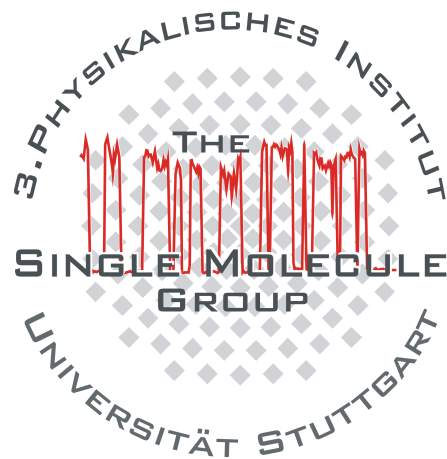


Einzelmolekülmessungen mit
Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
und
Fluoreszenzkreuzkorrelationspektroskopie
in lebenden Zellen

Elmar Thews



Biophysik – Grenzgebiet zwischen Biologie und Physik mit der Aufgabe, biologische Vorgänge und Strukturen physikalisch zu deuten. Unter B. ist also nicht nur die Anwendung physikalischer Methoden in Medizin und Biologie zu verstehen. Ein Hauptarbeitsgebiet der B. ist die Treffertheorie, ferner die Erforschung des submikroskopischen Feinbaues biologischer Strukturen, z.B. der Proteine, des Protoplasmas, der Zellkerne und Chromosomen, der Zellwände und Stützgewebe sowie der Untersuchung der Reizleitung im Nerv. *Perry Rhodan Lexikon, Folge 184*

Einzelmolekülmessungen mit
Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
und
Fluoreszenzkreuzkorrelationspektroskopie
in lebenden Zellen

Von der Fakultät Mathematik und Physik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von:

Elmar Thews

aus Menden (Sauerland)

Hauptberichter:	Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter:	Prof. Dr. Clemens Bechinger
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Udo Seifert
Tag der mündlichen Prüfung:	13. Juni 2005

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart
2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Biologische Grundlagen	4
2.1	Fluorophore	5
2.1.1	Lipidgebundene Fluorophore	6
2.1.2	Autofluoreszierende Proteine	7
2.2	Zellmodelle	11
2.3	Interzellulare Kommunikation	12
2.3.1	Kommunikation mittels gap junctional plaques	13
2.3.2	Apoptose	15
3	Fluoreszenzmikroskopie mit evaneszenter Anregung	18
3.1	Physikalische Grundlagen	18
3.2	Experimenteller Aufbau	20
3.2.1	Aufrechtes TIRF Mikroskop	20
3.2.2	Inverses TIRF Mikroskop	24
3.2.3	Detektionseffizienz	26
3.3	Diffusion	28
3.3.1	Freie Diffusion	29

3.3.2	Anomale Diffusion	31
3.3.3	Eingeschränkte Diffusion	32
3.3.4	Gerichtete Diffusion/aktiver Transport	32
3.3.5	Klassifizierung der Bewegungsmoden	33
3.4	Auswertesoftware	33
3.5	Diffusion von Connexin46-Hexameren	36
3.5.1	Testmessungen an fluoreszenzmarkierten Lipiden in Zellen	36
3.5.2	Einzelmolekülnachweis	36
3.5.3	Experimentell bestimmte Bewegungsmoden	39
3.6	Diffusion von TNF-R2 Rezeptoren in HeLa Zellen	47
4	Konfokale Mikroskopie	50
4.1	Motivation	50
4.2	Physikalische Grundlagen	53
4.3	Korrelationsfunktionen	55
4.3.1	Limitierungen dieses Modells	58
4.3.2	Erweiterung auf diffundierende ECFP/Cx ₄₆ – EYFP/Cx ₄₆ Hexamere	59
4.4	Experimenteller Aufbau	60
4.5	Ergebnisse	63
4.5.1	Zelllysate mit ECFP und EYFP	66
4.5.2	Zelllysate mit der ECFP/EYFP Chimäre	68
4.5.3	HeLa Zellen mit ECFP/Cx ₄₆ und EYFP/Cx ₄₆	70
5	Zusammenfassung	73
	Literaturverzeichnis	81

Abkürzungsverzeichnis

ARB2vis,nir	Anti-Reflex Beschichtung 2, visuelles/nahinfrarotes Spektrum
BBO	β -Barium Borat; β -BaB ₂ O ₄
cw	continious wave
Cx46	connexin46 (Molekulargewicht 46 kDa)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPSSL	diode pumped solid state laser
AFP	auto-fluorescent protein
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
ER	endoplasmatic reticulum
FCCS	fluorescence cross correlation spectroscopy
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
HeLa	Henriette Lacks Gebärmutterhalskrebszellen
MDBK	Madin-Darby bovine kidney
MDCK	Madin-Darby canine kidney
Nd:YAG	neodymium doped yttrium aluminum garnet (Y ₃ Al ₅ O ₁₂)
NFκB	nuclear factor κ B
PSF	point spread function
SPT	single particle tracking
TIRFM	total internal reflection fluorescence microscopy
Ti:Sa	titan doped sapphire
TNF	tumor necrosis factor
TNF-R1/2	tumor necrosis factor receptor 1/2
TRAF2	TNF receptor associated factor

abstract

Single Molecule Microscopy evolved in recent years to a promising toolbox to measure the dynamics of small amounts of target-molecules *in vivo*. This disquisition consists of two main parts: (i) **total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy** used to monitor membrane proteins – a channel protein (connexin46) as well as a receptor (TNF-R2) – in the plasmamembrane of living human cancer cells. (ii) **crosstalk-free fluorescence cross correlation spectroscopy (cf-FCCS)** to measure the colocalisation of autofluorescent protein labelled molecules in living cells.

In the first part the custom-built setups of an upright and an inverse, prismless TIRF microscope with single molecule detection sensitivity are introduced. They were used to detect different kinds of movement modes – namely brownian motion, anomalous diffusion, coralled diffusion and drift/directed transport – of connexon-hemichannels and TNF-R2 receptors in the plasmamembrane of living cells. These results are compared to fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements on the same systems to expose strengths and weaknesses of both techniques.

The second part describes the idea – and its realisation – to built a crosstalk-free FCCS setup for the, in cell biology for their specificity and non-toxicity widely used, autofluorescent proteins cyan fluorescent protein (ECFP) and yellow fluorescent protein (EYFP) by discriminating the fluorescence in the excitation spectrum rather than in emission as usual. A pulsed excitation with two alternating laser frequencies and the time correlated single photon counting detection technique enables us to calculate autocorrelation and crosscorrelation functions and therefore the amount of associated diffusing particles. Here the setup is ultimately tested with specimens in lysates and double labelled connexon-hemichannels in living cells.

Die Einzelmolekülmikroskopie entwickelte sich in den letzten Jahren zu einer vielversprechenden Methodensammlung zur Messung der Dynamik selbst kleinster Molekülkonzentrationen *in vivo*. Diese Abhandlung besteht inhaltlich aus zwei Teilen: (i) **Totale Interne Reflexions Fluoreszenz (TIRF) Mikroskopie** zur Messung von Membranproteinen – ein Kanalprotein (Connexin46) und einen Rezeptor (TNF-R2) – in der Plasmamembran von lebenden menschlichen Krebszellen. (ii) **crosstalkfreie Fluoreszenz Kreuz-Korrelations Spektroskopie (FCCS)** zur Bestimmung der Kolokalisation von mit autofluoreszierenden Proteinen markierten Molekülen in lebenden Zellen.

Der erste Teil enthält die Beschreibung der selbstgebauten aufrechten und inversen, prismafreien TIRF Mikroskope mit Einzelmoleküldetektionsempfindlichkeit. Sie dienen zur Messung der Bewegungsmodi – brownische Diffusion, anomale Diffusion, eingeschränkte Diffusion und Drift/gerichteter Transport – von Connexin-Halbkanälen und TNF-R2 Rezeptoren in der Plasmamembran von lebenden Zellen. Die Ergebnisse werden mit Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) Messungen an den gleichen Systemen verglichen, um die Stärken und Schwächen der jeweiligen Methode hervorzuheben.

Der zweite Teil beschreibt die Idee – und dessen Realisierung – zu einem crosstalk-freien FCCS Aufbau für die, in der Zellbiologie wegen ihrer Spezifität und Ungiftigkeit für Zellen weit verbreiteten, autofluoreszierenden Proteine Cyan Fluoreszierendes Protein (ECFP) und Gelb Fluoreszierendes Protein (EYFP) durch Diskriminierung der Fluoreszenz im Anregungsspektrum anstatt, wie üblich, im Emissionsspektrum. Dies wird mit gepulster Anregung mit zwei alternierenden Laserfrequenzen und der Detektion jedes einzelnen Fluoreszenzphotons mit einer time correlated single photon counting Karte erreicht, deren Ausgabe zur Berechnung der Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen herangezogen wird. Letztere gibt den Grad der Kolokalisation an. Dieses Kapitel enthält den Aufbau und die Testmessungen in Lysaten und an bichromatisch markierten Connexin46-Hexameren in lebenden Zellen.

Kapitel 1

Einleitung

Laut Richard P. Feynmans Rede „There’s Plenty of Room at the Bottom“ [1] hat die Evolution bereits das erreicht, worum sich heute der gänzlich neue Forschungszweig der Nanotechnologie bemüht: Die Miniaturisierung von Information oder Funktion in Form von Maschinen bis auf atomare Dimensionen. So benötigt die Natur nur etwa 50 Atome, um ein Bit in der DNS zu kodieren – die neueste Chiptechnologie braucht bei einem Einzelelektronentransistor dazu derzeit 10^6 Atome [2]. Ein molekularer Motor wie die ATPase (Adenosintriphosphat Synthese) besteht aus 10^5 Atomen – der kleinste derzeit bekannte synthetische Motor aus 10^{10} Atomen [3].

Ein Blick auf die Biologie scheint also angeraten, wenn man zu immer kleineren Strukturen in der Mikromechanik vorstoßen will. Andererseits fasziniert die Nanomaschinerie der Zellen nicht nur Ingenieure, sondern auch die um die Aufklärung der Lebensfunktionen bemühten Forscher der Lebenswissenschaften. Auf sie zielt Feynmans Ratschlag aus derselben Rede: „It is very easy to answer many of these fundamental biological questions; you just look at the thing!“. Er meinte damit die Verbesserung der Auflösung von Mikroskopen um zwei Größenordnungen, doch es geht auch anders.

In den späten 80er Jahren wurde von den ersten Detektionen einzelner Moleküle

im Fluoreszenzkontrast berichtet [4, 5]. Nachdem sich darauf folgend das Forschungsinteresse auf die photophysikalischen Eigenschaften einzelner Moleküle – beispielsweise die direkte Beobachtung quantenmechanischer Effekte, wie den Übergang eines angeregten Moleküls in den spinverbotenen Triplettzustand [6] – konzentrierte [7, 8], kam man Mitte der 90er Jahre zu den biologischen Motoren und Werkzeugen zurück, da man den Wert von empfindlichen Einzelmolekülmessungen im Vergleich zu Ensemblemessungen erkannte. So wurde das Verhalten einzelner fluoreszenzmarkierter Lipide in künstlichen, autofluoreszenzarmen Phospholipidmembranen ebenso untersucht [9], wie die Funktion von Motorproteinen *in vitro* mit anregungsvolumenverringenden Methoden wie der Totalreflexions Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) [10]. Aufsehenerregende Veröffentlichungen gelangen der Gruppe von Kinosita, die die Drehung einzelner ATPasen in 120° Schritten beobachten konnte [11], den Gruppen um Hochstrasser und Köhler, die Messungen zur elektronischen Struktur von bakteriellen Antennen-Komplexen LH-1/2 durchführten [12, 13], der Bräuchle-Gruppe, die einzelne Viren bei ihrem Zelleintritt verfolgten [14], oder die Beobachtung der Yanagida-Gruppe, die einzelne chemotaxieauslösende Rezeptoren in lebenden Zellen beobachtete [15].

Mit der Nutzbarmachung autofluoreszierender Proteine (AFP) aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* [16] eröffneten sich neue Möglichkeiten für minimalinvasive Einzelmolekülmessungen in lebenden Zellen. Die in den klassischen Anfärbemethoden verwendeten zelltoxischen, synthetischen Farbstoffe konnten nun durch Fluorophore substituiert werden, die von den Zellen selbst hergestellt wurden. Der zusätzliche Vorteil der hohen Spezifität der Färbung (die AFPs werden immer zusammen mit dem zu untersuchenden Protein expremiert, d.h. transkribiert und von Ribosomen synthetisiert) machte diese Technik schnell unter den Zellbiologen beliebt. Der Nachteil der schlechteren photophysikalischen Eigenschaften der neuen Fluorophore – niedrige Extinktionskoeffizienten, schnelleres Bleichen, geringere Sättigungsintensität [17] – verzögerte allerdings ihre Verwendung in Einzelmolekülmessungen bis zum Jahrtausendwechsel [18, 19, 20].

Doch insbesondere in der Zellbiologie gibt es zahlreiche Anwendungen, die Ein-

zelmolekülmessungen mit autofluoreszierenden Proteinen erfordern. Beispielsweise bei der Untersuchung von Signalkaskaden in Zellen, die einem biologischen Verstärker entsprechen, da sie aus geringsten Konzentrationen von Botenmolekülen eine global beobachtbare Zellantwort generieren. Einen unverfälschten Ablauf solcher Prozesse zu garantieren ist nur mit den geringen, endogenen Konzentrationen der daran beteiligten Membranrezeptoren zu gewährleisten, worin sich die neuen Techniken bewährten.

Parallel zu diesen Entwicklungen kam es auch in der konfokalen Mikroskopie zu Durchbrüchen in der Analyse der Funktion verschiedener Proteine mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) [21, 22]. Hier beobachtet man den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz einiger hundert Moleküle, die, statistisch verteilt, nacheinander durch einen fokussierten Anregungslaser in der Probe diffundieren. Daraus gewinnt man im Wesentlichen die Diffusionskonstante der mit Fluorophoren markierten Strukturen [23, 24, 25, 26, 27].

Die Erweiterung dieser Technik zur molekularen Kollokalisierung von zwei Molekülen ist die Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS), mit der die Bindung zwischen Proteinen untersucht werden kann [28, 29, 30, 31]. Erst kürzlich ist es dabei gelungen diese Technik auch in lebenden Zellen mit künstlichen Fluorophoren anzuwenden [32, 33]. Die natürliche Entwicklung der Verwendung autofluoreszierender Proteine in Kombination mit FCCS wird in dieser Abhandlung in Kapitel 4 beschrieben.

Diese Arbeit gliedert sich nach einer kurzen Einführung der biologischen Grundlagen in zwei Kapitel. Das Erste behandelt den Aufbau zweier TIRF Mikroskope und die damit durchgeführten Messungen verschiedener Bewegungsmoden an Membranproteinen in lebenden Zellen. Dabei wird auf die Vor- und Nachteile von single particle tracking (SPT) im Vergleich zu FCS eingegangen. Kapitel 4 enthält den Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit gepulster Zweifarbenanregung zur Messung der Kollokalisierung von an autofluoreszierende Proteine gebundene Moleküle in lebenden Zellen mit FCCS.

Kapitel 2

Biologische Grundlagen

Biologische Studien kann man in fünf Hierarchien unterteilen. Die Unterste befaßt sich mit den kleinsten Bestandteilen der lebendigen Materie, den Molekülen und deren Biochemie. Die zweite Ebene beinhaltet Arbeiten an Zellmodellen, in denen die Moleküle – Proteine, Lipide, DNS/RNS etc. – in ihrer mehr oder weniger natürlichen Umgebung untersucht werden. Die mittlere Ebene befaßt sich mit aus Zellen zusammengesetzten Organen. Hier kommen neue Aspekte im Bereich Zell-Zellkommunikation komplexitätssteigernd hinzu. Die dieses überspannende Ebene ist die der Tier- oder Pflanzenmodelle, die den gesamten lebensfähigen Organismus in den Fokus der Bemühungen stellt. Die letzte und größte Ebene stellt das gesamte Ökosystem mit allen Beeinflussungen von außen und durch andere Organismen dar. Die Aussagekraft verschiedener Studien wird daher häufig unterschiedlich bewertet, je nachdem welcher Ebene sie angehören.

In dieser Arbeit sind Proben der zweiten Hierarchiestufe untersucht worden. Diesbezüglich geht sie über die üblichen Betätigungsfelder der Biophysik auf der ersten Hierarchieebene (Kernspinresonanz an Proteinf Fragmenten, Elektronenmikroskopie, Röntgenstrukturaufklärung) hinaus. Der so prinzipiell gestiegenen biologischen Aussagekraft der Experimente stehen Probleme in der eindeutigen Interpretation der Einzelergebnisse gegenüber. Der übliche Weg der Inanspruchnahme der Statistik hilft hier nur bedingt weiter, da z.B. gemessene Diffusionskonstan-

ten durch Wechselwirkungen mit den unterschiedlichsten Strukturen in der Zelle über mehr als eine Größenordnung variieren können und so die Berechnung des Mittelwerts oder der Varianz der Verteilung ohne Kenntnisgewinn durchgeführt wird.

Dieses Kapitel gibt eine Einführung in biologische Sachverhalte, die zum Verständnis der Messungen in Kapitel 3 und 4 nötig sind. Es geht zuallererst auf die Eigenschaften einiger Fluorophore, die u.a. an die in dieser Arbeit untersuchten Proteine gebunden werden, ein. Es folgt eine Beschreibung der biochemischen Technik, mit der man Proteine mit Fluorophoren in Zellen inseriert. Auf Letztere wird dann im Folgenden näher eingegangen. Zum Schluß werden Details zur biologischen Funktion der untersuchten Proteine (Connexine und TNF Rezeptoren) aufgeführt. Bei weiterführenden Fragen zur Biochemie und Zellbiologie ist das Lehrbuch von Bruce Alberts zu empfehlen [34].

2.1 Fluorophore

Die derzeit einzige Möglichkeit einzelne Moleküle in lebenden Zellen zu beobachten ist die der Detektion ihrer Fluoreszenz. Die Eigenfluoreszenz von Proteinen beschränkt sich dabei auf die der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, die im ultravioletten Bereich des sichtbaren elektromagnetischen Spektrums angeregt werden können. Diese Fluoreszenz ist allerdings zu unspezifisch, da beinahe jedes Protein diese Aminosäuren enthält und deren Messung experimentell schwer zu realisieren, weil viele kleine Metabolite ebenfalls in diesem Spektralbereich fluoreszieren und so den Meßuntergrund erhöhen.

Daher müssen die zu untersuchenden Strukturen in der Zelle mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Die erste Methode ist eine Markierung der Strukturen mit synthetischen Farbstoffen. Diese haben sehr gute optische Eigenschaften – hohe Extinktion, hohe Quantenausbeute, hohe Sättigungsintensität und geringes Bleich- und Blinkverhalten – und sind relativ klein, so daß sie biologische

Funktionen ihrer Trägerproteine in der Regel nicht stören. Auf der anderen Seite steht ihr wenig spezifisches, bzw. sehr aufwendiges Markierungsverhalten: übliche Techniken, wie z.B. die kovalente Bindung der Farbstoffs über eine Maleimidgruppe an die Aminosäure Cystein müssen am aufgereinigten Protein außerhalb der Zelle durchgeführt werden, um dann das Protein wieder in das Untersuchungsobjekt zu reinsertieren – oder der Farbstoff wird mit einer der mannigfaltigen Antikörperfärbetechniken an das Zielmolekül gebunden; hierbei hängt die Spezifität der Färbung von der Qualität des Antikörpers, dessen sterische Hinderung zusätzlich nachteilig ist, ab.

Die zweite, neuere Methode ist die der Färbung mit autofluoreszierenden Proteinen (AFPs). Diese liegen als Bauplan (DNS-Ring) vor und können an den Bauplan des Zielproteins angehängt werden. Dieses als Vektor bezeichnete Konstrukt läßt man durch Bakterienkulturen vervielfältigen (klonen) und gibt es auf die Zellkulturen. Nach Aufnahme des DNS-Stücks (Plasmidring) durch die Zelle, produziert sie dann mit ihren Proteinsyntheseeinheiten, den Ribosomen, das Fusionsprotein und transportiert es in den dafür vorgesehenen Teil der Zelle (s. Kap. 2.1.2). Um sicherzustellen, daß das angehängte AFP die biologische Funktion nicht stört, wird es von einer kleinen Polypeptidsequenz – dem Linker – von der Proteinsequenz getrennt. Somit erreicht man mit dieser Methode eine ideale Spezifität, muß aber im Vergleich zu synthetischen Farbstoffen schlechtere optische Eigenschaften und einen großen, möglicherweise sterisch hinderlichen, Farbstoff hinnehmen.

2.1.1 Lipidgebundene Fluorophore

Zur Untersuchung von Membranviskositäten eignen sich synthetische Fluoreszenzfarbstoffe, die kovalent an Membranlipide gebunden sind (s. fluorescence recovery after photobleaching – FRAP Experimente [35, 36]; Beispiellipid siehe Abbildung 2.1). Wir benutzen Lipofluorophore der Firma Molecular Probes (DiO, DiI), die man auf die Zellen gibt und die in die Zellmembran ein-

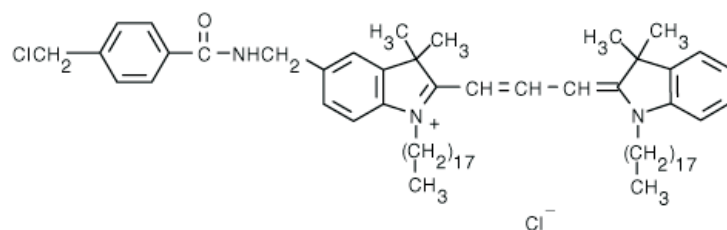


Abbildung 2.1: Chemische Struktur des Lipofluorophors DiI. Der Membrananker zeigt nach unten.

gebaut werden. Die Absorptionsspektren dieser Farbstoffe sind auf die üblichen Argon-Laserwellenlängen, bzw. die des frequenzverdoppelten Nd:YAG Lasers abgestimmt (s. Abb. 2.2).

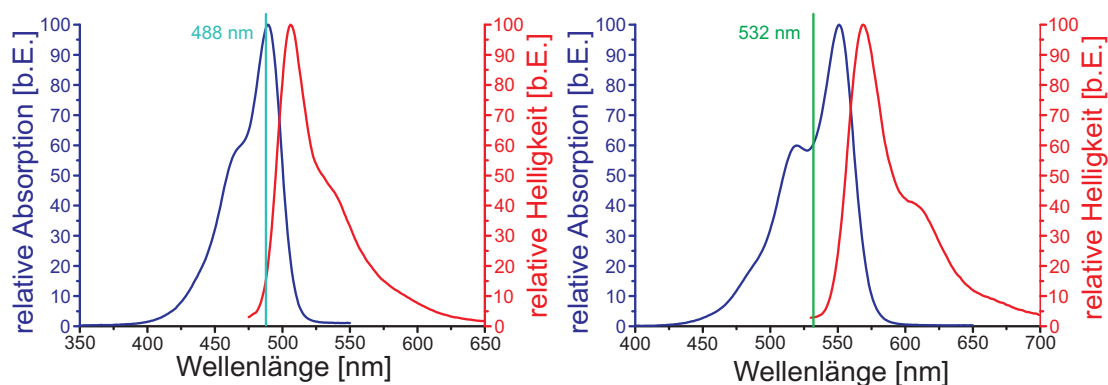


Abbildung 2.2: Fluoreszenzemissions- und Absorptionsspektren von DiO (**links**) und DiI (**rechts**). Die senkrechten Linien bezeichnen die Anregungswellenlänge.

2.1.2 Autofluoreszierende Proteine

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde 1962 in der Tiefseequalleart *Aequoria victoria* entdeckt [37]. Es dauerte aber noch 30 Jahre, bis das verantwortliche Gen identifiziert war und geklont werden konnte [38]. Die erste Übertragung

des Gens auf einen anderen Organismus mit nachweisbarer Fluoreszenz gelang in der Folge Inouye et al. [39]. Seitdem wurden die optischen Eigenschaften vermessen, die Übertragung auf Säugerzellen bewerkstelligt und eine Reihe zufälliger Punktmutationen durchgeführt, die mittlerweile einen ganzen Zoo verschiedener spektraler Mutanten erzeugten, die je nach ihrem Maximum der Anregungswellenlänge mit den Prefixen blue, cyan, green und yellow bezeichnet werden. Desweiteren wurde pH-Wert abhängige Fluoreszenz demonstriert und versucht viele weitere äußere Einflüsse auf den Fluorophor nutzbar zu machen [16]. Um auch den roten Spektralbereich zu erschließen, werden verwandte Proteine aus Korallen und anderen Quallenarten isoliert und zu kommerziellen Produkten weiterentwickelt (z.B. DsRed, Clontech Inc.).

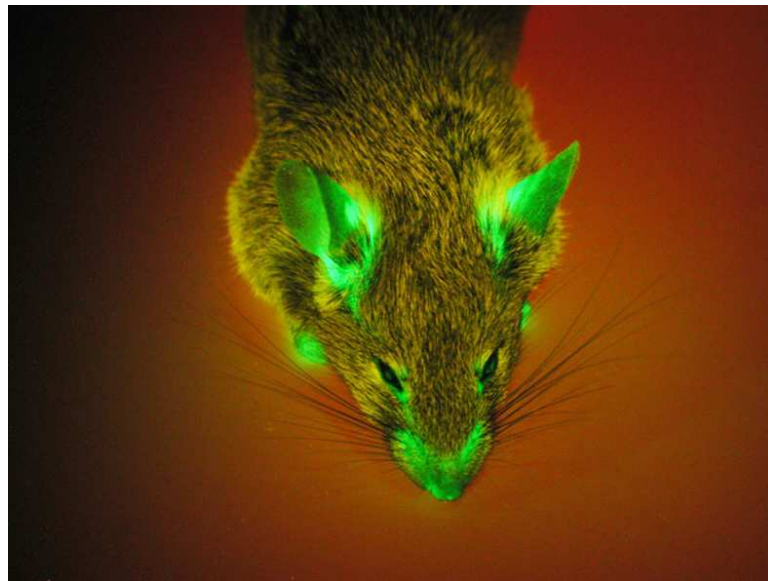


Abbildung 2.3: Blau beleuchtete transgene Maus, in deren Hautzellen GFP exprimiert wird [40].

Die Röntgenstruktur des Proteins zeigt ein aus elf Proteinsträngen in β -Faltblattstruktur aufgebautes Faß (β -Barrel), in dessen Inneren vier Aminosäuren den optisch aktiven Teil des Proteins bilden (s. Abb. 2.4). Punktmutationen in diesem Bereich erschlossen die spektralen Varianten dieses Proteins. Das den Fluo-

rophor umgebende β -Barrel macht es weitestgehend umgebungsunempfindlich, zum Beispiel gegenüber dem pH-Wert, obwohl auch hier sensibilisierte Mutanten existieren. Die Größe des Proteins – das Faß hat einen Durchmesser von 3 nm und eine Länge von 4 nm – kann zu sterischen Behinderungen der Funktion des daran gebundenen zu untersuchenden Proteins führen, oder aber die Diffusion einschränken.

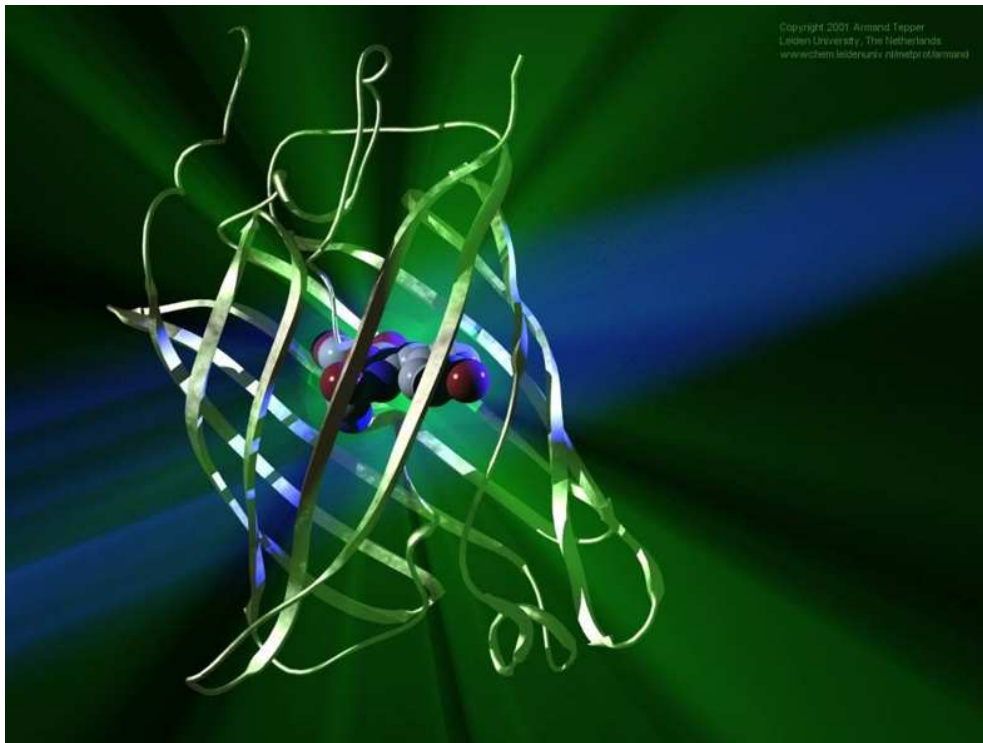


Abbildung 2.4: Proteinstruktur von GFP [41]. Das β -Barrel ist in Cartoon- und der optisch aktive Teil des Proteins in van-der-Waals Radius Darstellung abgebildet. Die künstlerische Darstellung der blauen Anregungswellenlänge von rechts kommend erzeugt die grüne Fluoreszenz des wildtype (*wt*-)Proteins.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich GFP-Mutanten der Firma Clontech Inc. mit dem Markennamen Living Colors™ verwendet. Diese führen die Vorsilbe enhanced im Namen, so daß im Folgenden von ECFP, EGFP und EYFP für die blauen, grünen und gelben Mutanten die Rede sein wird.

Normierte Absorptions- und Emissionsspektren der spektralen Varianten der in Messungen verwendeten Mutanten zeigt Abbildung 2.5. Die DsRed Mutante ist nur in tetramerisierter Form fluoreszierend und somit für Einzelmoleküluntersuchungen nur beschränkt einsetzbar, da die Tetramerisierung die zu untersuchenden Proteine, an die die Monomere fusioniert sind, preassoziiert und unter Umständen in ihrer Bewegungsfreiheit und Funktion einschränkt.

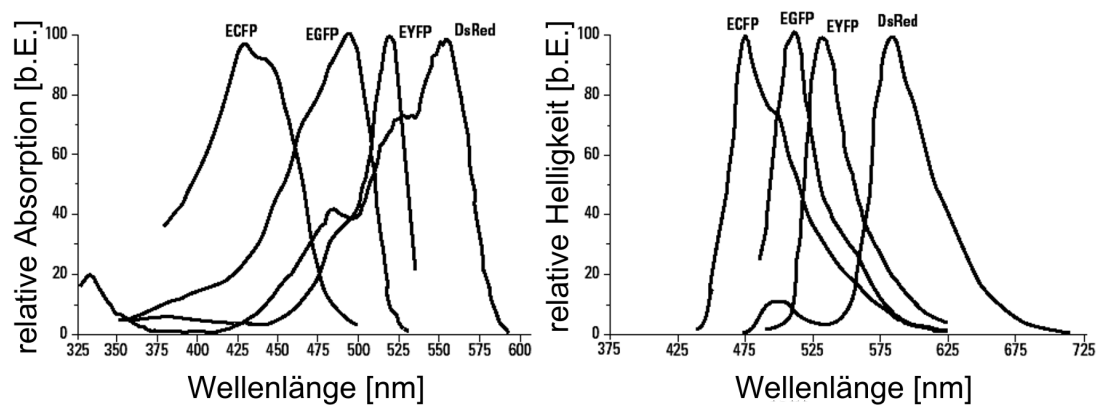


Abbildung 2.5: Normierte Absorptions- und Emissionsspektren der GFP Mutanten ECFP, EGFP, EYFP und DsRed.

Heterologe Expression

Um wildtyp, oder genetisch modifizierte Proteine (z.B. aus Kap. 2.3.1/2.3.2) in lebenden Zellen zu untersuchen, benutzt die molekulare Zellbiologie die Technik der heterologen Expression. Der bekannte Bauplan des Proteins wird in einen DNS-Ring (Plasmidring) codiert und kann nun genetisch verändert werden. Beispielsweise kann die DNS Sequenz eines biologischen Fluorophors (s. Kap. 2.1.2) angehängt und dann der entstandene Plasmidring in Bakterien vervielfältigt werden. Dieses Genmaterial muß dann in die Zelle eingeschleust werden. Häufig verwendet man dazu Lipidvesikel (z.B. Lipofectin™, Life Technologies), die mit der Plasmamembran fusionieren und das Plasmid in das Zytoplasma der Zelle entlas-

sen. Die Effizienz einer solchen Transfektion beträgt bei optimalen Bedingungen etwa 30 % der Zellpopulation. Bei einer transienten Kotransfektion zweier Fusionsproteine in zwei Plasmidringen ist die kombinierte Aufnahmewahrscheinlichkeit beider Konstrukte nicht das Produkt der Einzelwahrscheinlichkeiten, sondern nahe an der Einzeltransfektionseffizienz, weil der Aufnahmemechanismus kooperativ ist.

Die Zelle stellt nun die mRNA her, mit dessen Hilfe die Ribosomen das Fusionsprotein synthetisieren. Nach etwa 48 h wird das freie DNA Material im Zytoplasma abgebaut und die Produktion des Fusionsproteins kommt wieder zum Erliegen. Es öffnet sich also nur ein zeitliches Meßfenster von einigen Stunden. Zudem variiert die hergestellte Proteinmenge von positiv transfizierter Zelle zur nächsten erheblich, so daß es von Vorteil sein kann spät in diesem Fenster zu messen, da dann Zellen mit zu hoher Expressionsrate für die Einzelmolekülmessung aufgrund der Zelltoxizität der im endoplasmatischen Retikulum (ER) oder im Golgi-Apparat angereicherten Fusionsproteine abgestorben sind.

2.2 Zellmodelle

Experimente zur Bestimmung einer Meßgröße in Zellen zeigen eine hohe Variabilität der Werte, da zwei Zellen nie exakt gleich sind. So können sie sich beispielsweise in verschiedenen Zellzyklusphasen befinden, oder sie verhalten sich abhängig von der Anzahl der benachbarten Zellen unterschiedlich. Die in dieser Arbeit vermessenen Zellmodelle (Zelllinien) können bei Beginn des Experimentes nicht in denselben Ausgangszustand im zellinternen und Umgebungs-Parameterraum gebracht (synchronisiert) werden, um eine exakte Reproduktion der Meßwerte zu erzielen, da diese Räume, in Anbetracht der ungeheuren Komplexität des biologischen Systems Zelle, sehr groß sind.

In Untersuchungen zur Zellbiologie werden häufig permanentwachsende Zellkulturen (hier in Kultur genommene Krebszelllinien) verwendet, weil so Zellen in

ausreichender manipulierbarer Form zur Verfügung stehen. Der Nachteil dieser Praxis ist in der genetischen Instabilität des Zellmaterials zu sehen, da Krebszellen sehr schnell mutieren und so ihren Genotyp, als auch ihren Phänotyp verändern. Dagegen sollen Zelllinienbanken helfen, die den Forschern identisches Zellmaterial liefern. Dennoch kommt es vor, daß einzelne Studien zu einem Protein in der Zelle nur mit einer Zelllinie aus einem Labor gut funktionieren und von anderen Gruppen nur unvollständig oder mit weit geringerer Evidenz wiederholt werden können, es sei denn, sie erhalten den Originalstamm der Entdeckergruppe.

Hier wurden die Experimente hauptsächlich an einer HeLa-Zelllinie vorgenommen, da diese Gebärmutterhalskrebszellen – 1951 von der Patientin Henriette Lacks ohne ihr Wissen entnommen – einfach zu handhaben sind, auf verschiedenen Oberflächen adhärieren und, bei korrekter Vorbehandlung, eine geringe Autofluoreszenz im sichtbaren Spektralbereich aufweisen. Das Problem der genetischen Variabilität von Krebszellen (insbesondere von solchen, die schon seit 1951 verwendet werden) tauchte auch in unseren Studien auf, wenn z.B. eine mit Bakterien kontaminierte Zellpopulation verworfen werden mußte und die aufgetaute Ausgangszelllinie ein anderes Transfektionsverhalten (s. voriges Kapitel) aufwies als zuvor. Einige Messungen wurden auch an polaren Nierenzellen, wie der MDCK und MDBK (Madin-Darby canine/bovine kidney) Zelllinie vorgenommen, die in einen konfluenten Zellrasen (Zellmonolage) auf Deckgläsern aufwachsen und ebenfalls eine geringe Autofluoreszenz zeigen.

2.3 Interzelluläre Kommunikation

Zellen im Zellverbund mehrzelliger Organismen müssen ständig Informationen austauschen, um die Funktion, z.B. des Organs, sicher zu stellen. Jedwege Kommunikation erfolgt über zwei Mechanismen: die erste Methode benutzt spezielle Proteine in der Plasmamembran der Zelle, die als Tür fungieren. Diese Membrankanäle können hochspezifisch sein und sind in ihrer Durchlässigkeit regelbar.

Die zweite Methode ist die der Informationsübertragung ohne Massenübertragung über Membranrezeptoren, die hochspezifisch ein Botenmolekül außerhalb der Zelle erkennen und die Information ins Innere übertragen. Dabei fungieren die Rezeptoren als Signalverstärker, da nur wenige Botenmoleküle ausreichen müssen, um die gewünschte zelluläre Antwort zu generieren (s. Kap. 2.3.2).

2.3.1 Kommunikation mittels gap junctional plaques

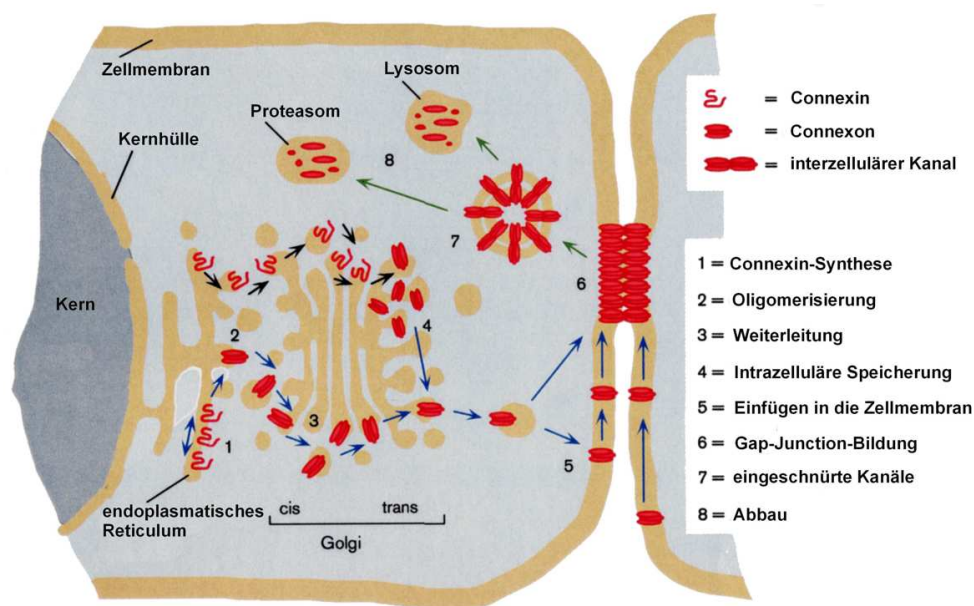


Abbildung 2.6: Lebenszyklus des Connexins von 1 (Synthese) bis 8 (Degradation). Näheres siehe Text.

Connexon-Halbkanäle gehören zur ersten Klasse der Informationsüberträger [42]. Sie werden aus sechs Connexinproteinen gebildet, die beim Menschen einer Proteinfamilie mit mindestens 20 unterschiedlichen Mitgliedern angehören [43]. Dabei sind Homo- und Heterohexamere möglich, allerdings nicht in beliebiger Kombination. Der Synthese-Degradationszyklus der Connexine (s. Abb. 2.6) beginnt mit der Herstellung im rauen ER durch Ribosomen. Noch im ER oligomerisieren die Connexine und bilden die Connexon-Halbkanäle. Diese durchlaufen den Golgi

Apparat, in dem verschiedene Modifikationen durchgeführt werden können. Dann werden sie mit Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort inseriert. In der Membran angekommen bilden sie an Zell-Zellkontaktflächen mit je einem Connexon-Halbkanal der angrenzenden Zelle einen Zell-Zellkanal. Solche Kanalporen treten in Ansammlungen mehrerer Connexon-Kanäle in zweidimensional geordneter hexagonaler Form als gap junctional plaque auf (s. Abb. 2.7) und erfüllen nun ihre primäre Funktion. Bei Verlust ihrer Funktionalität werden die kompletten Kanäle in Doppelmembranvesikeln zur Degradation der Proteine in Lysosome oder Proteasome gebracht und dort zersetzt [44].

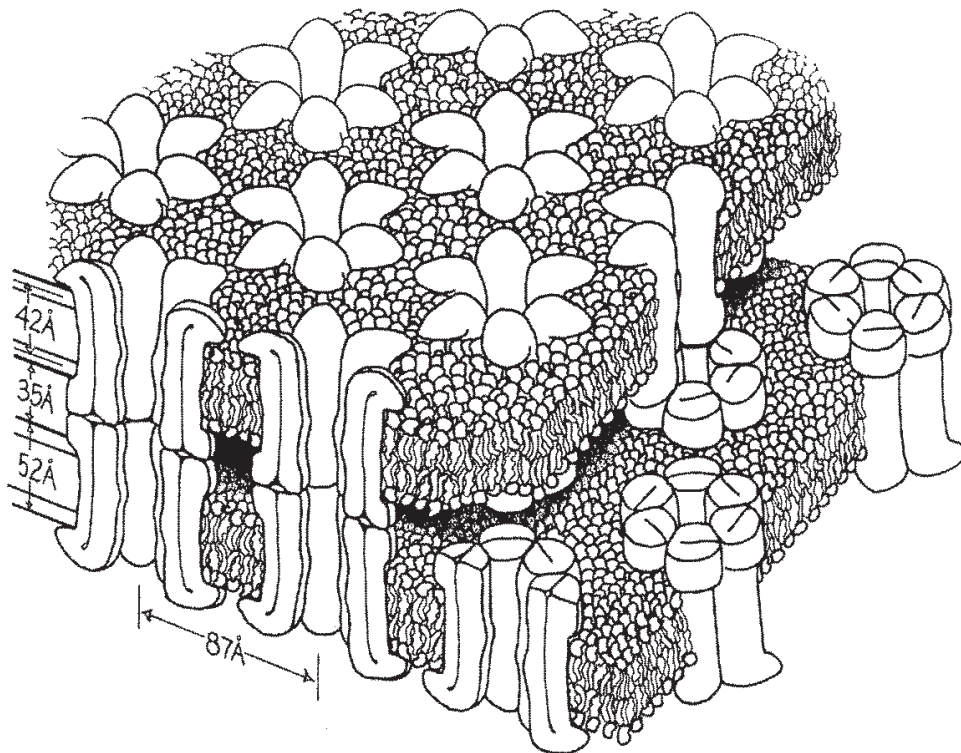


Abbildung 2.7: Modell eines gap junctional plaque, der aus Connexon-Kanälen aufgebaut ist, die sich zweidimensional in einer hexagonalen Struktur ordnen.

Die Größe der Kanalpore erlaubt den Transit kleiner Moleküle (unspezifisch) bis etwa 1 kDa (bei Annahme einer Dichte von Proteinen von $1,35 \text{ g/cm}^3$ und

globulärer Form ergibt sich ein Kugeldurchmesser von 1,3 nm) zwischen den Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen einen Porendurchmesser von 1,5 nm an der schmalsten Stelle des Kanals [45]. Allerdings wurden in diesen Experimenten die Proteinseitenketten nicht aufgelöst, so daß ein freier Durchgang mit einem Durchmesser von 0,5 nm angenommen wird. Da die Seitenketten jedoch nicht räumlich fest verankert sind, können auch größere Proteine bis zu der beobachteten Schranke von 1 kDa passieren. Die Pore kann von beiden Seiten unabhängig voneinander geschlossen, und so der Transport reguliert werden.

Diese Strukturen werden am Biologischen Institut der Universität Stuttgart, Abteilung Biophysik von Dr. Reiner Eckert untersucht.

2.3.2 Apoptose

In mehrzellige Organismen kommen immer wieder Situationen vor, in denen einzelne Zellen überflüssig (z.B. in der Entwicklungsphase des Organismus aber auch in der Homeostasis des erwachsenen Menschen, in der täglich etwa 10^9 Zellen sterben und ebensoviele neu entstehen) oder sogar gefährlich sind (z.B. durch induzierte genetische Schäden, Bakterien- oder Virenbefall). Für diese Fälle hat sich in Folge der Evolution der programmierte Zelltod – die Apoptose – entwickelt. Auf ein Signal durch das Immunsystem von außerhalb, oder auch autark von innerhalb der Zelle, wird über Leben und Tod entschieden. In letzterem Falle verdaut sich die Zelle mit ihrem gesamten Inhalt (DNS/RNS, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate) selbst und die entstehenden Zellreste werden von Freßzellen (Makrophagen) aufgenommen. Dabei erfolgt keine unkontrollierte Freisetzung von Zytoplasma, einem Charakteristikum des gewaltsamen Zelltodes – der Nekrose –, so daß es zu keiner Entzündungsreaktion des Organismus kommt. Ein prominentes Beispiel, wie ein Krankheitserreger dieses Programm für seine Zwecke ausnutzt ist das human immunodeficiency virus (HIV). Es gibt den T-Lymphozyten das Signal zur Apoptose, bevor diese es erkennen und den Organismus alarmieren können.

Eine Signalkaskade, die am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart in der Arbeitsgruppe von Prof. Scheurich untersucht wird, ist die der Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren 1 (TNF-R1) und 2 (TNF-R2). In Abbildung 2.8 ist diese skizziert:

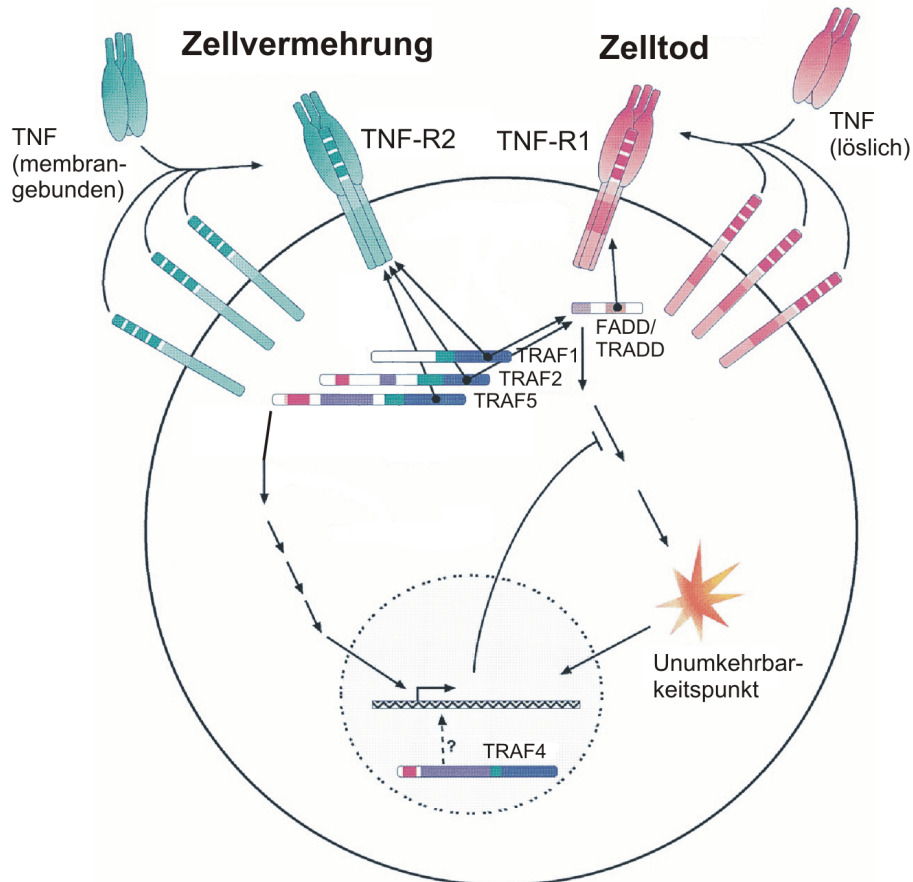


Abbildung 2.8: TNF-R1/2 Signalkaskade, die je nach physiologischen, bzw. zellulären Umständen die Zelle am Unumkehrbarkeitspunkt in die Apoptose führen kann. Näheres siehe Text.

Der Ligand – der Tumor Nekrose Faktor (TNF) – kommt in zwei Varianten vor: in löslicher Form signalisiert er vorwiegend über den TNF-R1 und als membrangebundene Variante über den TNF-R2. Betrachten wir zunächst die Signalkaskade

des TNF-R1: Durch die Bindung des Liganden trimerisiert der Rezeptor und ermöglicht es so, daß an die drei zytosolischen Todesdomänen (DD) zelleigene Proteine, die ebenfalls eine Todesdomäne besitzen (TRADD, FADD), andocken. Die Signalkaskade setzt sich fort, bis am Unumkehrbarkeitspunkt eine Gruppe von Effektorcaspasen bestimmte Proteine der Zelle spaltet und damit inaktiviert, aktiviert oder auch reguliert. Parallel dazu wird die DNS des Zellkerns in kurze, gleichlange Stücke zerschnitten und schließlich zerfällt die Zelle in viele kleine Vesikel (apoptotic bodies). Der membranständige Ligand dagegen setzt eine Signalkaskade über den TNF-R2 in Gang, die das Gegenteil bewirkt, nämlich die Produktion von Proteinen, die aktiv die Apoptose hemmen. Hierbei binden Trimere des TNF-Rezeptor assoziierten Faktors 2 (TRAF2) an das TNF-R2 Rezeptortrimer und lösen so, nach weiteren Zwischenschritten, die Aktivierung des nuclear factors κ B ($\text{NF}_{\kappa}\text{B}$) aus, der in den Zellkern transloziert und das Auslesen von Genabschnitten initiiert. Die daraus hergestellten Genprodukte stoppen nun die Aktivierung der Effektorcaspasen aus der anderen Signalkette. Bei einer Vorstimulierung der Zelle mit membrangebundenem TNF kann also die Zelle vor der Apoptose durch spätere Zugabe von löslichem TNF bewahrt werden. Um dazu membranverankertes TNF zu simulieren wurde lösliches TNF mit einem Antikörper verbunden. Dieses Konstrukt (*cys*-TNF) erbrachte eine zu membrangebundenem TNF vergleichbare TNF-R2 vermittelte Zellantwort.

Kapitel 3

Fluoreszenzmikroskopie mit evaneszenter Anregung

Das Hauptproblem der Einzelmolekülmikroskopie in lebenden Zellen ist die hohe Autofluoreszenz verschiedenster Proteine, Zellmetaboliten und sonstigen Molekülen, die das Fluorophorsignal überdecken. Beispielhaft seien hier Arbeiten über die allgegenwärtigen Flavine genannt, die sogar auf Einzelmolekülniveau beobachtbar sind [17, 46, 47]. Das übliche Mittel zur Verringerung dieses Problems ist die Verkleinerung des Anregungsvolumens. Dazu haben sich zwei Standardmikroskopietechniken etabliert: die konfokale Mikroskopie (s. Kap. 4) und die TIRF Mikroskopie. Zur Letzteren beginnt dieses Kapitel mit einer theoretischen Einführung und setzt sich mit Testmessungen an lipidgebundenen Fluorophoren in der Plasmamembran fort. Daraufhin folgen Messungen an den biologischen Systemen Connexin46 und TNF-R2 (s. Kap. 2.3.1, 2.3.2) in lebenden Zellen.

3.1 Physikalische Grundlagen

Die Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) [48] ist eine Weitfeldtechnik, mit der die Kontaktflächen der Zelle mit dem Deckglas untersucht werden können.

Die zeitliche Auflösung ist dabei abhängig von der verwendeten CCD Kamera. Zur Anregung der Fluorophore benutzt man hierbei nicht eine sich frei durch die Probe ausbreitende elektromagnetische Welle (häufig ein Laserfeld), sondern nur das evaneszente Feld oberhalb der Grenzfläche Deckglas/Wasser des dort totalreflektierten Strahls. Dieses Feld nimmt exponentiell mit der Höhe z ab (s. Gl. 3.1), so daß nur eine dünne Schicht, deren Mächtigkeit in etwa der Eindringtiefe d und deren Durchmesser dem des Beleuchtungsflecks entspricht, angeregt wird.

$$I(z) = I(0) e^{-z/d}, \quad (3.1)$$

mit

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_p^2 \sin^2 \Theta - n_w^2)^{-\frac{1}{2}}. \quad (3.2)$$

Die Totalreflexion tritt dabei nur oberhalb eines bestimmten Grenzwinkels zur Flächennormalen Θ_c der Einstrahlung auf, und das nur, wenn das Licht von einem optisch dichteren Medium n_p in ein optisch dünneres n_w trifft:

$$\Theta_c = \arcsin(n_w/n_p). \quad (3.3)$$

Dabei stehen die Suffizes der Brechungsindizes w für das hier biologisch relevante Medium Wasser und p für das Prismen- oder Deckglasmaterial.

Die funktionelle Abhängigkeit der Eindringtiefe d , bei der das elektrische Feld auf ein $\frac{1}{e}$ des Ausgangswertes abgeklungen ist, mit dem Einstrahlwinkel Θ zeigt Abbildung 3.1 für eine Laserwellenlänge λ_0 von 488 nm.

Im Grenzfall großer Winkel erkennt man, daß hochbrechende Materialien eine geringere Eindringtiefe, und damit ein kleineres Anregungsvolumen aufweisen, was für biologische Zwecke günstig ist. Desweiteren fallen Proteinaggregate auf der Oberfläche, die durch ihre lokale Erhöhung des Brechungsindex über 1,4 zur Frustration der Totalreflexion bei Quarz ($n = 1,46$) führen können, bei hochbrechenden Materialien nicht negativ ins Gewicht. Andererseits ist Quarz mit dem Handelsnamen SUPRASIL™ II (synthetisch aus der Gasphase hergestelltes, aufgereinigtes Si_2O_3) sehr arm an Eigenfluoreszenz und Streuzentren im Vergleich

zum reinsten, kommerziell erhältlichen Korundkristall Al_2O_3 ($n = 1,76$) mit dem Handelsnamen HEMEX™.

3.2 Experimenteller Aufbau

Um den speziellen biologischen Anforderungen zur Messung an lebenden Zellen gerecht zu werden, wurden zwei entsprechend angepaßte Mikroskope aufgebaut (s. Kapitel 3.2.1, 3.2.2).

3.2.1 Aufrechtes TIRF Mikroskop

Den schematischen Aufbau des aufrechten TIRF Mikroskops zeigt Abbildung 3.2. Der die verschiedenen Anregungswellenlängen zur Verfügung stellende Laser

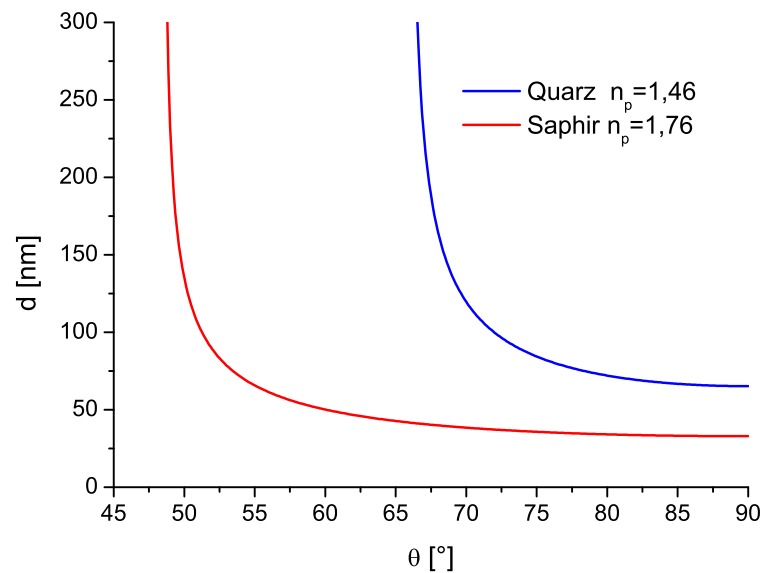


Abbildung 3.1: Aufgetragen ist die Eindringtiefe d des evaneszenten Feldes in Wasser über den Einstrahlwinkel Θ zur Grenzflächennormalen in zwei Prismenmaterialien (Quarz und Saphir).

(Innova 90 C-A3, Coherent Inc.; ILA120-1, VEB Carl Zeiss Jena) wird mit einer optischen Ausgangsleistung von 200 bis 300 mW betrieben. Zur Entfernung des Plasmauntergrundkontinuums des Gaslasers aus dem Anregungsstrahlengang wird ein 60° Quarzprisma (P1, Linos) eingefügt. Dann wird der Laserstrahl mit einem Teleskop (L1 $f = 40$ mm, L2 $f = 200$ mm 5x; Linos) auf einen Durchmesser von 15 mm aufgeweitet, um daraufhin mit der Linse L3 ($f = 250$ mm, Linos) auf die Probenfläche des Probenprismas P2 fokussiert zu werden. Dazu wurde der Strahl mit einem selbstgebauten Periskop von der Strahlhöhe des Lasers auf den gewünschten Einfallswinkel Θ abgelenkt.

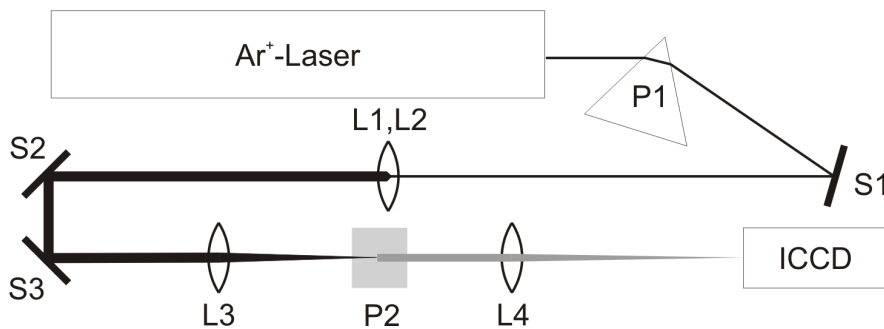


Abbildung 3.2: Aufrechtes TIRF Mikroskopaufbauschema. S, L, P stehen für Spiegel, Linse, Prisma. Näheres siehe Text.

Nach der Formel für den beugungsbegrenzten Fokusbereich einer Linse

$$w_{\text{Fokus}} = \frac{\lambda_0 f}{\pi w_e},$$

mit der Brennweite der Linse f , λ_0 für die Anregungswellenlänge (z.B. 488 nm) und w_e als Eingangsstrahldurchmesser, ergibt sich ein $w_{\text{Fokus},L3}$ von etwa $2,6 \mu\text{m}$. Dieser wird allerdings durch Astigmatismus, hervorgerufen durch einen endlichen Abstand zwischen Strahlachse und optischer Achse der Linse, erheblich aufgeweitet und mittels Verschiebung der Linse entlang der optischen Achse innerhalb der astigmatischen Differenz elliptisch geformt. Der so erzeugte Beleuchtungsfleck ist durch die Projektion des elliptischen Laserprofils unter dem Einstrahlwinkel zur

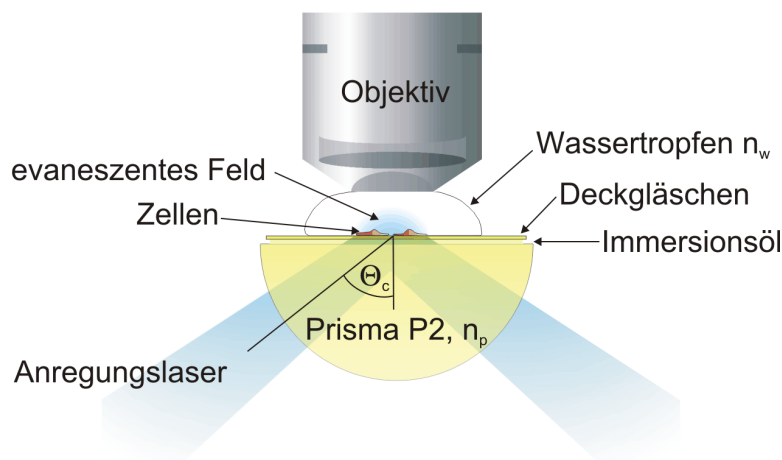


Abbildung 3.3: Aufrechtes TIRF Mikroskopaufbauschema, Detail: Probenbereich; Näheres siehe Text.

Basis von P2 wieder annähernd rund. Der Durchmesser des Beleuchtungsflecks beträgt etwa $80\ \mu\text{m}$.

Es wurden zwei Probenprismen benutzt: ein Halbzylinder aus amorphen SUPRA-SIL™ II Quarzglas mit den Abmessungen $30 \times 30\ \text{mm}$, $r = 15\ \text{mm}$ (B. Halle Nachfl. GmbH) und ein Korundeinkristall in Form eines Halbzylinders aus HEMEX™ (Kyburz AG Schweiz) mit den Abmessungen $20 \times 20\ \text{mm}$, $r = 9,5\ \text{mm}$. Bei Letzterem lag die optische Achse des doppelbrechenden Kristalls immer senkrecht zur Einfallsebene des Lasers (Polarisation senkrecht zum Tisch), so daß nur der ordentliche Strahl im Prisma propagiert, um eine inhomogene Probenausleuchtung durch Interferenzen zu verhindern. Der totalreflektierte Anregungslaser wurde dann von einem Strahlengrab absorbiert. Aus der senkrecht zum Tisch stehenden Laserpolarisation folgt eine elliptische Polarisation des evaneszenten Feldes [48], die eine homogene Anregung der Fluorophore sicherstellt.

Die Prismen, und somit die Proben, konnten mit Hilfe eines selbstgebauten Prismenhalters ausgewechselt und mit darunter befestigten Lineartischen (Radiant Dyes) in x - und y -Richtung verfahren werden. An den Prismen sind je zwei Lei-

stungswiderstände thermisch leitfähig befestigt, die mit Hilfe eines Thermoelementes und einer PID-Steuerung (ITC4, Oxford) die Proben­temperatur zwischen Raumtemperatur und 37 °C regeln.

Die auf dem Prisma direkt, oder häufiger auf einem passenden Deckglas (für Quarz Heraeus Quarzglas und Kyburz AG Schweiz für Korund), das mit einem Immersionsöl an das Prisma angekoppelt wurde (Glyzerin, bzw. Methyl­iodid Sigma-Aldrich), auf­gebrachten Proben senden in erster Näherung Fluoreszenzlicht isotrop in den Raumwinkel 4π aus, das von oben mit einem Objektiv (UPLAPO 60x/1.2 Wasser, Olympus) aufge­fangen wird, dessen z -Abstand mit einem weiteren Lineartisch (Radiant Dyes) in die Brennebene verstellbar ist. Die parallelen Strahlen­bündel, die das Objektiv verlassen, werden von einem Silber­spiegel (Linos Photonics Inc.) um 90° Richtung Detektor abgelenkt, von verschiedenen Filtern (Chroma, Kaiser Optical Systems, Omega Optical) spektral von Untergrund und Anregungswellenlänge getrennt und von der Tubuslinse auf die Phosphorschicht der ICCD (I-PentaMAX Gen.IV, Princeton Instruments) abgebildet [49]. Die dort durch den äußeren Photoeffekt herausgeschlagenen Elektronen werden auf eine Mikrokanalplatte beschleunigt, in dieser vervielfacht, auf einem Leuchtschirm in Photonen umgewandelt, die von einem Array von Glasfasern auf den CCD-Chip geleitet werden, um dort durch den inneren Photoeffekt Elektron-Lochpaare zu erzeugen, die getrennt werden. Die Elektronen werden in einem Halbleitertrog gesammelt und nach der Integrationszeit durch einen A/D Wandler sequentiell ausgelesen. Diese aufwendige Prozedur dient dazu, das Ausleserauschen der Kamera, das besonders bei hohen Ausleseraten auftritt und Einzelmolekülsignale überdeckt, relativ zum Photonensignal zu verringern, indem Letzteres verstärkt wird.

Die Brennweite der Tubuslinse L4 sollte nach dem Nyquistab­stasttheorem derart gewählt werden, daß ein Airyscheibchen (die beugungs­begrenzte Abbildung eines Punktobjektes) auf etwa 4 Pixel abgebildet wird. Nach der Formel für den Abbildungsmaßstab $M = \frac{f_{\text{Tubuslinse}}}{f_{\text{Objektiv}}}$, mit $f_{\text{Objektiv}} = 3 \text{ mm}$ ergibt sich mit der Pixelgröße des CCD-Chips von 22,5 μm und dem Durchmesser des Airyscheibchens

$d = 1,22 \cdot \lambda/n.A.$ [50], mit der numerischen Apertur des Objektivs von 1,2 und einer Detektionswellenlänge von beispielsweise 510 nm (Emissionsmaximum von EGFP, s. Kap. 2.1.2) ein optimaler Abbildungsmaßstab von etwa 100 und somit eine optimale Brennweite der Tubuslinse von circa 300 mm. So verteilen sich die Photonen der einzelnen Moleküle auf ein Flächenequivalent von vier Pixeln. Eine Verringerung der Vergrößerung ermöglicht, bei gleichzeitigem Verlust der lateralen Ortsauflösung, eine höhere Bildwiederholrate oder die Messung von sehr dunklen Farbstoffen, die nur wenige Photonen pro Zeitintervall emittieren. Bei einer Erhöhung der Vergrößerung erhält man bei Signal zu Rauschverhältnissen ab etwa fünf [51, 52] eine bessere Ortsauflösung des Moleküls.

Der hier gewählte Kompromiß zwischen Orts- und Zeitauflösung wurde mit einer 400 mm Tubuslinse L4 realisiert, die einem Abbildungsmaßstab von etwa 133 entspricht, und die Fläche des Airyscheibchens auf ein Flächenequivalent von 7,4 Pixeln abbildet. Dieser Kompromiß trägt der relativ langsamen Diffusion der in dieser Arbeit vermessenen biologischen Moleküle in der Zellmembran und der geforderten hohen Ortsauflösung Rechnung. Letztere lag typischerweise im Bereich von ± 5 nm.

3.2.2 Inverses TIRF Mikroskop

Das prismenlose oder inverse TIRF Mikroskop eignet sich besonders für die Beobachtung von Molekülen, die sehr nah an der Oberfläche des Brechungsindexsprungs liegen, da ein emittierender Dipol in der Nähe einer nicht elektrisch leitenden, höherbrechenden Oberfläche ($n = 1,5$) eine vom symmetrischen $\cos^2 \theta$ Profil abweichende Emissionscharakteristik, die im Mittel 70 % der Gesamtfluoreszenz in Richtung des Materials mit dem höheren Brechungsindex emittiert [53, 54, 55, 56, 57], aufweist. Bei Zellen, deren äußere Membran etwa 50 nm [58] von der Oberfläche des Deckglases entfernt liegt, ist dieser Effekt nachrangig. Vorteilhaft dagegen ist bei diesem Aufbau die geringere Wegstrecke, die die Fluoreszenzphotonen zum Detektor zurücklegen müssen. Beim aufrechten Aufbau da-

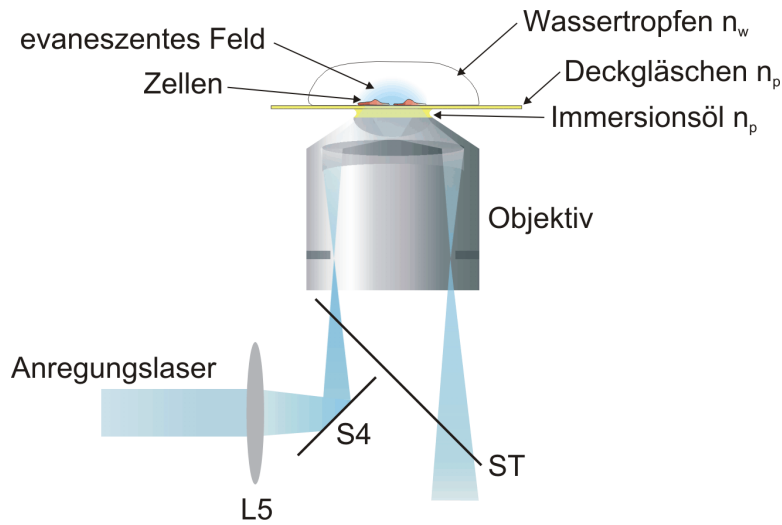


Abbildung 3.4: Inverses TIRF Mikroskopaufbauschema, Detail: Probenbereich; S, L, ST stehen für Spiegel, Linse und dichroischer Strahlteiler. Näheres siehe Text.

gegen können die Photonen bei ihrem Weg durch die etwa $10\ \mu\text{m}$ dicke Zelle gestreut werden, was der Bildschärfe und Helligkeit abträglich ist.

Der vom aufrechten TIRF Mikroskop abweichende Teil ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Der Anregungslaser wird von einer Linse L5 ($f = 200\ \text{mm}$, Linos) in die hintere Brennebene des Objektivs (UPLAPO 60x/1.4 Oil, Olympus) fokussiert, so daß die Fouriertransformation der Objektivlinse einen parallelen Anregungsstrahl am Probenort generiert. Durch den auf einem Lineartisch (Radiant Dyes) in Richtung des Strahls verschiebbaren Spiegels S4 läßt sich der Austrittswinkel aus dem Objektiv einstellen. Bei zentralem Einfall in das Objektiv erhält man die normale epi-Beleuchtung ($\Theta = 0^\circ$), und bei Randeinstrahlung einen Winkel, der der numerischen Apertur von 1,4 gegen Luft entspricht ($\Theta \approx 67^\circ$). Letzterer Winkel ist größer als $\Theta_c \approx 61^\circ$ für die Grenzfläche Glas/Wasser, so daß an dieser Totalreflexion auftritt. Nach S4 ist ein dichroischer Strahlteiler ST (DCSP500/DCSP525, Chroma Technology Corp.) zur Trennung von Detektions- und Anregungslicht eingefügt worden. Von dort aus geht das Detektionslicht wieder über die Tubuslinse ($f_{\text{Tubuslinse}} = 400\ \text{mm}$) zur ICCD Kamera. Die Probe kann mit einem Mikro-

manipulator (Leitz) in alle drei Raumrichtungen verschoben werden. Die Proben können auf BK7 Glas- oder Quarzdeckgläschen gemessen werden, wobei BK7 eine recht hohe Eigenfluoreszenz aufweist und dagegen Quarz nur einen sehr engen Winkelbereich, in dem die Totalreflexion auftritt ($\Theta_c = 66^\circ$).

3.2.3 Detektionseffizienz

Man kann davon ausgehen, daß die Dipolmomente der Fluorophore (AFPs, DiI, DiO; s. Kap. 2.1.2, 2.1.1) auf den gemessenen Zeitskalen (≈ 100 ms) räumlich gleichverteilt vorliegen und so eine isotrope Abstrahlcharakteristik aufweisen. Der Abstand der fluoreszierenden Moleküle von der Glas/Wasser Grenzfläche in den Lebendzellexperimenten beträgt immer mehr als 50 nm [58]. Daher ist nur mit einer geringen anisotropen Abstrahlcharakteristik der Dipole in Richtung des optisch dichteren Mediums zu rechnen, wie es bei Dipol/Dielektrikum Abständen von bis etwa 80 nm erwartet wird [56, 57]. Das Objektiv sammelt alle Photonen, die in einen Konus entlang der optischen Achse mit einem Öffnungswinkel von $2 \cdot \arcsin(n \cdot A_{\text{Objektiv}} / n_{\text{Immersionfluid}})$ emittiert werden. Das entspricht einem Winkel von 128° für das Wasserimmersionsobjektiv und 135° für das Ölimmersionsobjektiv. Die Raumwinkel dieser Konen ergeben, normiert auf den gesamten Raumwinkel 4π , das Verhältnis von der emittierten Gesamtphotonenzahl zur maximal detektierbaren Photonenzahl von etwa 28 % im ersten und 31 % im zweiten Fall.

Alle weiteren optischen Elemente im Detektionsstrahlengang wurden mit der Prämisse der geringsten Verluste ausgewählt, um bei hoher zeitlicher Auflösung Einzelmolekülempfindlichkeit zu erzielen:

- Die Transmission des Objektivs im sichtbaren Spektralbereich beträgt 85 %.
- Der Umlenkspiegel (Sp) ist silberbeschichtet, was einer Reflektivität von 98 % entspricht. Der Strahlteiler (ST) im inversen Aufbau weist eine Reflektivität von 99 % auf.

- Die verwendeten Interferenzfilter (IF-Filter) variieren leicht in ihren Transmissionswerten. Holographische Notchfilter (Kaiser Optical Systems) zeigen eine Transmission von 80%, Interferenzfilter (Chroma, Omega Optical) etwa 90 %.
- Glasoberflächen reflektieren bei senkrechtem Lichteinfall 4% der Photonen. Antireflexbeschichtungen (ARB2-VIS, Linos) verringern diese Verluste auf 0,5% pro Oberfläche. Die Tubuslinse ist beidseitig antireflexbeschichtet und reflektiert so 1% der zu detektierenden Photonen.
- Die Quantenausbeute der ersten Phosphorschicht der intensivierten Kamera beträgt um die 40 %.

So ergibt sich für beide TIRF Mikroskope – die leicht höhere Reflektivität des Strahlteilers zum Silberspiegel hat nach der Rundung keinen Einfluß – eine Detektionswahrscheinlichkeit von

$$\begin{aligned}
 P_{d, \text{Mikroskop}} &= T_{\text{Objektiv}} \cdot R_{\text{Sp/ST}} \cdot T_{\text{Notchfilter}} \cdot T_{\text{I-Filter}} \cdot T_{\text{Tubuslinse}} \cdot \eta_{\text{ICCD}} \\
 &= 0,85 \cdot 0,98 \cdot 0,80 \cdot 0,90 \cdot 0,99 \cdot 0,40 \\
 &= 0,24
 \end{aligned}$$

Mit der geometrischen Sammeleffizienz des Objektivs ergibt sich so eine Gesamtdetektionseffizienz von $\sigma_{\text{Detektion}} = 6,7\%$.

Das Ölimmersionsobjektiv des inversen TIRF Mikroskops ermöglicht eine leicht höhere Gesamtdetektionseffizienz von $\sigma_{\text{Detektion}} = 7,4\%$. Dieser Wert liegt bei Molekülen, die sich sehr nah an der Prisma/Wasser Grenzfläche befinden, durch die anisotrope Abstrahlcharakteristik eines einzelnen Dipols [53, 54, 55, 56, 57], höher.

3.3 Diffusion

Die Grundlage der Diffusion in Zellmembranen bildet die Brownsche Molekularbewegung. Weitere Kräfte können die diffundierenden Teilchen beeinflussen und ändern so den Diffusionsmodus (s. Abb. 3.5) von freier Diffusion zu anomaler Diffusion (transiente Bindungskräfte zu anderen Bestandteilen der Membran oder membrannahen Molekülen), eingeschränkter Diffusion (geometrische Randbedingungen – repulsive Kräfte) oder gerichteter Diffusion (gerichtete Drift- oder Zugkräfte beispielsweise von Motorproteinen).

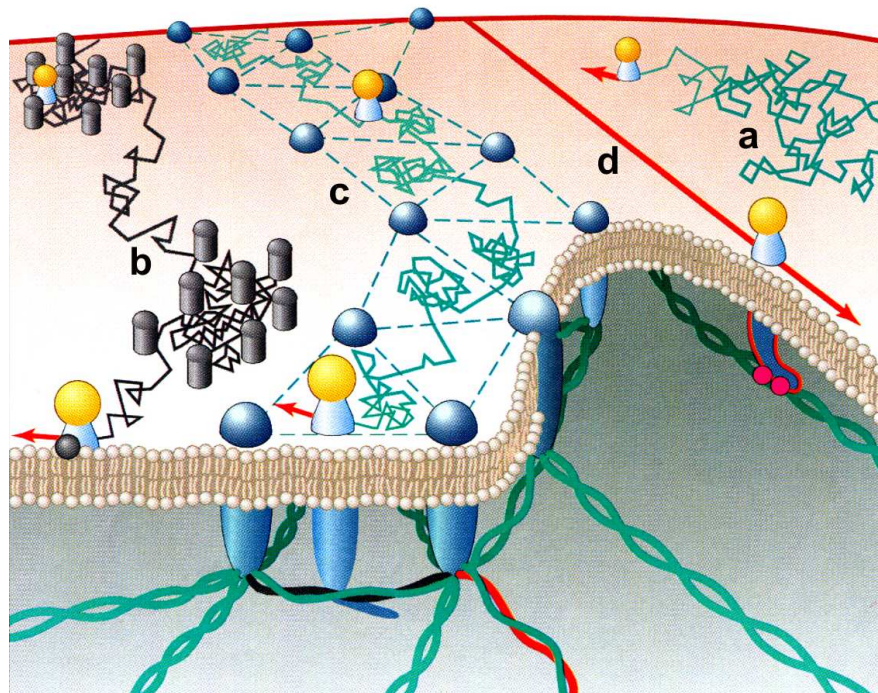


Abbildung 3.5: Schema zur Veranschaulichung der vier möglichen Diffusionsmoden nach [59]: **a** freie Diffusion, **b** anomale Diffusion durch transiente Bindung an andere Moleküle oder hier durch zeitweise Behinderung, **c** eingeschränkte Diffusion durch repulsive Wechselwirkung mit dem Zytoskelett und **d** Drift oder hier gerichteter, aktiver Transport durch ein Motorprotein.

3.3.1 Freie Diffusion

Zur Beschreibung der freien Diffusion benutzt man analoge Formeln zu denen der Wärmeleitung [60]. Ein Konzentrationsgefälle einer Teilchendichte ρ erzeugt einen Teilchenstrom \mathbf{j}_ρ .

Dies führt zum 1. Fickschen Gesetz:

$$\mathbf{j}_\rho = -D \nabla \rho,$$

mit der Diffusionskonstanten D . Zusammen mit der Kontinuitätsgleichung für die Teilchenzahlerhaltung

$$\dot{\rho} = -\nabla \mathbf{j}_\rho$$

erhält man die Differentialgleichung für die freie Diffusion durch Einsetzen – das 2. Ficksche Gesetz:

$$\dot{\rho} = D \nabla^2 \rho. \quad (3.4)$$

Die Lösungen dieser Differentialgleichung unter dem System angepassten Randbedingungen ergeben die Teilchendichte als Funktion des Ortes und der Zeit. Dies leistet beispielsweise – ausgehend von einer deltaförmigen Anfangsverteilung – die Normalverteilung in zwei Dimensionen:

$$\rho(\mathbf{r}, t) = \frac{N}{4\pi Dt} \exp\left(-\frac{(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0)^2}{4Dt}\right), \quad (3.5)$$

mit der Gesamtteilchenanzahl N . Das Volumenintegral über die Teilchendichte $\int_{-\infty}^{+\infty} \rho(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r} = N$ ergibt die Normierung.

Die Varianz dieser Verteilung ist nun die interessante Größe. Sie gibt das mittlere Verschiebungsquadrat eines diffundierenden Teilchens an (mean square displacement, *MSD*).

Berechnet wird sie mit Hilfe von Gleichung 3.6:

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle^2 = \langle \mathbf{r} - \langle \mathbf{r} \rangle \rangle^2 = \frac{1}{N} \int_{-\infty}^{+\infty} \Delta \mathbf{r}^2 \rho(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r}, \quad (3.6)$$

wobei die spitzen Klammern für die zeitliche Mittelung stehen.

Setzt man nun Gleichung 3.5 in Gleichung 3.6 ein, so erhält man für das mittlere Verschiebungsquadrat eines diffundierenden Teilchens in zwei Dimensionen:

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle^2 = 4Dt. \quad (3.7)$$

Eine Beispielkurve zu dieser Gleichung zeigt Abbildung 3.6 a.

Die Diffusionskonstante läßt sich mit der Einstein-Relation (Fluktuations-Dissipations-Theorem, s. Gl. 3.8) auf grundlegendere physikalische Größen zurückführen:

$$k_B T = \gamma D, \quad (3.8)$$

mit der Boltzmannkonstanten k_B , der Temperatur T und dem hydrodynamischen Widerstand γ . Der hydrodynamische Widerstand setzt sich bei Membranproteinen, wie beispielsweise dem Connexon-Halbkanal, additiv aus einem zytoplasmatischen Anteil γ_z und einem Membrananteil γ_m zusammen. In der Näherung, daß das Protein sphärisch symmetrisch ist, ergibt sich für Ersteren mit dem Stokeschen Gesetz:

$$\gamma_z = 6\pi\eta_z R_z, \quad (3.9)$$

mit der Viskosität des Zytoplasmas η_z und dem Radius des globulären Proteins R_z . Der Membrananteil wird in der Saffman-Delbrück Gleichung hergeleitet [61]

und lautet:

$$\gamma_m = 4\pi\eta_m h_m \frac{1}{\ln\left(\frac{\eta_m h_m}{\eta_z R_m}\right) - \varepsilon}, \quad (3.10)$$

mit der Membranviskosität η_m , der Höhe der Membran h_m , dem Radius des zylindrisch symmetrisch angenommenen Proteins R_m und der Eulerkonstante $\varepsilon = 0,5772$.

Setzt man nun die Gleichungen 3.10 und 3.9 in Gleichung 3.8 ein, so erhält man für die Diffusionskonstante:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta_z R_z + 4\pi\eta_m h_m / \ln\left(\frac{\eta_m h_m}{\eta_z R_m}\right) - \varepsilon}. \quad (3.11)$$

3.3.2 Anomale Diffusion

In oder nahe der Membran lokalisierte Moleküle können das diffundierende Teilchen in der freien Bewegung behindern oder transient binden. Dabei ist die Verteilung der möglichen Verweilzeiten sehr breit, so daß es keine mittlere Bindungszeit eines solchen Fallenzustandes gibt. All diese Effekte sind zeitlich mit der TIRFM Methode nicht aufzulösen, so daß sich in der Literatur eine phänomenologische Beschreibung dieses Effektes mit Hilfe einer gestauchten Zeitachse durchgesetzt hat [62, 63, 64]:

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle^2 = 4D(t)t = \Gamma t^\alpha \quad 0 \leq \alpha \leq 1, \quad (3.12)$$

mit der zeitabhängigen Diffusionskonstante $D(t) = \frac{1}{4}\Gamma t^{\alpha-1}$, dem Transportkoeffizienten Γ und dem anomalen Diffusionsexponenten α .

Für kurze Zeiten unterhalb der mittleren Zeit zwischen zwei transienten Bindungen mißt man die reale Diffusionskonstante. Für lange Zeiten verlangsamt sich die Diffusion durch die Fallenzustände. Eine Beispielkurve für anomale Diffusion zeigt

Abbildung 3.6 b. Man beachte, daß die analytische Form der Kurve im Nullpunkt eine unendliche Steigung (\propto Diffusionskonstante) aufweist, die unphysikalisch ist. Aussagen über die freie Diffusionskonstante sind aus realen Meßkurven nur bei sehr hoher – hier nicht gegebener – Zeitaufösung treffbar.

3.3.3 Eingeschränkte Diffusion

In der Nähe der Zellmembran kann das Zytoskelett die freie Bewegung von Membranproteinen, die einen nicht unerheblichen Teil ihrer Quartärstruktur in die Zelle prolongieren einschränken. Da die Aktinfilamente des Zytoskeletts sich zu unregelmäßig großen Maschen verketteten, ist die Größenvariation des Gebietes, in dem sich das Membranprotein frei bewegen kann, hoch. Die Modellierung einer solchen eingeschränkten Diffusion mit einer freien Diffusion innerhalb der Masche und einer bestimmten Wahrscheinlichkeit die Grenzen zu überschreiten ist schwierig und nur näherungsweise möglich [64, 65, 66]. Für kreisförmige Gebiete mit Radius R_c gilt:

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle^2 = R_c^2 \left[1 - \exp \left(-\frac{4Dt}{R_c^2} \right) \right], \quad (3.13)$$

mit der Fläche des einschränkenden Gebietes πR_c^2 . Eine Beispielkurve für eingeschränkte Diffusion zeigt Abbildung 3.6 c. Die Anfangssteigung entspricht der freien Diffusionskonstante. Der Sättigungswert für große Zeiten t ist proportional zur einschränkenden Fläche.

3.3.4 Gerichtete Diffusion/aktiver Transport

Ein Molekül kann neben der Diffusion auch eine überlagerte Driftbewegung ausführen, wenn sich das Diffusionsmedium gerichtet bewegt oder das Molekül von einem molekularen Motor entlang von Aktinfilamenten oder Mikrotubuli gezogen wird [67]. Die Erweiterung der Gleichung 3.7 geschieht einfach mit einem

Modell	s. Gl. Nr.	Gleichung
freie Diffusion (a)	3.7	$MSD = 4D\Delta t$
anomale Diffusion (b)	3.12	$MSD = 4\Gamma\Delta t^\alpha$
eingeschränkte Diffusion (c)	3.13	$MSD = R_c^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{4D\Delta t}{R_c^2}\right) \right]$
Diffusion + Drift/Transport (d)	3.14	$MSD = 4D\Delta t + v^2\Delta t^2$

Tabelle 3.1 : Tabelle der Diffusionsmoden mit den resultierenden Fitfunktionen.

additiven Geschwindigkeitsterm, der die MSD -Kurve parabelförmig krümmt:

$$\langle \Delta \mathbf{r} \rangle^2 = 4Dt + v^2t^2, \quad (3.14)$$

mit der Drift- oder Transportgeschwindigkeit v . Eine Beispielkurve mit großem Transportanteil zeigt Abbildung 3.6 d.

3.3.5 Klassifizierung der Bewegungsmoden

Gemessene und ausgewertete Trajektorien können mit Hilfe der Gleichungen 3.7, 3.12, 3.13 und 3.14 (siehe auch Tabelle 3.3.5) in die verschiedenen Bewegungsmoden klassifiziert werden. Dabei ist zu beachten, daß die Zeitachse nicht die fortlaufende Meßzeit abbildet, sondern in Einheiten der Bildintegrationszeit Δt der ICCD-Kamera gequantelt die Differenzzeiten angibt. Zur Klassifizierung der Bewegungsmoden verwendet man nur das erste Viertel des MSD -Graphen, weil nur dort die Statistik der einzelnen Punkte ausreichend ist [64].

3.4 Auswertesoftware

Zur Auswertung der aufgenommenen Filme wurde eine semiautomatische Analysesoftware geschrieben [68]. Das Programm QSAM liest die Daten, die die Kamerasoftware erzeugt (SPE-Format von Winspec, Roper Scientific), ein und bietet

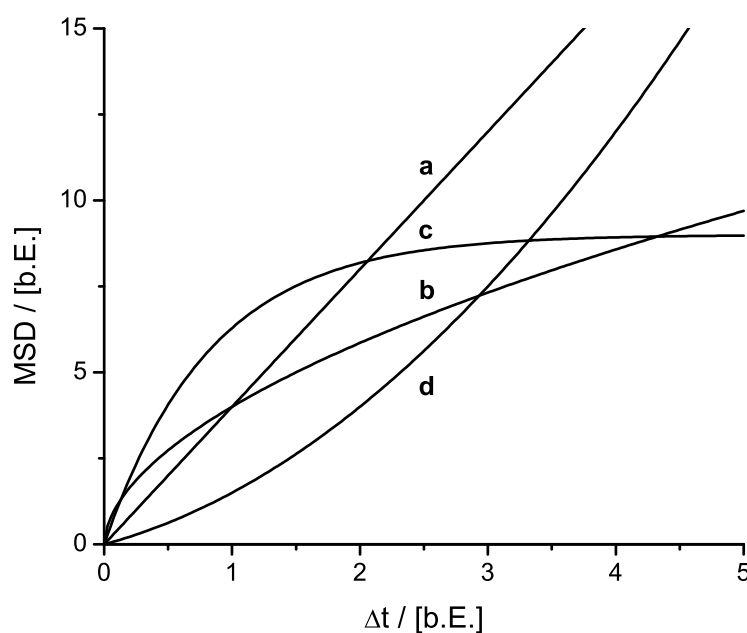


Abbildung 3.6: Beispielkurven der vier Diffusionsmodelle. Aufgetragen ist jeweils das mittlere Verschiebungsquadrat (MSD) über die Zeit Δt . **a** freie Diffusion, **b** anomale Diffusion, **c** eingeschränkte Diffusion und **d** Diffusion mit Drift oder aktivem Transport.

dann eine Bild-für-Bild Darstellung der Daten an, in der man in jedem Bild mit der Maus in etwa das Abbild des fluoreszierenden Moleküls auswählt. Um diesen ungefähr bestimmten Aufenthaltsort paßt die Software an die Intensitätswerte eine zweidimensionale Gaußfunktion an [69] und schreibt bei Erfolg (Fehler der Anpassung kleiner als eine gegebene Schranke) den Schwerpunkt und die Amplitude dieser Funktion in eine Liste. Desweiteren werden auch noch der Hintergrund und die Breite der Funktion angepaßt – insgesamt also fünf Parameter. So erhält man nach der Analyse des gesamten Filmes eine Trajektorie des Moleküls in zwei Dimensionen und den Helligkeitsverlauf über die Zeit.

Diese beiden Informationen kann man visualisieren und erhält so die in Abbildung 3.7 gezeigten Trajektorien, in denen die Farbe (von Violett bis Rot) die Zeit kodiert und die Helligkeit der Fluoreszenzintensität entspricht. Die quanti-

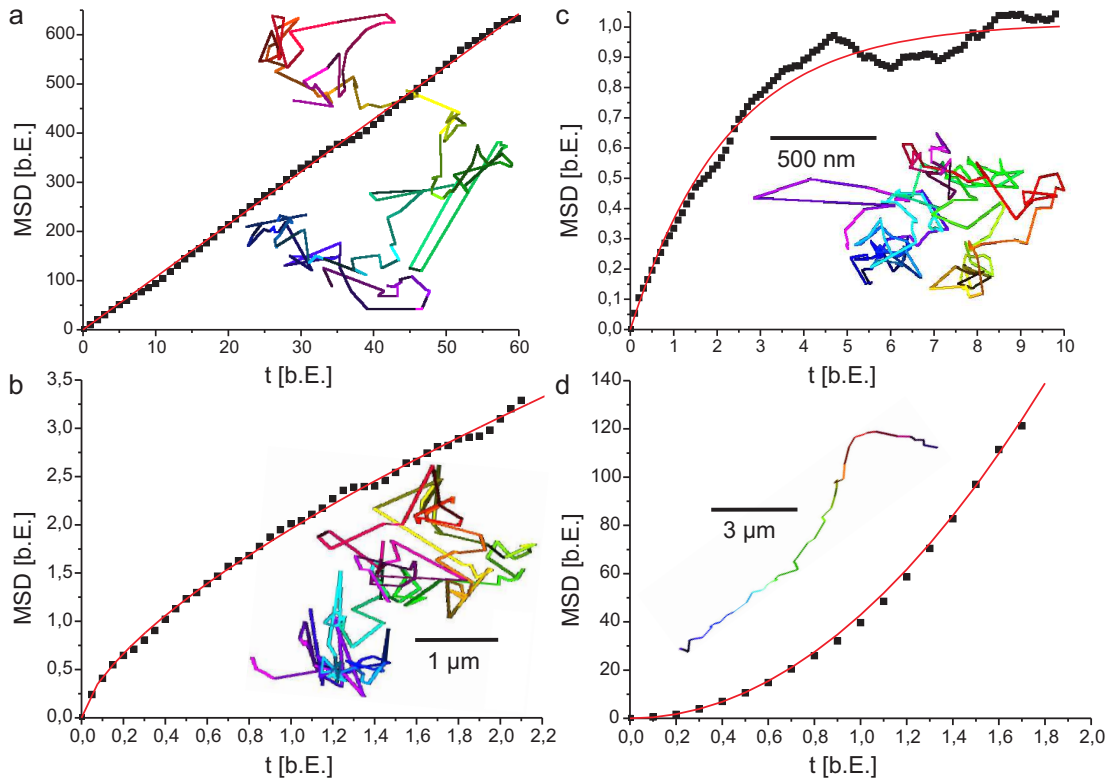


Abbildung 3.7: Gemessene Beispieltrajektorien für die vier Bewegungsmoden einzelner Moleküle in der Zellmembran: **a** freie Diffusion, **b** anomale Diffusion, **c** eingeschränkte Diffusion und **d** gerichteter Transport. In der Trajektorie ist die Zeit farblich von Violett nach Rot und die Intensität in der Helligkeit kodiert. Zu jeder Trajektorie ist zusätzlich der MSD über Δt Graph (schwarze Quadrate) und die angepasste Modellfunktion (rot) angegeben (s. auch Kap. 3.3.5).

tative Analyse dieser Daten ($MSD(n \cdot \Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i+n})^2$, mit N der Gesamtzahl der Bilder im Film) führt zu einem mittleren Verschiebungsquadrat (MSD) über Δt Graphen, den man mit den Diffusionskurvenmodellen aus Kapitel 3.3 vergleichen kann. Die Anpassung einer geeigneten Modellkurve ergibt dann die gewünschten Parameter Diffusionskonstante, anomaler Diffusionsexponent α , Transportkoeffizient Γ , Fläche der eingeschränkten Diffusion πR_c^2 und Drift- oder Transportgeschwindigkeit v .

3.5 Diffusion von Connexin46-Hexameren

3.5.1 Testmessungen an fluoreszenzmarkierten Lipiden in Zellen

DiO $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ AELP503, Omega; HQ512/35, Chroma

DiI $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$ AELP540, Omega; HQ575/26, Chroma

Tabelle 3.2 : Detektionsfiltertabelle DiI, DiO

Zum Testen des optischen Aufbaus und der Auswertesoftware wurden fluoreszenzmarkierte Lipide (DiI/DiO, s. Kap. 2.1.1) auf HeLa Zellen gegeben. Einige der Moleküle insertierten nach einiger Zeit in die Membran und wurden darin vermessen. Trotz der schnellen Diffusion der Lipide konnten diese, da sie helle Farbstoffe bargen, ausgewertet werden (Bildintegrationszeit $\Delta t = 30 \text{ ms}$). Die 20 analysierten Trajektorien geben keine gute Statistik. Dennoch gibt der Mittelwert der Diffusionskonstante $\bar{D} = 8,9 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ (s. Abb. 3.8) einen mit der Literatur [35, 36, 70] vergleichbaren Wert.

Diese Kontrollmessung stärkte das Vertrauen in den Aufbau und die Auswertesoftware, so daß im Folgenden biologisch relevantere Proben in Angriff genommen werden konnten.

3.5.2 Einzelmolekülnachweis

EGFP $\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$ AELP503, Omega; HQ512/35, Chroma

EYFP $\lambda_{ex} = 515 \text{ nm}$ 515 Notch, Kaiser; HQ532/35, Chroma

Tabelle 3.3 : Detektionsfiltertabelle EGFP, EYFP

Um zu erfahren, ob die beobachteten Punkte einzelnen Connexon-Halbkanal Molekülen entsprechen, betrachtet man die Bleichkurven stationärer Fluoreszenz-

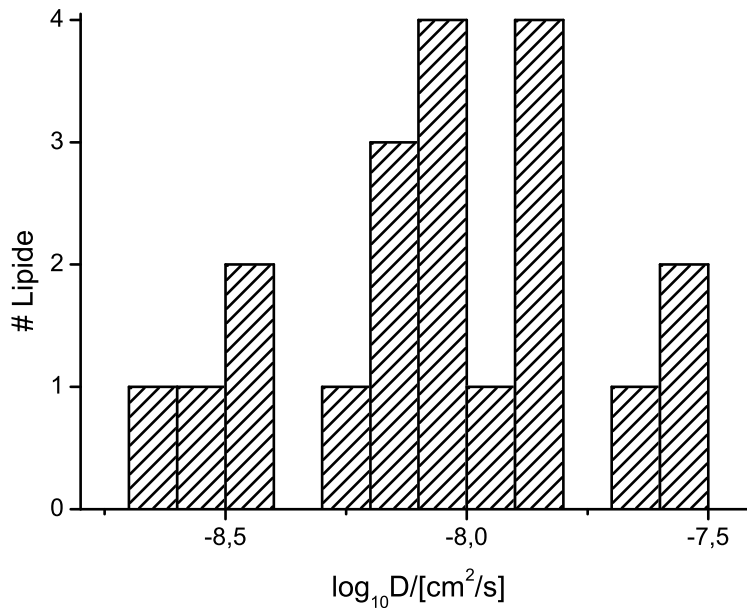


Abbildung 3.8: Diffusionskonstantenhistogramm der DiI/DiO Lipidfluorophore. Näheres siehe Text.

punkte. Die Lebensdauer einzelner EGFP Moleküle wird durch viele Faktoren beschränkt. Der am besten untersuchte Mechanismus beschreibt das finale Photobleichen durch Wechselwirkung des angeregten Moleküls mit Sauerstoff. Die Energie kann auf das im Grundzustand (hier Triplettzustand) befindliche O_2 Molekül übertragen werden, wobei der Sauerstoff in die sehr reaktive und langlebige Singlett-Form übergeht. In dieser Form ist in der Lage bei Relaxation kovalente Bindungen in der Nähe zu brechen und so irreversible Schäden im aktiven Zentrum des EGFP Moleküls zu verursachen. Die maximale Photonenzahl, die ein EGFP emittieren kann, bevor es irreversibel photobleicht, wurde in zwei unabhängigen Studien zu etwa $n_{\text{Photonen}} = 4 \cdot 10^5$ bestimmt [17, 71].

Es wurden 50 Punkte in verschiedenen Zellen diesbezüglich ausgewertet. Viele zeigten die erwartete schrittweise Bleichcharakteristik der sechs EGFP Fluorophore pro Connexinhexamer. Punkte mit höherer Gesamtintensität blichen dabei schneller als dunklere und somit weiter von der Oberfläche entfernte, so daß in

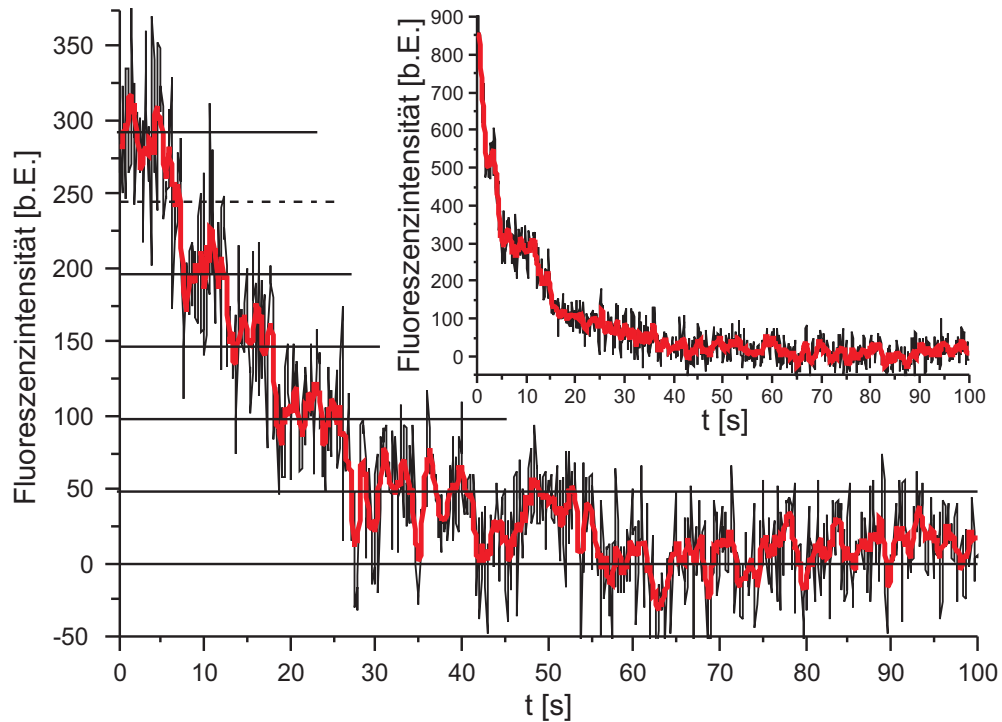


Abbildung 3.9: Bleichkurve eines Connexon-Halbkanal/EGFP-Fusionsproteins, Zeitschritt $\Delta t = 100$ ms. Rot: Savitzky-Golay Glättung erster Ordnung mit einem Radius von 4,5 Punkten; schwarze äquidistante horizontale Linien deuten die Intensitätsstufen an, die das Bleichen eines EGFPs verursacht. Inset: die Bleichkurve eines weiteren Connexon-Halbkanals, der mit höherer Anregungsleistung gemessen wurde. Näheres siehe Text.

ersteren Fällen nur wenige Bleichschritte getrennt zu beobachten waren. Eine besonders anschauliche Kurve eines vom Deckglas entfernteren Fluoreszenzpunktes zeigt Abbildung 3.9. Die y -Achse zeigt die mittlere Intensität einer 6×6 Pixel großen Fläche, die das gesamte Airy-Scheibchen abdeckt. Jeder Meßpunkt wurde hintergrundkorrigiert und dann mit einem 4,5 Punkte Radius umfassenden Savitzky-Golay Algorithmus 1. Ordnung geglättet (rote Kurve). Deutlich sind fünf Stufen zu sehen, wobei eine Stufe doppelt so hoch wie die übrigen ist. Sie entsprechen dem schrittweisen Bleichen einzelner EGFP Moleküle. Aus

der mittleren Höhe der Stufen von 48 cts, der Anzahl der Pixel (36), der Meßzeit pro Datenpunkt von 100 ms, der Sensitivität der Kamera (17 cts/Photon: Verhältnis Elektronen zu detektierten Photonen), der Detektionswahrscheinlichkeit des Aufbaus von 7 % und der maximalen Anzahl der emittierten Photonen von $n_{\text{Photonen}} = 4 \cdot 10^5$ [17,71] errechnet sich eine mittlere Lebensdauer eines EGFP Fluorophors vor dem Photobleichen von 28 s. Dies entspricht gut dem monoexponentiellen Fit, der einen Wert von 18 s ergibt, wenn man bedenkt, daß bei der Messung erst der Zellausschnitt ausgewählt wurde und dann erst die Aufnahme startete, so daß die ersten Sekunden mit Fluoreszenzphotonen verloren gingen.

Andere Punkte, die sich näher an der Oberfläche des Probenträgers befanden und somit eine höhere Anfangsintensität zeigten, wiesen ein schnelleres Bleichverhalten auf (s. Abb. 3.9 Inset). Diese Kurve ähnelt einer Exponentialfunktion, die man für ein Proteinaggregat erwartet. Einige Bleichschritte sind jedoch als einzelne Stufen erkennbar – das Zeichen für ein einzelnes quantenmechanisches System, hier ein EGFP-Molekül.

3.5.3 Experimentell bestimmte Bewegungsmoden

Die Messungen wurden mit verschiedenen Präparationstechniken durchgeführt um die Autofluoreszenz der Zelle zu verringern und den Einfluß verschiedener Meß- und Umgebungsparameter auf das Signal zu Untergrundverhältnis zu eroieren (z. B. Integrationszeit ($\Delta t \in [30, 100]$ ms), Anwachsverhalten der Zellen auf verschiedenen Deckglasmaterialien). Dabei wurde besonderes Augenmerk auf den Temperaturparameter gelegt, der in einigen *in vitro* [72] und *in vivo* [73] Messungen aufgrund des flüssig-flüssigkristallinen Phasenüberganges der Lipiddoppelschicht einen erheblichen Einfluß auf die Viskosität und somit auf die Diffusionskonstante der Membran hatte. Lebende HeLa-Zellen hingegen scheinen durch eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Membran die Viskosität konstant zu halten, so daß Raumtemperaturmessungen keine unterscheidbaren Ergebnisse zu den Messungen bei 37 °C ergaben.

An Überblicksmessungen auf den Deckgläsern fiel vor allem auf, daß nur in wenigen transfizierten Zellen Dynamik zu beobachten war. Ein Großteil aller Fluoreszenzpunkte war immobil, auch auf langen Zeitskalen von Deziminuten. Dabei kann es sich entweder um Proteinagglomerate handeln, die das evaneszente Anregungsfeld lokal frustrieren (Streulicht von nicht bleichenden Punkten, das der Filter nicht ganz unterdrückt), oder um an Zellstrukturen gebundene Connexon-Halbkanäle. Solche Strukturen (Integrine, Laminin-Fibronectin) kommen auf der Haftfläche von adhärennten oder semiadhärennten Zellen besonders häufig vor, da sie die Anhaftung vermitteln.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen der FCS Experimente, in denen nur wenige Autokorrelationskurven aus der Haftfläche der Zellen aufgenommen werden konnten [74].

Freie Diffusion

Die halbautomatische Auswertung aller erkennbaren Bewegungen einzelner Fluoreszenzpunkte in über 90 Zellen ergab 113 Trajektorien der verschiedenen Diffusionsmoden und 63 direkte Transporttrajektorien. Deren statistische Auswertung führte zu *MSD* Graphen, deren jeweils erstes Viertel für die quantitative Auswertung berücksichtigt wurde. Anhand dieser Graphen wurde dann die Klassifizierung in die verschiedenen Bewegungsmoden (s. Kap. 3.3) vorgenommen.

Das Histogramm in Abbildung 3.10 zeigt die Verteilung der 68 (60 %) frei diffundierenden (Rot) und der 31 (27 %) eingeschränkt diffundierenden Connexon-Halbkanäle (Grün). Das Maximum der Verteilung der als frei diffundierend klassifizierten Halbkanäle liegt bei $\bar{D} = 1,55 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ und die Breite der Verteilung ist größer als eine Größenordnung. Zum Vergleich kann man einen theoretisch erwarteten Wert unter Verwendung der vollständigen Saffman-Delbrück Gleichung 3.11 und den geometrischen Werten für einen EGFP-markierten Halbkanal (s. Tab. 3.4) berechnen. Es ergibt sich eine theoretisch vorausgesagte Diffusionskonstante von $D_{SD} \approx 1,50 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$. Dieser Wert liegt am Rande der Verteilung in Abbildung 3.10. Die gemessenen Diffusionskonstanten sind vorwiegend langsa-

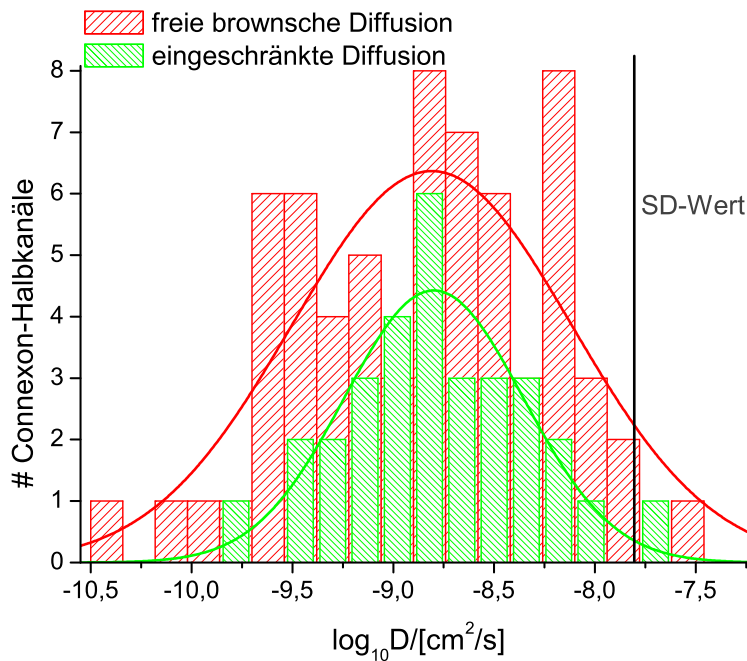


Abbildung 3.10: In Grün respektive Rot sind die Verteilungen der Diffusionskonstanten von Connexon-Halbkanälen im eingeschränkten und freien Diffusionsmodus zu sehen. Die x -Achse ist logarithmiert. SD bezeichnet den theoretisch vorausberechneten Wert nach Saffman-Dellbrück. Näheres siehe Text.

mer als dieser idealisierte Wert. Eine Verlangsamung kann hierbei durch viele Faktoren ausgelöst werden:

- Aggregation mehrerer Halbkanäle
- Diffusion in Membranbereichen mit erhöhter Viskosität
- Bindung an größere Proteinkomplexe in der Membran (z.B. Lipid Rafts)

Der Vergleich mit Messungen an Connexin46-Hexameren in HeLa Zellen mit FCS [26] (s. auch Kap. 4) zeigt eine Verschiebung der dort beobachteten Verteilung zu kleineren Diffusionskonstanten und eine Verbreiterung der Verteilung

der Werte aus den TIRFM Messungen. Dies resultiert aus dem methodischen Unterschied zwischen FCS und TIRFM: die FCS Methode konnte dort die langsamen Connexon-Halbkanäle nicht detektieren, da der in diesen Messungen verwendete Hardwarekorrelator die Kurve bei Durchgang eines sehr langsamen Moleküls unbrauchbar macht.

$$\begin{aligned}\eta_z &\approx 0,03 \text{ kg/ms} & R_z &= 5,4 \text{ nm} & T &= 300 \text{ K} \\ \eta_m &\approx 0,15 \text{ kg/ms} & R_m &= 4,5 \text{ nm} & h_m &= 4,2 \text{ nm}\end{aligned}$$

Tabelle 3.4: Geometrische Werte des Connexon-Halbkanals [75] und eines globulären Proteins, das aus sechs EGFP [76] besteht, sowie Werte für die Viskositäten von Zytoplasma und Plasmamembran [77], wie sie benutzt wurden, um die Saffman-Dellbrück Diffusionskonstante zu errechnen (s. Abb. 3.10).

Die Breite der Verteilung (1,39) resultiert einerseits aus einer starken Variabilität der Membranviskosität und andererseits aus der Bindung an andere Moleküle [78], was aus einer näheren Analyse der inter- und intrazellularen Diffusionskonstanten hervorgeht. Verschiedene Messungen innerhalb einer Zelle zeigen eine nicht so starke Variation, wie Messungen in unterschiedlichen Zellen.

Eingeschränkte Diffusion

Die Verteilung der eingeschränkt diffundierenden Moleküle (Abbildung 3.10, grünes Histogramm) hat ihr Maximum bei $\bar{D} = 1,58 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$, was dem Maximum der Verteilung frei diffundierender Halbkanäle entspricht. Die Breite der angepassten Gaußfunktion ist mit 0,89 geringer als im Fall freier Diffusion, was mit der nur halb so großen Anzahl Trajektorien zusammenhängt, da die starke Verbreiterung aus Messungen an unterschiedlichen Zellen herrührt und im Falle eingeschränkter Diffusion weniger Zellen gemessen wurden.

Der zweite Fitparameter dieses Diffusionsmodus, die Fläche des beschränkten Gebiets, ist nicht gaußverteilt, wie Abbildung 3.11 zeigt.

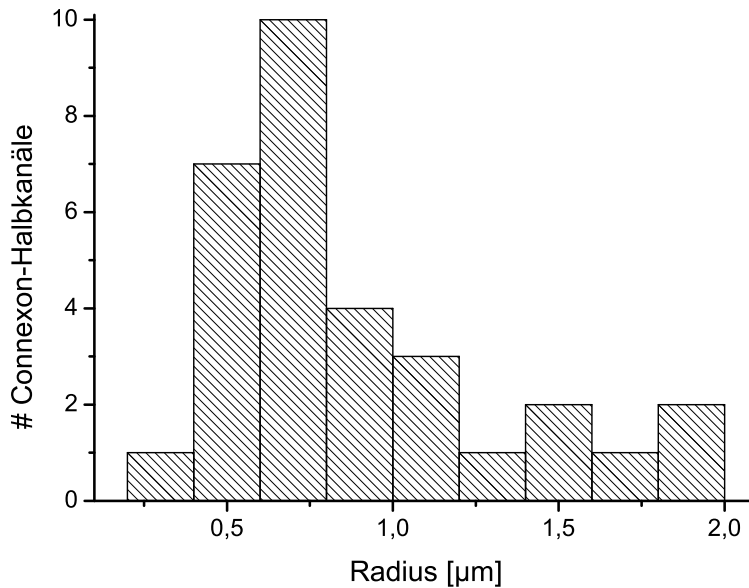


Abbildung 3.11: Radienverteilung der einschränkenden Gebiete bei der Diffusion von Connexon-Halbkanälen.

Die Werte ganz am Rand bei $R_c = 2 \mu\text{m}$ entsprechen eher Anhaftungsflächen ganzer Zellen und können auch zu den frei diffundierenden Halbkanälen gezählt werden. Die verbleibenden Werte sind dann gaußverteilt mit einem Maximum der Verteilung bei $R_c \approx 650 \text{ nm}$. Dies entspricht in etwa der Maschengröße der membranahen Aktinfilamente nach dem *membrane-skeleton fence* Modell [66, 70, 79, 80].

Anomale Diffusion

Von allen ausgewerteten Trajektorien entsprachen 14 (oder 13 %) dem anomalen Diffusionsmodus. Die Verteilung der Transportkoeffizienten Γ zeigt Abbildung 3.12. Das rechte der beiden Maxima der Verteilung liegt dabei in dem Diffusionskonstantenbereich, der von der Saffman-Dellbrück Gleichung vorausgesagt wird. Das zweite Maximum liegt bei kleineren Diffusionskonstanten, die durch die Anhaftungsstellen der Zellen an das Deckglas hervorgerufen werden. Die Statistik ist

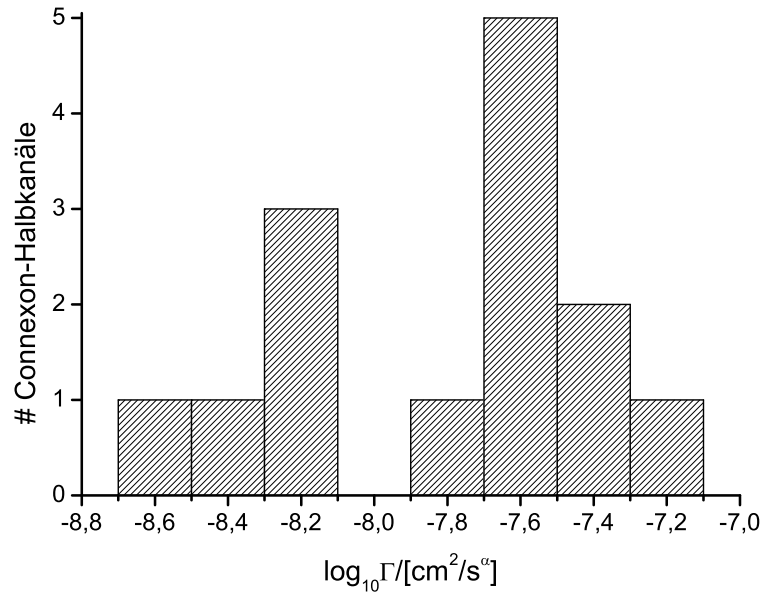


Abbildung 3.12: Histogramm von Γ bei anomaler Diffusion von Connexon-Halbkanälen.

nicht aussagekräftig genug, um an diese Verteilung Gaußfunktionen anzupassen, aber es fällt eine qualitative Ähnlichkeit zu der mittels FCS gemessenen Verteilung der Diffusionskonstanten D an der Anhaftungsfläche der Zelle auf. Auch dort bildete sich eine bimodale Verteilung wie in Abbildung 3.12, insbesondere dann, wenn man die Korrelationskurven mit einem anomalen Diffusionsmodell anpaßte [26].

Die FCS Verteilung der Diffusionskonstanten ist, bedingt durch die unterschiedliche Definition der beiden Größen, außerdem um eine halbe Größenordnung zu der hier gemessenen Transportkoeffizienten verschoben.

Die Verteilung des Anomalieparameters α zeigt das linke Diagramm der Abbildung 3.13. Nur wenige Trajektorien zeigen eine extreme Anomalie im Bereich kleiner α s. Das Gros der Messungen ergibt leichte bis mittlere Abweichungen von der brownischen Diffusion ($\alpha = 0,63$). Eine Schwäche der FCS Messungen gegenüber des single particle tracking (SPT) wird hier deutlich, wenn man das

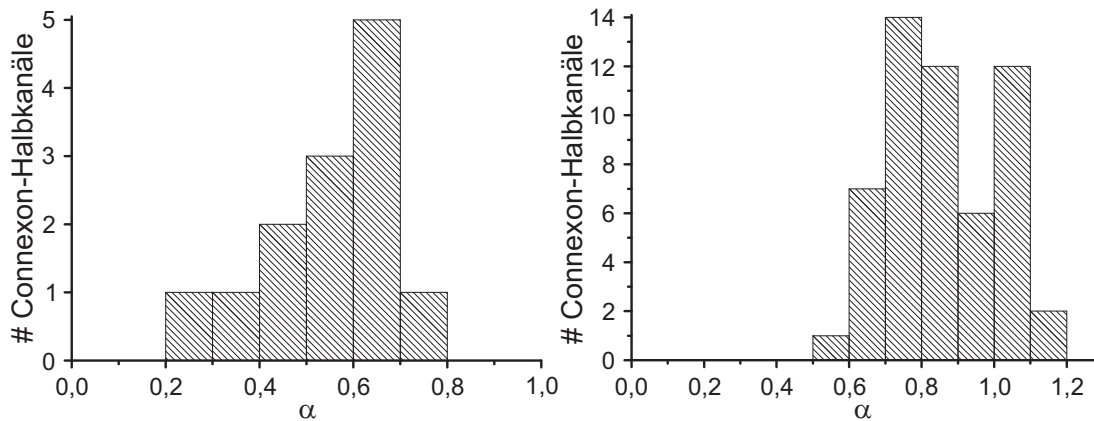


Abbildung 3.13: Histogramm von α bei Connexon-Halbkanälen gemessen mit single particle tracking (**links**) und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (**rechts**).

Histogramm des Anomalieparameters α der konfokalen Messungen betrachtet (s. Abb. 3.13 rechts). Dort kommen auch Werte vor, die ≥ 1 – dies entspricht gerichtetem Transport oder freier Diffusion – sind. Man erkennt, daß jede FCS-Meßkurve über einige hundert Moleküle, und somit auch über die möglicherweise unterschiedlichen Bewegungsmoden derselben, mittelt, und so einzelne Moleküle nicht aufgelöst werden können.

Diese Messungen der verschiedenen Bewegungsmoden stützen das derzeit diskutierte Postulat eines in der Zellmembran vorhandenen Reservoirs von freien Connexon-Halbkanälen, aus dem die gap junctional plaque Strukturen erwachsen [81].

Drift oder gerichteter Transport

In vielen Zellen konnte eine gerichtete Bewegung von fluoreszierenden Punkten beobachtet werden. Die Verteilung der gemessenen Drift- respektive Diffusionskonstanten zeigt Abbildung 3.14. Die langsamen Geschwindigkeiten auf der linken Seite des Histogramms können dabei eher einem Drift in der Plasmamembran zugeordnet werden. Dann folgen allerdings ausschließlich Werte, die aktiven Trans-

port der Halbkanäle voraussetzen. Der Transport kann theoretisch in zweierlei Form auftreten:

- Ein molekularer Motor zieht ein Lipidvesikel, in dem das fluoreszierende Protein umschlossen, oder eingelagert ist.
- Ein molekularer Motor zieht das Protein selbst durch die Plasmamembran.

Im Falle der Connexon-Halbkanäle gibt es sehr viele Trajektorien, die mehrere Mikrometer lang sind und deren Fluoreszenzintensität während der Bewegung nur leicht variiert. Diese Evidenzen deuten auf letzteren Transportmodus hin. Wenn man einige der Trajektorien genauer untersucht ergeben sich Spitzengeschwindigkeiten von $10 \mu\text{m/s}$. So hohe Geschwindigkeiten lassen sich nicht auf dem stark verschlungenen Aktinfilamentnetzwerk in der Zelle realisieren, so daß nur Mikrotubulitransport mit den molekularen Motoren Kinesin/Dynein für die Bewegung in Frage kommt. Diese hohen Geschwindigkeiten sind in der Literatur *in vivo* noch nicht gemessen worden [82, 83, 84]. *In vitro* Experimente hingegen demonstrierten bereits – speziell für Dynein – solch hohe Beweglichkeiten [85, 86, 87].

Von den 63 Werten in der Verteilung aus Abbildung 3.14 stammen 14 aus Messungen an HeLa Zellen, die mit dem Fusionsprotein TNF-R2/EGFP transfiziert waren. In diesem Fall sind die Trajektorien allerdings viel kürzer und die Intensität der Punkte ähnlich wie bei den Connexin46-Hexameren, so daß hier wahrscheinlich Vesikel mit mehreren TNF-Rezeptoren transportiert wurden.

Eine Abschätzung der benötigten Kräfte, um die Reibung der Vesikel beziehungsweise Connexon-Halbkanäle bei den gemessenen Geschwindigkeiten auszugleichen, ergibt einen Wert von $F_{\text{Zug}} \approx 0,03 \text{ pN}$. Diese Kraft wird von molekularen Motoren wie Kinesin oder Dynein weit übertroffen [87], so daß theoretisch noch höhere Geschwindigkeiten möglich sind.

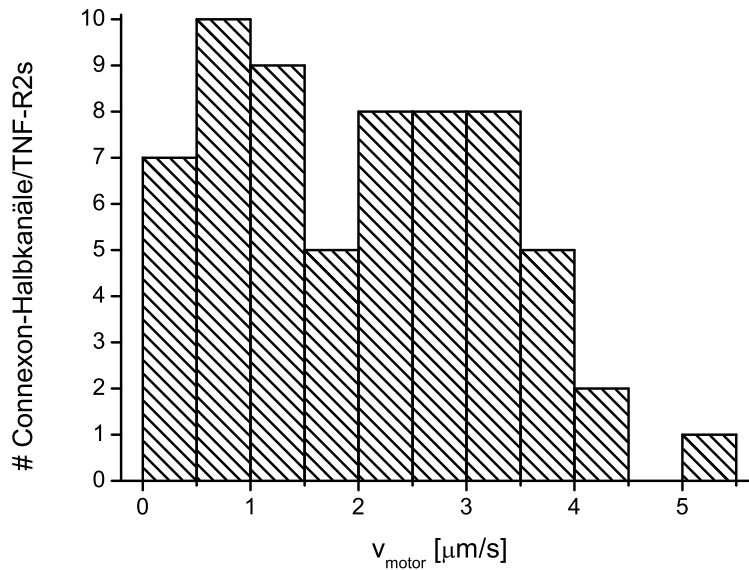


Abbildung 3.14: Histogramm der Drift- und Transportgeschwindigkeiten von Connexon-Halbkanälen.

3.6 Diffusion von TNF-R2 Rezeptoren in HeLa Zellen

Die untersuchten, mit TNF-R2/EGFP transfizierten, Zellen sind mit der halbautomatischen Methode (s. Kap. 3.4) schwieriger auszuwerten, da jeder Fluoreszenzpunkt zwei bis sechsmal dunkler ist als bei den Messungen an Connexon-Halbkanälen. Dies resultiert aus dem monomeren oder maximal trimeren Vorliegen des Rezeptors in der Plasmamembran [88]. Die Statistik des Histogramms in Abbildung 3.15 ist folglich verbesserungswürdig (s. Kap. 3.5.1). An diesem System wurden ebenfalls Messungen mit der FCS Methode vorgenommen, die hier besser geeignet ist Aussagen über die Diffusionskonstante zu treffen, weil schnelle, intensitätsschwache Fluktuationen besser detektiert werden können. Dennoch zeichnet sich im Histogramm der SPT-Messungen ein vergleichbarer Mittelwert der Diffusionskonstanten von etwa $\bar{D}_{\text{TIRFM}} = 3,0 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ zu $\bar{D}_{\text{FCS}} = 3,2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ [26] bei den FCS Messungen ab.

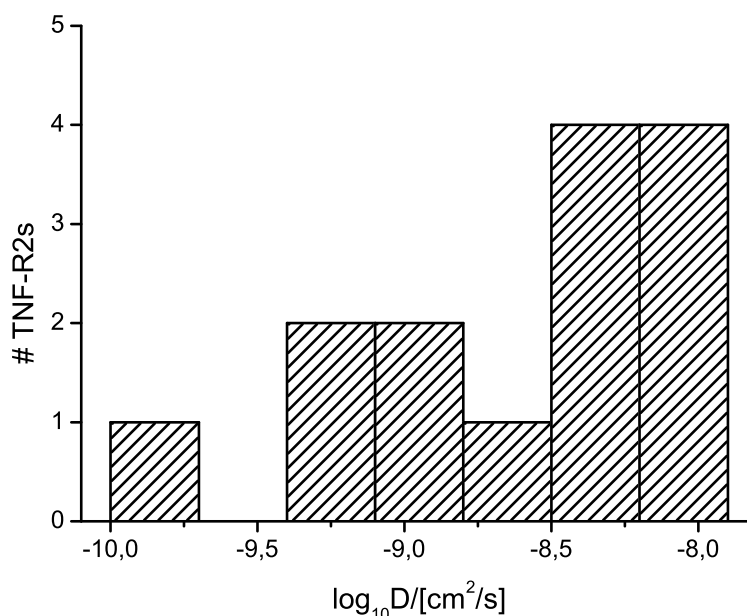


Abbildung 3.15 : Diffusionskonstantenhistogramm der TNF-R2 Oligomere.

Nach Zugabe von *cys*-TNF, dem Liganden des TNF-R2, ist eine Anhäufung des Rezeptors auf der Unterseite der Zelle zu beobachten (s. Abb. 3.16). Dort sind mehrere Zellen einer, mit TNF-R2/EGFP transient transfizierten HeLa80 Probe (dies sind HeLa Zellen, die einen künstlich hohen Anteil an endogenem TNF-R2 haben, der allerdings nicht fluoreszenzmarkiert ist) zu sehen, nachdem der Ligand zugegeben wurde. In den ersten 20 Minuten ist eine deutliche Zunahme der Gesamtfluoreszenzintensität pro Zelle zu beobachten, die dann wieder, durch Internalisierung der TNF-R2/*cys*-TNF Aggregate in das Innere der Zelle, außerhalb des Anregungsvolumens des TIRF Mikroskops, abnimmt. Diese starke Anhäufung ist teilweise durch den Liganden *cys*-TNF zu erklären, der den natürlichen Liganden – membranstämmiges TNF (s. Kap. 2.3.2) – simuliert, indem er die TNF Trimere mit einem Antikörper verbindet. Dadurch koppeln nach Zugabe bereits sechs Rezeptoren aneinander. Die verstärkte Anhäufung kommt im Folgenden durch die große Anzahl von diesen TNF-R2/*cys*-TNF Superkomplexen (etwa 80000 endogene Rezeptoren und einige weitere Tausend fluoreszenzmar-

kierte), die sich in der Membran bilden, zustande.

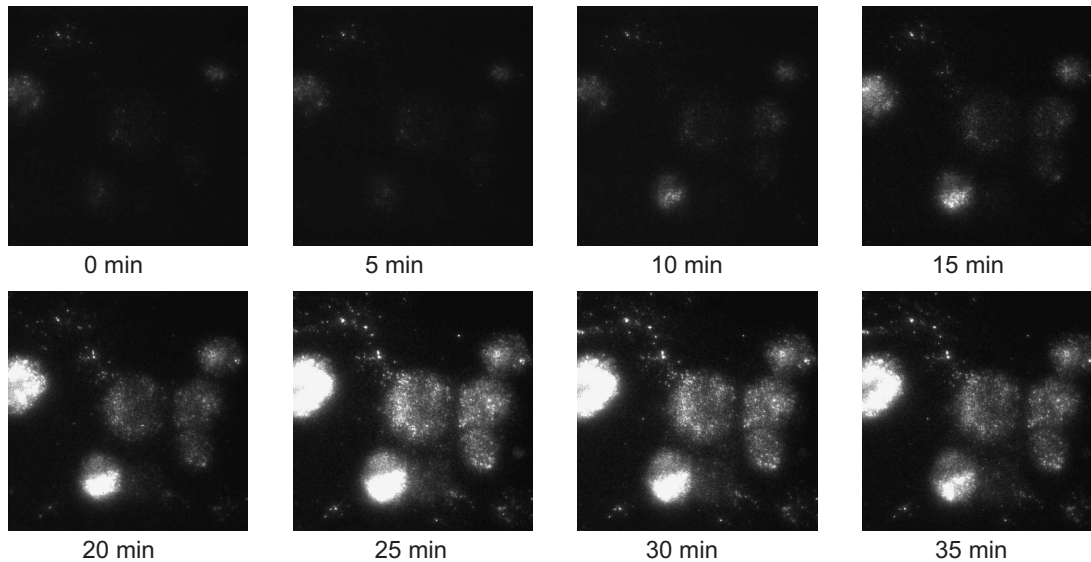


Abbildung 3.16: Zeitreihe von *cys*-TNF stimulierten HeLa80 (TNF-R2/EGFP) Zellen. Näheres siehe Text.

Dieses Resultat kann als Artefakt der Überexpression gelten, da in HeLa Zellen mit geringen, physiologischen Konzentrationen des Rezeptors dieses Verhalten nicht zu beobachten ist [27].

Für die Untersuchung von Signalkaskaden ist es folglich unumgänglich mit niedrigen Molekülkonzentrationen und Einzelmolekültechniken zu arbeiten, um solche Meßartefakte und die daraus resultierenden Fehlinterpretationen der Ergebnisse zu vermeiden.

Kapitel 4

Konfokale Mikroskopie

Dieses Kapitel behandelt die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie unter besonderer Berücksichtigung der Eignung zur Detektion einzelner Moleküle. Es schließt sich eine Einleitung in die Theorie der Fluoreszenzkorrelationsfunktionen an, welche zur Analyse der Meßdaten benötigt wird. Es folgen der Aufbau des für diese Arbeit konzipierten und konstruierten konfokalen Mikroskops mit gepulster Zweifarbenanregung und höchster Detektionseffizienz, das speziell für die Messung der Kreuzkorrelation der autofluoreszierenden Proteine ECFP und EYFP optimiert wurde, und die mit diesem Meßaufbau gesammelten Daten der biologischen Testproben.

4.1 Motivation

Eine zentrale Fragestellung der Zellbiologie behandelt die – eventuell transiente – Bindung von verschiedenen Proteinen. Dazu kann man die erwartete Proteinbindung molekularbiologisch durch Crosslinker stabilisieren und durch Gele extrahieren. Eine Analyse des biologischen Materials in einer solchen Gelbande führt dann zu der gewünschten Evidenz. Dazu sind allerdings große, meist unphysiologische Mengen des Proteins nötig und auch die Crosslinker können zu Artefakten führen.

Eine andere, nicht-invasive Technik ist die der Kollokalisierung mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern. Diese werden mit Antikörpern oder direkt an die zu untersuchenden Proteine gebunden und im Mikroskop vermessen. Bei gleichzeitiger Detektion der beiden Fluoreszenzwellenlängen an einem Ort schließt man, häufig zu Unrecht, auf eine Verbindung. Durch die Beugungsbegrenzung der Lokalisation schränkt sich der Einsatz dieser Methode auf Kollokalisierungen von Proteinen in Kompartimenten der Zelle ein.

Auf molekularer Ebene wird der fluoreszenzresonante Energietransfer (FRET [89]) eingesetzt. Zwei Fluorophore die sehr nahe beieinander liegen (Größenordnung 5 nm) können ihre Anregungsenergie durch Dipol-Dipol Wechselwirkungen strahlungslos übertragen. Wenn zwei unterschiedliche Fluorophore verwendet werden, kann so die räumliche Nähe von Proteinen, an die die FRET-Partner gebunden sind, bestimmt werden [90]. Diese Technik ist in der Praxis schwierig anzuwenden, da die Markierung der beiden Proteine sichergestellt und ein Übersprechen der Fluoreszenzphotonen auf den beiden, für die zwei unterschiedlichen Fluorophore zuständigen, Detektoren (Crosstalk) vermieden werden muß.

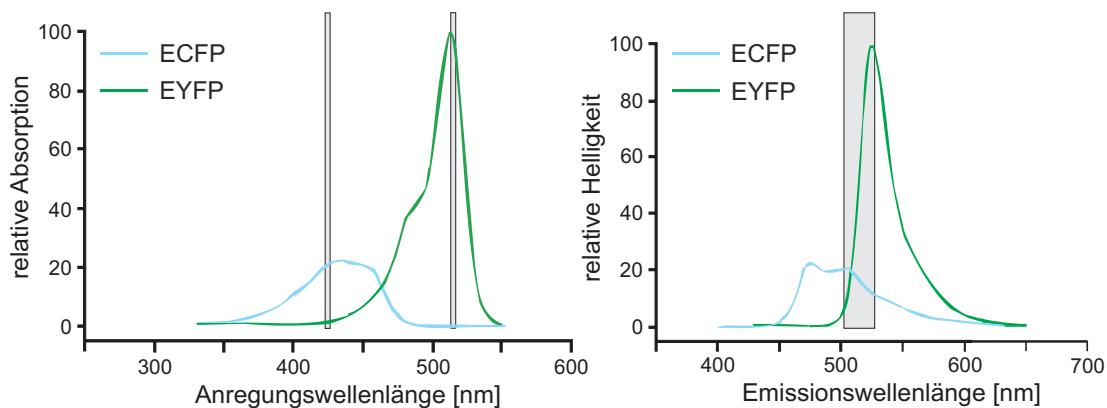


Abbildung 4.1: ECFP und EYFP Absorptions und Emissionsspektren. **Links** die grauen Balken weisen auf die beiden Anregungswellenlängen zur crosstalkfreien Anregung hin. Der graue Balken **rechts** ist der Bereich des Spektrums, der aufgrund des trichroischen Strahlteilers in Abbildung 4.4 undetektiert bleibt.

Auch die Messung der Kreuzkorrelation (s.u.) von zwei unterschiedlichen Chromophoren bestimmt den Anteil der gebundenen Proteine, die durch den Laserfokus schwimmen, auf molekularer Ebene. Da in der Zellbiologie bevorzugt autofluoreszierende Proteine als Marker wegen ihrer Bindungsspezifität und geringen Zelltoxizität verwendet werden, kommt es aber auch bei der Kreuzkorrelationsanalyse zu Problemen mit Detektorcrossstalk der beiden am Besten geeigneten AFPs ECFP und EYFP, wie Abbildung 4.1 verdeutlicht.

Dort sieht man in den Emissionsspektren im Spektralbereich ab 510 nm einen breiten Überlapp der Kurven, der zu einer automatischen Kreuzkorrelation führt, da das Konzentrationsverhältnis der Fluorophore, mit denen man diesen Fehler korrigieren könnte, in lebenden Zellen nicht bekannt ist. Auf der linken Seite der Abbildung sind die Absorptionsspektren der beiden Fluorophore aufgetragen. Hier erkennt man, daß es spektrale Bereiche gibt, in denen man jeweils nur einen Markertyp anregt. Die Idee dieser Arbeit ist es, eine Meßmethode zu entwickeln, mit der eine crosstalkfreie Kolokalisationsmessung von mit ECFP und EYFP markierten Proteinen in lebenden Zellen möglich ist.

Zur Diskriminierung der Fluoreszenzphotonen von ECFP und EYFP werden die beiden Fluorophore selektiv mit zwei Wellenlängen angeregt (425 nm für ECFP und 515 nm für EYFP, siehe graue Bereiche in Abbildung 4.1 links). Um sie aber nach der Detektion eindeutig zuzuordnen zu können, muß man zu einer gepulsten Anregung übergehen (s. Abb. 4.2).

Die beiden Anregungswellenlängen werden alternierend in dasselbe Volumen der Probe fokussiert und die Fluoreszenz der Probe von einem Detektor zeitaufgelöst registriert. Alle Photonen, die dann relativ zu einem Synchronisationspuls in einem bestimmten Zeitintervall den Detektor erreichen, sind jeweils einem Fluorophor eindeutig zuordenbar. Um diese Idee umzusetzen, wurde der in Kapitel 4.4 beschriebene Aufbau konzipiert, mit dem erstmals Kolokalisationsmessungen von Proteinen auf molekularer Ebene auch in geringster Konzentration in lebenden Zellen möglich waren.

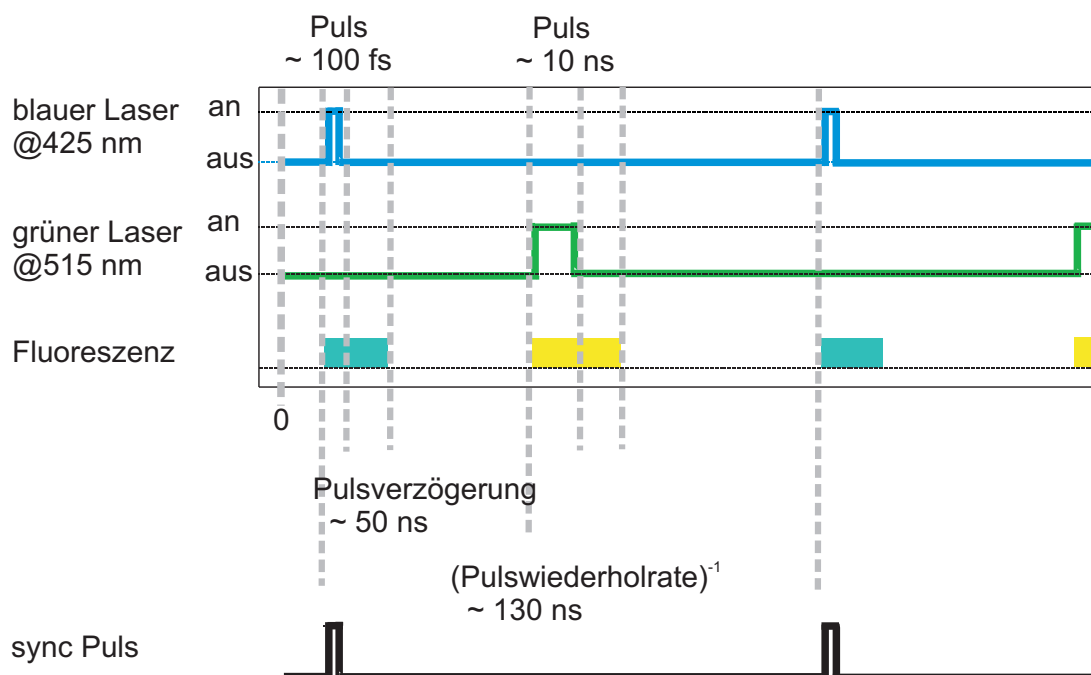


Abbildung 4.2: Pulsschema zum crosstalk free fluorescence cross-correlation spectroscopy (cf-FCCS) Meßprinzip. Die beiden Anregungswellenlängen werden in alternierenden Pulsen auf die Probe gelenkt. Ein Synchronisationspuls hilft die detektierten Photonen eindeutig den beiden unterschiedlichen Fluorophoren zuzuordnen.

4.2 Physikalische Grundlagen

Ein konfokales Mikroskop vereint eine bessere axiale und eine leicht verbesserte laterale Auflösung mit dem Nachteil des langsameren, seriellen Bildaufbaus. Ein fokussierter Laserstrahl definiert das bikonische Anregungsvolumen in der Probe, das durch ein Pinhole in einer konjugierten Ebene zur Objektebene (daher die Bezeichnung *konfokal*), insbesondere in axialer Richtung weiter verkleinert wird. Das effektive Fokusvolumen kann in erster Näherung (Abweichungen von dieser Form werden kurz in Kapitel 4.3.1 diskutiert) als zigarrenförmiges Rotationsellipsoid betrachtet werden, das einem Volumen von einem Bruchteil eines Femtoliters entspricht. Dieses Volumen wird dann zeilen- und spaltenweise durch die Probe ver-

schoben, bis ein zweidimensionaler Schnitt durch die Probe im Auswerterechner vervollständigt ist. Mehrere dieser optischen Schnitte durch das Präparat können dann zu einer dreidimensionalen Rekonstruktion des Objektes zusammengefügt werden.

Die Abbildungseigenschaften eines konfokalen Mikroskops ergeben sich einerseits aus der point spread function (*PSF*, s. Gl. 4.1) des Objektivs, die die Intensitätsverteilung des Anregungslasers – in der Näherung, daß der Laser einer Punktlichtquelle entspricht – in der Probe beschreibt, multipliziert mit der Abbildungsfunktion eines einzelnen Moleküls, die in der Näherung einer Punktlichtquelle ebenfalls der *PSF* entspricht, also dem Quadrat der *PSF* gefaltet mit der Apparatfunktion des Pinholes [91].

$$PSF_{\text{radial}} = 2 \left[\frac{J_1\left(\frac{2\pi}{\lambda} r \, n.A.\right)}{\frac{2\pi}{\lambda} r \, n.A.} \right]^2, \quad PSF_{\text{axial}} = \left[\frac{\sin\left(\frac{\pi}{2n\lambda} z \, n.A.^2\right)}{\frac{\pi}{2n\lambda} z \, n.A.^2} \right]^2 \quad (4.1)$$

Die *PSF* und die daraus abgeleiteten Funktionen gelten streng nur in der paraxialen Näherung (kleine Öffnungswinkel), die Korrekturterme für Objektive mit großer numerischer Apertur sind allerdings von marginaler Auswirkung: die Minima erreichen nicht die Nulllinie und das Airyscheibchen ist ein wenig größer. Im Weiteren werden die exakten Werte der *PSF* benutzt.

Die Auflösung eines konfokalen Mikroskops kann nun durch die Abbildungsfunktion – im Wesentlichen das Quadrat der *PSF* – mit dem Rayleigh-Kriterium für zwei gleich helle, rauschfreie Punkte zu $d_{\text{konfokal, radial}} = 0,88\lambda/n.A.$ (s. Abb. 4.3) und $d_{\text{konfokal, axial}} = 3n\lambda/n.A.^2$ berechnet werden.

Aufgrund des kleinen Detektionsvolumen ist das konfokale Mikroskop besonders zur Messung einzelner Moleküle in lebenden Zellen geeignet:

- Nur wenige bis einzelne Farbstoffmoleküle befinden sich, entsprechende Verdünnung vorausgesetzt, zur selben Zeit im Fokus, so daß Intensitätskorrelationsfunktionen mit hoher Amplitude beobachtet werden können.

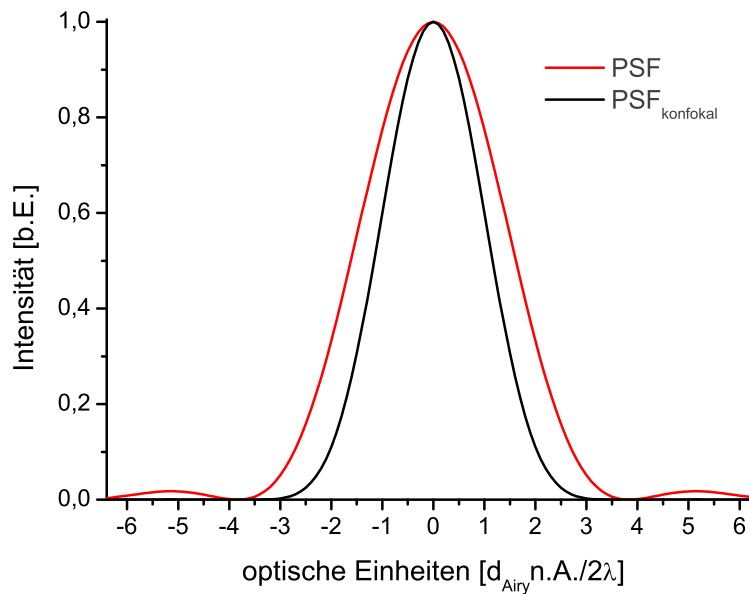


Abbildung 4.3: Laterale Abbildungsfunktion eines einzelnen Moleküls in einem epi- und einem konfokalen Mikroskop.

- Störende Untergrundfluoreszenz kommt nur aus dem kleinen Detektionsvolumen, was zu einem hohen Signal zu Untergrundverhältnis führt.
- Der Fokus kann an verschiedene Stellen innerhalb der Zelle verfahren, und somit lokale Moleküleigenschaften in den unterschiedlichen Zellkompartimenten (hier insbesondere die Zellmembran) untersucht werden.
- Photobleichen und damit verbundene Phototoxizität für die Zelle kann nur in einem kleinen Volumen auftreten und ermöglicht so lange Messungen.

4.3 Korrelationsfunktionen

Zur Bestimmung von Fluoreszenzdynamik benutzt man gemessene Autokorrelationsfunktionen, die mit Modellen der verschiedenen dynamikauslösenden Effekte

verglichen werden. Von den vielen möglichen Größen sind hier zwei von Interesse:

- Konzentrationsdynamik des beobachteten Fluorophors, die zu Schwankungen im Intensitätssignals führt, und
- protonierte/deprotonierte Zustände des Fluorophors EYFP, die zeitlichen dunkel/hell Intervallen im sub-Millisekundenbereich entsprechen.

Dazu multipliziert man das Fluoreszenzsignal mit sich selbst ($i = j$ in Gl. 4.2 — im Folgenden gilt: $i, j \in \{1, 2\}$, $1 \hat{=} \text{ECFP}$, $2 \hat{=} \text{EYFP}$), wobei man eine zeitliche Verschiebung τ einführt. Die zeitliche Mittelung über die Trajektorie ergibt dann die zeitliche Korrelationsfunktion zweiter Ordnung, die dann von diesem neuen Parameter abhängig ist:

$$g_{ij}^2(\tau) = \frac{\langle F_i(t) \cdot F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \cdot \langle F_j(t) \rangle} \Leftrightarrow g_{ij}^2(\tau) - 1 = \frac{\langle \delta F_i(t) \cdot \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \cdot \langle F_j(t) \rangle}. \quad (4.2)$$

Hierbei ist $F_{i,j}(t)$ die Fluoreszenzintensität der Molekülsorte i, j zur Zeit t und die spitzen Klammern stehen für eine zeitliche Mittelung. Die Umformung zur rechten Seite der Gleichung 4.2 geschieht mit der Annahme, daß sich das Fluoreszenzsignal aus einem mittleren Signal $\langle F_i \rangle$ und dem zeitabhängigen Fluktuationsteil $\delta F_i(t)$ zusammensetzt: $F_i(t) = \langle F_i \rangle + \delta F_i(t)$.

Zur Nachbildung des Verlaufs der Autokorrelationsfunktion werden nun Modelle benutzt. Zur Beschreibung der Konzentrationsfluktuationen im Meßvolumen nimmt man dazu ein Fluoreszenzanregungsvolumen an, das sich in allen drei Raumrichtungen durch zwei Gaußfunktionen anpassen läßt. Die Parameter für die x - und y -Richtung sind identisch, so daß das Volumen einem Rotationsellipsoid entspricht.

Die Konzentrationsfluktuationen werden dann mit einer Diffusionsgleichung (dem 2. Fickschen Gesetz, s. Gl. 3.4) modelliert, und man erhält im Falle dreidimensionaler Diffusion (z.B. im Zytoplasma von Zellen oder in Zelllysaten) die drei (erster,

vierter und fünfter) Terme der Gleichung 4.3 [92], die zusätzlich noch einen (zweiter) Term für die Korrektur unkorrelierter Untergrundfluoreszenz und zur Berücksichtigung fluorophorinterner Dynamik (hier die Protonierung/Deprotonierung des optisch aktiven Zentrums von EYFP) bereitstellt (Term drei). Im Falle zweidimensionaler Diffusion (Zellmembran) erübrigt sich der fünfte Term und die Gleichung vereinfacht sich dementsprechend:

$$g_{ii}^2(\tau) - 1 = \frac{1}{\langle N_{ii} \rangle} \left(1 - \frac{F_{UG,i}}{F_{tot,i}}\right)^2 \left(1 + \frac{P_i \exp(-\tau/\tau_p)}{1 - P_i}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff,i}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S_i^2 \tau_{diff,i}}\right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (4.3)$$

mit $\langle N_{ii} \rangle$ der mittleren Anzahl Fluorophore im Beobachtungsvolumen, $F_{UG,i}$, $F_{tot,i}$ der Untergrundfluoreszenzintensität respektive Gesamtfluoreszenzintensität, P_i der Anteil der deprotonierten Moleküle, τ_p der Lebensdauer des deprotonierten Zustands, $\tau_{diff,i}$ der mittleren Aufenthaltsdauer des Fluorophors im Beobachtungsvolumen und S_i dem Strukturfaktor, der dem Verhältnis der Ellipsenradien des Fokus entspricht ($S_i = \frac{r_{xy,i}}{r_{z,i}}$).

Wenn die Diffusionsterme dieser Gleichung auf die Hälfte gegenüber der Amplitude bei der Zeit $\tau = 0$ abgefallen sind, erhält man $\tau_{diff,i}$. Um diese mittlere Fokusaufenthaltszeit – oder auch mittlere Fokustransferzeit – in eine Diffusionskonstante umzurechnen, verwendet man die an dieses Problem adaptierte Gleichung 3.7:

$$r_{xy,i}^2 = 4D_i\tau_{diff,i} \Leftrightarrow D_i = \frac{r_{xy,i}^2}{4\tau_{diff,i}}$$

im Falle dreidimensionaler Diffusion und zweidimensionaler Diffusion in einer Membran. Die Diffusionskonstante selbst gehorcht der Einsteinbeziehung:

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{hd,i}}, \quad (4.4)$$

mit $R_{hd,i}$ dem hydrodynamischen Radius des diffundierenden Teilchens i , T der Temperatur, η der dynamischen Viskosität des umgebenden Mediums und k_B der Boltzmannkonstanten. Die Korrelationsfunktion ist also nicht sehr sensitiv auf die Größe der beobachteten Moleküle, da eine Verdopplung der Proteinmasse m sich, bei gleichbleibender Dichte ρ , nur in einer $\sqrt[3]{m}$ -fachen Vergrößerung der Diffusionskonstanten niederschlägt (bei globulären Proteinen: $R_{hd} = \sqrt[3]{\frac{3m}{4\pi\rho}}$).

Die Kreuzkorrelationsfunktion erhält man, wenn man in Gleichung 4.3 $i \neq j$ setzt [32,93]. Die Fokustransferzeit entspricht der der Autokorrelationsfunktionen. Die Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion berechnet sich unter der Annahme zweier diffundierender Spezies zu [93]:

$$g_{12}(0) - 1 = \frac{\langle C_{12} \rangle}{V_{12}(\langle C_1 \rangle + \langle C_{12} \rangle)(\langle C_2 \rangle + \langle C_{12} \rangle)}, \quad (4.5)$$

mit $\langle C_{12} \rangle$ der mittleren Konzentration der doppeltmarkierten Moleküle im Detektionsvolumen V_{12} . Es gilt die Beziehung $V_{12} \cdot \langle C_{12} \rangle = \langle N_{12} \rangle$. Der Nenner der Gleichung 4.5 bleibt konstant, auch wenn sich das Verhältnis von gebundenen zu ungebundenen Molekülen ändert. Die Amplitude ist dann proportional zu der Konzentration der gebundenen Moleküle. In den weiter unten betrachteten Fällen der Positivkontrollmessungen an Chimären (s. Kap. 4.5.2) und Connexin-Halbkanälen (s. Kap. 4.5.3), in denen es nur doppelt markierte Moleküle gibt, sind die untergrundkorrigierten Amplituden der Autokorrelationsfunktionen und der Kreuzkorrelationsfunktion gleich. Falls letztere dennoch nach unten abweicht, ist dies auf einen unvollständigen Überlapp der Anregungsfoci zurückzuführen.

4.3.1 Limitierungen dieses Modells

Es gibt einige Einschränkungen dieses Modells, die insbesondere den Wert der Diffusionskonstanten beeinflussen:

- Die Annahme eines dreidimensionalen Rotationsellipsoids mit gaußförmiger Intensitätsverteilung ist insbesondere im Nahfeldbereich eines Brechungs-

dexsprunges (Deckglas-Wasser) falsch. Eine genauere Modellierung des Volumens ergibt aber keine analytische Lösung der Diffusionsgleichung und resultiert folglich in einer erschwerten Anpassung an die Meßdaten [94, 95] (Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen ist die Fokusform als Fitparameter zu behandeln [96].).

- Temperaturunterschiede (Erwärmung durch den Laser) und Brechungsindexgradienten in Zellen insbesondere bei Messungen tief im Gewebe beeinflussen das Fokusvolumen.
- Die Annahme freier brownischer Diffusion ist in Zellen, insbesondere in der Zellmembran, selten gegeben. Verschiedene Quellen der anomalen Diffusion und eingeschränkten Diffusion oder auch gerichteter Transport (s. Kap. 3.3) lassen die Korrelationskurven flacher oder steiler abfallen.

Diese Einschränkungen betreffen allesamt nicht die Amplitude der Korrelationsfunktionen, die für die Kolokalisation die entscheidende Größe ist.

4.3.2 Erweiterung auf diffundierende ECFP/Cx₄₆ – EYFP/Cx₄₆ Hexamere

Bei Betrachtung der Zellmembrandiffusion des Connexin-Hexamers, das sich aus ECFP und EYFP markierten Connexinen beliebig zusammensetzen läßt, muß die Korrelationsfunktion durch einen Korrekturterm für die Amplitude erweitert werden, um beispielsweise von der Kreuzkorrelationsfunktion unberücksichtigte Homohexamere mit einzubeziehen.

Dazu nimmt man an, daß die sich im endoplasmatischen Reticulum der Zelle bildenden Hexamere in ihrer Zusammensetzung aus ECFP/Cx₄₆ und EYFP/Cx₄₆-Monomeren binomialverteilt sind:

$$P(k) = \binom{n}{k} \cdot p^k \cdot (1 - p)^{n-k}, \quad (4.6)$$

mit $P(k)$, $k \in \{0 \dots 6\}$ der Wahrscheinlichkeit ein Hexamer ($n = 6$) mit k ECFP Molekülen zu finden, wenn die Besetzungswahrscheinlichkeit des ECFP/Connexins für jeden Platz im Hexamer p (hier $p = 0,5$) ist. Diese Verteilung wichtet die Helligkeiten der Hexamere in den beiden Farben und ändert so die Korrelationsfunktionen. Die Amplituden der Auto- ($i = j$) und Kreuzkorrelationsfunktionen setzen sich aus den Anteilen der Hexamere mit der entsprechenden Anzahl Fluorophoren multipliziert mit der Helligkeit der Fluorophore $\xi_{k,i}$ zusammen:

$$g_{ij}^2(0) - 1 = \frac{1}{\langle N_{ij} \rangle} \left(\sum_{k=0}^6 P(k) \xi_{k,i} \xi_{k,j} \right) / \left[\left(\sum_{k=0}^6 P(k) \xi_{k,i} \right) \cdot \left(\sum_{k=0}^6 P(k) \xi_{k,j} \right) \right], \quad (4.7)$$

mit $\xi_{k,1} = k \xi_{\text{ECFP}}$ und $\xi_{k,2} = (6 - k) \xi_{\text{EYFP}}$.

Setzt man nun Gleichung 4.6 in Gleichung 4.7 ein und vereinfacht die Summen, so erhält man die benötigte Formel zur Berechnung der Korrekturfaktoren C_{ij} :

$$\begin{aligned} (g_{12}^2(0) - 1) \cdot C_{ij} &= \frac{1}{\langle N_{12} \rangle} \frac{\sum_{k=0}^6 k(6-k) \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}}{n^2 p(1-p)} \\ &= \frac{1}{\langle N_{12} \rangle} \frac{\sum_{k=0}^6 k(6-k) \binom{6}{k} 0,5^4}{36} = \frac{1}{\langle N_{12} \rangle} \cdot 1,2, \end{aligned} \quad (4.8)$$

$$\begin{aligned} (g_{11}^2(0) - 1) \cdot C_{ii} &= \frac{1}{\langle N_{11} \rangle} \frac{\sum_{k=0}^6 k^2 \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k}}{n^2 p^2} \\ &= \frac{1}{\langle N_{11} \rangle} \frac{\sum_{k=0}^6 k^2 \binom{6}{k} 0,5^4}{36} = \frac{1}{\langle N_{11} \rangle} \cdot 0,7, \end{aligned} \quad (4.9)$$

mit $C_{11} \equiv C_{22}$.

4.4 Experimenteller Aufbau

Das zentrale Element des Aufbaus ist ein inverses Mikroskopstativ (IX70, Olympus), mit dem die Lebzellprobe im normalen Durchlichtkontrast beobachtet

und positioniert werden kann. Zur konfokalen Messung (s. Abb. 4.4) wird dann auf ein 100 % Umlenkprisma zum linken Mikroskopausgang umgeschaltet. Die Probe selbst wird von einem Piezoscantisch (PiMars P-527.3CL, Physik Instrumente) auf einer Fläche von $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ abgerastert. Ein Teil der emittierten Photonen wird vom Objektiv (UPLAPO 60x/1.2 Wasser, Olympus) aufgefangen, und von der Tubuslinse zum Zwischenbild fokussiert. Die Linse L5 ($f = 60 \text{ mm}$ ARB2vis, Linos) parallelisiert den Strahl, welcher den trichroischen Anregungsstrahlteiler ST (Z425/514RB@10°, Chroma Technology Corp.) passiert und von L6 ($f = 120 \text{ mm}$ ARB2vis, Linos) auf das Pinhole P ($\emptyset = 50 \mu\text{m}$) fokussiert wird. L7 ($f = 60 \text{ mm}$ ARB2vis, Linos) erwirkt eine 1:1 Abbildung des Pinholes auf die empfindliche Detektorfläche ($\emptyset = 170 \mu\text{m}$) einer Avalanche Photodiode (APD, SPCM-AQR 14, EG&G). Dieser Detektortyp zeichnet sich durch eine hohe Detektionseffizienz ($\sim 50 \%$ im sichtbaren Spektralbereich), einer geringen Totzeit (50 ns) und einer geringen Dunkelzählrate ($< 100 \text{ cps}$) aus.

Zwei Laserquellen stellen die Pulse bereit, die den chromatisch alternierenden Fluoreszenzanregungsstrahl bilden:

- Ein DPSSL (Verdi-V5, Coherent Inc.) gepumpter Ti:Sa Laser (Mira900-F, Coherent Inc.) emittiert etwa 100 fs lange Pulse der Zentralwellenlänge 850 nm mit einer Repetitionsrate von 76 MHz. Die Linse L3 ($f = 150 \text{ mm}$ ARB2nir, Linos) fokussiert die Pulse in einen β -Barium Borat (BBO) Kristall ($2,5 \times 2,5 \times 5 \text{ mm}$ Typ II, CASTECH Inc.), dessen nichtlineare optischen Eigenschaften die Photonenenergie verdoppeln (Photonenanzahl und Wellenlänge halbieren). L4 ($f = 200 \text{ mm}$ ARB2vis, Linos) parallelisiert den Strahl der Wellenlänge 425 nm für den folgenden Pulspicker (PulseSelect, APE Berlin), der die Pulsfrequenz auf 7,6 MHz heruntersetzt, bzw. den Interpulsabstand auf 130 ns erhöht.
- Ein continuous wave (cw) Argonionen Gaslaser (Innova 90 C-A3, Coherent Inc.), der bei einer Wellenlänge von 515 nm emittiert, wird von L1 ($f = 60 \text{ mm}$ ARB2vis, Linos) in einen akustooptischen Modulator (AOM,

3350 – 350 MHz, Chrystal Technologies Inc.) fokussiert und im Folgenden von L2 ($f = 40$ mm ARB2vis, Linos) wieder parallelisiert. Das Treibermodul des Modulatorkristalls erhält vom Pulspicker ein 10 ns langes TTL Signal synchron zu den blauen Pulsen, das von einem passend lang gewählten Kabel so verzögert wird, daß aufeinanderfolgende blaue und grüne Pulse einen Abstand von etwa 50 ns haben.

Der Anregungsstrahl wird über einen dichroischen Strahlvereiniger (SV, Z425DC, Chroma Technology Corp.) erzeugt, indem die beiden Laserwellenlängen in Deckung gebracht werden und über die Spiegel S4 und S5 in einem Winkel von 10° auf den Strahlteiler ST geleitet, der ihn in den Mikroskopstativsideport reflektiert. Die Linse L5 und die Tubuslinse ($f = 180$ mm, Olympus) weiten den Anregungsstrahl auf, um die hintere Apertur des Objektivs auszuleuchten und so eine beugungsbegrenzte Fokusgröße zu gewährleisten.

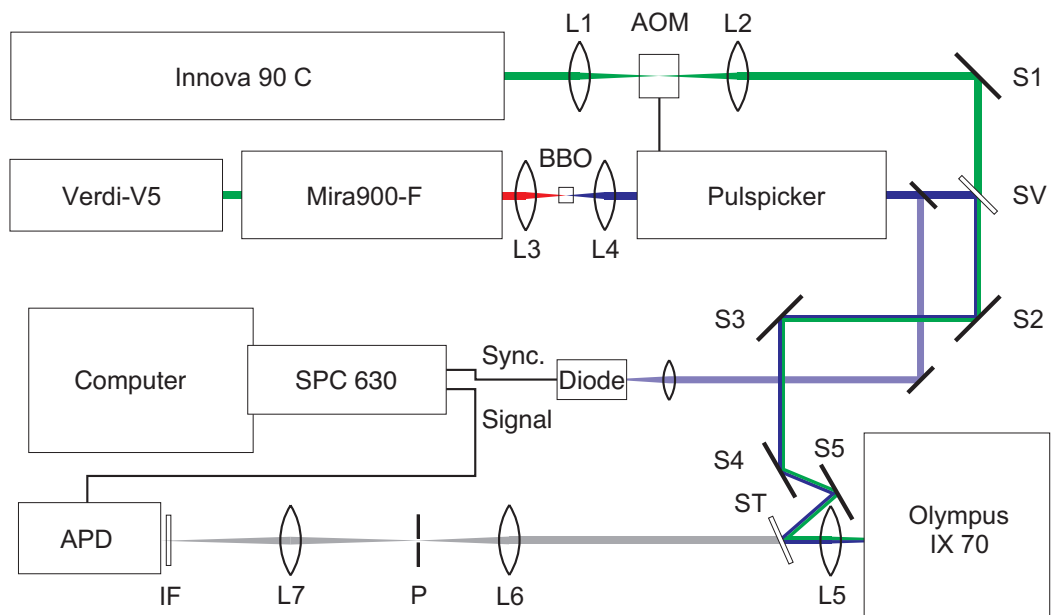


Abbildung 4.4: FCCS Mikroskopaufbauschema: S, L, SV, ST, P, IF stehen für Spiegel, Linse, Strahlvereiniger, Strahlteiler, Pinhole und Interferenzfilter. Näheres siehe Text.

Ein kleiner Teil des blauen Anregungsstrahls wird auf eine Photodiode (PHD-400, Becker&Hickl GmbH) fokussiert, die einen Synchronisationspuls für die Datenaufnahme durch eine time correlated single photon counting Messkarte (TCSPC, SPC-630, Becker&Hickl GmbH) bereitstellt. Diese speichert alle detektierten Photonen mit ihrer Makrozeit (absolute Zeit während der Messung; 50 ns Zeitauflösung) und ihrer Mikrozeit (Zeit relativ zum nächsten Synchronisationspuls; 9 ps Zeitauflösung) ab. Eine Software [97] trennt diese Photonen über zwei frei wählbare Mikrozeitenintervalle in zwei Kanäle, die die timetraces bilden, welche zur Berechnung der Autokorrelationskurven und der Kreuzkorrelationskurve benötigt werden. Photonen außerhalb der beiden Intervalle sind Untergrundphotonen und werden so effektiv diskriminiert.

Der Interpulsabstand von 130 ns ergibt sich aus den Anforderungen, daß einerseits nach jedem Puls genug Zeit zum Abklingen der Fluoreszenz gelassen werden muß ($\sim 3 \cdot \tau_i$), um Crosstalk der Fluorophore in der Zeitdomäne zu verhindern und andererseits, daß genügend Pulse jeder Farbe in die Fokustransitzeit ($\sim 1 - 10$ ms) eines Moleküls fallen. Desweiteren zeigt der Pulspicker bei dieser Einstellung (jeden zehnten Puls durchlassen) die höchste Beugungseffizienz.

Die Gesamtdetektionseffizienz setzt sich analog zur Rechnung in Kapitel 3.2.3 zu:

$$\begin{aligned} \sigma_{\text{konfokale Detektion}} &= \Omega_{\text{Objektiv}} \cdot T_{\text{Objektiv}} \cdot T_{\text{ST}} \cdot T_{\text{Linse}}^3 \cdot \eta_{\text{APD}} \\ &= 0,28 \cdot 0,85 \cdot 0,90 \cdot 0,99^3 \cdot 0,50 \\ &= 0,08 \end{aligned}$$

also 8 % zusammen.

4.5 Ergebnisse

Der Aufbau zeigte anfangs noch starke Untergrundfluoreszenz insbesondere im blauen Kanal, die aber mit einer leichten Korrektur der Anregungswellenlänge an der Filterkante des Strahlteilers hinauf und mit der Verwendung sauberen Im-

mersionswassers und frisch mit Methanol gesäuberten optischen Flächen reduziert werden konnte. Ein typisches Mikrozeitenhistogramm, das die Auswertesoftware Burstanalyser [98] ausgibt, ist in Abbildung 4.5 zu sehen.

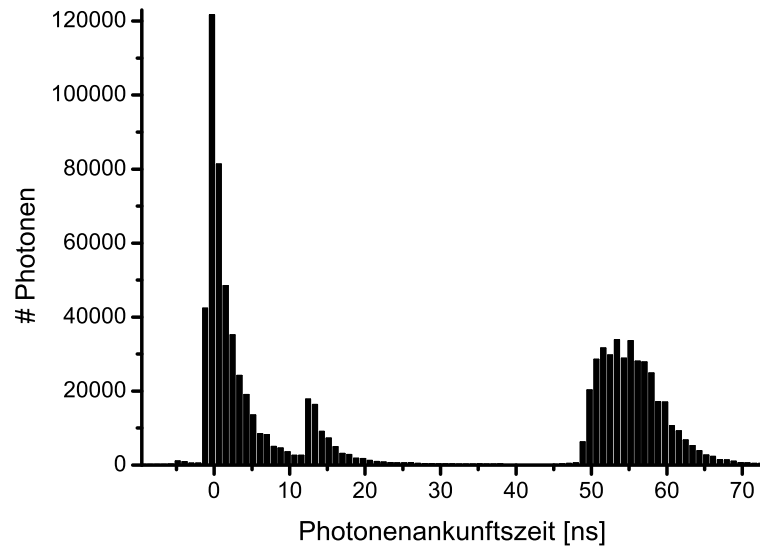


Abbildung 4.5: Mikrozeitenhistogramm einer ECFP/Cx₄₆ – EYFP/Cx₄₆ Messung. Die Abszisse gibt die Zeit vom Synchronisationspuls zur Photonenankeunftszeit am Detektor an. Das erste Maximum bei 0 ns enthält die Fluoreszenzphotonen des ECFP, das zweite bei 13 ns ist ein Meßartefakt und das dritte Maximum enthält die Photonen, die 50 ns nach dem Synchronisationspuls, direkt nach dem grünen Anregungspuls den Detektor erreichen. Näheres siehe Text.

Das erste Maximum ist der Fluoreszenz des ECFPs zuzuordnen. Das zu beobachtende Abfallen der Fluoreszenz zu größeren Zeiten ist monoexponentiell und spiegelt die Lebensdauer des Fluorophors von 3 ns wieder, wie sie auch für ECFP beobachtet wurde [99]. Das sich anschließende zweite, kleinere Maximum im Histogramm, 13 ns nach dem ersten, rührt von dem nicht optimal arbeitenden Puls picker her, der den folgenden Puls des Ti:Sa Oszillators nicht vollständig unterdrücken kann (after pulse).

Das dritte Maximum, etwa 50 ns nach dem ersten, ist gaußförmig mit einer zusätz-

lichen exponentiell abfallenden Flanke zu längeren Zeiten. Die Breite des Gaußanteils beträgt etwa 10 ns, was der Pulslänge des grünen Anregungspulses entspricht. Dieses Maximum kann also der Fluoreszenz von EYFP zugerechnet werden, die der Form des Anregungspulses folgt, um mit der Lebensdauer von EYFP (ca. 3 ns [100]) abzufallen.

Anhand eines solchen Mikrozeithistogramms können nun die Zeitintervalle gewählt werden, deren Photonen für die Berechnung der Autokorrelations- und der Kreuzkorrelationsfunktion herangezogen werden sollen. Dabei lassen sich insbesondere beim blauen Maximum Streulichtphotonen – Lebensdauer im ps Bereich – kurz nach dem Puls, oder auch Untergrundfluoreszenzphotonen von Molekülen mit langen Lebensdauern verglichen mit denen von ECFP, EYFP abschneiden, um so ein besseres Signal zu Untergrundverhältnis zu erreichen. In lebenden Zellen, die eine hohe Autofluoreszenz aufweisen, hilft dieses softwareimplementierte Detektorgating (je nach Lebensdauer der vorherrschenden Autofluoreszenzquellen, die zelltypvariabel sind).

Bei den im Folgenden vorgestellten Messungen trat ein systematischer Fehler auf, der die Diffusionszeiten von ECFP verlängerte. Das Ausmaß dieses Fehlers wurde mit Hilfe der Messungen an per Definitionem gleich schnellen Fluorophoren, wie der ECFP/EYFP Chimäre und den Connexonen (siehe unten) ermittelt. Dieser Fehler resultiert aus zwei Effekten, die den Fokus der blauen Anregungsstrahls vergrößerten. Dies ist zum einen ein Fluoreszenzsättigungseffekt von ECFP und zum anderen ein chromatischer Fehler des Objektivs:

- Ersterer tritt bei einer Anregung mit kurzen Pulsen, wie sie der Ti:Sa-Oszillator erzeugt, auf: das Fokusbild entspricht in seiner Intensitätsverteilung weiterhin einer dreidimensionalen Gaußfunktion. Die Emission des Fluorophors kann dagegen den hohen Intensitäten im Zentrum des Fokus nicht folgen und es bildet sich ein Detektionsvolumen, das verbreitert ist [101]. Dieser Effekt konnte schon bei der in den Messungen verwendeten Anregungsleistung von 50 μ W, vor dem Einsetzen der Diffusionszeitenver-

ringerung durch Bleichen des Farbstoffs, beobachtet werden.

- Der zweite Fehler rührt von der Farbkorrektur des Mikroskopobjektivs her, die insbesondere im Bereich zwischen 432 nm und 488 nm ungenügend ist [102]. Dies ist aber der größte Teil des spektralen Detektionsbereichs der Emission von ECFP. Da nun das Detektorpinhole mit Rhodamin6G auf den grünen Spektralbereich optimal justiert wurde, ist das ECFP Detektionsvolumen in z -Richtung verschoben und somit vergrößert.

4.5.1 Zellysate mit ECFP und EYFP

Zuerst wurden Zellysate mit ECFP respektive EYFP (s. Abb. 2.4) mit phosphate buffered saline (PBS) Puffer auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l verdünnt und 100 μ l von dieser Lösung in einem Objektträger mit Vertiefung vermessen, um die Intensitätsbereiche zu eroieren, in denen keine Anregung von ECFP mit 515 nm, bzw. EYFP mit 425 nm auftritt. Die dann zur Messung verwendeten Leistungen lagen mit 50 μ W bei 425 nm und 5 μ W bei 515 nm (zeitlich gemittelt gemessen: continuous wave – cw) um eine Größenordnung unter den Maximalwerten. Dann wurden die beiden Lösungen vermischt und erneut vermessen. Die resultierenden Autokorrelationskurven zeigt Abbildung 4.6.

Die ECFP Modellkurve einer Einkomponentendiffusion paßt gut zu den experimentellen Daten. Zur Bestimmung der Diffusionskonstante wurde der Wert für den axialen Ellipsenradius von $r_{xy,1} = 2,8 \cdot 10^{-7}$ m verwendet, die dem theoretischen Wert aus der Formel für das Airyscheibchen (s. Kap. 3.2.1) des Detektorwellenlängenmaximums von ECFP, mit einer zusätzlichen Vergrößerung durch die systematischen Fehler (s. voriges Kap.), entsprechen. Der Strukturfaktor beträgt $S_1 = 3,3$. Damit ergeben sich durch die Modellkurve Werte für die Diffusionskonstante und die mittlere Anzahl von Molekülen im Fokus, wie sie in Tabelle 4.1 aufgeführt sind. Letztere ist mit einem großen systematischen Fehler behaftet, da er nicht untergrundkorrigiert ist. Die genaue Korrektur erfordert allerdings die Konzentration von ECFP in der Lösung, die nicht absolut bekannt ist. Allerdings

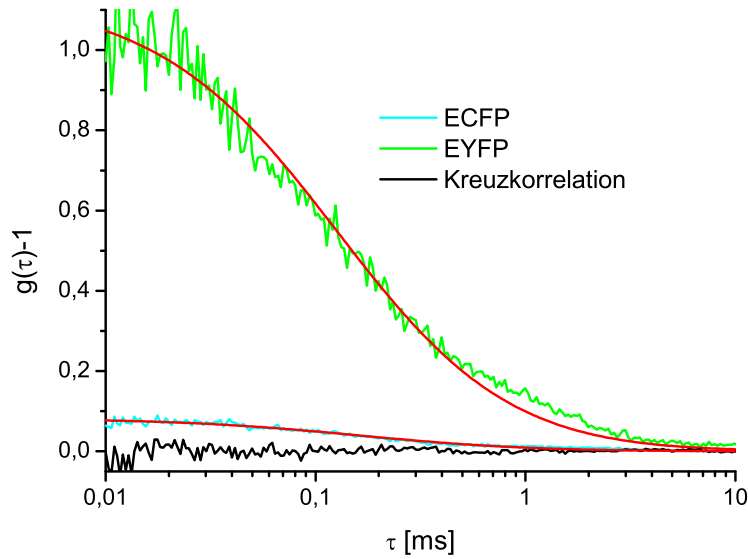


Abbildung 4.6: Korrelationsfunktionen einer ECFP-EYFP Zelllysatzmischung mit einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l je Fluorophor. Die roten Kurven entsprechen Fitfunktionen (vgl. Gl. 4.3) mit den Parametern aus Tabelle 4.1. Anregungsleistung: 50 μ W bei 425 nm, 5 μ W bei 515 nm (cw).

sieht man, daß die Anregung mit hochenergetischen Photonen der Wellenlänge 425 nm viele Untergrundfluoreszenzphotonen von anderen Zellbestandteilen im Lysat hervorruft. Andere Quellen der Untergrundfluoreszenz konnten mit zeitaufgelösten Messungen an verschiedenen Deckglasmaterialien (SUPRASILTMII, BK7), dem Immersionswasser und Pufferlösungen ausgeschlossen werden.

$$\begin{array}{l|l}
 \langle N_{11} \rangle^{-1} = 0,08 \pm 0,00 & D_1 = (7,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} \\
 \langle N_{22} \rangle^{-1} = 1,13 \pm 0,01 & D_2 = (1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s} \\
 r_{xy,1} = 2,8 \cdot 10^{-7} \text{ m} & r_{z,1} = 9,2 \cdot 10^{-7} \text{ m} \\
 r_{xy,2} = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ m} & r_{z,2} = 6,6 \cdot 10^{-7} \text{ m}
 \end{array}$$

Tabelle 4.1: Fitparameter für die Zelllysatzmessung von ECFP-EYFP. Die angegebenen Fehlergrenzen sind reine Fitfehler ohne Berücksichtigung von systematischen Fehlern. Die Fokusparameter sind im Text erläutert.

Die Autokorrelationskurve von EYFP läßt sich ebenfalls recht gut mit einer Einkomponentendiffusion anpassen (s. Kap. 4.3). Eine kleine Abweichung nach oben bei längeren Korrelationszeiten deutet auf vereinzelte EYFP/Protein Komplexe hin, die sich in der Präparation nicht aufgelöst haben. Dies ist insbesondere bei Proben, die lange bei -80°C eingefroren waren der Fall. Bei der ECFP Kurve ist die Abweichung nicht sichtbar, da die ECFP Lysate direkt vor den Messungen hergestellt wurden und so erst kurze Zeit eingefroren waren. Mit den Fokusparametern aus Tabelle 4.1 ergibt sich eine ähnliche Diffusionskonstante wie beim ECFP – ähnliche Werte wie auch in den Veröffentlichungen [17, 103] – und eine mittlere EYFP Anzahl im Fokus von etwa eins. Bei dieser Anregungswellenlänge (515 nm) gibt es keine Untergrundfluoreszenzprobleme.

Die Kreuzkorrelationskurve entspricht einer verrauschten Nulllinie und folgt somit der Erwartung in diesem Negativkontrollexperiment, da ECFP und EYFP keine starken Bindungsdomänen zueinander aufweisen (im Gegensatz zu dem in tetramerer Form vorliegenden DsRed) und daher unabhängig durch den Fokus diffundieren.

4.5.2 Zellysat mit der ECFP/EYFP Chimäre

Als Positivkontrollprobe wurde eine ECFP/EYFP-Chimäre vermessen. Die Chimäre besteht aus einem ECFP- und einem EYFP-Molekül, die mit einem Calmodulinlinker verbunden sind. Sie wurde ursprünglich für Kalziumkonzentrationsmessungen in Zellen entwickelt, wobei die Konformationsänderung des Calmodulinlinkers bei Bindung von zwei Kalziumionen eine Abstandsänderung der beiden Fluorophore induziert, die darauf wiederum mit einem erhöhten Försterenergie-transfer von ECFP zu EYFP reagieren (FRET, s. Kap. 4.1). Diese Funktion der Chimäre ist in diesem Experiment jedoch hinderlich, so daß der zur Verdünnung auf Einzelmolekülkonzentration ($3 \cdot 10^{-9}$ mol/l) verwendete PBS Puffer keine Kalziumionen enthielt und so der Calmodulinlinker in seiner elongierten Konformation, die nur wenig FRET zuläßt, vorlag.

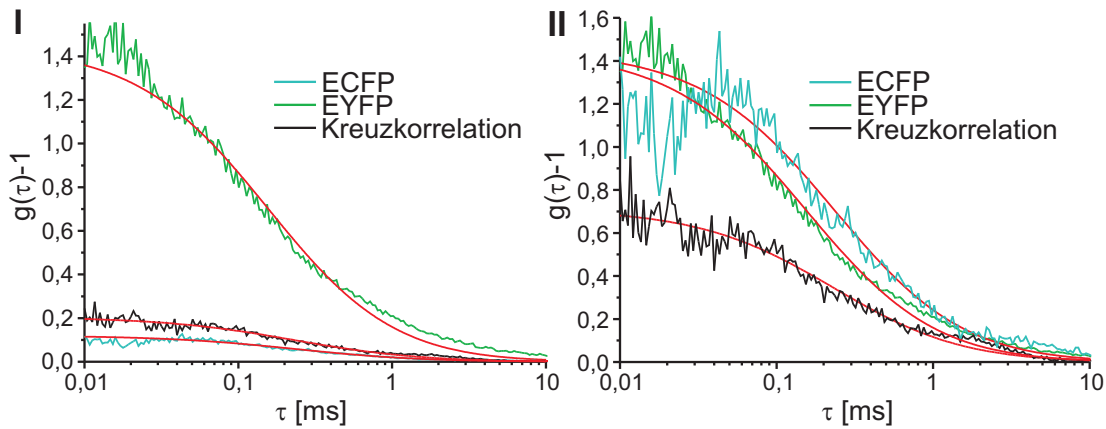


Abbildung 4.7: Korrelationsfunktionen der ECFP/EYFP Chimäre im Zelllysate mit einer Konzentration von etwa $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l. Die roten Kurven entsprechen Fitfunktionen (vgl. Gl. 4.3) mit den Parametern aus Tabelle 4.2. Anregungsleistung: $50 \mu\text{W}$ bei 425 nm , $5 \mu\text{W}$ bei 515 nm (cw). **I** zeigt die Rohdaten und **II** die untergrundfluoreszenzkorrigierten Kurven (siehe Text).

Die Anregungsintensitäten entsprechen denen der obigen ECFP-EYFP Messung im Lysat. Auch hier passen die Modellkurven für dreidimensionale Diffusion gut zu den Meßkurven (s. Abb. 4.7 I). Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion von EYFP entspricht wie erwartet einer mittleren Konzentration der Chimärenmoleküle von ungefähr Eins im Fokalvolumen. Die Diffusionskonstante ist etwas kleiner als im Falle des ungebundenen ECFPs respektive EYFPs (s. Tab. 4.2), weil der in das Diffusionsmodell eingehende hydrodynamische Radius R_{hd} (vgl. Gl. 4.4) dieses Konstrukts etwas größer ist. Da in diesem Experiment die Konzentration aus der quasi untergrundfreien EYFP Messung (s.u.) exakt bekannt ist, kann hier eine Untergrundkorrektur in Form eines Korrekturterms für die Amplitude der Autokorrelationsfunktion (s. Gl. 4.3) vorgenommen werden. Die sich ergebende Kurve zeigt Abbildung 4.7 II.

Die korrigierte Kreuzkorrelationsamplitude von 0,7 entspricht gerade der Hälfte des Wertes, der für hundertprozentige Kreuzkorrelation zu erwarten wäre. Die Diskrepanz erklärt sich durch zwei Nichtidealitäten, die bisher nicht berücksich-

$\langle N_{11} \rangle^{-1} = 0,12 \pm 0,00$	$D_1 = (8,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$
$\langle N_{11,\text{corr}} \rangle^{-1} = 1,42 \pm 0,02$	
$\langle N_{22} \rangle^{-1} = 1,42 \pm 0,01$	$D_2 = (7,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$
$\langle N_{12} \rangle^{-1} = 0,20 \pm 0,00$	$D_{12} = (6,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$
$\langle N_{12,\text{corr}} \rangle^{-1} = 0,70 \pm 0,02$	
$r_{xy,1} = 2,8 \cdot 10^{-7} \text{ m}$	$r_{z,1} = 9,2 \cdot 10^{-7} \text{ m}$
$r_{xy,2} = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}$	$r_{z,2} = 6,6 \cdot 10^{-7} \text{ m}$
$r_{xy,12} = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ m}$	$r_{z,12} = 7,9 \cdot 10^{-7} \text{ m}$

Tabelle 4.2: Fitparameter für die Zellysatmessung von ECFP/EYFP Chimären. Die Fokusparameter für die Kreuzkorrelation entsprechen den Mittelwerten der beiden Anregungsfoki. Die angegebenen Fehlergrenzen sind reine Fitfehler ohne Berücksichtigung von systematischen Fehlern. Näheres siehe Text.

tigt wurden:

- Die beiden Foki überlappen durch zeitliche Instabilitäten des Aufbaus im Zeitraum von 30 min zum Zeitpunkt der Messung nicht mehr vollständig (s. Kap. 4.5.3).
- Eines der beiden Fluorophore einzelner Chimären ist während der langen Aufbewahrungszeit bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert und steht zur Kreuzkorrelationsmessung nicht mehr zur Verfügung.

Trotz dieser Einflüsse reicht diese Amplitude, speziell im Vergleich mit Werten aus anderen Gruppen [29,32] aus, um Kollokalisationsexperimente durchzuführen.

4.5.3 HeLa Zellen mit ECFP/Cx₄₆ und EYFP/Cx₄₆

Die ersten Messungen mit dieser Methode in lebenden Zellen fanden bei Raumtemperatur an dem Membranprotein Connexin statt, das als Hexamer frei in der Plasmamembran vieler Säugerzellen diffundiert (s. Kap. 2.3.1). Als Zelllinie

wurde eine HeLa-Linie gewählt, die sich durch besonders geringe endogene Konzentrationen von Connexinen auszeichnet (ECACC #96112022). Der Effekt einer Vermischung von unmarkierten, endogenen und AFP markierten Connexinen auf die Kreuzkorrelationsamplitude kann vernachlässigt werden. Die Meßkurven sind in Abbildung 4.8 I zu sehen.

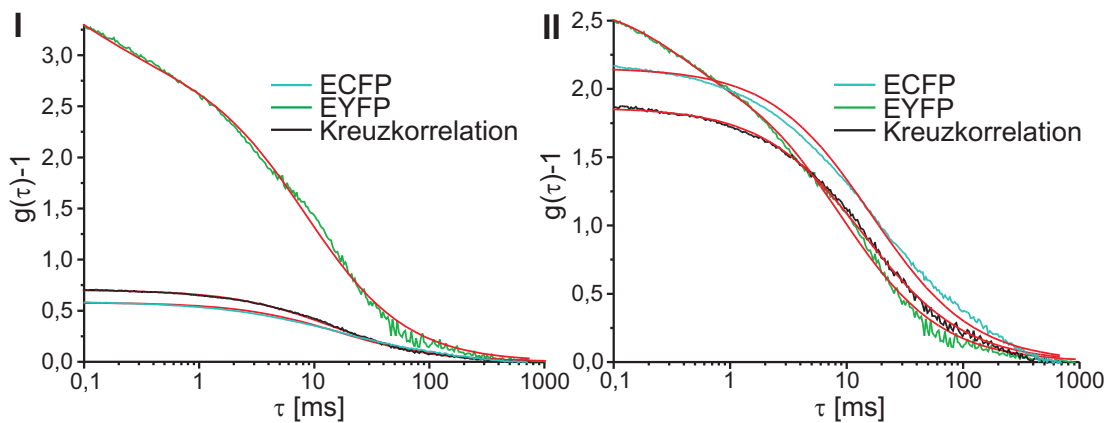


Abbildung 4.8: Korrelationsfunktionen der ECFP/Cx₄₆ – EYFP/Cx₄₆ Fusionsproteine in lebenden Zellen. Die roten Kurven entsprechen den Fitfunktionen (vgl. Gl. 4.3) mit den Parametern aus Tabelle 4.3. Anregungsleistung: 70 μ W bei 425 nm, 5 μ W bei 515 nm (cw). **I** zeigt die Rohdaten und **II** die untergrundfluoreszenz- und binomialverteilungskorrigierten Kurven (siehe Text).

Die Kurven sind bei gleicher Meßzeit wie bei den Chimären (etwa 30 s) deutlich rauschfreier, was auf ein deutlich besseres Signal zu Untergrundverhältnis deutet. Die Fitfunktionen (s. Gl. 4.3 für zweidimensionale Diffusion) passen gut zu einer einkomponentigen Diffusion, wobei für die EYFP-Kurve ein weiterer Term aus Gleichung 4.3 zur Eigendynamik des Fluorophors (Protonierung/Deprotonierung) berücksichtigt werden muß. Dieses Verhalten liegt im selben Zeitbereich wie die Diffusionszeit der Fluorophore im Zellysate und wurde von dieser bei den vorangegangenen Messungen verdeckt. Von Protonierungs- Deprotonierungsreaktionen des EYFP wurde, im Gegensatz zu ECFP, in der Literatur bereits berichtet [104]. Die Diffusionskonstante ist in allen drei Kurven beinahe gleich und mit einem

$P = 0,18$	$\tau_p = 0,34 \text{ ms}$
$\langle N_{11} \rangle^{-1} = 0,58 \pm 0,00$	$D_1 = (1,2 \pm 0,0) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$
$\langle N_{11,\text{corr}} \rangle^{-1} = 2,18 \pm 0,06$	
$\langle N_{22} \rangle^{-1} = 2,86 \pm 0,02$	$D_2 = (1,2 \pm 0,0) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$
$\langle N_{22,\text{corr}} \rangle^{-1} = 2,18 \pm 0,05$	
$\langle N_{12} \rangle^{-1} = 0,70 \pm 0,00$	$D_{12} = (1,0 \pm 0,0) \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$
$\langle N_{12,\text{corr}} \rangle^{-1} = 1,86 \pm 0,02$	
$r_{xy,1} = 2,8 \cdot 10^{-7} \text{ m}$	$r_{xy,2} = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}$
$r_{xy,12} = 2,4 \cdot 10^{-7} \text{ m}$	

Tabelle 4.3: Fitparameter für die Lebendzellmessung von ECFP/Cx₄₆ – EYFP/Cx₄₆. Die Fokusparameter für die Kreuzkorrelation entsprechen den Mittelwerten der beiden Anregungsfoki. Die angegebenen Fehlergrenzen sind reine Fitfehler ohne Berücksichtigung von systematischen Fehlern. Näheres siehe Text.

Wert von um die $D = 1 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ vergleichbar mit Ergebnissen an anderen Membranproteinen [26, 105, 106]. Die unkorrigierte Amplitude der EYFP/Cx₄₆ Kurve entspricht einer niedrigen Konzentration von im Mittel 0,3 Molekülen im Anregungsfokus. Wie bei der Positivkontrolle im Lysat war auch hier der Untergrund im grünen Kanal der Detektion nahe Null, so daß eine Korrektur der ECFP- und der Kreuzkorrelationsamplitude erfolgen konnte (s. Abb. 4.8 II). Zusammen mit den Korrekturfaktoren für die binomiale Verteilung der Heterohexamere C_{ij} aus Kapitel 4.3.2 errechnen sich für die korrigierten Größen die Werte 2,18 für die Autokorrelationen und 1,86 für die Kreuzkorrelation (s. Tab. 4.3), was im letzteren Fall 86 % des Maximalwertes entspricht. Die Nichtidealität ist in diesem Fall zur Gänze dem nicht perfekten Überlapp der Anregungsfoki zuzuschreiben.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit dem jungen Thema der Einzelmoleküldetektion in lebenden Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden ein Totalreflexionsmikroskop mit Prismenanregung und ein prismenloses, inverses Totalreflexionsmikroskop, sowie ein konfokales, gepulstes Zweifarben Fluoreszenzkreuzkorrelationsmikroskop aufgebaut, getestet und mit ihnen an biologischen Proben gemessen. In Kooperation mit Biologen wurden weiterhin Optimierungen an der Probenpräparation unternommen, um es zusammen mit der gesteigerten Detektionseffizienz der ultrasensitiven Mikroskope möglich zu machen die Dynamik einzelner Proteine oder Lipide in Zellmembranen und im Zytoplasma zeitlich aufzulösen. Die Ergebnisse werden kurz nach Kapiteln sortiert aufgelistet.

Das dritte Kapitel behandelt die Weitfeldmessungen mit den Totalreflexionsmikroskopen an Lipiden, Connexonen und TNF-R2 Rezeptoren in lebenden Zellen:

- Einzelne, fluoreszenzmarkierte Lipide konnten in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Die mittlere Diffusionskonstante von $\bar{D} = 1,58 \cdot 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ ist mit Literaturwerten [35, 36] vereinbar und weist so die quantitativ korrekte Funktion der Auswertemethode nach.
- Es ist möglich einzelne, mit grün fluoreszierendem Protein (EGFP) angefarbte Connexon-Halbkanäle in der Plasmamembran zu detektieren.

- Die Fluoreszenzintensität einzelner Punkte aufgetragen gegen die Zeit verifiziert die Annahme einzelner Connexin-Hexamere in der Plasmamembran, da diese in sechs Schritten bleichen. Die sich daraus ergebende Beobachtungszeit liegt im Bereich von Minuten. Dies reicht für Messungen der Bewegungsmoden aus.
- Nur wenige der beobachteten Punkte zeigten außer dem Bleichen eine Dynamik. Deren größte Teil (60 %) bewegte sich mit freier brownischer Diffusion durch die Membran. Die Verteilung der Diffusionskonstanten ist breit, da die interzellulären Variationen der Membranviskosität hoch sind, und weil der Halbkanal in der mit anderen Proteinen dicht gefüllten Membran an unterschiedlich große Komplexe, wahrscheinlich nichtfunktionell, binden kann. Die mittlere Diffusionskonstante beträgt $\bar{D} = 1,55 \cdot 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$.
- 27 % der diffusiven Bewegungen waren durch ein Membranskelett oder ähnliche Strukturen nahe der Doppellipidschicht eingeschränkt. Die Diffusionskonstanten verteilen sich ähnlich breit wie im Falle der freien Diffusion um einen praktisch identischen Mittelwert von $\bar{D} = 1,58 \cdot 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$. Der Radius des einschränkenden, als rund angenommenen Gebietes ist im Mittel $R_c \approx 650 \text{nm}$. Diese Größe wurde auch von anderen Gruppen [66, 80] teilweise auch mit anderen Techniken [79] ermittelt.
- Ein kleiner Anteil der diffundierenden Partikel (13 %) zeigt anomales Diffusionsverhalten. Ein Vergleich mit FCS Daten [26] zeigt eine kongruente Verteilung der Transportkoeffizienten respektive Diffusionskonstanten. Die Verteilung ist hier zu großen Werten hin verschoben, was durch den Anomalieparameter α erwirkt wird. Die Verteilung des Letzteren hat ein Maximum bei mittleren Anomalien von etwa $\bar{\alpha} = 0,63$. Die Maxima der bimodalen Verteilung des Transportkoeffizienten entsprechen anomal, aber allein diffundierenden Kanälen (schnelle Komponente) und anomal, aber in Proteinaggregaten (z.B. Lipid Rafts) diffundierenden Connexin-Hexameren (langsame Komponente).

-
- Obige Ergebnisse stützen die These eines Reservoirs von Connexon-Halbkanälen in der Plasmamembran, aus dem die gap junctional plaques aufgebaut werden [81].
 - Der Hauptvorteil von single particle tracking (SPT) gegenüber Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) Daten ist die Auflösung des Bewegungsmodus jedes einzelnen Moleküls. Die FCS dagegen mittelt über einige hundert Moleküle, respektive Bewegungsmoden.
 - Eine Vielzahl von Fluoreszenzpunkten bewegte sich auf gerichtete Art und Weise. 63 Trajektorien zeigten entweder eine kleine, der Diffusion überlagerte, Driftgeschwindigkeit, oder schnellen gerichteten Transport in der Zellmembran mit Durchschnittsgeschwindigkeiten von bis zu $\bar{v} = 5 \mu\text{m/s}$, die auf Kinesin- oder Dyneinmotortransport entlang Mikrotubuli deuten. Kurzzeitig erreichte Maximalgeschwindigkeiten von $v_{\text{max}} = 10 \mu\text{m/s}$ wurden *in vivo* noch nicht beobachtet [82, 83, 84].
 - Der EGFP fluoreszenzmarkierte TNF-R2 Rezeptor konnte als monomere bis trimere Struktur in der Zellmembran frei diffundierend detektiert werden. Diese, im Vergleich zu den Connexin-Hexameren, dunkleren und schneller diffundierenden Rezeptoren sind am Rande der Meßbarkeit, die dieser Aufbau zu leisten vermag. Eine mittlere Diffusionskonstante von $\bar{D} = 3,2 \cdot 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s}$ ist dabei vergleichbar mit Messungen an diesem Rezeptor mittels FCS [27].
 - Zu beobachten waren zudem hellere, mit gerichtetem Transport bewegte Fluoreszenzpunkte, die mit Durchschnittsgeschwindigkeiten um $\bar{v} = 3 \mu\text{m/s}$ über kurze Distanzen von etwa $1 \mu\text{m}$ an der Membran entlang gezogen wurden. Dies deutet auf aktiv bewegte exozytotische Vesikel hin, die die Transmembranproteine in die Plasmamembran verbringen sollen.
 - Nach Zugabe des Liganden *cys*-TNF in den Rezeptor stark überexprimierenden Zellen sieht man eine sich verstärkende Aggregation der Rezeptoren

auf der Anhaftungsseite der Zelle in einem Zeitraum von 20 min. Danach nimmt die Fluoreszenzintensität wieder ab, da die Proteinaggregate internalisiert, und so aus dem Anregungsvolumen transportiert werden.

Das vierte Kapitel behandelt die gepulsten Zweifarben Kreuzkorrelationsmessungen mit einem konfokalen Mikroskop an verschiedenen biologischen Testproben:

- Das Konzept der zeitlich und farblich alternierenden Laseranregungspulse zur Diskriminierung der beiden autofluoreszierenden Proteine ECFP und EYFP bei der Messung von Kreuzkorrelationen konnte demonstriert werden. Damit sind *in vivo* Messungen zur Proteinbindung mit einer zeitlichen Auflösung von etwa 30 s möglich.
- Testmessungen an ECFP und/oder EYFP enthaltenden Zelllysaten ergaben die gewünschten Negativkontrollen (keine Kreuzkorrelation, aber Autokorrelation). Mit Hilfe einer ECFP/EYFP Chimäre konnte eine Positivkontrolle realisiert werden. Messungen an ECFP/Cx₄₆-EYFP/Cx₄₆ coexpresmierenden HeLa Zellen verifizierte die Meßmethode in lebenden Zellen. Dabei wurde ein Fokusüberlapp der Anregungswellenlängen von 86 % ermittelt.
- Die schlechten Fluorophoreigenschaften des ECFP Proteins und der im blauen Kanal erhöht auftretende Fluoreszenzuntergrund lassen eine Mehrfachklonierung des ECFP-Vektors an ein zu untersuchendes Protein sinnvoll erscheinen.
- Die zeitaufgelöste Detektion aller Fluoreszenzphotonen relativ zu einem Synchronisationspuls ermöglicht die Diskriminierung von langlebiger Untergrundfluoreszenz (>5 ns) und kurzlebigen Streulichts.
- Durch die ebenfalls mögliche Messung der Lebensdauer des ECFPs kann dieser Aufbau dazu genutzt werden, lebensdauerverkürzende Effekte, z.B. fluorescence resonance energy transfer (FRET), nachzuweisen.

Diese Ergebnisse zeigen die Möglichkeiten, die eine fruchtbare Zusammenarbeit zweier naturwissenschaftlicher Gebiete eröffnen. Während die TIRF Mikroskopie besonders geeignet ist einzelne Proteine in oder nahe der Plasmamembran zu untersuchen, ist die FCS, respektive FCCS Methode auch im Zytoplasma und in Organellen lebender Zellen anwendbar. Dabei ist die Entwicklung von neuen Farbvarianten von GFP nicht stehengeblieben. So ist es vor Kurzem einer japanischen Gruppe gelungen ein FCCS Experiment in lebenden Zellen mit den Mutanten EGFP und mRFP1 durchzuführen [107]. Auch hier war der zweite Fluorophor so schwach fluoreszierend, daß mehrere zur Markierung des Zielproteins benötigt wurden. Allerdings überlappen die Fluoreszenzspektren dieser beiden autofluoreszierenden Proteine nicht, so daß auf die gepulste Anregung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, verzichtet werden konnte.

Ein interessanter auswertbarer Zusatzparameter im Falle der Zweifarbenanregungsmethode ist das Antibunching der kreuzkorrelierten Fluorophorphotonen. Aus der Amplitudenreduktion der Antibunchingkurve ließe sich die Anzahl der gebundenen Proteine im Bereich von Dimer bis Multimer ablesen und so mehr Information über die Proteinbindung sammeln.

Mit weiteren Verbesserungen der Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Stickstoff/Leerstellen-Zentren in Nanodiamanten) und der dazu passenden Labelverfahren – sowie weiterer Methoden zur Unterdrückung der Autofluoreszenz von Zellen – eröffnen sich so vielversprechende Anwendungen der höchstempfindlichen Fluoreszenzmikroskopie. Diese werden bei der Suche nach dem komplexen Zusammenspiel der Moleküle in Zellen und den Fehlern darin, die zu Krankheiten führen, helfen.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktur von DiI	7
2.2	Spektren von DiO und DiI	7
2.3	GFP Maus	8
2.4	Proteinstruktur von GFP	9
2.5	Normierte Spektren der GFP Mutanten	10
2.6	Lebenszyklus des Connexins	13
2.7	Modell eines gap junctional plaque	14
2.8	TNF-R1/2 Signalkaskade	16
3.1	TIR Eindringtiefe	20
3.2	Aufrechtes TIRF Mikroskopaufbauschema	21
3.3	Aufrechtes TIRF Mikroskopaufbauschema; Detail: Probenbereich	22
3.4	Inverses TIRF Mikroskopaufbauschema; Detail: Probenbereich . .	25
3.5	Diffusionsmoden in biologischen Membranen	28
3.6	<i>MSD</i> Beispielkurven	34
3.7	Gemessene Beispieltrajektorien mit <i>MSD</i> -Graphen	35
3.8	Diffusionskonstantenhistogramm der DiI/DiO Lipidfluorophore . .	37
3.9	Bleichkurve eines Connexon-Halbkanal/EGFP-Fusionsproteins . .	38
3.10	Diffusionskonstantenhistogramm der Connexon-Halbkanäle	41

3.11	Radienverteilung bei der eingeschränkten Diffusion von Connexon-Halbkanälen	43
3.12	Histogramm von Γ bei anomaler Diffusion von Connexon-Halbkanälen	44
3.13	Histogramm von α bei Connexon-Halbkanälen gemessen mit SPT und FCS	45
3.14	Histogramm der Drift- und Transportgeschwindigkeiten von Connexon-Halbkanälen	47
3.15	Diffusionskonstantenhistogramm der TNF-R2 Oligomere	48
3.16	TNF-R2 Aggregation in HeLa80 Zellen	49
4.1	ECFP-EYFP Spektren	51
4.2	cf-FCCS Pulsschema	53
4.3	point spread function	55
4.4	FCCS Mikroskopaufbauschema	62
4.5	Mikrozeitenhistogramm	64
4.6	Korrelationsfunktionen von ECFP-EYFP im Lysat	67
4.7	Korrelationsfunktionen der ECFP/EYFP Chimäre im Zelllysat	69
4.8	Korrelationsfunktionen der ECFP/Cx ₄₆ – EYFP/Cx ₄₆ Fusionsproteine in lebenden Zellen	71

Tabellenverzeichnis

3.1	Diffusionsmoden	33
3.2	Detektionsfiltertabelle DiI, DiO	36
3.3	Detektionsfiltertabelle EGFP, EYFP	36
3.4	Werte für die Saffman-Delbrück Gleichung	42
4.1	Ergebnisse ECFP-EYFP im Zelllysate	67
4.2	Ergebnisse ECFP/EYFP Chimäre im Zelllysate	70
4.3	Ergebnisse der ECFP/Cx ₄₆ – EYFP/Cx ₄₆ Messung in lebenden Zellen	72

Literaturverzeichnis

- [1] R.P. Feynman. *There's Plenty of Room at the Bottom*. In *annual APS Meeting* 1959.
- [2] T.A. Fulton und G.J. Dolan. *Observation of Single-Electron Charging Effects in Small Tunnel Junctions*. *Physical Review Letters* **59** (1987) 109–112.
- [3] A.M. Fennimore, T.D. Yuzvinsky, W.-Q. Han, M.S. Fuhrer, J. Cumings und A. Zettl. *Rotational Actuators Based on Carbon Nanotubes*. *Nature* **424** (2003) 408–410.
- [4] W.E. Moerner und L. Kador. *Optical Detection and Spectroscopy of Single Molecules in a Solid*. *Physical Review Letters* **62** (1989) 2535–2538.
- [5] M. Orrit und J. Bernard. *Single Pentacene Molecules Detected by Fluorescence Excitation in a p-Terphenyl Crystal*. *Physical Review Letters* **65** (1990) 2716–2719.
- [6] J. Bernard, L. Fleury, H. Talon und M. Orrit. *Photon Bunching in the Fluorescence from Single Molecules: A Probe for Intersystem Crossing*. *Journal of Chemical Physics* **98** (1993) 850–859.
- [7] Th. Basché, W.E. Moerner, M. Orrit und H. Talon. *Photon Antibunching in the Fluorescence of a Single Dye Molecule Trapped in a Solid*. *Physical Review Letters* **69** (1992) 1516–1519.

- [8] A. Zumbusch, L. Fleury, R. Brown, J. Bernard und M. Orrit. *Probing Individual Two-Level Systems in a Polymer by Correlation of Single Molecule Fluorescence*. Physical Review Letters **70** (1993) 3584–3587.
- [9] Th. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber und H. Schindler. *Imaging of Single Molecule Diffusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93** (1996) 2926–2929.
- [10] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito und T. Yanagida. *Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual ATP Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous Solution*. Nature **374** (1995) 555–559.
- [11] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida und K. Kinoshita. *Direct Observation of the Rotation of F1-ATPase*. Nature **386** (1997) 299–302.
- [12] M.A. Bopp, Y. Jia, L. Li, R.J. Cogdell und R.M. Hochstrasser. *Fluorescence and Photobleaching Dynamics of Single Light-Harvesting Complexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94** (1997) 10630–10635.
- [13] A.M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T.J. Aartsma und J. Schmidt. *Unraveling the Electronic Structure of Individual Photosynthetic Pigment-Protein Complexes*. Science **285** (1999) 400–402.
- [14] G. Seisenberger, M.U. Ried, Th. Endreß, H. Büning, M. Hallek und C. Bräuchle. *Real-Time Single-Molecule Imaging of the Infection Pathway of an Adeno-Associated Virus*. Science **294** (2001) 1929–1932.
- [15] M. Ueda, Y. Sako, T. Tanaka, P. Devreotes und T. Yanagida. *Single-Molecule Analysis of Chemotactic Signaling in Dictyostelium Cells*. Science **294** (2001) 864–867.
- [16] R.Y. Tsien. *The Green Fluorescent Protein*. Annual Review of Biochemistry **67** (1998) 509–544.

- [17] G.S. Harms, L. Cognet, P.H.M. Lommerse, G.A. Blab und Th. Schmidt. *Autofluorescent Proteins in Single-Molecule Research: Applications to Live Cell Imaging Microscopy*. Biophysical Journal **80** (2001) 2396–2408.
- [18] R. Iino, I. Koyama und A. Kusumi. *Single Molecule Imaging of Green Fluorescent Proteins in Living Cells: E-Cadherin Forms Oligomers on the Free Cell Surface*. Biophysical Journal **80** (2001) 2667–2677.
- [19] G.S. Harms, L. Cognet, P.H.M. Lommerse, G.A. Blab, H. Kahr, R. Gamsjäger, H.P. Spaink, N.M. Soldatov, C. Romanin und Th. Schmidt. *Single-Molecule Imaging of L-Type Ca^{2+} Channels in Live Cells*. Biophysical Journal **81** (2001) 2639–2646.
- [20] P.H.M. Lommerse, G.A. Blab, L. Cognet, G.S. Harms, B.E. Snaar-Jagalska, H.P. Spaink und Th. Schmidt. *Single-Molecule Imaging of the H-Ras Membrane-Anchor Reveals Domains in the Cytoplasmic Leaflet of the Cell Membrane*. Biophysical Journal **86** (2004) 609–616.
- [21] D. Magde, E. Elson und W.W. Webb. *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System – Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Physical Review Letters **29** (1972) 705–708.
- [22] R. Rigler und J. Widengren. *Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Bioscience **3** (1990) 180–183.
- [23] K.M. Berland, P.T. So und E. Gratton. *Two-Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy: Method and Application to the Intracellular Environment*. Biophysical Journal **68** (1995) 694–701.
- [24] S. Maiti, U. Haupts und W.W. Webb. *Perspective: Fluorescence Correlation Spectroscopy: Diagnostics for Sparse Molecules*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94** (1997) 11753–11757.

- [25] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti und W.W. Webb. *Molecular Dynamics in Living Cells Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy with One- and Two-Photon Excitation*. *Biophysical Journal* **77** (1999) 2251–2265.
- [26] M. Gerken, E. Thews, C. Tietz, J. Wrachtrup und R. Eckert. *Single Molecule Microscopy of Gap junction Hemichannels in Living Cells*. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **6** (2005) 151–159.
- [27] M. Gerken, E. Thews, F. Neugart, A. Krippner-Heidenreich, M. Branschädel, P. Scheurich, C. Tietz und J. Wrachtrup. *First Steps of the TNF Mediated Apoptosis Signaling Cascade. A Fluorescence Correlation Spectroscopy Study*. *Biophysical Journal*: to be published.
- [28] M. Eigen und R. Rigler. *Sorting Single Molecules: Application to Diagnostics and Evolutionary Biotechnology*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (1994) 5740–5747.
- [29] P. Schwille, F.-J. Meyer-Almes und R. Rigler. *Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy for Multicomponent Diffusional Analysis in Solution*. *Biophysical Journal* **72** (1997) 1878–1886.
- [30] U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwille und M. Eigen. *Real-Time Enzyme Kinetics Monitored by Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (1998) 1416–1420.
- [31] A. Camacho, K. Korn, M. Damond, J.F. Cajot, E. Litborn, B. Liao, P. Thyberg, H. Winter, A. Honegger, P. Gardellin und R. Rigler. *Direct Quantification of mRNA Expression Levels Using Single Molecule Detection*. *Journal of Biotechnology* **107** (2004) 107–114.
- [32] K. Bacia, I.V. Majoul und P. Schwille. *Probing the Endocytic Pathway in Live Cells Using Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Analysis*. *Biophysical Journal* **83** (2002) 1184–1193.

- [33] S.A. Kim, K.G. Heinze, M.N. Waxham und P. Schwille. *Intracellular Calmodulin Availability Accessed with Two-Photon Cross-Correlation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101** (2004) 105–110.
- [34] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und J. Watson. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. 1994.
- [35] J.A. Boullier, B.A. Brown, J.C. Bush Jr und B.G. Barisas. *Lateral Mobility of a Lipid Analog in the Membrane of Irreversible Sickle Erythrocytes*. Biochimica et Biophysica Acta **856** (1986) 301–309.
- [36] J.A. Bloom und W.W. Webb. *Lipid Diffusibility in the Intact Erythrocyte Membrane*. Biophysical Journal **42** (1983) 295–305.
- [37] O. Shimomura, F.H. Johnson und Y. Saiga. *Extraction Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology **59** (1962) 223–239.
- [38] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast und M.J. Cormier. *Primary Structure of the Aequorea Victoria Green-Fluorescent Protein*. Gene **111** (1992) 229–233.
- [39] S. Inouye und F.I. Tsuji. *Aequorea Green Fluorescent Protein. Expression of the Gene and Fluorescence Characteristics of the Recombinant Protein*. FEBS Letters **341** (1994) 277–280.
- [40] R.Y. Tsien <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>.
- [41] A. Tepper <http://wwwchem.leidenuniv.nl/metprot/armand>.
- [42] D.A. Goodenough, J. Goliger und D. Paul. *Connexins, Connexons and Intercellular Communication*. Annual Review of Biochemistry **65** (1996) 475–502.

- [43] K. Willecke, J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Guldenagel, U. Deutsch und G. Sohl. *Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome*. *Biological Chemistry* **383** (2002) 725–737.
- [44] J.G. Laing, P.N. Tadros, E.M. Westphale und E.C. Beyer. *Degradation of Connexin43 Gap Junctions Involves Both the Proteasome and the Lysosome*. *Experimental Cell Research* **236** (1997) 482–492.
- [45] V.M. Unger, N.M. Kumar, N.B. Gilula und M. Yeager. *Three-Dimensional Structure of a Recombinant Gap Junction Membrane Channel*. *Science* **283** (1999) 1176–1180.
- [46] H.P. Lu, L.Y. Xun und X.S. Xie. *Single-Molecule Enzymatic Dynamics*. *Science* **282** (1998) 1877–1882.
- [47] W.W. Webb <http://www.drbio.cornell.edu/MPEi/mpei05.html>.
- [48] D. Axelrod. *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*. *Methods in Cell Biology* **30** (1989) 245–270.
- [49] E. Hott. *Wissenswertes über CCD-Kameras*. PCO CCD Imaging 1997.
- [50] C. Hofmann. *Die Optische Abbildung*. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.-G. 1980.
- [51] N. Bobroff. *Position Measurement with a Resolution and Noise-Limited Instrument*. *Review of Scientific Instruments* **57** (1986) 1152–1157.
- [52] M.K. Cheezum, W.F. Walker und W.H. Guilford. *Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles*. *Biophysical Journal* **81** (2001) 2378–2388.
- [53] W. Lukosz und R.E. Kunz. *Light Emission by Magnetic and Electric Dipoles Close to a Plane Interface. I. Total Radiated Power*. *Journal of the Optical Society of America* **67** (1977) 1607–1614.

- [54] W. Lukosz und R.E. Kunz. *Light Emission by Magnetic and Electric Dipoles Close to a Plane Dielectric Interface. II. Radiation Patterns of Perpendicular Oriented Dipoles.* Journal of the Optical Society of America **67** (1977) 1615–1619.
- [55] W. Lukosz. *Light Emission by Magnetic and Electric Dipoles Close to a Plane Dielectric Interface. III. Radiation Patterns of Dipoles with Arbitrary Orientation.* Journal of the Optical Society of America **69** (1979) 1495–1503.
- [56] J. Enderlein, T. Ruckstuhl und S. Seeger. *Highly Efficient Optical Detection of Surface-Generated Fluorescence.* Applied Optics **38** (1999) 724–732.
- [57] J. Mertz. *Radiative Absorption, Fluorescence, and Scattering of a Classical Dipole Near a Lossless Interface: a Unified Description.* Journal of the Optical Society of America B - Optical Physics **17** (2000) 1906–1913.
- [58] D. Braun und P. Fromherz. *Fluorescence Interferometry of Neuronal Cell Adhesion on Microstructured Silicon.* Physical Review Letters **81** (1998) 5241–5244.
- [59] K. Jacobson, E. Sheets und R. Simson. *Revisiting the Fluid Mosaic Model of Membranes.* Science **268** (1995) 1441–1443.
- [60] T. Fließbach. *Statistische Physik.* Spektrum Akademischer Verlag 1995.
- [61] P.G. Saffman und M. Delbrück. *Brownian Motion in Biological Membranes.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **72** (1975) 3111–3113.
- [62] J.P. Bouchaud und A. Georges. *Anomalous Diffusion in Disordered Media: Statistical Mechanisms, Models and Physical Applications.* Physics Reports **195** (1990) 127–293.

- [63] T.J. Feder, I. Brust-Mascher, J.P. Slattery, B. Baird und W.W. Webb. *Constrained Diffusion or Immobile Fraction on Cell Surfaces: a New Interpretation*. Biophysical Journal **70** (1996) 2767–2773.
- [64] M.J. Saxton und K. Jacobson. *Single Particle Tracking: Applications to Membrane Dynamics*. Annual Review of Biomolecular Structure **27** (1997) 373–399.
- [65] M.J. Saxton. *Lateral Diffusion in an Archipelago: Single-Particle Diffusion*. Biophysical Journal **64** (1993) 1766–1780.
- [66] A. Kusumi, Y. Sako und M. Yamamoto. *Confined Lateral Diffusion of Membrane Receptors as Studied by Single Particle Tracking (Nanovid Microscopy)*. *Effects of Calcium-Induced Differentiation in Cultured Epithelial Cells*. Biophysical Journal **65** (1993) 2021–2040.
- [67] D.A. Smith und R.M. Simmons. *Models of Motor-Assisted Transport of Intracellular Particles*. Biophysical Journal **80** (2001) 45–68.
- [68] A. Wechsler. *Videomikroskopie an Einzelnen Molekülen*. Diplomarbeit 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart 2001.
- [69] W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling und B. Flannery. *Numerical Recipes in C*. Cambridge University Press 1992.
- [70] G.J. Schütz, G. Kada, V.Ph. Pastushenko und H. Schindler. *Properties of Lipid Microdomains in a Muscle Cell Membrane Visualized by Single Molecule Microscopy*. EMBO Journal **19** (2000) 892–901.
- [71] U. Kubitscheck, O. Kückmann, T. Kues und R. Peters. *Imaging and Tracking of Single GFP Molecules in Solution*. Biophysical Journal **78** (2000) 2170–2179.
- [72] R.D. Klausner und D.E. Wolf. *Selectivity of Fluorescent Lipid Analogues for Lipid Domains*. Biochemistry **19** (1980) 6199–6203.

- [73] H.G. Kapitza und E. Sackmann. *Local Measurement of Lateral Motion in Erythrocyte Membranes by Photobleaching Technique*. *Biochimica et Biophysica Acta* **595** (1980) 56–64.
- [74] persönliche Mitteilung von Margarita Gerken *3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart*.
- [75] L. Makowski, D.L.D. Caspar, W.C. Phillips und D.A. Goodenough. *Gap Junction Structures: Analysis of the X-Ray Diffraction Data*. *Journal of Cell Biology* **74** (1977) 629–645.
- [76] M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien und S.J. Remington. *Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the Aequorea Green-Fluorescent Protein*. *Science* **273** (1996) 1392–1395.
- [77] M. Weiss, H. Hashimoto und T. Nilsson. *Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. *Biophysical Journal* **84** (2003) 4043–4052.
- [78] M.L. Greenberg und D. Axelrod. *Anomalously Slow Mobility of Fluorescent Lipid Probes in the Plasma-Membrane of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae**. *Journal of Membrane Biology* **131** (1993) 115–127.
- [79] M. Edidin, S.C. Kuo und M.P. Sheetz. *Lateral Movements of Membrane Glycoproteins Restricted by Dynamic Cytoplasmic Barriers*. *Science* **254** (1991) 1379–1382.
- [80] M.P. Sheetz, M. Schindler und D.E. Koppel. *Lateral Mobility of Integral Membrane-Proteins is Increased in Spherocytic Erythrocytes*. *Nature* **285** (1980) 510–512.
- [81] U. Lauf, B.N.G. Giepmans, P. Lopez, S. Braconnot, S.C. Chen und M.M. Falk. *Dynamic Trafficking and Delivery of Connexons to the Plasma Membrane and Accretion to Gap Junctions in Living Cells*. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America **99** (2002) 10446–10451.
- [82] J. Lane und V. Allan. *Microtubule-Based Membrane Movement*. Biochimica et Biophysica Acta **1376** (1998) 27–55.
- [83] H. Yamazaki, T. Nakata, Y. Okada und N. Hirokawa. *KIF3A/B: A Heterodimeric Kinesin Superfamily Protein that Works as a Microtubule Plus End-Directed Motor for Membrane Organelle Transport*. Journal of Cell Biology **130** (1995) 1387–1399.
- [84] J. Lippincott-Schwartz. *The Secretory Membrane System Studied in Real-Time*. Histochemistry and Cell Biology **116** (2001) 97–107.
- [85] W.S. Sale und L.A. Fox. *Isolated β -Heavy Chain Subunit of Dynein Translocates Microtubules In Vitro*. Journal of Cell Biology **107** (1988) 1793–1797.
- [86] R.D. Vale und Y.Y. Toyoshima. *Rotation and Translocation of Microtubules In Vitro Induced by Dyneins from Tetrahymena Cilia*. Cell **52** (1988) 459–469.
- [87] C. Shingyoji, H. Higuchi, M. Yoshimura, E. Katayama und T. Yanagida. *Dynein Arms are Oscillating Force Generators*. Nature **393** (1998) 711–714.
- [88] F.K.M. Chan, H.J. Chun, L.X. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui und M.J. Lenardo. *A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling*. Science **288** (2000) 2351–2354.
- [89] T. Förster. *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik **2** (1948) 55–75.
- [90] Y. Ishii, T. Yoshida, T. Funatsu, T. Wazawa und T. Yanagida. *Fluorescence Resonance Energy Transfer between Single Fluorophores Attached to a Coiled-Coil Protein in Aqueous Solution*. Chemical Physics **247** (1999) 163–173.

- [91] R.H. Webb. *Confocal Optical Microscopy*. Reports on Progress in Physics **59** (1996) 427–471.
- [92] S.R. Aragon und R. Pecora. *Fluorescence Correlation Spectroscopy and Brownian Rotational Diffusion*. Biopolymers **14** (1975) 119–137.
- [93] P. Schuille. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications* chapter 17: Cross-Correlation Analysis in FCS. Springer, Berlin 2001.
- [94] J. Enderlein, I. Gregorand D. Patra und J. Fitter. *Art and Artefacts of Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Current Pharmaceutical Biotechnology **5** (2004) 155–161.
- [95] S.T. Hess und W.W. Webb. *Focal Volume Optics and Experimental Artifacts in Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophysical Journal **83** (2002) 2300–2317.
- [96] Evotec Technologies <http://www.evotec-technologies.com/>.
- [97] J. Zäpfel. *Fluoreszenz-Korrelationsuntersuchungen von Ligand-Rezeptor-Bindungen*. Diplomarbeit 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart 2004.
- [98] N. Zarrabi und J. Zäpfel *Burstanalyse 4.2, 3. Physikalisches Institut, Universität Stuttgart 2004*.
- [99] A. Hoppe, K. Christensen und J. Swanson. *Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Stoichiometry in Living Cells*. Biophysical Journal **83** (2002) 3652–3664.
- [100] G. Striker, V. Subramaniam, C. Seidel und A. Volkmer. *Photochromicity and Fluorescence Lifetimes of Green Fluorescent Protein*. Journal of Physical Chemistry B **103** (1999) 8612–8617.

- [101] I. Gregor, D. Patra und J. Enderlein. *Optical Saturation in Fluorescence Correlation Spectroscopy under Continuous-Wave and Pulsed Excitation*. ChemPhysChem **6** (2005) 164–170.
- [102] persönliche Mitteilung von Martin Maass *Olympus Europa, Hamburg*.
- [103] M. Wachsmuth, W. Waldeck und J. Langowski. *Anomalous Diffusion of Fluorescent Probes Inside Living Cell Nuclei Investigated by Spatially-Resolved Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Journal of Molecular Biology **298** (2000) 677–689.
- [104] P. Schwille, S. Kummer, A.A. Heikal, W.E. Moerner und W.W. Webb. *Fluorescence Correlation Spectroscopy Reveals Fast Optical Excitation-Driven Intramolecular Dynamics of Yellow Fluorescent Protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97** (2000) 151–156.
- [105] V. Borisenko, T. Loughheed, J. Hesse, E. Füreder-Kitzmüller, N. Fertig, J.C. Behrends, G.A. Woolley und G.J. Schütz. *Simultaneous Optical and Electrical Recording of Single Gramicidin Channels*. Biophysical Journal **84** (2003) 612–622.
- [106] G.J. Schütz, V.Ph. Pastushenko, H.J. Gruber, H.-G. Knaus, B. Pragl und H. Schindler. *3D Imaging of Individual Ion Channels in Live Cells at 40 nm Resolution*. Single Molecules **1** (2000) 25–31.
- [107] K. Saito, I. Wada, M. Tamura und M. Kinjo. *Direct Detection of Caspase-3 Activation in Single Live Cells by Cross-Correlation Analysis*. Biochemical and Biophysical Research Communications **324** (2004) 849–854.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Abhandlung beigetragen haben. Herrn Prof. Jörg Wrachtrup danke ich für die Aufnahme in sein Institut und die gewährte Entscheidungsfreiheit bei den Experimenten. Für die Übernahme des Mitberichts danke ich Herrn Prof. Clemens Bechinger. Für die Aufrichtung in theoretischen Schief lagen danke ich Carsten Tietz und bei experimentellen Problemen Fedor Jelezko. Für die Programmierung der Software zur Auswertung der Experimente danke ich meinen Diplom- bzw. Masterstudenten Axel Wechsler und Johannes Zäpfel.

Biologischen Nachhilfeunterricht habe ich insbesondere Reiner Eckert vom Biologischen Institut der Universität Stuttgart Abteilung Biophysik zu verdanken, ebenso wie die Probenpräparation der Connexin-transfizierten Zellen und Ideen zu vielen neuen Möglichkeiten Zellen auf ein Mikroskop zu spannen. Mein Dank für die Bereitstellung TNF-R2 transfizierter Zellen gilt dem Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart, insbesondere deren Mitarbeitern Prof. Scheurich und Anja Krippner-Heidenreich, die mir auch immer wieder die Notwendigkeit klarer Ausdrucksweise zum gegenseitigen Verständnis vor Augen führten.

Die gute Arbeitsatmosphäre unter allen Mitgliedern des 3. Physikalischen Instituts während meiner Anwesenheit hat mir sehr geholfen die Motivation über den Zeitraum der Dissertation aufrecht zu erhalten und auszubauen. Möge die hohe Variation der Gesprächsthemen niemals versiegen und das damit verbundene Halbwissen obsiegen.

Einen nicht unerheblichen Anteil an dem Gelingen der Experimente hatten die Mitarbeiter der mechanischen Werkstätten und der Glaswerkstatt, ohne deren Maßanfertigungen die Mikroskope nicht zu realisieren gewesen wären.