

Visualisierung kleiner Biomoleküle mittels Fluoreszenz- und Ramanmikroskopie

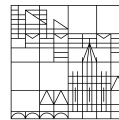
Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Schütter-Kerndl, Britta Juliane

an der

Universität
Konstanz



Mathematisch-Naturwissenschaftliche Sektion

Fachbereich Chemie

Herbrechtingen, 2021

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2021

1. Referent: Prof. Dr. Andreas Zumbusch

2. Referent: Prof. Dr. Andreas Marx

Danksagung:

Die hier vorliegende Arbeit entstand in der Zeit zwischen April 2015 und Dezember 2018 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Zumbusch am Fachbereich Chemie der Universität Konstanz und ist ein Werk von vielen. Deswegen möchte ich allen danken, die mich in dieser Zeit unterstützt haben.

An erster Stelle geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. Andreas Zumbusch für die Überlassung eines Themas, bei dem ich mich sowohl mit chemischer Synthese als auch Zellbiologie und Mikroskopie beschäftigen durfte. Eine vielfältigere Arbeit hätte ich mir nicht wünschen können. Trotzdem war die Zeit nicht immer einfach für mich. Deswegen möchte ich mich auch insbesondere für jegliche Unterstützung bedanken.

Prof. Dr. Andreas Marx danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Unterstützung im Bezug auf alle Fragestellungen zu den verwendeten Nukleosiden und die Diskussionen im Rahmen des Thesis Committes.

Bei Prof. Dr. Valentin Wittmann bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Prof. Dr. Elke Deuerling möchte ich für die Diskussionen und die Unterstützung im Rahmen des Thesis Committes danken.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Franziska Doll, die mir seit dem ersten Tag für Diskussionen und Handgriffe immer unterstützend zur Seite stand und zudem die Klonierungen zur Untersuchung der Malonylierung für mich vorgenommen hatte.

Für die Unterstützung bei CARS- und SRS-Messungen und ein ständiges offenes Ohr für Probleme im Laboralltag danke ich Dr. Martin J. Winterhalder ganz besonders.

Peter Fimpel danke ich für die Zeit und Unterstützung bei SRS-Messungen und den dazugehörigen Auswertungen.

Auch für die Messungen am konfokalen Ramanmikroskop fand ich Unterstützung. Mathias Altenburg stand mir bei sämtlichen Fragen und Justageproblemen immer zur Seite. Herzlichen Dank dafür.

Ohne die Zusammenarbeit mit der AG Marx, Universität Konstanz, wäre es nicht möglich gewesen, verschiedene modifizierte Nukleoside als Reporter zu testen. Ein herzlicher Dank für die Reportersynthese geht an Dr. Jana Balintová und Yizhi Yuan.

Für die Unterstützung bei der Synthese der Malonylierungsreporter danke ich Prof. Dr. Ewald Daltrozzo und Dr. Birte Schröder für die Diskussionen.

Franziska Rabold und Brunhilde-Anna Kottwitz sorgten während meiner Zeit im Labor für eine gute Arbeitsatmosphäre und standen mir immer mit ihren Erfahrungen und ihrer technischen Unterstützung zur Seite. Ein besonderer Dank geht auch an Franziska Rabold, die in wilden Zeiten einfach auf alles eine Antwort wusste.

Anke Friemel und Ulrich Haunz danke ich für die Durchführung von NMR-Messungen und Diskussionen zu NMR-Spektren.

Meine Arbeiten im Labor wurden von Mitarbeiterpraktikanten unterstützt. Emilia Amro half mir beim Test verschiedener Nukleoside und mit John Geiger entstanden die meisten Ramanspektren am konfokalen Ramanmikroskop.

Ein herzlicher Dank geht an die Graduiertenschule Chemische Biologie der Universität Konstanz (KoRS-CB), die mich durch ein Promotionsstipendium unterstützte und damit die Entstehung dieser Arbeit möglich machte.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Ehemann Stefan für die alltägliche Unterstützung, sei es finanziell, seelisch oder einfach durch Ablenkung vom Alltag bedanken und freue mich auf viele gemeinsame Stunden.

Zusammenfassung

Nirgends arbeiten Biophysiker, Biochemiker, Physiker und Chemiker so eng zusammen wie bei der Aufklärung des Zusammenspiels von Struktur und Reaktivität kleiner Biomoleküle in biochemischen Prozessen, sei es *in vitro* als auch *in vivo*.^[1] Die immer bessere Auflösung in der Mikroskopie und die Anwendung verschiedener mikroskopischer und biochemischer Techniken ermöglichten es, einige grundlegende Fragen zu klären, brachten jedoch vor allem auch neue auf. Dies ergab die Notwendigkeit, Biomoleküle zu markieren und damit, im besten Fall in lebenden Zellen, sichtbar zu machen. Ein wichtiger Schritt Proteine zu visualisieren, gelang mit der Entdeckung und Charakterisierung des „Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP)“.^{[2],[3],[4]} Fluoreszierende Proteine können an andere Proteine fusioniert werden, um diese zu markieren. Dies ist eine wichtige Technik zur Aufklärung der Lokalisierung von Proteinen oder deren Funktion in Zellen. Die Größe von GFP kann jedoch die Struktur, insbesondere von kleineren Proteinen, stören und damit ebenso deren Funktion. Zudem können Fusionsproteine keinen Aufschluss über die Funktion und Lokalisierung kleinerer Biomoleküle wie Lipide, Glycane oder Nukleoside geben.^[5] Die Verwendung von Antikörpern zur Detektion von Biomolekülen wurde sowohl in lebenden Zellen als auch in Organismen angewandt.^[6] Doch auch hier ergeben sich Probleme durch die Größe der Moleküle. Deswegen war es notwendig, eine neue Strategie zu entwickeln, mit der es möglich ist, auch kleine Biomoleküle sichtbar zu machen.

Mit der Verwendung bioorthogonaler chemischer Reportermoleküle konnte diesem Ziel näher gekommen werden.^[5] In dieser Arbeit werden Alkin-markierte Reportermoleküle zur Visualisierung kleiner Biomoleküle verwendet. Alkine als funktionelle Gruppe finden sich von Natur aus nicht in der Zelle oder anderen lebenden Organismen. Zudem sind sie kleine Labels, die die Struktur des zu untersuchenden Biomoleküls, und somit auch dessen Funktion, oft nur wenig stören. Zur Detektion können schließlich Fluoreszenzmikroskopie oder Schwingungsspektroskopie in Betracht gezogen werden. Da Alkine eine hochselektive Reaktion mit Aziden eingehen, können auf diese Art Azid-funktionalisierte Farbstoffe mit Alkinen in einer von Kupfer(I)-katalysierten Reaktion in der Zelle reagieren und damit Fluorophore an das Zielmolekül kovalent angeknüpft werden. Eben diese Reaktion wurde in dieser Arbeit zunächst zur Untersuchung der post-translationalen Modifikation Malonylierung angewandt. Als Reportermoleküle kamen hierfür Alkin-funktionalisierte Malonsäurederivate mit hydrophoben Estergruppen zum Einsatz, die zunächst synthetisiert wurden. Die anschließende Behandlung von HEK293T und HeLa S3 Zellen mit diesen Reportern zeigte, dass diese von der Zelle direkt aufgenommen und selbst biosynthetisch eingebaut werden. Der Einbau konnte sowohl durch Lyse der Zellen und anschließendes Western Blotting als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Der zusätzliche Nachweis einer proteinspezifischen Markierung durch Malonylierungsreporter mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) konnte

jedoch nicht gezeigt werden. Für diese Methode ist es notwendig, das gewünschte Protein mit einem GFP zu verknüpfen und es in den Zellen zu exprimieren. Es ergab sich jedoch, dass auch das GFP selbst durch den Malonylierungsreporter modifiziert wird, was in folgenden FRET-Messungen immer zu einem FRET-Signal geführt und damit proteinspezifische Aussagen über Modifikationen verhindert hätte.

Alkin-modifizierte Moleküle zeigen in Ramanspektren ein Schwingungssignal der C-C-Dreifachbindung in einer Region, in der Zellen selbst kein Signal aufweisen.^[7] Dies macht es besonders attraktiv, mit Alkinen modifizierte Reporter mittels Ramanmikroskopie zu untersuchen und diese in zellulären Systemen anzuwenden. Zudem wird dadurch die Anbringung eines Farbstoffs an den Reporter überflüssig. Dies bedeutet, dass keine im Vergleich zum Biomolekül großen Farbstoffe verwendet werden müssen. Dadurch wird die Anwendung des für die Zelle toxischen Kupfers überflüssig und die Verwendung des Reporters in lebenden Zellen möglich. Aufgrund des kleinen Streuquerschnitts ist spontane Ramanmikroskopie jedoch sehr insensitive. In dieser Arbeit wurden an einem Ramanmikroskop Ramanspektren von Biomolekülen aufgenommen, die später in zellulären Systemen untersucht werden sollten. Zudem wurden auch nicht-lineare Ramantechniken wie CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) und SRS (stimulated Raman scattering), welche deutlich sensitiver sind, verwendet. Hierbei wurden zunächst in Zellen in sogenannten Lipid droplets (LDs) akkumulierte Fettsäuren visualisiert. Da diese in besonders hohen Konzentrationen in Zellen vorkommen, konnten hier sowohl mit CARS als auch SRS an einem in der Arbeitsgruppe selbst gebauten Aufbau und an einem kommerziellen Gerät kontrastreiche Bilder von Zellen erhalten werden. Für die Visualisierung von Nucleosiden stellte sich dies als deutlich schwieriger heraus. Trotz eingehender Studien mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die RNA durch die Markierung mit dem Alkin-modifizierten Nucleosid 5-Ethynyluridin (EU) nicht visualisiert werden. Die Markierung der DNA mit 5-Ethynyldeoxyuridin (EdU) ermöglichte deren Visualisierung durch die Verwendung von SRS-Mikroskopie in lebenden Zellen. Ebenso gelang es, post-translational mit Malonylresten modifizierte Proteine nicht nur wie oben genannt mit Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen, sondern auch in lebenden Zellen durch SRS-Mikroskopie zu visualisieren.

Gliederung

1. Einleitung

2. Grundlagen

- 2.1 Bioorthogonale Reaktionen
- 2.2 Malonylierung von Proteinen
- 2.3 Ramanspektroskopie und -mikroskopie
- 2.4 Visualisierung von Nukleosiden

3. Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

- 3.1 Strategie
- 3.2 Synthese der Reporter
- 3.3 Viabilität
- 3.4 Einbau der Malonylierungsreporter und Fluoreszenzmikroskopie
- 3.5 Nachweis der Malonylierung mittels Western Blotting

4. Fluoreszenz- und Ramanmikroskopie an Alkinverbindungen

- 4.1 Strategie und Herangehensweise
- 4.2 Verwendete Nukleoside und Toxizitätstests
- 4.3 Einbau der Nukleosid-Reporter und Fluoreszenzmikroskopie
- 4.4 Ramanmikroskopie von Alkinverbindungen
 - 4.4.1 Hinführende Experimente
 - 4.4.2 Nicht-lineare Ramanmikroskopie mit Alkin-funktionalisierten Reporter-molekülen

5. Zusammenfassung und Ausblick

6. Material und Methoden

- 6.1 Material
 - 6.1.1 Eukaryotische Zellen
 - 6.1.2 Medien, Puffer, Reagenzien, Farbstoffe und Kits
 - 6.1.3 Antikörper
 - 6.1.4 Plasmide
 - 6.1.5 Geräte
 - 6.1.6 Verbrauchsmaterialien
 - 6.1.7 Chemikalien zur Synthese
 - 6.1.8 Software
- 6.2 Methoden
 - 6.2.1 Zellkultur
 - 6.2.2 Viabilität

Einleitung

6.2.3 Behandlung mit Malonylierungsreportern

6.2.4 Behandlung mit Nukleosiden

6.2.5 Behandlung mit Fettsäuren

6.2.6 Färben der Zellen

6.2.7 Chemische Zelllyse

6.2.8 Färben der Zelllysate

6.2.9 Proteinfällung

6.2.10 Denaturieren der Proteine

6.2.11 Gelelektrophorese und Western Blotting

6.2.12 Transfektion von HEK293T-Zellen

6.2.13 IP

6.2.14 Färben und Denaturieren der IPs

6.2.15 Fluoreszenzmikroskopie

6.2.16 Ramanmikroskopie

6.2.17 SRS

6.2.18 CARS-Mikroskopie

6.2.19 Probenvorbereitung für die SRS-Mikroskopie am TCS SP8

6.2.20 Chemische Synthese

6.2.21 NMR-Spektroskopie

7. Abkürzungsverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Sowohl kleine Organelle in Zellen als auch große Organe werden durch hochkomplexe biologische Signalwege gesteuert. Diese Steuerungsprozesse müssen am besten bis ins Kleinste verstanden werden, um in ein biologisches System eingreifen und damit Fortschritte in der Pharmazie oder Medizin erzielen zu können. Dynamische Prozesse, chemische Reaktionen, das räumliche und zeitliche Zusammenspiel einzelner Zellorganelle und deren räumliche Anordnungen bilden die Grundlage dafür, Zellteilung, Differenzierung und das Absterben von Zellen überhaupt erklären zu können. Kleine Biomoleküle wie Glycane, Lipide und Adenosintriphosphat (ATP), aber auch Biopolymere wie Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und Proteine bilden die Grundstrukturen von Zellen und damit ganzer Lebewesen.^[8] Eine große Hilfe zum Verständnis und zur Aufklärung biochemischer Prozesse und des zellulären Aufbaus leistet dabei die Mikroskopie. Um jedoch einen bestimmten zellulären Prozess, eine biochemische Reaktion oder bestimmte Modifikation in Zellen verfolgen zu können, bedarf es einer Hervorhebung der Biomoleküle durch bestimmte funktionelle Gruppen zur Entstehung eines chemischen Kontrasts.^{[9],[10]} Dies kann durch die Einführung einer chemischen Funktionalität ermöglicht werden, die in der Zelle von Natur aus nicht vorhanden ist. Man spricht dabei von Reporter-molekülen, die hohe Anforderungen erfüllen müssen. Diese dürfen im zellulären Umfeld nicht vorkommen, die biochemischen Abläufe im Metabolismus nicht durcheinander bringen und müssen in der Zelle hochselektive Reaktionen eingehen können. Die zugrundeliegende Strategie besteht darin, dass ein Reporter-molekül mit einer für die Zelle einzigartigen Funktionalität in das zelluläre System eingebracht wird, als natürliches Biomolekül von den zellulären Enzymen erkannt und in den Metabolismus integriert wird (Abbildung 1). Dabei sollte die Struktur des Zielmoleküls nicht zerstört werden. In einem zweiten Schritt, soll der in die RNA, DNA, in ein Glycan oder in Proteine eingebaute Reporter mit einem zweiten kleinen Molekül, zum Beispiel einem Farbstoff, in einer bioorthogonalen chemischen Reaktion an das Zielmolekül angeknüpft werden. Die Vorgaben an diese Reaktion sind strikt. Sie muss bei 37°C in wässriger Umgebung und in einem pH-Bereich von 7-8 ohne die Entstehung von Nebenprodukten oder das Einbeziehen weiterer Reaktionspartner, also hochselektiv, aus dem zellulären Milieu möglichst quantitativ und schnell ablaufen.^[5] Zunächst sollen nun Anwendungen vorgestellt werden, die zur Untersuchung von biochemischen Prozessen oder zur Lokalisierung von Biomolekülen einen Beitrag leisten konnten. Weiter soll auf Reporter-moleküle eingegangen werden, die mit einem Alkin funktionalisiert sind. Eben solche Moleküle wurden zur Visualisierung von Biomolekülen auch in dieser Arbeit verwendet.

Einleitung

Bereits 1998 konnten Roger Tsien und Kollegen eine Anwendung vorstellen, bei der ein Tetracystein-Motiv bestehend aus sechs Aminosäuren über freie Thiolgruppen spezifisch an einen Biarsen-Fluoreszenzfarbstoff angeknüpft werden konnte. Der Vorteil gegenüber den bereits verwendeten fluoreszierenden Fusionsproteinen war dabei, dass aufgrund der geringen Größe nur kleine Einflüsse auf die Struktur des Zielmoleküls beobachtet wurden. Zudem zeigte die Detektion von Fluoreszenz an, dass tatsächlich eine Anbindung des Farbstoffs an das Zielprotein stattgefunden haben muss, da dieses nur im gebundenen Zustand emittiert.^{[11],[12],[13]}

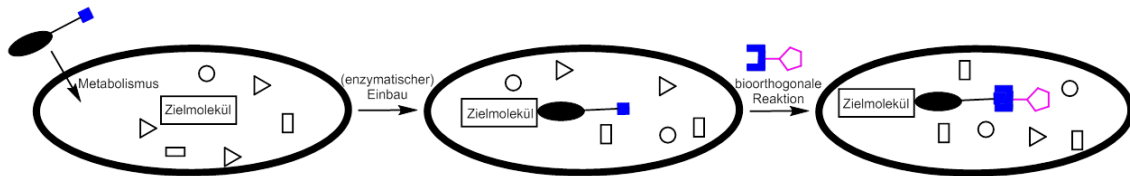


Abbildung 1: Die bioorthogonale Reporterstrategie: Eine Reporterfunktionalität (blau), die an ein kleines Substrat (schwarze Ellipse) kovalent gebunden ist, wird in die Zelle gebracht, metabolisiert und in das zu untersuchende Zielmolekül eingebaut. In einem zweiten Schritt reagiert der Reporter mit einem Fluorophor in einer bioorthogonalen Reaktion. Dies bedeutet, dass an der Reaktion keine intrazellulär vorkommenden Funktionalitäten beteiligt sind.

Ein weiterer Schritt in Richtung Bioorthogonalität war die Reaktion von Aldehyden und Ketonen mit Aminoxy- und Hydrazidgruppen. Da Aldehyde und Ketone nicht in Proteinen an der Zelloberfläche vorkommen und Aminoxy- und Hydrazidgruppen in Zellen gänzlich abwesend sind, können diese als Reporter angesehen werden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass Ketozucker in Glycane eingebaut werden konnten.^{[14],[15]} Trotzdem setzte sich diese Art von Modifikation nicht durch, da sowohl Aldehyde als auch Ketone im Zellinneren zahlreich vorhanden sind und damit keine Selektivität für bestimmte Zielmoleküle geschaffen werden konnte.^[16]

Geeignete chemische Reporter sollten in der zellulären Umgebung nicht vorhanden sein. Dies führt dazu, dass auch Amine, Thiole und Maleimide, die zur Biokonjugation verwendet werden, nicht in Frage kommen und damit nur wenige funktionelle Gruppen überhaupt eingesetzt werden können.^[5]

Azide waren im Jahr 2000 die ersten funktionellen Gruppen, die als echte bioorthogonale Funktionalitäten fungieren konnten. Sie existieren weder in Zellen noch reagieren sie mit anderen funktionellen Gruppen in der Zelle. Azide sind kinetisch stabil, reagieren jedoch sehr gut als 1,3-Dipole und weiche Elektrophile. Zudem werden azidmodifizierte Biomoleküle oft von zellulären Enzymen umgesetzt.^[17] In den folgenden Jahren wurden Azide in der Staudinger Ligation,^[18] der Kupfer-katalysierten [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC)^[19] und der durch Ringspannung katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC)^[20], auf die in Kapitel 2 näher eingegangen werden soll, in biologischen Systemen eingesetzt.

Als Reaktionspartner der Azide in der [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition und der durch Ringspannung katalysierten Cycloaddition können auch Alkine als funktionelle Gruppen in Reportermolekülen eingesetzt werden. Auch diese kommen von Natur aus in biologischen Systemen nicht vor und sind gegenüber anderen funktionellen Gruppen in der zellulären Umgebung nicht reaktiv. Die [3+2] Cycloaddition läuft zudem im Gegensatz zur Staudinger Ligation schneller ab. Diese thermodynamisch begünstigte Reaktion wurde zum ersten Mal von Huisgen erwähnt.^[21] Hierbei reagieren Alkin und Azid zu stabilen 1,2,3-Triazolen. Um nicht unter hohen Temperaturen oder hohen Drücken arbeiten zu müssen, was mit biologischen Systemen nicht in Einklang gebracht werden kann, muss das Dipolarophil zunächst aktiviert werden.^[5] Dies kann zum Beispiel durch die Katalyse mit Cu(I) geschehen. Die Gruppen um Sharpless und um Meldal zeigten dies annähernd zeitgleich.^{[22],[23]} Diese Reaktion läuft nahezu regioselektiv ab und wird auch als „Click-Chemie“ bezeichnet, was genau genommen eine Klasse von Reaktionen kennzeichnet.^[5] Genauere Erläuterungen dazu werden in Kapitel 2 gegeben.

Wie auch in dieser Arbeit wurden in der folgenden Zeit Alkin-funktionalisierte Reporter in verschiedensten Biomolekülen eingesetzt, wofür im Folgenden einige Beispiele aufgezeigt werden sollen. Hsu und Kollegen etwa untersuchten Glycoconjugate an der Zelloberfläche und auch intrazellulär in verschiedenen Krebszelllinien. Hierzu verwendeten sie Alkin-modifizierte Fucose und alkinierte *N*-Acetylmannosamin-Bausteine, die in fucosylierte und sialylierte Glycane eingebaut wurden. Die Anbindung von Fluorophoren via Kupfer-katalysierter [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Lokalisierung der jeweiligen Glycane konnte zudem mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden.^[24]

Bioorthogonale Reportermoleküle machten es ebenso möglich, post-translationale Modifikationen zu verfolgen. Auch hierfür wurden kleine Alkin-modifizierte Biomoleküle verwendet, die vom zellulären System in die zu untersuchenden Proteine eingebaut wurden.

6-Alkynyl-Nicotinamidadenindinukleotid (6-Alkynyl-NAD) etwa ist ein sehr wirkungsvoller Reporter zur Untersuchung der Adenosindiphosphat-(ADP-) Ribosylierung. Dieser konnte zur Isolierung und Identifizierung von Substratproteinen der Poly-ADP-Polymerasen (PARPs) verwendet werden, indem diese durch die Anknüpfung eines Fluorophors im Gel nach einer Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) detektiert werden konnten.^[25]

Wie bereits erwähnt, wurden in dieser Arbeit Alkin-funktionalisierte Reportermoleküle zur Visualisierung kleiner Biomoleküle verwendet. Unter anderem wurden diese zur Untersuchung der Malonylierung von Proteinen, einer Modifikation der ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten in Proteinen, eingesetzt. Bao und Kollegen entwickelten einen Reporter (MalAMyne) zur Untersuchung dieser post-translationalen Modifikation. Dabei konnten sie mittels in-Gel Fluoreszenz und massenspektrometrisch zeigen, dass der Reporter in Proteine eingebaut wird. Ebenso konnten damit einige malonylierte Proteine identifiziert werden.^[26] Eine

Visualisierung der Malonylierung mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde von dieser Gruppe nicht beschrieben. Genau dies wird in dieser Arbeit vorgenommen.

Alkinfunktionalisierungen wurden auch zur Untersuchung von RNA verwendet, was in dieser Arbeit ebenso getan wurde. Ein Beispiel aus der Literatur für die Modifikation von RNA sind modifizierte Phosphoramidit-Building Blocks für die Festphasensynthese. Shukla und Kollegen präsentierten hier deren Anwendung in small interfering RNAs (siRNAs).^[27] Vor allem jedoch wurden modifizierte Nukleoside zur Untersuchung der DNA-Synthese während der Zellteilung und der Synthese von Nukleosiden überhaupt sowie zur Visualisierung von DNA und RNA eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit kam das Alkin-funktionalisierte Nukleosid 5-Ethynyluridin (EU) zur Untersuchung der RNA zum Einsatz. Salic und Kollegen verwendeten 5-Ethynyl-2-desoxyuridine (EdU) für die Visualisierung der DNA-Synthese während der Zellproliferation mittels der Kupfer-katalysierten [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition, sowohl in Zellen als auch in Gewebeproben einer Maus.^[28] Dieselbe Gruppe verwendete auch EU zur Detektion von RNA-Synthese, ebenfalls via Kupfer-katalysierter [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition. Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte die Detektion von RNA in NIH 3T3 Zellen, genauso wie in verschiedenen Gewebeproben von Mäusen.^[29] Inzwischen wurden auch weitere Alkin-modifizierte Nukleoside zur Visualisierung von DNA und RNA eingesetzt, wie es auch in dieser Arbeit der Fall ist. Ein tieferer Einblick soll dabei in Kapitel 2 gegeben werden.

Eine weitere Klasse von Biomolekülen, die zum Verständnis von biochemischen Prozessen wichtig ist, sind Lipide. Diese sind an einer Reihe zellulärer Prozesse beteiligt, zum Beispiel der Signalweiterleitung bzw. generell im gesamten Fettstoffwechsel. Die erste erfolgreiche Markierung von Lipiden wurde von Anne Neef in der Gruppe von Carsten Schultz vorgenommen. Sie modifizierte Phospholipidderivate mit Alkinen zur Verwendung in der CuAAC. In fixierten Zellen konnten die Lipide mittels eines Azid-funktionalisierten Coumarinfarbstoffs und Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Da die Toxizität von Kupfer die Notwendigkeit mit sich bringt, die Zellen vor der Cycloaddition zu fixieren, ist es nicht möglich dynamische Prozesse mit dieser Methode zu beobachten. In lebenden Zellen wurde deshalb auf die durch Ringspannung katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition zurückgegriffen. Mit einem synthetisierten Phospholipid, welches eine Cyclooctin-Gruppe enthält, konnten Lipide in lebenden Zellen sichtbar gemacht werden. Da Lipide jedoch sehr kleine Biomoleküle sind, wird deren Struktur möglicherweise bereits durch eine Cyclooctin-Modifikation beeinflusst.^[30] Hier werden die Nachteile von Fluoreszenzmikroskopie deutlich. Ein weiterer Nachteil ist die Verwendung von Kupfer. Aufgrund der Toxizität der Kupferionen ist es nicht möglich, in lebenden Zellen mit der CuAAC zu arbeiten. Vor der Anwendung von Kupfer müssen die Zellen aus diesem Grund fixiert werden. Damit ist die Beobachtung von dynamischen Prozessen mit der CuAAC in einer Zelle nicht möglich. Des Weiteren können eingesetzte Fluorophore aufgrund ihrer Größe die Struktur kleiner Biomoleküle

beeinflussen oder deren Funktion komplett zerstören. Weiterhin sind Langzeitstudien mit Fluorophoren nicht ideal, da sie zu Fotobleichen neigen und damit die Intensität des Fluoreszenzsignals nicht zuverlässig über eine längere Zeit verglichen werden kann.^[31] Die Anwendung von Schwingungsmikroskopie könnte ein Weg sein, diese Probleme zu überwinden. In dieser Arbeit wurden nach der Verwendung der Alkin-funktionalisierten Reporter zur Visualisierung von Nukleosiden mittels Fluoreszenzmikroskopie dieselben Reporter zur Visualisierung mittels Ramanmikroskopie angewandt. Ramanmikroskopie ist eine Technik, die nicht-invasiv, sensitiv und spezifisch ist und dabei meist auf Markierungen von Molekülen verzichtet.^{[32],[33]} Die für eine chemische Bindung charakteristische Schwingung bietet dabei über deren Schwingungsfrequenz den Kontrast. Auch hierfür ist die Funktionalisierung der zu untersuchenden Biomoleküle mit Alkinen hervorragend geeignet. Die kleine Modifikation zeigt im Bereich von 2125 cm^{-1} eine scharfe Ramanbande, einem Bereich, in dem andere zelluläre Bestandteile kein Signal zeigen.^[34] Spontane Ramanspektroskopie ist jedoch aufgrund des kleinen Streuquerschnitts von etwa 10^{-30} cm^2 pro Molekül im Gegensatz zur Fluoreszenz mit 10^{-16} cm^2 pro Molekül eine Technik, die lange Integrationszeiten erfordert. Dies ist für die Untersuchung von biologischen Systemen unpraktisch, da keine dynamischen Prozesse damit untersucht werden können. Mikroskopie mit kohärenter Raman Streuung (CRS Mikroskopie) wie CARS- und SRS-Mikroskopie dagegen liefern deutlich höhere Signalintensitäten, sodass die Bildgebung im Gegensatz zu einem herkömmlichen Ramanmikroskop 1000- bis 10000-mal schneller möglich ist.^[35] Alkin-modifizierte Biomoleküle wie EU, EdU, *L*-Homopropargylglycin, Propargylcholin und 17-Octadecinsäure wurden in RNA, DNA, Proteine, Phospholipide bzw. Triglyceride eingebaut und mittels SRS-Mikroskopie in lebenden Zellen visualisiert.^[34] In der vorliegenden Arbeit wurde hierbei hauptsächlich mit EU gearbeitet.

SRS-Mikroskopie ist nicht nur in Zellen, sondern auch in Gewebe möglich. So wurden DNA, RNA und Lipide in Hirngewebe aus dem Hippocampus von Ratten untersucht – unter der Verwendung von ebenso EU, EdU und Propargylcholin. Dabei konnten metabolische Veränderungen beobachtet werden, die durch das Nachstellen eines Traumas während eines Autounfalls hervorgerufen wurden.^[36]

Die Möglichkeiten, biologische Systeme anhand kleiner Reportermoleküle mit nicht-linearen Ramantechniken zu untersuchen, werden immer ausgedehnter. Trotzdem ist dies nicht trivial. Weitere Beispiele und die Anwendung weiterer Reporter soll in Kapitel 2 genauer beleuchtet werden.

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Anwendung Alkin-funktionalisierter Reportermoleküle sowohl in der Fluoreszenz- als auch in der Ramanmikroskopie. Ziel dieser Arbeit ist die Verfolgung zellulärer Prozesse mit Alkin-modifizierten Reportern und bioorthogonales Markieren am Beispiel der Malonylierung im ersten Teil. Die Ergebnisse dazu sind im dritten Kapitel dargestellt und umfassen die Synthese der verwendeten Reportermoleküle, deren

Anwendung und den Einbau in menschliche Zellen und die Visualisierung der Malonylierung anhand von Fluoreszenzmikroskopie. Die Malonylierung von Proteinen ist eine post-translationale Modifikation der Klasse der Acylierungen, hauptsächlich an der Aminogruppe der Seitenkette der Aminosäure Lysin. Da sie erst 2011 zum ersten Mal nachgewiesen wurde, sind zwar einige Funktionen in biochemischen Prozessen, als auch in Krankheitsbildern bekannt, aber bisher nicht eingehendst untersucht worden.^[37] Bao und Kollegen entwickelten einen Reporter für die Malonylierung, der auch in dieser Arbeit untersucht und zur Visualisierung verwendet wurde.^[26] Zudem wurden Experimente durchgeführt, die mehr Informationen zur Enzymkatalyse liefern sollen.

Im zweiten Teil, dessen Ergebnisse im vierten Kapitel dargestellt sind, geht es um die direkte Verfolgung des zellulären Einbaus von (Alkin-modifizierten) Biomolekülen mit Ramanmikroskopie. Der Visualisierung von modifizierten Nucleosiden mittels Ramanmikroskopie gehen Untersuchungen mit Fluoreszenzmikroskopie und die Visualisierung von Lipiden voraus, was ebenfalls in diesem Kapitel diskutiert wird. Die notwendigen Hintergründe werden im zweiten Kapitel genauer erklärt. In Kapitel 5 werden die Ergebnisse nochmals zusammengefasst und es wird ein Ausblick gegeben.

2. Grundlagen

2.1 Bioorthogonale Reaktionen

Wie bereits im ersten Kapitel erwähnt, sind die Anforderungen an eine Reaktion, die innerhalb einer Zelle oder eines Organismus zur selektiven Markierung von Biomolekülen durchgeführt werden soll, hoch. Die beiden miteinander reagierenden funktionellen Gruppen sollten von Natur aus nicht in der Zelle vorkommen, damit deren Reaktion miteinander selektiv abläuft, ohne die Prozesse in der Zelle zu stören. Um Untersuchungen in lebenden Systemen durchführen zu können, müssen diese zwischen 25 und 37 °C durchgeführt werden, ebenso ist es nicht möglich, unter erhöhtem oder erniedrigtem Druck zu arbeiten. Zelluläre Systeme, genauso lebende Organismen, sind wässrige Systeme. Reaktionen in der organischen Chemie werden meist nicht im wässrigen Milieu durchgeführt. Auch hier liegt eine Herausforderung bei der Reaktionsführung. Entstehen während der Reaktion Nebenprodukte, möglicherweise mit toxischen Wirkungen, wird dies negative Auswirkungen auf die Viabilität des zu untersuchenden Systems mit sich bringen, was wiederum die Aussagekraft einer Messung stark einschränkt.^[17]

All diese Anforderungen werden von einer Klasse von Reaktionen erfüllt, die unter dem Begriff „Click-Reaktionen“ zusammengefasst werden. Dieser wurde von der Gruppe von Sharpless geprägt und bezeichnet Reaktionen, bei denen kleine Moleküle unter der Ausbildung einer C-X-C Kohlenstoff-Heteroatom-Kohlenstoff-Bindung miteinander reagieren. „Das Ziel war es, ein Baukastenprinzip an Funktionalitäten zu entwickeln, das sowohl in kleinen als auch großen Ansätzen anwendbar ist. Die darin enthaltenen Reaktionen unterliegen strengen Kritikpunkten wie, dass diese umfangreich sein müssen, hohe Ausbeuten erzielt werden sollen, und nur unbedenkliche Nebenprodukte dabei entstehen, die ohne chromatographische Methoden abgetrennt werden können. Eine weitere Anforderung ist die Stereospezifität. Die Bedingungen, unter denen derartige Reaktionen ablaufen sollen, müssen einfach sein. Das beinhaltet keine Empfindlichkeit gegenüber Wasser und Sauerstoff, leicht zugängliche Edukte und kein oder ein Lösungsmittel wie Wasser, ebenso eine einfache Abtrennung der Produkte, die unter physiologischen Bedingungen stabil sind.“^[38] Cycloadditionsreaktionen bilden eine Untergruppe, die diese Anforderungen erfüllen und thermodynamisch gesteuert sind, meist mit einer Energie von mehr als 80 kJ mol⁻¹. Konkret sind hier die Diels-Alder-Reaktion und Cycloadditionen mit 1,3-Dipolen zu nennen, wobei fünf- und sechsgliedrige Heterocyclen ausgebildet werden. Auch nukleophile Substitutionen wie Ringöffnungen, bei denen Ringspannung abgebaut wird, Reaktionen von Carbonylgruppen, in denen Harnstoffe, Thioharnstoffe, aromatische Heterozyklen, Hydrazone, Oximether oder Amide gebildet werden, und Additionsreaktionen an C-C-

Mehrfachbindungen dürfen dazu gezählt werden.^[38] Die drei wichtigsten bioorthogonalen Click-Reaktionen, die zur Markierung von Biomolekülen verwendet werden und wurden, sollen im Folgenden präsentiert werden. Die erste davon war die sog. Staudinger Ligation. Anschließend folgten die [3+2] Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) und die durch Ringspannung katalysierte Cycloaddition (SPAAC) (Abbildung 7).

Die Staudinger Ligation:

1919 postulierte Hermann Staudinger in seinen Arbeiten über neue organische Phosphorverbindungen, dass tertiäre Phosphane mit Aziden über ein Phosphazid unter der Abspaltung von Stickstoff zu Phosphaniminen reagieren.^[39] Unter Zugabe von Wasser bilden sich ein Amin und ein Phosphanoxid aus (Abbildung 2). Diese Reaktion wird auch als Staudinger Reaktion bezeichnet.^[40]

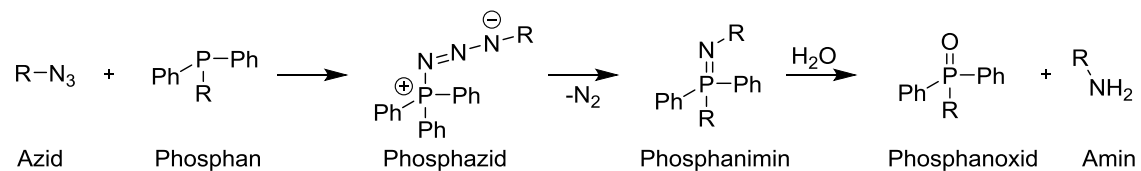


Abbildung 2: Schema der Staudinger Reaktion am Beispiel eines Azids, wobei R einen organischen Rest darstellt, und Triphenylphosphan, die über ein Phosphazid unter der Abspaltung von Stickstoff zu einem Phosphanimin reagieren. Die Zugabe von Wasser ergibt ein Phosphanoxid und ein Amin.

Sowohl Azide als auch Phosphane kommen von Natur aus nicht in zellulären Systemen vor. Dies macht diese beiden funktionellen Gruppen zur intrazellulären Markierung von Biomolekülen interessant. Die Ausbildung zweier Produkte, und damit die Entstehung eines Nebenprodukts, ist nicht erwünscht. Zudem ist das Phosphazid-Intermediat ein Aza-ylid, welches in Wasser nicht stabil ist. In der Gruppe von Carolin Bertozzi wurde dabei ein Phosphan entwickelt, das einen Methylester enthält, dessen Carbonylkohlenstoff vom negativ geladenen Stickstoff intramolekular angegriffen werden kann.^[18] Nach dieser Zyklisierungsreaktion entsteht durch die Reaktion mit Wasser das Endprodukt, das sowohl ein Amid als auch ein Phosphanoxid enthält. Zudem sollte dabei kein zweites Produkt entstehen. Dies wurde sowohl an Jurkat T Zellen als auch an HeLa Zellen getestet, welche zunächst mit acetyliertem *N*-Acetylmannosamin behandelt und anschließend mit einem Biotin-Phosphan und mit Fluoresceinisothiocyanat gefärbt wurden. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine Anreicherung der Biotinmoleküle an der Zelloberfläche, an welcher die modifizierten Zucker eingebaut werden, beobachtet werden. Dies waren die Anfänge der sogenannten Staudinger Ligation.^[18] Im Folgenden wurden auch O-verknüpfte Glycoproteine des Mucintyps durch die Staudinger Ligation untersucht. Unter mehreren *N*-Acetylgalactosaminderivaten (GalNAc), die eine Azidfunktionalität tragen, stellte sich *N*-azido-Galactosamin als das Effektivste heraus. Dieses wird meta-

bolisch in O-verknüpfte Glycane des Mucintyps eingebaut, kann intrazellulär mit einer Triarylphosphan-Sonde zur Reaktion gebracht und mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Der tatsächliche Einbau in Glycoproteine konnte durch SDS-PAGE nachgewiesen werden, wobei die Sichtbarmachung in beiden Fällen durch Immundetektion geschah.^[41] Die Staudinger Ligation konnte ebenso zur Visualisierung von Glycoproteinen mittels Fluoreszenzmikroskopie angewandt werden. Auch hierfür wurden Zellen, hier aus Ovarien des chinesischen Zwerghamsters (CHO für engl. Chinese Hamster Ovary), mit peracetyliertem *N*-Azido-Galactosamin behandelt, fixiert, permeabilisiert und mit Cyanin 5.5 angefärbt. Fluoreszenzmikroskopie zeigte ein deutliches Anfärben von Strukturen an der Zelloberfläche.^[42] Auch wenn die Staudinger Ligation im wässrigen Milieu bei neutralem pH-Wert und unter Umgebungstemperatur ablaufen kann, sind Nebenreaktionen und damit verbundene Nebenprodukte durch die Oxidation von Phosphanen an Luft oder durch Enzyme möglich. Die langsame Reaktion mit Alkylaziden läuft kinetisch nach 2. Ordnung ab (Geschwindigkeitskonstante $k = 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und erfordert damit hohe Phosphankonzentrationen, da der Angriff des Phosphans an das Azid den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Synthetisch wurden Versuche unternommen, die Nucleophilie des Phosphans zu erhöhen. Dies stellte sich jedoch als herausfordernd dar, ebenso wurde damit die Oxidationsfreudigkeit des Phosphans durch Luft erhöht.^{[43],[16]} Die höhere Reaktionsgeschwindigkeit, genauso wie der synthetische Zugang zu den Edukten Azid und Alkin und deren Stabilität gegenüber Sauerstoff, machen die Kupfer-katalysierte [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition gegenüber der Staudinger Ligation attraktiv.^[17] Diese soll im Folgenden genauer untersucht werden.

Die Kupfer-katalysierte [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC)

Die CuAAC gehört zur Klasse der [3+2] Cycloadditionen, wobei ein ungeladener Fünfring entsteht. Damit dieser ausgebildet werden kann, muss ein 1,3-Dipol mit einem Dipolarophil reagieren. Ein 1,3-Dipol besteht dabei aus einem Molekül mit positiver Partialladung bzw. einem Elektronensextett an Position 1 und einer negativen Partialladung mit freiem Elektronenpaar am Atom an Position 3.

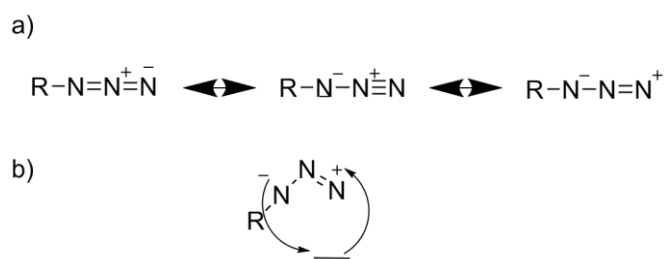


Abbildung 3: Im Teil a) sind die mesomeren Grenzstrukturen des Azids aufgezeigt, wobei R einen organischen Rest darstellt. Teil b): Dargestellt ist der Mechanismus einer Zyklisierungsreaktion eines 1,3-Dipols, wie es ein Azid ist, und eines Dipolarophils, wie etwa einer C-C-Doppelbindung.

Durch die Aufzeichnung mesomerer Grenzformeln wird deutlich, dass die Gruppe im Gesamten ein stabiles Oktett bildet. Der Reaktionspartner ist ein Dipolarophil wie etwa eine C-C-Mehrfachbindung (Abbildung 3).^[21]

Solche 1,3-dipolaren Cycloadditionen werden auch Huisgen-Cycloadditionen genannt und sind exergone Prozesse. Als Dipolarophile kommen für die Reaktion Alkene oder Alkine in Frage. Beispiele für 1,3-Dipolarophile sind etwa Diazoalkane, Azide oder Nitroxide. Azide werden dabei sehr schnell zu Aminen reduziert, gleichzeitig sind diese jedoch extrem stabil gegenüber Wasser und Sauerstoff. Dies macht die funktionelle Gruppe attraktiv für die Verwendung in Click-Reaktionen. Die Reaktion eines Alkins mit einem Azid führt jedoch zu zwei möglichen Regioisomeren, dem 1,4- bzw. 1,5-Regioisomer (Abbildung 4). Ein weiteres Handicap stellt die Notwendigkeit hoher Temperaturen dar. Oftmals wird die Reaktion in Toluol zum Rückfluss erhitzt.^{[22],[23]}

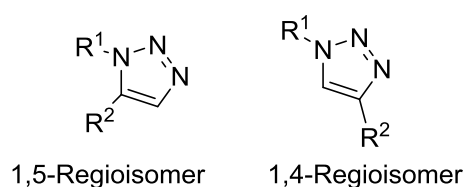


Abbildung 4: Darstellung der beiden Regioisomere, die die Produkte einer Cycloaddition eines Azids mit einem Alkin ergeben.

Die Gruppen um Sharpless^[22] und Meldal^[23] präsentierten nahezu zeitgleich die Katalyse der Reaktion durch Kupfer(I). Sharpless *et al.* berichten von Reaktionsbedingungen wie neutralem pH-Wert, Raumtemperatur, einer Reaktionszeit von sechs bis 36 Stunden und einer Reihe möglicher Lösungsmittel wie verschiedenen Alkoholen, aber auch Wasser. Als Katalysator werden hier Kupfer(II)-Salze verwendet, die *in situ* durch Ascorbinsäure oder Natriumascorbat reduziert werden. Die Ausbeute des 1,4-Isomers beträgt dabei 91 %. Unter diesen Gesichtspunkten kann die Reaktion zur Klasse der Click-Reaktionen gezählt werden. Der hier vorgeschlagene Katalysezyklus sieht zuerst die Bildung eines Kupferacetylids vor, was nur mit endständigen Alkinen möglich ist. Laut Dichtefunktionaltheorie wird zunächst ein sechsgliedriges Intermediat gebildet, das Kupfer(I) im Ring trägt. Erst anschließend kommt es zur Ausbildung des Fünfrings (Abbildung 5).^[22]

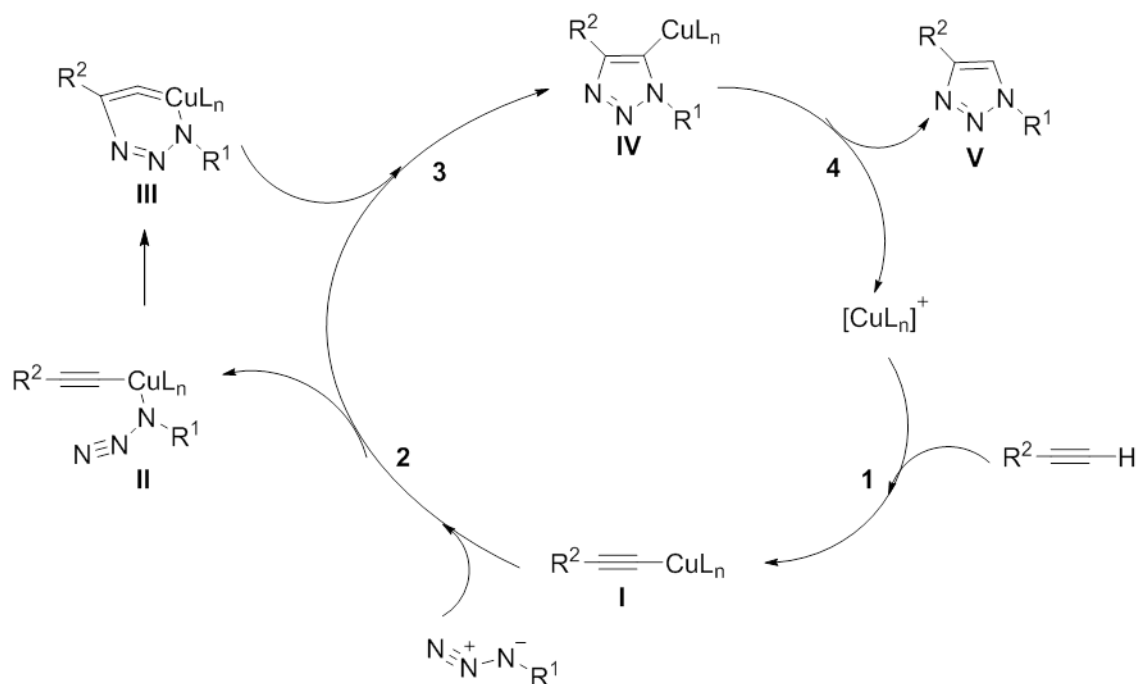
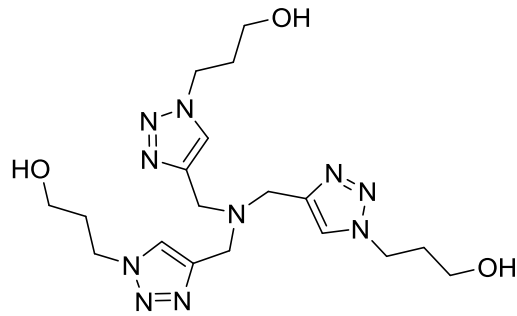


Abbildung 5: Der von Sharpless^[22] vorgeschlagene Katalysezyklus der Kupferkatalysierten [3+2] Cycloaddition: Im ersten Schritt erfolgt dabei die Insertion des Kupfers, das in der Lösung als Komplex vorliegt. Hier als L bezeichnet sind Liganden wie Stickstoffbasen, die dazu beitragen, dass keine sonstigen Nebenprodukte gebildet werden. Im zweiten Schritt erfolgt eine Anlagerung des Azids. Zunächst wird als Intermediat ein Sechsring ausgebildet, bevor der eigentliche Fünfring gebildet wird. Nach der Abspaltung des Kupfers entsteht das 1,4-Regioisomer.

Die Gruppe um Meldal dagegen untersuchte die Katalyse der Reaktion durch Kupfer(I) an einem System der Festphasensynthese von Peptiden.^[23] Bei 25°C und mit CuI als Katalysator konnten damit Ausbeuten von 75-95 % bzw. mehr als 95 % in den meisten Fällen der Peptidsynthese erzielt werden. Als Edukte wurden dabei an das Harz gebundene endständige Alkine und primäre, sekundäre, tertiäre Alkylazide, Arylazide und ein Azidozucker getestet. In allen Fällen erhielten sie ebenfalls nur ein Regioisomer, das 1,4-substituierte [1,2,3]-Triazol. Die besten Ausbeuten jedoch wurden in nicht-wässrigen Lösungsmitteln erzielt.^[23]

Um die Reaktion in biologischen Systemen anwenden zu können, bedarf es jedoch einiger Verbesserungen. Zum einen ist es erforderlich, bei Temperaturen zwischen 20°C und 37°C zu arbeiten und die Reaktionsrate zu erhöhen. Zum anderen muss das eigentliche Substrat vor den schädlichen Einflüssen des Kupfers geschützt werden und dieses jedoch – am besten im wässrigen Milieu in seiner Oxidationsstufe I stabilisiert werden.^[44] Studien dazu wurden zunächst am Cowpea Mosaic Virus durchgeführt, welches an der Oberfläche mit Azid- und Alkinlinkern versehen wurde und mit dem jeweiligen Fluoresceinalkin bzw. -azid zur Reaktion gebracht wurde.^[45] Eine Reaktion ohne Kupfer in der Oxidationsstufe I war dabei nicht möglich. Die Zugabe von Tris(triazolyl)amin jedoch erhöhte die Reaktionsrate, konnte die durch Cu(II)

katalysierte Nebenreaktion der oxidativen Kupplung zweier Alkine zu Diinen verhindern und Proteine vor den schädlichen Einflüssen von Kupfer, wie der Zersetzung durch Kupfer-Triazole, schützen.^[45] Ein Problem des Tris(triazolyl)amins ist jedoch dessen schlechte Löslichkeit in Wasser. Die Reaktion läuft in wässrigem Milieu so langsam ab, dass hohe Konzentrationen an Edukt notwendig werden. Eine Verbesserung konnte durch die Zugabe von sulfoniertem Bathophenanthrolin beobachtet werden. Bei einem pH-Wert von 8,0 konnten mit diesem Liganden Ausbeuten von 85 % und mehr erzielt werden. Ebenso erfüllte dieser die Anforderung, die hydrolytische Spaltung von etwa Peptiden oder Polynukleotiden durch Kupferionen zurückzudrängen, vermutlich durch die Abschirmung des Metallzentrums im Komplex. Da dieser Ligand jedoch nur unter Inertgasatmosphäre eingesetzt werden kann, waren weitere Verbesserungen notwendig.^[44] Studien mit weiteren Liganden ergaben, dass die Cycloaddition durch Liganden mit einem Stickstoffatom im Zentrum die Elektronendichte am Metall erhöht und damit Kupfer(I) stabilisiert. Eine schwache Bindung eines chelatisierenden Liganden ist ausreichend, um das Metall zu stabilisieren, aber gleichzeitig genügend Raum für die Koordination der Substrate zu bieten. Säure- oder Estergruppen in den Seitenketten der Liganden können den Schritt der Spaltung der Cu-C-Bindung beschleunigen. Durch weitere Untersuchungen zur Kinetik wurde klar, dass mindestens zwei katalytisch aktive Spezies im Katalysezyklus vorliegen müssen. Zudem variiert das Geschwindigkeitsgesetz je nach Konzentration der Liganden oder des Katalysators, ebenso in Anwesenheit von Chloridionen und generell durch die Anwesenheit und Art der verwendeten Liganden.^[46] Zusammenfassend gilt für die Reaktionsbedingungen, dass Natriumascorbat die besten Ergebnisse als Reduktionsmittel erzielt. Als besten Liganden stellte sich [Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin] (THPTA) (Abbildung 6), ein wasserlösliches Triazol, heraus, das mit fünf Äquivalenten Überschuss im Vergleich zum Kupfer am effektivsten reaktive Sauerstoffspezies wie H₂O₂ reduzieren kann, die während der Reaktion aufgrund von gelöstem Sauerstoff entstehen und Biomoleküle zersetzen können. Zudem muss beachtet werden, dass durch die Oxidation von Natriumascorbat Dehydroascorbat entsteht, welches als Elektrophil reagieren kann. Die Zugabe von Aminoguanidin verhindert dabei etwaige Verknüpfungsreaktionen von Proteinen. Den pH-Wert betreffend eignet sich ein Bereich von 6,5-8,0 am besten. Tris-Puffer-Lösungen können jedoch negative Auswirkungen haben, da das darin vorhandene Tris(hydroxymethyl)aminomethan ebenso an Kupfer binden kann.^[19] Eine der ersten Anwendungen der CuAAC wurde von der Gruppe von Finn und Kollegen beschrieben. Dabei wurden Glycane an den Oberflächen von Säugerzellen mit peracetylierter Azidomannose behandelt und mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Nach der Reaktion mit einem alkiniierten Farbstoff konnten die markierten Zucker sowohl in HeLa als auch in CHO Zellen sichtbar gemacht werden.^[47] Weitere Anwendungen für die Markierung von Lipiden^[30], Glycanen an der Zelloberfläche und im Zytoplasma^[24] und von Nukleosiden^[29] folgten.



Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)

Abbildung 6: THPTA ist ein wasserlöslicher und der am häufigsten verwendete Ligand für die CuAAC.

Die CuAAC stellt eine robuste Methode dar, mit der mit kurzer Reaktionszeit und hoher Regioselektivität bei 37 °C oder Raumtemperatur und in einem mit zellulären Systemen kompatiblen pH-Bereich Biomoleküle, etwa in Zellen, nahezu hintergrundfrei markiert werden können. Ein Nachteil jedoch stellt die Toxizität des zur Katalyse verwendeten Kupfers dar. Durch dieses ist die Verwendung der CuAAC ausschließlich in fixierten Zellen möglich.^[5]

Die durch Ringspannung katalysierte [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC)

Um die [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition auch in lebenden Zellen oder Organismen anwenden zu können, muss die Katalyse der Reaktion durch Kupfer in der Oxidationsstufe I aufgrund dessen Toxizität durch eine andere Methode ersetzt werden. In den 60-er Jahren des 20. Jahrhunderts präsentierten Wittig und Krebs die Reaktion von Cyclooctin mit Phenylazid, die „explosionsartig“ abläuft.^[48] Der Winkel an den acetylenischen C-Atomen im Cyclooctin beträgt etwa 160° (158,5° gemessen, 162,7° berechnet). Berechnungen ergaben eine Ringspannung von etwa 50 kJ mol⁻¹.^[49] Durch die Reaktion des Cyclooctins mit einem Azid entsteht ebenfalls ein 1,2,3-Triazol, wobei Ringspannung abgebaut wird, was die Reaktion antreibt. Eine Katalyse durch Kupfer(I) ist dadurch nicht notwendig. Trotz des thermodynamisch günstigen Abbaus der Ringspannung läuft die Reaktion sehr langsam ab. Die Geschwindigkeitskonstante beträgt für eine Reaktion in wässrigem deuteriertem Acetonitril 0,0012 M⁻¹s⁻¹. Dies ist ein kleinerer Wert als für die Staudinger Ligation mit 0,0025 M⁻¹s⁻¹.^[5] Ein Nachteil der Staudinger Ligation, der mit der CuAAC überwunden werden konnte, war jedoch die geringe Reaktionsgeschwindigkeit. Die SPAAC ist einfach in verschiedensten Lösungsmitteln durchzuführen, effizient, regioselektiv und liefert ein stabiles Produkt. Aufgrund der langsamen Kinetik sind jedoch lange Reaktionszeiten und hohe Ausgangskonzentrationen der Edukte von Nöten. Deswegen wurden neue Cyclooctinderivate entwickelt, die sowohl stabil sein sollten als auch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöhen, um damit die Reaktion als bioorthogonale Reaktion attraktiv zu machen.^[50] Die Gruppe von Carolyn Bertozzi entwickelte Cyclooctine mit elektronenziehenden Gruppen in benachbarter

Position zur Dreifachbindung. Die Anbringung von zum Beispiel Fluorgruppen erniedrigt die Energie des niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals (LUMO), wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird. Eine zusätzliche Carbonsäuregruppe verbessert die Löslichkeit des Cyclooctinderivats in Wasser.^[17] Baskin und Kollegen entwickelten DIFO (von engl. difluorinated cyclooctyne), ein eben solches Cyclooctinderivat. Für die Reaktion mit Benzylazid ergibt sich dabei eine Geschwindigkeitskonstante von $0,076 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, was etwa dem 60-fachen der Geschwindigkeitskonstante für Cyclooctin entspricht. Dabei war es möglich, dynamische Prozesse von Oberflächenglycanen auf einer Zeitskala von Minuten in lebenden CHO Zellen mit vernachlässigbarem Hintergrundsignal mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Ebenso gelang es, DIFO in derselben Probe nacheinander mit zwei verschiedenen Farbstoffen zu markieren. Dabei wurden CHO Zellen, die Azidosialinsäure als Reportermoleküle trugen, zunächst eine Stunde mit dem ersten DIFO-Farbstoff behandelt, anschließend mit peracetylierter *N*-Azidomannose für den Einbau weiterer Azidgruppen in Sialinsäuren und schließlich 24 Stunden mit dem zweiten DIFO-Farbstoff. Der zuerst verwendete DIFO-488 war zunächst an der Zelloberfläche zu finden, nach 24 Stunden jedoch, wie zu erwarten, in Lysosomen. Der zweite DIFO-568 markierte dann die Glycane an der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse zeigen das große Potential der SPAAC. Sensitives Labeling von dynamischen Prozessen auf einer Zeitskala von Minuten und Stunden ist aufgrund der Reaktionsgeschwindigkeit der SPAAC damit möglich. Zudem hat diese Reaktion auch in lebenden Zellen keine negativen Einflüsse auf zelluläre Prozesse.^[20] Trotz dieser Vorteile stellt ein Cyclooctin im Gegensatz zu einem endständigen Alkin eine sperrige Gruppe dar. Diese, verknüpft mit einem Farbstoffmolekül, ergibt ein Molekül einer Größe, das die eines kleinen Biomoleküls übertreffen und damit dessen Struktur und auch Funktion verändern oder komplett zerstören kann.

Bioorthogonale Reaktionen konnten in den vergangenen Jahren viele wertvolle Informationen über biochemische Prozesse, die Lokalisation von kleinen Biomolekülen und deren Einbau in biochemische Makromoleküle sowohl in Zellen, als auch in Gewebe und Organismen liefern. Trotzdem sind längst nicht alle Prozesse aufgeklärt, wofür weitere detaillierte Informationen aus lebenden Zellen notwendig sind. Eine vielversprechende Technik, die mit kleinen funktionellen Gruppen auskommt, nicht-invasiv ist, keine Fluorophore benötigt und in lebenden Zellen anwendbar ist, ist die Ramanmikroskopie. Diese soll in Kapitel 2.4 genauer beleuchtet werden.

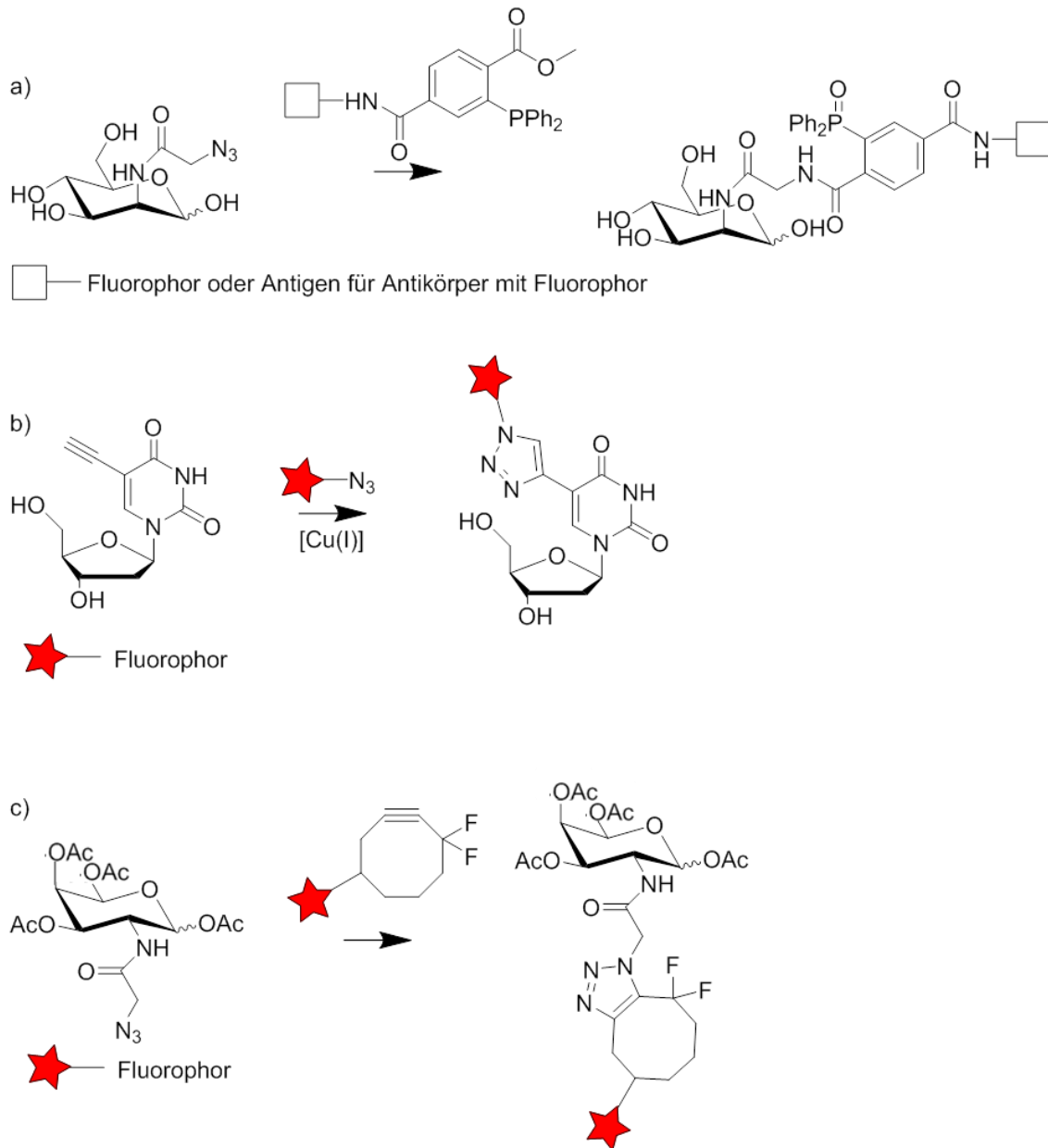


Abbildung 7: Übersicht über die drei hier beschriebenen bioorthogonalen Reaktionen.
 a) Die Staudinger Ligation am Beispiel von Azido-*N*-Acetylmannosamin (ManNAc). Dabei reagiert der Azidozucker mit einem in der Gruppe von C. Bertozzi entwickelten Triarylphosphan. Dieses kann sowohl einen Fluorophor als auch ein Antigen für die Detektion mittels eines Antikörpers, der wiederum einen Fluorophor trägt, tragen.^[13]
 b) Die CuAAC am Beispiel von 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin, das mit einem Azid zu einem 1,2,3-Triazol reagiert. Damit kann ein Fluorophor kovalent angeknüpft werden.^[20]
 c) Die SPAAC; abgebildet ist die Reaktion von peracetyliertem Azido-*N*-Acetylgalactosamin, das mit einem zweifach fluorierten Cyclooctinderivat reagiert, welches kovalent an einen Fluorophor gebunden ist.^[28]

2.2 Malonylierung von Proteinen

Nach der Transkription der DNA in die RNA erfolgt die Translation dieser in Proteine. Um die Vielfalt des Proteoms noch zu erweitern, werden Proteine, sowohl in ihrer nativen als auch in ihrer fertig gefalteten Quartärstruktur, weiter modifiziert. Kovalente Anknüpfungen sowohl an den Seitenketten der Aminosäuren als auch am Rückgrat der Proteine sind möglich. Diese sogenannten post-translationalen Modifikationen (PTMs) von Proteinen sind oft dynamisch und reversibel. Dabei werden sowohl kleine Modifikationen an die Seitenketten der Proteine angeknüpft als auch Proteine mit weiteren ganzen anderen Proteinen modifiziert. Dies kann sowohl die Struktur als auch damit die Funktion von Proteinen verändern. PTMs an Enzymen können dabei deren katalytische Aktivität erhöhen, herabsetzen oder gänzlich ausschalten.^{[51],[52]} Ein Protein kann dabei gleichzeitig durch verschiedene Modifikationen post-translational modifiziert sein. Khoury und Kollegen berichten von über 430 PTMs.^[53] Unter den Modifikationen spielt die Klasse der Acylierung von Proteinen eine entscheidende Rolle. Bis zu 20 Acylierungen von Proteinen an der Seitenkette der Aminosäure Lysin an über 50000 Proteinen in Eukaryoten und Prokaryoten wurden identifiziert. Eine Modifikation an der in zellulärer Umgebung positiv geladenen Aminogruppe des Lysins hat eine Ladungsänderung zur Folge. Die Anknüpfung eines Acylrests geht einher mit der Ausbildung einer Amidbindung, die damit nach außen elektrisch neutral ist. Dies hat Auswirkungen auf die Struktur des zugrunde liegenden Proteins.^[54] Unter die Klasse der Acylierung fallen die Formylierung, Acetylierung, Propionylierung, Butyrylierung, Malonylierung, Succinylierung und Crotonylierung, um einige zu nennen. Diese unterscheiden sich dabei hauptsächlich in der Länge der Seitenkette bzw. auch in der Anzahl der Carbonylgruppen. Kleine Modifikationen wie die Acetylierung spielen eine große Rolle in der Proteininteraktion. Längere unpolare Seitenketten dienen zur Anlagerung der Proteine an Membranen und steuern damit ebenso die Signalweiterleitung. Das Substrat in der Zelle, das den Acylrest auf die Lysinseitenkette überträgt, ist Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA). Die meisten der Modifikationen werden von Transferasen katalysiert. Die Acylierung von Proteinen muss nicht unbedingt an der Seitenkette des Lysins (N-Acylierung) stattfinden. Möglich sind auch Reaktionen mit freien Thiolgruppen wie im Cystein (S-Acylierung) oder an Serin oder Threonin (O-Acylierung).^{[55],[56]}

Von chemischer Seite her sind post-translationale Modifikationen wie die Succinylierung, Glutarylierung und die Malonylierung von Proteinen hochinteressant. Diese Modifikationen an der ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin neutralisieren an dieser Stelle nicht nur die Ladung der Seitenkette, sondern verändern diese von + nach -1 aufgrund ihrer Carboxylgruppe. Dadurch ist der Einfluss der Acylierung auf die Struktur der Proteine noch größer als etwa der der Acetylierung.

In den letzten Jahren wurde klar, dass die Malonylierung auch biochemisch eine große Rolle zu spielen scheint, jedoch noch viel zu wenig untersucht wurde.^[57] Bei Diabetespatienten mit Typ II Diabetes wurde eine erhöhte Konzentra-

tion an Malonyl-CoA, dem Substrat für die Malonylierung, gefunden.^[58] Zudem zeigen Zellen, in denen Proteine vermehrt malonyliert vorliegen als in anderen, eine beeinträchtigte Funktion der Mitochondrien und Fettsäureoxidation. Dies deutet auf eine nicht unwesentliche Rolle der Malonylierung bei der Malonyl-Azidurie (*von engl. malonic aciduria*) hin. Verstanden ist bisher, dass Malonyl-CoA durch die Carboxylierung von Acetyl-CoA katalysiert durch die Acetyl-CoA-Carboxylase entsteht. Zudem ist es das Substrat der Malonyl-CoA-Decarboxylase (MCD), der Fettsäure-Synthase und der Fettsäure-Elongase.^[57] Auch Funktionen im Fettsäurestoffwechsel werden Malonyl-CoA zugeschrieben, genauso wie es als Energiesensor im Hypothalamus als Schlüsselintermediat fungieren kann. Die MCD ist ein Enzym, das für die Aufrechterhaltung des Malonyl-CoA-Levels sorgt, vor allem in den Mitochondrien und den Peroxisomen. Ist dieses jedoch in geringerem Maße vorhanden, wird weniger Malonyl-CoA in Acetyl-CoA umgewandelt, sodass eine höhere Konzentration an Malonyl-CoA vorliegt. Dies wird auch als Malonyl-Azidurie beschrieben und ist eine angeborene Krankheit, die sich aufgrund von erhöhten Malonylcarnitinkonzentrationen im Blut und einer höheren Malonsäurekonzentration im Urin bei Patienten durch zurückgebliebene Entwicklung bei Kindern, Krampfanfällen, Erbrechen und Durchfall, Hypoglykämie und Kardiomyopathie äußert.^[57] Gleichzeitig bedeutet dies auch, dass Proteine vermehrt malonyliert sind. Zudem spielt die Malonylierung eine Rolle in der Muskelkontraktion und bei der Durchblutung des Herzens. Diese Punkte zeigen, dass diese post-translationalen Modifikation eine nicht unwesentliche Rolle zu spielen scheint.

Zum ersten Mal wurde die Malonylierung 2011 mittels Massenspektrometrie nachgewiesen. Peng *et al.* konnten dabei auch mittels Western Blot Analyse und eines Malonylierungsantikörpers die Malonylierung sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen nachweisen.^[37] Wie die oben genannten Punkte zeigen, wurde bereits einiges an Forschung betrieben. Viele Fragen bleiben jedoch noch offen. Aufgrund ihrer Rolle bei verschiedenen Krankheitsbildern ist es zum besseren Verständnis erforderlich, diese post-translationalen Modifikation und die betreffenden Proteine tiefgründiger zu untersuchen. Bereits 2011 wurden einige der malonylierten Proteine ebenso durch Peng *et al.* identifiziert. Die meisten gehören dem Fettsäure- oder Glucosemetabolismus an, die über Acetyl-CoA miteinander zusammenhängen. Beispielproteine sind etwa die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), die α -Enolase 1 (ENO1) oder die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1).^[37]

Wie bereits oben erwähnt, entsteht das Substrat der Malonylierung, Malonyl-CoA, durch die Carboxylierung von Acetyl-CoA. Die Rückreaktion geschieht unter Abspaltung von CO_2 . Beide Reaktionen verlaufen Enzym-katalysiert. Malonyl-CoA steht dann für die Malonylierung von Proteinen zur Verfügung, genauso wie für die Fettsäuresynthese. Auf die Reaktion der Malonylierung von Proteinen soll weiter unten eingegangen werden. Zunächst soll die Reaktion der Demalonylierung genauer beleuchtet werden. Diese wird durch Sirtuin 5 katalysiert. Bei der Reaktion wird positiv geladenes NAD^+ verbraucht und es entste-

hen Nicotinamid (NAM), 2'-O-Malonyl-ADP-ribose und das demalonylierte Protein. Sirtuine, silent information regulator 2 (Sir2), sind Proteine, die zur Katalyse NAD⁺ benötigen.^[59] In Säugern existieren sieben verschiedene Sirtuine, die auch als Sirt1 bis Sirt7 bezeichnet werden und sich in ihren N- und C-Termini und auch ihrer Lokalisation in der Zelle unterscheiden. Sirt1, 2, 6 und 7 sind im Zellkern zu finden, Sirt1 und 2 zudem auch im Cytoplasma. Die Sirtuine 6 und 7 kommen zusätzlich noch in den Nucleoli vor. Die Sirtuine 3 bis 5 wirken hauptsächlich in den Mitochondrien.^[60] Die meisten Sirtuine spielen eine Rolle in der Deacylierung von Proteinen. Eine Unterteilung in verschiedene Klassen erfolgt aufgrund von Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen. Bei Sirt1 bis 3 spricht man von Klasse I Sirtuinen, die eine Deacetylaseaktivität zeigen. Sirt6 und Sirt7 zeigen keine Auswirkungen auf acylierte Peptide. Sirtuin 5 dagegen besitzt im aktiven Zentrum die Aminosäuren Tyrosin und Arginin, was an dessen Kristallstruktur gezeigt werden konnte.^[59] Diese beiden Aminosäuren begünstigen die Bindung von negativ geladenen Acylgruppen. Aus diesem Grund katalysiert Sirtuin 5 die Deacylierung von malonylierten und succinylierten Proteinen, weniger jedoch von acetylierten Proteinen.^[59] Sirt5 gehört zur Klasse III der Sirtuine. Das menschliche SIRT5 Gen besitzt mindestens zwei Isoformen, die sich an ihren C-terminalen Enden unterscheiden. Neben den Mitochondrien konnte das Enzym auch im Cytoplasma nachgewiesen werden.^[61] Durch seine Funktion in der Deacylierung von Proteinen spielt Sirtuin 5 in einem breiten Feld an biochemischen Prozessen, genauso wie in diversen Krankheitsbildern, eine nicht unerhebliche Rolle, zum Beispiel in kardiologischen. Außerdem sind neurodegenerative Krankheiten zu nennen und es interagiert mit Proteinen in der Glycolyse, der Fettsäureoxidation, der Bildung von Ketonkörpern und im Entgiftungsprozess von reaktiven Sauerstoffspezies. Die Wirkung der Demalonylase kann durch einige kleine Moleküle eingeschränkt werden. Die meisten jedoch wie Resveratrol oder Sirtinol inhibieren vor allem die Desuccinylierung. Suramin inhibiert Sirt5 dadurch, dass die NAD⁺- und Substratbindestellen blockiert werden. Trotzdem sind davon auch in den gleichen Inhibitorkonzentrationen (mikromolar) weitere Sirtuine betroffen, sodass keine spezifische Inhibition für etwa die Malonylierung bestätigt ist.^[60]

In Abbildung 8A ist für die Reaktion der Malonylierung kein Enzym aufgezeigt. Dies liegt daran, dass bisher für die Katalyse dieser Reaktion kein Enzym nachgewiesen werden konnte. Für die Acetylierung von Proteinen ist die Katalyse durch Acetyltransferasen bekannt.^[62] Jedoch kann die N-Acetylierung auch nicht-enzymatisch ablaufen, ebenso die Succinylierung.^{[63],[64],[65]} Einige Eigenschaften der Acyl-CoA-Substrate sprechen dafür, dass die Übertragung eines Malonyl- bzw. Acylrestes auf die Aminogruppe von Lysin in Proteinen nicht-enzymatisch abläuft. Diese sind aufgrund ihrer Thioestergruppe mit ihrer hohen Elektrophilie sehr reaktiv. Die Hydrolyse eines Acyl-CoA-Moleküls durch die elektrophile Addition von Wasser ist thermodynamisch begünstigt und liefert eine Energie von mehr als 35 kJ mol⁻¹ bei neutralem pH-Wert.^{[66],[67]} Die Annahme eines nicht-enzymatischen Ablauf von Acylierungsreaktionen wird eben-

falls dadurch unterstützt, dass diese mit geringer Stöchiometrie ablaufen und *in vitro* spontan mit Proteinen reagieren.^{[63],[68],[69]} Dass die Malonylierung komplett nicht-enzymatisch verläuft, konnte bisher nicht gezeigt werden. Kulkarni *et al.* imitierten jedoch ein Substrat (Abbildung 8B) für die Acylierung von Proteinen, um dies zu untersuchen. Dieses enthält eine reaktive Thioesterfunktion, jedoch keine ADP-Einheit wie das Coenzym A. Die Thioesterfunktion sorgt für die nötige Elektrophilie und damit Reaktivität. Die ADP-Funktionalität im Coenzym A ist der Teil des Moleküls, der mit einer hohen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen an Acetyltransferasen bindet. Fehlt diese Eigenschaft, so ist die enzymatische Reaktion viel weniger wahrscheinlich. Zur Beobachtung wurde an das synthetisierte Substrat zusätzlich eine Alkinfunktionalität angebracht. Damit konnte dieses als Reporter dienen. Um das Molekül in seiner Sterik zu variieren, wurde die *N*-Acylgruppe in ihrer Kettenlänge variiert.^[70]

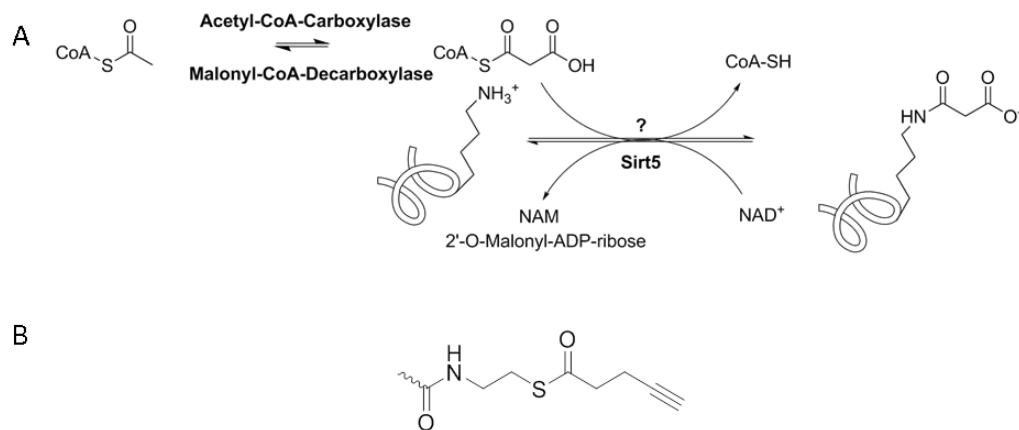


Abbildung 8A zeigt den Mechanismus der Malonylierung. Das Substrat Malonyl-CoA wird zunächst in einer reversiblen Reaktion aus Acetyl-CoA durch Carboxylierung gebildet. Schließlich wird der Malonylrest unter Abspaltung von Coenzym A auf die ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin in Proteinen übertragen. Ob diese Reaktion enzymkatalysiert abläuft, ist bisher noch nicht geklärt. Die Demalonylierung wird durch Sirtuin 5, einem NAD⁺ abhängigen Enzym, katalysiert. Dabei wird NAM abgespalten und es entsteht 2'-O-Malonyl-ADP-ribose.^[59]

B: Die von Kulkarni *et al.* synthetisierten Thioester, die Acyl-CoA-Moleküle für die Untersuchung der Enzymkatalyse von Acylierungen in ihrer Funktion nachahmen sollen.^[70] Sie enthalten eine reaktive Thioesterfunktionalität und eine Alkingruppe, um als Reporter zu fungieren.^[70]

Die Ergebnisse zeigen, dass die Acyl-CoA-Imitate kein Substrat der beiden untersuchten Acetyltransferasen sind. Mittels SDS-PAGE konnte Proteinlabeling durch das *N*-Acetyl-Imitat sowohl in Lysaten als auch ganzen Zellen detektiert werden, vor allem auch konzentrationsabhängig, was für einen nicht-enzymatischen Prozess spricht. Proteine wie ENO1, die Fettsäure-Synthase oder GAPDH, die als malonylierte Proteine identifiziert wurden, wurden mit den Imitaten modifiziert. Diese reflektieren also ziemlich genau die Wirkungsweise von Acyl-CoA mit Proteinen. Trotzdem kann damit noch keine endgültige Aus-

sage über die Enzymkatalyse der Malonylierung getroffen werden. Die synthetisierten Thioester wurden bisher nur an einer bestimmten Auswahl an Proteinen untersucht. Das Fehlen der ADP-Einheit spiegelt ebenso nicht genau die Funktion und Wirkungsweise der Acyl-CoA-Substrate wieder.^{[70],[66]}

2.3 Ramanspektroskopie und -mikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Visualisierung von Zellen und deren Organellen, Biomolekülen und die Untersuchung wichtiger biochemischer intrazellulärer Prozesse. Oft werden dabei große Fluorophore verwendet. Die Expression fluoreszierender Proteine macht die Untersuchung eines bestimmten Proteins möglich. Dieser Prozess jedoch greift in die Zellphysiologie ein. Kleine Moleküle wie Nukleoside oder Glycane zeigen meist keine Autofluoreszenz und müssen mit großen sperrigen Fluorophoren markiert werden. Diese sind meist größer als das Molekül selbst und besitzen damit großes Potential, dessen Struktur und Funktion zu beeinflussen. Biopolymere werden durch die Markierung schlechter zugänglich oder können damit gar nicht markiert werden. Oftmals sind *in vivo* Experimente zudem erschwert oder gar nicht möglich. Die CuAAC etwa benötigt zur Katalyse das für Zellen toxische Kupfer, womit nur in fixierten Zellen gearbeitet werden kann.^{[71],[31]}

Schwingungsspektroskopie in Kombination mit Mikroskopie bietet eine Möglichkeit zur Visualisierung ohne die Verwendung großer Markierungen. Ramanmikroskopie kommt ohne die Verwendung von Fluorophoren aus und verwendet stattdessen die intrinsische Schwingung funktioneller Gruppen in Biomolekülen oder benötigt nur die Anbringung kleiner zusätzlicher funktioneller Gruppen an Biomoleküle, die auf deren Struktur keine großen Auswirkungen haben. Dadurch können qualitative und quantitative Informationen im zellulären Umfeld und in biochemischen Prozessen mittels einer nicht-invasiven und nicht- oder nur minimal destruktiven Technik erhalten werden. Auch Lebendzelleexperimente sind dadurch möglich.^[72]

Die Entdeckung des Raman-Effekts durch C. V. Raman 1928 wurde 1930 mit dem Physiknobelpreis ausgezeichnet. Sowohl Raman- als auch Infrarot (IR)-Spektroskopie sind beides Arten der Vibrationsspektroskopie. Ein lineares Molekül mit N Atomen besitzt $3N-5$ und ein nicht-lineares $3N-6$ Vibrationsmoden. Diese sogenannten Normalmoden sind unabhängige Bewegungen von Atomen oder Atomgruppen. IR und Raman ergänzen sich. Wenn sich durch die Anregung der Schwingung das Dipolmoment des jeweiligen Moleküls bzw. der funktionellen Gruppe ändert, ist dieses IR aktiv. Ändert sich jedoch dessen Polarisierbarkeit, so handelt es sich um eine Raman-aktive Mode. Generell gilt, dass bei der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit einer Gruppe von Atomen oder einem Molekül, diese elastisch oder inelastisch gestreut wird. Bei der elastischen Streuung spricht man von der Rayleigh-Streuung, bei der inelastischen von der Raman-Streuung. Die meisten der gestreuten Photonen jedoch besitzen dieselbe Energie wie die der einfallenden Strahlung. Außer

dem Grundzustand des Moleküls und einem virtuellen Zustand sind dabei keine Vibrationszustände an dem Prozess beteiligt (Rayleigh-Streuung). Anders ist es beim Raman-Prozess. Hierbei wird das Molekül vom Grundzustand in einen sehr kurzlebigen virtuellen Zustand angehoben, von wo aus es in einen angeregten Vibrationszustand zurück fällt. In diesem Fall spricht man von der Stokes-Streuung. Befindet sich ein Molekül bereits in einem angeregten Vibrationszustand, wird dieses durch ein einfallendes Photon in einen kurzlebigen virtuellen Zustand angehoben und fällt anschließend in den Grundzustand zurück. Man spricht hier von Anti-Stokes-Streuung. Im Falle des Stokes-Prozesses besitzt das gestreute Photon eine um Ω geringere Energie als das einfallende, im Falle von Anti-Stokes eine um Ω höhere.^{[73],[72]}

Die spontane Ramanspektroskopie und -mikroskopie verwenden zur Anregung der Probe einen Laser mit der Frequenz ω_P (vgl. Abbildung 9). Damit wird an jeder Stelle der Probe ein Spektrum aufgenommen. Durch das Abscannen Pixel für Pixel werden die einzelnen Spektren mit dem Fokus auf ein bestimmtes Signal zu einem Bild zusammengesetzt. Somit gelingt es, die Spektroskopie für die Mikroskopie anzuwenden. Die eingestrahlte Frequenz des Anregungslasers wird meist so gewählt, dass keine elektronische Anregung der Probe erfolgt. Damit wird auch eine geringere Autofluoreszenz der Probe detektiert. Dies begünstigt vor allem die Anwendung von Ramanmikroskopie an biologischen Systemen. Zudem ist Wasser nur wenig Raman-aktiv, während es einen sehr großen IR-Absorptionsquerschnitt besitzt. Dadurch dass jedoch jeder Pixel einzeln abgerastert werden muss und Raman aufgrund des geringen Raman-Querschnitts eine sehr insensitive Technik ist, sind lange Integrationszeiten pro Pixel notwendig. Dies bedeutet wiederum, dass die Erzeugung eines zweidimensionalen Bildes im Bereich von Minuten bzw. sogar Stunden liegen kann, was mit der Untersuchung von lebenden Zellen und deren dynamischen Prozessen nicht kompatibel ist.^{[74],[73]}

Bei der kohärenten Raman-Streuung werden dagegen zur Anregung zwei Laser-Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge verwendet. In Abbildung 9 sind diese als Pump-Strahl ω_P und Stokes-Strahl ω_S bezeichnet. Stimmt die Differenz der beiden Frequenzen der einfallenden Strahlen mit der Frequenz einer Schwingung im anzuregenden Molekül überein und interagieren diese räumlich und zeitlich gleichzeitig mit der chemischen Bindung, wird dadurch die Anregung dieser Schwingung verstärkt und das Molekül in einen angeregten Schwingungszustand versetzt. Dies geschieht über einen virtuellen Zustand. CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) und SRS (stimulated Raman scattering) sind zwei Prozesse, die dabei auftreten können. Beim CARS Prozess wird eine chemische Bindung mittels eines Photons der Frequenz ω_P über einen virtuellen Zustand in einen angeregten Schwingungszustand überführt und interagiert mit einem weiteren einfallenden Photon der Frequenz ω_P . Das dabei generierte Photon ω_{AS} besitzt eine höhere Energie als die der einfallenden Photonen. Das Signal wird bei diesem Prozess somit bei einer anderen Wellenlänge detektiert als eingestrahlt wird.

Beim SRS-Prozess wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Anregung einer Schwingung ein einfallendes Photon mit der Frequenz ω_p „verbraucht“ und eines der Frequenz ω_s erzeugt wird. Die Intensität der Stokes-Photonen wird dabei verstärkt, wobei man von Stimulated Raman Gain (SRG) spricht. Die Abschwächung der Intensität der Pump-Photonen dagegen wird als Stimulated Raman Loss (SRL) bezeichnet. Die Detektion des Signals besteht genau in der Messung dieses Intensitätsunterschieds.^[75] Dies geschieht in den meisten Aufbauten mittels eines Lock-in Amplifiers. Auf dessen Funktionsweise soll hier jedoch nicht genauer eingegangen werden. Die genaue Beschreibung der hier verwendeten Aufbauten ist in Kapitel 6.2.17 zu finden und kann ebenso der Literatur entnommen werden.^[76]

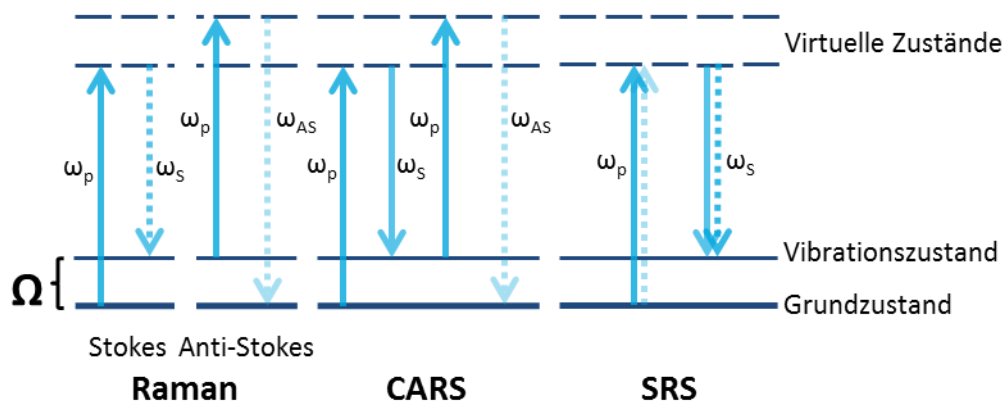


Abbildung 9 zeigt die Energiediagramme für spontanes Raman und die nicht-linearen Raman-Techniken CARS und SRS. Während des Raman-Prozesses wird ein Stokes bzw. Anti-Stokes Photon mit den Frequenzen ω_s bzw. ω_{AS} aufgrund inelastischer Streuung von Licht an einem Molekül oder einer Gruppe von Atomen generiert. Der CARS-Prozess beinhaltet vier Strahlen, wobei ein Molekül in einen angeregten Schwingungszustand versetzt wird und anschließend mit einem weiteren einfallenden Photon der Frequenz ω_p interagiert, um ein Anti-Stokes Photon ω_{AS} zu generieren. Im Gegensatz zu CARS wird beim SRS kein Photon bei unterschiedlicher Frequenz als die der einfallenden Photonen detektiert. Identisch ist, dass die Differenz der Frequenzen der beiden einfallenden Strahlen ω_p und ω_s mit der einer Molekülschwingung übereinstimmen muss, um ein resonanzverstärktes Signal zu erhalten. Die Intensität des Pump-Strahls wird verringert, die des Stokes-Strahls dabei erhöht, worin beim SRS das Prinzip der Detektion besteht.

Durch die Beschränkung auf die Detektion nur einer Frequenz einer Molekülschwingung ist die Sensitivität im Vergleich zur spontanen Ramanmikroskopie deutlich erhöht. Dadurch sind Geschwindigkeiten in der Aufnahme bis zu 1000-mal schneller als bei einem Ramanmikroskop, das eine Probe den Linien entlang abrastert, wobei an jedem Pixel ein komplettes Spektrum aufgenommen wird. Da die Molekülschwingung explizit durch die Einstellung der Frequenz adressiert wird, sind diese Techniken chemisch selektiv.^[35]

Beispiele für chemische Bindungen, bei denen sich bei der Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung die Polarisierbarkeit ändert und die damit Raman-aktiv sind, sind Gruppen wie Alkine, Azide oder Carbonylgruppen.^[73] Aus diesem Grund ist die Verwendung von Alkin-funktionalisierten Molekülen zur Visualisierung von dynamischen Prozessen in Zellen zusammen mit nicht-linearen Raman-Techniken eine optimale Kombination.

Eine Möglichkeit der Anwendung ohne jegliche Anbringung von Markierungen an Molekülen ist die Untersuchung von sogenannten Lipid droplets (LDs) und deren Dynamiken in Zellen. Überschüssiges Fett in Zellen wird im Cytoplasma in LDs gespeichert. Diese sind quasi der Speicherort von Fett, jedoch gleichzeitig auch dynamische Organellen in Zellen. Zur Aufklärung von deren Dynamik und ihrer Lokalisation und Form im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten eignen sich nicht-lineare Raman Techniken sehr gut.^[77] Da LDs hauptsächlich aus Fett bestehen und damit eine Anhäufung von CH-Gruppen widerspiegeln, die so in keinem anderen Bereich der Zelle aufzufinden ist, wird die Detektion erleichtert. Nur durch die Akkumulation ist es hier möglich ohne Markierungen zu arbeiten, da CH-Gruppen ansonsten überall in der Zelle ebenso vorhanden sind. Aufgrund der verschiedenen Streckschwingungen ist es möglich, LDs quantitativ auf verschiedene Fettsäuren zu untersuchen, die sich in ihrem Sättigungsgrad unterscheiden. Dafür kann die CH_2 -Deformationsschwingung bei 1445 cm^{-1} als Referenz verwendet werden, da diese unabhängig von der C-C-Sättigung ist. Die C-H-Streckschwingung gesättigter Fettsäuren hat eine Energie von 2850 cm^{-1} , die symmetrische Streckschwingung der CH_3 -Gruppe befindet sich bei 2935 cm^{-1} . Die Streckschwingung der C-C-Doppelbindung findet sich im Bereich von 1655 cm^{-1} und die der ungesättigten CH-Gruppen bei 3020 cm^{-1} .^{[78],[79]}

Die Dynamik der Fusion von LDs konnte mittels CARS-Mikroskopie in Langzeitmessungen verfolgt werden. Im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie erfolgt hier auch kein Fotobleichen der Probe, sodass Messungen über Stunden problemlos möglich sind. Durch die quantitative Analyse der Messdaten der CARS-Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der LDs in Adipozyten während deren Differenzierung auf der Fusion der Fetttröpfchen basiert. Ebenso konnte herausgefunden werden, dass der Prozess über eine passive Diffusion geschieht, bei der das Fett aufgrund eines Druckunterschieds durch eine Fusionspore transportiert wird.^[80] Dieses Beispiel zeigt, dass die Anwendung nicht-linearer Ramanmikroskopie nicht nur die Visualisierung zellulärer Kompartimente mittels spezifischer Schwingungen erlaubt, sondern auch die Untersuchung dynamischer Prozesse über einen längeren Zeitraum.

Während die Verfolgung von LDs komplett ohne Markierung möglich ist, können zur Untersuchung anderer kleiner Biomoleküle kleine Raman-Sonden verwendet werden. Wie bereits oben erwähnt, eignet sich hier die Verwendung von Alkinen besonders gut. Betrachtet man das Schwingungsspektrum einer Zelle, so wird deutlich, dass dieses im Bereich zwischen 1800 cm^{-1} und 2800 cm^{-1} kein Signal besitzt. Dieser wird auch als „Raman silent region“ bezeichnet. Die

Insensitivität der Ramanmikroskopie aufgrund ihres geringen Ramanquerschnitts (10^{-30} cm^2 pro Molekül gegenüber 10^{-16} cm^2 pro Molekül für die Fluoreszenz) kann durch die Vorteile der nicht-linearen Techniken etwas verbessert werden. Trotzdem ist es notwendig, Signalüberlagerungen zu vermeiden, um ein möglichst starkes Signal zu bekommen.^[35] Dies kann zum einen, wie es auch bei der Untersuchung der LDs der Fall ist, die Betrachtung akkumulierter Biomoleküle sein. Zum anderen ist es damit wichtig, Sonden zu verwenden, deren Schwingungssignal nicht durch andere Signale überlagert wird. Die Bande des Alkins befindet sich im Ramanspektrum im Bereich von 2120 cm^{-1} und ist damit für die Anwendung in biologischen Systemen passend.^[81]

Weitere mögliche funktionelle Gruppen mit Schwingungen im Bereich zwischen 1800 und 2800 cm^{-1} sind Nitrile, Azide und die C-D-Streckschwingung. Hierbei handelt es sich ebenfalls um kleine Gruppen, die die Größe eines zu untersuchenden Biomoleküls kaum beeinträchtigen. Im direkten Vergleich jedoch ist etwa die Intensität der Schwingung eines Nitrils etwa halb so groß wie die eines Alkins, die eines Azids dagegen liegt sogar etwa nur bei einem Fünftel im Vergleich zum Alkin. Die Verwendung von Deuterium-markierten Reporter-molekülen verspricht aufgrund der Größe der funktionellen Gruppe und der Ähnlichkeit zum Proton, die Struktur und Funktion in biologischen Systemen noch weniger zu stören. Jedoch liegt dessen Intensität etwa nur bei der Hälfte der einer Alkinschwingung.^[82]

Die Verwendung von Alkinen zur Detektion kleiner Biomoleküle bzw. deren Einbau in Biopolymere mittels Raman- und SRS-Mikroskopie wird anhand Alkin-funktionalisierter Nukleoside im Kapitel 2.4 ausführlicher besprochen.

In den letzten Jahren fand die Ramanmikroskopie immer wieder Anwendung im pharmazeutischen Bereich. Die Gruppe um Sunney Xie visualisierte mittels SRS ohne Molekülmarkierung Acetylcholin in Froschmuskeln. Sie verwendeten dafür die symmetrische C-N-Streckschwingung bei 720 cm^{-1} der quarternären Ammoniumgruppe in Cholin. Dies ist möglich, da andere Neurotransmitter, die im selben Bereich eine Schwingung besitzen, nur in geringeren Anteilen dort vorkommen. Trotzdem wird auch kritisch beleuchtet, dass die Sensitivität für die Untersuchung von Neurotransmittern für weitere Studien erhöht werden muss. Hintergrundsignale, die vom Gewebe herrühren, wurden durch Frequenzmodulation verringert, konnten aber nicht komplett eliminiert werden. Zudem befindet sich das Signal der untersuchten Schwingung nicht in einem Bereich, der von anderen Schwingungen isoliert ist.^[83]

Mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT) konnte herausgefunden werden, dass die Verwendung von Polyinen die Polarisierbarkeit der Dreifachbindung erhöht. Aus diesem Grund wurde zur Detektion von Anisomycin, einem Wirkstoff der die Proteinsynthese inhibiert und den MAP (mitogen-activated-protein)-Kinase-Weg aktiviert, mit einem Phenylidin ausgestattet. Dabei zeigte das Derivat mit zwei Phenylresten in damit behandelten Zellen schon bei Konzentrationen von $10 \text{ }\mu\text{M}$ ein Signal. Bei dem Derivat mit nur einem Phenylrest konnte die Aufnahme des Wirkstoffes in Zellen erst ab einer Konzentration von $100 \text{ }\mu\text{M}$

detektiert werden. Das Potential von SRS-Mikroskopie zur Untersuchung der Aufnahme von Wirkstoffen wird anhand von Zeitstudien an lebenden Zellen noch deutlicher. Trotzdem ist das hier sehr sensitive verwendete Label größer als nur eine Alkylgruppe, weswegen die Gefahr besteht, dass die Struktur des zu untersuchenden Wirkstoffes gestört und damit dessen Wirkungsweise herabgesetzt oder gar verändert wird.^[84]

Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Hepatitis C Virus (HCV) schlossen die Verwendung von Deuterium-markiertem Desmosterol, einer Zwischenstufe in der Cholesterolsynthese, ein. Mittels SRS-Mikroskopie konnte dabei die Verteilung von Desmosterol, was in Zellen, die mit HCV infiziert wurden, vermehrt vorkommt, in HCV-induzierten LDs gezeigt werden. Zudem wurde klar, dass Desmosterol ebenso eine direkte Rolle in der HCV-Replikation spielt.^[85]

Die oben genannten Vorteile der Ramanspektroskopie und -mikroskopie und der nicht-linearen Raman Techniken versprechen weitere Einblicke in zelluläre Strukturen und vor allem auch dynamische Prozesse, da auch Lebendzellmikroskopie möglich ist. Trotzdem gibt es noch einige Hindernisse, die überwunden werden müssen. Die geringe Sensitivität der Ramanmikroskopie wurde durch die nicht-linearen Techniken zwar erhöht, die Schwierigkeit, Moleküle zu detektieren, die nicht hochakkumuliert vorliegen, bleibt jedoch weiterhin eine Herausforderung.

2.4 Visualisierung von Nukleosiden

Zum besseren Verständnis von DNA-Replikation und RNA-Synthese ist es notwendig, Nukleoside in der zellulären Umgebung oder in Gewebe untersuchen und visualisieren zu können. Durch die Markierung von DNA etwa konnten überhaupt erst die vier Phasen der Zellteilung identifiziert und auch in ihrer Kinetik verstanden werden. Die Identifikation der verschiedenen Phasen des Zellzyklus wurde mit Hilfe der ersten „Markierungsmethoden“ von DNA ermöglicht. Durch den Einbau von radioaktiv markierten Nukleosiden wie ³H- oder ¹⁴C-Uridin in die RNA bzw. die jeweiligen Desoxynukleoside ³H- oder ¹⁴C-Thymidin in die DNA konnten Nukleoside autoradiographisch detektiert und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert werden.^[86] Nachteile wie lange Detektionszeiten von manchmal Monaten, die Arbeit mit radioaktiven Stoffen und das geringe Signal-zu-Rauschverhältnis drängten dazu, neue Marker zur weiteren Untersuchung von Zellzyklus und Translation zu entwickeln.^[28] Der nächste Schritt war der Einbau halogenerter Nukleoside wie etwa 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA. Zunächst konnten diese dahingehend analysiert werden, dass BrdU die Fluoreszenz des Farbstoffs Hoechst 33358 proportional zur in die DNA eingebauten Menge an halogeniertem Nukleosid quencht. Später wurde mit Antikörpern gearbeitet, die spezifisch an halogenierte Nukleoside binden und schließlich immunocytochemisch detektiert werden konnten. Diese Methode wurde sowohl in Tumoren als auch in gesunden Zellen zu Kinetikstudien im Zellzyklus herangezogen.^[86] Im Gegensatz zu autoradiographischen Methoden ist diese Methode auf einer Zeitskala von Stunden durchführ-

bar und damit schneller. Zudem werden bessere Mikroskopiebilder erhalten. Schwerwiegende Nachteile jedoch sind etwa, dass die Detektion durch die jeweiligen Antikörper in doppelsträngiger DNA aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Daher steht vor der eigentlichen Detektion immer die Denaturierung der Probe durch Salzsäure, Mischungen aus Methanol und Essigsäure oder durch Erhitzen der Probe, wodurch die Struktur zerstört wird. Letztlich müssen die Antikörper zum Antigen in der Probe hindurchdringen, was aufgrund ihrer Größe nicht quantitativ geschieht und damit das Signal von der Menge an Antikörper in der Probe und meist nicht von eingebautem BrdU abhängig macht.^[28] Was die RNA betrifft, kann 5-Bromouridin verwendet werden, welches in die RNA eingebaut wird. Die Nachteile sind hier nicht so schwerwiegend. Da RNA meist einzelsträngig vorliegt, ist für die Untersuchung keine Denaturierung nötig, um die Anlagerung der Antikörper zu ermöglichen. Kommt RNA jedoch als Doppelstrang oder in Verbindung mit Proteinen vor, ist damit die Denaturierung nötig. Dadurch wird die Struktur der Konstrukte zerstört und kann somit nicht in ihrer Natur untersucht werden. Weitere Möglichkeiten zur Markierung von Nucleosiden waren damit notwendig.^[86]

Die Verwendung alkinierter Nucleoside bringt gegenüber den bisher genannten Methoden einige Vorteile. Anstatt eines Halogenids tragen diese Moleküle zum Beispiel an der Position 5 der Nucleobase von Thymidin bzw. Uridin eine Alkinfunktionalität. Diese Reportermoleküle werden in die DNA bzw. RNA mittels intrazellulärer Enzyme eingebaut. Dies wurde dadurch gezeigt, dass der Einbau von EdU durch die Anwendung von Harnstoff, einem Inhibitor der Ribonucleotidreduktase, unterbunden werden kann. EU ist ein Substrat der RNA-Polymerasen I, II und III, jedoch nicht der Ribonucleotidreduktase. Dies bedeutet, es kann zur selektiven Markierung von RNA-Konstrukten in Zellen verwendet werden. Gezeigt werden konnte dies dadurch, dass Harnstoff hier keinen Einfluss auf den Einbau hat, das Antibiotikum Actinomycin D jedoch schon. Dieses inhibiert bereits in nanomolaren Konzentrationen die RNA-Polymerase I und in mikromolaren auch die RNA-Polymerase II. Durch die Anwendung von Actinomycin D konnte der Einbau von EU zunächst in den Nucleoli, schließlich sogar im kompletten Zellkern unterbunden werden. Die RNA-Polymerase I transkribiert dabei die ribosomale RNA (rRNA), die Polymerase II die messenger RNA (mRNA) und kleinere nicht-codierende RNAs und die Polymerase III spezielle RNAs wie die transfer RNA (tRNA).^[87] Durch die Verwendung alkinierter Verbindungen wird die Detektion durch Antikörper überflüssig. Dadurch dass keine Denaturierung der Proben mehr notwendig ist, können diese in ihrer kompletten Struktur untersucht und visualisiert werden. Die Detektion erfolgt dabei durch die Anwendung der CuAAC (siehe auch Kapitel 2.1). Dies geschieht schneller als die Anwendung der Antikörperstrategie.^[28-29] EdU konnte schließlich im Folgenden zur Visualisierung der Zellteilung in HeLa Zellen^[28], neuronalen Stammzellen und in Hirngewebe von Mäusen^[88] angewandt werden. Alkinuridine blieben jedoch nicht die einzigen verwendeten Nucleoside. 5-Ethynylcytidin (EC) etwa zeigte in der Literatur zur Markierung von RNA ver-

gleichbare Eigenschaften wie EU.^[89] Zudem wurden nicht nur Pyrimidin-basierte Nucleoside mit Alkylfunktionalisierungen versehen, sondern auch Purin-basierte. 2-Ethynyladenosin (2-EA) wird ebenso während der Transkription in die RNA eingebaut, zudem aber auch von der Polyadenylat (Poly(A))-polymerase als Substrat verwendet und kann damit zur Identifizierung der Polyadenylierung und zur Detektion von polyadenylierter mRNA verwendet werden.^[90] Zur Verfolgung des RNA-Metabolismus kann ein weiteres Nucleosid herangezogen werden. *N*⁶-Propargyladenosin (*N*6-PA) wird ebenfalls von allen drei RNA-Polymerasen in Säugerzellen als Substrat verwendet und auch von der Poly(A)-polymerase zum Einbau in Poly(A)-Strängen. Der Einbau konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Zur Visualisierung wurde hierbei ein Rhodaminazid verwendet.^[87] Für die Markierung von Nucleosiden und die Detektion mittels CuAAC ist prinzipiell auch die Verwendung von Azido-Nucleosiden möglich. 5-Azido-2'-desoxyuridin (AdU) wird ebenfalls in die DNA eingebaut. Ein Vergleich mit EdU zeigt jedoch einen viel stärkeren Hintergrund in der Fluoreszenzmikroskopie.^[28]

Ein Problem der alkinierten Nucleoside ist deren Toxizität. Durch die Anwendung eines nicht-natürlichen Nucleosids auf Zellen wird die Stabilität der DNA, etwa durch EdU, herabgesetzt. Zudem führt der Einbau von EdU zu Nekrose und in manchen Fällen zum Stillstand des Zellzyklus. Um Zellen oder Gewebe jedoch genau untersuchen zu können, ist es notwendig, diese auch möglichst intakt zu halten. Der IC_{50} -Wert von EdU liegt bei 0,2- 4 μ M für das Zellwachstum und bei 0,2 μ M zur Herbeiführung eines Stillstands des Zellzyklus. Neef und Kollegen synthetisierten einige Arabinofuranosylethynyluracil-Derivate, von denen (2'*S*)-2'-Desoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridin (*F-ara*-EdU) (Abbildung 10) selektiv in die DNA eingebaut wird und eine geringere Toxizität zeigt als EdU. Untersuchungen in menschlichem als auch in tierischem Gewebe zeigten so gut wie keine Hemmung der DNA-Synthese, wodurch auch Langzeitstudien möglich sind. Bei einer Applikation von 10 μ M Nucleosid (EdU und *F-ara*-EdU) sind nach 72 Stunden mit EdU jedoch kaum noch lebendige Zellen vorhanden. Mit *F-ara*-EdU zeigten diese keine Veränderungen in ihrer Viabilität oder Morphologie. Ein Grund dafür ist die Stärkung der glycosidischen Bindung durch die Anknüpfung eines Fluoratoms an der 2'-Position des Nucleosids. Dagegen ist die Abspaltung der Nucleobase bei EdU viel wahrscheinlicher und damit die Bildung eines weiteren toxischen Produkts durch die Pyrimidinphosphorylase, dem 5-Ethynyluracil. Die Stärkung der Bindung bewirkt gleichzeitig eine Stabilisierung der DNA mit den eingebauten Nucleosiden. Minimale Auswirkungen von *F-ara*-EdU auf DNA-Reparaturmechanismen konnten jedoch gefunden werden. Diese sollten die Effektivität des Reporters und Langzeitstudien allerdings nicht einschränken.^[91]

Ein weiteres fluoriertes Nucleosid, das in derselben Gruppe untersucht wurde, ist 2'-Desoxy-2',2'-difluoro-5-ethynyluridin (dF-EdU) (Abbildung 10). Es ermöglicht die selektive Markierung von mit dem Herpes Simplex Virus-1 befallenen Zellen. Dieses entsteht durch die Deaminierung von Gemcitabin, einem Zyto-

statikum, und anschließender Alkinierung in drei Schritten. Dadurch dass dF-EdU nur von der Herpes Simplex Virus-1 Thymidin Kinase (HSV-1 TK) phosphoryliert wird, nicht aber von menschlichen Thymidinkinasen, kann dieses zur selektiven Detektion eines Pathogens verwendet werden, indem es dort in die DNA eingebaut wird. Damit werden mit dem Herpes Simplex Virus infizierte Zellen von dF-EdU markiert, gesunde, nicht-befallene Zellen jedoch nicht. Die anschließende Anwendung der CuAAC mit einem Azid-markierten Fluoreszenzfarbstoff erlaubt die Visualisierung von dF-EdU und damit von den befallenen Zellen.^[92]

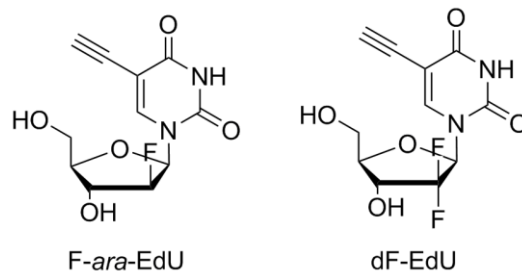


Abbildung 10 zeigt die Strukturen der beiden fluorierten Nucleoside von Neef *et al.*^{[91],[92]} F-ara-EdU und dF-EdU.

Sollen nun jedoch dynamische Prozesse in einer lebenden Zelle betrachtet werden, so ist die Anwendung der CuAAC aufgrund der Toxizität des verwendeten Kupfers nicht möglich. Zudem können durch die Anknüpfung eines Fluorophors, dessen Größe meist die des eigentlichen Biomoleküls übertrifft, die Struktur und damit dessen Funktion beeinträchtigt werden. Ramanmikroskopie vermeidet diese Nachteile. Yamakoshi *et al.* verwendeten 2011 zum ersten Mal EdU zusammen mit Ramanmikroskopie. Nach der Behandlung mit EdU wurden lebende HeLa Zellen Ramanmikroskopisch untersucht und anhand des Alkin-signals Bilder rekonstruiert. So konnte die DNA und deren Synthese verfolgt werden.^[81] Der Nachteil hier liegt in der langen Dauer der Messungen. Für spontane Ramanmessungen kann diese im Bereich von Stunden liegen und ist damit für dynamische Prozesse, etwa auf der Minutenskala, nicht anwendbar. SRS und CARS, ebenso in Kapitel 2.3 genauer beschrieben, sind Techniken mit höherer Sensitivität und damit geringerer Messdauer. Damit konnten innerhalb von Sekunden Bilder von HeLa Zellen, die mit EdU behandelt wurden, mittels SRS-Mikroskopie erhalten werden. Das Alkin-Signal im Bereich von 2120 cm^{-1} im Zellkern ermöglichte damit die schnelle Visualisierung von DNA.^[33] Um zu zeigen, dass hiermit tatsächlich die Visualisierung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen möglich sind, wurden HeLa Zellen mit EdU behandelt und sich teilende Zellen alle fünf Minuten während der Mitose mit SRS-Mikroskopie verfolgt. Während des Startpunkts der Messung waren bereits die getrennten Chromatiden an zwei Polen der Zelle sichtbar. Nach 30 Minuten konnten dann deutlich zwei getrennte Zellkerne anhand des Alkinsignals beobachtet werden. Die Anwendung von EdU und die Detektion der Dreifachbindung und damit die Visualisierung der DNA konnten ebenso in lebenden Orga-

nismen wie *C. elegans* gezeigt werden. Dieselbe Gruppe verwendete auch das RNA-Nukleosid EU zusammen mit SRS-Mikroskopie.^[34] Ebenfalls in lebenden HeLa Zellen wurde über mehrere Stunden der Abbau des eingebauten EUs verfolgt. Zum Zeitpunkt 0 konnte ein deutliches Signal der C-C-Dreifachbindung, hauptsächlich in den Nukleoli, etwas schwächer auch im gesamten Zellkern, detektiert werden. Dieses wurde nach 4 Stunden deutlich schwächer bis es nach 7 Stunden nahezu komplett verschwand.^[34]

Da das Alkinalsignal unabhängig von seiner chemischen Umgebung meist im selben Wellenzahlbereich liegt, ist es schwer, gleichzeitig verschiedene Alkinmarkierte Moleküle sichtbar zu machen. Die Gruppe um Wei Min synthetisierte aus diesem Grund drei EdU-Derivate, die in der Dreifachbindung unterschiedlich viele ^{13}C -Atome enthielten. Dabei verschiebt sich die Energie der Streckschwingung der Alkingruppe um $30\text{-}50\text{ cm}^{-1}$ pro ^{13}C -Atom, womit die Detektion von mehreren Signalen gleichzeitig möglich wird.^[9]

3. Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

3.1 Strategie

Bao und Kollegen publizierten 2013 den Reporter Diacetoxymethylpropargylmalonat (MalAMyne) zur Untersuchung der Malonylierung von Proteinen.^[26] Mit antikörperbasierten Methoden konnte die Malonylierung bisher bereits in HeLa-Zellen und *E. coli*-Bakterien nachgewiesen werden.^[37] Zur Untersuchung von dynamischen Prozessen ist jedoch die Verwendung eines Reporters die Methode der Wahl. MalAMyne ist ein Malonsäurederivat, dessen beide Säuregruppen verestert wurden. Die beiden Acetoxymethylgruppen führen dazu, dass das Molekül deutlich besser von Zellen aufgenommen werden kann als etwa der Dimethylester. Zur Detektion der Malonylierung dient die Propargylfunktionalität, die in der CuAAC mit einem Azid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff zum Triazol reagiert. Bao und Kollegen testeten den Reporter bereits in HeLa S3 Zellen und analysierten die Lysate mittels Gelelektrophorese und Western Blotting. Mittels Massenspektrometrie konnten zudem neue Malonylierungsstellen in Proteinen identifiziert werden. Die Visualisierung der Malonylierung mit diesem Reporter mit Fluoreszenzmikroskopie wurde jedoch bisher nicht verfolgt.

Die hier beschriebene Untersuchung der Malonylierung schließt die Reportersynthese ein. Zusätzlich zu MalAMyne wurde ein zweites Reportermolekül synthetisiert, mMalAMyne ((Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat). Anschließend wurden die Reporter *in vivo* angewandt. Nach der Aufnahme der Reporter durch die Zellen spalten intrazelluläre Esterasen die Estergruppen und das zweifach negativ geladene Malonat wird von der Malonyl-CoA-Synthetase als Substrat verwendet und in Malonyl-CoA umgewandelt. Dieses wiederum ist schließlich das Substrat für die Malonylierung. Die Beschreibung des Mechanismus der Malonylierung kann in Kapitel 2.2 genauer nachgelesen werden. Der Einbau der Reportermoleküle und damit die Malonylierung können schließlich verfolgt werden. Dies geschah zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie. Als Nachweis des Einbaus der Reportermoleküle wurden Gelelektrophorese und anschließende Western Blot Analyse eingesetzt.

Im Weiteren wurden für Protein-spezifische Untersuchungen, Proteine, von denen bekannt war, dass sie durch einen Malonylrest modifiziert sind, mit GFP markiert. Dies geschah in Vorarbeiten durch Franziska Doll in der Arbeitsgruppe Zumbusch an der Universität Konstanz, sodass die notwendigen Plasmide für diese Arbeit zur Verfügung standen. Durch den Einbau des Reportermoleküls und dessen Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann die Malonylierung mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) an einem bestimmten Protein

mikroskopisch nachgewiesen werden, wenn sich Reporter und GFP in räumlicher Nähe von 2-10 nm befinden und es einen Überlapp zwischen dem Emissionsspektrum des Donorfarbstoffs und dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfarbstoffs gibt.^[93]

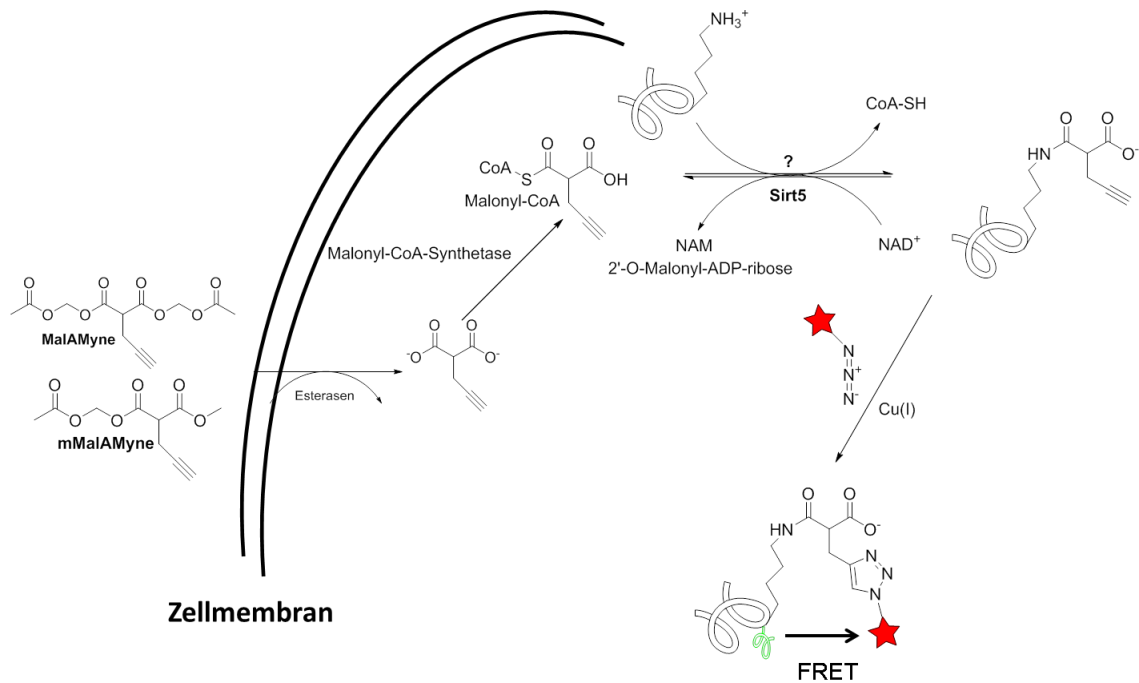


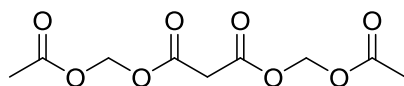
Abbildung 11: Schema der hier verwendeten Strategie zur Untersuchung der Malonylierung: Menschliche Zellen werden zunächst mit den Reportermolekülen MalAMyne bzw. mMalAMyne behandelt. Intrazelluläre Esterasen spalten anschließend die Ester-schutzgruppen. Das Produkt dieser Reaktionen ist dasselbe und steht nun als Substrat der Malonyl-CoA-Synthetase bereit. Das Substrat für den Prozess der Malonylierung ist Malonyl-CoA und überträgt während dessen einen Malonylrest auf die Aminogruppe der Aminosäureseitenkette von Lysin in Proteinen. Zur Visualisierung der Malonylierung wird schließlich Fluoreszenzmikroskopie angewandt. Die Anbindung der Reporter an Proteine wird mittels Gelelektrophorese und Western Blot Analyse verfolgt. Das in beiden Fällen verwendete Fluoreszenzsignal kommt vom mittels CuAAC ange-bundenen Fluorophor (roter Stern) an den Reporter. Zur Protein-spezifischen Untersuchung der Malonylierung mittels der Reporter kann weiter gegangen werden und Proteine, die als malonyliert bekannt sind, mit einem GFP (grüne Seitenkette am Protein) markiert werden. Sind GFP und Fluorophor in räumlicher Nähe zueinander, ist FRET möglich.

Wie auch in Kapitel 2.2 erwähnt, ist nicht nachgewiesen, ob der Prozess der Malonylierung enzymatisch verläuft. In Abbildung 11 ist dies durch ein Fragezeichen markiert. Auch hierzu werden in diesem Kapitel Experimente vorgestellt und diskutiert.

3.2 Synthese der Reporter

Die Synthese der Reporter-moleküle wurde in Anlehnung an die Beschreibungen von Bao und Kollegen vorgenommen.^[26] Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, wurde zusätzlich zu MalAMyne der Reporter mMalAMyne, welcher von Bao *et al.* nicht beschrieben wurde, synthetisiert. Zur Kontrolle der spezifischen Anknüpfung eines Fluoreszenzfarbstoffes war es zusätzlich notwendig, eine Negativkontrolle (negKon) zu verwenden. Diese war in der Literatur bereits beschrieben.^[26] Die genauen Synthesebeschreibungen sind dabei in Abschnitt 6.2.20 zu finden, die dazugehörigen NMR-Spektren in Abschnitt 6.2.21.

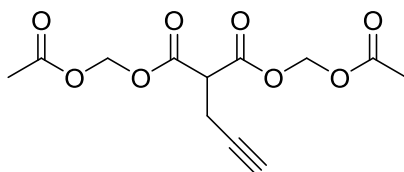
Synthese von Diacetoxymethylmalonat (negKon)



Diacetoxymethylmalonat (negKon)

Diacetoxymethylmalonat wurde ausgehend von Malonsäure direkt nach der Synthesevorschrift von Bao und Kollegen erhalten. Unter Stickstoffatmosphäre wurde Malonsäure zusammen mit der Hünig-Base Diisopropylethylamin und Bromomethylacetat über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte mittels säulenchromatographischer Aufreinigung das reine Produkt mit 57 %-iger Ausbeute erhalten werden. Die Reinheit konnte mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie gezeigt werden.

Synthese von (Diacetoxymethyl)propargylmalonat (MalAMyne)

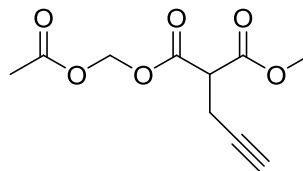


(Diacetoxymethyl)propargylmalonat (MalAMyne)

Wie von Bao und Kollegen beschrieben, sollte die Synthese von MalAMyne über zwei Stufen erfolgen. Die erste beinhaltete die Spaltung der Methylestergruppen von Dimethylpropargylmalonat in Methanol mit 1 M Natronlauge zum Erhalt der freien Disäure. Deren Aufreinigung gestaltete sich aufgrund der schlechten Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln und der starken Bindung aufgrund der polaren Säuregruppen an Silica schwierig, weswegen die Disäure nur in sehr geringen Mengen erhalten werden konnte und auf eine alternative Syntheseroute ausgewichen werden musste.

Auch diese beinhaltet zwei Stufen. Ausgehend von Malonsäure wurde zunächst negKon (siehe oben) synthetisiert. Zur Anknüpfung eines Propargylrestes wurde negKon schließlich am aziden Kohlenstoff zwischen den Carbonylgruppen mit Natriumhydrid unter Stickstoffatmosphäre in THF deprotoniert. Dieses Intermediat reagierte schließlich mit Propargylbromid. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur war die Reaktion abgeschlossen und das Rohprodukt wurde mit Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnte das reine Produkt mittels Säulenchromatographie erhalten werden. Die Ausbeute der hier beschriebenen zweiten Stufe betrug dabei 15 %. Die Reinheit wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie gezeigt.

Synthese von (Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat (mMalAMyne)



(Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat

(Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat (mMalAMyne) wurde etwas abgewandelt nach der Vorschrift von Bao *et al.* für MalAMyne in zwei Stufen erhalten. Dabei wurde zunächst Dimethylpropargylmalonat für vier Stunden bei Raumtemperatur in Methanol mit 1 M Natronlauge gerührt. Mittels Dünnschichtchromatographie konnte die Reaktion verfolgt werden, um nur eine Estergruppe des Edukts zu spalten. Das Rohprodukt konnte schließlich direkt zur weiteren Umsetzung verwendet werden. Dabei wurde die freie Säuregruppe durch Rühren in Acetonitril zusammen mit der Hünig-Base Diisopropylethylamin und Bromomethylacetat bei Raumtemperatur über Nacht unter Stickstoffatmosphäre zum gemischten Ester umgesetzt. Die säulenchromatographische Aufreinigung ergab das reine Produkt mit einer Ausbeute von 67 %. Die Reinheit konnte mit ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie gezeigt werden.

3.3 Viabilität

Mit den drei synthetisierten Reportern negKon, MalAMyne und mMalAMyne in der Hand konnte deren Aufnahme und Einbau in Säugerzellen getestet und untereinander verglichen werden. Zusätzlich wurde das Edukt der Synthese für mMalAMyne Dimethylpropargylmalonat (dmMalyne) ebenfalls in seiner Reporterfunktion getestet. Da diese Moleküle jedoch alle ursprünglich nicht in Zellen vorkommen, ist es notwendig, diese auf ihre Toxizität zu testen. Dies geschah mittels eines Alamar Blue Assays.^[94] Dieser besteht aus einer wässrigen Resazurinlösung. Resazurin ist dabei ein nicht-toxischer blauer Farbstoff. Wird er reduziert, entsteht das Resorufin, ein rosafarbener Fluoreszenzfarbstoff. Ist eine Zelle intakt und damit metabolisch aktiv, ist sie in der Lage das Resazurin zu Resorufin zu reduzieren. Gleichzeitig wird dabei NADH zu NAD⁺ oxidiert. Ist die Zelle aufgrund von etwa der Aufnahme eines toxischen Stoffes in ihrer metabolischen Aktivität eingeschränkt, wird nicht dieselbe Menge Resazurin zu Resorufin reduziert wie in gesunden Zellen. Damit ist die Reduktion von Resazurin ein Maß für die Viabilität von Zellen.^{[94],[95]}

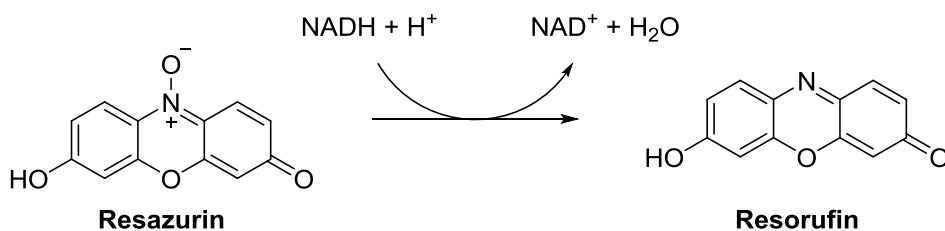


Abbildung 12: Schema der Reduktion von Resazurin zu Resorufin durch NADH wie sie in metabolisch aktiven Zellen abläuft. Diese Reaktion kann damit als Maß für die Viabilität von Zellen verwendet werden.

Die Toxizität der vier Reportermoleküle wurde sowohl an HEK293T als auch an HeLa S3 Zellen getestet. Hierfür wurden diese in Konzentrationen zwischen 1 μM und 2 mM mit dem jeweiligen Reporter für eine bestimmte Zeit behandelt. Da diese in einer Stocklösung von 100 mM in DMSO vorlagen, musste die Auswirkung von DMSO in verschiedenen Anteilen auf die Zellen ebenso betrachtet werden. Hierzu wurden die Zellen in den jeweiligen Anteilen und für dieselben Zeiten wie die Reporter mit DMSO behandelt. Nach der Behandlung erfolgte die Zugabe der Alamar Blue Lösung. Um die Reduktion des blauen Farbstoffs zum rosafarbenen Fluoreszenzfarbstoff in den Zellen beurteilen zu können, wurde anschließend die Fluoreszenz mit einem Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader ausgelesen. Die Anregung erfolgte bei 530 nm, die Detektion der Emission bei 590 nm.

Die Toxizität der Reporter in HEK293T und HeLa S3 Zellen wurden über Behandlungszeiten von einer und drei Stunden untersucht. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wird beschrieben werden, dass die Löslichkeit der Reportermoleküle in DMSO bzw. in weiteren Verdünnungen in DMSO und Medium nicht optimal ist. Aus diesem Grund war es immer wichtig, die Reporterlösungen vor der

Behandlung der Zellen eingehend zu mischen und mit Ultraschallwellen zu behandeln.

Um aussagekräftige und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die prozentualen Werte für die Viabilität folgendermaßen bestimmt:

$$Viabilität (\%) = \frac{I_{Fl(Reporter)} - I_{Fl(AB)}}{I_{Fl(ohne)} - I_{Fl(AB)}} \times 100\%$$

$I_{Fl(Reporter)}$ ist hier die ausgelesene Fluoreszenz der mit Reporter behandelten Zellen, $I_{Fl(AB)}$ ist die ausgelesene Fluoreszenz der Wells, die ausschließlich Alamar Blue in Medium in derselben Verdünnung wie die Wells, in denen sich Zellen befanden, enthielten, $I_{Fl(ohne)}$ ist die Fluoreszenz von Wells, in denen sich Zellen befanden, die nicht mit Malonylierungsreportern, aber mit Alamar Blue behandelt wurden.

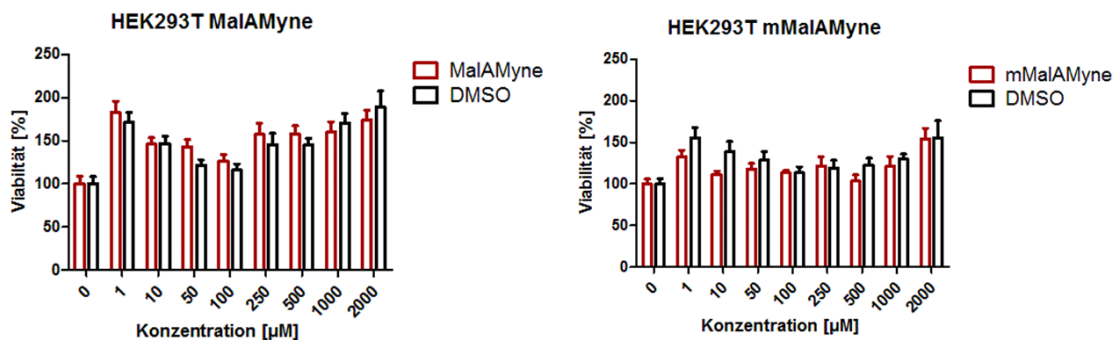


Abbildung 13: Dargestellt sind die Viabilitätstests von MalAMyne und mMalAMyne an HEK293T Zellen. Die Zellen wurden hierfür für eine Stunde mit dem jeweiligen Malonylierungsreporter bzw. mit dem jeweiligen DMSO-Anteil alleine und anschließend mit Alamar Blue behandelt. Verwendet wurden je die Reporterkonzentrationen 1, 10, 50, 100, 250 und 500 µM und 1 und 2 mM. Dargestellt sind die Werte als Mittelwert im Balkendiagramm mit Standardabweichung (SEM). Auf der x-Achse ist die Konzentration in µM aufgetragen, auf der y-Achse die Viabilität in %.

Zunächst sollen die Viabilitätstests an HEK293T und HeLa S3 Zellen mit einständiger Behandlungszeit mit den Malonylierungsreportern MalAMyne und mMALAMyne diskutiert werden.

Diese sind für die HEK293T Zellen in Abbildung 13 dargestellt. Auffällig ist dabei, dass zum Teil scheinbare Viabilitäten von über 100 % erreicht werden. Besonders stark ist dies bei höheren Reporterkonzentrationen. Für MalAMyne mit zwei Acetoxymethylgruppen ist dies noch stärker zu beobachten als für mMALAMyne.

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

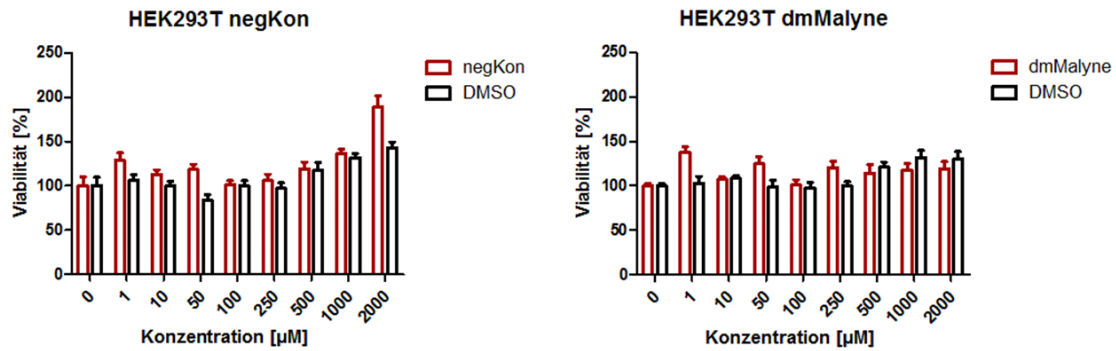


Abbildung 14: Dargestellt sind die Viabilitätstests von negKon und dmMalyne an HEK293T Zellen. Die Zellen wurden hierfür für eine Stunde mit dem jeweiligen Malonylierungsreporter bzw. mit dem jeweiligen DMSO-Anteil alleine und anschließend mit Alamar Blue behandelt. Verwendet wurden je die Reporterkonzentrationen 1, 10, 50, 100, 250 und 500 µM und 1 und 2 mM. Dargestellt sind die Werte als Mittelwert im Balkendiagramm mit Standardabweichung (SEM). Auf der x-Achse ist die Konzentration in µM aufgetragen, auf der y-Achse die Viabilität in %.

Auch die Behandlung mit dmMalyne führt zu Viabilitäten von über 100 % (Abbildung 14), jedoch nicht so stark wie MalAMyne und negKon. Die Viabilität von mMalAMyne liegt etwa im Bereich dazwischen. Da dieser Viabilitätstest die metabolische Aktivität der behandelten Zellen wiedergibt, ist anzunehmen, dass die Acetoxymethylgruppe zu höherer metabolischer Aktivität in Zellen führt, und zwar umso mehr, desto mehr dieser Gruppen im Reporter vorhanden sind. Nicht ausschließen lässt sich jedoch auch, dass das DMSO, in dem die Reporter gelöst wurden, darauf ebenso einen Einfluss nimmt. Die Werte von mit DMSO behandelten Zellen (schwarzen Balken) in den Diagrammen von MalAMyne und mMalAMyne reichen ebenfalls über die 100 % hinaus. Fakt ist, dass die Reporter innerhalb einer Stunde die Viabilität der behandelten Zellen nicht herabsetzen und diese sich damit gut zur weiteren Untersuchung der Malonylierung eignen.

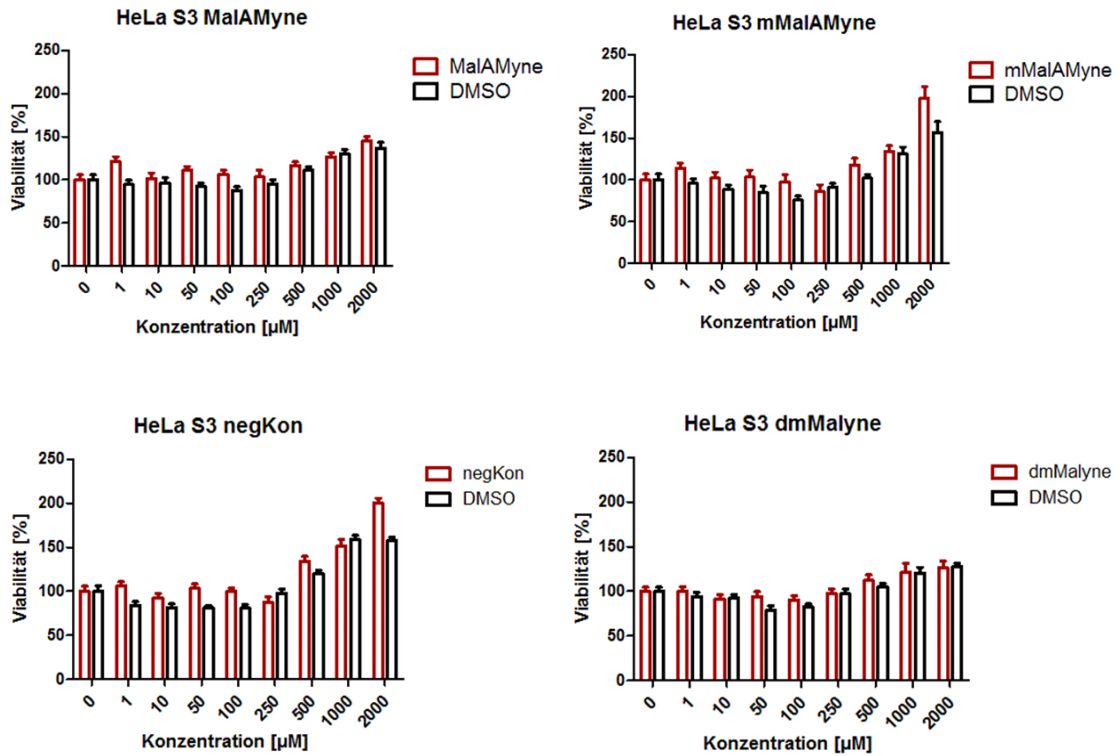


Abbildung 15: Dargestellt sind die Viabilitätstests an HeLa S3 Zellen. Die Zellen wurden hierfür für eine Stunde mit dem jeweiligen Malonylierungsreporter bzw. mit dem jeweiligen DMSO-Anteil alleine und anschließend mit Alamar Blue behandelt. Verwendet wurden je die Reporterkonzentrationen 1, 10, 50, 100, 250 und 500 µM und 1 und 2 mM. Dargestellt sind die Werte als Mittelwert im Balkendiagramm mit Standardabweichung (SEM). Auf der x-Achse ist die Konzentration in µM aufgetragen, auf der y-Achse die Viabilität in %.

Dieselben Tests wurden an HeLa S3 Zellen durchgeführt (Abbildung 15). Auch hier ist sichtbar, dass die Viabilität der Zellen außer bei negKon und mMalAMyne in einzelnen Fällen nicht unter 100 % fällt. Wie bei den HEK293T Zellen ist der Trend zu beobachten, dass die Viabilität bei hohen und geringeren Konzentrationen höher ist als im Zwischenbereich. Trotzdem kann festgehalten werden, dass die Malonylierungsreporter für Studien über die Malonylierung ebenso auf HeLa S3 Zellen angewandt werden können.

Die gleichen Tests wurden ebenso mit einer Expositionszeit der Reporter von drei Stunden auf den Zellen durchgeführt (Abbildungen 16 und 17).

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

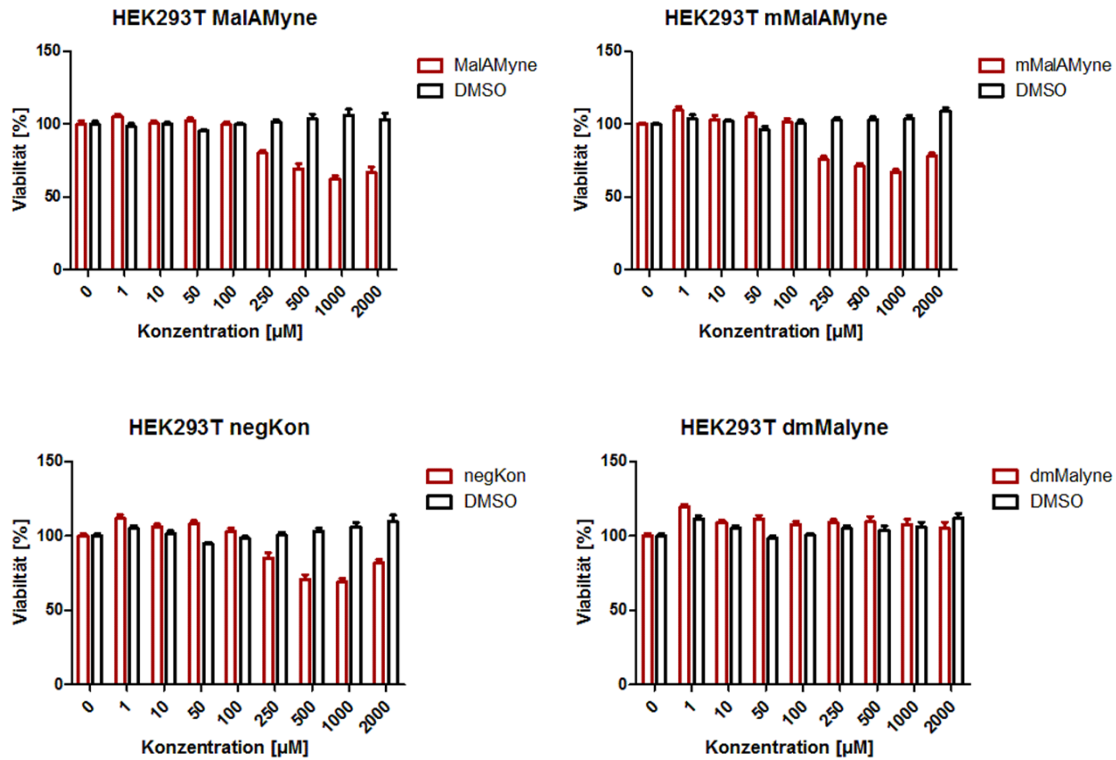


Abbildung 16: Dargestellt sind die Viabilitätstests an HEK293T Zellen. Die Zellen wurden hierfür für drei Stunden mit dem jeweiligen Malonylierungsreporter bzw. mit dem jeweiligen DMSO-Anteil alleine und anschließend mit Alamar Blue behandelt. Verwendet wurden je die Reporterkonzentrationen 1, 10, 50, 100, 250 und 500 µM und 1 und 2 mM. Dargestellt sind die Werte als Mittelwert im Balkendiagramm mit Standardabweichung (SEM). Auf der x-Achse ist die Konzentration in µM aufgetragen, auf der y-Achse die Viabilität in %.

Nach einer Behandlungszeit von drei Stunden ist im Gegensatz zu den Tests mit einer Stunde Behandlungszeit eine deutliche Absenkung der Viabilität der HEK293T Zellen für die Reporter MalAMyne, mMalAMyne und negKon zu beobachten. Für die Konzentrationen 250 µM bis 2 mM liegt diese unter 100 %. Für die Konzentrationen von 1 µM bis 100 µM liegt diese etwa bei 100 %. Die Reporter scheinen in den zuletzt genannten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf die Zellen zu haben. Jedoch fällt die Viabilität der Zellen durch die dreistündige Behandlung mit den Reporter-molekülen insgesamt nicht unter 62 %. Für dmMalyne ergeben sich kaum Abweichungen von 100 % bzw. zur jeweiligen Kontrolle mit DMSO. Damit scheint auch eine Behandlungszeit von drei Stunden ohne starke Auswirkungen auf die Zellen möglich zu sein.

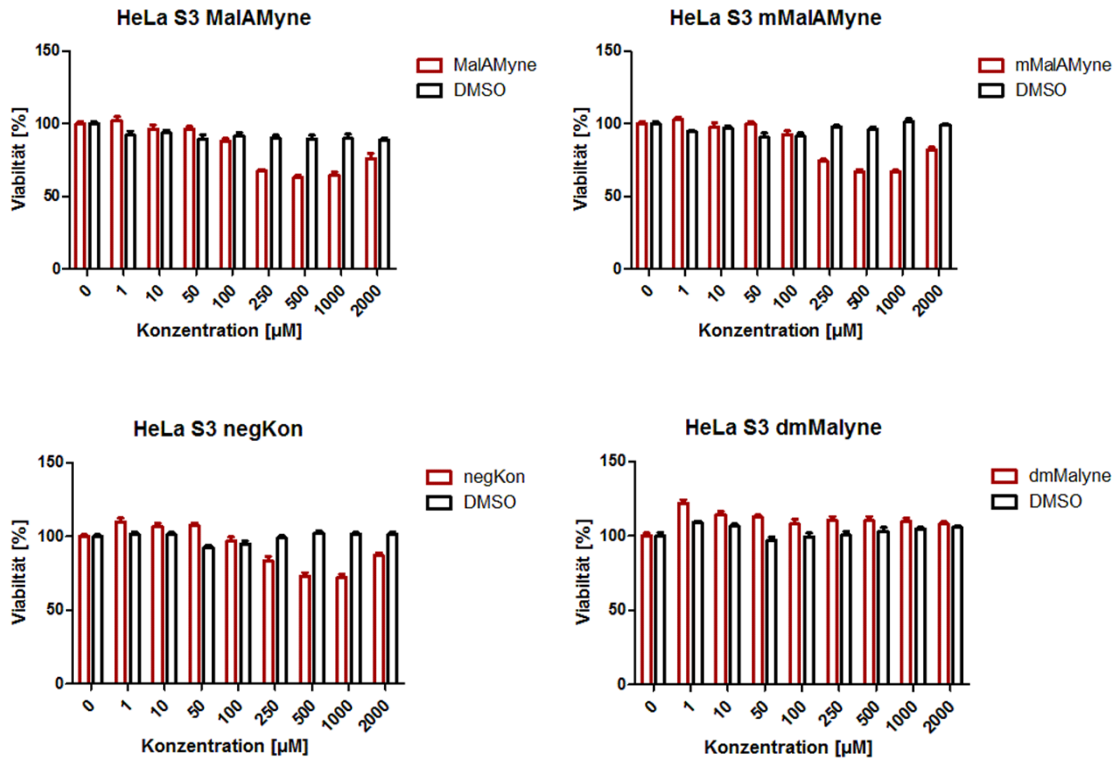


Abbildung 17: Dargestellt sind die Viabilitätstests an HeLa S3 Zellen. Die Zellen wurden hierfür für drei Stunden mit dem jeweiligen Malonylierungsreporter bzw. mit dem jeweiligen DMSO-Anteil alleine und anschließend mit Alamar Blue behandelt. Verwendet wurden je die Reporterkonzentrationen 1, 10, 50, 100, 250 und 500 µM und 1 und 2 mM. Dargestellt sind die Werte als Mittelwert im Balkendiagramm mit Standardabweichung (SEM). Auf der x-Achse ist die Konzentration in µM aufgetragen, auf der y-Achse die Viabilität in %.

Für die HeLa S3 Zellen und deren Viabilität gilt dasselbe wie für die HEK293T Zellen nach dreistündiger Behandlung mit den Malonylierungsreportern. dmMalMyne scheint quasi keine toxischen Wirkungen zu haben. Die Viabilität liegt für alle Behandlungskonzentrationen etwa bei 100 %. Für die anderen drei Reporter MalAMyne, mMalAMyne und negKon gilt auch hier, dass die Viabilität unter 100 % sinkt. Dies gilt jedoch nicht für Konzentrationen von 100 µM und kleiner. Wie bei den HEK293T Zellen scheinen auch hier 1 mM und 500 µM der Reporter toxischer zu sein als 2 mM. Dies kann wiederum darauf zurückzuführen sein, dass wie bei den Tests mit einer Behandlungszeit von einer Stunde zu sehen war, die metabolische Aktivität durch die Reporter ansteigt, umso mehr je höher die Konzentration.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Reporter auf Zellen angewandt werden können und dabei innerhalb einer Behandlungszeit von drei Stunden mit den Reportern die Zellviabilität nicht unter etwa 60 % sinkt.

3.4 Einbau der Malonylierungsreporter und Fluoreszenzmikroskopie

Nach den Toxizitätstests wurden die vier Reporter zur Untersuchung der Malonylierung direkt auf Säugerzellen angewandt. Hierzu wurden zunächst Stock-

lösungen der Reporter in DMSO vorbereitet, die dann für die jeweiligen Experimente mit Medium weiter verdünnt wurden. Zu Beginn wurde mit einer 1 M Stocklösung der Reporter in DMSO gearbeitet. Nach mehreren Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass diese nicht reproduzierbar waren. Dies lag an der schlechten Löslichkeit der Malonylierungsreporter in DMSO und Medium. Aus diesem Grund wurde schließlich mit 100 mM Stocklösungen in DMSO gearbeitet. Zudem war es immer notwendig, die Lösungen vor der Anwendung auf den Zellen auf 37°C zu erwärmen und mittels Ultraschallwellen gut zu durchmischen.

Ob die Reporter von den Zellen aufgenommen und kovalent eingebunden werden, sollte sich durch die Behandlung von HEK293T und HeLa S3 Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen mit MalAMyne, mMalAMyne, negKon bzw. dmMalyne für eine Stunde zeigen. Nach der Behandlung mit den Reportern wurden die Zellen mit 4 (w/v) % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und anschließend mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Es folgten weitere Tests der Reporter mit unterschiedlichen Inkubationszeiten für die Konzentrationen 500 μ M und 250 μ M. Auch hier wurden die Zellen nach der jeweiligen Behandlungszeit fixiert, permeabilisiert und angefärbt. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde schließlich an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (TCS SP5 Laser Scanning Mikroskop (Leica) und TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop (Leica)). Die Anregung erfolgte dabei bei 561 nm (SP5) bzw. 552 nm (SP8) und die Detektion jeweils im Bereich zwischen 565 und 625 nm. Im Folgenden sollen zunächst diese Experimente diskutiert werden.

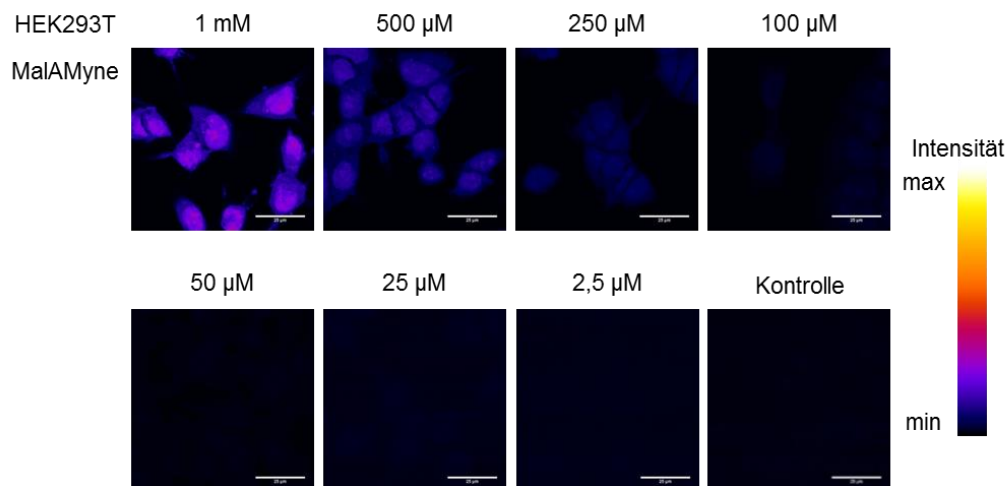


Abbildung 18: Gezeigt sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, von HEK293T Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne behandelt wurden. Nach der einstündigen Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μ m

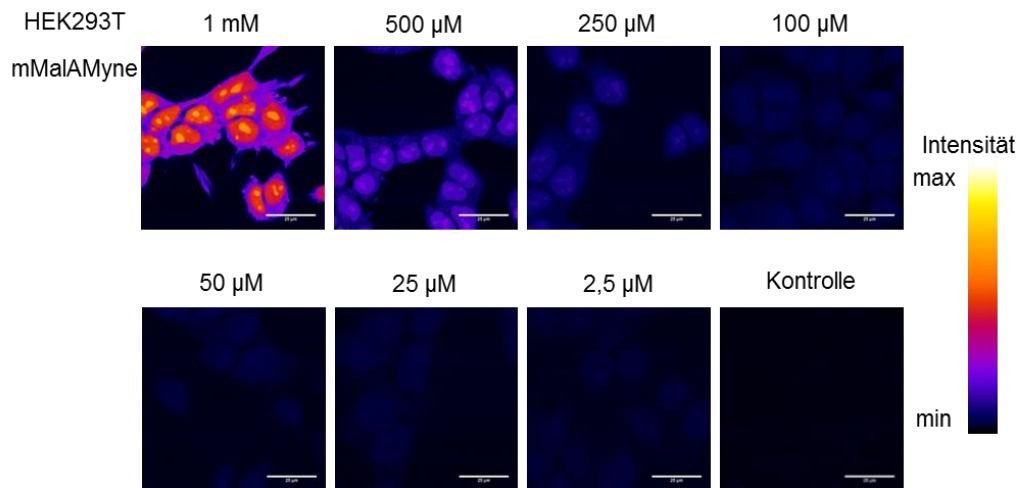


Abbildung 19: Gezeigt sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, von HEK293T Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Malonylierungsreporter mMalAMyne behandelt wurden. Nach der einstündigen Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 µm

Die Fluoreszenzbilder der HEK293T Zellen, die mit MalAMyne (Abbildung 18) bzw. mMalAMyne (Abbildung 19) behandelt wurden, zeigen zunächst einmal, dass die Reporter von den Zellen aufgenommen und kovalent eingebaut wurden. Der Einbau kann dadurch begründet werden, dass andernfalls die Reporter aufgrund der Permeabilisierung nach dem Färben wieder ausgewaschen worden wären. Zudem ist ersichtlich, dass umso mehr eingebaut wurde je höher die Konzentration, mit der die Zellen behandelt wurden. Für die Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurden die Laserintensität und die Abstimmung zwischen Signal und Hintergrund in jedem Experiment angepasst. Vergleichbar sind damit die Bilder innerhalb einer Abbildung.

Das höchste Fluoreszenzsignal jedoch ist in den Nukleoli zu beobachten. In den Kernen im Bereich um die Nukleoli ist das Signal ebenso hoch, während im Zytoplasma Proteine offensichtlich weniger stark durch die Reporter modifiziert werden. In Abbildung 20 und 21 sind dieselben Experimente in HeLa S3 Zellen aufgezeigt. Auch hier ist sichtbar, dass die Reporter MalAMyne und mMalAMyne von den Zellen aufgenommen und eingebaut werden. Ebenso zeigt sich ein Trend in der Signalintensität. Je höher die Reporterkonzentration desto höher das Fluoreszenzsignal. Ebenso wird der Reporter offensichtlich am besten in den Nukleoli eingebaut. Auch hier sollten die Intensitäten in den Bildern nur innerhalb eines Experiments aufgrund der Bildeinstellungen direkt verglichen werden. Für die Experimente, bei denen die Zellen mit mMalAMyne behandelt wurden, musste ein deutlich höherer Smart Gain gewählt werden. Dies bedeutet, das Fluoreszenzsignal ist dort deutlich geringer. Dieser Reporter wird damit nach ersten Annahmen weniger gut aufgenommen bzw. kovalent gebunden.

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

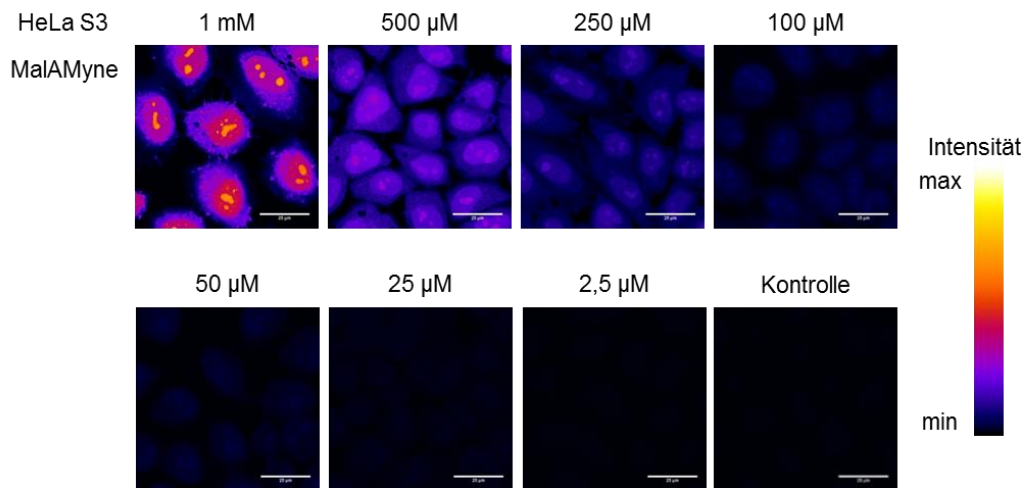


Abbildung 20: Gezeigt sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, von HeLa S3 Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne behandelt wurden. Nach der einstündigen Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 µm

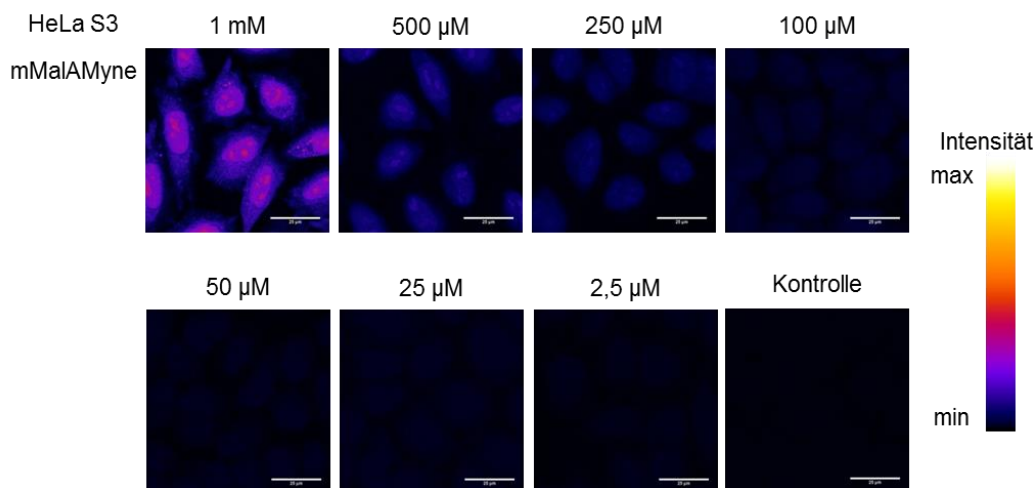


Abbildung 21: Gezeigt sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, von HeLa S3 Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dem Malonylierungsreporter mMalAMyne behandelt wurden. Nach der einstündigen Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 µm

Die Behandlung sowohl der HEK293T als auch der HeLa S3 Zellen mit dmMalmyne führte zu deutlich geringeren Fluoreszenzsignalen bzw. es konnte kaum ein Einbau der Reporter beobachtet werden. Im Bereich der kleinen Konzentrationen wurde hier 10 µM und 1 µM anstatt 25 µM und 2,5 µM verwendet. Doch auch hier ist jeweils nur ein sehr schwaches Signal sichtbar.

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

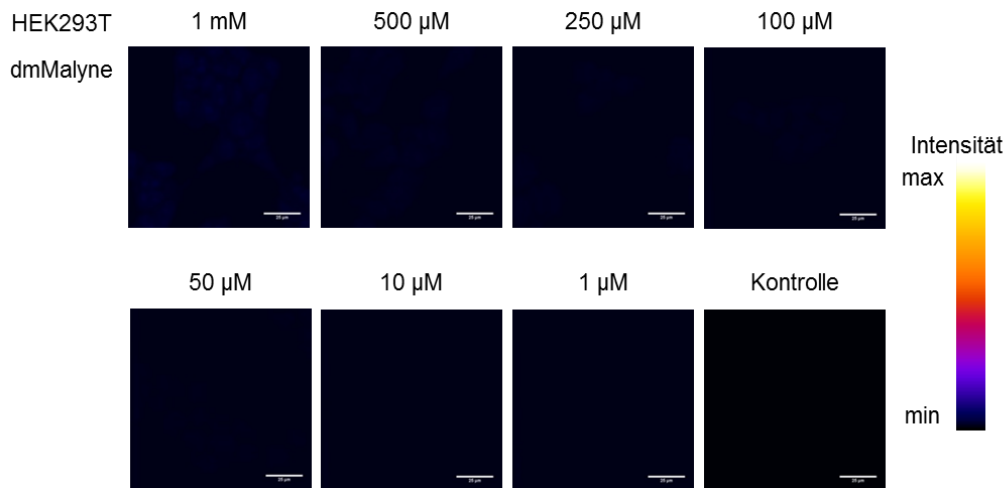


Abbildung 22: Gezeigt sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, von HEK293T Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dmMalyne behandelt wurden. Nach der einstündigen Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μ m

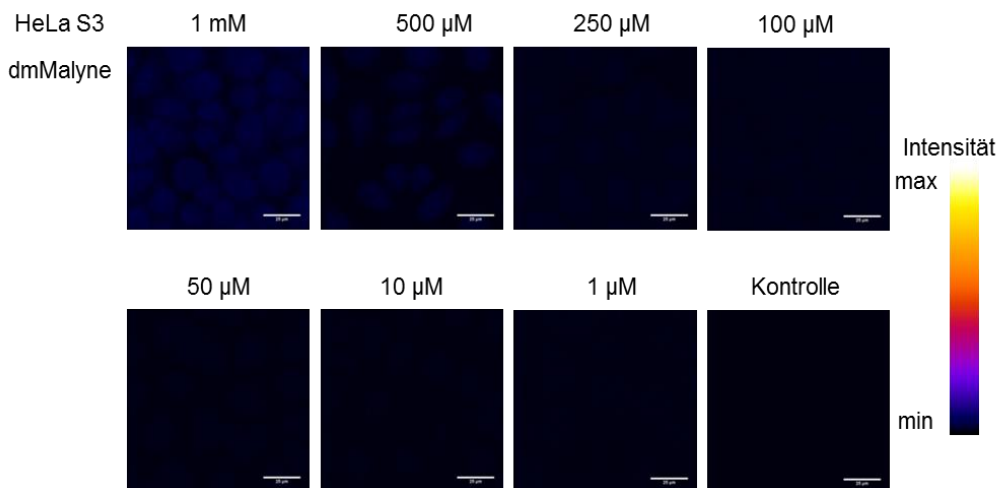


Abbildung 23: Gezeigt sind Fluoreszenzbilder, aufgenommen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, von HeLa S3 Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen mit dmMalyne behandelt wurden. Nach der einstündigen Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μ m

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Reporter, die eine oder zwei Acetoxymethylgruppen tragen, besser von den Zellen aufgenommen werden. Alle drei Reporter sollten nach der Aufnahme in den Zellen durch Esterasen zum selben Substrat umgewandelt werden. Der Einbau selbst sollte damit nicht von der Schutzgruppe abhängen.

Um zu zeigen, dass das Anfärben der Zellen nur in Anwesenheit eines Reporters möglich ist, der eine Propargylgruppe trägt und damit der verwendete Farbstoff Sulfo-Cyanin-3-Azid nicht unspezifisch eingebaut oder angelagert wird, wurden beide Zelllinien mit negKon ebenso in unterschiedlichen Konzent-

rationen behandelt. Sowohl in HEK293T als auch in HeLa S3 Zellen ist kein Fluoreszenzsignal und damit keine unspezifische Färbung für die anderen Reporter sichtbar.

Im Folgenden sind nun die Experimente zu unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt. Verwendet wurden jeweils Konzentrationen von 500 μM und 250 μM der Reporter.

Für den Reporter MalAMyne ist hierbei ein deutlicher Trend erkennbar (Abbildung 24). Je länger mit dem Reporter inkubiert wurde, desto stärker das Fluoreszenzsignal. Dies ist sowohl für 500 μM als auch für 250 μM der Fall.

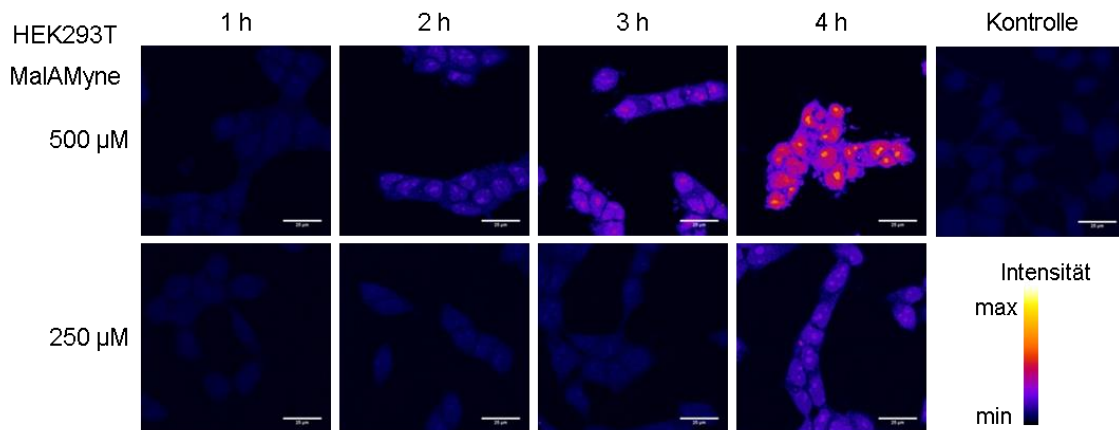


Abbildung 24: Aufnahmen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop von HEK293T Zellen, die zwischen einer und vier Stunden mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne behandelt wurden. Dabei wurden die beiden Konzentrationen 500 μM und 250 μM verwendet. Die Kontrolle zeigt Zellen, die nicht mit Reporter behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μm

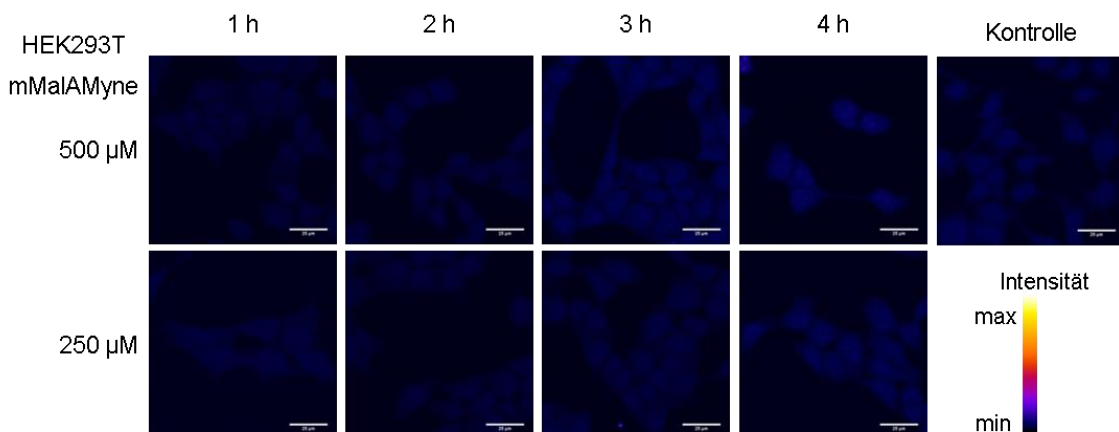


Abbildung 25: Aufnahmen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop von HEK293T Zellen, die zwischen einer und vier Stunden mit dem Malonylierungsreporter mMalAMyne behandelt wurden. Dabei wurden die beiden Konzentrationen 500 μM und 250 μM verwendet. Die Kontrolle zeigt Zellen, die nicht mit Reporter behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μm

Für mMalAMyne (Abbildung 25) ist hier nur ein sehr schwaches Signal zu sehen. Dies gilt für beide Konzentrationen und auch für die unterschiedlichen Inkubationszeiten zwischen einer und vier Stunden.

Gleiches gilt für die HeLa S3 Zellen in diesem Fall. Betrachtet man die Abbildungen 26 und 27, so wird deutlich, dass für MalAMyne ein eindeutiger Trend sichtbar ist. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wird am meisten an Reporter eingebaut. mMalAMyne dagegen zeigt für alle Inkubationszeiten wieder nur sehr geringe Signale.

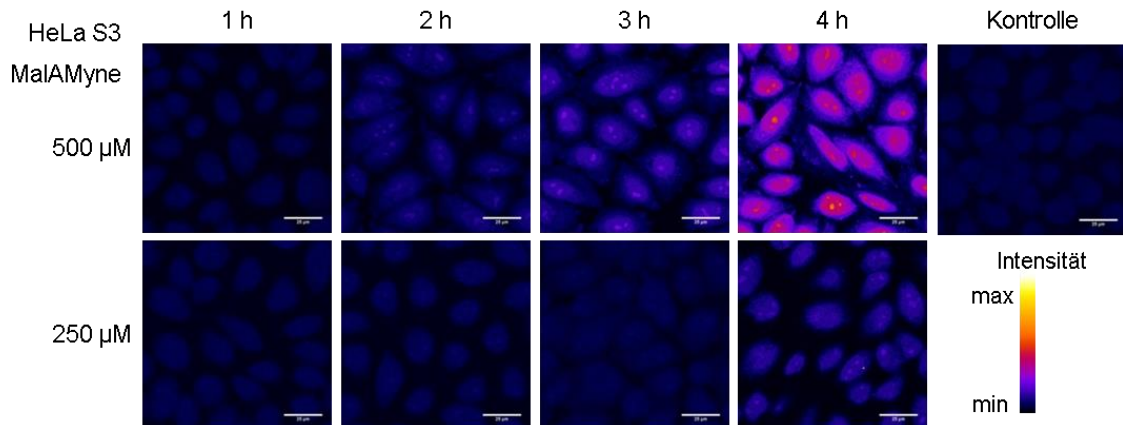


Abbildung 26: Aufnahmen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop von HeLa S3 Zellen, die zwischen einer und vier Stunden mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne behandelt wurden. Dabei wurden die beiden Konzentrationen 500 µM und 250 µM verwendet. Die Kontrolle zeigt Zellen, die nicht mit Reporter behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 µm

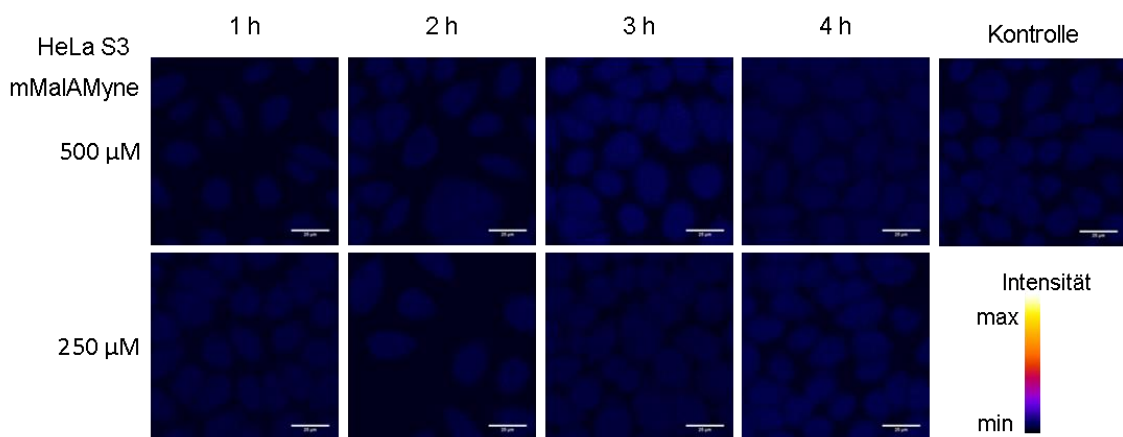


Abbildung 27: Aufnahmen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop von HeLa S3 Zellen, die zwischen einer und vier Stunden mit dem Malonylierungsreporter mMalAMyne behandelt wurden. Dabei wurden die beiden Konzentrationen 500 µM und 250 µM verwendet. Die Kontrolle zeigt Zellen, die nicht mit Reporter behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 µm

Auch in diesem Experiment wurde der Reporter dmMalyne nochmals an beiden Zelllinien getestet. Die Zellen wurden ebenfalls zwischen einer und vier Stunden mit den Konzentrationen 500 μM und 250 μM behandelt.

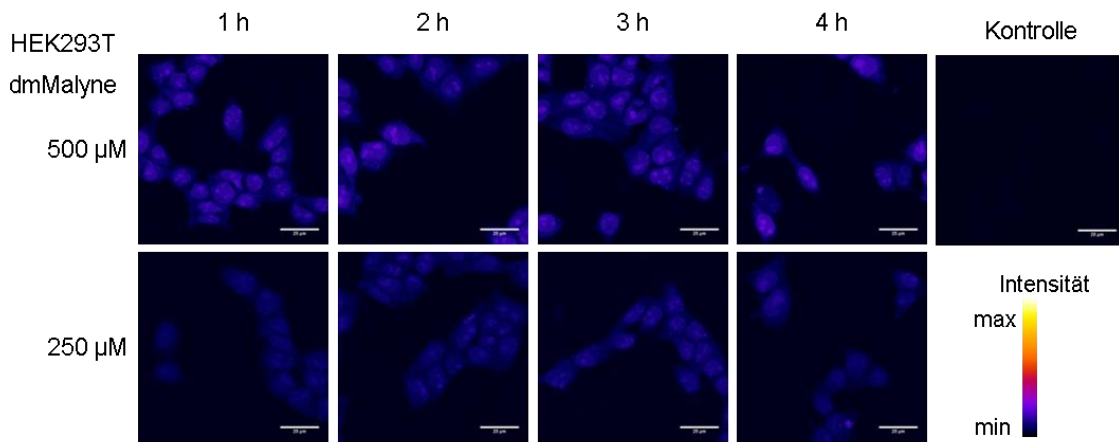


Abbildung 28: Aufnahmen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop von HEK293T Zellen, die zwischen einer und vier Stunden mit dmMalyne behandelt wurden. Dabei wurden die beiden Konzentrationen 500 μM und 250 μM verwendet. Die Kontrolle zeigt Zellen, die nicht mit Reporter behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μm

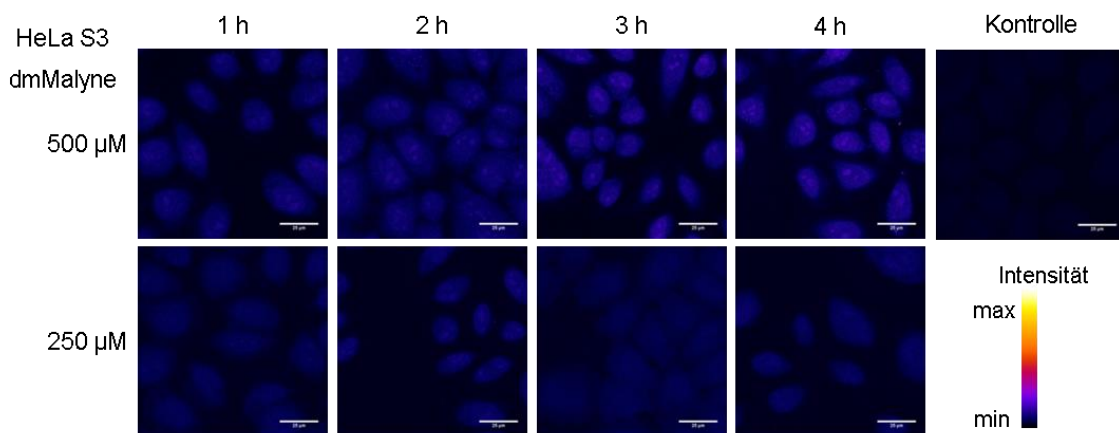


Abbildung 29: Aufnahmen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop von HeLa S3 Zellen, die zwischen einer und vier Stunden mit dmMalyne behandelt wurden. Dabei wurden die beiden Konzentrationen 500 μM und 250 μM verwendet. Die Kontrolle zeigt Zellen, die nicht mit Reporter behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und über CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 25 μm

In Abbildung 28 und 29 erkennt man, dass auch hier dmMalyne sowohl in HEK293T als auch in HeLa S3 Zellen nur zu einem geringen Maße eingebaut wird. Zwischen den zwei Konzentrationen bzw. ebenso zwischen den unterschiedlichen Inkubationszeiten sind kaum Unterschiede zu erkennen. Ebenso ist der Unterschied zur Kontrolle, also dem Fluoreszenzsignal der Zellen, die

nicht behandelt wurden, nur sehr gering. Aus diesem Grund wurde das Augenmerk in den folgenden Experimenten auf MalAMyne und mMalAMyne gelegt.

Um jedoch auch hier zu zeigen, dass das Fluoreszenzsignal nicht von einer unspezifischen Färbung durch das Sulfo-Cyanin-3-Azid zu Stande kommt, wurden HEK293T und HeLa S3 Zellen ebenfalls mit negKon behandelt.

In beiden Fällen ist keine Fluoreszenz zu erkennen. Dies bedeutet, dass auch über mehrere Stunden keine unspezifische Färbung auftritt und die ansonsten detektierte Fluoreszenz tatsächlich von der kovalenten Anbindung des Azido-Farbstoffs an den jeweiligen Malonylierungsreporter kommt.

Im Folgenden wurde nun getestet, ob die beiden Reporter MalAMyne und mMalAMyne bereits schon nach einer Exposition von weniger als einer Stunde auf HEK293T und HeLa S3 Zellen merklich eingebaut werden (Abbildungen 30-33).

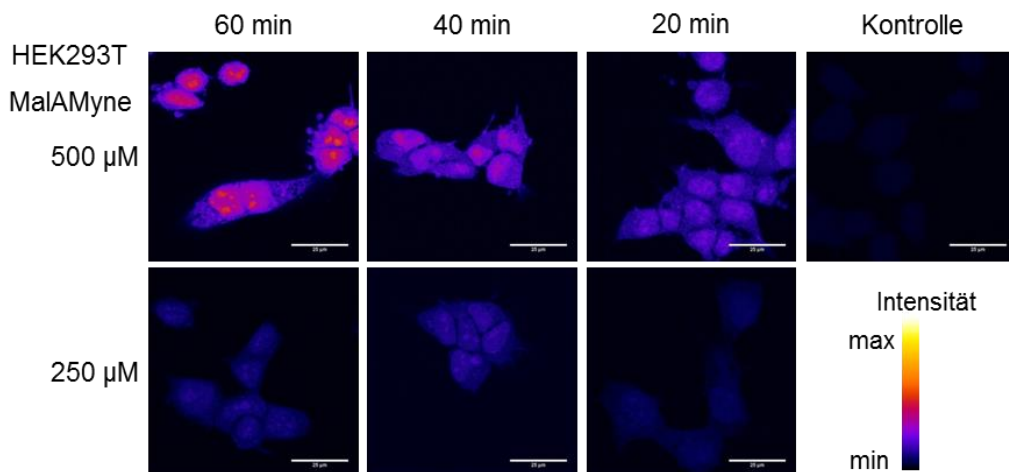


Abbildung 30: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HEK293T Zellen, die für weniger als eine Stunde mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne behandelt wurden. Nach der Behandlung folgte das Fixieren, Permeabilisieren und Anfärben der Zellen mittels der CuAAC und dem Azid-funktionalisierten Farbstoff Sulfo-Cyanin-3. Scale Bar: 25 µm

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

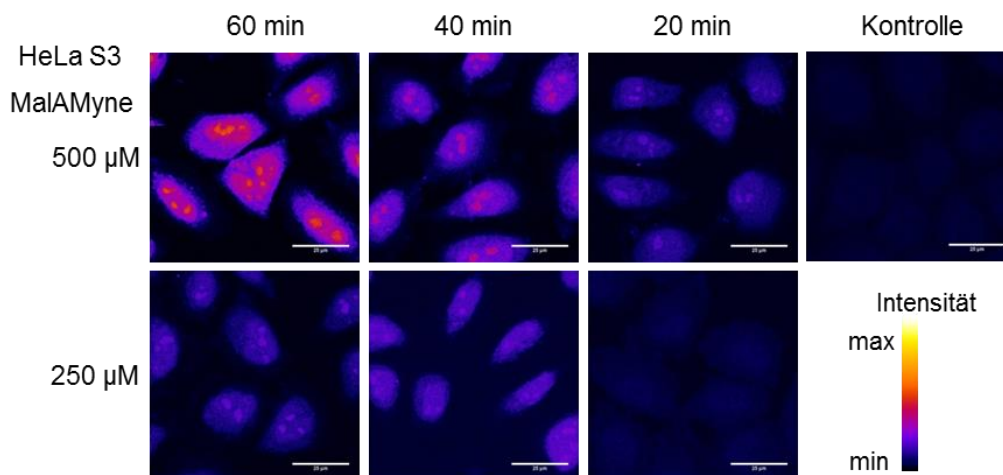


Abbildung 31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa S3 Zellen, die für weniger als eine Stunde mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne behandelt wurden. Nach der Behandlung folgte das Fixieren, Permeabilisieren und Anfärben der Zellen mittels der CuAAC und dem Azid-funktionalisierten Farbstoff Sulfo-Cyanin-3. Scale Bar: 25 µm

Auch hier wurden die Zellen je mit Konzentrationen von 500 µM bzw. 250 µM Reporter behandelt. Vor allem für die mit 500 µM MalAMyne behandelten Zellen ist ein Trend im Einbau zu erkennen. Nach einer Behandlung von einer Stunde ist definitiv das stärkste Fluoreszenzsignal sichtbar. Aber auch nach bereits 40 und ebenso 20 Minuten sind Unterschiede im Vergleich zur „Kontrolle“, wobei die Zellen nicht mit Reporter behandelt wurden, zu erkennen. Bei einer Konzentration von 250 µM ist nach nur 20 Minuten sowohl bei den HEK293T als auch den HeLa S3 Zellen kein Einbau sichtbar. Nach 40 Minuten und auch nach einer Stunde ist ein Fluoreszenzsignal zu erkennen. Jedoch unterscheiden sich diese beiden kaum.

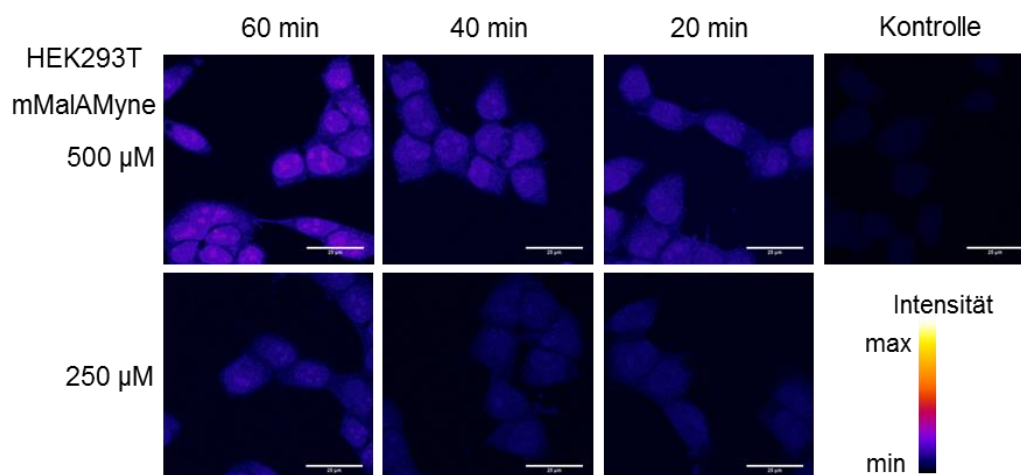


Abbildung 32: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HEK293T Zellen, die für weniger als eine Stunde mit dem Malonylierungsreporter mMalAMyne behandelt wurden. Nach der Behandlung folgte das Fixieren, Permeabilisieren und Anfärben der Zellen mittels der CuAAC und dem Azid-funktionalisierten Farbstoff Sulfo-Cyanin-3. Scale Bar: 25 µm

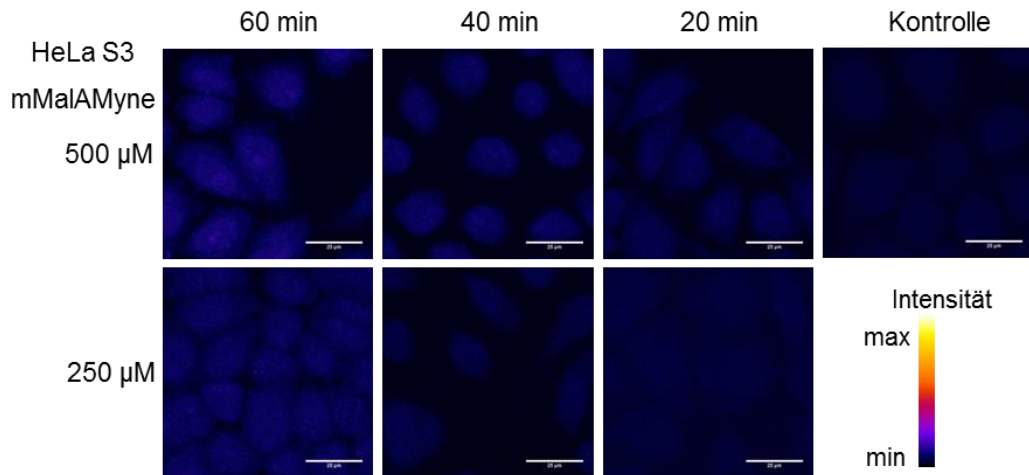


Abbildung 33: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa S3 Zellen, die für weniger als eine Stunde mit dem Malonylierungsreporter mMalAMyrene behandelt wurden. Nach der Behandlung folgte das Fixieren, Permeabilisieren und Anfärben der Zellen mittels der CuAAC und dem Azid-funktionalisierten Farbstoff Sulfo-Cyanin-3. Scale Bar: 25 µm

Betrachtet man die Abbildungen 32 und 33, so ist nur für die HEK293T Zellen ein schwacher Einbau von mMalAMyrene nach einer Behandlung von einer Stunde mit einer Konzentration von 500 µM sichtbar. Alle anderen behandelten Zellen zeigen keinen Unterschied zur Kontrolle. Auch dieses Experiment zeigt wieder, dass MalAMyrene deutlich besser eingebaut wird als mMalAMyrene.

Bis zu diesem Punkt kann festgehalten werden, dass die Reporter MalAMyrene und mMalAMyrene in HEK293T und HeLa S3 Zellen eingebaut werden. Damit konnte die Malonylierung mittels einer Reporterstrategie in Zellen mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden. Der kovalente Einbau der Reporter zeigt sich dadurch, dass aufgrund des Fixierens und des anschließenden Permeabilisierens, Färbens und Waschen der Zellen der Reporter ohne eine kovalente Anknüpfung wieder ausgewaschen worden wäre. MalAMyrene scheint jedoch deutlich besser von den Zellen aufgenommen zu werden als mMalAMyrene. Mit dmMalmyne sind nur sehr schwache Fluoreszenzsignale sichtbar. Das nicht-propargylierte Pendant zu MalAMyrene negKon zeigt wie zu erwarten kein Fluoreszenzsignal.

3.5 Nachweis der Malonylierung mittels Western Blotting

In diesem Unterkapitel wird vor allem der Malonylierungsreporter MalAMyne, der die vielversprechendsten Ergebnisse in der Fluoreszenzmikroskopie zeigte, auf den Einbau in Proteinen untersucht. Ein Vergleich der beiden Reporter MalAMyne und mMalAMyne wird ebenfalls aufgezeigt.

Getestet wurden verschiedene Reporterkonzentrationen und Inkubationszeiten, um dies mit den Fluoreszenzexperimenten abzugleichen. Ebenso wurde ein Augenmerk auf die Demalonylase Sirtuin 5 gelegt und untersucht, ob MalAMyne von dieser als Substrat verwendet wird. Dies geschah zum einen durch deren Überexpression in HEK293T Zellen und die Behandlung mit einem Inhibitor des Enzyms. Da das Ziel die proteinspezifische Untersuchung der Malonylierung ist, wurden mehrere als malonyliert bekannte Proteine mit einer GFP-Markierung in HEK293T Zellen überexprimiert. Es folgte die Behandlung mit MalAMyne. Zudem war mittels des Reporters zu untersuchen, ob der Prozess der Malonylierung enzymatisch verläuft.

Zunächst sollten die beiden Reporter verglichen werden. Dafür wurden sowohl HEK293T als auch HeLa S3 Zellen mit den Reportern MalAMyne (250 μ M und 500 μ M), mMalAMyne (250 μ M und 500 μ M) oder negKon (500 μ M) für vier Stunden behandelt. Anschließend erfolgten die Lyse der Zellen und das Anfärben wie für die Fluoreszenzexperimente mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid. Nach dem Fällern der Proteine und der Denaturierung der Proben wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blotting analysiert. Das Auslesen der Fluoreszenz im Western Blot erfolgte an einem Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences) der AG Deuring der Universität Konstanz, womit der Einbau der Reporter verfolgt werden konnte. Die Anregung erfolgte dabei bei 532 nm und die Detektion des Fluoreszenzsignals aller Wellenlängen >575 nm. Die Ladekontrolle der einzelnen Proben wurde durch die Anfärbung der Proteine mit Ponceau S und die Detektion an einem ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) überprüft.

Die Abbildungen 34 und 35 zeigen die Western Blots zu dem Vergleich der beiden Reporter in HEK293T bzw. in HeLa S3 Zellen. Die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid zeigt deutlich, dass die beiden Reporter MalAMyne und mMalAMyne kovalent an Proteine angeknüpft werden. Die Intensität von MalAMyne ist dabei jedoch viel höher. Dieser Reporter wird, wie sich auch schon in den Fluoreszenzexperimenten andeutete, besser eingebaut bzw. durch seine beiden Acetoxymethylgruppen effektiver von den Zellen aufgenommen, wodurch mehr Substrat zur Verfügung stehen kann. Kein Signal ist erwartungsgemäß bei der Negativkontrolle und auch im Kontrollexperiment mit unbehandelten Zellen zu erkennen. Die Färbung erfolgt also nicht unspezifisch. Aufgrund der Effektivität des Einbaus wurde in den folgenden Experimenten das Augenmerk auf MalAMyne gelegt.

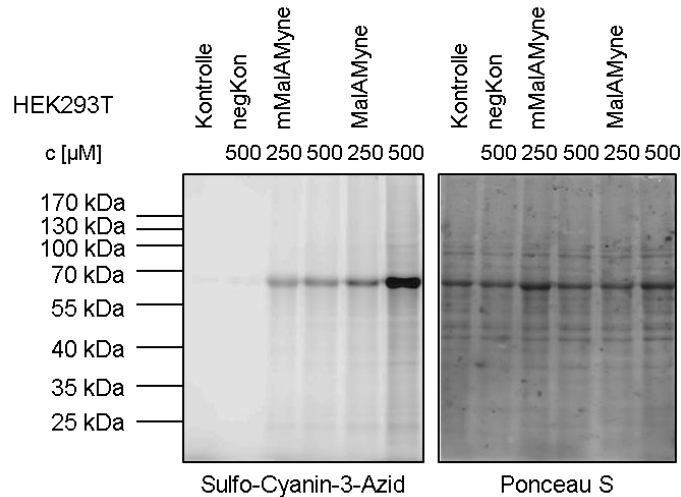


Abbildung 34: Direkter Vergleich der beiden Reporter MalAMyne und mMAlAMyne. HEK293T Zellen wurden dafür entweder mit einem der Reporter mit einer Konzentration von 250 μ M bzw. 500 μ M oder mit negKon für vier Stunden behandelt. Die „Kontrolle“ zeigt eine Probe mit unbehandelten Zellen. Nach der Behandlung der Zellen wurden diese lysiert und mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Die Visualisierung der Reporter erfolgte mittels der Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid. Die Anfärbung mit Ponceau S diente als Ladekontrolle.

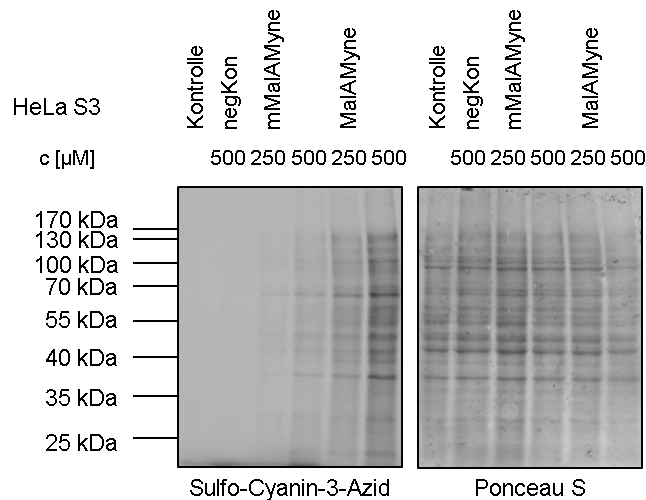


Abbildung 35: Direkter Vergleich der beiden Reporter MalAMyne und mMAlAMyne. HeLa S3 Zellen wurden dafür entweder mit einem der Reporter mit einer Konzentration von 250 μ M bzw. 500 μ M oder mit negKon für vier Stunden behandelt. Die „Kontrolle“ zeigt eine Probe mit unbehandelten Zellen. Nach der Behandlung der Zellen wurden diese lysiert und mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Die Visualisierung der Reporter erfolgte mittels der Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid. Die Anfärbung mit Ponceau S diente als Ladekontrolle.

Zur Stützung der Aussagen aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie an HEK293T und HeLa S3 Zellen wurden diese erneut mit MalAMyne behandelt. Zunächst wurden unterschiedliche Konzentrationen auf die Zellen angewandt

und die Zellen nach der Behandlung lysiert. Nach dem Färben der Proben mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, der Fällung der Proteine und dem Denaturieren der Proben wurden die Proteine ebenso mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blotting analysiert.

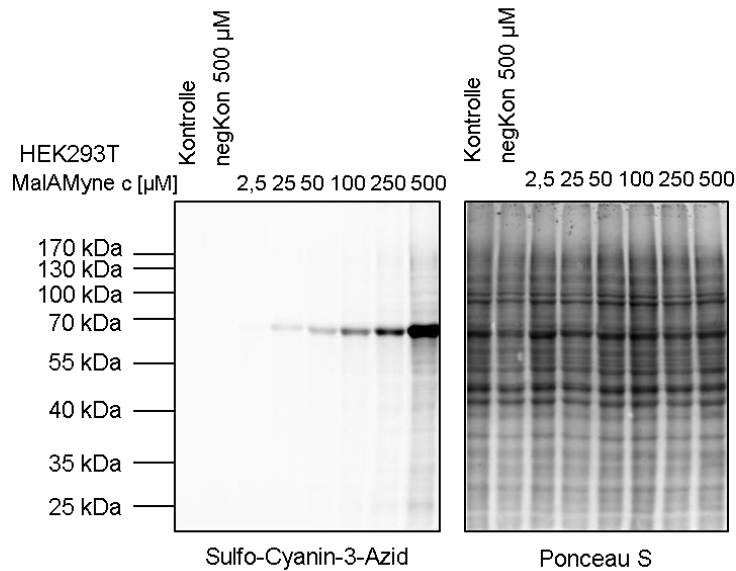


Abbildung 36: Gezeigt ist die Behandlung von HEK293T Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an MalAMyne von 2,5 µM bis 500 µM für eine Stunde. Der Behandlung mit Reportern folgte die Lyse der Zellen, das Anfärben mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, das Fällung der Proteine und das Denaturieren der Probe. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Gelelektrophorese und die Analyse mittels Western Blotting. Der linke Blot zeigt die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid, der rechte die Ponceau S-Färbung zur Ladekontrolle.

Die Blots in den Abbildungen 36 und 37 zeigen deutlich, sowohl für HEK293T als auch für HeLa S3 Zellen, einen konzentrationsabhängigen Einbau des Reporters MalAMyne wie er auch auf den Fluoreszenzbildern zu beobachten war. Die Zellen wurden mit Konzentrationen zwischen 2,5 µM und 500 µM Reporter für eine Stunde behandelt. Auch schon für eine Konzentration von nur 25 µM sind schwache Banden zu erkennen. Kein Fluoreszenzsignal ist zu erkennen, falls die Zellen gar nicht oder mit negKon behandelt wurden.

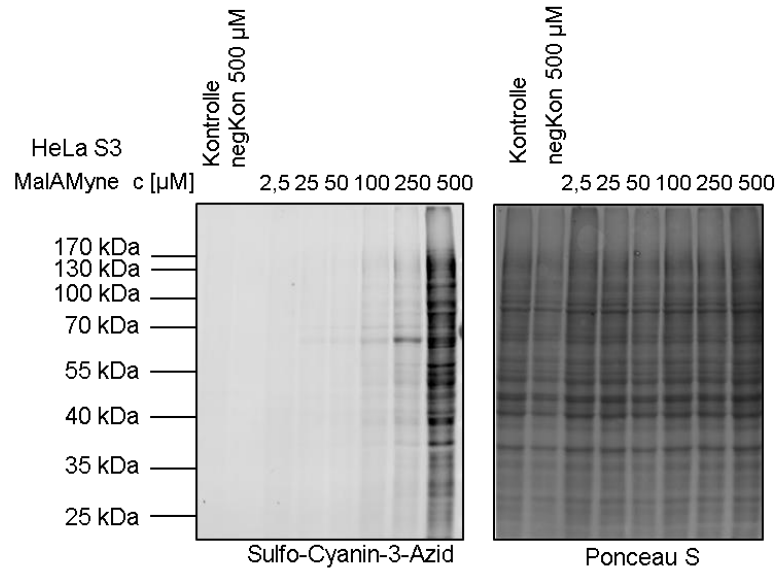


Abbildung 37: Gezeigt sind die Behandlung von HeLa S3 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an MalAMyne von 2,5 µM bis 500 µM für eine Stunde. Der Behandlung mit Reportern folgte die Lyse der Zellen, das Anfärben mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, das Fällen der Proteine und das Denaturieren der Probe. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Gelelektrophorese und die Analyse mittels Western Blotting. Der linke Blot zeigt die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid, der rechte die Färbung mit Ponceau S, die als Ladekontrolle diente.

Ob eine Abhängigkeit zwischen Reportereinbau und Inkubationszeit besteht, wie sie bereits in den Fluoreszenzexperimenten beobachtet wurde, konnte nun auch nach der Lyse der behandelten Zellen und der Auftrennung deren Proteine mittels Gelelektrophorese gezeigt werden. HEK293T und HeLa S3 Zellen wurden erneut mit MalAMyne behandelt, in diesem Falle zwischen ein und vier Stunden. Ebenso wurden wieder zwei verschiedene Reporterkonzentrationen von 250 µM und 500 µM gewählt. Die Ergebnisse dazu werden in den Abbildungen 38 und 39 vorgestellt.

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

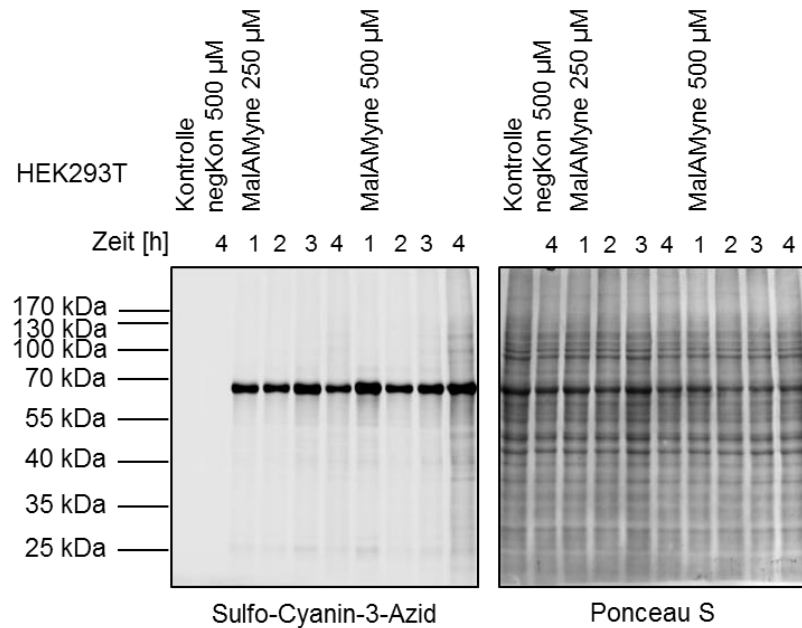


Abbildung 38: Behandlung von HEK293T Zellen mit MalAMyne zwischen ein und vier Stunden mit 250 µM bzw. 500 µM. Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen komplett nicht bzw. mit 500 µM der Negativkontrolle für vier Stunden behandelt. Der Behandlung mit Reportern folgte die Lyse der Zellen, das Anfärben mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, das Fällen der Proteine und das Denaturieren der Probe. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Gelelektrophorese und die Analyse mittels Western Blotting. Der linke Blot zeigt die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid, der rechte die Anfärbung mit Ponceau S zur Überprüfung der Ladekontrolle.

Die Ergebnisse, die in den Western Blots zu den unterschiedlichen Inkubationszeiten erkennbar sind, decken sich mit dem Konzentrationsexperiment und den Ergebnissen aus der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 24 und 26). Bei einer Inkubationszeit von vier Stunden und einer Konzentration von 500 µM ist sowohl für die HEK293T als auch die HeLa S3 Zellen der Einbau von MalAMyne am stärksten und damit auch der Anteil der Malonylierung durch den Reporter. Bei den HEK293T Zellen ist für die geringeren Inkubationszeiten, ebenso wie für eine Konzentration von 250 µM, kaum ein Fluoreszenzsignal zu erkennen. Dies gilt jedoch nicht für eine Bande bei etwa 67 kDa, die bei allen Konzentrationen und Inkubationszeiten besonders heraussticht. Hier handelt es sich vermutlich um ein besonders stark malonyliertes bzw. mit dem Reporter modifiziertes Protein. Auffällig ist nur, dass diese bei den HeLa S3 Zellen gegenüber den anderen Banden nicht ganz so intensiv ist. Bei den HeLa S3 Zellen ist jedoch für eine Konzentration von 250 µM ebenso ein Fluoreszenzsignal über alle Banden sichtbar. Dies ist schwächer als für Zellen, die mit 500 µM für 4 Stunden behandelt wurden.

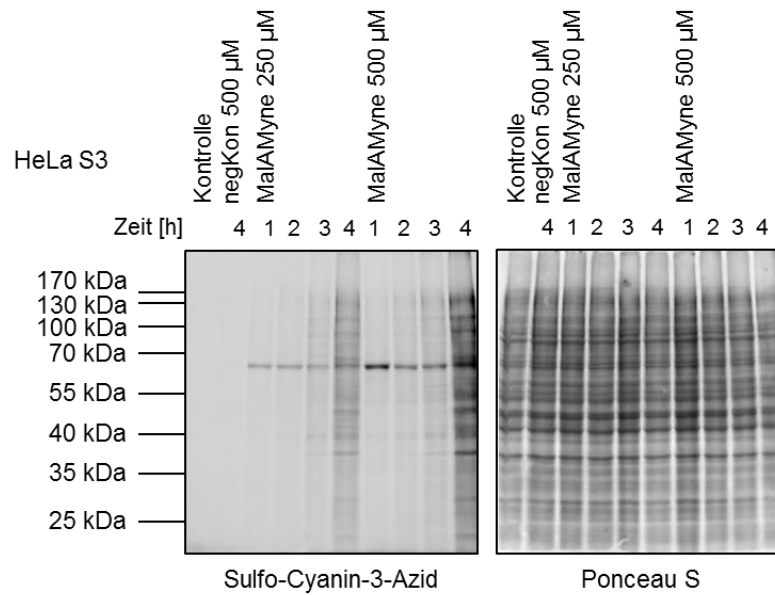


Abbildung 39: Behandlung von HeLa S3 Zellen mit MalAMyne zwischen ein und vier Stunden mit 250 µM bzw. 500 µM. Als Kontrolle wurden zusätzlich Zellen komplett nicht bzw. mit 500 µM der Negativkontrolle für vier Stunden behandelt. Der Behandlung mit Reportern folgte die Lyse der Zellen, das Anfärben mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, das Fällern der Proteine und das Denaturieren der Probe. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Gelelektrophorese und die Analyse mittels Western Blotting. Der linke Blot zeigt die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid, der rechte die Anfärbung mit Ponceau S zur Ladekontrolle.

Gezeigt werden konnte damit, dass die Reportermoleküle MalAMyne und mMalAMyne sowohl in HEK293T als auch in HeLa S3 Zellen kovalent an Proteine angeknüpft werden, MalAMyne noch deutlich mehr als mMalAMyne. Der Einbau erfolgt zeit- und konzentrationsabhängig.

Wie bereits in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben wurde, wird die Demalonylierung von Proteinen durch das Enzym Sirtuin 5 katalysiert. Nun stellt sich die Frage, ob der Malonylierungsreporter MalAMyne ein Substrat von Sirtuin 5 ist und damit die Demalonylierung ebenso beobachtet werden kann. Hierzu wurden zwei Experimente durchgeführt. Im ersten wurden sowohl HEK293T als auch HeLa S3 Zellen zusätzlich zur Behandlung von MalAMyne mit einem Sirtuin 5-Inhibitor, Suramin, behandelt. Im zweiten Experiment wurde Sirtuin 5 in HEK293T überexprimiert und das Verhalten des Reporters im Gegensatz zu Zellen mit normalem Sirtuin 5-Level verglichen.

Die Überexpression von Sirtuin 5 in HEK293T Zellen erfolgte mittels der Calcium-Phosphat-Transfektion von Sirtuin 5.^[96] Nach der Transfektion folgte die Behandlung mit Malonylierungsreporter MalAMyne in den Konzentrationen 500 µM und 250 µM für vier Stunden. Es folgte wie bei den vorhergehenden Experimenten die Lyse der Zellen, das Färben mit Sulfo-Cyanin-3-Azid, das Fällern und Denaturieren der Proteine und die Auftrennung mittels Gelelektrophorese mit anschließender Western Blot Analyse. Durch die Überexpression

von Sirtuin 5 ist zu erwarten, dass der Level der Malonylierung geringer ist, da die Demalonylierung verstärkt sein sollte.

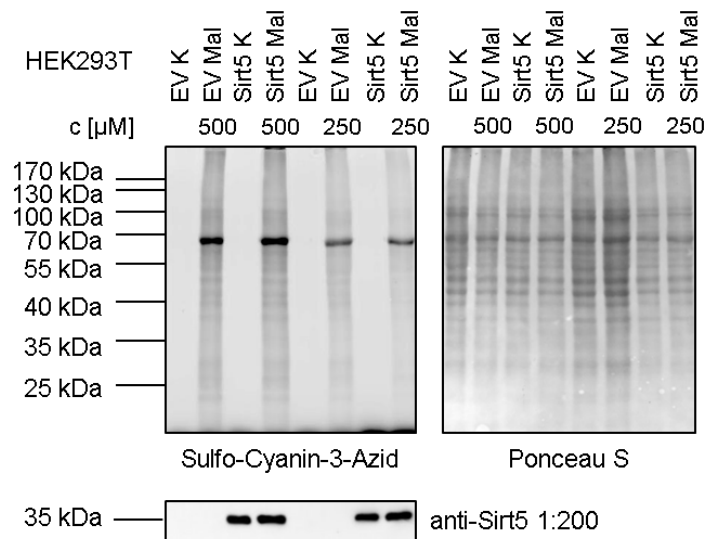


Abbildung 40: Transfektion von HEK293T Zellen mit Sirtuin 5: Nach der Überexpression von Sirtuin 5 wurden die Zellen für vier Stunden mit 500 μM bzw. 250 μM MalAMyene behandelt bzw. nur das Medium getauscht. EV steht für Ersatzvektor. Diese Zellen wurden nicht mit Sirtuin 5, sondern nur mit einem Kontrollvektor transfiziert. Wie in der Abbildung angezeigt wurden sowohl Zellen mit EV also auch solche mit überexprimiertem Sirt5 mit MalAMyene behandelt. Anschließend erfolgten die Lyse, das Färben, die Fällung der Proteine und die Denaturierung. Die Transfektion wurde durch die Anfärbung mit einem Sirtuin 5-Antikörper, die gleichmäßige Ladung der Proteine auf dem Gel mit der Ponceau S-Färbung kontrolliert.

In Abbildung 40 ist deutlich zu sehen, dass überall dort, wo die HEK293T Zellen mit MalAMyene behandelt wurden, ein Fluoreszenzsignal sichtbar ist, sowohl für die Zellen, in denen Sirtuin 5 überexprimiert wurde, als auch dort, wo diese mit einem Ersatzvektor transfiziert wurden. Dass Sirtuin 5 überexprimiert werden konnte, wird durch die Behandlung mit Sirtuin 5-Antikörper angezeigt. Was jedoch nicht beobachtet werden kann, ist eine Verringerung des Fluoreszenzsignals bei höherem Sirtuin 5-Level. Es besteht kein Unterschied in der Signalintensität zwischen den Banden Ersatzvektor MalAMyene und Sirtuin 5 MalAMyene mit jeweils derselben Konzentration. Dies lässt vermuten, dass der Malonylierungsreporter MalAMyene kein Substrat der Demalonylase Sirtuin 5 ist.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde mit dem Sirtuin 5-Inhibitor Suramin gearbeitet. Dabei wurden sowohl HEK293T als auch HeLa S3 Zellen mit 300 μM Suramin für 30 Minuten vor- und anschließend mit negKon bzw. MalAMyene behandelt. Als Vergleich wurden dieselben Experimente ohne die Suramin-Vorbehandlung durchgeführt. Wie für die vorherigen Experimente erfolgten nach vierstündiger Behandlung mit Malonylierungsreporter die Lyse der Zellen, die Anfärbung, die Fällung der Proteine und deren Denaturierung. In den Abbildungen 41 und 42 ist zusätzlich die Sichtbarmachung der natürlichen Malonylie-

ung mittels Antikörper abgebildet. Um ein Signal zu erhalten, musste zur Inkubation der Blots mit Anti-Malonyllysin über Nacht noch anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Trotzdem war die natürliche Malonylierung nur sehr schwach zu erkennen. Jedoch konnte damit gezeigt werden, dass der Level überall gleich hoch war.

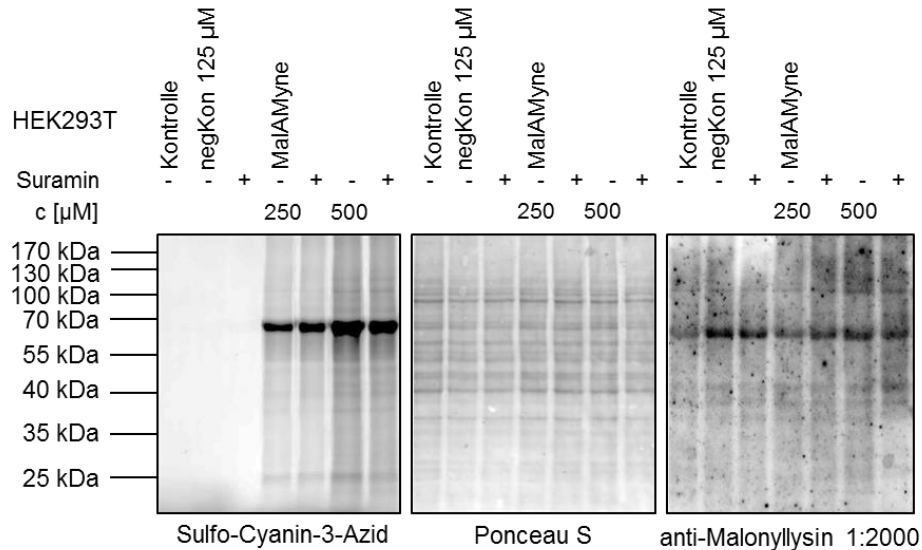


Abbildung 41: Behandlung von HEK293T Zellen mit zunächst 300 µM Suramin für 30 Minuten vor der Behandlung mit MalAMyne mit 250 µM bzw. 500 µM oder der Negativkontrolle für vier Stunden. Eine „Kontrolle“ zeigt Zellen, die gar nicht behandelt wurden. Nach der Behandlung erfolgte deren Lyse, die Färbung mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, die Fällung der Proteine und deren Denaturierung. Nach der Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden diese mittels Western Blotting analysiert. Das natürliche Level der Malonylierung wurde durch einen Malonylierungsantikörper sichtbar gemacht und die gleichmäßige Ladung der Proteine auf dem Gel durch die Ponceau S-Färbung kontrolliert.

Wie zu erwarten, wurde kein Fluoreszenzsignal für die Kontrollproben detektiert, ebenso für die mit Negativkontrolle behandelten Zellen. Ein Vergleich zwischen jeweils den Proben, die außer der Vorbehandlung mit Suramin identisch behandelt wurden, zeigt jedoch auch hier keinen Unterschied. Sowohl für die HEK293T als auch die HeLa S3 Zellen ist das Level der Malonylierung für mit Suramin behandelte Zellen nicht höher. Aufgrund des Demalonylase-Inhibitors sollte dieses jedoch erhöht sein. Dies ist auch nicht in der Antikörperfärbung zu erkennen. Somit ist ebenso der Level der natürlichen Malonylierung durch Suramin nicht verändert worden und damit keine Aussage diesbezüglich zu MalAMyne und der Suraminbehandlung möglich.

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

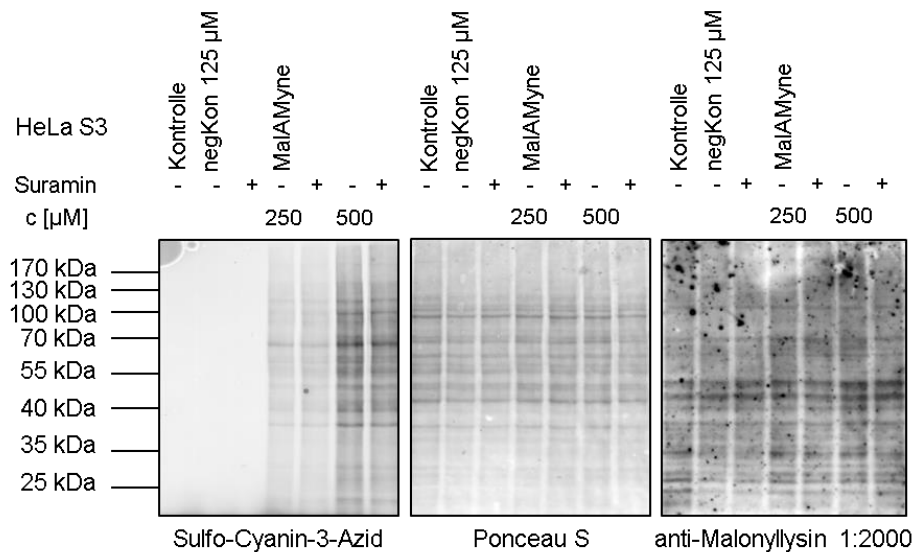


Abbildung 42: Behandlung von HeLa S3 Zellen mit zunächst 300 µM Suramin für 30 Minuten vor der Behandlung mit MalAMyne mit 250 µM bzw. 500 µM oder der Negativkontrolle für vier Stunden. Eine „Kontrolle“ zeigt Zellen, die gar nicht behandelt wurden. Nach der Behandlung erfolgten deren Lyse, die Färbung mit CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid, die Fällung der Proteine und deren Denaturierung. Nach der Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden diese mittels Western Blotting analysiert. Anti-Malonyllysine zeigt den natürlichen Level der Malonylierung an, die Färbung mit Ponceau S gibt Aufschluss über die Ladekontrolle.

Um einen besseren Einblick zu bekommen, wurde in einem nächsten Experiment die Konzentration an Suramin auf 500 µM und die Behandlungszeit auf eine Stunde erhöht. Die Zellen wurden ebenfalls vor der Behandlung mit Malonylierungsreporter mit Suramin vorbehandelt. Nach der Behandlung mit 500 µM MalAMyne für eine Stunde erfolgte dann die Behandlung mit 500 µM negKon für unterschiedlich lange Zeiten. Dieses Pulse-Chase-Experiment sollte unterschiedliche Malonylierungslevel mittels des Malonylierungsreporters aufzeigen. Zunächst sollte damit die Demalonylase Sirtuin 5 durch Suramin inhibiert werden. Mit der Behandlung der Zellen mit MalAMyne erfolgt die Malonylierung mittels des Reporters. Die anschließende Chase-Phase stellt der Zelle negKon zur Malonylierung zur Verfügung. Ist die Demalonylierung gehemmt, wird negKon nicht verwendet und MalAMyne bleibt kovalent an die Proteine gebunden. Ist die Demalonylase nicht gehemmt, sollte MalAMyne entfernt und negKon zur weiteren Malonylierung verwendet werden. Damit verschwindet das Fluoreszenzsignal, falls eine Inhibition von Sirtuin 5 vorliegt.

Dies ist in den Abbildungen 43 und 44 dargestellt. Für die HEK293T Zellen ist ein deutlicher Unterschied mit und ohne negKon zu erkennen. Wurden die Zellen nach MalAMyne mit negKon behandelt, so ist das Fluoreszenzsignal deutlich geringer. Offensichtlich findet eine Demalonylierung statt. Diese ist jedoch laut den Abbildungen nicht abhängig von der Behandlungszeit mit der Negativ-

kontrolle, da zwischen einer Behandlung von einer halben Stunde und vier Stunden kein großer Unterschied sichtbar ist. Bei den HeLa S3 Zellen dagegen ist das Signal nach zwei bis vier Stunden negKon-Behandlung sogar wieder etwas höher als ohne bzw. nach nur einer halben und einer Stunde. Zudem bleibt jedoch zu bedenken, dass keine Unterschiede sichtbar sind, egal ob eine Vorbehandlung mit Suramin stattgefunden hat oder nicht. Dies ist im Falle beider Zelllinien gleich. Die Antikörperfärbung zeigt zudem einen gleichen Malonylierungslevel für alle Proben. Das bedeutet, der Demalonylaseinhibitor zeigt keine Unterschiede für den Malonylierungslevel und beeinflusst auch nicht den Ein- bzw. Abbau von MalAMyne. Da Suramin nicht nur die Demalonylase inhibiert, sondern auch Auswirkungen auf weitere zelluläre Prozesse hat, ist es möglich, dass die Zellen durch die Zugabe in anderen Prozessen gehemmt sind und damit Veränderungen der Malonylierung hier nicht beobachtet werden können und auch durch dieses Experiment damit keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob MalAMyne ein Substrat von Sirtuin 5 ist.^[60]

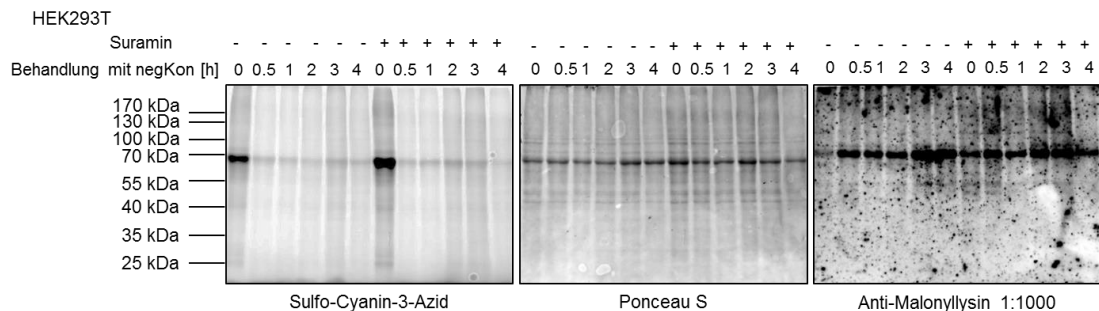


Abbildung 43: HEK293 Zellen wurden zunächst mit 500 μ M Suramin vorbehandelt und anschließend MalAMyne (500 μ M) hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Medium getauscht und für unterschiedliche Zeiten mit 500 μ M negKon behandelt. Es folgte die Lyse der Zellen, die Färbereaktion, die Fällung der Proteine und die Denaturierung bevor diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert wurden. Anti-Malonyllysine zeigt den natürlichen Level der Malonylierung an, die Färbung mit Ponceau S gibt Aufschluss über die Ladekontrolle.

Die Strategie zu Protein-spezifischen Untersuchungen zur Malonylierung unter Verwendung von GFP-markierten Proteinen und einem Akzeptor-Fluorophor mittels FRET ist unter 3.1 beschrieben.^[93] Die aufgereinigten Plasmide der GFP-markierten als malonyliert bekannten Proteine wurden zur Transfektion von HEK293T Zellen verwendet. Dies geschah wie bei der Überexpression von Sirtuin 5 nach der Calcium-Phosphat-Transfektion.^[96] Nach der Transfektion wurden die Zellen für vier Stunden mit 500 μ M MalAMyne behandelt. Es folgte die Lyse der Zellen und anschließend die Fällung der gewünschten Proteine. Dies geschah mittels GFP-Trap_A beads, die spezifisch an Proteine binden, die an ein GFP angeknüpft sind. Nach der Aufreinigung dieser erfolgte das Färben der Proteine mittels CuAAC und ebenfalls Sulfo-Cyanin-3-Azid. Nach der Denaturierung folgten die Gelelektrophorese und die Western Blot Analyse.

Untersuchungen zur Malonylierung von Proteinen

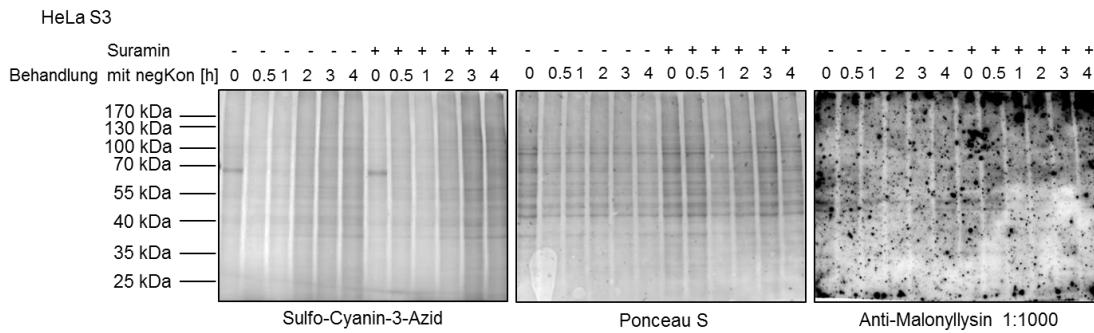


Abbildung 44: HeLa S3 Zellen wurden zunächst mit 500 μ M Suramin vorbehandelt und anschließend MalAMyne (500 μ M) hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Medium getauscht und für unterschiedliche Zeiten mit 500 μ M negKon behandelt. Es folgte die Lyse der Zellen, die Färbereaktion, die Fällung der Proteine und die Denaturierung bevor diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert wurden. Anti-Malonyllysine zeigt den natürlichen Level der Malonylierung an, die Färbung mit Ponceau S gibt Aufschluss über die Ladekontrolle.

Die Western Blots in Abbildung 45 zeigen die Immunopräzipitate nach der Transfektion von HEK293T Zellen mit den GFP-markierten Proteinen. Es stehen die mit demselben Protein transfizierten Zellen einmal mit und einmal ohne die Behandlung mit MalAMyne in direktem Vergleich nebeneinander. Klar zu erkennen ist bei den mit Malonylierungsreporter behandelten Proben das Fluoreszenzsignal von Sulfo-Cyanin-3-Azid. MalAMyne ist damit an alle behandelten Proteine kovalent angeknüpft. Mittels GFP-Antikörper kann im rechten Blot jeweils gezeigt werden, dass aus allen Proben ein GFP-markiertes Protein gefällt werden konnte. Die verwendeten Proteine sind dabei EGFP selbst, p53-EGFP, EGFP-GAPDH mit GFP am N-Terminus, welche in Abbildung 45 A gezeigt sind.

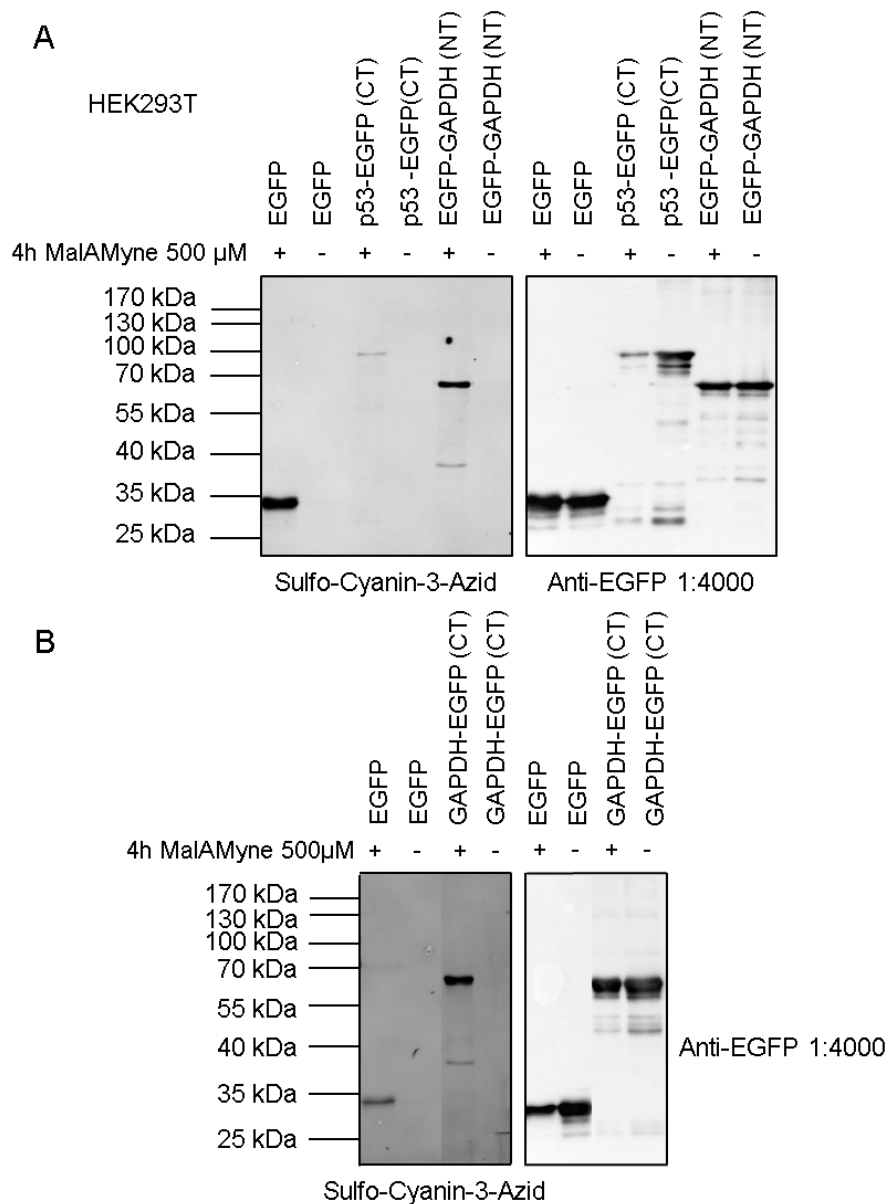


Abbildung 45: Dargestellt sind die Western Blots der Immunpräzipitate von GFP-Fusionsproteinen aus HEK293T Zellen. Nach der Transfektion der HEK293T Zellen mit den GFP-markierten Proteinen nach der Calcium-Phosphat-Transfektion wurden die Hälfte der Zellen für vier Stunden mit MalAMyne behandelt. Die andere Hälfte diente jeweils als Kontrolle und ist hier bei MalAMyne mit einem - gekennzeichnet. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen und die Fällung der GFP-Proteine mit GFP-Trap_A beads zur Isolierung dieser aus den Zellen. Nach der Färbung mit Sulfo-Cyanin-3-Azid und der Denaturierung der Proben konnten Gelelektrophorese und Western Blotting angewandt werden. Zur Detektion der Proteine wurden die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid und die Anfärbung durch einen GFP-Antikörper verwendet. A: Immunpräzipitate von HEK293T Zellen, die mit EGFP, p53-EGFP und EGFP-GAPDH transfiziert wurden. B: In einem weiteren Experiment wurde in Zellen zusätzlich noch GAPDH betrachtet, das das GFP am C-Terminus trägt.

Im Teil B wurde zusätzlich GAPDH mit EGFP am C-Terminus dargestellt. Sowohl in Teil A als auch in Teil B ist sichtbar, dass auch EGFP selbst ein Fluoreszenzsignal von Sulfo-Cyanin-3-Azid aufweist. Dies bedeutet, dass GFP selbst mit dem Malonylierungsreporter modifiziert ist. Somit werden alle mit GFP markierten Proteine am GFP selbst eine kovalente Anbindung von MalAMyne aufweisen. Um ein Artefakt auszuschließen, wurden Proteine mit GFP sowohl am N- als auch am C-Terminus getestet. Die Position von GFP macht, wie in Abbildung 45 zu erkennen ist, jedoch keinen Unterschied. Da sich damit GFP und der Malonylierungsreporter mit kovalent angebindenem Sulfo-Cyanin-3-Azid in räumlicher Nähe befinden, wird es in jedem Fall FRET zwischen dem fluoreszierenden Protein und dem Fluorophor geben. Damit ist keine proteinspezifische Aussage der Malonylierung mittels FRET möglich. Proteinspezifische Untersuchungen der Malonylierung mittels FRET mit dem FRET-Paar GFP-Sulfo-Cyanin-3-Azid und MalAMyne als Malonylierungsreporter sind damit nicht möglich.

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt, ist nicht klar, ob die Malonylierung Enzymkatalysiert abläuft oder nicht. An dieser Stelle soll nun untersucht werden, ob die Anknüpfung des Malonylrests, der durch MalAMyne der Zelle zur Verfügung gestellt wird, enzymatisch verläuft (Abbildung 46 und 47).

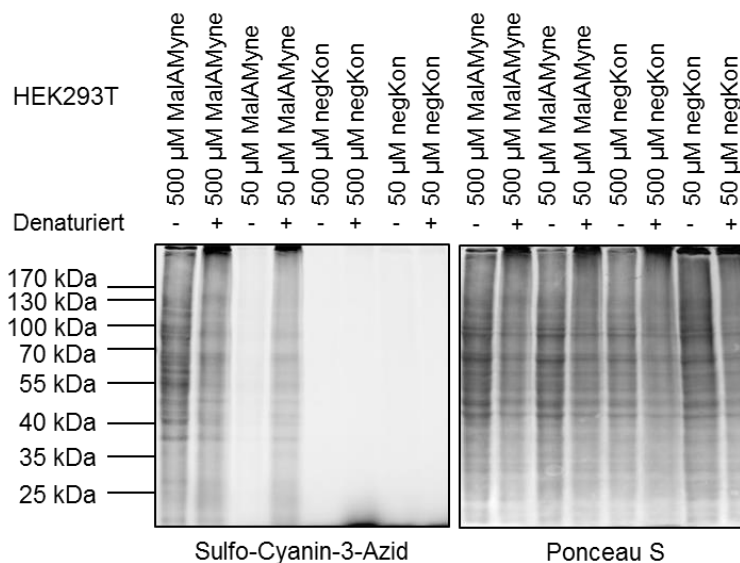


Abbildung 46: Als Test, ob die Malonylierung mit MalAMyne enzymatisch verläuft, wurden HEK293T Zellen zunächst lysiert und anschließend die Hälfte der Proben dreimal für zehn Minuten bei 98 °C denaturiert. Alle Proben wurden schließlich für eine Stunde mit MalAMyne oder negKon (50 μ M oder 500 μ M) behandelt und direkt mittels CuAAC gefärbt und die Proteine gefällt. Nach der Denaturierung mit SDS konnten diese durch Gelelektrophorese getrennt und mittels Western Blotting analysiert werden.

Hierfür wurden sowohl HEK293T als auch HeLa S3 Zellen lysiert und jeweils die Hälfte der Proben bereits an diesem Punkt durch dreimaliges Erhitzen auf 98 °C für zehn Minuten denaturiert. Es folgte die Behandlung der Lysate mit

MalAMyne und negKon in den Konzentrationen 50 μM und 500 μM für eine Stunde. Die Proben wurden im Anschluss mittels CuAAC und mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt und die Proteine gefällt. Nach der Denaturierung mit SDS wurden die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert.

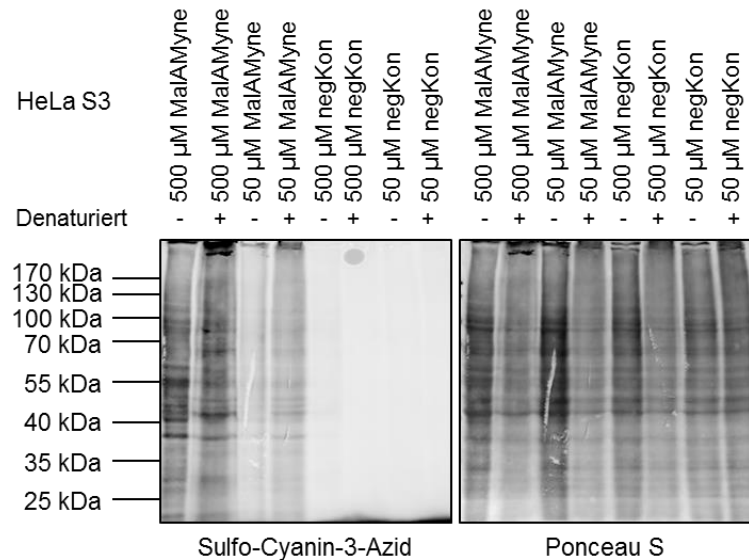


Abbildung 47: Als Test, ob die Malonylierung mit MalAMyne enzymatisch verläuft, wurden HeLa S3 Zellen zunächst lysiert und anschließend die Hälfte der Proben dreimal für zehn Minuten bei 98 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Alle Proben wurden schließlich für eine Stunde mit MalAMyne oder negKon (50 μM oder 500 μM) behandelt und direkt mittels CuAAC gefärbt und die Proteine gefällt. Nach der Denaturierung mit SDS konnten diese durch Gelelektrophorese getrennt und mittels Western Blotting analysiert werden.

Durch die Denaturierung eines Teiles der Proben, sollte beim enzymatischen Verlauf der Malonylierung kein Einbau von MalAMyne stattfinden, da durch das Erhitzen die Struktur und damit auch die Funktion des jeweiligen Enzyms zerstört werden.

Wie zu erwarten, ist für beide Zelllinien wieder kein Signal für die Negativkontrolle sichtbar, für die Proben, die mit MalAMyne behandelt wurden, jedoch durchaus. Dieses ist für 50 μM geringer als für 500 μM , aber trotzdem sehr deutlich. Für 500 μM MalAMyne ist für die denaturierte Probe als auch für die, die vor der Behandlung mit Malonylierungsreporter nicht erhitzt wurde, ein deutliches Fluoreszenzsignal sichtbar. Dies gilt sowohl für die HEK293T als auch die HeLa S3 Zellen. Bei der geringeren Konzentration wird dies noch deutlicher: Für die denaturierten Proben ist das Fluoreszenzsignal sogar noch intensiver als für die Proteine, die vor der Reporter-Behandlung nicht denaturiert wurden. Dies bedeutet, dass die Malonylierung, hier untersucht an dem Malonylierungsreporter MalAMyne, nicht enzymatisch verläuft und durch die Zerstörung der Struktur der Proteine sogar noch deutlich mehr Stellen im Protein malonyliert werden. Dies ist dadurch möglich, dass durch die Störung der Tertiärstruktur

der Proteine mehr Stellen im Protein zugänglich sind, an denen eine Reaktion mit einem Thioester möglich ist.

Kurzzusammenfassung:

Zur Untersuchung der Malonylierung von Proteinen wurden zunächst die Reportermoleküle MalAMyne, mMalAMyne und negKon synthetisiert. MalAMyne und mMalAMyne sollten dabei auf ihre Reporterfunktion getestet werden. Da es sich bei allen Molekülen um Fremdstoffe in der Zelle handelt, war es notwendig, zunächst die Viabilität der Zellen nach der Reporterbehandlung zu untersuchen. Hierfür wurden diese auf HEK293T und HeLa S3 Zellen angewandt. Zusätzlich wurden die Auswirkungen von dmMalyne auf die Viabilität der Zellen getestet, was als Vergleich zu den anderen Reportern an Säugerzellen untersucht werden sollte. Dies geschah mit Hilfe eines Alamar Blue Assays. Zusammenfassend lässt sich dazu sagen, dass die Viabilität beider Zelllinien nur in einzelnen Fällen überhaupt unter 60% fällt. Der kovalente Einbau der Reportermoleküle in den beiden oben genannten Zelllinien konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Der Einbau erfolgt dabei bei MalAMyne und mMalAMyne zeit- und konzentrationsabhängig. Ebenso erfolgt dieser umso effizienter je mehr Acetoxymethylgruppen die Reporter tragen. Es ist anzunehmen, dass die Reporter dadurch besser bzw. schneller von den Zellen aufgenommen werden können. dmMalyne zeigte damit kaum ein Fluoreszenzsignal und wurde im Folgenden nicht weiter verwendet. Vergleichsproben mit der Negativkontrolle negKon zeigten, dass die Färbung nicht unspezifisch erfolgt.

Mittels Gelelektrophorese und Western Blotting konnten die beiden Reporter MalAMyne und mMalAMyne direkt miteinander verglichen werden. MalAMyne war dabei, wie sich bereits in der Fluoreszenzmikroskopie angedeutet hatte, deutlich effizienter. Ebenso konnte die kovalente Anbindung der Reporter an Proteine nachgewiesen werden. Diese erfolgt zeit- und konzentrationsabhängig, was sich mit den Fluoreszenzexperimenten deckte. Experimente darüber, ob die Demalonylase Sirtuin 5 MalAMyne als Substrat verwendet, zeigten mit dem Sirtuin 5-Inhibitor Suramin kein eindeutiges Ergebnis. Die Überexpression von Sirtuin 5 in HEK293T Zellen jedoch, zeigte dass dies nicht der Fall ist. Die am Anfang des Kapitels angekündigten Protein-spezifischen Untersuchungen der Malonylierung mittels FRET-Experimenten konnten nicht erfolgen. Das hier verwendete FRET-Paar GFP-Sulfo-Cyanin-3-Azid ist mit MalAMyne nicht zu gebrauchen. MalAMyne modifiziert GFP selbst, wodurch der Reporter und das fluoreszierende Protein sich immer in räumlicher Nähe befinden werden und damit das FRET-Signal, unabhängig vom Protein, immer positiv sein wird.

Ein abschließender Test zeigte, dass die Malonylierung, hier untersucht mit Hilfe von MalAMyne, zudem nicht-enzymatisch verläuft. Die starke Bande in den Blots der Untersuchungen von MalAMyne an HEK293T Zellen rührt vermutlich daher von einem Protein her, das in dieser Zelllinie besonders viele für MalAMyne zugängliche Stellen zu freien Thioestern besitzt. MalAMyne bringt damit

nicht ausreichend positive Eigenschaften und damit Möglichkeiten mit, die Malonylierung weiter zu untersuchen.

4. Fluoreszenz- und Ramanmikroskopie an Alkinverbindungen

4.1 Strategie und Herangehensweise

In Kapitel 3 wurde die Untersuchung der Malonylierung von Proteinen nach einer Reporterstrategie vorgestellt. Dies geschah mittels CuAAC und dem Fluoreszenzfarbstoff Sulfo-Cyanin-3-Azid. Dabei konnte erfolgreich der kovalente Einbau der Malonylierungsreporter in Proteine mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. In diesem vierten Kapitel soll der Schritt in Richtung Visualisierung von Biomolekülen mittels Ramanmikroskopie getan werden. Diese ist im Gegensatz zur Fluoreszenzmikroskopie deutlich weniger invasiv. Zur Markierung kleiner Biomoleküle müssen keine sperrigen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, die die Struktur und die Funktion der Moleküle beeinflussen können. Zudem ist die Anwendung der CuAAC überflüssig und damit auch die Verwendung von für Zellen toxisches Kupfer, was die Anwendung von Ramanmikroskopie an lebenden Zellen ermöglicht. Weitere Vorteile der Ramanmikroskopie sind in Kapitel 2.3 genauer erläutert.

Zur Visualisierung werden hier kleine Label verwendet, die aufgrund ihrer Größe die Struktur kleiner Moleküle nicht stark verändern. In dieser Arbeit soll dabei, wie auch zur Untersuchung der Malonylierung mittels Fluoreszenzmikroskopie, der Schwerpunkt auf Alkin-modifizierte Verbindungen gelegt werden. Hierfür wurden zunächst mehrere Alkin-funktionalisierte Nukleoside auf ihre Toxizität und schließlich über Fluoreszenzmikroskopie auf ihren Einbau in Säugerzellen getestet. Aufgrund der Insensitivität der Ramanmikroskopie ist es notwendig, sicherzustellen, dass die Nukleosidreporter effizient in die DNA bzw. RNA eingebaut werden. Hierfür bedarf es Nukleoside, die von den Zellen aufgenommen werden als auch keine hohe Toxizität zeigen. Zudem ist es von großem Vorteil, die alkinierten Moleküle in kleinen Bereichen konzentriert in der Zelle vorzufinden.

Die nicht-linearen Raman-Techniken CARS und SRS zeichnen sich im Gegensatz zur spontanen Ramanmikroskopie durch eine deutlich erhöhte Sensitivität und höhere Messgeschwindigkeit aus. Das Ziel ist es, kleine Biomoleküle wie etwa die hier verwendeten Nukleoside, und zelluläre Prozesse mit Hilfe dieser Techniken zu untersuchen.

4.2 Verwendete Nucleoside und Toxizitätstests

Eingehendst untersucht wurden die modifizierten Nucleoside 5-Ethynyluridin (EU), 7-Ethynyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin (EDDA) und (2'*S*)-2'-desoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridin (*F-ara*-EdU). *N*⁶-Propargyladenosin, 2-Ethynyladenosin, O3'-Propargyladenosin und O2'-Propargyladenosin wurden ebenfalls getestet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde dabei der Einbau der alkinisierten Nucleoside untersucht, um die besten Voraussetzungen für einen möglichst effektiven Einbau in Säugerzellen auszumachen. Wie in Kapitel 2.4 beschrieben wurde EU von Jao und Kollegen bereits zur Visualisierung von RNA verwendet und galt damit als vielversprechend.^[29] Die Synthese des Desoxynucleosids EDDA wurde von Jana Balintová in der AG Marx der Universität Konstanz vorgenommen, ebenso die von *F-ara*-EdU. Letzteres zeigte bei Studien von Neef und Kollegen eine geringe Toxizität und sollte damit auch für längere Behandlungszeiten auf Zellen einsetzbar sein und damit möglicherweise in größerem Maße eingebaut werden können.^[91] Die RNA-Nucleoside *N*⁶-Propargyladenosin (*N*6-PA), 2-Ethynyladenosin (2-EA), O3'-Propargyladenosin (O3-EA) und O2'-Propargyladenosin (O2-EA) wurden von Yizhi Yuan (AG Marx, Universität Konstanz) synthetisiert und ebenfalls mit Fluoreszenzmikroskopie auf ihren Einbau in Säugerzellen getestet. Über die Verwendung von *N*6-PA und 2-EA wurde ebenfalls in Kapitel 2.4 bereits berichtet. Die verwendeten Nucleoside sind in Abbildung 48 dargestellt.

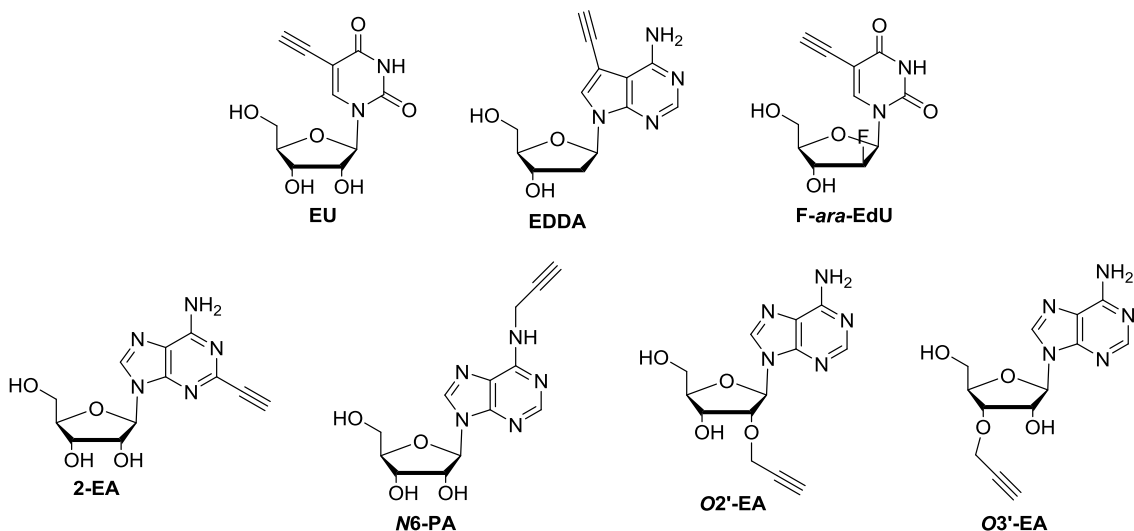


Abbildung 48: Strukturen der in dieser Arbeit untersuchten Alkin-funktionalisierten Nucleoside 5-Ethynyluridin (EU), 7-Ethynyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin (EDDA), (2'*S*)-2'-desoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridin (*F-ara*-EdU), *N*⁶-Propargyladenosin (*N*6-PA), 2-Ethynyladenosin (2-EA), O3'-Propargyladenosin (O3-EA) und O2'-Propargyladenosin (O2-EA).

Vorangestellt an die Untersuchungen der Nucleoside mittels Fluoreszenzmikroskopie seien die Untersuchungen auf toxische Auswirkungen dieser auf Säugerzellen. Die Nucleoside EU, EDDA und F-*ara*-EdU wurden in HEK293T und HeLa Zellen getestet, EU zusätzlich in MCF-7 Zellen. Die Behandlungszeiten betragen dabei jeweils sechs bzw. 24 Stunden, für F-*ara*-EdU ebenso 72 Stunden. Wie für die Malonylierungsreporter wurde auch hier ein sog. Alamar Blue Assay verwendet, dessen zu Grunde liegende chemische Reaktion in Kapitel 3.2 ausführlich beschrieben ist.

Dabei wurden die Zellen mit dem jeweiligen Alkin-funktionalisierten Nucleosid für sechs, 24 bzw. 72 Stunden in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Da alle Reporter in DMSO gelöst vorlagen, wurden die Zellen zur Kontrolle ebenfalls nur in den jeweiligen DMSO-Anteilen behandelt. Nach der Behandlung erfolgte die Zugabe der Alamar Blue Lösung. Um eine Aussage über die Viabilität der Zellen machen zu können, wurde nach dieser Behandlung die Fluoreszenz am Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader ausgelesen. Die Anregung erfolgte dabei bei 530 nm, die Detektion der Emission bei 590 nm. Da nur in metabolisch aktiven Zellen die Reduktion des in der Alamar Blue Lösung vorhandenen Resazurins zum Fluoreszenzfarbstoff Resorufin stattfindet, ist die Fluoreszenz ein Maß für die Viabilität.

Nachfolgend sind zunächst die Viabilitätstests für EU an HEK293T, HeLa und MCF-7 Zellen gezeigt.

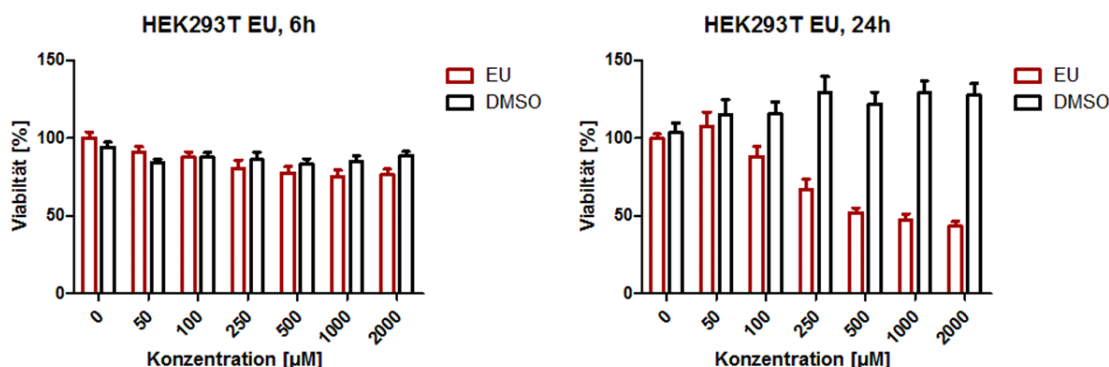


Abbildung 49: Untersuchung der Toxizität von EU an HEK293T Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. HEK293T Zellen wurden dabei für sechs bzw. 24 Stunden mit EU und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die EU-Konzentration in µM, bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

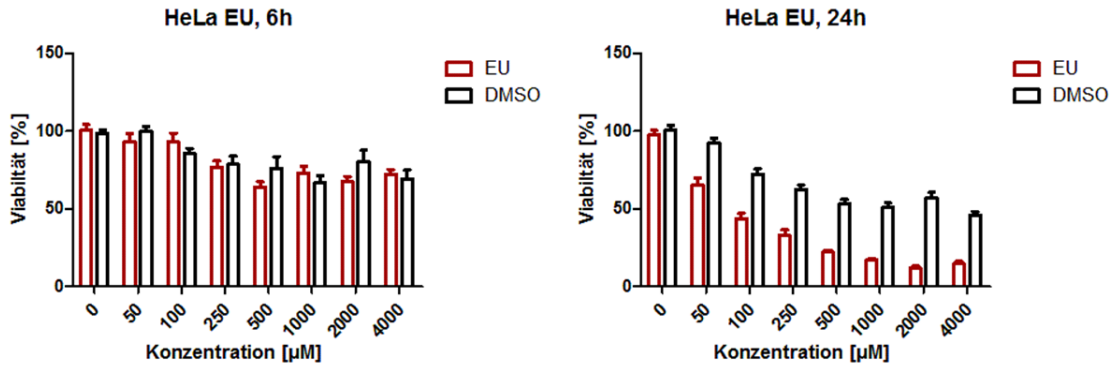


Abbildung 50: Untersuchung der Toxizität von EU an HeLa Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. HeLa Zellen wurden dabei für sechs bzw. 24 Stunden mit EU und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die EU-Konzentration in µM, bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

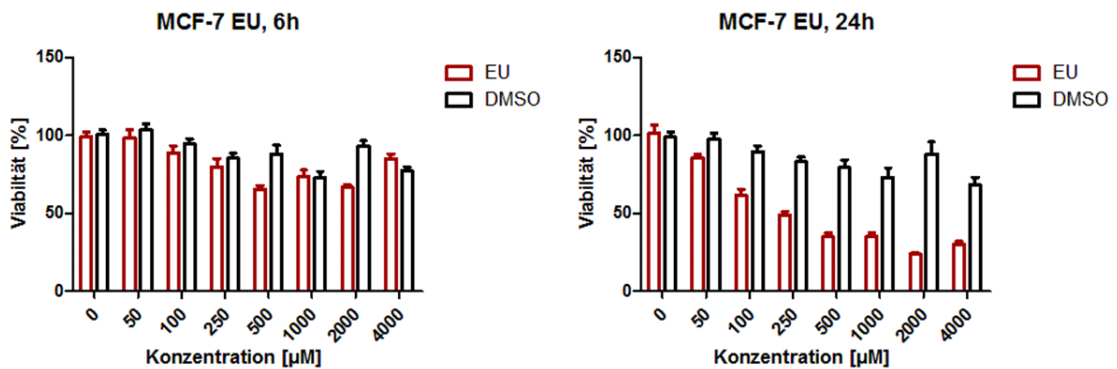


Abbildung 51: Untersuchung der Toxizität von EU an MCF-7 Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. MCF-7 Zellen wurden dabei für sechs bzw. 24 Stunden mit EU und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die EU-Konzentration in µM, bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

Die HEK293T Zellen wurden dabei für 6 bzw. 24 Stunden mit den Konzentrationen 50, 100, 250 und 500 µM und 1 und 2 mM behandelt. In allen Abbildungen ist dabei der Balken für die Reporter in rot, der für die DMSO-Behandlung in schwarz dargestellt. Bei der sechsstündigen Behandlung fällt die Viabilität für die hohen Konzentrationen dabei knapp unter die 80 %, für die Behandlung von 24 Stunden dafür jedoch unter 50 %. Aus diesem Grunde wurde bei den HEK293T Zellen auch nicht zu höheren EU-Konzentrationen gegriffen. Da die Krebszelllinien HeLa und MCF-7 als deutlich robuster gelten, wurde hier auch

die Konzentration von 4 mM verwendet. Für eine Behandlung der HeLa Zellen von sechs Stunden ist der Rückgang der Viabilität mit 4 mM EU etwa auf 80 % zu beobachten. Allgemein fällt diese jedoch nicht viel darunter. Anders bei 24 Stunden: Hier liegt sie nur noch bei etwa 20 %. Ähnliches gilt für die MCF-7 Zellen: Über eine Behandlungszeit von sechs Stunden zeigt sich EU hier bei weitem nicht so toxisch. Anders ist dies bei der Exposition des Nukleosids von 24 Stunden. Für alle Zelllinien gilt dabei, dass EU über sechs Stunden auf die hier getesteten Säugerzellen in Konzentrationen zwischen 50 μ M und 2 bzw. 4 mM angewandt werden kann, ohne dass die Zellviabilität auf unter 64 % sinkt, wie dies bei den HeLa Zellen für 500 μ M der Fall ist.

Die Toxizität von EDDA wurde an HEK293T und HeLa Zellen getestet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 52 und 53 dargestellt.

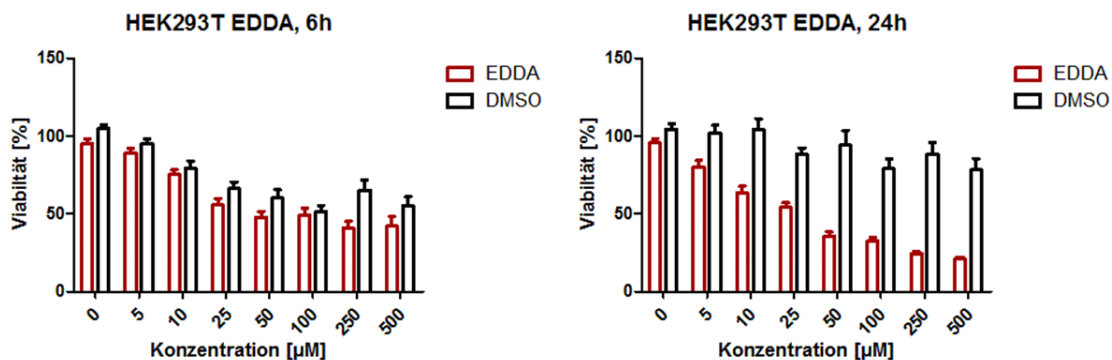


Abbildung 52: Untersuchung der Toxizität von EDDA an HEK Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. HEK Zellen wurden dabei für sechs bzw. 24 Stunden mit EDDA und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die EDDA-Konzentration in μ M, bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

Für dieses Alkin-funktionalisierte DNA-Nukleosid ist auffällig, dass in beiden Zelllinien bereits bei einer Behandlungszeit von nur sechs Stunden die Viabilität auf unter 50 % absinkt. Dabei sind Experimente nur mit 500 μ M EDDA dargestellt. Für eine lange Behandlung von 24 Stunden sinkt die Viabilität der HeLa Zellen sogar auf 8 % ab. Aber auch in den HEK293T Zellen zeigt sich die Toxizität des Reporters. Auch hier sinkt die Viabilität auf etwas unter 21 % nach einem Tag Behandlungszeit. EDDA ist damit deutlich toxischer als EU und im Umgang mit der Behandlung von Zellen sollten Expositionszeiten von viel mehr als sechs Stunden vermieden werden, da damit aufgrund der Toxizität keine verlässlichen Aussagen über den Einbau mehr gemacht werden können.

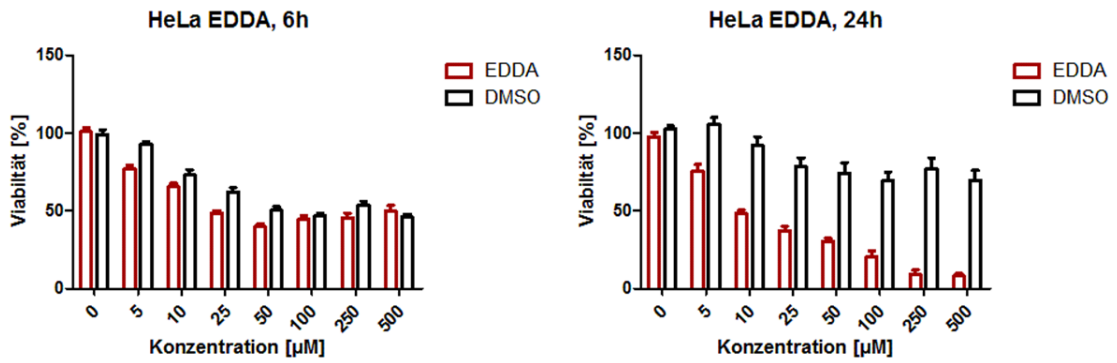


Abbildung 53: Untersuchung der Toxizität von EDDA an HeLa Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. HeLa Zellen wurden dabei für sechs bzw. 24 Stunden mit EDDA und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die EDDA-Konzentration in μM , bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

Da *F-ara-EdU* bei Studien von Neef und Kollegen eine geringe Toxizität zeigte, wurden Viabilitätstests auch für dieses Nukleosid in HEK293T und HeLa Zellen durchgeführt.^[91] Ist ein Reporter weniger toxisch, sind möglicherweise längere Behandlungszeiten und damit ein effizienterer Einbau in den Zellen möglich. Dies wiederum kommt der Ramanmikroskopie aufgrund ihrer Insensivität zu Gute.

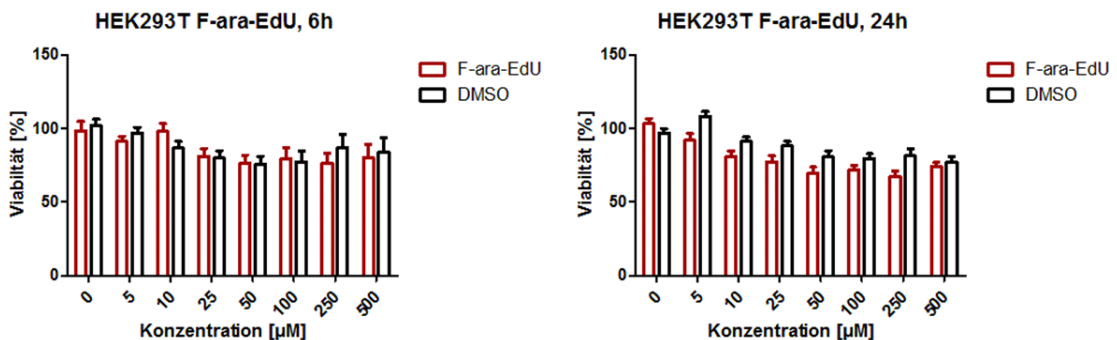


Abbildung 54: Untersuchung der Toxizität von *F-ara-EdU* an HEK Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. HEK293T Zellen wurden dabei für sechs bzw. 24 Stunden mit *F-ara-EdU* und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die *F-ara-EdU*-Konzentration in μM , bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

Die Abbildungen 54 und 55 zeigen die Ergebnisse des Alamar Blue Assays zur Viabilität von HEK293T und HeLa Zellen nach der Behandlung mit *F-ara-EdU*. Verwendet wurden dabei, in Anlehnung an die Ergebnisse mit EDDA, zunächst

Konzentrationen bis 500 μM . Zu erkennen ist in jedem Falle, dass die Viabilität sowohl für die HEK293T als auch die HeLa Zellen für die Behandlungszeiten von sechs und 24 Stunden nicht unter die 50 % abfällt. Die HeLa Zellen wurden deswegen zudem für 72 Stunden mit dem möglichen Reporter behandelt. Über diesen Zeitraum ist eine deutliche Toxizität von F-*ara*-EdU erkennbar. Die Viabilität sinkt auf knapp unter 15 % für eine Konzentration von 500 μM . Dies verspricht jedoch trotzdem die Möglichkeit auf lange Inkubationszeiten von F-*ara*-EdU. Alle drei Alkin-funktionalisierten Nukleoside wurden nun auf Säugerzellen angewandt und deren Einbau mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

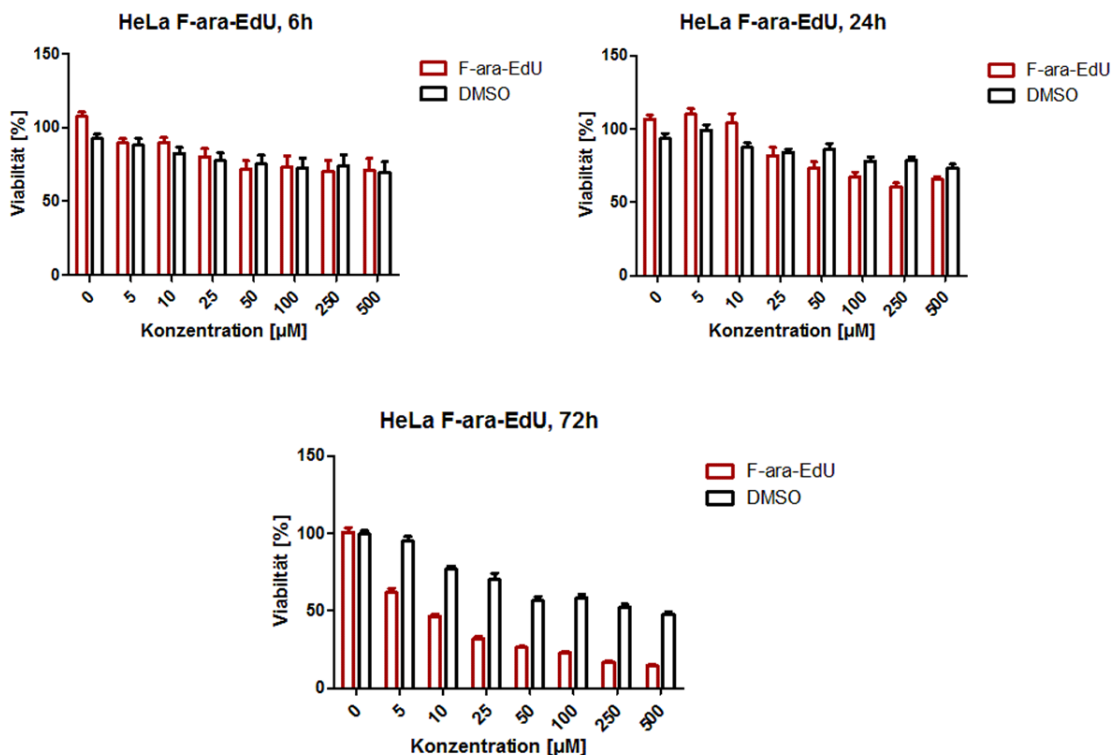


Abbildung 55: Untersuchung der Toxizität von F-*ara*-EdU an HeLa Zellen: Dargestellt ist die Viabilität der Zellen, die mittels eines Alamar Blue Assays bestimmt wurde. HeLa Zellen wurden dabei für sechs, 24 bzw. 72 Stunden mit F-*ara*-EdU und im Anschluss mit Alamar Blue Lösung behandelt. Auf der x-Achse ist dabei jeweils die F-*ara*-EdU-Konzentration in μM , bzw. der jeweilige DMSO-Anteil angegeben, auf der y-Achse die Viabilität der Zellen in %. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Mittelwert als Balkendiagramm mit Standardabweichung.

4.3 Einbau der Nukleosid-Reporter und Fluoreszenzmikroskopie

Der Einbau der Nukleoside wurde anhand von Fluoreszenzmikroskopie evaluiert. Hierzu wurden zunächst die drei Alkin-funktionalisierten Nukleoside EU, EDDA, und F-*ara*-EdU an Säugerzellen getestet. Alle drei wurden auf HEK293T und HeLa Zellen angewandt, EU ebenso auf MCF-7 Zellen. Aufgrund der Hydroxygruppe an der 2'-Position von EU und der Ergebnisse von Jao und Kollegen sollte EU in die RNA eingebaut werden.^[29] EDDA und F-*ara*-EdU fehlt die Hydroxygruppe an der 2'-Position des Nukleosids, womit der Einbau in die DNA erfolgen sollte. Zunächst wurden in den Experimenten verschiedene Konzentrationen der Nukleoside verwendet, genauso wie unterschiedliche Inkubationszeiten. Ebenso wurde getestet, ob diese tatsächlich in die RNA bzw. DNA eingebaut werden. Für alle Experimente wurde die jeweilige Zelllinie mit Nukleosid behandelt, das in unterschiedlichen Konzentrationen, gelöst in DMSO und schließlich verdünnt in Medium, auf die Zellen gegeben wurde. Nach einer bestimmten Inkubationszeit erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS, das Quenchen der PFA-Lösung mit Ammoniumchlorid und das anschließende Permeabilisieren mittels Triton X-100. Zur Visualisierung war es notwendig, mittels CuAAC einen Fluoreszenzfarbstoff an den Reporter kovalent anzuknüpfen. Wie auch schon für die Malonylierungsexperimente wurde hier ebenfalls Sulfo-Cyanin-3-Azid verwendet.

Zunächst sollen die Ergebnisse der Behandlung von HEK293T Zellen mit EU diskutiert werden.

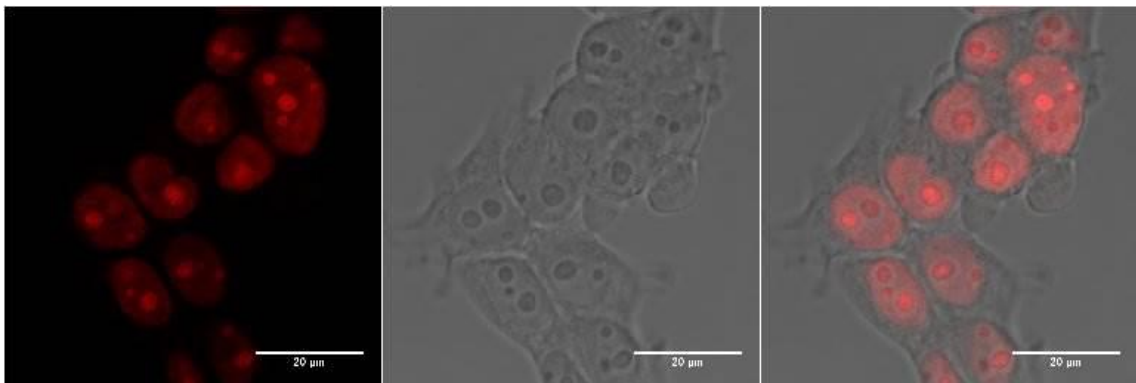


Abbildung 56: Bilder von HEK293T Zellen, die mit 500 µM EU für sechs Stunden behandelt wurden. Nach dieser Zeit erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und die Färbung der Zellen mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid. Dargestellt sind die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid, ein Durchlichtbild und die Überlagerung der beiden ersten Bilder. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte, wie auch bei der Malonylierung und in allen folgenden Experimenten bei 561 nm. Scale Bar: 20 µm

Abbildung 56 zeigt deutlich den Einbau von EU in HEK293T Zellen. Exemplarisch wurde hier die Konzentration 500 µM verwendet. Der Einbau des Nukleosids erfolgt sowohl in den Zellkernen als auch in den Nukleoli. Das linke Bild stellt dabei die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid dar, das mittlere ein Durchlichtbild und das rechte die Überlagerung der beiden. Die kovalente An-

bindung von EU ist damit erklärt, dass aufgrund der Permeabilisierung der Zellen nicht-kovalent angebundener Farbstoff wieder aus den Zellen ausgewaschen worden wäre. Somit ist Sulfo-Cyanin-3-Azid kovalent an EU und dieses wiederum kovalent an Kompartimente in der Zelle gebunden.

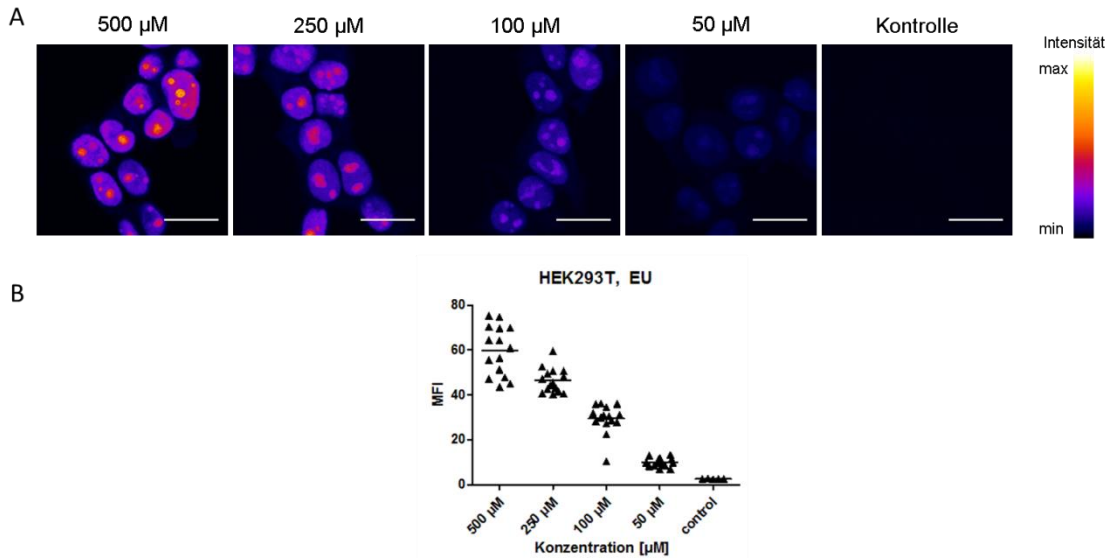


Abbildung 57: A: Fluoreszenzbilder eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops von HEK293T Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von EU für sechs Stunden behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden diese fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC und Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Dargestellt ist die Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid. B: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in den Bildern von A. Ausgemessen wurde die Intensität in den Kernen und Nukleoli der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je fünf Zellen in drei Bildern verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die jeweilige Konzentration in μM dargestellt. Scale Bar: 20 μm

Die Behandlung von HEK293T Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an EU ist in Abbildung 57 gezeigt. Verwendet wurden die Konzentrationen 500, 250, 100 und 50 μM und für sechs Stunden auf den Zellen belassen. Eine Kontrolle zeigt, dass ohne eine Behandlung von EU auch keine Fluoreszenz detektiert werden kann. Sowohl in den Bildern im Teil A als auch im Teil B im Diagramm ist deutlich ein konzentrationsabhängiger Einbau sichtbar. Zudem ist ein deutlich stärkerer Einbau von EU in den Nukleoli zu beobachten. Dies deutet bereits hier auf den Einbau des Nukleosids in die RNA hin. Im weiteren Verlauf soll dies jedoch noch genauer untersucht werden. Im Hinblick auf die Ramanmikroskopie wäre dies bereits vielversprechend, da die Akkumulationen hoher Konzentrationen in der Zelle die Signaldetektion begünstigen würde. Im Folgenden werden nun weitere Einbautests von EU an HEK293T Zellen vorgestellt.

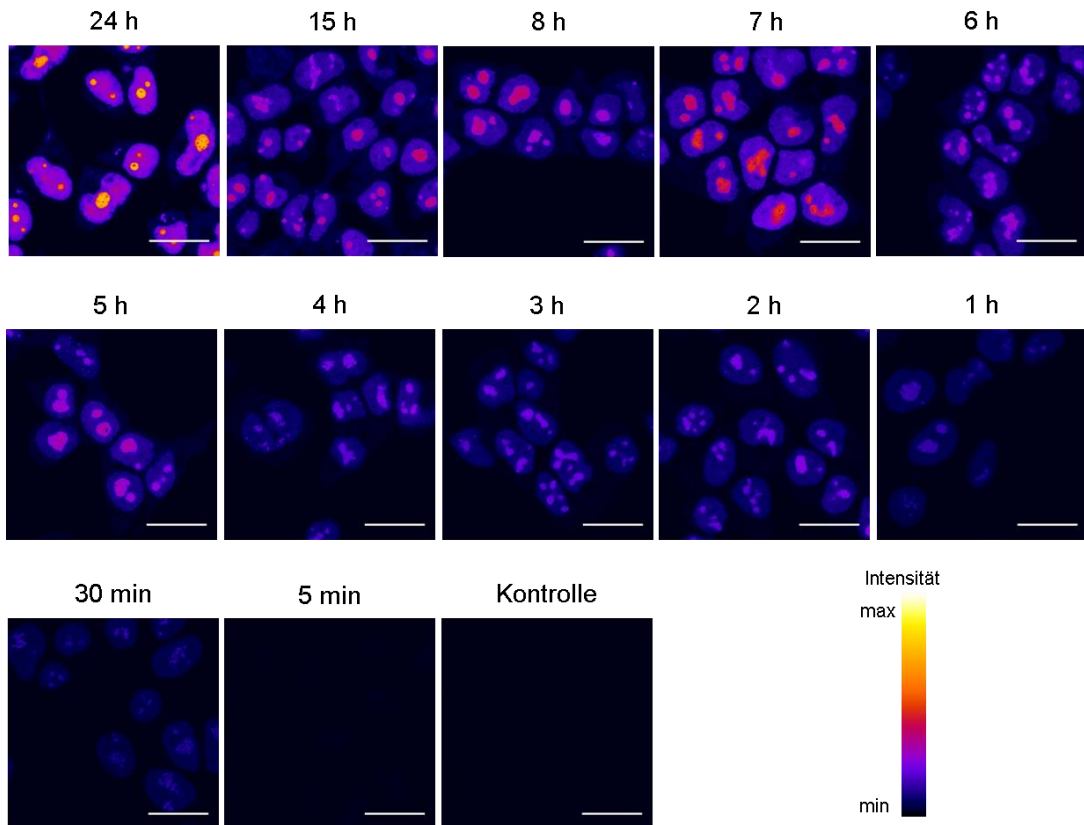


Abbildung 58: Fluoreszenzbilder nach der Behandlung von HEK293T Zellen mit 250 μM EU für unterschiedliche Inkubationszeiten zwischen 24 Stunden und fünf Minuten. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels der CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 20 μm

Der Einbau von EU in HEK293T Zellen erfolgt, wie in Abbildung 58 gezeigt, nicht nur konzentrations- sondern auch zeitabhängig. Nach Abbildung 49 fällt die Viabilität von behandelten HEK293T Zellen nach einer solchen Behandlung mit EU auf etwa 50 % ab. Trotzdem ist ein deutlicher Einbau in Kern und Nukleoli der Zellen zu erkennen und auch deutlich das Intaktsein dieser.

Der zeitabhängige Einbau ist in Abbildung 59 verdeutlicht. Besonders stark eingebaut wird EU nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Zwischen den Zeiten 15 und drei Stunden unterscheidet sich die Fluoreszenzintensität nicht sehr stark.

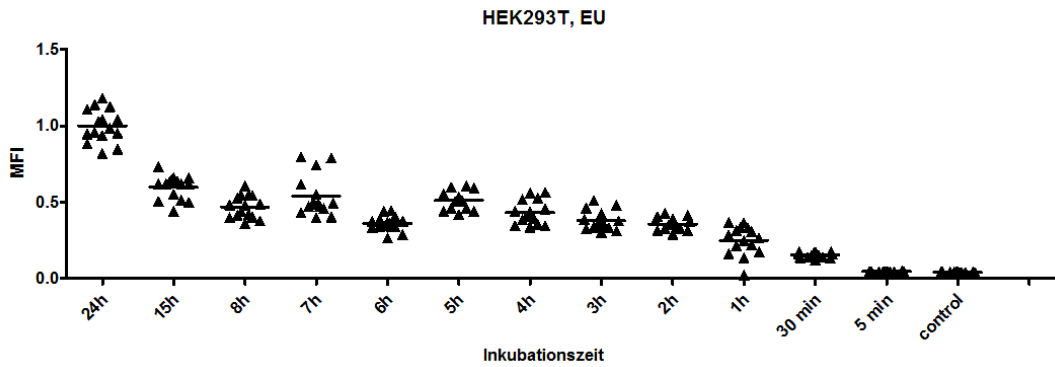


Abbildung 59: Darstellung der mittleren Fluoreszenz in Kernen und Nukleoli der HEK293T Zellen, die für unterschiedliche Zeiten mit 250 μM EU behandelt wurden. Ausgemessen wurde die Intensität in den Kernen und Nukleoli der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je fünf Zellen in drei Bildern verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die jeweilige Konzentration in μM dargestellt.

Von Interesse war nun ebenso, wie HEK293T Zellen auf die EU-Behandlung und dessen Einbau reagieren, wenn nicht sofort die Fixierung der Zellen erfolgt. Deswegen wurden HEK293T Zellen für fünf Stunden mit 250 μM EU behandelt. Anschließend wurden die Zellen nicht fixiert, sondern für eine bis 24 Stunden in Medium ohne EU-Zugabe belassen. Der Vergleich mit einer Kontrolle von unbehandelten Zellen und HEK293T Zellen, die lediglich mit 250 μM EU behandelt und direkt fixiert wurden, zeigt, dass EU mit der Zeit wieder abgebaut wird (Abbildung 60). Bereits nach einer Stunde ist das Fluoreszenzsignal im Vergleich zur direkt fixierten Probe deutlich verringert. Nach fünf Stunden ist kaum noch ein Fluoreszenzsignal sichtbar und nach 19 Stunden ist keine Fluoreszenz mehr zu erkennen. Abbildung 60 A verdeutlicht dies in Bildern und B im Diagramm.

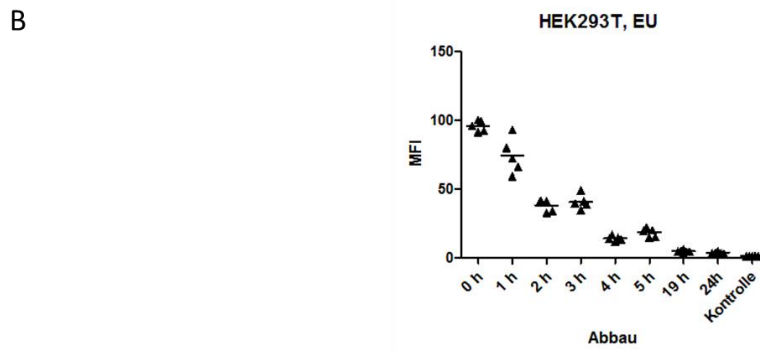
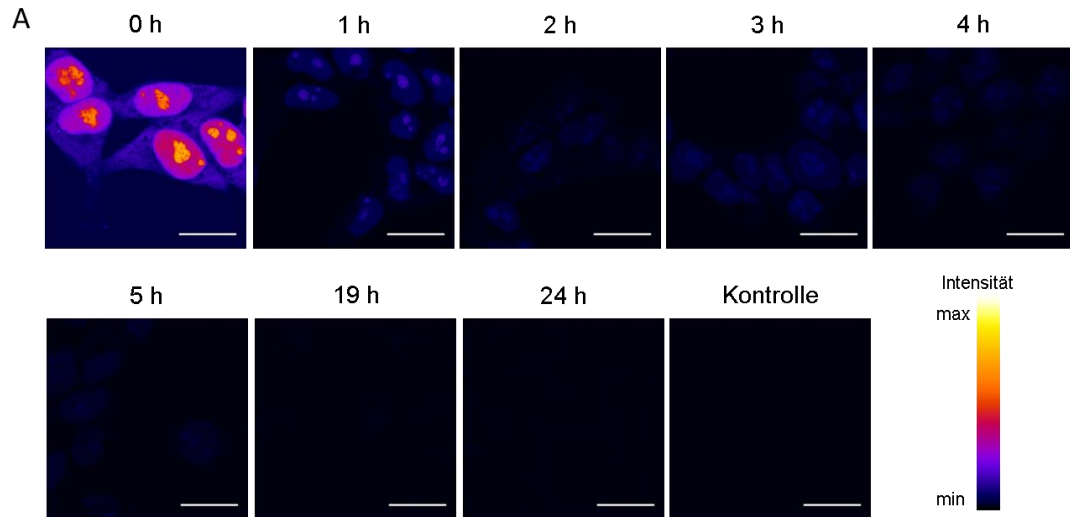


Abbildung 60: In A sind die konfokalen Fluoreszenzbilder von HEK293T Zellen dargestellt, die für fünf Stunden mit 250 μM EU behandelt wurden. Die Zeiten über den Bildern geben an, wie lange die Zellen nach der Behandlung nicht fixiert, sondern in Medium ohne EU-Zusatz belassen wurden. Eine Kontrolle zeigt das Bild von komplett unbehandelten Zellen. B: Darstellung der mittleren Fluoreszenz: Ausgemessen wurde diese in den Kernen und Nukleoli der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je fünf Zellen verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die jeweilige Konzentration in μM dargestellt. Scale Bar: 20 μm

Harnstoff (HU) inhibiert die Ribonukleotidreduktase, ein Enzym, das die Dehydroxylierung von Ribonukleotiddiphosphaten zu Desoxyribonukleotiddiphosphaten katalysiert. Ist EU ein Substrat dieses Enzyms, so kann es auch in die DNA eingebaut werden und damit als Reporter dafür verwendet werden bzw. ist kein spezifischer Reporter für die RNA. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293T Zellen mit EU und gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen von HU behandelt (Abbildung 61).

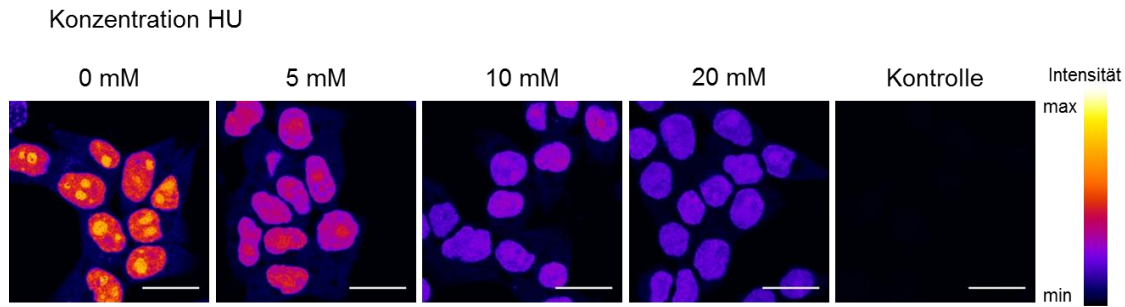


Abbildung 61: Zusätzlich zu einer Behandlung mit 250 μM EU wurden HEK293T Zellen für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an HU behandelt. Die jeweilige HU-Konzentration ist über den Bildern angegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und in einer CuAAC Sulfo-Cyanin-3-Azid kovalent an EU angeknüpft. Die „Kontrolle“ zeigt ein Fluoreszenzbild von komplett unbehandelten Zellen. Scale Bar: 20 μm

Die Fluoreszenzbilder zum Test mit HU zeigen unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten. Ohne eine HU-Behandlung ist wie in den vorherigen Experimenten ein deutliches Signal in den Zellkernen und in den Nukleoli sichtbar. Mit steigender HU-Konzentration nimmt die Signalstärke ab. Zu erwarten wäre für ein reines RNA-Nukleosid, dass die HU-Behandlung keine Auswirkungen auf die Stärke des Fluoreszenzsignals mit sich bringt. Da hier ein Unterschied zu erkennen ist, lässt das Experiment vermuten, dass EU auch zum Teil in die DNA eingebaut wird. Damit sollte zwischen den Fluoreszenzbildern von HEK293T Zellen, die mit HU behandelt wurden, im Vergleich zum Bild ganz links in Abbildung 61 kein Unterschied sichtbar sein. Dies jedoch ist der Fall. Da HU auch toxisch auf Zellen wirkt, ist es möglich, dass weitere zelluläre Prozesse durch die Behandlung eingeschränkt sind und damit der generelle EU-Einbau zurückdrängt wird und ein schwächeres Signal zu Stande kommt. EU wird damit, wie aus diesem Experiment hervorgeht, vermutlich nur in geringem Maße ebenso in die DNA eingebaut. Klarheit soll die Behandlung mit Actinomycin D bringen.

Um zu zeigen, dass EU definitiv in die RNA eingebaut wird, wurde zur Behandlung mit EU Actinomycin D (Act D) zum Zellmedium hinzugegeben. Act D ist ein Antibiotikum, das die RNA-Polymerasen inhibiert. Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, erfolgt die Inhibition der RNA-Polymerase I bereits mit 100 nM Act D. Mit höheren Konzentrationen im einstelligen mikromolaren Bereich wird auch die Funktion der RNA-Polymerase II ausgeschaltet.^[29] Dass EU definitiv in die RNA eingebaut wird, zeigen die Fluoreszenzbilder in Abbildung 62. Ohne eine Act D-Behandlung ist deutlich der Einbau von EU in die Zellkerne und Nukleoli sichtbar. Bereits 50 nM Act D lassen das Signal in den Nukleoli komplett verschwinden. Die RNA-Polymerase I wird damit bereits inhibiert. Höhere Konzentrationen schwächen auch das Fluoreszenzsignal und damit den EU-Einbau in den Zellkernen ab. Für mikromolare Konzentrationen unterscheiden sich die Bilder kaum von denen unbehandelter Zellen. EU ist damit definitiv ein RNA- und kein DNA-Nukleosid und kann dafür als Reporter verwendet werden. Der

akkumulierte Einbau in den Nukleoli verspricht dort hohe Konzentrationen und damit ein hohes Signal, was der Ramanmikroskopie zu Gute kommt.

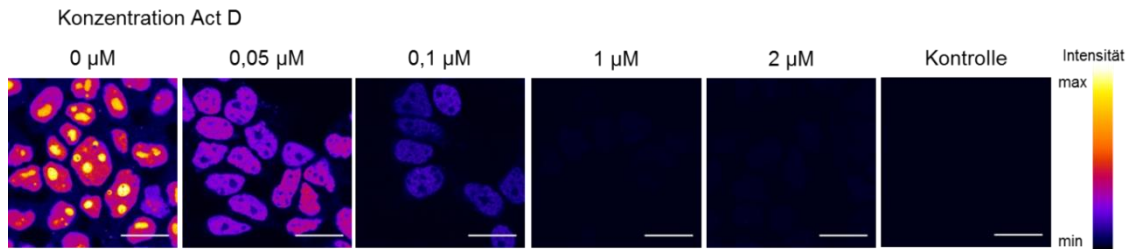


Abbildung 62: Konfokale Fluoreszenzbilder von HEK293T Zellen, die mit EU (250 µM) für sechs Stunden behandelt wurden. Analog zum HU-Experiment wurden die Zellen gleichzeitig mit unterschiedlichen Act D-Konzentrationen behandelt. Die jeweilige Konzentration von Act D ist über den jeweiligen Bildern angegeben. Nach der Behandlung folgte das Fixieren, Permeabilisieren und Färben der Zellen. Scale Bar: 20 µm

Im Folgenden sind ebenso Experimente dargestellt, wobei der EU-Einbau in HeLa und MCF-7 Zellen untersucht wurde, um auch hier optimale Bedingungen für die Ramanmikroskopie zu finden.

In HeLa Zellen wurden dabei unterschiedliche Konzentrationen sowie Inkubationszeiten getestet. Für das Konzentrationsexperiment wurden ebenso hohe Konzentrationen wie 1, 2 und 4 mM getestet. Das Vorgehen für die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den HEK293T Zellen.

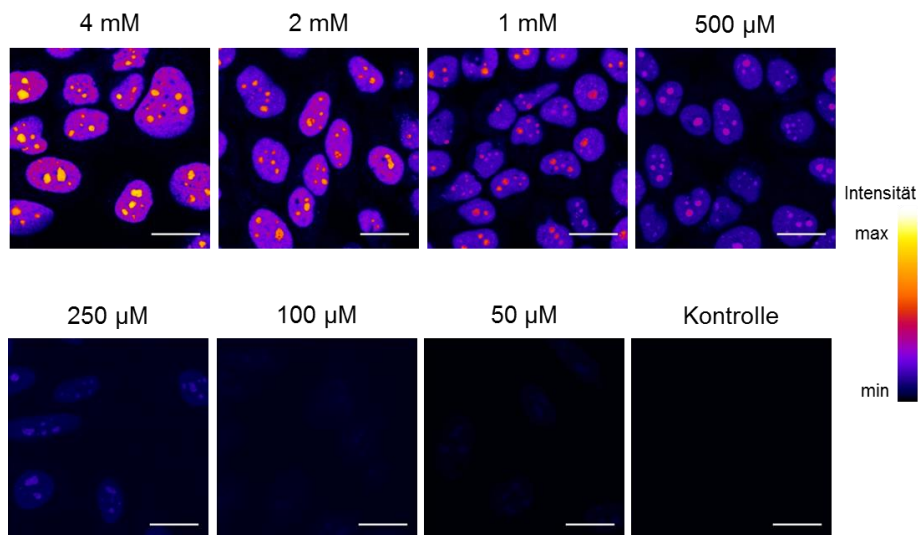


Abbildung 63: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen EU behandelt wurden. Die „Kontrolle“ zeigt komplett unbehandelte Zellen. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 20 µm

Auch in HeLa Zellen wird EU innerhalb von sechs Stunden konzentrationsabhängig eingebaut. Am stärksten ist auch hier der Einbau in den Nukleoli (Abbildung 63).

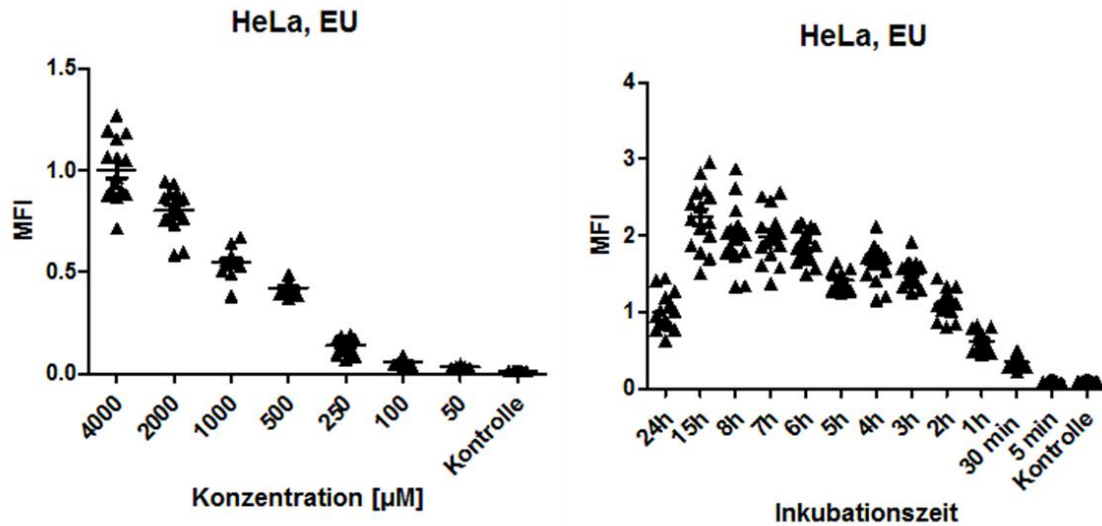


Abbildung 64: Darstellung der mittleren Fluoreszenz aus den Fluoreszenzbildern der Experimente mit HeLa Zellen, die mit unterschiedlichen EU-Konzentrationen bzw. für verschiedene Zeiten mit EU behandelt wurden. Ausgemessen wurde diese in den Kernen und Nukleoli der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je 15 Zellen verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die jeweilige Konzentration in μM bzw. die Zeit dargestellt.

Die Konzentrationsabhängigkeit gemessen an der Fluoreszenzintensität ist im Blot in Abbildung 64 auf der linken Seite zusätzlich dargestellt. Dabei sind die Abstufungen zwischen den Konzentrationen 50 und 100 μM relativ gering, zwischen hohen Konzentrationen wie 2 und 4 mM jedoch deutlich bemerkbar. Im rechten Teil der Graphik ist zudem die Fluoreszenzintensität für unterschiedliche Behandlungszeiten aufgezeigt. Diese steigt zwischen fünf Minuten und vier Stunden stark an. Zwischen fünf und 15 Stunden sind kaum Schwankungen auszumachen bevor sie, vermutlich aufgrund der Toxizität, bei einer Behandlung von 24 Stunden wieder abfällt. Aus diesen Beobachtungen zusammen mit den Viabilitätstests wurde für die Untersuchung von MFC-7 Zellen und den EU-Einbau eine Inkubationszeit von elf Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen gewählt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

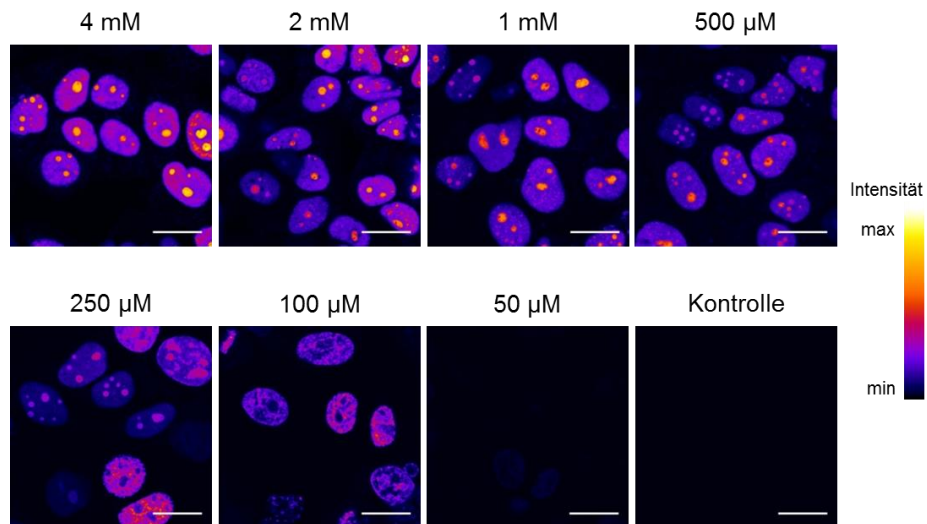


Abbildung 65: Dargestellt sind die konfokalen Fluoreszenzbilder von MCF-7 Zellen, die für elf Stunden mit EU-Konzentrationen zwischen 50 µM und 4 mM behandelt wurden. Auch hier folgte nach der Behandlung das Fixieren, Permeabilisieren und Färben der Zellen. Scale Bar: 20 µm

Auffällig ist hierbei, dass für die Konzentrationen 50, 100 und 250 µM das Signal in den Nucleoli nicht besonders stark ist, vor allem gegenüber dem Rest des Zellkerns. Für 50 und 100 µM ist nahezu keine Nucleolifärbung zu erkennen, wohingegen sie für 250 µM in manchen Zellen stärker ist als die des übrigen Zellkerns und in manchen deutlich schwächer. Jedoch ist in allen Bildern sichtbar, dass innerhalb eines Bildes die Fluoreszenzintensität deutlich schwankt. Es findet also innerhalb einer Probe, in der die Zellen alle dieselbe EU-Konzentration erfahren haben, kein gleichmäßiger Einbau statt. Verdeutlicht ist dies im Plot in Abbildung 66. Die mittlere Fluoreszenzintensität unterscheidet sich nicht sehr stark zwischen den einzelnen Konzentrationen im Bereich zwischen 4 mM und 100 µM. Innerhalb einer Konzentration jedoch unterliegt der EU-Einbau starken Schwankungen. Zusammengefasst ist in MCF-7-Zellen kein zuverlässiger Einbau von EU vorhanden und die Akkumulation in den Nucleoli nicht immer gegeben.

Aus diesen Gründen wurde im Folgenden auf Experimente mit MCF-7 Zellen verzichtet. HEK293T und HeLa Zellen zeigten in den Experimenten deutlich vielversprechendere Ergebnisse.

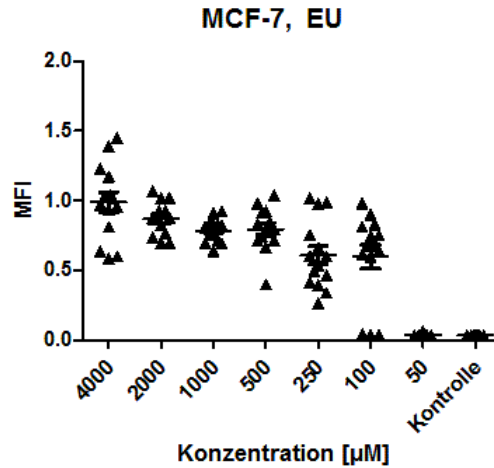


Abbildung 66: Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität aus den Fluoreszenzbildern des konzentrationsabhängigen Experiments mit MCF-7 Zellen. Ausgemessen wurde diese in den Kernen und Nukleoli der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je 15 Zellen verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die jeweilige Konzentration in μM dargestellt.

Die Tests von EDDA wurden damit an HEK293T und HeLa Zellen durchgeführt und werden im Folgenden diskutiert. Da die Viabilität für HeLa Zellen, die für sechs Stunden mit EDDA behandelt wurden, im Gegensatz zu den HEK293T Zellen etwas höher lag (Abbildungen 52 und 53), wurde zunächst mit diesen begonnen. Zunächst wurden verschiedenen EDDA-Konzentrationen an HeLa-Zellen getestet (Abbildung 67). Um einen Vergleich zu EU zu haben, wurden auch hohe Konzentrationen wie 2 und 1 mM verwendet. Das Vorgehen war dabei gleich wie im Falle von EU, dies gilt ebenso für die folgenden Experimente. Nach der Behandlung mit dem Nukleosid wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

Für die Konzentrationen 250 μM und höher ist deutlich zu erkennen, dass die Viabilität der Zellen durch die Behandlung mit dem Nukleosid sichtbar herabgesetzt wurde. Die Kontrolle zeigt keine Färbung. Dies bedeutet, dass EDDA auf jeden Fall kovalent eingebaut wird. Für die Konzentrationen 100 bis 25 μM ist ein Einbau im Zellkern sichtbar, jedoch nicht in den Nukleoli. Dies weist bereits darauf hin, dass EDDA in die DNA eingebaut wird. Zudem fällt jedoch auf, dass der Einbau innerhalb einer Konzentration, also innerhalb eines Bildes, nicht gleichmäßig erfolgte. Zwischen den einzelnen Konzentrationen ist hier kein merklicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität zu sehen.

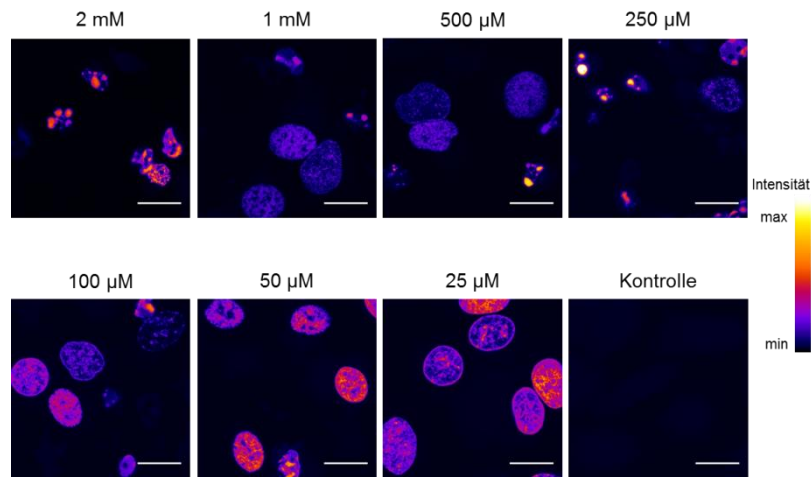


Abbildung 67: Gezeigt sind die Fluoreszenzbilder von HeLa Zellen nach der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an EDDA für sechs Stunden. Die „Kontrolle“ zeigt dabei komplett unbehandelte Zellen. Nach der Behandlung erfolgte das Fixieren, Permeabilisieren und Färben der Zellen. Scale Bar: 20 µm

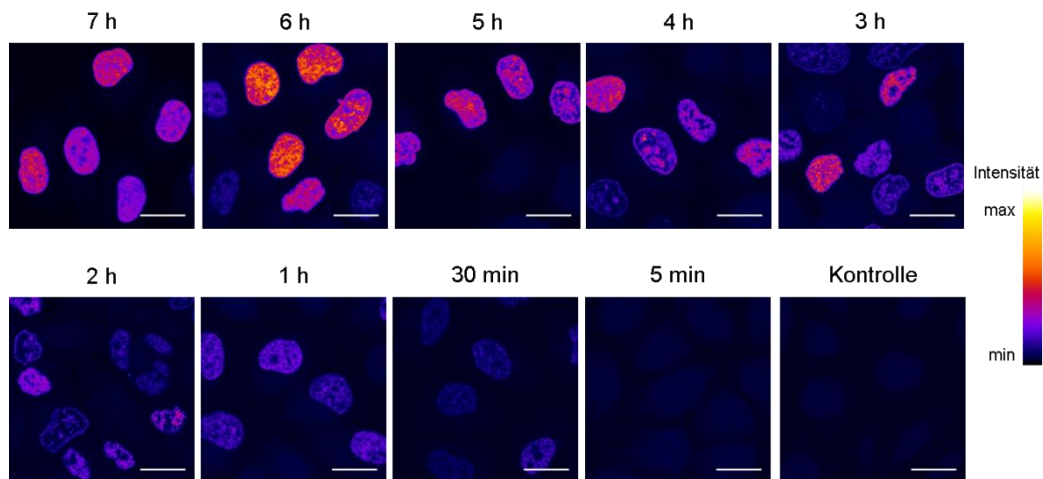


Abbildung 68: Gezeigt sind konfokale Fluoreszenzbilder von HeLa Zellen, wobei die Zellen für unterschiedliche Zeiten mit dem Nukleosid EDDA (50 µM) behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden diese fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Scale Bar: 20 µm

Auch die Behandlung von HeLa Zellen mit EDDA für unterschiedliche Inkubationszeiten zeigt einen ungleichmäßigen Einbau des Nukleosids (Abbildung 68). Verwendet wurde hierbei die Konzentration 50 µM, die im ersten Test einen Einbau von EDDA und keine sichtbar geringere Viabilität zeigte. Ein sichtbarer Einbau ist nach einer Inkubationszeit von einer Stunde zu erkennen. Das Maximum scheint den Bildern nach nach sechs Stunden erreicht zu sein. Trotzdem ist der Einbau auch hier wieder nicht in jeder Zelle gleich. Möglicherweise ist dies auch vom Zellzyklus abhängig. Der Plot in Abbildung 69 zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensität und damit den ungleichmäßigen Einbau noch genauer.

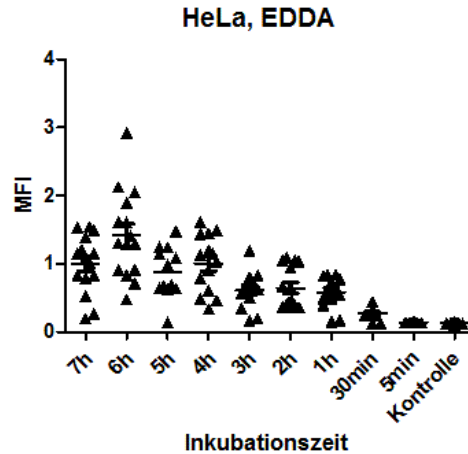


Abbildung 69: Darstellung der mittleren Fluoreszenz aus den Fluoreszenzbildern der unterschiedlich langen Behandlung von HeLa Zellen mit EDDA (50 μ M). Ausgemessen wurde diese in den Kernen der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je 15 Zellen verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die Inkubationszeit dargestellt.

Weiter wurden HeLa Zellen zusammen mit der EDDA Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Harnstoff behandelt, um den Einbau des Nucleosids in die DNA zu verifizieren.

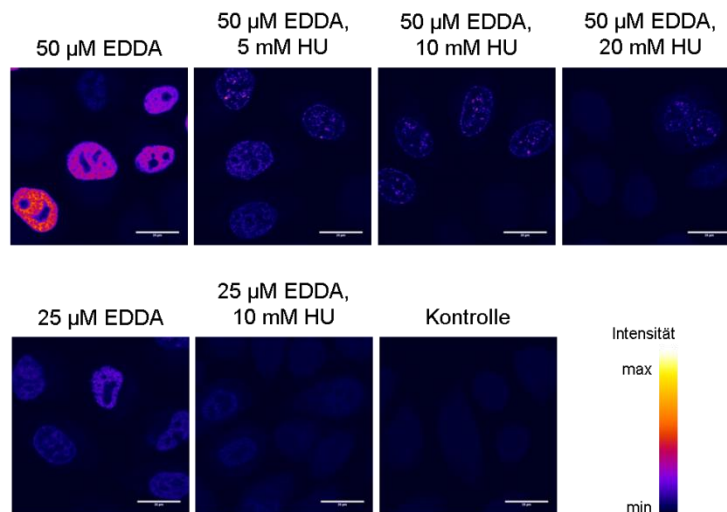


Abbildung 70: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die zusammen mit dem Nucleosid EDDA noch mit einem Inhibitor der Ribonucleotidreduktase (HU) für sechs Stunden behandelt wurden. Bei den Bildern ganz links erfolgte nur die Behandlung mit EDDA. Wenn nicht anders angezeigt, wurden zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen HU dazu gegeben. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Scale Bar: 20 μ m

HeLa Zellen wurden mit entweder 50 oder 25 μ M EDDA behandelt und so fixiert oder zusätzlich unterschiedliche HU-Konzentrationen hinzugegeben. In der oberen Bildreihe in Abbildung 70 sind die konfokalen Fluoreszenzbilder zu se-

hen, wobei die Zellen mit 50 μM EDDA behandelt wurden, in der unteren mit 25 μM . Die Behandlung mit HU lässt das Fluoreszenzsignal nahezu komplett verschwinden. Diese Experimente zeigen, dass EDDA in die DNA eingebaut wird.

In einem weiteren Test wurden HEK293T Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an EDDA für sechs Stunden behandelt. In Anlehnung an die Experimente der HeLa Zellen wurden nur geringe Konzentrationen von 50, 25 und 12,5 μM verwendet (Abbildung 71).

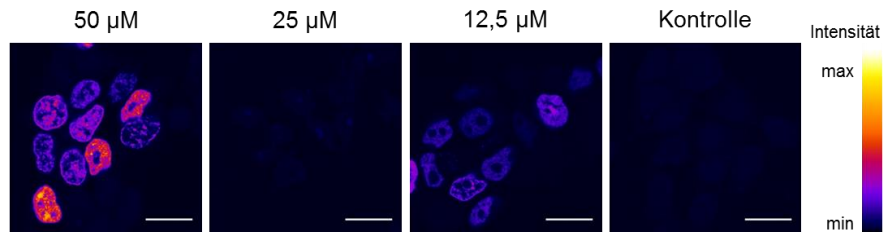


Abbildung 71: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HEK293T Zellen, die für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von EDDA behandelt wurden. Anschließend erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und das Färben der Zellen. Scale Bar: 20 μm

Auch in HEK293T Zellen erfolgt der Einbau von EDDA unregelmäßig. Sowohl innerhalb eines Bildes sind unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten in den Zellkernen sichtbar als auch zwischen den Konzentrationen. Hier gilt jedoch nicht, je höher die Konzentration desto stärker der Einbau. Für eine Konzentration von 25 μM ist der Einbau deutlich schwächer als für die beiden übrigen Konzentrationen. Ebenso ergeben sich große Unregelmäßigkeiten für unterschiedliche Inkubationszeiten, dargestellt im Plot in Abbildung 72. Innerhalb derselben Inkubationszeit schwankt die Intensität stark.

Für EDDA ist damit sowohl in HEK293T als auch in HeLa Zellen kein regelmäßiger konzentrations- und zeitabhängiger Einbau sichtbar. Aus diesem Grunde ist EDDA für die Ramanmikroskopie, wo ein akkumulierter, regelmäßiger Einbau gesucht wird, nicht geeignet. Mögliche Gründe können die Abhängigkeit des Einbaus vom Zellzyklus als auch die hohe Toxizität des Nukleosids sein.

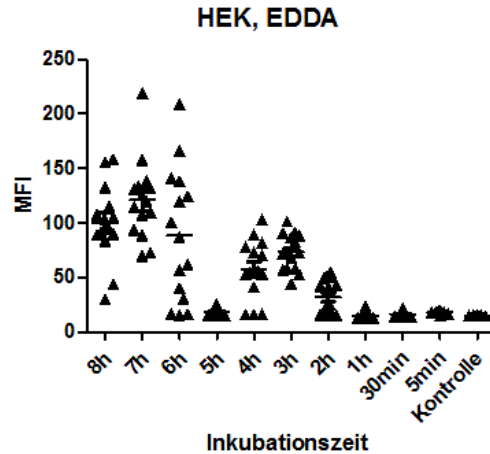


Abbildung 72: Darstellung der mittleren Fluoreszenz aus den Fluoreszenzbildern der unterschiedlich langen Behandlung von HEK Zellen mit EDDA (50 μ M). Ausgemessen wurde diese in den Kernen der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je 15 Zellen verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die Inkubationszeit dargestellt.

Für das Alkin-funktionalisierte Nukleosid *F-ara*-EdU wird eine deutlich geringere Toxizität erwartet. Dies zeigten bereits die Viabilitätstests am Anfang dieses Kapitels als auch Studien von Neef et al.^[91] *F-ara*-EdU wurde im Folgenden an HeLa Zellen getestet, da sich diese als robuster erwiesen. Da eine geringere Toxizität für dieses Nukleosid erwartet wurde, wurde das Augenmerk auf höhere Inkubationszeiten gelegt. HeLa Zellen wurden für sechs, 24 und 72 Stunden mit unterschiedlichen *F-ara*-EdU-Konzentrationen behandelt. Zudem konnte der Einbau des Nukleosids in die DNA mit Hilfe von HU gezeigt werden. Nach jeder Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

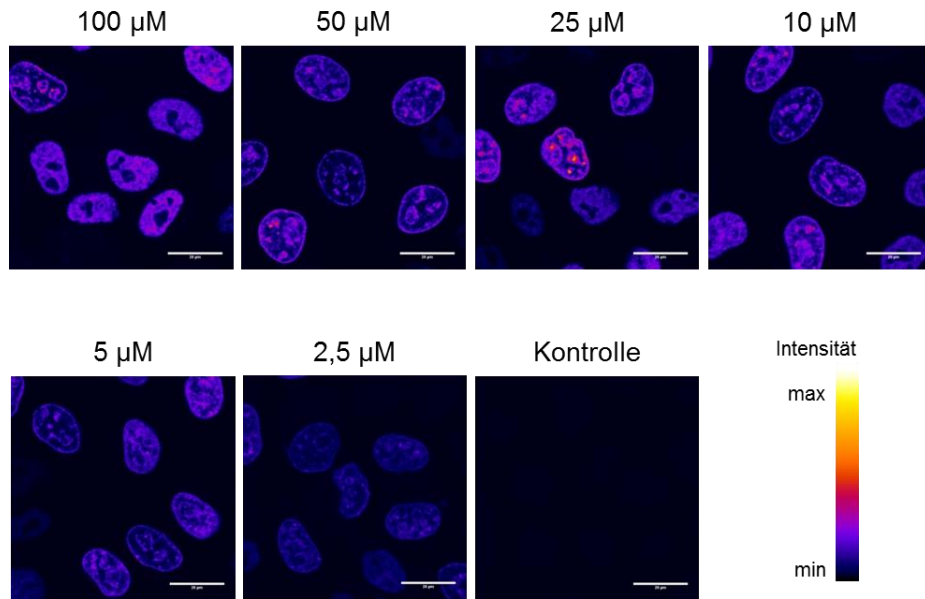


Abbildung 73: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die für sechs Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an F-ara-EdU behandelt wurden. Anschließend wurden diese fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Scale Bar: 20 µm

Die Konzentrationen wurden in Anlehnung an EDDA so gewählt, dass die höchste 100 µM betrug (Abbildung 73). Bereits für eine geringe Konzentration wie 5 µM ist hier ein deutlicher Einbau des Nukleosids zu erkennen. Auch die Probe mit 2,5 µM Nukleosid zeigt einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle mit unbehandelten Zellen. Jedoch sind innerhalb eines Bildes, wie bei der Behandlung mit EDDA, Schwankungen in der Fluoreszenzintensität sichtbar, wenn auch nicht ganz so stark. Zudem ist zwischen den Konzentrationen 5 und 100 µM kein großer Unterschied sichtbar. Zu erkennen ist auch, dass kein Einbau in den Nukleoli, sondern nur in den Zellkernen stattfindet. Dies deutet darauf hin, dass F-ara-EdU, zumindest hauptsächlich, in die DNA eingebaut wird.

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 74 bestätigt die Beobachtung eines unregelmäßigen Einbaus aus Abbildung 73 für eine Inkubationszeit von sechs Stunden. Wird die Inkubationszeit jedoch erhöht, wie etwa auf 24 und 72 Stunden, so ist der Einbau innerhalb einer Konzentration viel regelmäßiger. Die Viabilitätstests in Kapitel 4.2 zeigen jedoch für die 72 Stunden eine deutlich herabgesetzte Viabilität der Zellen. Für 24 Stunden jedoch liegt diese immer noch über 50 % und scheint damit vielversprechend zu sein. Dass F-ara-EdU nahezu ausschließlich in die DNA eingebaut wird, ist in Abbildung 75 dargestellt. Dabei erfolgte zur Behandlung mit F-ara-EdU die gleichzeitige Behandlung mit HU.

Fluoreszenz- und Ramanmikroskopie an Alkinverbindungen

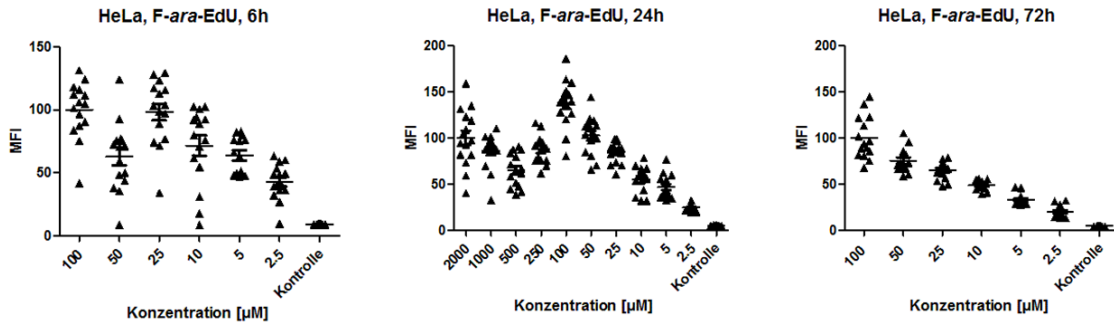


Abbildung 74: Gezeigt sind die Fluoreszenzintensitäten von F-ara-EdU innerhalb eines Experiments, hier für HeLa Zellen, die für sechs, 24 bzw. 72 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen an F-ara-EdU behandelt wurden. Ausgemessen wurde diese in den Kernen der Zellen. Dabei wurden für jede Konzentration je 15 Zellen verwendet. Auf der y-Achse ist dabei die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) mit Mittelwert und auf der x-Achse die Konzentration in µM dargestellt.

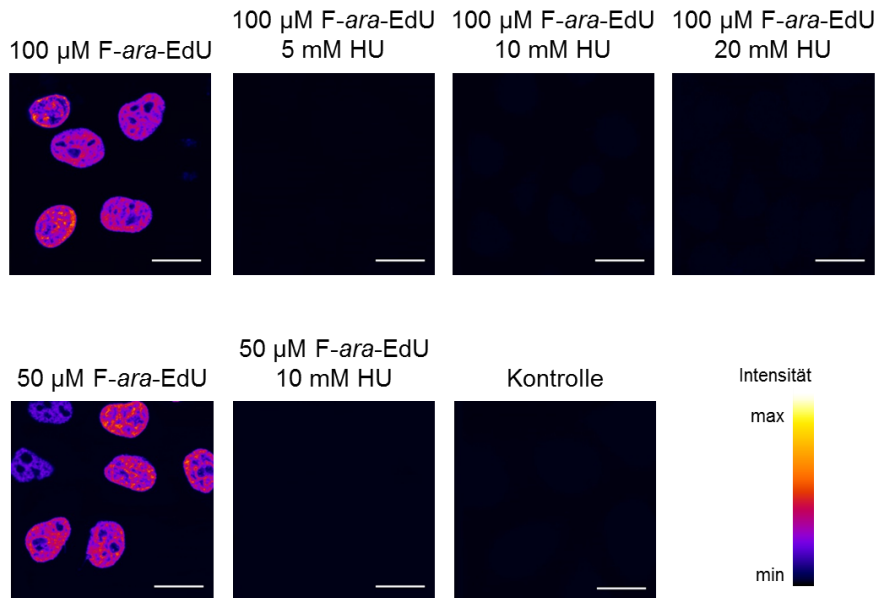


Abbildung 75: Konfokale Fluoreszenzbilder von HeLa Zellen, die mit 100 bzw. 50 µM F-ara-EdU und unterschiedlichen Konzentrationen an HU (5, 10, 20 mM) für sechs Stunden behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Scale Bar: 20 µm

Noch eindeutiger als für die Behandlung mit EDDA und HU ist das Ergebnis für die Behandlung von HeLa Zellen mit F-ara-EdU und HU. Bereits die geringste HU-Konzentration von 5 mM, die hier angewandt wurde, blockiert den Einbau des Nukleosids komplett.

Die geringe Toxizität des Nukleosids und damit dessen Anwendbarkeit auf Zellen über längere Zeiträume wie 24 Stunden oder sogar länger, lassen F-ara-EdU vielversprechend wirken. Zudem erfolgt der Einbau bei längeren Inkubationszeiten regelmäßig. Da der Schwerpunkt im Folgenden jedoch auf der Unter-

suchung der RNA liegen soll und es sich bei *F-ara-EdU* um ein reines DNA-Nukleosid handelt, ist im weiteren Verlauf EU das Nukleosid der Wahl.

Zudem wurden die vier Nukleoside *N6-PA*, *2-EA*, *O3-EA* und *O2-EA* auf den Einbau in HeLa Zellen getestet. Synthetisiert wurden diese von Yizhi Yuan (AG Marx, Universität Konstanz). Das Ziel war es hier, ein vielversprechenderes Nukleosid zu finden als es EU zu sein scheint. Der Einbau sollte also möglichst in die RNA erfolgen, um Akkumulationen in den Nukleoli zu erhalten. Für die Tests mit diesen Nukleosiden wurden HeLa Zellen für je sieben Stunden mit den Konzentrationen 2 und 1 mM, 500, 250, 100, 50 und 25 μM behandelt. Eine Kontrolle mit komplett unbehandelten Zellen wurde jeder Reihe ebenso hinzugefügt. Die Zellen wurden wie in den Experimenten mit den oben besprochenen Nukleosiden ebenfalls fixiert mikroskopiert. Der Einbau der Nukleoside konnte anhand der Fluoreszenz von Sulfo-Cyanin-3-Azid gemessen werden. Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den Nukleosiden EU, EDDA und *F-ara-EdU*, indem je eine andere Konzentration an Nukleosid dem Zellmedium hinzugegeben wurde.

Im Folgenden sind die konfokalen Fluoreszenzbilder der mit Nukleosid behandelten HeLa Zellen dargestellt (Abbildungen 76-79). Da in diesem Fall für alle vier Nukleoside dieselben Einstellungen für die Mikroskopie gewählt wurden (smart Gain, smart Offset und Laser Power), können die Bilder nicht nur innerhalb eines Experiments, sondern auch untereinander verglichen werden. Auffällig ist dabei, dass die Nukleoside *O3-EA* und *O2-EA* im Gegensatz zu *2-EA* und *N6-PA* kaum einen Einbau zeigen. Die beiden letzteren wurden dabei bereits in der Literatur beschrieben (siehe Kapitel 2.4). *N6-PA* zeigt dabei jedoch noch ein weitaus höheres Fluoreszenzsignal als *2-EA*.

Fluoreszenz- und Ramanmikroskopie an Alkinverbindungen

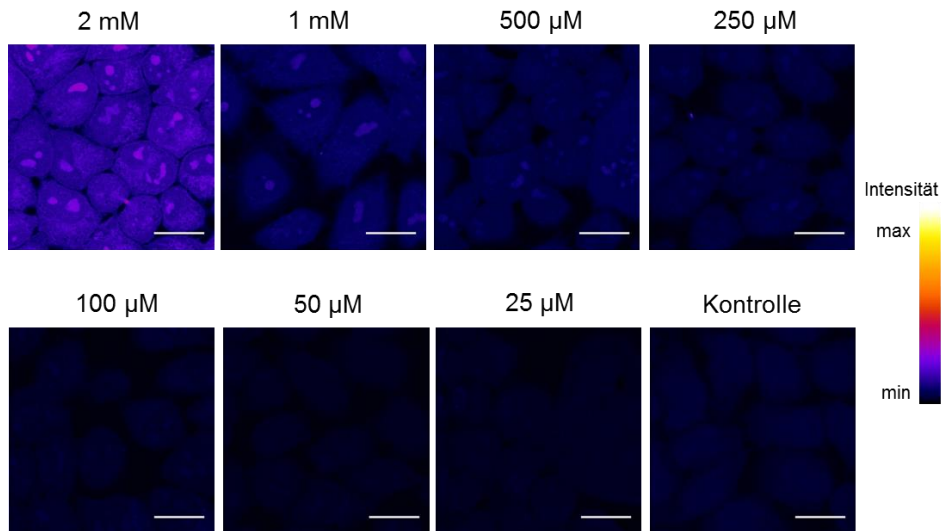


Abbildung 76: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die für sieben Stunden mit den Konzentrationen 2 und 1 mM bzw. 500, 250, 100, 50 und 25 μ M O2-EA behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Der smart Gain aller vier Experimente betrug dabei 720 V, der smart Offset -0,4 %. Scale Bar: 20 μ m

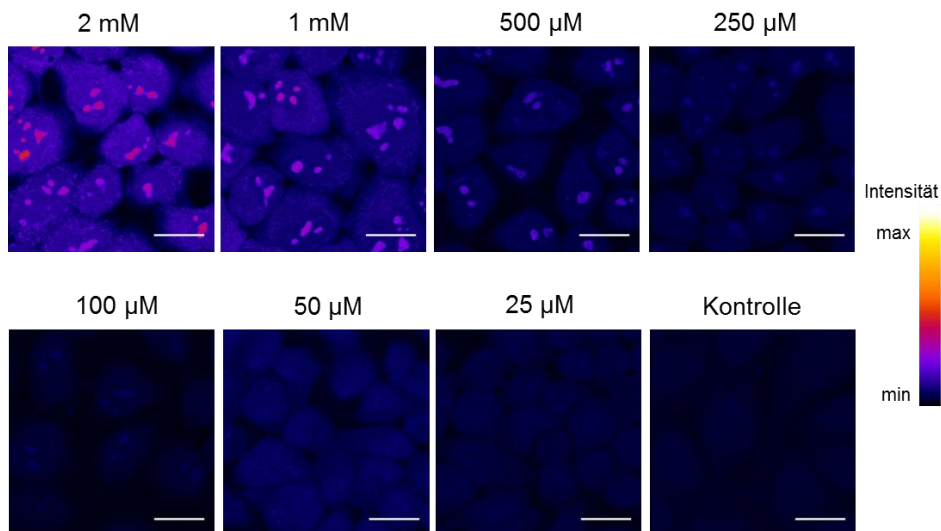


Abbildung 77: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die für sieben Stunden mit den Konzentrationen 2 und 1 mM bzw. 500, 250, 100, 50 und 25 μ M O3-EA behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Der smart Gain aller vier Experimente betrug dabei 720 V, der smart Offset -0,4 %. Scale Bar: 20 μ m

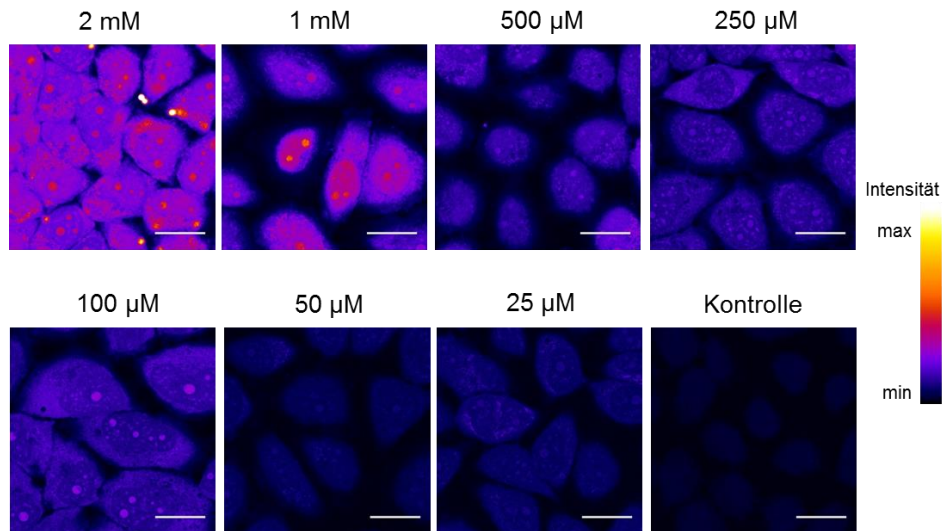


Abbildung 78: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die für sieben Stunden mit den Konzentrationen 2 und 1 mM bzw. 500, 250, 100, 50 und 25 μM 2-EA behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Der smart Gain aller vier Experimente betrug dabei 720 V, der smart Offset -0,4 %. Scale Bar: 20 μm

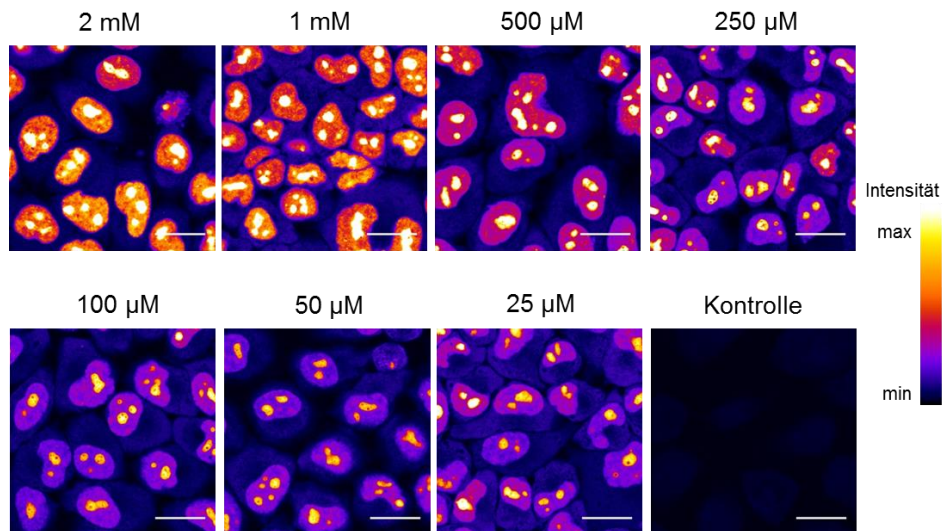


Abbildung 79: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie an HeLa Zellen, die für sieben Stunden mit den Konzentrationen 2 und 1 mM bzw. 500, 250, 100, 50 und 25 μM N6-PA behandelt wurden. Nach der Behandlung wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mittels CuAAC mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Der smart Gain aller vier Experimente betrug dabei 720 V, der smart Offset -0,4 %. Scale Bar: 20 μm

Für alle Nucleoside ist ein Einbau in den Nucleoli zu beobachten. Ebenso ist für alle ein konzentrationsabhängiger Einbau sichtbar. Interessant für die Ramanmikroskopie scheint jedoch nur N6-PA zu sein. Für Experimente mit EU wurden für die Fluoreszenzmikroskopie meist ein smart Gain von 500-600 V verwendet und damit deutlich geringer als für die hier vorliegenden Experimente. Ein effizienterer Einbau als für EU ist damit nicht zu beobachten. Damit ist von allen untersuchten Nucleosiden EU für Ramanuntersuchungen am geeignetsten.

4.4 Ramanmikroskopie von Alkinverbindungen

4.4.1 Hinführende Experimente

Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, fällt die Streckschwingung der Alkine mit etwa 2100 cm^{-1} in einen Bereich, in dem Zellen kein Ramansignal zeigen, der sogenannten „Raman-silent-region“. Damit sind diese Reporterfunktionalitäten optimal zur Untersuchung kleiner Biomoleküle mittels Ramanmikroskopie in Zellen geeignet.^[81] Dafür ist es jedoch notwendig, die genaue Energie der Alkinstreckschwingung der hier verwendeten Nucleoside zu kennen. Hierzu diente die Ramanspektroskopie. Ebenso wurden Fettsäuren ramanspektroskopisch untersucht, die im Anschluss für erste CARS- und SRS-Experimente an Zellen verwendet wurden. Diese zur Ramanmikroskopie an Alkin-funktionalisierten Reporter-molekülen hinführenden Experimente sind im Folgenden dargestellt. Das verwendete Ramanmikroskop, genauer beschrieben in Abschnitt 6.2.16, wurde dabei zur Aufnahme von Ramanspektren verwendet. Die Nucleoside wurden dabei als Feststoff auf Quarz-Objektträgern vermessen. Die Durchführung der Messungen fand im Rahmen eines Mitarbeiterpraktikums von John Geiger statt. Im Folgenden werden die Spektren von Fettsäuren und alkinisierten Nucleosiden gezeigt und diskutiert.

An erster Stelle sind die Spektren der Fettsäuren gezeigt, da im folgenden Abschnitt zunächst nicht-lineare Raman-Techniken an mit Fettsäuren behandelten Zellen diskutiert werden. Die Verwendung von Fettsäuren in Leberzellen zur Ausbildung von LDs eignet sich hervorragend für erste Messungen mit CARS und SRS-Mikroskopie, da diese hohe Akkumulationen von Fettsäuren im Zytoplasma darstellen und damit leichter zu detektieren sein sollten als die Alkin-funktionalisierten Nucleoside. Die Aufnahme der Spektren diente auch bei den Fettsäuren dazu, die Lage der verschiedenen Schwingungsbanden einzuordnen, um diese anschließend zur Detektion der LDs mittels nicht-linearer Raman-Techniken zu verwenden.

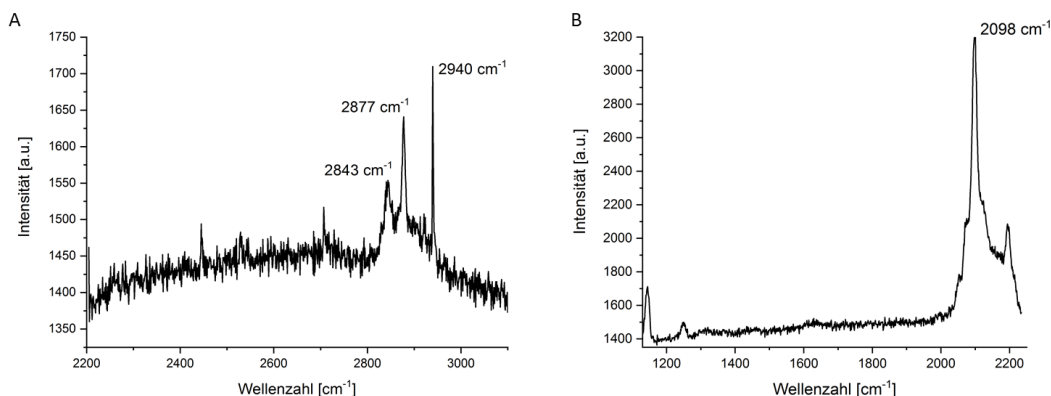


Abbildung 80: Ramanspektren von Stearinsäure (A) und deuterierter Palmitinsäure (B)

Im Ramanspektrum der Stearinsäure in Abbildung 80 A ist eindeutig das Signal der symmetrischen Streckschwingung der CH_3 -Gruppe bei 2940 cm^{-1} zu erken-

nen, ebenso die C-H-Streckschwingung in den Signalen um 2850 cm^{-1} .^{[78],[79]} Diese typischen Signale sollen im folgenden Kapitel zur Verfolgung von LDs mittels CARS und SRS zu Rande gezogen werden. Deuterierte Fettsäuren besitzen ihre Hauptsignale aufgrund der C-D-Streckschwingung im Bereich von 2100 cm^{-1} . Beispielhaft sei hier das Spektrum der Palmitinsäure- d_{31} (Abbildung 80 B) gezeigt. Auch dieses Signal soll für erste CARS- und SRS-Mikroskopie-Messungen verwendet werden.

Die Signale der C-D-Streckschwingung befinden sich in derselben spektralen Region wie die der Alkinschwingung. Die Raman-Spektren der Alkinfunktionalisierten Nucleoside EU, EDDA und F-*ara*-EdU sind im Folgenden aufgezeigt.

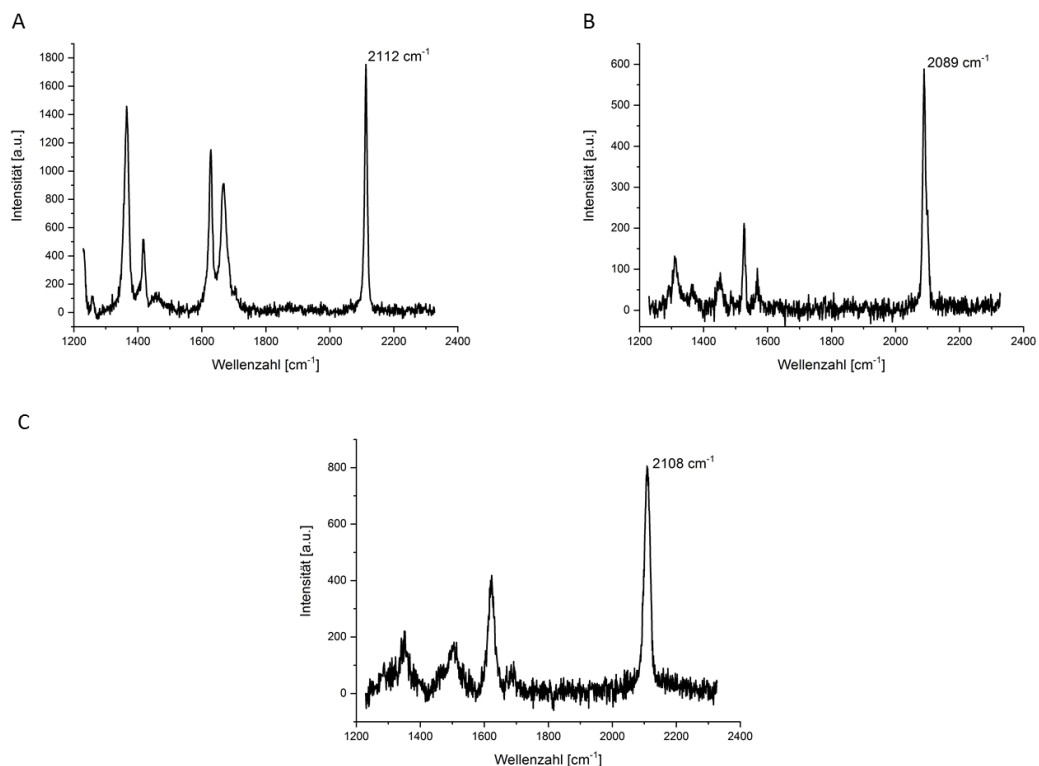


Abbildung 81: Ramanspektren der Nucleoside EU (A), EDDA (B) und F-*ara*-EdU (C)

Wie erwartet enthalten alle Spektren ein Signal bei einer Wellenzahl um 2100 cm^{-1} für die Alkinschwingung, die sich in der sog. „Raman-silent-region“ einer Zelle befindet und deswegen besonders gut detektiert werden können sollte. Die genaue Position dieser Schwingung für jedes Nucleosid ist damit hilfreich, um die Signale in CARS und SRS besser bestimmen und zuordnen zu können. Mit den Informationen dieser Spektren der Fettsäuren und Nucleoside konnte zur Verwendung der nicht-linearen Raman-Techniken CARS und SRS übergegangen werden.

Visualisierung von LDs mittels nicht-linearer Raman-Techniken

CARS- und SRS-Mikroskopie sollten zunächst anhand der Untersuchung von LDs in HepG2 Zellen verwendet werden. Wie bereits in Kapitel 2.3 erläutert, bieten diese ein verlässliches System, mit Hilfe dessen ein Gefühl für die Sensitivität eines Aufbaus erhalten werden kann. Von diesem System sollte später auf das der Alkin-funktionalisierten Nukleoside übergegangen werden. Dabei sollte der Einbau unterschiedlicher Fettsäuren in die LDs intrazellulär untersucht werden. Hierfür mussten die Fettsäuren als Fettsäure-Albumin-Komplexe dem Zellmedium hinzugegeben werden, damit diese von den HepG2 Zellen aufgenommen und in LDs eingebaut werden konnten. Um die Fettsäuren in Albumin-Komplexe zu überführen, wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Listenberger *et al.* gearbeitet.^[97] Hierzu mussten die Fettsäuren zunächst in ihre Natriumsalze überführt werden. Dies geschah mit Hilfe von NaOH. Nach Überführung der Lösung in eine 5 % (w/v)-ige BSA-Lösung unter ständigem Durchmischen und folgender Sterilfiltration konnte die gesamte Lösung in Medium überführt und die HepG3 Zellen damit behandelt werden. Dies jedoch war nur für Fettsäuren möglich, die bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vorlagen. Somit wurden Ölsäure, Linolsäure, α -Linolensäure, Arachidonsäure und Ölsäure- d_{34} (Abbildung 82) in BSA-Komplexe überführt, wobei die Endkonzentration der Fettsäuren im Zellmedium 400 μ M betrug. Nach einer Behandlungszeit von 32 Stunden waren in den Zellen deutlich LDs sichtbar, sodass diese zu diesem Zeitpunkt fixiert wurden.

Um zu untersuchen, ob die dem Zellmedium zugesetzten Fettsäuren von den HepG2 Zellen aufgenommen und für das Wachstum von LDs verwendet wurden, sollten die LDs mittels CARS- und SRS-Mikroskopie auf unterschiedliche Streckschwinungen untersucht werden. Die nicht-deuterierten Fettsäuren besitzen dabei eine unterschiedliche Anzahl an Doppelbindungen. Dieser unterschiedliche Sättigungsgrad sollte sich in den Spektren der LDs widerspiegeln.

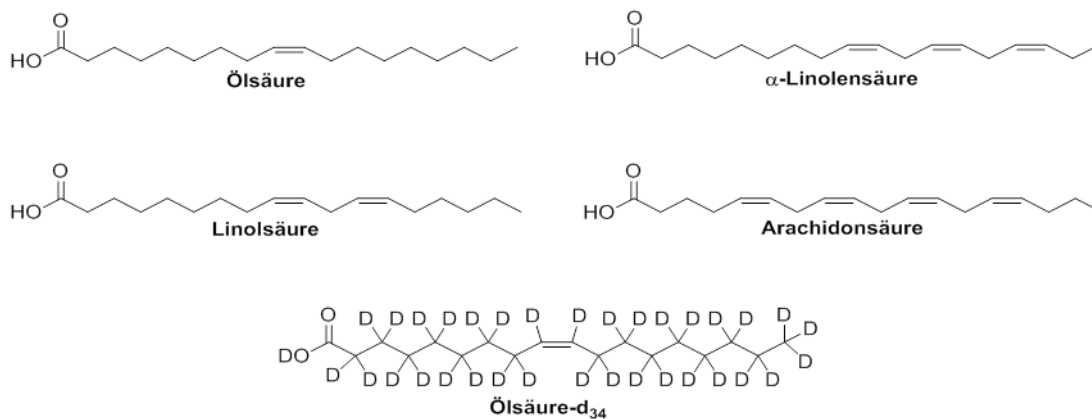


Abbildung 82: Dargestellt sind die Strukturformeln der Fettsäuren, die auf den Einbau in LDs in HepG2 Zellen untersucht wurden. Die Fettsäurekonzentration betrug dabei 400 μ M auf den Zellen.

Die CARS-Experimente an mit Fettsäuren behandelten HepG2-Zellen wurden an einem von Dr. Martin Winterhalder (AG Zumbusch, Universität Konstanz) selbst erbautem Aufbau, und einige Experimente auch mit Martin Winterhalder, durchgeführt.^[98] Die Aufnahmeparameter der Bilder sowie der Aufbau sind in Abschnitt 6.2.18 genauer beschrieben. Die Leistung von Pump-Laser und Stokes-Laser war bei allen Bildern dieselbe, 110 mW bzw. 140 mW. Die Streckschwingungen, die in diesem Falle von Interesse waren, waren die C-H-Streckschwingung gesättigter CH-Bindungen um 2850 cm^{-1} und die ungesättigter um 3010 cm^{-1} .^[99] Zur Aufnahme von Spektren mittels CARS-Mikroskopie wurde bei jeder Wellenzahl ein Bild aufgenommen und anschließend die Intensitäten eines LDs verglichen und gegen die Wellenzahl in cm^{-1} aufgetragen. So entstanden die Spektren in den Abbildungen 83 und 84.

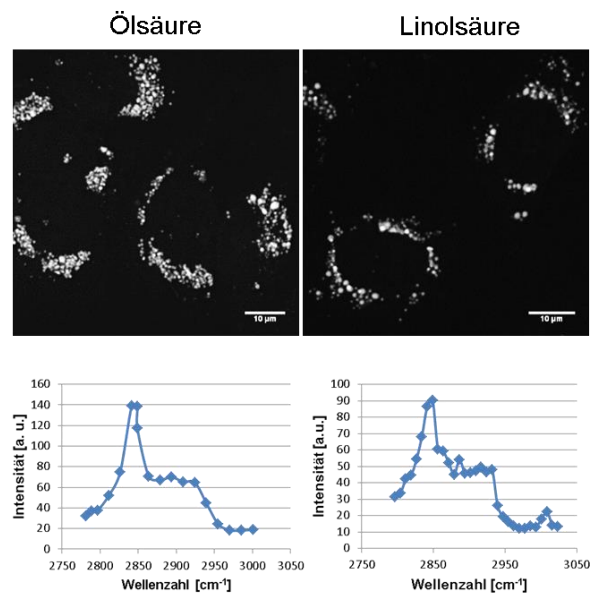


Abbildung 83: CARS-Mikroskopie an HepG2 Zellen, die einerseits mit Ölsäure und im anderen Falle mit Linolsäure für 32 Stunden behandelt wurden. Die Fettsäurekonzentration betrug dabei $400\text{ }\mu\text{M}$. Die Bilder wurden bei einer Wellenzahl von 2849 cm^{-1} aufgenommen. Die Spektren entstanden durch die Aufnahme von Bildern bei unterschiedlichen Wellenzahlen, wobei jeweils die Intensität in einem LD gegen die Wellenzahl aufgetragen wurde. Scale Bar: $10\text{ }\mu\text{m}$

Mittels CARS-Mikroskopie an den mit Ölsäure, Linolsäure, α -Linolensäure und Arachidonsäure behandelten HepG2 Zellen konnten deutlich die LDs im Zytoplasma der Zellen erkannt werden. Diese zeigen ein deutlich höheres CARS-Signal als die übrigen Bereiche. Die Bilder in den Abbildungen 83 und 84 sind dabei jeweils bei einer Wellenzahl von 2849 cm^{-1} aufgenommen worden. Unter den Mikroskopiebildern sind die Spektren eines LDs der jeweiligen Probe dargestellt. Die Maxima befinden sich dabei bei 2849 cm^{-1} . Umso höher die Anzahl der Doppelbindungen der dem Medium zugesetzten Fettsäuren ist, umso stärker ist auch ein Signal um 3010 cm^{-1} zu erkennen. Im Spektrum der Ölsäure, die in ihrer Struktur nur eine Doppelbindung aufweist, ergibt sich kein Signal im Bereich der Streckschwingung der C-H-Bindung einer C-C-Doppelbindung. Be-

trachtet man jedoch das der Linolsäure, das der α -Linolensäure und das der Arachidonsäure, so sind in diesem Bereich deutliche Signale vorhanden. Das Signal der Streckschwingung der C-H-Bindung gesättigter C-C-Bindungen ist in allen Spektren sichtbar. Offenbar wurden die komplexierten und dem Zellmedium zugesetzten Fettsäuren damit von den Zellen zur Ausbildung von LDs verwendet.

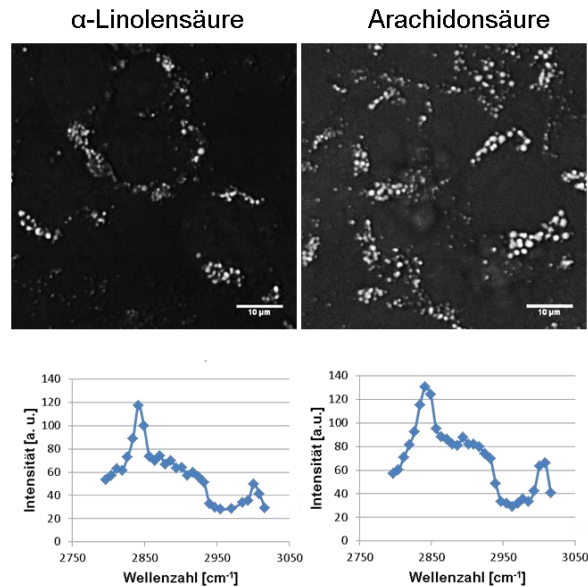


Abbildung 84: CARS-Mikroskopie an HepG2 Zellen, die einerseits mit α -Linolensäure und im anderen Falle mit Arachidonsäure für 32 Stunden behandelt wurden. Die Fettsäurekonzentration betrug dabei $400 \mu\text{M}$. Die Bilder wurden bei einer Wellenzahl von 2849 cm^{-1} aufgenommen. Die Spektren entstanden durch die Aufnahme von Bildern bei unterschiedlichen Wellenzahlen, wobei jeweils die Intensität in einem LD gegen die Wellenzahl aufgetragen wurde. Scale Bar: $10 \mu\text{m}$

Als folgender Schritt wurde der Bereich um 2100 cm^{-1} untersucht, in dem sich auch das Signal der Alkinschwingung befindet. Hierfür eigneten sich deuterierte Fettsäuren sehr gut. Die Detektion des Signals der C-D-Streckschwingung von deuterierten Fettsäuren, die dem Zellmedium zugesetzt wurden, zeigt noch deutlicher, dass die zugesetzten Fettsäuren tatsächlich für die Ausbildung von LDs verwendet werden, da Fettsäuren in deuterierte Form der Zelle von Natur aus nicht zur Verfügung stehen. Die Ramanspektren der Stearinsäure und der deuterierten Palmitinsäure sind in Abbildung 80 dargestellt. Zur Komplexierung einer deuterierten Fettsäure nach dem oben verwendeten Protokoll von Listemberger *et al.* muss diese jedoch bei Raumtemperatur flüssig sein.^[97] Aus diesem Grund wurde Ölsäure- d_{34} gewählt und nach eben diesem Protokoll in einen BSA-Komplex überführt. HepG2 Zellen wurden anschließend für 32 Stunden mit einer Konzentration von $400 \mu\text{M}$ damit behandelt und anschließend fixiert. Die Ergebnisse der CARS-Mikroskopie sind in Abbildung 85 dargestellt.

Auch für die mit deuterierter Ölsäure behandelten HepG2 Zellen sind mittels CARS-Mikroskopie LDs im Zytoplasma zu erkennen. Das Spektrum im rechten Teil der Abbildung zeigt ein deutliches Signal im Bereich der C-D-Streckschwingung um 2100 cm^{-1} , was den Einbau der nicht-natürlichen Fettsäure beweist. Das Maximum im Spektrum liegt dabei bei 2102 cm^{-1} .

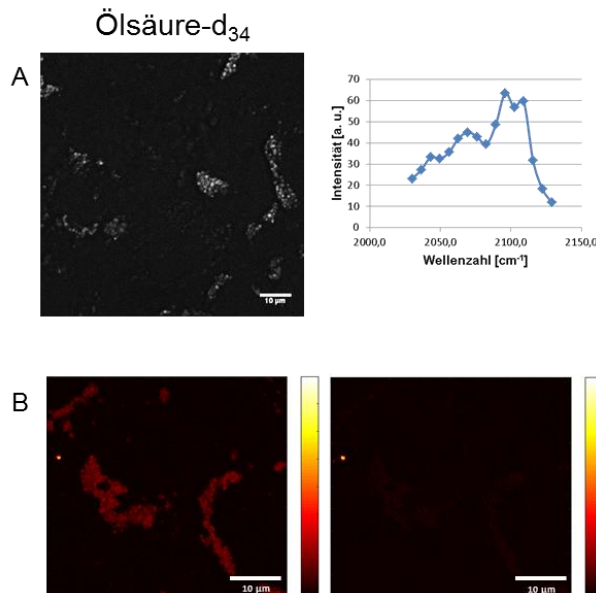


Abbildung 85: A: CARS-Mikroskopie an HepG2 Zellen, die mit Ölsäure-d₃₄ für 32 Stunden behandelt wurden. Die Fettsäurekonzentration betrug dabei $400\text{ }\mu\text{M}$. Die Bilder zeigen LDs in den Zellen, aufgenommen bei einer Wellenzahl von 2102 cm^{-1} . Die Spektren entstanden durch die Aufnahme von Bildern bei unterschiedlichen Wellenzahlen, wobei jeweils die Intensität in einem LD gegen die Wellenzahl aufgetragen wurde. B: SRS-Bilder von HepG2 Zellen, die auf dieselbe Art wie für die CARS-Messungen in Teil A mit deuterierter Ölsäure behandelt wurden. Das linke Bild wurde bei 2101 cm^{-1} und das rechte bei 2846 cm^{-1} aufgenommen, dabei betragen die Leistungen von Pump- bzw. Stokes-Strahl 7 bzw. 6 mW auf der Probe. Scale Bar: $10\text{ }\mu\text{m}$

Die gleichen Systeme wurden nun mittels SRS-Mikroskopie untersucht. Durch die hohen Akkumulationen der Fettsäuren und damit auch die an C-H-Bindungen, sollte eine optimale Voraussetzung zur Signaldetektion geschaffen sein. Die hier gezeigten SRS-Bilder wurden an einem in der AG Zumbusch selbst entwickelten System durchgeführt, das in Abschnitt 6.2.17 näher beschrieben ist. Die Messungen wurden alle zusammen mit Peter Fimpel (AG Zumbusch, Universität Konstanz) durchgeführt. Im Teil A von Abbildung 86 sind LDs in HepG2 Zellen dargestellt, die ebenso wie für die CARS-Mikroskopie für 32 Stunden mit $400\text{ }\mu\text{M}$ Ölsäure behandelt wurden. Das linke der drei Bilder ist dabei bei 2846 cm^{-1} aufgenommen, das mittlere bei derselben Wellenzahl, jedoch wurde im mittleren Bereich des Bildes der Stokes-Laser zur Anregung blockiert, um zu zeigen, dass es sich bei den Signalen nicht um Artefakte handelt (rote Markierung). Nur wenn Pump- und Stokes-Laser räumlich und zeitlich überlappt auf die Probe treffen, kann ein Signal detektiert werden. Das rechte

der Bilder wurde bei 3009 cm^{-1} aufgenommen. Auch hier sind damit wieder deutlich die LDs im Zytoplasma der Zellen sichtbar. Auch die ungesättigten C-H-Streckschwingungen sind zu erkennen, da auch im rechten Bild die LDs ein deutlich vom Hintergrund verschiedenes Signal erzeugen.

Die Teile B, C und D der Abbildung 86 zeigen SRS-Bilder von HepG2 Zellen, die mit Linolsäure, α -Linolensäure und Arachidonsäure behandelt wurden. Für ein LD aus Teil B ist ebenso das Spektrum gezeigt. Auch hier ist ein Signal im Bereich von 3010 cm^{-1} zu erkennen, was das Vorhandensein von ungesättigten Fettsäuren in den LDs anzeigt. In den Teilen C und D sind sowohl Signale für die C-H-Schwingung der gesättigten als auch der ungesättigten C-C-Bindungen ersichtlich. Auch hier kann also der Einbau der Fettsäuren in LDs beobachtet werden. Gezeigt wird dies auch anhand des Einbaus der deuterierten Fettsäure Ölsäure- d_{34} in Abbildung 85 B. Bei 2101 cm^{-1} sind Signale in den LDs zu beobachten, bei 2846 cm^{-1} nicht.

LDs konnten mittels CARS- und SRS-Mikroskopie an in der AG selbst entwickelten Aufbauten detektiert werden. Der nächste Schritt, die Detektion von Nukleosiden in Zellen, gelang jedoch nur am TCS SP8 unter Verwendung höherer Anregungsintensitäten, was im Folgenden beschrieben wird.

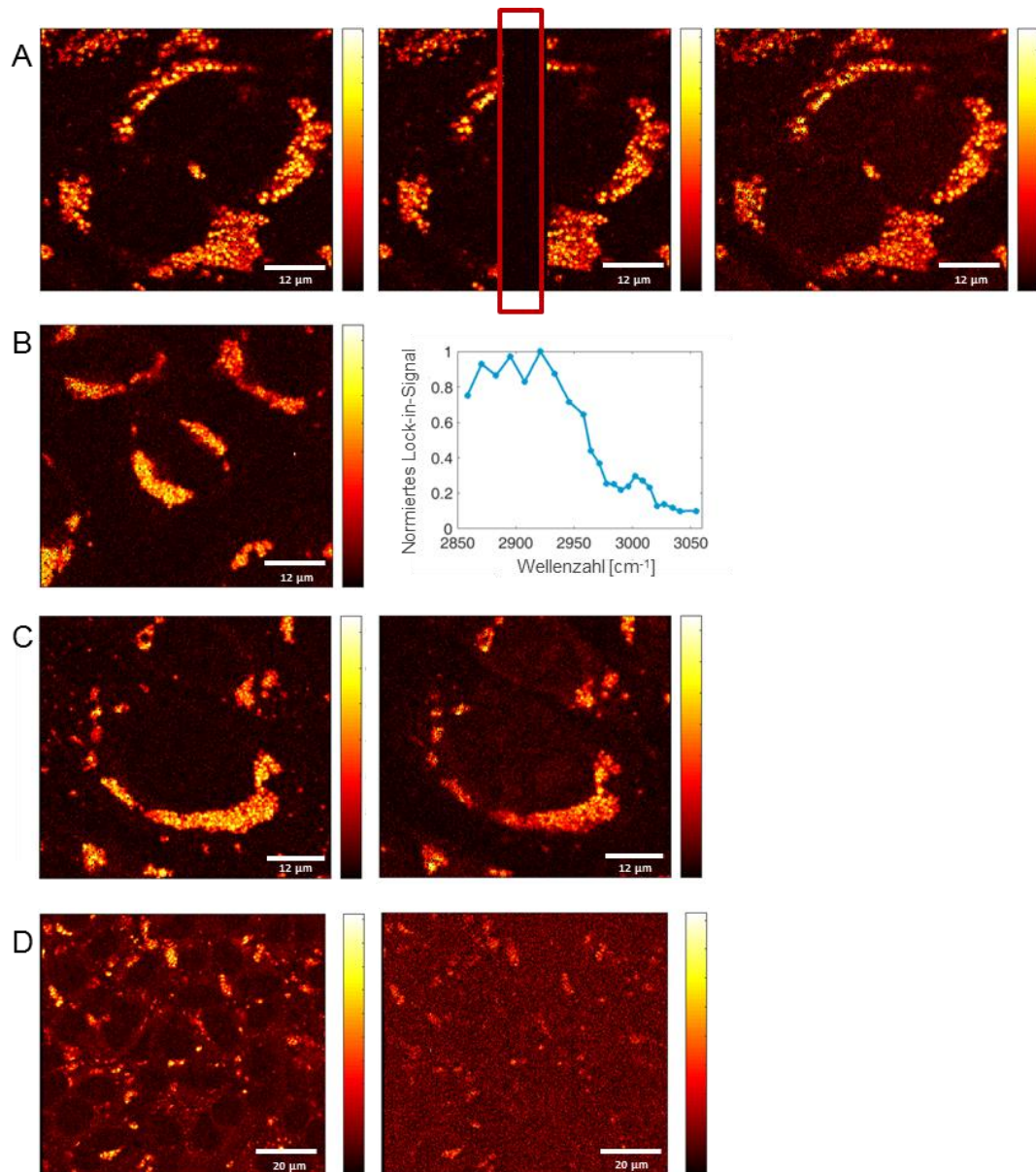


Abbildung 86: SRS-Bilder von HepG2 Zellen, die je mit 400 μM einer Fettsäure behandelt wurden. A: Ölsäure, aufgenommen bei 2846 cm^{-1} , teilweise ohne Stokes-Laser, um zu zeigen, dass es sich bei den Signalen nicht um Artefakte handelt, und bei 3009 cm^{-1} ; Scale bar: $12\text{ }\mu\text{m}$; B: Linolsäure bei 2846 cm^{-1} zudem ist ein SRS-Spektrum eines LDs gezeigt; Scale bar: $12\text{ }\mu\text{m}$; C: α -Linolensäure bei 2846 cm^{-1} und 3009 cm^{-1} ; Scale bar: $12\text{ }\mu\text{m}$; D: Arachidonsäure mit denselben Wellenzahlen wie in C; Scale bar: $20\text{ }\mu\text{m}$; die Leistungen von Pump- bzw. Stokes-Strahl betragen dabei auf der Probe 2-3 bzw. 6-9 mW; alle Beschreibungen gelten dabei von links nach rechts.

Hinführende Experimente am TCS SP8

Zusätzlich zu den nicht-linearen Ramanmessungen an den selbst entwickelten Setups für CARS und SRS wurden Messungen auch an einem kommerziellen SRS-Mikroskop (TCS SP8, Leica) durchgeführt. Das integrierte CARS-System ist dabei in den Abschnitten 6.2.17 und 6.2.18 genauer beschrieben. Hier finden sich auch genaue Daten zu den CARS- und SRS-Bildern. Da das System neu zur Verfügung stand, wurde zum Test der vorhandenen Messmöglichkeiten zunächst mit Partikeln und erneut mit HepG2 Zellen gearbeitet, die mit Fettsäuren zur Ausbildung von LDs behandelt wurden.

Zunächst wurden 3 μm große Polystyrol- (PS) Partikel mit CARS-Mikroskopie betrachtet. Dabei erfolgte die Aufnahme eines CARS-Spektrums an einem Partikel direkt mittels der Leica LAS X Software, wobei der Stokes-Laser in seiner Wellenlänge konstant gehalten (1031 nm) und der Pump-Laser in 1 nm-Schritten variiert wurde (820 bis 782 nm), sodass ein Spektrum von 2500 cm^{-1} bis 3100 cm^{-1} erhalten werden konnte. Als Vergleich ist hier ebenso ein am konfokalen Ramanmikroskop aufgenommenes Spektrum von PS-Partikeln gleicher Größe gezeigt.

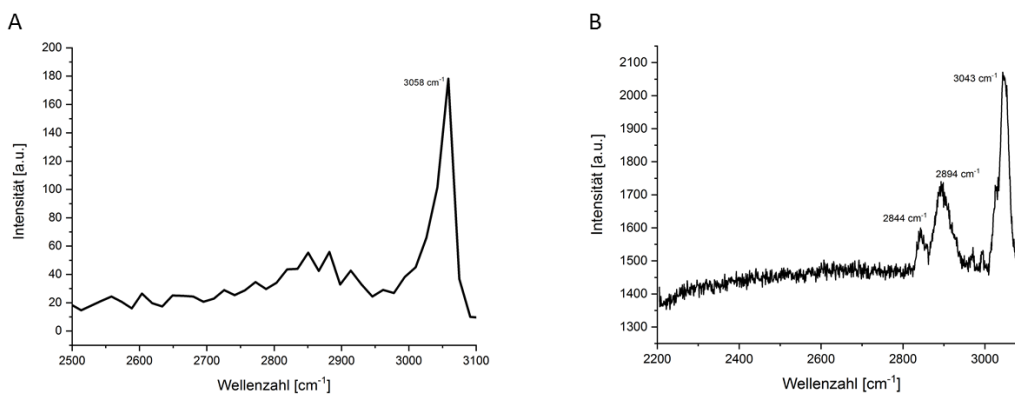


Abbildung 87: CARS- (A) und Ramanspektrum (B) von PS-Partikeln einer Größe von 3 μm . Das CARS-Spektrum wurde dabei am TCS SP8 (Leica) aufgenommen, das Ramanspektrum am konfokalen Ramanmikroskop. Für die CARS-Messungen wurde ein Luftkondensator mit der NA 0,9 verwendet und mit einer Laserleistung von 8 mW (Pump) und 8 mW (Stokes) auf der Probe gearbeitet.

In beiden Spektren ist deutlich das Signal der aromatischen C-H-Streckschwingung bei etwa 3050 cm^{-1} erkennbar. Im Ramanspektrum sieht man die Signale der C-H-Streckschwingung gesättigter C-C-Bindungen zwischen 2840 cm^{-1} und 2900 cm^{-1} deutlicher als im CARS-Spektrum.^[100] In einem nächsten Schritt wurden Polymethylmetacrylat- (PMMA) Partikel untersucht. In Abbildung 88 ist ein spontanes Ramanspektrum gezeigt, welches am konfokalen Ramanmikroskop aufgenommen wurde.

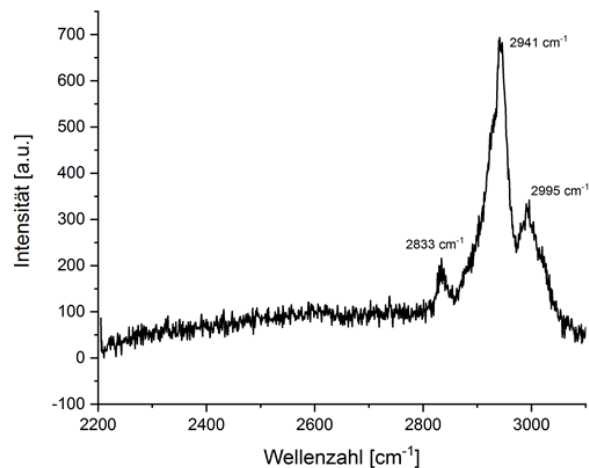


Abbildung 88: Spontanes Ramanspektrum von PMMA-Partikeln der Größen 1-10 μm , welches am konfokalen Ramanmikroskop aufgenommen wurde.

Im Spektrum in Abbildung 88 ist dabei die prominente Bande aliphatischer C-H-Gruppen bei etwa 2950 cm^{-1} sichtbar.^[101] Im Gegensatz zu der aromatischen C-H-Streckschwingung der PS-Partikel in Abbildung 87 befindet sich diese unterhalb von 300 cm^{-1} .

Da die Untersuchung alkinierter Nucleoside in Zellen erfolgen sollte, war der nächste Schritt, nicht-lineare Ramanmikroskopie am TCS SP8 an einem erprobten System in Zellen durchzuführen. Hier wurde erneut die Untersuchung von LDs gewählt. Wie bereits zuvor beschrieben, konnte von HepG2 Zellen, die mit verschiedenen Fettsäure-Albumin-Komplexen behandelt wurden, der Einbau dieser in LDs mit CARS und SRS verfolgt werden. Im Folgenden sind die Messungen an HepG2 Zellen, die mit Ölsäure, Linolsäure und α -Linolensäure behandelt wurden, beispielhaft gezeigt.

HepG2 Zellen wurden hierfür ebenfalls mit Fettsäure-Albumin-Komplexen behandelt, die nach einem Protokoll von Listenberger *et al.* hergestellt wurden.^[97]

Die genaue Vorgehensweise dazu ist in Abschnitt 6.2.5 ausführlich beschrieben. Die Endkonzentrationen der Fettsäuren auf den Zellen betragen $400\text{ }\mu\text{M}$, womit diese 32 Stunden behandelt und anschließend fixiert wurden. Das Ziel war es hier, die LDs mittels SRS anhand der Signale für die C-H-Streckschwingung gesättigter und ungesättigter C-C-Bindungen zu visualisieren und die Bildparameter so zu wählen, dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis möglichst groß wird. Dazu sollten Laserleistung, smart Gain, smart Offset und Belichtungszeit pro Pixel optimal aufeinander abgestimmt werden. Zudem wurden Spektren einzelner LDs aufgenommen. Dies geschah wie im Falle der Partikel durch das Durchstimmen des Pump-Lasers mittels der LAS X Software zwischen 820 nm und 782 nm für Spektren zwischen 2650 cm^{-1} und 3100 cm^{-1} .

Die SRS-Bilder der mit Ölsäure behandelten HepG2 Zellen sind in Abbildung 89 A zu sehen. Aufgenommen wurden diese bei 2930 cm^{-1} . In diesem Bereich

zeigt das Spektrum im Teil B der Abbildung ebenso das Maximum für die C-H-Bindungen gesättigter Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen. Für die ungesättigten ist ebenso ein Signal bei 3009 cm^{-1} zu erkennen. In den Bildern sind hauptsächlich LDs sichtbar, hohe Akkumulationen an C-H-Bindungen mit hoher Intensität. Zudem sind jedoch weitere zelluläre Strukturen zu erkennen wie etwa die Kernmembran. Dies verspricht, dass auch für Bereiche mit etwas geringerer akkumulierter Spezies Signale in den Zellen sichtbar gemacht werden können und ist damit eine gute Voraussetzung für die intrazelluläre Untersuchung von alkylierten Reporterverbindungen.

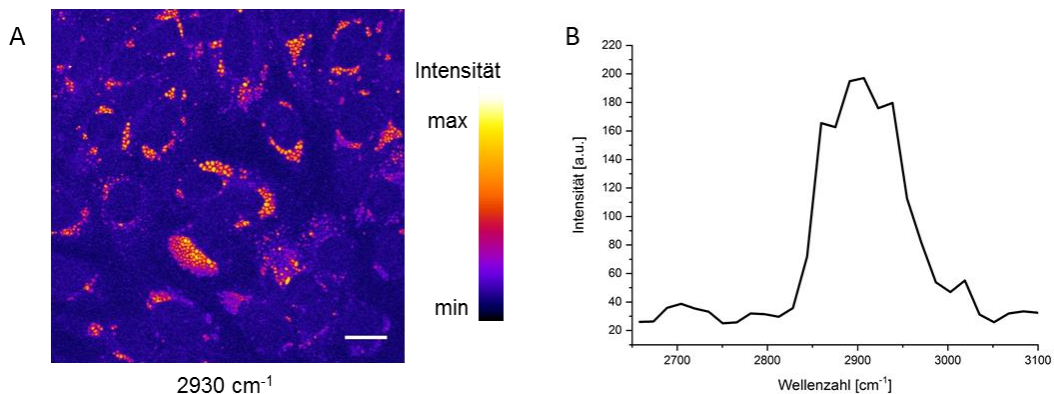


Abbildung 89: SRS-Mikroskopie am TCS SP8 an HepG2 Zellen, die für 32 Stunden mit $400\text{ }\mu\text{M}$ Ölsäure behandelt und anschließend fixiert wurden. In A ist ein SRS-Bild bei 2930 cm^{-1} gezeigt. In Teil B ist das Spektrum eines LDs zwischen 2650 und 3100 cm^{-1} dargestellt. Alle Aufnahmen wurden bei einer Laserleistung von $5,5\text{ mW}$ für Pump und Stokes auf der Probe aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug $600\text{ }\mu\text{s}$ bei 512×512 Pixel. Scale Bar: $20\text{ }\mu\text{m}$

Für die mit Linolsäure und α -Linolensäure behandelten HepG2 Zellen wurde analog vorgegangen. Dargestellt sind SRS-Bilder aufgenommen bei drei verschiedenen Wellenzahlen (Abbildung 90 A). 2945 cm^{-1} repräsentiert dabei das Signal der Streckschwingung der C-H-Bindungen gesättigter C-C-Bindungen und 3009 cm^{-1} die der ungesättigten. Im Bereich um 2700 cm^{-1} wird kein Signal erwartet. Das dargestellte Spektrum in Abbildung 90 B entstand auf dieselbe Art wie das in Abbildung 89.

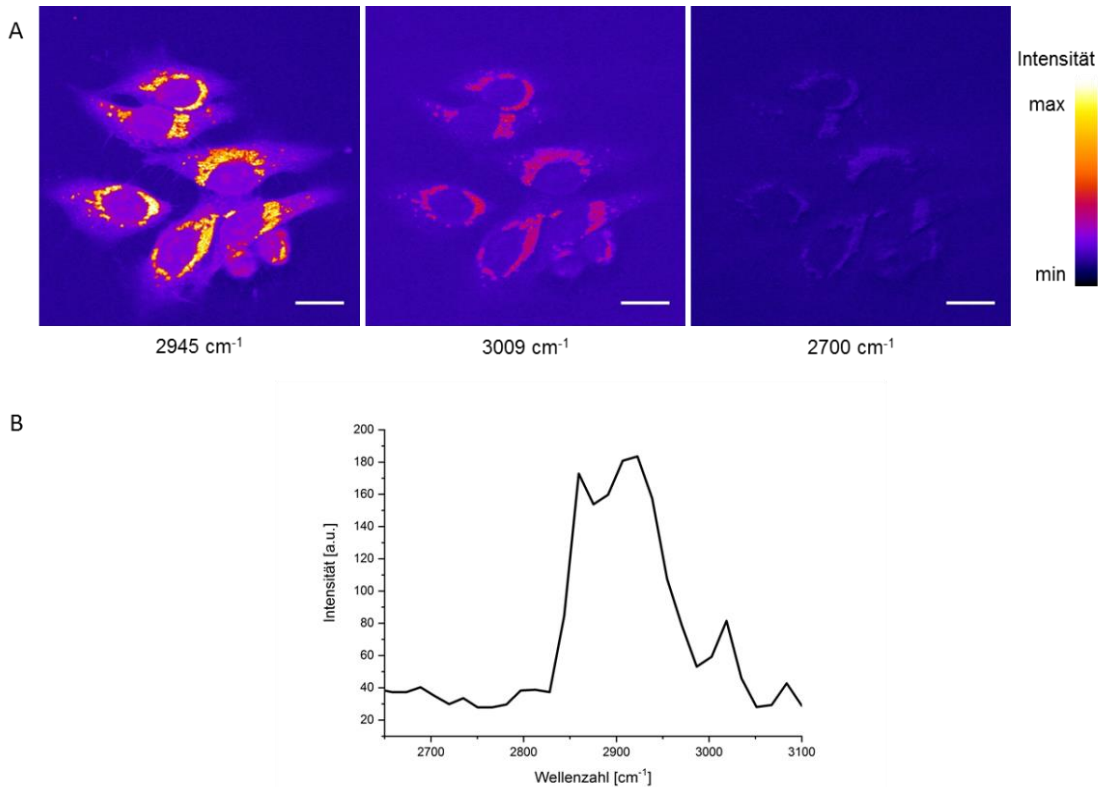


Abbildung 90: SRS-Mikroskopie an HepG2 Zellen, die mit 400 μM Linolsäure behandelt und anschließend fixiert wurden. In Teil A sind drei SRS-Bilder dargestellt, aufgenommen bei 2945, 3009 und 2700 cm^{-1} . Der Teil B zeigt ein Spektrum eines LDs. Alle Aufnahmen wurden bei einer Laserleistung von 15 bzw. 13 mW für Pump bzw. Stokes auf der Probe aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug 600 μs bei 515 x 515 Pixel. Scale Bar: 20 μm

Für die mit Linolsäure behandelten HepG2 Zellen sind auf den SRS-Bildern, die in den Wellenzahlbereichen der C-H-Streckschwingungen aufgenommen wurden, deutliche Signale in den LDs sichtbar (Abbildung 90). Bei 2700 cm^{-1} , einem Bereich, in dem kein Signal zu erwarten ist, sind nur Schatten der Strukturen zu erkennen. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Spektrum im Teil B der Abbildung 90. Zudem wurden die Bilder im Vergleich zu denen in Abbildung 89 mit höherer Laserleistung, einem geringeren smart Gain und einer höheren Belichtungszeit pro Pixel aufgenommen. Das Ergebnis sind klare Konturen der LDs, genauso wie die Umrisse der Zellkerne durch die Zellmembranen. Zudem sind weitere Zellorganelle sichtbar. Die Nukleoli, ebenso wie das Zytoplasma können schwach erkannt werden.

Fluoreszenz- und Ramanmikroskopie an Alkinverbindungen

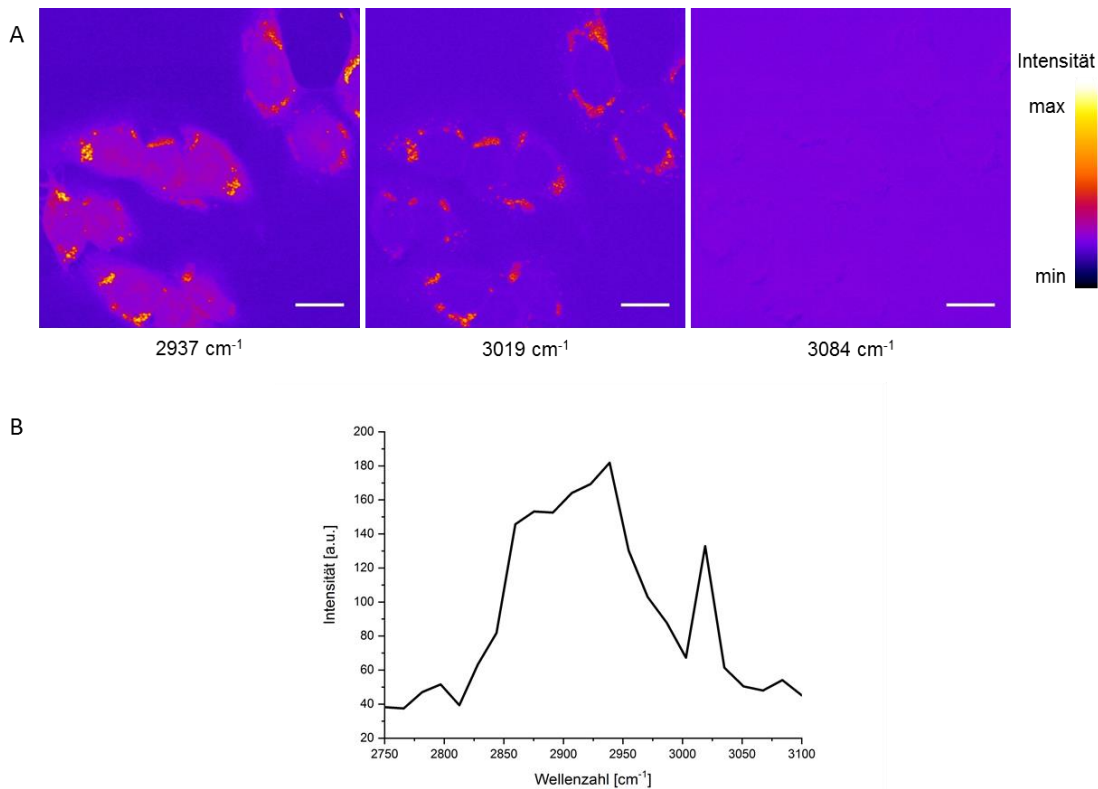


Abbildung 91: SRS-Mikroskopie an HepG2 Zellen, die mit 400 µM α-Linolensäure behandelt und anschließend fixiert wurden. In Teil A sind drei SRS-Bilder dargestellt, aufgenommen bei 2937, 3019 und 3084 cm⁻¹. Der Teil B zeigt ein Spektrum eines LDs. Alle Aufnahmen wurden bei einer Laserleistung von 13 bzw. 11,5 mW für Pump bzw. Stokes aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug 600 µs bei 512 x 512 Pixel. Scale Bar: 20 µm

Für die mit α-Linolensäure behandelten HepG2 Zellen sind ebenfalls drei SRS-Bilder dargestellt (Abbildung 91). Hier ist deutlich sichtbar, dass ein höheres Signal für die C-H-Streckschwingung ungesättigter C-C-Bindungen bei 3019 cm⁻¹ vorhanden ist als in den Abbildungen 89 und 90. Für 3084 cm⁻¹ und damit einen Bereich, in dem kein Signal zu erwarten ist, ist nichts zu erkennen. Dasselbe ist im Spektrum im Teil B der Abbildung gezeigt. Auch in diesen Bildern sind weitere zelluläre Strukturen sichtbar. Eine höhere Laserleistung als in Abbildung 89 zusammen mit möglichst geringerem smart Gain führten hier zum besten Ergebnis.

Die Messungen an den HepG2 Zellen zeigen damit deutlich, dass je nach Einstellungen hohe Signalstärken erzielt werden können, nicht nur für stark akkumulierte Bereiche. Der Vergleich zwischen Abbildung 90 und 91 zeigt jedoch auch, dass für dieselben smart Gain-Einstellungen der Hintergrund deutlich variieren kann. Die Ergebnisse versprechen jedoch die Möglichkeit der Visualisierung von weniger signalintensiven Komponenten in der Zelle.

4.4.2 Nicht-lineare Ramanmikroskopie mit Alkin-funktionalisierten Reporter-molekülen

SRS-Spektren der Reporterlösungen:

Um eine Idee der genauen Lage der Alkin-Bande zu bekommen, wurden zunächst SRS-Spektren von EU, EdU und MalAMyne am TCS SP8 gemessen. Die Präparation der 1 M Lösungen in DMSO erfolgte in Imaging Spacern und ist in Abschnitt 6.2.19 genauer beschrieben. Die Konstruktion der Spektren erfolgte durch die einzelne Aufnahme von Bildern bei jeder dargestellten Wellenzahl. Die Auswertung der Intensität in den Bildern erfolgte schließlich in der LAS X Software und die Darstellung mit Microsoft Office (Excel).

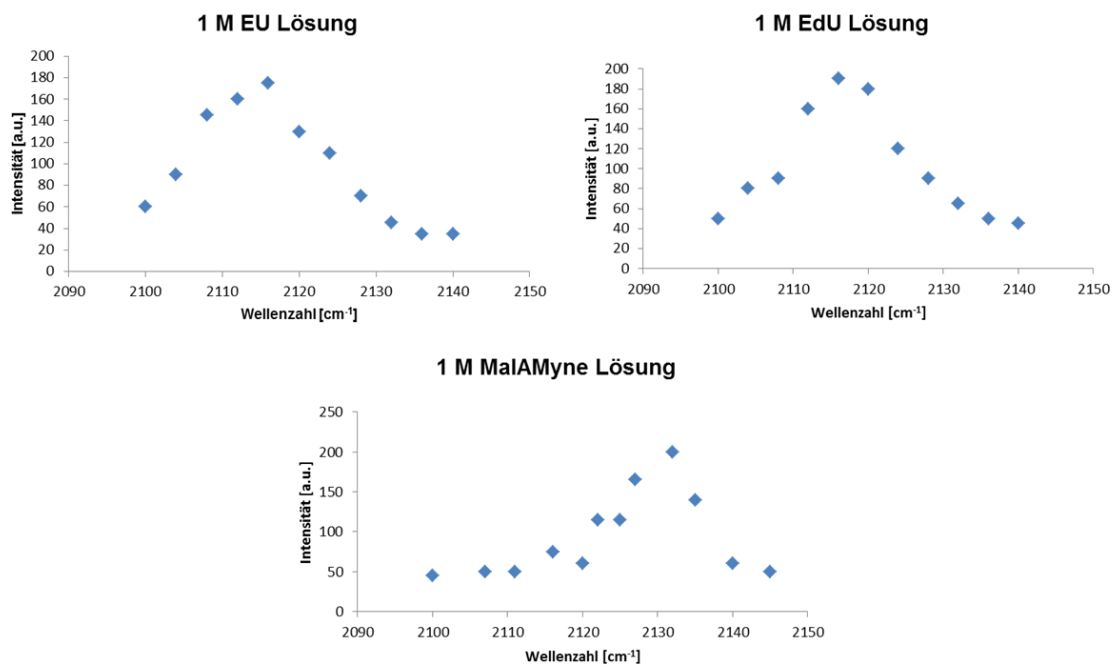


Abbildung 92: Gezeigt sind die Spektren der 1 M Lösungen von EU, EdU und MalAMyne im Bereich der Alkinstretschwingung. Die Lösungen wurden je in Imaging Spacern gemessen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug dabei jeweils 2,4 μ s. Die Leistung von Pump- bzw. Stokes-Laserarm waren dabei 12 bzw. 10 mW auf der Probe. Alle Messungen wurden mit einem Ölkondensator mit NA 1,40 durchgeführt.

Die Einstellungen zur Bildintensität (smart Gain) und zum Hintergrund (smart Offset) wurden für jede der Lösungen angepasst, weswegen die einzelnen Intensitäten der unterschiedlichen Lösungen nicht direkt miteinander verglichen werden sollten. Das Maximum im Spektrum von EU liegt dabei bei 2116 cm^{-1} , bei EdU ebenfalls bei 2116 cm^{-1} und bei MalAMyne bei 2132 cm^{-1} . Bei sowohl 2100 cm^{-1} als auch 2140 cm^{-1} ist in allen drei Fällen kein Signal der Alkinbande mehr zu erwarten.

SRS-Mikroskopie an mit Alkin-funktionalisierten Reportern behandelten Zellen:

SRS-Mikroskopie zur Visualisierung von Alkin-funktionalisierten Reporter-molekülen in Zellen wurde sowohl am in der Arbeitsgruppe selbst erbauten Setup als auch am TCS SP8 durchgeführt. Wie sich mittels Fluoreszenz und Viabilitätstests herausgestellt hatte (Kapitel 4.2 und 4.3), eigneten sich HeLa bzw. HeLa S3 Zellen am besten für die Behandlung mit den Reporter-molekülen.

In den Messungen am in der Arbeitsgruppe selbst erbauten Setup konnte für die Alkin-Schwingung jedoch kein Signal in den Zellen detektiert werden. Hierbei wurde mit Leistungen von 2-9 mW für sowohl Pump- als auch Stokes-Laser auf der Probe gearbeitet. Am TCS SP8 sind deutlich höhere Leistungen für die Messungen verfügbar. So können im Bereich des Maximums der Alkinschwingung 120 mW für sowohl Pump- als auch Stokes-Laser auf der Probe eingesetzt werden.

Um RNA und Proteine mit Hilfe der untersuchten Reporter mittels SRS-Mikroskopie zu visualisieren, wurden HeLa S3 Zellen mit einerseits 2 mM EU für 7 Stunden bzw. mit 2 mM MalAMyne für 4 Stunden behandelt. Um Artefakte durch das Fixieren mit Paraformaldehyd ausschließen zu können, wurden sowohl lebende als auch fixierte Zellen untersucht. Für das RNA-Nukleosid EU konnte jedoch sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellen kein Alkinsignal detektiert werden. Der Malonylierungsreporter MalAMyne konnte jedoch mit schwachem Signal detektiert werden. Zusätzlich wurden schließlich Proben getestet, bei denen HeLa S3 Zellen für 17 Stunden mit dem DNA-Nukleosid EdU behandelt wurden, da sowohl die Arbeitsgruppe um Wei Min als auch Tipping *et al.* damit bereits Erfolg hatten.^{[9],[34],[84]} Dessen Einbau konnte anhand des Raman-signals im Zellkern sowohl an fixierten als auch an lebenden Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zur EdU-Lösung befand sich das Maximum des Signals der Alkinschwingung in den Zellen bei 2125 cm^{-1} .

In Abbildung 93 sind die SRS-Bilder von lebenden HeLa S3 Zellen dargestellt, die für 17 Stunden mit EdU behandelt wurden. Das Bild A zeigt die Zellen beim Resonanzsignal der Alkinschwingung von 2125 cm^{-1} . Trotz des Hintergrundsignals, das vermutlich von Streuung herrührt, sind im Zellkern eindeutig hellere Bereiche zu erkennen, wobei die Nukleoli dabei ausgespart sind. EdU wird in die DNA eingebaut, welche sich im Zellkern, jedoch nicht in den Nukleoli befindet. Aus diesem Grund ist in diesen auch kein Signal zu erwarten. Um dies tatsächlich als Signal der Alkinschwingung sicherzustellen, wurde ein Bild mit denselben Parametern bei 2300 cm^{-1} aufgenommen, einem Bereich, in dem kein Signal zu erwarten ist (Abbildung 93 B). Die Differenz der beiden Bilder (Abbildung 93 C) verdeutlicht das Signal in den Zellkernen. Somit ist es möglich, die DNA in lebenden Zellen anhand des Einbaus von EdU und der Detektion von dessen Alkinschwingung zu visualisieren.

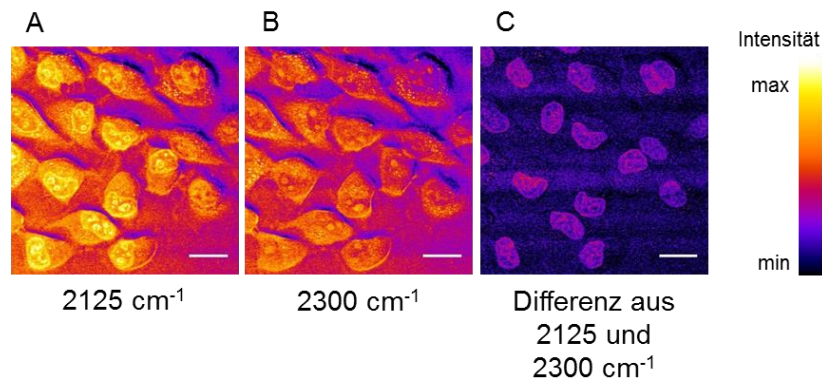


Abbildung 93: SRS-Bilder von lebenden HeLa S3 Zellen, die für 17 Stunden mit 100 μM EdU behandelt wurden. Aufgenommen wurden Bilder bei 2125 cm^{-1} (A) und 2300 cm^{-1} (B). Dargestellt ist zusätzlich die Differenz aus den beiden Bildern (C). Die Bilder wurden dabei mit einer Laserleistung von 44 mW (Stokes) und 60 mW (Pump) auf der Probe aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug hier 53,22 μs . Scale Bar: 25 μm

Um auszuschließen, dass das Fixieren von Proben mit 4 % (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS zu einer Abschwächung oder Veränderung des SRS-Signals der Alkinschwingung von EdU führt, wurden ebenfalls fixierte HeLa S3 Zellen untersucht, die für 17 Stunden mit 100 μM EdU behandelt und anschließend fixiert wurden. In Abbildung 94 sind die SRS-Bilder dazu dargestellt.

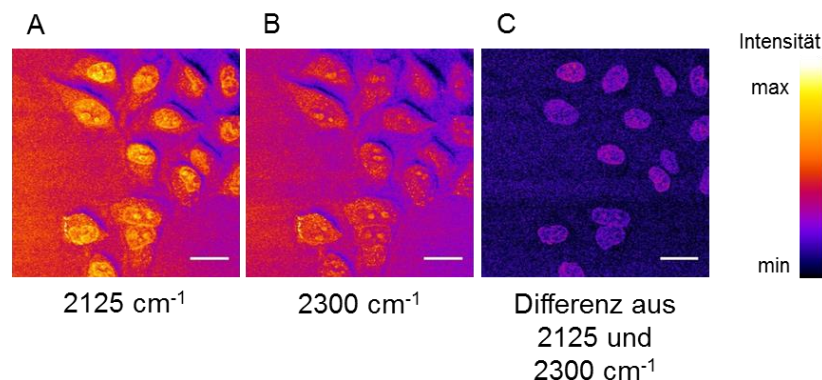


Abbildung 94: SRS-Bilder von mit 4 % (w/v)-iger PFA-Lösung fixierten HeLa S3 Zellen, die für 17 Stunden mit 100 μM EdU behandelt wurden. Aufgenommen wurden Bilder bei 2125 cm^{-1} (A) und 2300 cm^{-1} (B). Dargestellt ist zusätzlich die Differenz aus beiden Bildern (C). Die Bilder wurden dabei mit einer Laserleistung von 40 mW (Stokes) und 62 mW (Pump) auf der Probe aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug hier 53,22 μs . Scale Bar: 25 μm

Wie in Abbildung 94 ersichtlich, ist auch in fixierten, mit EdU behandelten HeLa S3 Zellen ein Alkinsignal im Zellkern zu erkennen. Das Fixieren der Zellen durch PFA führt damit zu keiner Abschwächung des Signals oder zur Destruktion der Alkinfunktionalität.

Weiterhin wurde der Einbau von EdU nach unterschiedlichen Behandlungszeiten der HeLa S3 Zellen beobachtet. Hierfür wurden die Zellen für vier, fünf, acht

und 25 Stunden mit 100 μM EdU behandelt und lebend vermessen. Dargestellt sind in Abbildung 95 jeweils die Differenzen der Bilder von 2125 cm^{-1} und 2300 cm^{-1} .

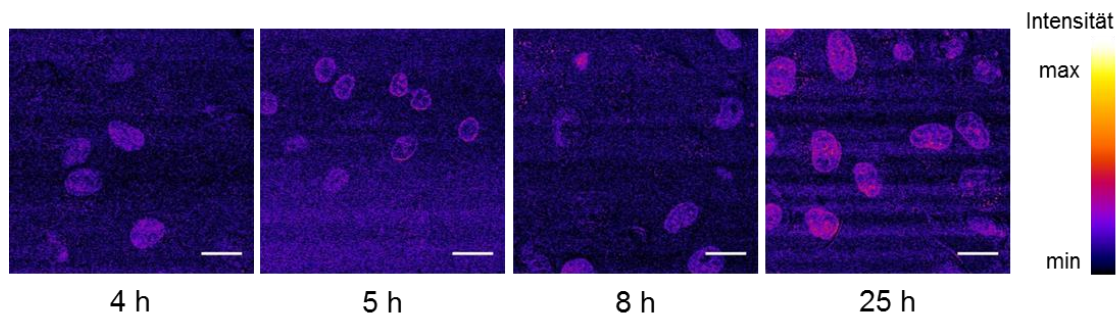


Abbildung 95: Gezeigt sind HeLa S3 Zellen, die für vier, fünf, acht und 25 Stunden mit 100 μM EdU behandelt wurden. Nach der Behandlungszeit mit dem Alkin-modifizierten Nukleosid wurden direkt die SRS-Bilder aufgenommen. Dargestellt sind hier jeweils die Differenzen der Bilder von 2125 cm^{-1} und 2300 cm^{-1} . Diese wurden dabei mit einer Laserleistung von 44 mW (Stokes) und 65 mW (Pump) auf der Probe aufgenommen. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug hier 53,22 μs . Scale Bar: 25 μm

Der Einbau von EdU in HeLa S3 Zellen unterscheidet sich nach einer Behandlung der Zellen mit dem Alkin-funktionalisierten DNA-Nukleosid von vier, fünf bzw. acht Stunden nicht merklich. Wie in Abbildung 95 ersichtlich, ist jedoch das SRS-Signal des Alkins nach 25 Stunden Behandlungszeit deutlich höher als in den drei Bildern mit den kürzeren Behandlungszeiten.

Die Alkin-Schwingung des Malonylierungsreporters MalAMyne, der zur Untersuchung der Malonylierung verwendet wurde und in Kapitel 3 ausführlich beschrieben ist, konnte ebenfalls mittels SRS-Mikroskopie detektiert werden. Damit konnten in Zellen Bereiche visualisiert werden, wo sich Proteine befanden, die mit dem Reporter modifiziert waren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte dies in Kapitel 3 bereits gezeigt werden. An dieser Stelle ist nun die Visualisierung ohne einen Fluoreszenzfarbstoff möglich. Bild A in Abbildung 96 zeigt das Signal der C-H-Schwingung einer Methylgruppe, womit die Zellstrukturen ersichtlich werden. Bild B entstand aus der Differenz der Bilder bei 2125 cm^{-1} und 2300 cm^{-1} . Wie auch bei EdU befand sich das Maximum des Ramansignals der Alkinschwingung beim MalAMyne bei 2125 cm^{-1} im Gegensatz zur Lösung, bei der es bei 2132 cm^{-1} lag. Die Darstellung der Differenz aus Bildern bei resonanter und nicht-resonanter Anregung zeigt deutlich ein Signal von MalAMyne in den Zellen. Diese wurden hier mit 2 mM MalAMyne für vier Stunden behandelt und anschließend lebend vermessen. Sowohl die Konzentration als auch die Behandlungszeit wurden so gewählt, dass möglichst viel MalAMyne in den Zellen vorhanden war. Die Toxizität des Reporters, die bereits in Kapitel 3.3 diskutiert wurde, ist den Zellen in den Bildern deutlich anzusehen. Bereits für eine Behandlungszeit von drei Stunden sinkt die metabolische Aktivität der Zel-

len deutlich unter 100 %. Die Wahl der Konzentration und der Behandlungszeit galt hier der Signaloptimierung.

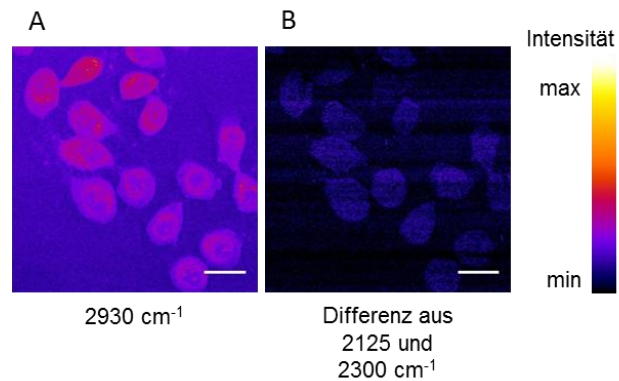


Abbildung 96: SRS-Bilder von lebenden HeLa S3 Zellen, die für vier Stunden mit 2 mM MalAMyne behandelt wurden. Dargestellt sind SRS-Bilder bei 2930 cm^{-1} (A) und die Differenz der Bilder von 2125 cm^{-1} und 2300 cm^{-1} (B). Bei 2930 cm^{-1} wurde mit einer Laserleistung von 9 mW (Stokes) und 15 mW (Pump) auf der Probe gearbeitet, bei den beiden anderen Bildern mit 30 mW (Stokes) und 50 mW (Pump) auf der Probe. Die Belichtungszeit pro Pixel betrug hier $53,22 \mu\text{s}$. Scale Bar: $25 \mu\text{m}$

Kurzzusammenfassung:

Zu Beginn dieses Kapitels 4 wurde zunächst EU an verschiedenen Zelllinien auf seine Toxizität und den Einbau in die RNA mittels Fluoreszenzmikroskopie getestet. Weitere Nucleoside wurden anschließend auf HeLa Zellen angewandt. Der beste Einbau konnte jedoch mit EU detektiert werden. Aus diesem Grund sollte EU für die SRS-Mikroskopie verwendet werden. Vorarbeiten zum Test der SRS-Mikroskopie an einem zellulären System wurden an HepG2 Zellen durchgeführt.

Die Visualisierung von LDs an den beiden verwendeten Geräten, dem in der Arbeitsgruppe selbst erbauten Aufbau und dem kommerziellen TCS SP8, konnte anhand der C-H-Streckschwingungen gesättigter und ungesättigter C-C-Bindungen in Fettsäuren erfolgen. Diese wurden dem Zellmedium vor der Mikroskopie hinzugesetzt. Ebenso konnte dieses System zum Kennenlernen des TCS SP8 hervorragend verwendet werden.

Die Untersuchung von Zellen, die mit Alkin-funktionalisierten Reporter-molekülen behandelt wurden, war jedoch nur mit dem kommerziellen System möglich, da hierfür Leistungen von Pump- und Stokes-Laser von mehr als je 10 mW auf der Probe von Nöten waren. Nicht möglich war, auch nach wiederholten Versuchen, die intrazelluläre Detektion von EU bzw. des Ramansignals dessen Alkinschwingung. Trotz der Akkumulation von EU in den Nucleoli, was in Kapitel 4.3 mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden konnte, der Verwendung von Leistungen von mehr als 60 mW für sowohl Pump- als auch Stokes-Laser, einer Belichtungszeit pro Pixel von etwa 100 μ s und auch einer Behandlung der Zellen von mehr als 24 Stunden mit 2 mM EU war keine Visualisierung dessen möglich.^[34] Stattdessen wurden die Zellen unter diesen Parametern zerstört. Das Alkin-funktionalisierte DNA-Nucleosid EdU dagegen konnte, wie in diesem Kapitel gezeigt, mittels seines Ramansignals der Alkinschwingung in Zellen visualisiert werden. Ebenso, eher unerwartet, gelang dies mit dem Malonylierungsreporter MalAMyne. Beide Reporter, die detektiert werden konnten, liegen in der Zelle nicht so stark akkumuliert vor wie EU in den Nucleoli. Dass die Visualisierung eines Reporters möglich ist, hängt somit ganz von diesem selbst und dessen kovalenten Einbau in der Zelle ab.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die mikroskopische Beobachtung kleiner Biomoleküle in Zellen. Unter Verwendung dieser sogenannten Reportermoleküle konnten Biopolymere wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren in Zellen sichtbar gemacht werden. Hierfür konnten verschiedene Techniken angewandt werden, mit deren Hilfe schließlich die Untersuchung biochemischer Prozesse intrazellulär verfolgt werden können. Fluoreszenz- und Raman-Mikroskopie waren dabei die Techniken der Wahl. In beiden Fällen wurden hauptsächlich Alkin-funktionalisierte biochemische Reporter verwendet. Die Markierung eines kleinen Biomoleküls mit einem Alkin ist ideal. Die zusätzliche C-C-Dreifachbindung ist eine kleine Modifikation, die sich damit kaum auf biochemische Prozesse auswirkt, und von Natur aus im zellulären Umfeld nicht aufzufinden ist. Für die Anwendung eines Alkins in der Fluoreszenz-Mikroskopie wurde dieses in der CuAAC mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft, der schließlich zur Visualisierung verwendet wurde.

Zunächst wurde die post-translationale Modifikation Malonylierung untersucht. Bao und Kollegen synthetisierten bereits 2013 einen Reporter (MalAMyne) zur Untersuchung dieser.^[26] Auch in dieser Arbeit stand zu Beginn die Reportersynthese. Neben MalAMyne und dem nicht-alkinierten Pendant dazu wurde ebenfalls ein gemischter Ester synthetisiert. Viabilitätstests mittels eines Alamar Blue Assays gaben zunächst Aufschluss über die Viabilität der Zellen nach der Behandlung mit den Reportern. Nach einer Behandlungszeit von drei Stunden sank diese maximal bis auf die Hälfte ab. Nach einer Stunde jedoch erhöhte sie sich sogar, was eine höhere metabolische Aktivität der Zelle anzeigt. Dies wurde mit einer möglichen Abwehrreaktion gegen die fremden Biomoleküle erklärt. Mit den Viabilitätsdaten der Reporter von HEK293T und HeLa S3 Zellen in der Hand wurden diese in diesen beiden Zelllinien mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihren Einbau getestet. Wie zu erwarten führte der nicht mit einem Alkin modifizierte Reporter zu keinem Signal in den Zellen, womit eine unspezifische Färbung der anderen Reporter ausgeschlossen werden kann. Unter diesen erwies sich MalAMyne als effizientester. Sein Fluoreszenzsignal wurde dabei am stärksten im Kern und in den Nukleoli der Zelle detektiert, jedoch ebenfalls im Zytoplasma. Zur Bestätigung der kovalenten Anknüpfung des Reporters an Proteine wurden MalAMyne und ebenso der gemischte Ester mMalAMyne nach der Lyse der behandelten Zellen und der Fällung und Auftrennung der Proteine über Gelelektrophorese mittels Auslesen von Fluoreszenz auf Western Blots detektiert. Die Grundvoraussetzungen der kovalenten Anknüpfung des Reporters zur Untersuchung der Malonylierung waren damit gegeben. Es folgten biochemische Untersuchungen zur Enzymkatalyse der Malonylierung. Experimen-

te zur Überexpression von Sirtuin 5, dem Enzym, welches die Demalonylierung katalysiert, genauso wie die Zugabe von Suramin, einem Inhibitor der Demalonylase, sollten Einblicke in diesen enzymatischen Prozess geben.^{[60],[26]} Trotz Überexpression von Sirtuin 5 konnte jedoch kein verringertes Malonylierungslevel beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass MalAMyne kein Substrat von Sirtuin 5 ist und damit auf diesem Wege die Demalonylierung nicht weiter untersucht werden kann. Auch der Inhibitor Suramin zeigte keine Auswirkungen auf das Malonylierungslevel. Ein möglicher Grund hierfür ist jedoch dessen Toxizität und damit der Einfluss auf mehrere biochemische Prozesse in der Zelle. Kumar und Kollegen beschreiben die Wirkung von Suramin auf die Demalonylierung zudem als „unbekannt“.^[60] Ebenso sind hier weitere mögliche Inhibitoren wie Resveratrol und Nicotinamid genannt. Ersteres inhibiert wie Suramin die Desuccinylierung und könnte damit bei weiteren Studien im Hinblick auf die weitere Untersuchung der Demalonylierung als Inhibitor getestet werden. Letzteres wird bei der Demalonylierung freigesetzt und könnte durch Zugabe zur Zelle das Gleichgewicht auf die Seite der Malonylierung verschieben und damit die Demalonylierung zurückdrängen.^[60]

Da bis dato kein Enzym publiziert wurde, welches die Malonylierung selbst katalysiert und Studien von Kulkarni *et al.* Argumente für die nicht-enzymatische Acylierung beleuchten,^[70] wurden Experimente zum enzymatischen Verlauf der Malonylierung mit Hilfe von MalAMyne durchgeführt. Im Falle einer enzymatischen Kontrolle des Prozesses dürfte MalAMyne nach der Denaturierung der Zellproben nicht auf Proteine übertragen werden. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. MalAMyne wird in denaturierten Proben sogar stärker eingebaut, womit die Malonylierung, zumindest mit Hilfe von MalAMyne, nicht-enzymatisch verläuft. Möglicherweise werden durch die Denaturierung der Proben nicht-zugängliche Stellen durch die Zerstörung der Tertiärstruktur freigelegt, wodurch MalAMyne auf weitere Stellen an Proteinen übertragen werden kann.

Proteine, die bereits als malonyliert galten, wie etwa GAPDH und p53, sollten nun mit GFP modifiziert werden. Hierfür wurden HEK293T nach der Calcium-Phosphat-Transfektion transfiziert.^[96] Dabei kamen die Proteine EGFP selbst, p53-EGFP, EGFP-GAPDH und GAPDH-EGFP mit GFP am N- bzw. C-Terminus zum Einsatz. Nach der Behandlung mit MalAMyne und der IP der EGFP-gebundenen Proteine konnte direkt festgestellt werden, dass auch EGFP selbst mit MalAMyne modifiziert ist. Dadurch war es nicht möglich, die proteinspezifische Malonylierung mittels MalAMyne und mit Hilfe von FRET-Mikroskopie zu untersuchen.

In diesem ersten Teil wurde die Fluoreszenz-Mikroskopie zur biochemischen Untersuchung der Malonylierung mittels MalAMyne verwendet. Ob ein anderer Reporter als MalAMyne proteinspezifische Aussage zur Malonylierung liefern kann, ist fraglich. Dieser würde sich hauptsächlich in der Schutzgruppe vom hier verwendeten Reporter unterscheiden. Andere Schutzgruppen steuern lediglich die Membrangängigkeit und wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits untersucht. Eine Veränderung der Funktionalität zur Visualisierung, wie hier die

Alkinmodifikation verwendet wurde, wäre denkbar. So könnte anstatt des Alkins ein Azid angebracht werden und der Reporter ebenfalls in der CuAAC mit einem Fluoreszenzfarbstoff kovalent verknüpft werden. Ebenso möglich wären Cycloalkene, die anschließend in einer Diels-Alder-Reaktion an einen Tetrazin-funktionalisierten Farbstoff angeknüpft werden können.^[87] Diese Reporter müssten dann ebenfalls zunächst synthetisiert, auf ihre Toxizität getestet, die besten Bedingungen von Konzentration und Inkubationszeit gefunden werden und schließlich Experimente durchgeführt werden, die zeigen, ob sie ebenfalls in einer nicht-enzymatischen Reaktion auf die Proteine übertragen werden. Zudem muss getestet werden, ob diese Substrate von Sirtuin 5 sind.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der proteinspezifischen Malonylierung ist eventuell mit anderen Fusionsproteinen möglich. Anstatt EGFP könnte an dessen Stelle ein anderes fluoreszierendes Protein wie etwa EYFP verwendet werden. Dieses bringt den Nachteil mit sich, dass es säurelabil ist und 50 % seiner Fluoreszenz bereits bei pH 6,5 verliert. Zudem zeigt es eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Chloridionen. Durch die Substitution einer Aminosäure jedoch können diese Nachteile überwunden werden. Dies ist durch das gelb-fluoreszierende Protein Citrine gegeben. Dessen Absorptions- bzw. Emissionsmaximum liegt bei 516 nm bzw. 529 nm, wodurch als Partner zur Verwendung in FRET-Messungen ebenso Sulfo-Cyanin 3 verwendet werden kann.^[102] Soll ein gelb-fluoreszierendes Protein verwendet werden, müssen zuerst jedoch die jeweiligen Konstrukte der Fusionsproteine mit den bereits als malonyliert bekannten Proteinen dargestellt werden.

Da in dieser Arbeit jedoch ebenso gezeigt wurde, dass die Übertragung von MalAMyne nicht-enzymatisch erfolgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass damit auch dieses fluoreszierende Protein modifiziert wird. Aus diesem Grund sollte nach den Arbeiten der Klonierung dies zunächst getestet werden, um sicher zu gehen, dass weitere Arbeiten überhaupt lohnenswert sind. Werden EYFP-Derivate laut IP nicht mit dem Malonylierungsreporter modifiziert, sind proteinspezifische Studien damit möglich.

Was jedoch möglich war, war die Detektion des Malonylierungsreporters mittels SRS-Mikroskopie anhand der Alkin-Streckschwinung.

Aufgrund der geringen Sensitivität der Technik war der erste Schritt, weitere Alkin-funktionalisierte Verbindungen zu untersuchen. Da vor allem die RNA visualisiert werden sollte, wurde zuerst eingehendst auf Viabilität und Einbau des RNA-Nukleosid EU getestet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte sein Einbau in drei verschiedenen Säugerzelllinien konzentrations- und zeitabhängig gezeigt werden. Weitere Nukleoside, EDDA, F-*ara*-EdU, N6-PA, 2-EA, O3'-PA und O2'-PA, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie getestet. Unter all diesen stellte sich EU als das mit dem intensivsten Signal heraus, zudem liegt das Nukleosid als RNA-Nukleosid akkumuliert in den Nukleoli vor, was dem SRS-Signal zu Gute kommen sollte. Weiterhin wurden die in der Arbeitsgruppe selbst-erbauten Setups für CARS und SRS vor den Experimenten mit Alkin-funktionalisierten Reportern für Messungen an HepG2 Zellen verwendet, in de-

nen die Bildung von LDs durch die Zugabe vor allem in ihrer Sättigung verschiedener Fettsäuren hervorgerufen wurde. Spektren, die an einem konfokalen Ramanmikroskop aufgenommen wurden, halfen dabei, die Lage der interessanten Banden genauer zu kennen. Zur Detektion der Alkinverbindungen in lebenden als auch in fixierten Zellen waren jedoch Leistungen von mehr als 40 mW von sowohl Pump- als auch Stokes-Laser auf der Probe von Nöten. Diese konnten mit dem kommerziellen Gerät TCS SP8 erreicht werden. Die Visualisierung von Reporter-molekülen anhand deren Alkin-Streckschwingung gelang mit EdU und dem Malonylierungsreporter MalAMyne in lebenden als auch fixierten HeLa S3 Zellen. Das RNA-Nukleosid EU konnte wider Erwarten, trotz eines starken Fluoreszenzsignals, in Zellen nicht detektiert werden. Für die Aufnahme der jeweiligen SRS-Bilder waren Belichtungszeit pro Pixel, Laserleistung, smart Gain und smart Offset genau aufeinander abgestimmt.

Noch höhere Konzentrationen an EU zu verwenden als bereits geschehen, würde die Viabilität der Zellen stark herabsenken (in Kapitel 4.2 diskutiert) und sich in keinem biologisch relevanten Bereich mehr bewegen. EdU wurde in einer Konzentration von 100 μM auf die Zellen gegeben und konnte detektiert werden, bei EU war trotz 2 mM kein Signal sichtbar. Die beiden Konzentrationen der Nukleoside, ebenso wie die jeweiligen Inkubationszeiten, sollten an dieser Stelle jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden, da das eine von den DNA-Polymerasen, das andere von den RNA-Polymerasen als Substrat verwendet wird.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, das Potential der SRS-Mikroskopie. Die Möglichkeit, Reporter-moleküle anhand der Alkin-Streckschwingung zu detektieren, ebnet den Weg zur Detektion weiterer als die hier verwendeten Alkin-Reporter und damit auch von biochemischen Prozessen. Wichtig ist es, die Reporter und deren Einbau im Vorfeld genauestens zu untersuchen und deren Intensität des Einbaus im zellulären Umfeld sicherzustellen. Nicht jeder Reporter zeigt eine genügende Akkumulation bzw. einen genügend effektiven Einbau, um detektiert werden zu können.

Zwei aktuelle Beispiele, bei denen ein Alkin in der SRS-Mikroskopie Anwendung finden, sind die Arbeiten von Min und Kollegen und Tipping und Kollegen. Erstere verwendeten ein Dialkin als Sensor der H_2S -Produktion in den Mitochondrien, letztere konnten mittels eines Dialkins und einem weiteren Reporter wie EdU in derselben Probe zwei Reporter-moleküle anhand deren verschiedenen Resonanzen der Alkinschwingungen visualisieren.^{[103],[84]}

Die Detektion zweier Moleküle könnte auch am hier verwendeten TCS SP8 eine Anwendung finden. Dabei könnten etwa gleichzeitig sowohl LDs als auch die DNA mittels EdU visualisiert werden oder die Kerne, außer den Nukleoli, durch EdU sichtbar gemacht werden und gleichzeitig mittels MalAMyne malonylierte Proteine lokalisiert werden.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Eukaryotische Zellen

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Herkunft
HEK293T	menschliche embryonale Nierenzellen	AG Brunner, Universität Konstanz
HeLa	Menschliche Epithelzellen eines Gebärmutterhalstumsors von Henrietta Lacks	AG Scheffner, Universität Konstanz
HeLa S3	Subklon der HeLa Zellen	Christian Jüngst, AG Zumbusch, Universität Konstanz
HepG2	Zellen eines menschlichen Lebertumors eines	Malin Bein, AG Gaich, Universität Konstanz
MCF-7	Brustkrebszellen (Michigan Cancer Foundation-7)	Malin Bein, AG Gaich, Universität Konstanz

6.1.2 Medien, Puffer, Reagenzien, Farbstoffe und Kits

Medien:

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Zelllinien wurden bei -196 °C in Einfriermedium bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco (Katalognummer 41966-029) mit 10 % (v/v) FBS, $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Streptomycin, 100 U mL^{-1} Penicillin und 10 % DMSO aufbewahrt.

Für die Kultivierung von HEK293T, HeLa, HeLa S3 und HepG2 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco (Katalognummer 41966-029) verwendet, wozu 10 % (v/v) FBS, $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ Streptomycin und 100 U mL^{-1} Penicillin zugesetzt wurden.

Puffer:

Folgende Puffer wurden in dieser Arbeit verwendet:

DPBS (1X) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) von Gibco (Katalognummer 14190169) ohne Calcium, ohne Magnesium.

10X PBS, pH 7,4:

1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4 , 5 N NaOH zur pH-Einstellung, in MilliQ

PBS-T:

Material und Methoden

10 % (v/v) 10X PBS, 0,001 % (v/v) Tween20 in MilliQ

Blotto:

2 % (w/v) BSA, 0,05 % (w/v) NaN_3 in PBS-T

10X Elektrophorese Laufpuffer:

10X TGS, Tris/Glycine/SDS Buffer, 10X von Bio-Rad; 250 mM Tris, 1,92 M Glycine, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

10X Blotting Buffer:

10X TG, Tris/Glycine Buffer 10X von Bio-Rad; 250 mM Tris, 1,92 M Glycine, pH 8,3

Sammelgel-Puffer, pH 6,8:

1 M Tris-HCl, pH 6,8 und 0,8 % (w/v) SDS

Trenngel-Puffer, pH 8,8:

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 und 0,4 % (w/v) SDS

4X SDS Probenpuffer nach Lämmli:

100 mM Tris-HCl, pH 6,8 mit 30 % (w/v) Glycerin, 6 % (w/v) SDS, 2,86 M Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Dilution Buffer für Immunopräzipitation:

50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Wash Buffer für Immunopräzipitation:

50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 0,5 % (v/v) Triton X 100

2X HBS-Puffer:

280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 pH 7,1

Lysepuffer für Zelllyse mit DNaseI:

1X Triton-X-100, 1X Proteaseinhibitor, 1X PBS aus 10X PBS mit 300 mM NaCl, 10 U mL^{-1} DNaseI in MilliQ

Lysepuffer für die Zelllyse ohne DNaseI:

Siehe Lysepuffer mit DNaseI; die Menge an DNaseI wird durch MilliQ ersetzt

Reagenzien/Chemikalien:

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien/Chemikalien und der zugehörige Vertreiber

Reagenz/Chemikalie	Vertreiber (Katalognummer)
(+)-Natrium-L-Ascorbat, Bioextra	Sigma
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) ≥ 98 % p.a. ACS	Roth
2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher

5-Ethynyldeoxyuridine	Thermo Fisher (A10044)
5-Ethynyl-uridine (5-EU)	Jena Bioscience (CLK-N002-10)
Acrylamid, Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Roth
Actinomycin D <i>from Streptomyces sp.</i>	Sigma (A1410)
Alamar Blue	Invitrogen (DAL 1100)
Albumin, Fraction V, fatty acid free	Roche
Arachidonsäure, BioReagent	Sigma
Bovine Serum Albumin	Sigma
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Sigma
Chloroform, 99,9 % extra dry, stabilized AcroSeal	Acros Organics
Chloroform-d 99,8 atom% D	Sigma (151823)
Chloroquin	Sigma (C6628)
Clarity™ Western ECL Substrate Luminol Enhancer solution	Bio-Rad
Clarity™ Western ECL Substrate Peroxide solution	Bio-Rad
CuSO ₄	Merck
Deuterium oxide 99,9 atom % D	Sigma (151882)
DMEM	Gibco (41966-029)
DMSO for molecular biology	Sigma
DNAseI ≥2500 units mL ⁻¹	Thermo Fisher (#90083)
DPBS	Gibco (14190-094)
FBS Superior standardized, tested for virus and mycoplasma, tested for endotoxin	Merck (S0615 0167F)
GFP-Trap_A beads	Chromotek (gta-20)
Glycerin	Sigma
HCl AnalaR NORMAPUR	VWR
Hepes ≥ 99,5 % (titration)	Sigma
Hydroxyurea, 98 % powder	Sigma (H8627)
IMM ibidi Mounting Medium	ibidi
KCl, for analysis	Merck
KH ₂ PO ₄	Riedel-deHaën
Linolsäure	Sigma (L2376)
Methanol p.A.	Sigma
Methanol-d4 ≥ 99,8 atom % D	Sigma (151947)
Milchpulver, Blotting grade, pulv. fettarm	Roth
Na ₂ HPO ₄	Sigma
NaCl	VWR
NaN ₃	Sigma

Material und Methoden

NaOH	Fisher Scientific
NH ₄ Cl	Roth
Ölsäure ≥ 99 % (GC)	Sigma (O1008)
Ölsäure-d ₃₄	Sigma
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher (#26616)
Palmitic acid-d ₃₁	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin Streptomycin	Gibco (15140-122)
Polybead® PMMA Clear 1-10 µm, Micro-particles (5 % Solids-Latex)	Polysciences, Inc
Poly-L-Lysin	Sigma (P4707)
Ponceau S solution, Bioreagent, suitable for electrophoresis, 0,1 % (w/v) in 5 % acetic acid	Sigma
Proteaseinhibitor complete Tablets Mini, EDTA-free, EASYPack	Roche (04693 159001)
PS-Forschungspartikel 3,00 µm, SD = 0,07 µm, 10 % wässr. Suspension	micro particles GmbH
SDS/Natriumlaurylsulfat ≥ 99 %	Roth
Stearic acid	Fluka Analytical
Stearic-d ₃₅ acid	Sigma
Suramin Hexanatriumsalz	abcamBiochemicals (ab120422)
TEMED 99 % p. a. für die Elektrophorese	Roth
Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amine (THPTA)	Sigma
Tris, Trizma base ≥ 99,9 % (titration) crystalline	Sigma
Triton X-100	Roth
TrypLE Express (1X)	Gibco (12604-013)
Tween20	Roth
α-Linolensäure ≥ 99 %	Sigma

Farbstoffe:

Sulfo-Cyanine-3-azide	Lumiprobe (B1330)
-----------------------	-------------------

Kits:

Click-iT Cell Reaction Buffer Kit	Invitrogen (C102609)
-----------------------------------	----------------------

Nicht-kommerziell erworbene Nukleoside:

Tabelle 3: In der AG Marx synthetisierte Nukleoside

7-Ethynyl-7-deazadesoxyadenosin (EDDA)	Synthetisiert von Jana Balintová, AG Marx, Universität Konstanz
(2'S)-2'-desoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridin (F-ara-EdU)	Synthetisiert von Jana Balintová, AG Marx, Universität Konstanz
N6-Propargyladenosin (N6-PA)	Synthetisiert von Yizhi Yuan, AG Marx, Universität Konstanz
2-Ethynyladenosin (2-EA)	Synthetisiert von Yizhi Yuan, AG Marx, Universität Konstanz
O3'-Propargyladenosin (O3'-PA)	Synthetisiert von Yizhi Yuan, AG Marx, Universität Konstanz
O2'-Propargyladenosin (O2'-PA)	Synthetisiert von Yizhi Yuan, AG Marx, Universität Konstanz

6.1.3 Antikörper**Primärantikörper:**

Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper

Antikörper	Quelle
Anti-GFP, Living Colors A. v. Monoclonal Antibody (JL-8), Maus	Clontech (632381)
Pan anti-malonyllsine Antibody, Hase	PTM Biolabs (PTM-901)
SIRT5 Polyclonal Antibody, Hase	Thermo Fisher (PA5-13224)

Die zugehörigen Sekundärantikörper sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Sekundärantikörper:

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper

Anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat	Jackson ImmunoResearch (115-035-003)
Anti-Hase IgG, Peroxidase Antibody produced in goat	Sigma (A0545)

6.1.4 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle
EV	AG Hauck Universität Konstanz
EGFP-NT	AG Hauck Universität Konstanz
p53-EGFP	AG Bürkle Universität Konstanz
EGFP-GAPDH	Kloniert von Franziska Doll, AG Zumbusch

	Universität Konstanz
GAPDH-EGFP	Kloniert von Franziska Doll, AG Zumbusch Universität Konstanz
SIRT5_HA	Addgene(#24483)

Genauere Informationen zu den Plasmiden und Vektoren finden sich in der Stammsammlung der AG Zumbusch.

6.1.5 Geräte

- Elektrophorese-Kammern: Mini Protean Tetra System (Bio-Rad)
- Fluoreszenz-Auslesegerät für Gele und Western Blots: Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences) (AG Deuerling Universität Konstanz)
- Inkubator für die Zellkultur (Binder)
- Konfokale Mikroskope: TCS SP5 und TCS SP8 (Leica)
- Lumineszenz-Auslesegerät für Gele und Western Blots: ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad)
- Lyophylle Alpha 2-4 LDplus (Christ) (AG Wittmann Universität Konstanz)
- NMR-Spektrometer: Avance III 400 (isa400) und Avance III (ayita400) (Bruker) (NMR Core Facility Universität Konstanz)
- Plattenlesegerät Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek)
- Probenrotator für Überkopfrotation: Rotator SB3 (Stuart)
- Raman-Mikroskop (Olympus)
- Schüttelgeräte: Unimax 1010 (Heidolph) und Gyro rocker SSL3 (Stuart)
- Schüttel-Wasserbad Precision SWB 27 (Thermo Fisher)
- Sterilbänke Herasafe (Heraeus)
- Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Zell-Zählkammer Neubauer Marienfeld (Roth)
- Zentrifugen: Centrifuge 5430 und Centrifuge 5424R (Eppendorf)

6.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Vertreiber
1,5 mL-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Stein Labortechnik
15 mL Centrifuge Tube	Corning

50 mL Self-Standing Centrifuge Tube	Corning
6-Well Cell Culture Cluster	Corning
8-Well Mikroskopiekammern, μ -Slide 8 Well ibitreat	ibidi
96-Well Cell Culture Cluster	Corning
Costar 50 mL Reagent Reservoir	Corning
Costar Stripetten 2, 5, 10, 25, 50 mL	Corning
Coverslip Rd 1" (25 mm) Durchmesser	Electron Microscopy Sciences
Cryogenic Vials	Corning
Deckgläser 18 mm Dia. Stärke1, rund 0,13 mm - 0,16 mm	T H. Geyer
DIAFIL PA Spritzenfilter 0,2 μ m	Graphic Controls
Mikroskopie-Schalen, μ -Dish 35 mm, high, glass bottom ibitreat	ibidi
Mikroskopie-Schalen, μ -Dish 35 mm, high, glass bottom, Grid-50	ibidi
Objekträger ca. 76 mm x 26 mm	Roth
Pasteurpipetten	WU Mainz
Petrischalen 100 mm x 20 mm Style Dish Cell Culture Treated	Corning
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 μ L, 20 μ L	Eppendorf, Sarstedt
Pipettenspitzen 1000 μ L	Eppendorf, Axygen Scientific
Quartz Cover-Slip ~0,2 mm thick	Electron Microscopy Sciences
Secure-Seal Imaging Spacers 1 mm - 9 mm Durchmesser ID x 0,12 mm Depth	Grace Bio-Labs
Spritzen 1 mL NORM-JECT®	Henke Sass Wolf
Spritzen 10 mL (12 mL) NORM-JECT®	Henke Sass Wolf
Spritzen 2 mL (3 mL) NORM-JECT®	Henke Sass Wolf
Sterican® Kanülen 0,80 mm x 120 mm	Braun
Sterican® Kanülen 0,90 mm x 40 mm	Braun
Sterican® Kanülen, 0,60 mm x 80 mm	Braun

6.1.7 Chemikalien zur Synthese

Tabelle 8: Chemikalien zur Synthese

Chemikalie	Vertreiber
Acetonitrile anhydrous, 99,8 %	Sigma
Dimethylpropargylmalonat \geq 95,0 % (GC)	Sigma
Essigsäurebromomethylester 95 %	Acros Organics
Essigsäureethylester, technisch	Bilgram
HCl AnalaR NORMAPUR	VWR

Malonsäure, ReagentPlus 99 %	Sigma
MgSO ₄ x H ₂ O ≥ 99 % getrocknet, reinst	Roth
N,N-Diisopropylethylamin 99,5 %, biotech grade	Sigma
NaCl	VWR
NaOH	Fisher Scientific
Natriumhydrid 57-63 % oil dispersion	Alfa Aesar
Petrolether, technisch	Bilgram
Propargylbromid solution purum, ~80% in Toluol	Sigma
Tetrahydrofuran dried	Merck

6.1.8 Software

- ChemBioOffice 2014: ChemBioDraw Ultra 14.0 (Perkin Elmer)
- Endnote: Endnote X6 (Clarivate Analytics, ehemals Thomson Reuters)
- GraphPad Software: GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.)
- ImageJ: ImageJ1 und (Fiji Is Just) ImageJ2 (National Instruments of Health)
- ImageLab Software Version 5.2.1 (Bio-Rad)
- ImageLab Software: ImageLab Software Version 5.2.1 (Bio-Rad)
- Leica LAS AP: LAS AF Lite 2.6.3 build 8173 und LAS X 3.0.2.16120 (Leica Microsystems CMS GmbH)
- MatLab: MATLAB R2016 (MathWorks)
- MestReNova: MestReNova 8.1.0 (Mestrelab Research)
- Microsoft Office: Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation)
- OriginPro: OriginPro 8G und Origin 2018b (OriginLab)
- S&I Trivista: S&I VistaControl V4.1 Build 12565 und VistaControlBasic V4.2 Build 12588

6.2 Methoden

6.2.1 Zellkultur

HeLa, HeLa S3, HEK293T-Zellen wie auch HepG2-Zellen wurden in DMEM, welchem 10 % FBS und 100 U mL^{-1} Penicillin und $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Streptomycin zugesetzt wurden, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. MCF-7 Zellen wurden ebenso in DMEM mit denselben Additiven kultiviert, jedoch alle vier bis sechs Tage passagiert. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen negativ auf Mycoplasmen getestet.

6.2.2 Viabilität

Zur Toxizitätsbestimmung wurde ein sogenannter Alamar Blue Assay verwendet. Alamar Blue enthält Resazurin, einen nicht-fluoreszierenden Farbstoff, der von Enzymen in den Mitochondrien zu Resorufin, einem Fluoreszenzfarbstoff, reduziert wird. Dies geschieht jedoch nur in metabolisch aktiven Zellen. Anhand der Fluoreszenzintensität kann schließlich eine Aussage über die Viabilität der Zellen getroffen werden.^[94] Das Auslesen der Fluoreszenz wurde an einem Synergy HT Multi-Detection Mikroplattenlesegerät der Firma BioTek vorgenommen. Hierbei wurde bei 530 nm angeregt und die Emission bei 590 nm detektiert (Filter: Anregung 530/25, Emission 590/35). Viabilitätstests zur Bestimmung der Toxizität von 5-EU wurden an HEK293T, HeLa und MCF-7 Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und 18 h später für sechs oder 24 h mit dem Nukleosid behandelt. Für die Behandlung für sechs h wurden 15000 Zellen pro Well, für 24 h 10000 Zellen pro Well ausgesät. Toxizitätstests zu EDDA wurden an HEK293T und HeLa Zellen für sechs oder 24 h durchgeführt, wofür ebenfalls 15000 bzw. 10000 Zellen pro Well ausgesät wurden. Die Toxizität von F-*ara*-EdU wurde über sechs und 24 h an HEK293T und HeLa Zellen und ebenso 72 h an HeLa Zellen getestet. Die Experimente zu sechs und 24 h erfolgten wie oben. Für die Behandlung mit Nukleosid für 72 h wurden 5000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 18 h erfolgte die Behandlung mit Nukleosid. Vor dem Auslesen der Fluoreszenz wurde für eineinhalb Stunden Alamar Blue zu den Zellen gegeben (33,3 % (v/v) in DPBS). Zur Bestimmung der Toxizität der Malonylierungsreporter wurden 15000 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und 18 h später mit dem jeweiligen Reporter für eine Stunde bzw. drei Stunden behandelt. Die folgende Behandlung mit Alamar Blue (33,3 % (v/v) in DPBS) erfolgte für eine Stunde.

Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Office (Excel) und die Darstellung der Viabilitätsdaten mittels der GraphPad Prism Software.

6.2.3 Behandlung mit Malonylierungsreportern

18 h vor der Behandlung der HEK293T und HeLa S3 Zellen wurden 8-Well Mikroskopiekammern (μ -Slide 8 well ibidi) mit Poly-L-Lysin (20 % (v/v) in MilliQ) behandelt und für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ belassen. Nach Waschen mit DPBS wurden 50000 Zellen pro Well in je 200 μL DMEM ausgesät. Zur Behandlung

dieser wurden die Reporter in DMSO gelöst ($c = 100 \text{ mM}$) und in den jeweiligen Konzentrationen in Medium verdünnt. Um ein optimales Lösungsverhalten zu erreichen, wurden die Lösungen vor der Behandlung der Zellen für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ belassen und im Ultraschallbad durchmischt. Anschließend wurde das Medium der Zellen durch Reporter-Medium ersetzt und je nach Experiment unterschiedlich lange bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5 \text{ } \%$ CO_2 auf den Zellen belassen. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden diese mit $4 \text{ } \%$ (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 50 mM NH_4Cl -Lösung in DPBS für zwei mal zwei Minuten behandelt. Für HEK293T und HeLa S3 Zellen wurde identisch vorgegangen. Es folgte das Färben der Zellen wie in Abschnitt 6.2.6 beschrieben.

Für die SRS-Mikroskopie wurden Mikroskopieschalen mit Glasboden (μ -Dish 35 mm, high, glass bottom, Grid-50 ibidi) verwendet. Nach der Behandlung dieser mit Poly-L-Lysin ($20 \text{ } \%$ (v/v) in MilliQ) für eine Stunde bei 37°C wurden nach einmaligem Waschen mit DPBS 50000 HeLa S3 Zellen pro Schale in je 2 mL DMEM ausgesät. Am folgenden Tag wurden diese für 4 h mit 2 mM MalAMyne behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden diese durch die Behandlung mit $4 \text{ } \%$ (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS für 20 min fixiert oder direkt lebend vermessen.

6.2.4 Behandlung mit Nukleosiden

Behandlung mit EU:

Die Fluoreszenz-Experimente mit EU erfolgten an HEK293T, HeLa und MCF-7 Zellen. Einen Tag vor dem eigentlichen Experiment wurden jeweils vor dem Aussäen der Zellen 8-Well Mikroskopiekammern (μ -Slide 8-well ibidi) mit Poly-L-Lysin ($20 \text{ } \%$ (v/v) in MilliQ) behandelt und für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde einmal mit DPBS gewaschen und 50000 Zellen pro Well in $200 \text{ } \mu\text{L}$ DMEM ausgesät. Zum Test verschiedener Nukleosidkonzentrationen wurden die Zellen am folgenden Tag für eine bestimmte Zeit (siehe Abschnitt 2.2.1) bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5 \text{ } \%$ CO_2 mit verschiedenen Nukleosidkonzentrationen behandelt. Dabei wurde das Medium entfernt und Medium mit unterschiedlichen Reporterkonzentrationen auf die Zellen gegeben (EU-Stocklösung mit 500 mM in DMSO). Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte dann das Fixieren der Zellen mit $4 \text{ } \%$ (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS für 20 min bei Raumtemperatur und die anschließende Behandlung mit 50 mM NH_4Cl -Lösung in DPBS für zwei mal zwei Minuten. Die Behandlung für unterschiedliche Zeiten erfolgte analog mit je einer Konzentration. Zum Abbautest des Nukleosids wurde ebenso vorgegangen und die Zellen für eine bestimmte Zeit mit dem Reporter behandelt. Es folgte ein Mediumwechsel zu Medium ohne Nukleosid für unterschiedliche Dauern. Für die Experimente mit Hydroxyurea wurden zusätzlich zu EU unterschiedliche Mengen Hydroxyurea in das Medium gegeben und die Zellen damit behandelt. Für die Behandlung mit dem Antibiotikum Actinomycin D wurden dem Medium ebenfalls unterschiedliche Mengen an Antibiotikum hinzugesetzt. Das weitere Vorgehen beim Färben der Zellen ist in Abschnitt 6.2.6 beschrieben.

ben. Die Experimente wurden in Anlehnung an die Beschreibungen von Jao *et al.* vorgenommen.^[29]

Für die SRS-Mikroskopie wurden Mikroskopieschalen mit Glasboden (μ -Dish 35 mm, high, glass bottom, Grid-50 ibidi) verwendet. Nach der Behandlung dieser mit Poly-L-Lysin (20 % (v/v) in MilliQ) für eine Stunde bei 37 °C wurden nach einmaligem Waschen mit DPBS 50000 HeLa S3 Zellen pro Schale in je 2 mL DMEM ausgesät. Am folgenden Tag wurden diese für sieben Stunden mit 2 mM EU behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS wurden diese durch die Behandlung mit 4 % (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS für 20 min fixiert.^[34]

Behandlung mit EDDA:

18 h vor der Behandlung mit dem Nukleosid wurden 8-Well-Mikroskopiekammern (μ -Slide 8 Well ibidi) zur Beschichtung für eine Stunde bei 37 °C mit Poly-L-Lysin behandelt (20 % (v/v) in MilliQ) und anschließend nach einmaligem Waschen mit DPBS 50000 Zellen (HEK293T bzw. HeLa) pro Well in 200 μ L Medium ausgesät. Zur Behandlung der Zellen mit Nukleosid wurde dieses in DMSO (500 mM) gelöst und schließlich mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Analog wie bei EU wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen, unterschiedlich lange oder nach der Behandlung mit Reporter-Medium unterschiedlich lange mit DMEM ohne Zusätze behandelt. Das Fixieren der Zellen geschah analog zu EU.

Behandlung mit F-*ara*-EdU:

Eine Stocklösung von 250 mM in DMSO wurde präpariert. Für die Experimente mit F-*ara*-EdU wurde analog zu EDDA vorgegangen und an HEK293T und HeLa Zellen durchgeführt.

Behandlung mit N6-PA, 2-EA, O3'-PA, O2'-PA:

Es wurden aufgrund der Löslichkeit folgende Stocklösungen in DMSO präpariert: c (N6-PA) = 31 mM, c (O3'-PA) = 125 mM, c (O2'-PA) = 79 mM, c (2-EA) = 55 mM

18 h vor der Behandlung der HeLa Zellen mit Nukleosid wurden 8-Well-Mikroskopiekammern (μ -Slide 8 Well, ibidi) mit Poly-L-Lysin (20 % (v/v) in MilliQ) für eine Stunde bei 37°C beschichtet. Anschließend wurden 50000 Zellen pro Well in DMEM ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die modifizierten Nukleoside wurden mit Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt und die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen für sieben Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ damit behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS erfolgte das Fixieren mit 4 % (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS für 20 min bei Raumtemperatur. Zum Quenchen der PFA-Lösung wurde zweimal zwei Minuten mit 50 mM NH₄Cl-Lösung (in DPBS) behandelt.

Behandlung mit EdU:

Für die SRS-Mikroskopie wurden HeLa S3 Zellen mit EdU behandelt. Hierzu wurden Mikroskopieschalen mit Glasboden (μ -Dish 35 mm, high, glass bottom, Grid-50 ibidi) zur Beschichtung für eine Stunde bei 37 °C mit Poly-L-Lysin (20 % (v/v) in MilliQ) belassen und nach einmaligem Waschen mit DPBS 50000 Zellen pro Schale in je 2 mL DMEM ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium zu FBS-freiem Medium getauscht und die Zellen für 24 Stunden darin belassen, um diese in ihrem Zellzyklus zu synchronisieren. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit 100 μ M EdU zwischen vier Stunden und 25 h.^[34] Für die SRS-Mikroskopie wurden sowohl lebende als auch fixierte Proben verwendet. Vor der Messung wurden diese in beiden Fällen zweimal mit DPBS gewaschen und entweder direkt vermessen oder fixiert (vgl. Abschnitt 6.2.4 Behandlung mit EU).

6.2.5 Behandlung mit Fettsäuren

Präparation von mit Fettsäuren angereichertem Medium:

Zur Präparation eines mit Fettsäuren angereichertem Medium mussten die Fettsäuren in Albumin komplexiert werden. Hierfür wurde nach dem Protokoll, das von Listenberger *et al.* entwickelt wurde, vorgegangen.^[97] Hierfür wurde zunächst eine 5 % (w/v)-ige BSA-Lösung vorbereitet. Um das BSA vollständig und unter geringem Aufschäumen zu lösen, wurden zuerst 1,254 g BSA (Fettsäure-frei) in 20 mL DPBS (ohne Calcium und ohne Magnesium) gegeben und für 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Schließlich wurden weitere 5 mL DPBS hinzugegeben. Als zweiter Schritt wurde eine 20 mM Natrium-Fettsäure-Lösung präpariert. Hierfür wurden 3,925 mL MilliQ in einem Falcon vorgelegt und 50 μ L 1 M NaOH hinzugegeben und auf 70 °C unter ständigem Durchmischen im Schüttelgerät erwärmt. Hierzu wurden 0,075 mmol Fettsäure gegeben und 30 min bei 70 °C und 1000 rpm im Schüttelgerät inkubiert. Anschließend wurden viermal je 12,5 μ L 1 M NaOH zu der Mischung hinzu gegeben und für je fünf Minuten bei 70 °C und 1000 rpm im Schüttelgerät inkubiert bis keine zwei Phasen mehr vorhanden waren. Zur Überführung in DMEM wurden 2,9 mL 5 % (w/v)-ige BSA-Lösung vorgelegt und 875 μ L Fettsäure-NaOH-Lösung vorsichtig zugetropft. Die gesamte Menge dieser Lösung wurde schließlich in 40 mL Medium getropft und anschließend über einen 0,2 μ m Filter steril filtriert. Auf diese Art wurden Ölsäure, Linolsäure, α -Linolensäure, Arachidonsäure und Ölsäure-d₃₄ komplexiert. Die Endkonzentration an komplexierter Fettsäure in DMEM betrug dann 400 μ M.

Behandlung von HepG2 Zellen mit in DMEM komplexierten Fettsäuren:

18 h vor Behandlung der HepG2 Zellen wurden Mikroskopieschalen mit Glasboden (μ -Dish 35 mm, high, glass bottom ibitreat ibidi und μ -Dish 35 mm, high, glass bottom, Grid-50 ibidi) zur Beschichtung für eine Stunde bei 37 °C mit Poly-L-Lysin (20 % (v/v) in MilliQ) behandelt. Anschließend wurden 60000 Zellen pro Well in DMEM ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Behand-

lung der Zellen wurde das ursprüngliche Medium abgenommen, durch fettsäurehaltiges Medium (wie oben präpariert) ersetzt und die Zellen damit zwischen 25 und 32 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt bis sich unter dem Durchlichtmikroskop sichtbar LDs gebildet hatten. Zum Fixieren wurden die Zellen zunächst zweimal mit DPBS gewaschen und mit 4 % (w/v)-iger PFA-Lösung in DPBS für 20 min bei Raumtemperatur behandelt. Nach weiteren zwei Mal Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit DPBS überschichtet.

6.2.6 Färben der Zellen

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die bereits fixierten Zellen (für alle Zelllinien identisch) mit Sulfo-Cyanin-3-Azid gefärbt. Hierzu wurden diese zunächst für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton X-100 in DPBS und anschließend für zweimal zwei Minuten mit 3 % (w/v)-ige BSA-Lösung behandelt. Zum Färben der Zellen wurden das Click-iT Cell Reaction Buffer Kit von invitrogen und das dafür vorgesehene Protokoll verwendet. Die Zellen wurden 30 min bei Raumtemperatur, geschützt vor Lichteinstrahlung, mit der Farbstofflösung behandelt, wobei die Farbstoffkonzentration 10 µM auf den Zellen betrug. Anschließend wurde zweimal mit DPBS gewaschen und die Zellen für die Mikroskopie in DPBS belassen.

6.2.7 Chemische Zellyse

Zur chemischen Zellyse wurden zunächst an Tag 1 Zellen in 6-Well-Platten ausgesät (300000 Zellen pro Well in je 2 mL DMEM). Am darauffolgenden Tag 2 wurden diese, je nach Experiment, mit Reportermolekülen in der jeweiligen Konzentration und für die jeweilige Zeit behandelt und anschließend lysiert: Hierzu wurde einmal mit DPBS gewaschen und die HeLa S3 Zellen mit 200 µL TrypLE Express (1X) aus den Wells gelöst. Nach der Aufnahme dieser in 1 mL DPBS wurden diese für drei Minuten bei 600 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. HEK293T Zellen konnten ohne die Verwendung von Trypsin überführt werden. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet in 1 mL DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (drei Minuten, 600 g, 4 °C). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet bei 0 °C gehalten und in Lysepuffer mit DNaseI (siehe Abschnitt 6.1.2 Puffer) resuspendiert und 30 min bei 0 °C inkubiert. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 4 °C und 18000 g konnte das Lysat abgenommen und zum Färben und Fällern der Proteine weiter verwendet werden.

6.2.8 Färben der Zellysate

Zum Färben der Zellysate wurde ein von Franziska Doll entwickeltes Protokoll verwendet.^[104] Hierfür wurden 20 µL Zellysate mit 60 µL Lysepuffer ohne DNaseI (siehe Abschnitt 6.1.2 Puffer) und CuAAc-Mix vermischt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Für den CuAAc-Mix wurden 5 mM CuSO₄, 6,25 mM THPTA, 25 mM Natriumascorbat und 50 µM Sulfo-Cyanin-3-Azid in MilliQ gemischt, damit die Endkonzentration auf den Zellen 1 mM CuSO₄, 1,25 mM THPTA,

5 mM Natriumascorbat und 10 μ M Sulfo-Cyanin-3-Azid betrug. Anschließend an das Färben erfolgte direkt die Fällung der Proteine.

6.2.9 Proteinfällung

Die Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von bei -20 °C aufbewahrtem Methanol, bei -20 °C aufbewahrtem Chloroform und MilliQ. Dabei wurden zu 100 μ L wässrigem Lysat 600 μ L Methanol, 150 μ L Chloroform und 400 μ L MilliQ gegeben und durch Invertieren gut vermischt. Nach anschließendem Zentrifugieren bei 18000 g für drei Minuten bei 4 °C befanden sich die Proteine an der Phasengrenze und die obere Phase konnte abgenommen und verworfen werden. Zum Waschen wurden weitere zweimal 450 μ L eiskaltes Methanol hinzugegeben, gut vermischt, jeweils bei 18000 g und 4 °C für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinpellet wurde schließlich geschützt vor Licht über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

6.2.10 Denaturieren der Proteine

An Tag 3 wurden die gefällten Proteine denaturiert, dazu in 30 μ L 1X SDS Probenpuffer (25 % (v/v) 4X SDS Probenpuffer in DPBS wie in Abschnitt 6.1.2 beschrieben) aufgenommen und bei 2500 rpm für je 15 s gevortext. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut 10 s bei 2500 rpm am Vortexer durchmischt und anschließend zehn Minuten bei 98 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben konnten diese direkt für die Gelelektrophorese verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

6.2.11 Gelelektrophorese und Western Blotting

Gelzusammensetzung für die Gelelektrophorese:

10 % Trenngel:

30 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 10 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED, Trenngel-Puffer pH 8.8 (25 % (v/v)) in MilliQ

5 % Sammelgel:

30 % Acrylamid/Bisacrylamid, 10% (v/v) APS, 0,1% (v/v) TEMED, Sammelgel-Puffer pH 6,8 (25 % (v/v)) in MilliQ

Durchführung:

Die Gelelektrophorese wurde in einem Mini Protean Tetra System von Bio-Rad mit 15 % Acrylamidgel und einer Stromstärke von 50 mA in einer Stunde durchgeführt. Zur Charakterisierung der Banden wurde der Page Ruler Prestained Protein Ladder (33,3 % (v/v) in 1X SDS-Probenpuffer) verwendet. Anschließendes Western Blotting wurde bei 120 V durchgeführt. Das Auslesen der Fluoreszenz der Banden erfolgte an einem Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences) der AG Deuerling, Universität Konstanz, unter Verwendung eines Langpassfilters von 575 nm und einer Anregungswellenlänge von 532 nm. Zum Test der Transfereffizienz wurden die Blots anschließend für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit Ponceau S behandelt und am ChemiDoc Touch Imaging

System (Bio-Rad) ausgelesen. Erfolgte zusätzlich eine Behandlung der Blots mit Antikörper, so wurde die Ponceau S Färbung durch mehrmaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Vor der Zugabe der Antikörper wurden die Blots mit 5 % Milch in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken bei 50 rpm behandelt. Der Primärantikörper wurde schließlich in Blotto (siehe Abschnitt 6.2.1) in der jeweiligen Konzentration auf den Blot gegeben (4 mL pro Blot) und über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwenken bei 60 rpm inkubiert. Am Tag 4 wurden die Blots dreimal für je zehn Minuten unter ständigem Schwenken bei 60 rpm bei Raumtemperatur mit PBS-T gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Sekundärantikörper in 5 % Milch in PBS-T (10 mL pro Blot) für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Schwenken bei 60 rpm inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal zehn Minuten, Raumtemperatur, 60 rpm) wurde die Chemolumineszenz am ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad) ausgelesen.

Tabelle 9: Zugehörige Sekundärantikörper zu den verwendeten Primärantikörpern

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-GFP, Living Colors A. v. Monoclonal Antibody (JL-8)	Anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat
Pan anti-malonyllysine Antibody	Anti-Hase IgG, Peroxidase Antibody produced in goat
SIRT5 Polyclonal Antibody	Anti-Hase IgG, Peroxidase Antibody produced in goat

6.2.12 Transfektion von HEK293T-Zellen

Überexpression von Sirtuin5:

Zur Überexpression von Sirtuin5 wurden am Tag vor der Transfektion 300000 HEK293T Zellen pro Well in je 2 mL DMEM in 6-Well-Platten ausgesät. Die Transfektion wurde nach der Calcium-Phosphat-Transfektion vorgenommen.^[96] Hierfür wurden pro Well 100 µL MilliQ vorgelegt und 2 µg Plasmid und 100 µL 2X HBS Puffer (siehe Abschnitt 6.2.1) hinzugegeben und gut durchmischt. Unter Vortexen wurden 10 µL 2,5 M CaCl₂ hinzugetropft und der Mix für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 2 µL Chloroquin zu den Zellen wurden 200 µL der Transfektionsmischung auf den Zellen verteilt und diese für sieben Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit DPBS gewaschen und mit neuem DMEM überschichtet. Nach weiteren 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ konnten diese mit Malonylierungsreporter behandelt (siehe Abschnitt 6.2.1) und schließlich lysiert werden (siehe Abschnitt 6.2.7).

Transfektion für Immunopräzipitation (IP):

Die Transfektion für die IP wurde ebenfalls nach der Calcium-Phosphat-Transfektion durchgeführt.^[96] Im Unterschied zur Überexpression von Sirtuin5

wurden hier am Tag vor der Transfektion 1,5 Millionen HEK293T Zellen in 10 mL Petrischalen ausgelegt und für die Transfektion 4 µg Plasmid pro Schale in 0,5 mL MilliQ und 0,5 mL 2X HBS-Puffer mit 50 µL 2,5 M CaCl₂ verwendet. Vor der Zugabe des Transfektionsmixes wurden 10 µL Chloroquin auf die Zellen gegeben. Weiteres Vorgehen war analog zur Sirtuin5-Überexpression.

6.2.13 IP

Nach der Behandlung der Zellen mit Malonylierungsreporter (Abschnitt 6.2.3) erfolgte die Lyse dieser nach Abschnitt 6.2.7, wobei pro IP 600 µL Lysepuffer verwendet wurden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben an dieser Stelle bei -80 °C gelagert. Alle folgenden Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Zur eigentlichen IP wurden GFP-Trap®_A beads verwendet, wovon zunächst 10 µL in 500 µL Dilution Buffer (siehe Abschnitt 6.1.2) gegeben und zweimal gewaschen wurden. Dabei wurden diese zunächst bei 3000 g drei Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und es wurde erneut Verdünnungspuffer hinzugegeben. Anschließend wurden 800 µL Verdünnungspuffer und 200 µL des jeweiligen Lysats hinzugegeben und die Proben für mindestens eine Stunde bei 4 °C über Kopf am Rotator SB3 (Stuart) bei 9 rpm rotiert. Die Proben wurden bei 4 °C und 3000 g drei Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und es wurde erneut zweimal mit je 500 µL Verdünnungspuffer gewaschen. Es folgte das Färben der IPs nach Abschnitt 6.2.14.

6.2.14 Färben und Denaturieren der IPs

Zum Färben der IPs wurde dasselbe Protokoll verwendet wie zum Färben der Zelllysate.^[104] Hierbei wurden 80 µL Protein-GFP-Trap®_A bead Suspension mit CuAAc-Mix gemischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 500 µL Waschpuffer (Abschnitt 6.1.2) gewaschen und jeweils bei 4 °C und 3000 g für drei Minuten zentrifugiert. Zum Denaturieren der Proben wurden 60 µL der gefärbten Lösung mit 20 µL 4X SDS versetzt und diese zehn Minuten bei 98 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben konnten diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

6.2.15 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben in 8-Well-Mikroskopiekammern (µ-Slide 8-Well ibitreat, ibidi) verwendet. Die Vorbereitung wurde bereits in den Abschnitten 6.2.3 und 6.2.4 beschrieben. Die Fluoreszenzmikroskopie selbst wurde sowohl an einem TCS SP5 Laser Scanning Mikroskop (Leica) als auch an einem TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop (Leica) durchgeführt. Hierbei wurde jeweils ein Ölimmersionsobjektiv (63x, 1,4 NA, HCX PL APO, OIL, Leica) und die Leica LAS AF (SP5) bzw. Leica LAS X (SP8) Acquisition Software verwendet. Am TCS SP5 wurde mit einem DPSS 561 Laser bei 561 nm (Sulfo-Cyanin-3-Azid) angeregt und im Bereich von 565–625 nm mittels eines Photovervielfachers (PMT) detektiert. Die Aufnahme von Transmissions-

bildern erfolgte durch eine Anregung bei 633 nm. Die Anregungsintensitäten waren dabei 10 % bzw. 1 % der maximalen Laserleistung.

Am TCS SP8 wurde mit einem OPAL 552 bei 552 nm (Sulfo-Cyanin-3-Azid) angeregt und ebenfalls im Bereich 565–625 nm detektiert. Für die Aufnahme von Transmissionsbildern wurde mit einem Diodenlaser bei 638 nm angeregt. Die Laserintensitäten betragen zur Anregung dabei 5 % bzw. 1 % der maximalen Laserleistung. Smart Gain und smart Offset wurden dabei jeweils so gewählt, dass Hintergrund und Intensität aufeinander abgestimmt waren.

Die Bilder wurden alle mittels ImageJ ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität wurde mit der LAS AF bzw. LAS X Software ausgelesen und anschließend mit der GraphPad Prism Software dargestellt.

Für die Bilder wurden folgende Aufnahmeparameter verwendet:

Tabelle 10: Bildparameter für die Fluoreszenzmikroskopie

	SP5	SP8
Line Average	4	4
Scangeschwindigkeit	100 Linien/s	100 Linien/s
Pixelgröße	80,2 nm x 80,2 nm	90 nm x 90 nm
Bildparameter	82,02 µm x 82,02 µm (1024 Pixel x 1024 Pixel)	92,26 µm x 92,26 µm (1024 Pixel x 1024 Pixel)
Bildtiefe	8 Bit	8 Bit

6.2.16 Ramanmikroskopie

Raman-Spektren wurden an einem konfokalen Raman-Spektrometer MonoVista CRS 750HR/BX51WI (Spectroscopy and Imaging) mit integriertem Mikroskop (Olympus) aufgenommen. Als Anregungsquelle diente ein HeNe-Laser (633 nm) (Melles Griot). Zur Detektion des Raman-Signals wurde das Licht durch einen Spalt variierbarer Breite auf einen Monochromator (Princeton Instruments) mit einem Transmissionsgitter mit 600 Linien pro Millimeter geschickt und als Detektor eine mit flüssigem Stickstoff gekühlte CCD-Kamera mit einem Spektralbereich von 200 nm bis 1050 nm verwendet. Für alle Messungen wurden ein Luftobjektiv (100x, 0,9 NA, MPLN, air, Olympus) und die S&I TrivistaControl Software verwendet. Die Proben wurden jeweils als Feststoff entweder auf einem Glasobjektträger 76 mm x 26 mm oder auf einem Quartz Cover-Slip mit 0,2 mm Dicke präpariert. Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der S&I Trivista und die Darstellung mit der OriginPro Software. Dabei wurden die Spektren unverändert und ohne Baselinekorrektur dargestellt.

6.2.17 SRS

SRS-Experimente an mit Fettsäuren behandelten HepG2-Zellen, an mit Nukleosiden bzw. MalAMyne behandelten HeLa bzw. HeLa S3 Zellen wurden an einem in der Arbeitsgruppe selbst-erbauten Er: fibre Lasersystem mit einer Repeatsrate von 40 MHz und einer zentralen Wellenlänge von 1562 nm durchgeführt.^[76] Der Laser war in zwei Strahlen, den Pump- und den Stokes-Strahl auf-

geteilt. Der Pump-Strahl wurde dabei in einem LiNbO_3 (PPLN) Kristall, der Picosekundenpulse bei 776 nm generierte, frequenzverdoppelt. Der Stokes-Strahl wurde an einem elektro-optischen Modulator (EOM) moduliert, um jeden zweiten Puls zu eliminieren. Eine hochgradig nicht-lineare Faser (HNF *engl. highly non-linear fibre*) diente dazu, ein breites Spektrum zu erhalten. Pulse zwischen 810 nm und 1030 nm wurden von einem fan out PPLN generiert, welcher das Soliton der HNF verdoppelte. Die Detektion geschah durch einen Lock-in Amplifier durch die Abschwächung des Pump-Strahls bei der Resonanzfrequenz aufgrund des Ramaneffekts. Die beiden Strahlen wurden schließlich in ein Mikroskop (Leica) eingekoppelt. Für alle Messungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (63x, 1,2 NA, WATER, Leica) verwendet. Die Vorbereitung der Proben wurde in Abschnitt 6.2.5 beschrieben. Die Aufnahmeparameter der Bilder sind jeweils direkt angegeben. Die Auswertung der Spektren und Bilder erfolgte mittels MATLAB. Alle Messungen an diesem Aufbau wurden zusammen mit Peter Fimpel (AG Zumbusch, Universität Konstanz) durchgeführt.

Zusätzlich wurden SRS-Messungen an einem Leica TCS SP8 CARS System vorgenommen. Die Anregung erfolgte dabei mit einem *picoEmerald*TM S wie in Abschnitt 6.2.18 beschrieben. Für alle Messungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet (40x, 1,10 NA, HC PL IR APO, WATER, Leica). Ob ein Luft- (0,9 NA, AIR, Leica) oder Ölkondensator (1,40 NA, OIL, Leica) verwendet wurde, ist jeweils direkt bei der Messung angegeben. Die Aufnahmeparameter der Spektren und Bilder sind ebenso direkt angegeben. Im Gegensatz zur CARS-Mikroskopie wird hier der Stokes-Laser mittels eines elektrooptischen Modulators (EOM) mit 20 MHz moduliert. Die Detektion erfolgt anschließend über einen Lock-in amplifier. Smart Gain und smart Offset zur Aufnahme der Bilder wurde dabei jeweils so gewählt, dass Hintergrund und Intensität aufeinander abgestimmt waren. Die Spektren wurden mit der LAS X Software ausgewertet und anschließend in Origin dargestellt. Die Darstellung der Bilder erfolgte mittels ImageJ.

6.2.18 CARS-Mikroskopie

Die CARS-Experimente an mit Fettsäuren behandelten HepG2-Zellen wurden an einem von Dr. Martin Winterhalder (AG Zumbusch, Universität Konstanz) selbst aufgebautem Setup durchgeführt.^[98] Die Vorbereitung der Proben ist in Abschnitt 6.2.5 beschrieben. In dem Aufbau diente ein Nd:YVO_4 Laser (pico-Train, High Q Laser) mit einer Wellenlänge von 1064 nm, einer Repetitionsrate von 76 MHz und einer Pulsdauer von 7 ps als Pumpquelle für den optischen parametrischen Oszillator (OPO, APE, Berlin). Ein Laserarm wurde als Stokes-Strahl verwendet, der andere in der Frequenz zu 532 nm verdoppelt und pumpete den OPO. Dieser generierte über einen nicht-linearen optischen Kristall zwei Strahlen geringerer Energie, Signal und Idler, von welchen einer als Pump-Strahl im CARS-Prozess verwendet wurde. Die beiden Strahlen wurden zeitlich und räumlich überlagert und wurden so in ein konfokales TCS SP5 Mikroskop (Leica) eingekoppelt. Die Wellenlänge des Pump-Strahls war fest bei 1064 nm,

während der Stokes-Strahl in seiner Wellenlänge variiert werden konnte. Für alle Messungen wurde ein Wasserobjektiv (63x, 1,2 NA, WATER; NIR, Prototyp, Leica) verwendet. Die Leistung des Stokes-Strahls wurde dabei bei 140 mW und die des Pump-Strahls bei 110 mW gehalten.^[98] Einige der Messungen wurden zusammen mit Dr. Martin Winderhalder (AG Zumbusch, Universität Konstanz) durchgeführt.

Zusätzlich wurden CARS-Messungen an einem Leica TCS SP8 CARS System vorgenommen. Die Anregung erfolgte dabei mit einem *picoEmerald*TM S. Dabei diente ein Frequenz-verdoppelter mode-locked Picosekunden Faserlaser als Pumpquelle für den optisch-parametrischen Oszillator (OPO). Die Laserwellenlänge beträgt dabei 1031 nm, was als Stokes-Laser verwendet wurde. Weitere zwei Pulsszüge, die mit dem Stokes-Laser zeitlich und räumlich überlagert waren, standen zur Verfügung: Signal und Idler des OPO. Als Pump-Strahl wurde dabei das OPO-Signal verwendet, der im Bereich von 700–960 nm variiert werden konnte. Die Repetitionsrate des Lasers liegt bei 80 MHz und die Pulsdauer bei 2 ps. Für alle Messungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet (40x, 1,10 NA, HC PL IR APO, WATER, Leica). Ob ein Luft- (0,9 NA, AIR, Leica) oder Ölkondensor (1,40 NA, OIL, Leica) verwendet wurde, ist jeweils direkt bei der Messung angegeben. Die Aufnahmeparameter der Spektren und Bilder sind ebenso direkt angegeben. Smart Gain und smart Offset zur Aufnahme der Bilder wurde dabei jeweils so gewählt, dass Hintergrund und Intensität aufeinander abgestimmt waren. Die Darstellung der Spektren gelang durch das Auslesen der Intensitäten in den jeweiligen Bildern in der LAS AF Software und die anschließende Darstellung mit Microsoft Office (Excel). Die Bilder wurden alle mittels ImageJ prozessiert.

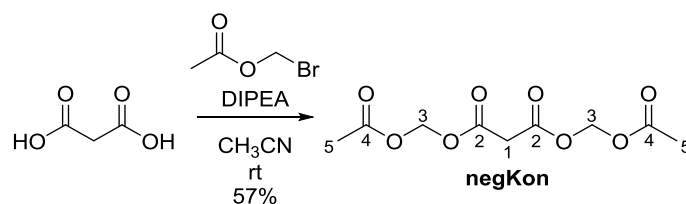
6.2.19 Probenvorbereitung für die SRS-Mikroskopie am TCS SP8

Zur Aufnahme von Spektren von Lösungen wurden diese in Secure-Seal Imaging Spacers der Firma Grace BioLabs präpariert.

Für die Messungen an Zellen wurden diese in Mikroskopieschalen mit Glasboden (μ -Dish 35 mm, high, glass bottom ibitreat ibidi und μ -Dish 35 mm, high, glass bottom, Grid-50 ibidi) ausgesät und behandelt. Zur eigentlichen Messung wurde nur ein dünner Film an DPBS auf den Zellen belassen und diese mit einem Deckglas versehen.

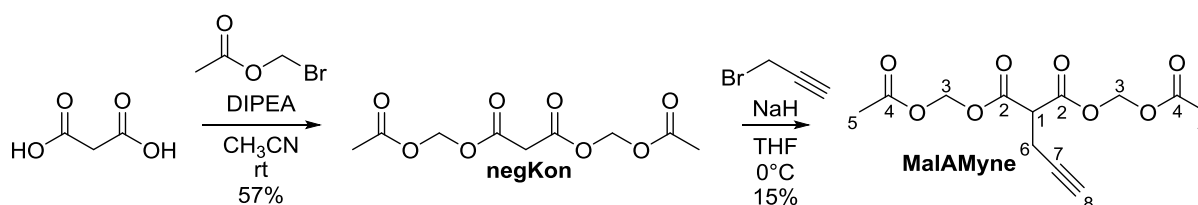
6.2.20 Chemische Synthese

Synthese von Diacetoxymethylmalonat (negKon):



Die Synthese von Diacetoxymethylmalonat (negKon) wurde nach der Vorschrift von Jao *et al.* vorgenommen.^[29] 500 mg (4,80 mmol) Malonsäure wurden vorgelegt und unter starkem Rühren und Erwärmen auf 35°C unter N₂-Atmosphäre in 5,5 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst. Nach der Zugabe von 1,9 mL (12,01 mmol) DIPEA und 1,18 mL (12,01 mmol) Essigsäurebromomethylester wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (PE:EE = 7:3). Ausbeute 57 %. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.78 (s, 4H, H-3), 3.48 (s, 2H, H-1), 2.13 (s, 6H, H-5); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 169.53 (C-4), 164.64 (C-2), 79.50 (C-3), 40.73 (C-1), 20.63 (H-5).

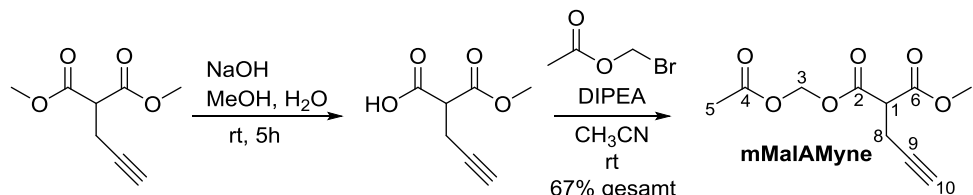
Synthese von Diacetoxymethylpropargylmalonat (MalAMyne):



Diacetoxymethylpropargylmalonat wurde in zwei Stufen synthetisiert. Die erste wurde nach der Vorschrift von Jao *et al.* vorgenommen (siehe auch Abschnitt 6.2.21 Synthese von Diacetoxymethylmalonat).^[29] Für die zweite Stufe wurden 71 mg (1,77 mmol) NaH als 57-63 % Suspension in Öl in 4,4 mL trockenem THF gelöst und mit einem Kältebad auf -9 °C gekühlt. Hierzu wurde eine Lösung von 400 mg (1,61 mmol) negKon in 1,5 mL trockenem THF hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde fünf Minuten bei 0 °C, anschließend 20 min bei 15 °C gerührt und schließlich wieder auf -5 °C gekühlt. Nach dem Zutropfen von 175 µL (1,61 mmol) Propargylbromid wurde die Reaktionsmischung für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wurden 5 mL Wasser und 5 mL EE hinzugegeben. Nach der Trennung der Phasen im Scheidetrichter wurde die wässrige Phase viermal mit 5 mL EE extrahiert und die organische Phase einmal mit 5 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (PE:EE = 7:3) wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten.

Ausbeute 15 %. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.78 (s, 4H, H-3), 3.67 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.57$ Hz, 1H, H-1), 2.82 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.57$ Hz, 2H, H-6), 2.12 (s, 6H, H-5), 2.04 (s, 1H, H-8; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 169.38 (C-4), 166.16 (C-2), 79.74 (C-3), 78.97 (C-7), 71.00 (C-8), 50.61 (C-1), 20.66 (C-5), 18.20 (C-6).

Synthese von (Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat (mMalAMyne):

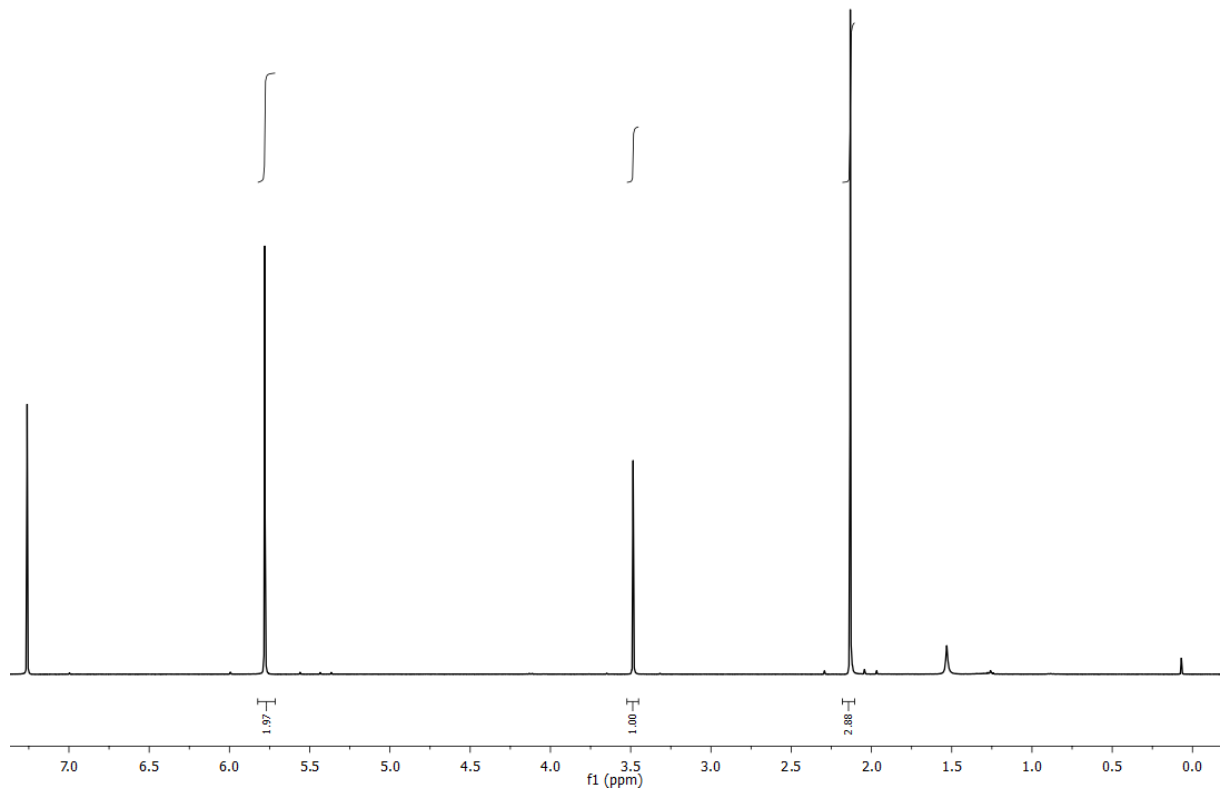


Die Synthese von mMalAMyne wurde etwas abgewandelt nach der Vorschrift von Jao *et al.* durchgeführt.^[29] 500 mg (2,97 mmol) Dimethylpropargylmalonat wurden in 25 mL Methanol p. a. gelöst und es wurden vier Äquivalente 1 M NaOH hinzugegeben und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktionslösung mit 1 M HCl auf pH 6 gebracht und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt wurde, konnte das Rohprodukt direkt für die nächste Stufe verwendet werden. Dieses wurde in 4 mL wasserfreiem Acetonitril gelöst und es wurden 1,2 mL (7,35 mmol) DIPEA und 600 μL (6,12 mmol) Essigsäurebromomethylester unter N_2 -Atmosphäre dazugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel anschließend am Vakuum entfernt. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung mit PE:EE = 7:3 blieb das Produkt als farbloses Öl zurück. Ausbeute: 67 %. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.79 (m, 2H, H-3), 3.77 (s, 3H, H-7), 3.64 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.54$ Hz, 1H, H-1), 2.80 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.54$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.42$ Hz, 2H, H-8), 2.12 (s, 3H, H-5), 2.03 (t, $^4J_{\text{HH}} = 2.42$ Hz, 1H, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 169.45 (C-4), 167.73 (C-6), 166.82 (C-2), 79.85 (C-3), 79.44 (C-9), 70.90 (C-10), 53.10 (C-7), 50.81 (C-1), 20.71 (C-5), 18.43 (C-8).

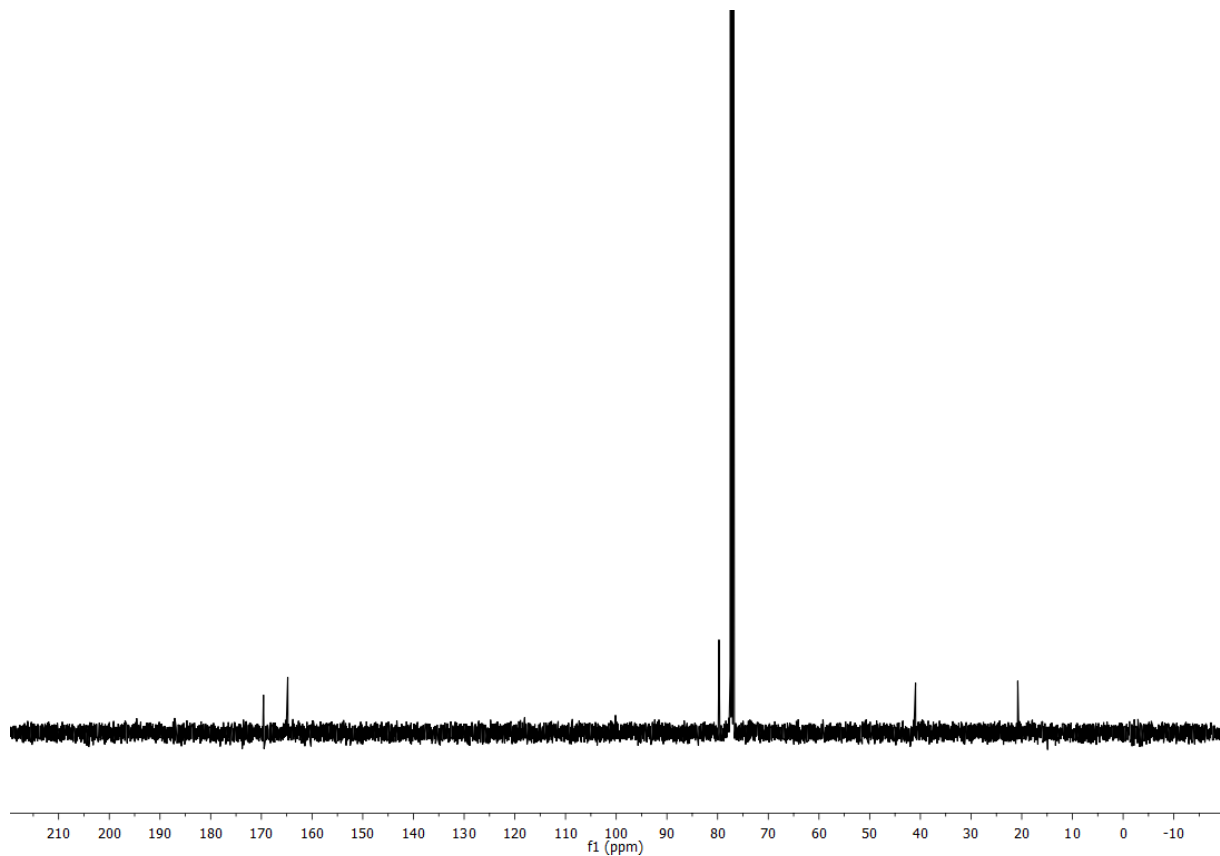
6.2.21 NMR-Spektroskopie

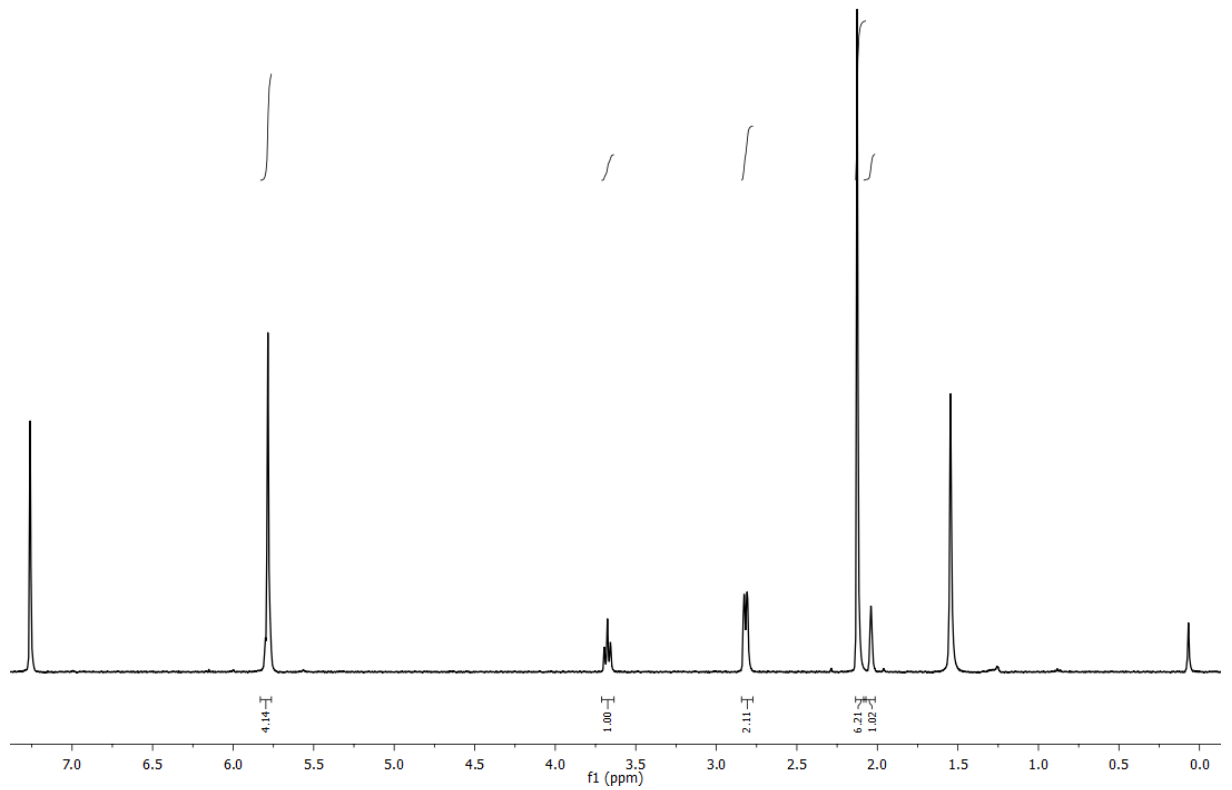
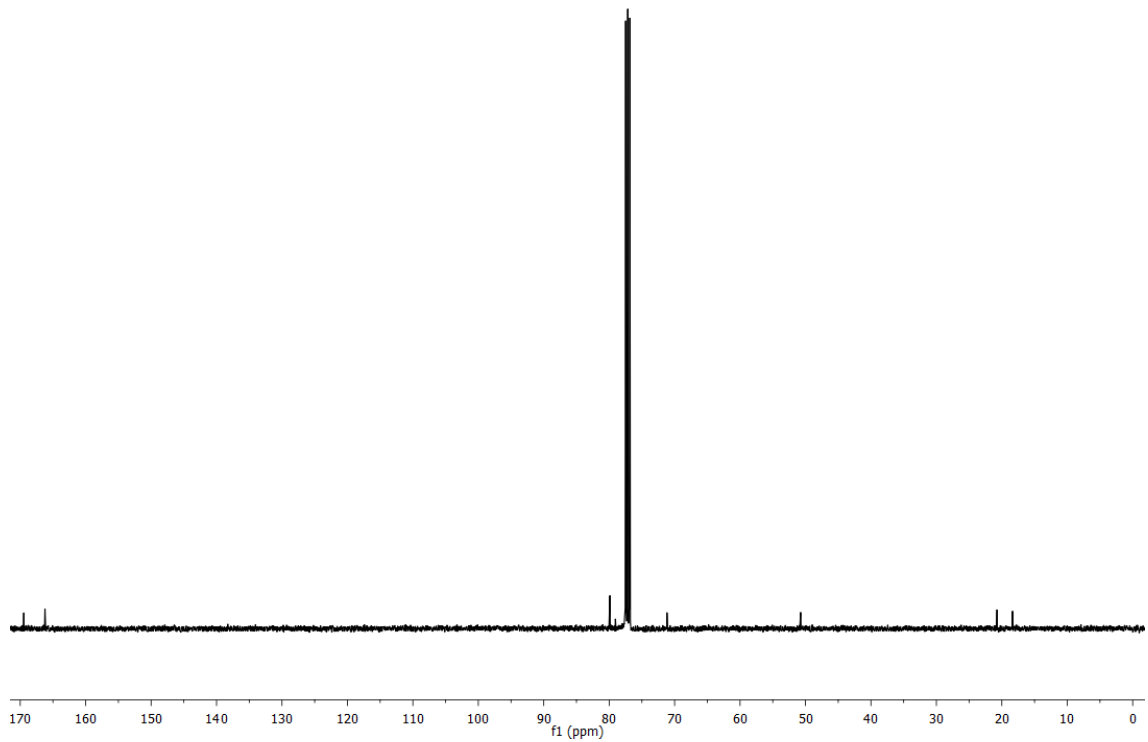
Alle NMR-Experimente wurden an einem Bruker Avance III 400 Spektrometer aufgenommen und alle deuterierten Lösungsmittel von Sigma bezogen (s. 6.1.2) und bei +8 °C gelagert. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und die Kopplungskonstanten in Hertz. Als interne Referenz diente das Lösungsmittelsignal. Zur vollständigen Zuordnung der Signale wurden zusätzlich $^1\text{H}, ^1\text{H-gCOSY}$, $^1\text{H}, ^{13}\text{C-gHSQC}$ und $^1\text{H}, ^{13}\text{C-gHMBC}$ Experimente aufgenommen.

Diacetoxymethylmalonat (negKon) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

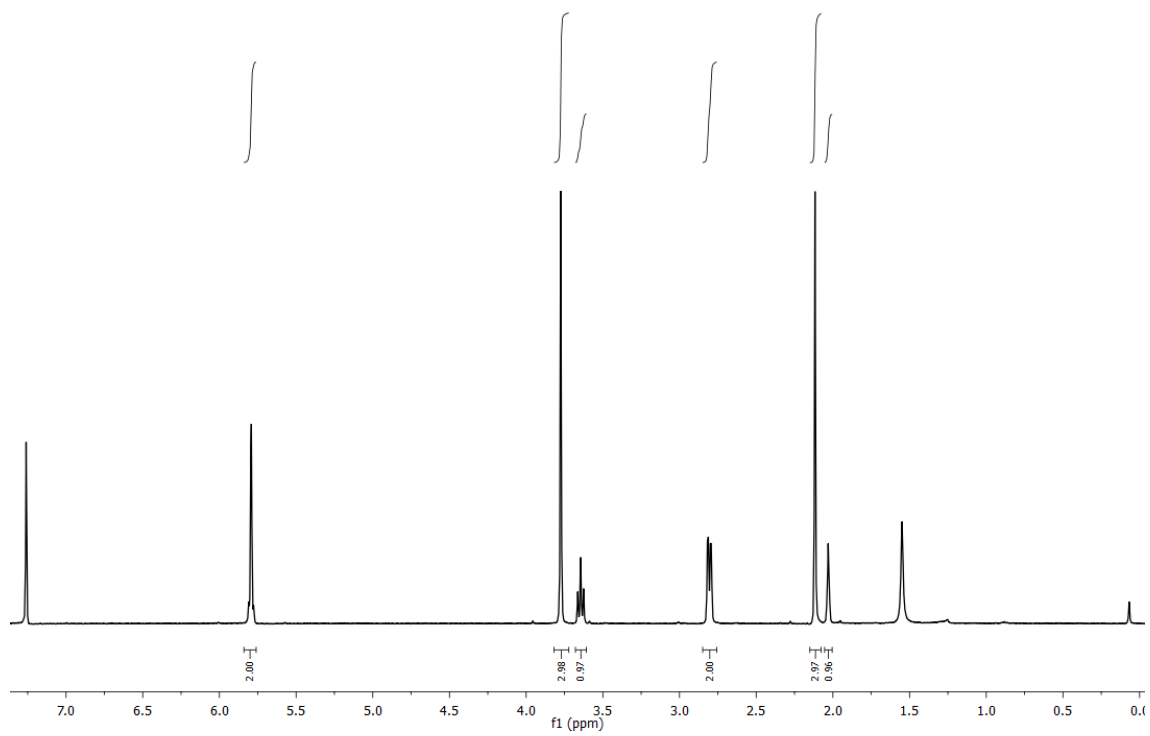


Diacetoxymethylmalonat (negKon) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

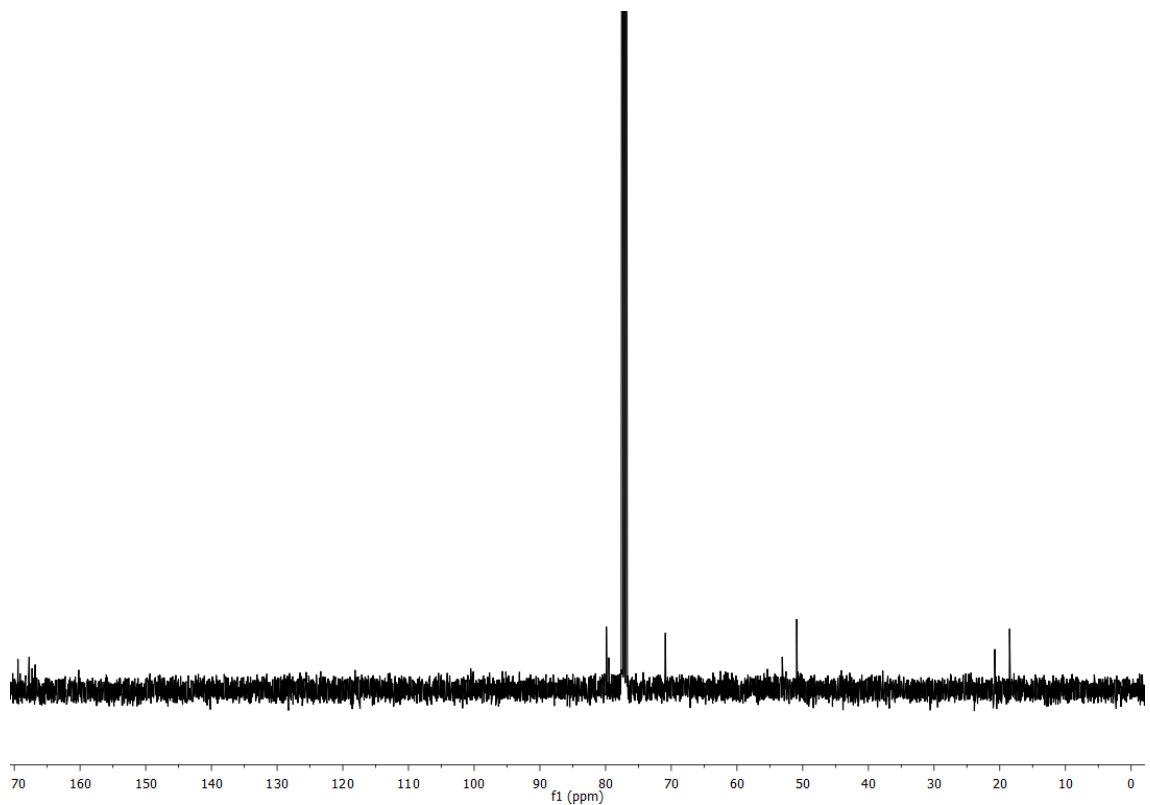


Diacetoxymethylpropargylmalonat (MalAMyne) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):**Diacetoxymethylpropargylmalonat (MalAMyne) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):**

(Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat (mMalAMyne) $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):



(Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat (mMalAMyne) $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):



7. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 11: Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	Ausführung
(E)GFP	(enhanced) green fluorescent protein
2-EA	2-Ethynyladenosin
Act D	Actinomycin D
Acyl-CoA	Acyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
AdU	5-Azido-2'-desoxyuridin
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromodesoxyuridin
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
CARS	coherent anti-Stokes Raman Scattering
CCD	charge-coupled device
CHO	chinese Hamster ovaries
CRS	coherent Raman scattering
CT	C-Terminal(e)
CuAAC	Kupfer(I) katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
dF-EdU	2'-Desoxy-2',2'-difluoro-5-ethinyluridin
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DHA	Dehydroascorbat
DIFO	difluorierte Cyclooctine
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dmMalyne	Dimethylpropargylmalonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EC	Ethynylcytidin
EDDA	7-Ethynyl-7-deaza-2'-desoxyadenosin
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EE	Ethylacetat
engl.	englisch
ENO1	α -Enolase1

Abkürzungsverzeichnis

EOM	elektro-optischer Modulator
et al.	et alii, aliae, alia
EU	5-Ethynyluridin
EV	Ersatzvektor
F- <i>ara</i> -EdU	(2' <i>S</i>)-2'Desoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridin
FBS	fetal bovine serum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	human embrionic kidney
HeLa	menschliche Zelllinie abgeleitet vom Zervixkarzinom von Henrietta Lacks
HepG2	menschliche Leberzelllinie
HNF	highly non-linear fibre
HSV-1 TK	Herpes Simplex Virus-1 Thymidin Kinase
HU	Hydroxyurea
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, die notwendig ist, um etwas zu 50% zu inhibieren
IP	Immunopräzipitation
IP	Immunopräzipitation
IR-	Infrarot-
LD	Lipid droplet
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
MalAMyne	(Acetoxymethyl)propargylmalonat
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
MAP-Kinase	Mitogen-activated-protein-Kinase
max	Maximum
MCD	Malonyl-CoA-Decarboxylase
MCF-7	Michigan-Cancer-Foundation-7, menschliche Brustkrebszelllinie
MilliQ	Entionisiertes Wasser
min	Minimum
mMalAMyne	(Acetoxymethyl)methylpropargylmalonat
mRNA	messenger Ribonucleic acid
<i>N</i> ⁶ -PA	<i>N</i> ⁶ -Propargyladenosin
NA	Numerische Apertur
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAM	Nikotinamid

NIH3T3	Zelllinie von Mausfibroblasten ursprünglich aus embryonalem Gewebe von schweizerischen Albino-Mäusen
NMR	nuclear magnetic resonance
NT	N-Terminus
O2'-PA	O2'-Propargyladenosin
O3'-PA	O3'-Propargyladenosin
OPO	optisch-parametrischer Oszillator
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PE	Petrolether
PFA	Paraformaldehyd
PGK1	Phosphoglyceratkinase1
PMMA	Polymethylmethacrylat
PMT	Photovervielfacher (photomultiplier tube)
Poly(A)-	Polyadenylat-
PPLN	Periodically Poled Lithium Niobate
PS	Polystyrol
PTM	post-translationale Modifikation
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	ribosomal Ribonucleic acid
rt	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis
SEM	standard Error of the Mean
Sir2	silent information regulator 2
siRNA	small interfering ribonucleic acid
Sirt	Sirtuin
sog	sogenannt
SPAAc	strain-promoted Azide-Alkine-Cycloaddition
SRG	stimulated Raman gain
SRL	stimulated Raman loss
SRS	stimulated Raman scattering
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin
tRNA	transfer Ribonucleic acid

8. Literaturverzeichnis

- [1] J. C. Jewett, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1272-1279.
- [2] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544.
- [3] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Physiol.* **1962**, 59, 223-239.
- [4] F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gershman, G. T. Reynolds, J. R. Waters, *J. Cell. Physiol.* **1962**, 60, 85-103.
- [5] J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 13.
- [6] T. F. Massoud, S. S. Gambhir, *Genes Dev.* **2003**, 17, 545-580.
- [7] L. Wei, F. Hu, Z. Chen, Y. Shen, L. Zhang, W. Min, *Acc. Chem. Res.* **2016**.
- [8] M. Grammel, H. C. Hang, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 475-484.
- [9] Z. Chen, D. W. Paley, L. Wei, A. L. Weisman, R. A. Friesner, C. Nuckolls, W. Min, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 8027-8033.
- [10] D. Fu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, 39, 24-31.
- [11] B. A. Griffin, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 281, 269-272.
- [12] S. R. Adams, R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis, R. Y. Tsien, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6063-6076.
- [13] M. Boyce, C. R. Bertozzi, *Nat. Methods* **2011**, 8, 638.
- [14] L. K. Mahal, K. J. Yarema, C. R. Bertozzi, *Science* **1997**, 276, 1125-1128.
- [15] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1242-1243.
- [16] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 6974-6998.
- [17] J. M. Baskin, C. R. Bertozzi, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 1211-1219.
- [18] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007-2010.
- [19] H. Vu, P. S. I., M. Celia, F. M. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 9879-9883.
- [20] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 16793-16797.
- [21] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565-598.
- [22] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [23] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.
- [24] T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 2614-2619.
- [25] H. Jiang, J. H. Kim, K. M. Frizzell, W. L. Kraus, H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9363-9372.
- [26] X. Bao, Q. Zhao, T. Yang, Y. M. E. Fung, X. D. Li, *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 4883-4886.
- [27] S. Shukla, S. Sumaria Chintan, P. I. Pradeepkumar, *ChemMedChem* **2010**, 5, 328-349.

- [28] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 2415-2420.
- [29] C. Y. Jao, A. Salic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 15779-15784.
- [30] N. A. B., S. Carsten, *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 1498-1500.
- [31] J.-X. Cheng, X. S. Xie, *Science* **2015**, *350*.
- [32] X. Zhang, M. B. J. Roeffaers, S. Basu, J. R. Daniele, D. Fu, C. W. Freudiger, G. R. Holtom, X. S. Xie, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 1054-1059.
- [33] S. Hong, T. Chen, Y. Zhu, A. Li, Y. Huang, X. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 5827-5831.
- [34] L. Wei, F. Hu, Y. Shen, Z. Chen, Y. Yu, C.-C. Lin, M. C. Wang, W. Min, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 410-412.
- [35] S. Yue, J.-X. Cheng, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *33*, 46-57.
- [36] F. Hu, M. R. Lamprecht, L. Wei, B. Morrison, W. Min, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39660.
- [37] C. Peng, Z. Lu, Z. Xie, Z. Cheng, Y. Chen, M. Tan, H. Luo, Y. Zhang, W. He, K. Yang, B. M. M. Zwaans, D. Tishkoff, L. Ho, D. Lombard, T.-C. He, J. Dai, E. Verdin, Y. Ye, Y. Zhao, *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10*.
- [38] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [39] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.
- [40] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.
- [41] H. C. Hang, C. Yu, D. L. Kato, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14846-14851.
- [42] P. V. Chang, J. A. Prescher, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8400-8401.
- [43] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [44] S. S. Gupta, J. Kuzelka, P. Singh, W. G. Lewis, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1572-1579.
- [45] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3192-3193.
- [46] V. O. Rodionov, S. I. Presolski, D. Díaz Díaz, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12705-12712.
- [47] V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912-1916.
- [48] G. Wittig, A. Krebs, *Chem. Ber.* **1961**, *94*, 3260-3275.
- [49] H. Meier, H. Petersen, H. Kolshorn, *Chem. Ber.* **1980**, *113*, 2398-2409.
- [50] J. Dommerholt, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374*, 16.
- [51] T. Walsh Christopher, S. Garneau-Tsodikova, J. Gatto Gregory, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 7342-7372.
- [52] Y. L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 666.
- [53] G. A. Khoury, R. C. Baliban, C. A. Floudas, *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 90.
- [54] H. Xu, J. Zhou, S. Lin, W. Deng, Y. Zhang, Y. Xue, *J. Genet. Genomics* **2017**, *44*, 243-250.
- [55] S. Lee, *Toxicol. Res.* **2013**, *29*, 81-86.
- [56] E. Thinon, Howard C. Hang, *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 253.

8. Literaturverzeichnis

- [57] G. Colak, O. Pougovkina, L. Dai, M. Tan, H. te Brinke, H. Huang, Z. Cheng, J. Park, X. Wan, X. Liu, W. W. Yue, R. J. A. Wanders, J. W. Locasale, D. B. Lombard, V. C. J. de Boer, Y. Zhao, *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 3056-3071.
- [58] Y. Du, T. Cai, T. Li, P. Xue, B. Zhou, X. He, P. Wei, P. Liu, F. Yang, T. Wei, *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14*, 227-236.
- [59] J. Du, Y. Zhou, X. Su, J. J. Yu, S. Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J. H. Kim, B. H. Choi, B. He, W. Chen, S. Zhang, R. A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao, H. Lin, *Science* **2011**, *334*, 806-809.
- [60] S. Kumar, D. B. Lombard, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *53*, 311-334.
- [61] Y. Nishida, Matthew J. Rardin, C. Carrico, W. He, Alexandria K. Sahu, P. Gut, R. Najjar, M. Fitch, M. Hellerstein, Bradford W. Gibson, E. Verdin, *Mol. Cell* **2015**, *59*, 321-332.
- [62] I. Scott, Bradley R. Webster, Jian H. Li, Michael N. Sack, *Biochem. J.* **2012**, *443*, 655-661.
- [63] G. R. Wagner, R. M. Payne, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 29036-29045.
- [64] Gregory R. Wagner, Matthew D. Hirschey, *Mol. Cell* **2014**, *54*, 5-16.
- [65] A. M. James, K. Hoogewijs, A. Logan, A. R. Hall, S. Ding, I. M. Fearnley, M. P. Murphy, *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2105-2112.
- [66] G. R. Wagner, M. D. Hirschey, *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 126-128.
- [67] R. W. Guynn, H. J. Gelberg, R. L. Veech, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6957-6965.
- [68] A. S. Olia, K. Barker, C. E. McCullough, H.-Y. Tang, D. W. Speicher, J. Qiu, J. LaBaer, R. Marmorstein, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2034-2047.
- [69] B. T. Weinert, V. Iesmantavicius, T. Moustafa, C. Schölz, S. A. Wagner, C. Magnes, R. Zechner, C. Choudhary, *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *10*.
- [70] R. A. Kulkarni, A. J. Worth, T. T. Zengeya, J. H. Shrimp, J. M. Garlick, A. M. Roberts, D. C. Montgomery, C. Sourbier, B. K. Gibbs, C. Mesaros, Y. C. Tsai, S. Das, K. C. Chan, M. Zhou, T. Andersson, A. M. Weissman, W. M. Linehan, I. A. Blair, N. W. Snyder, J. L. Meier, *Cell Chem. Biol.* **2017**, *24*, 231-242.
- [71] R. Smith, K. L. Wright, L. Ashton, *Analyst* **2016**, *141*, 3590-3600.
- [72] J. Popp, C. Krafft, M. Schmitt, I. Schie, D. Cialla-May, C. Matthaeus, T. Bocklitz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, n/a-n/a.
- [73] W. J. Tipping, M. Lee, A. Serrels, V. G. Brunton, A. N. Hulme, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2075-2089.
- [74] D. Zhang, P. Wang, M. N. Slipchenko, J.-X. Cheng, *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2282-2290.
- [75] Y. Yu, P. V. Ramachandran, M. C. Wang, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 1120-1129.
- [76] C. Riek, C. Kocher, P. Zirak, C. Kölbl, P. Fimpel, A. Leitenstorfer, A. Zumbusch, D. Brida, *Opt. Lett.* **2016**, *41*, 3731-3734.
- [77] S. Daemen, M. A. M. J. van Zandvoort, S. H. Parekh, M. K. C. Hesselink, *Mol. Metab.* **2016**, *5*, 153-163.
- [78] M. N. Slipchenko, T. T. Le, H. Chen, J.-X. Cheng, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7681-7686.
- [79] A. Zumbusch, W. Langbein, P. Borri, *Prog. Lipid Res.* **2013**, *52*, 615-632.
- [80] C. Jüngst, M. Klein, A. Zumbusch, *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 3419-3429.

- [81] H. Yamakoshi, K. Dodo, M. Okada, J. Ando, A. Palonpon, K. Fujita, S. Kawata, M. Sodeoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6102-6105.
- [82] H. Yamakoshi, K. Dodo, A. Palonpon, J. Ando, K. Fujita, S. Kawata, M. Sodeoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20681-20689.
- [83] D. Fu, W. Yang, X. S. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**.
- [84] W. J. Tipping, M. Lee, A. Serrels, V. G. Brunton, A. N. Hulme, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5606-5615.
- [85] V. A. Villareal, D. Fu, D. A. Costello, X. S. Xie, P. L. Yang, *ACS Chem. Biol.* **2016**.
- [86] Z. Darzynkiewicz, F. Traganos, H. Zhao, H. D. Halicka, J. Li, *Cytometry A* **2011**, *79*, 328-337.
- [87] M. Grammel, H. Hang, K. Conrad Nicholas, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1112-1115.
- [88] F. Chehrehasa, A. C. B. Meedeniya, P. Dwyer, G. Abrahamsen, A. Mackay-Sim, *J. Neurosci. Methods* **2009**, *177*, 122-130.
- [89] D. Qu, L. Zhou, W. Wang, Z. Wang, G. Wang, W. Chi, B. Zhang, *Anal. Biochem.* **2013**, *434*, 128-135.
- [90] D. Curanovic, M. Cohen, I. Singh, C. E. Slagle, C. S. Leslie, S. R. Jaffrey, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 671-673.
- [91] A. B. Neef, N. W. Luedtke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 20404-20409.
- [92] A. B. Neef, L. Pernot, V. N. Schreier, L. Scapozza, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, n/a-n/a.
- [93] R. M. Clegg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6*, 103-110.
- [94] R. C. Borra, M. A. Lotufo, S. M. Gaglioti, F. d. M. Barros, P. M. Andrade, *Braz. Oral Res.* **2009**, *23*, 255-262.
- [95] M. J. White, M. J. DiCaprio, D. A. Greenberg, *J. Neurosci. Methods* **1996**, *70*, 195-200.
- [96] Y. Chen, *Bio-protocol* **2012**, *2*, e86.
- [97] L. L. Listenberger, D. A. Brown, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2007**, *35*, 24.22.21-24.22.11.
- [98] M. J. Winterhalder, PhD thesis, University of Konstanz (Konstanz), **2013**.
- [99] B. Brozek-Pluska, M. Kopec, J. Surmacki, H. Abramczyk, *Analyst* **2015**, *140*, 2134-2143.
- [100] T. A. P. Hai, H. Matsukuma, R. Sugimoto, *React. Funct. Polym.* **2018**, *122*, 167-174.
- [101] K. J. Thomas, M. Sheeba, V. P. N. Nampoori, C. P. G. Vallabhan, P. Radhakrishnan, *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.* **2008**, *10*, 055303.
- [102] R. N. Day, M. W. Davidson, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2887-2921.
- [103] C. Zeng, F. Hu, R. Long, W. Min, *Analyst* **2018**, *143*, 4844-4848.
- [104] F. Doll, PhD thesis, Universität Konstanz (Konstanz), **2018**.