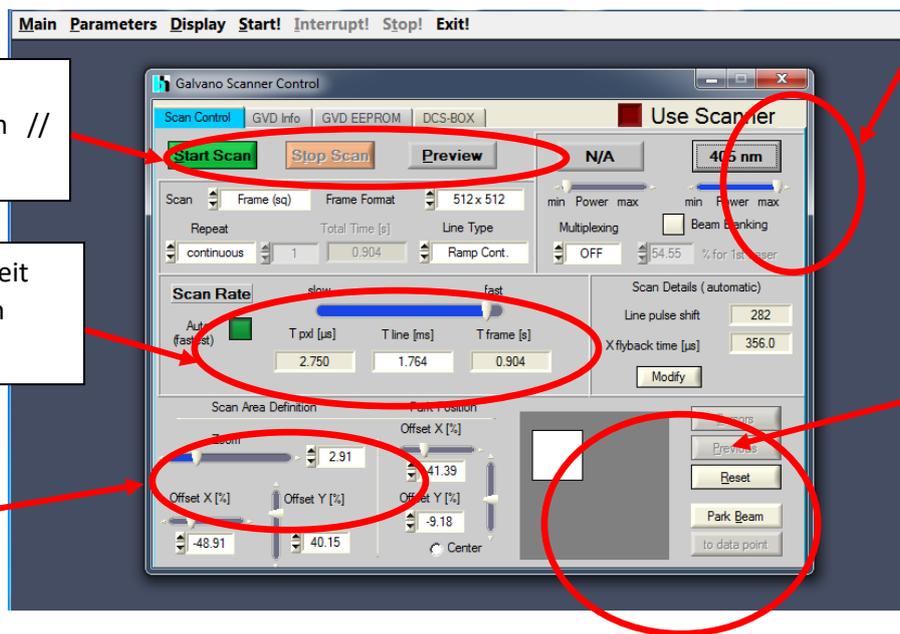
Filter und Beamsplitter an FLIM-Box eingestellt

Für den 405 nm Laser von B&H Steuerung

Messung
starten // stoppen //
preview

Abtastgeschwindigkeit
des Lasers einstellen

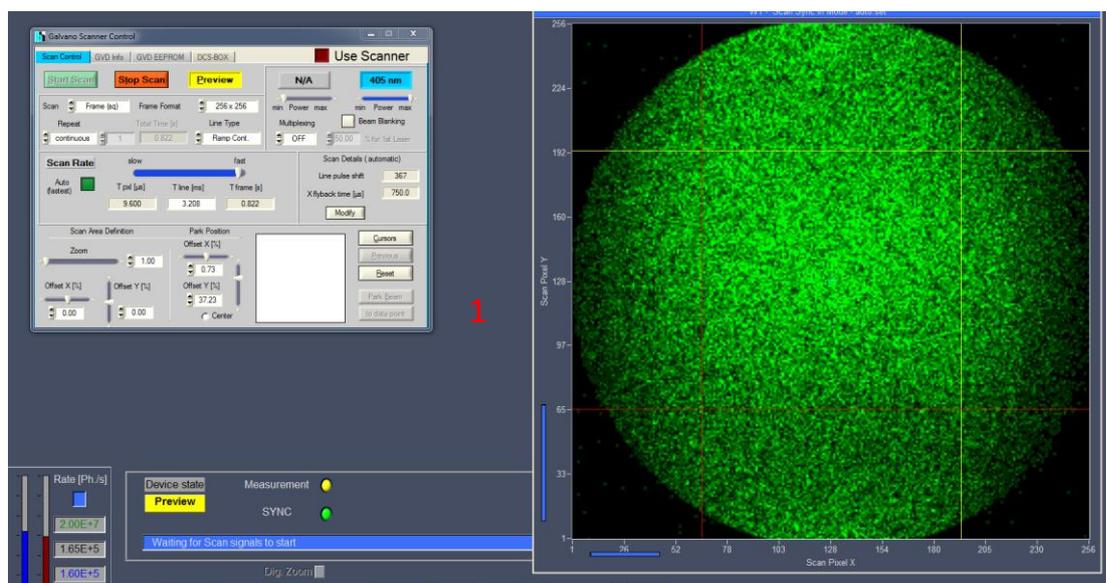
Zoom des
Bereiches
auswählen



Auswahl des zu
scannenden
Bereiches

Preview

Messung wird nicht aufgezeichnet: Für Intensitätseinstellung und Finden der Region of Interest (ROI)

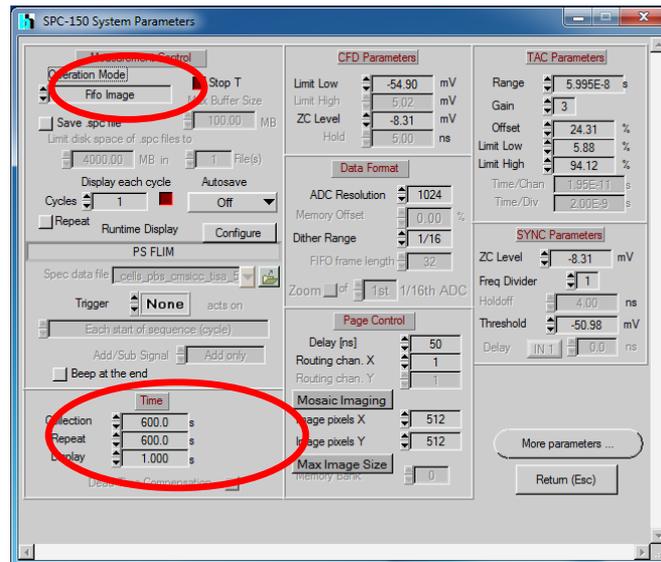


Ausleuchtung der Probe anpassen durch Ändern der Laserjustage (an FLIM-Box, Seite 140); kann auch mittels des fluoreszierenden Glasträgers justiert werden.

Für die Einstellung der Lifetime Aufzeichnung:

Messung/Preview gestoppt:

Im Preview Park Beam (1) und in den „Parameter“ Reiter die „System Parameter“ (Tastatur: F2) aufrufen:



Von „Fifo Image“ zu „Single“ wechseln um an dem geparkten Beamstelle die Lifetime-Kurve zu betrachten.

Mittels „START SCAN“ die Lifetime-Kurve betrachten:

Einstellungen:

- Collection: Zeit in der Signal aufsummiert wird
- Repeat: Falls Repeat gewählt wird: Zeiten, nach der wiederholt wird
- Display: Nach welcher Zeit das angezeigte Bild erneuert wird

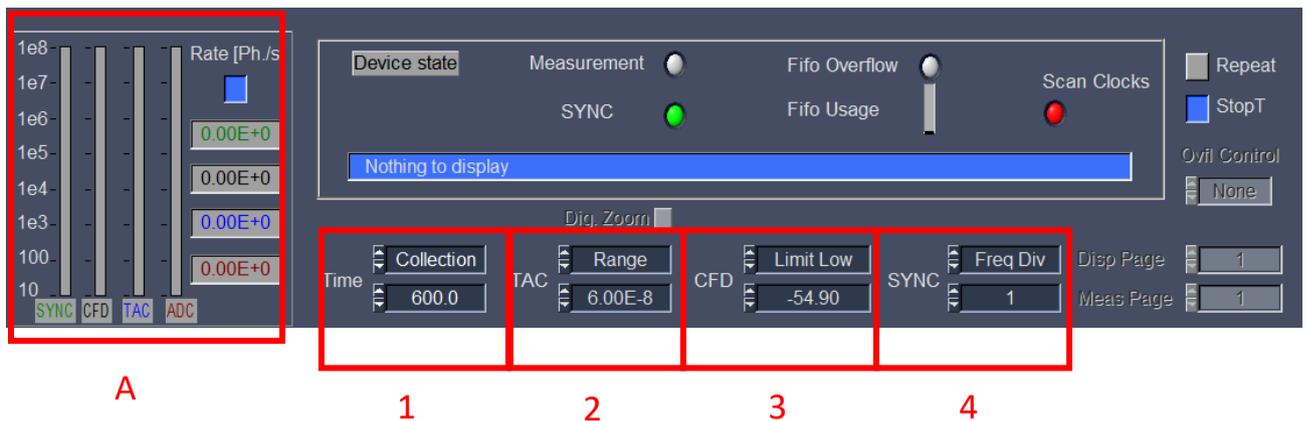
TAC Parameters:

- Range: $6.00E-8 \sim 20 \text{ ns}$
- Gain:
- Offset: Einstellung für Beginn der Lifetime Kurve (sollte bei 2-3 ns sein)
- Limit Low:
- Limit High:

Messung

Vorab die Justage von Laser und Lifetime durchführen!

Zeiteinstellung



Mittels „Preview“ die ROI der Probe finden. Bei schwach fluoreszierender Probe kann die „Recordzeit“ pro Anzeige erhöht werden (Time; 1). Zoombereich, wenn gewünscht einstellen (siehe Seite 141).

Rate von CFD und TAC (A) für ein gutes Signal mittels der ND Filter einstellen.

VORSICHT: Nicht Detektor überladen. Auf Anzeige für die Detektorsteuerung (Seite 140) achten, dass kein „OVERLOAD“ angezeigt wird!!!

Zur Einstellung der Länge der Messung wird bei (Time; 1) „Collection“ eingestellt. Auch bei „Parameter“ einstellbar:

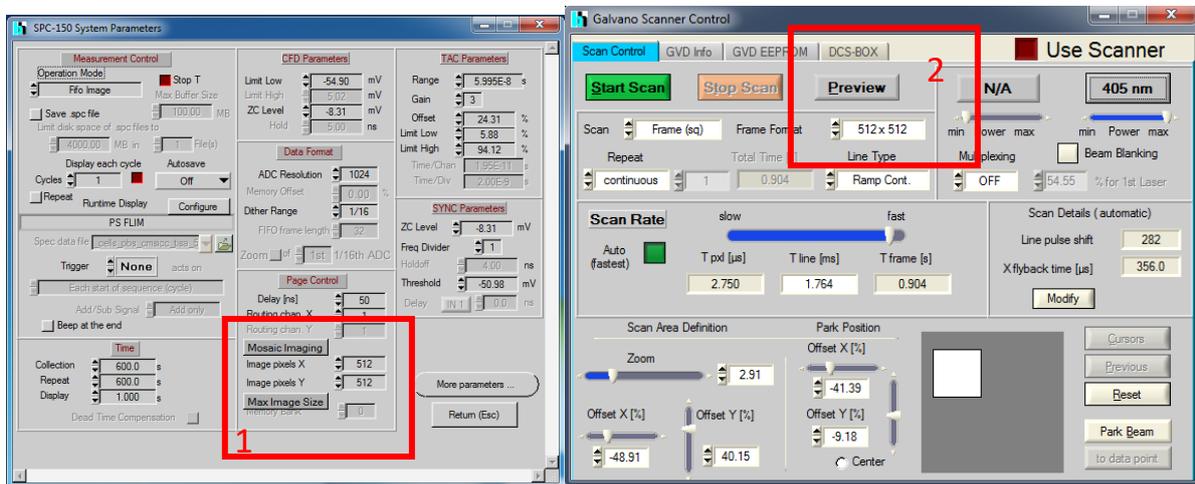
- Collection: Zeit, in der Signal aufsummiert wird
- Repeat: Falls Repeat gewählt wird: Zeit, nach der Collection wiederholt wird
- Display: Zeit, nach welcher das angezeigte Bild erneuert wird

TAC 2:

- Range: Länge der Zeitmessung für TCSPC: 6.00E-8 ~ 20ns
- Gain:
- Offset:

Einstellung der Auflösung:

Maximale Auflösung: 1024 x 1024 pix² bei 1024 Zeitkanälen



Beide Einstellungen müssen vorgenommen werden:

- 1: Einstellung der zu speichernden/ anzeigenden Pixelauflösung
- 2: Einstellung des Galvo-scanners auf selbe Auflösung

Messung starten und speichern

Nach Einstellung von Laser, Lifetime, Zoom, Auflösung und gewünschter Messzeit kann die Messung mittels „Start Scan“ gestartet werden.

Die noch verbleibende Zeit der Messung wird im Hauptbildschirm dargestellt. Auch die gesamte Anzahl der Photonen wird am Ende der Messung angezeigt (im Gerätebuch zu notieren!).

Die Messung wird mittels „Save“ gespeichert. **Wird nach der Messung „Preview“ oder „Messung starten“ gewählt, werden nicht gespeicherte Daten gelöscht!!!**