

**Einzelmolekülspektroskopie in lebenden Zellen:
Untersuchung und Anwendung alternativer
Fluoreszenzmarkierungen mit verbesserten
photophysikalischen Eigenschaften**

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

Vorgelegt von
Felix Neugart
aus Wiesbaden

Hauptberichter: Prof. Dr. Jörg Wrachtrup
Mitberichter: Prof. Dr. Clemens Bechinger

Tag der mündlichen Prüfung:
4. November 2009

3. Physikalisches Institut der Universität Stuttgart
2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	15
2	Grundlagen und Methoden	21
2.1	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	21
2.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	22
2.2.1	Prinzip der konfokalen Mikroskopie	22
2.2.2	Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops	24
2.3	Einzelmolekülspektroskopische Methoden in lebenden Zellen	25
2.3.1	Single Particle Tracking	26
2.3.2	Fluorescence Fluctuation Analysis (FFA)	28
2.3.3	Förster Resonant Energy Transfer (FRET)	35
2.4	Markierung einzelner Proteine	36
2.4.1	Fluoreszierende Markierungen zur Einzelmolekülspektroskopie in lebenden Zellen	36
2.5	Experimentelle Aufbauten	39
2.5.1	Konfokale Mikroskopie zur Durchführung von FFA und FRET	39
2.5.2	Imaging für Single Particle Tracking-Experimente	42
3	Nanodiamanten mit Nitrogen-Vacancy-Zentren	45
3.1	Theoretische Grundlagen	45
3.1.1	Aufbau und Eigenschaften des NV-Zentrums	45
3.1.2	Herstellung fluoreszierender Nanodiamanten	47
3.1.3	Oberflächenchemie an Nanodiamanten	51
3.1.4	Stabilität kolloidaler Lösungen in physiologischem Puffer (DLVO-Theorie)	51
3.1.5	Einbringen von Nanopartikeln in lebende Zellen	55
3.2	Experimente	56
3.2.1	Oberflächenchemie	56
3.2.2	Überprüfung der Stabilität von kolloidalen wässrigen Nanodiamantenlösungen	58
3.2.3	Nanodiamanten in lebenden Zellen	60
3.2.4	Single Particle Tracking von fluoreszierenden Nanodiamanten	64
3.3	Diskussion und Ausblick	68
4	Untersuchungen von Signaltransduktionsprozessen in der Plasmamembran lebender Zellen	73

4.1	Grundlagen	73
4.1.1	Signaltransduktionsprozesse	73
4.1.2	Einzelmolekülspektroskopie an Membranproteinen in der Plasmamembran lebender Zellen	75
4.2	TNF-Rezeptor-Komplex	76
4.2.1	Biologischer Hintergrund	76
4.2.2	PCH-Analysen zu FCS-Untersuchungen an TNF-Rezeptor 2	79
4.3	CNTF-Rezeptor-Komplex	83
4.3.1	Biologischer Hintergrund	83
4.3.2	FCS-Untersuchungen an den Proteinen des CNTF-Rezeptor-Komplexes	86
4.3.3	FCCS- und FRET-Untersuchungen an mit zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF-Liganden	87
4.4	Diskussion und Ausblick	100
5	Zusammenfassung	105

Abkürzungsverzeichnis

ACP	Acyl Carrier Protein
APD	Avalanche Photo Diode
ALEX	Alternated Laser Excitation
BP	Bandpass
cAMP	Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CoA	Coenzyme A
Cy	Cyanine
DCLP	Dichroischer Langpass
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
EMCCD	Electron Multiplying Charge-coupled Device
ATPase	Adenosintriphosphat-Synthase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCFS	Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
FFA	Fluorescence Fluctuation Analysis
FRET	Förster Resonant Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
gp130	Glycoprotein 130
GPI	Glucose-6-phosphat-Isomerase
H-Ras	Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
HeLa	Henrietta Lacks
IL6	Interleukin-6
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LP	Langpass
MSD	Mean Square Displacement
NV	Nitrogen-Vacancy
ODMR	Optical Detected Magnetic Resonance

PCH	Photon Counting Histogram
PIE	Pulsed Interleaved Excitation
ppm	Parts per Million
PSF	Point Spread Function
STED	Stimulated Emission Depletion
SPC	Single Photon Counting
TIRF	Total Internal Reflection
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNT	Trinitrotoluol
TTL	Transistor-Transistor-Logik
YFP	Yellow Fluorescent Protein

Summary

Since the nineties single-molecule fluorescence techniques have been used for investigations in molecular biology and biochemistry. The application of single-molecule fluorescence techniques allows addressing biological questions which were inaccessible via ensemble measurements. Dynamic interactions of nucleic acids and proteins can be probed by Förster resonance energy transfer (FRET), single-particle tracking can follow the trajectory of single-molecules over distances of microns, and fluorescence fluctuation analysis yields information on concentration, diffusion behavior and binding of proteins.

Even though these techniques are now established as powerful tools that can reveal the dynamic behavior of proteins and nucleic acids, the application of single-molecule techniques in live cells remains challenging. To use single-molecule techniques in live cells, one has to overcome a decreased signal-to-noise ratio caused by the high auto-fluorescence of the cell. Another crucial point is the necessity of high specificity in labeling of the molecules of interest. Establishing new labels with enhanced photo-physical properties compared to frequently used labels is a major issue towards making the described methods more commonly available for investigations in live cells.

Developing and applying alternative fluorescent labels with enhanced photo-physical properties was an important aspect of this thesis. One approach to achieving this goal was to introduce nanodiamonds with fluorescent NV color centers as markers in live cells. Another currently uncommon labeling technique using ACP-tags was used to investigate protein complexes at the plasma membrane of live cells. This technique offers a specific label for proteins. Synthetic fluorescent chromophores with superior photo-physical properties can bind to ACP-tags with high specificity. The significant enhancement in the signal to noise ratio allows detecting single receptors in living cells by spectroscopic means. The following paragraphs present the most important results of this work.

Nanodiamonds with NV centers

The aim of these experiments was to initiate the use of nanodiamonds with fluorescent NV color centers as a label for live-cell microscopy. Several aspects such as specific binding to proteins, the stability in physiological buffers and the insertion of nanodiamonds into live cells were investigated.

The specific binding of a protein to nanodiamonds was demonstrated by the specific association of fluorescent streptavidin to diamonds functionalized via biotin. The successful bond between the two constituents was evidenced by fluorescence correlation spectroscopy measurements.

Nanodiamonds with chemically untreated surfaces generally neither form a stable colloidal solution in water nor in physiological buffer solution. Due to their electrically neutral surface potential nanodiamonds interact only through attractive van der Waals forces and therefore aggregate. To avoid aggregation of nanodiamonds, the nanodiamond surface was treated with concentrated highly oxidizing acids. This treatment leads to carboxylic groups at the nanodiamond surface. The dissociation of these carboxylic groups in water results in a negatively charged surface, which stabilizes the colloidal solution of nanodiamonds. Unfortunately, the created surface potential is not sufficient to prevent aggregation in a physiological buffer. Either a further increase of the surface potential or sterical hindering of aggregation via polymers at the nanodiamond surface can overcome this problem.

The insertion of nanodiamonds in live cells was demonstrated via endocytosis and via microinjection. To verify an uptake of nanodiamonds to the inside of a cell, the plasma membrane of the cells was fluorescently labeled. Nanodiamonds of 40 nm diameter were detected in a confocal microscope via scattered and fluorescent light within the fluorescent membrane.

Single-particle Tracking has been demonstrated on nanodiamonds in glycerol and in live cells. Analyzing the diffusion of nanodiamonds after the endocytic uptake by the cell, both directed transport and constrained diffusion were observed. The speed of the directed transport was in the order of $0.1 \mu\text{m s}^{-1}$, and the projected area of the confined motion yielded a corral size with a diameter in the order of $1 \mu\text{m}$. These values are comparable with diffusion behavior of endosomes reported in literature.

Further steps are needed to establish nanodiamonds with NV centers as fluorescent label for live cell experiments. Smaller diamonds with a diameter less than 10 nm can

additionally decrease perturbations to the labeled protein of interest. This, however, requires a higher NV density ensuring one or even several fluorescent color centers within the nanodiamond. Furthermore, a higher stability of the colloidal nanodiamond solution is required. An alternative to endocytosis and microinjection could be the uptake of nanodiamonds via carrier peptides. In contrast to the endocytic uptake the nanodiamonds will not be coated by a lipid layer so that specific binding sites are still active after the uptake. The advantage of carrier peptides compared to microinjection is to easily address many cells at once instead of only few cells manually penetrated by a micropipette. However, the uptake of nanodiamonds with carrier peptides has not been verified, since it was not possible to distinguish between nanodiamonds taken up by endocytosis or via carrier peptides.

Investigation of signal transduction processes in the plasma membrane of live cells

In the second part of this thesis, experiments were performed on live cells to investigate the formation of protein complexes in the plasma membrane which are involved in cell signaling. Single-molecule methods were used for investigations of the initial steps of two different signal transduction processes. Malfunction of these signal transduction processes can lead to several serious diseases, which makes a detailed understanding of these processes very important.

The proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) binds two distinct plasma membrane receptors, TNF receptor 1 and TNF receptor 2. Due to stimulation via the ligand, the TNF receptor complex forms in the plasma membrane of live cells and initiates the signaling pathway that affects regulation of apoptosis.

Former measurements evidenced a slowdown in the diffusion of TNF receptor 2 due to complex formation after stimulation. Unstimulated TNF receptor 2 diffusion is rather fast ($D = 3.1 \times 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$) and markedly reduced within 30 min upon stimulation of TNF receptor 2 ($D = 0.9 \times 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$). For an explanation of this behavior two models were discussed. One model describes the formation of higher-ordered receptor clusters, the other assumes an association to a slowly diffusing structure. This was done by photon-counting histogram (PCH) analysis which yields information about the brightness of the diffusing complexes.

As a result of the PCH analysis of fluorescence traces of GFP labeled TNF receptor 2, the model describing a clustering of TNF receptors was discarded. Consequently, the other model, assuming the association of the complex to a slowly diffusing structure

Summary

due to stimulation, is validated. For a detailed description of the stoichiometrie of the TNF receptor complex, i. e. the question of two or three TNF receptors per complex, the signal-to-noise ratio was not sufficient as auto-fluorescent proteins were used.

In a second set of experiments the Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) was investigated. CNTF receptor complexes form at the plasma membrane, due to stimulation by the ligand CNTF, and initialize the further signaling process. In addition to the ligand CNTF three membrane proteins are involved in this complex: CNTF receptor, gp130 and LIF receptor. Even though the involved proteins are known, the exact stoichiometrie of the complex still remains unclear. Prior investigations proposed a tetrameric (one CNTF, one CNTF receptor, one gp130 and one LIF receptor) and a hexameric model (two CNTFs, two CNTF receptors, one gp130 and one LIF receptor) for the CNTF receptor complex. For investigating the stoichiometrie of this complex, ACP-tag labeled CNTF ligands and CNTF receptors were used.

By analyzing auto and cross correlation, FRET experiments and PCH, the existence of complexes in the plasma membrane with two CNTF ligands and two CNTF receptors was demonstrated. A quantitative analysis showed that 8 % of the CNTF receptors bind a ligand due to stimulation. 20-100 % of these receptor ligand pairs were part of complexes with two CNTF receptors and ligands. Furthermore the distance between two CNTF ligands within the complex was determined by FRET measurements to be 5 – 7 nm. The distance between two receptors exceeds 8 nm. Results of the thesis clearly argue against the tetrameric model. In combination with further recent studies an octameric model (two CNTFs, two CNTF receptors, two gp130 and two LIF receptors) is proposed in addition to the hexameric model. As the hexameric model contains only one LIF receptor, whereas the octameric model contains two, further experiments, i. e. measurements of cross correlation of differently labeled LIF receptors are required.

The success of investigating the CNTF receptor complex using cross correlation and FRET experiments at a single-molecule level on proteins labeled via ACP-tags was only possible due to the increased signal-to-noise ratio compared to a system with auto-fluorescent proteins.

The application of the methods of single-molecule spectroscopy presented in this thesis, offers new approaches to problems of cell biology that were inaccessible by currently established methods. During the past years these methods have been incorporated into

commercial systems, or such a development is in progress. Hence, one can expect an increasing propagation of single molecule techniques in biology and medicine in the near future.

Summary

1 Einleitung

Platons Höhlengleichnis in der Politeia, seinem Hauptwerk, beschreibt eine Gruppe von Menschen, deren gesamte Erfahrung aus dem Leben in einer Höhle herrührt. Im Eingang der Höhle befinden sich andere Menschen, die für die Personen in der Höhle nicht direkt sichtbar sind und von ihnen lediglich als Schatten an der rückwärtigen Höhlenwand wahrgenommen werden.

Für die Menschen in der Höhle besteht kein Anlass, die Frage nach der Welt außerhalb der Höhle und nach der Ursache der Schatten zu stellen. Platons Gleichnis beschreibt dann, wie eine Person aus der Höhle ins Freie gelangt und bei ihrer Rückkehr von den Erfahrungen in der Welt außerhalb der Höhle berichtet. Die anderen Bewohner der Höhle schenken diesen Berichten aber zunächst wenig Glauben oder Beachtung, da sie ihrem vom Leben in der Höhle geprägten Weltbild verhaftet sind. Erst mit der Zeit und mit weiteren Erkundungen außerhalb der Höhle kann sich das Weltbild der Menschen in der Höhle entscheidend weiterentwickeln.

Auch in Bereichen der Wissenschaft wird so durch neue Untersuchungsmethoden bisher nicht zugängliches Wissen erlangt und der Grundstein zu einem besseren Verständnis der Dinge gelegt. Die Entwicklung der Mikroskopie machte die Abbildung von Strukturen möglich, die zu klein sind, um sie mit dem menschlichen Auge wahrzunehmen, und prägte so das Bild des Lebens auf zellulärer Ebene. Das Verständnis von Prozessen innerhalb lebender Zellen wurde durch die Etablierung genspezifischer Fluoreszenzmarkierungen geprägt. Neben den meist qualitativen Ensemble-Untersuchungen bestehen mit den noch jungen Methoden der Einzelmolekülspektroskopie seit einigen Jahren auch Ansätze, die in Zukunft zu einem besseren quantitativen Verständnis von Prozessen in Zellen führen können.

Vor zwei Jahrzehnten konnte erstmals Fluoreszenz auf Einzelmolekülniveau nachgewiesen werden. Die Gruppen von Moerner [1] und Orrit [2] wiesen unabhängig voneinander die Fluoreszenz einzelner Pentazenmoleküle in einer p-Terphenylmatrix in flüssigem Helium nach. Es folgte der zur Anwendung auf biologische Fragestellungen notwendige

1 Einleitung

Schritt des Einzelmolekülnachweis bei Raumtemperatur [3]. Der erste Nachweis in wässriger Umgebung, der ebenfalls die erste biologische Anwendung darstellt, konnte von Funatsu et al. [4] 1995 erbracht werden.

In den Folgejahren ist die Zahl der Publikationen im Bereich der Einzelmolekülspektroskopie rasant angestiegen. Abb. 1a zeigt die jährliche Anzahl von Publikationen, die über die Datenbank PubMed bei der Suche nach Artikeln zu den Schlagworten „single-molecule fluorescence“ gefunden werden [5]. Daneben werden die wichtigsten methodischen Entwicklungen (Abb. 1a, rote Beschriftung) und die biologischen Themengebiete, die im Rahmen herausragender Veröffentlichungen mit diesen Methoden untersucht wurden (Abb. 1a, graue Beschriftung, Abb. 1b und Abb. 1c), aufgeführt.

Ab der Mitte der 90er Jahre gelangen zunächst aufsehenerregende Arbeiten auf der Basis von Untersuchungen in Modellsystemen. So wurde 1996 zum ersten mal resonanter Energietransfer zwischen Fluorophoren auf Einzelmolekülniveau nachgewiesen [6]. Ebenso wurde die Aufnahme von Trajektorien einzelner diffundierender fluoreszenzmarkierter Lipide in künstlichen Membranen demonstriert [7]. Die Rotation eines einzelnen Motorproteins, der F1-ATPase, konnte 1997 über ein angebundenes fluoreszierendes Aktinfilament [8] und im Jahr 2004 über die Änderung der Polarisierung eines direkt angebundenes Fluorophors [9] nachgewiesen werden. Die schrittweise Translation eines einzelnen Motorproteins, dem Myosin, entlang eines Aktin-Filaments wurde 2003 demonstriert [10].

Einzelmolekültechniken sind heute zur Untersuchung biochemischer Fragestellungen an Modellsystemen etabliert. Die Übertragung dieser Methoden auf Experimente in lebenden Zellen zur Beantwortung zellbiologischer Fragen stellt dagegen bis heute eine Herausforderung dar. Durch die Autofluoreszenz verschiedener Moleküle in der Zelle, etwa von Flavinen, wird das Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber Experimenten in Modellsystemen signifikant verschlechtert. Eine Verbesserung wurde in vielen Arbeiten durch die Anbindung mehrerer Fluoreszenzmarkierungen an einzelne Moleküle, i. d. R. Proteine, erreicht. Die hohe Spezifität beim Binden synthetischer Farbstoffe an ein bestimmtes Molekül, die bei Experimenten in lebenden Zellen in der Regel zum Einsatz kommen, ist in zellulärer Umgebung nicht zu gewährleisten. Diese ist aber notwendig, um die Fluoreszenz der Markierung eindeutig zuzuordnen. Zur Anwendung von Methoden der Einzelmolekülspektroskopie muss darüber hinaus eine geringe Dichte von fluoreszierenden Molekülen vorliegen, um Kollisionsfluoreszenz von zwei Molekülen zu vermeiden. Erste Arbeiten, die die Anwendung einzelnmolekülspektroskopischer Metho-

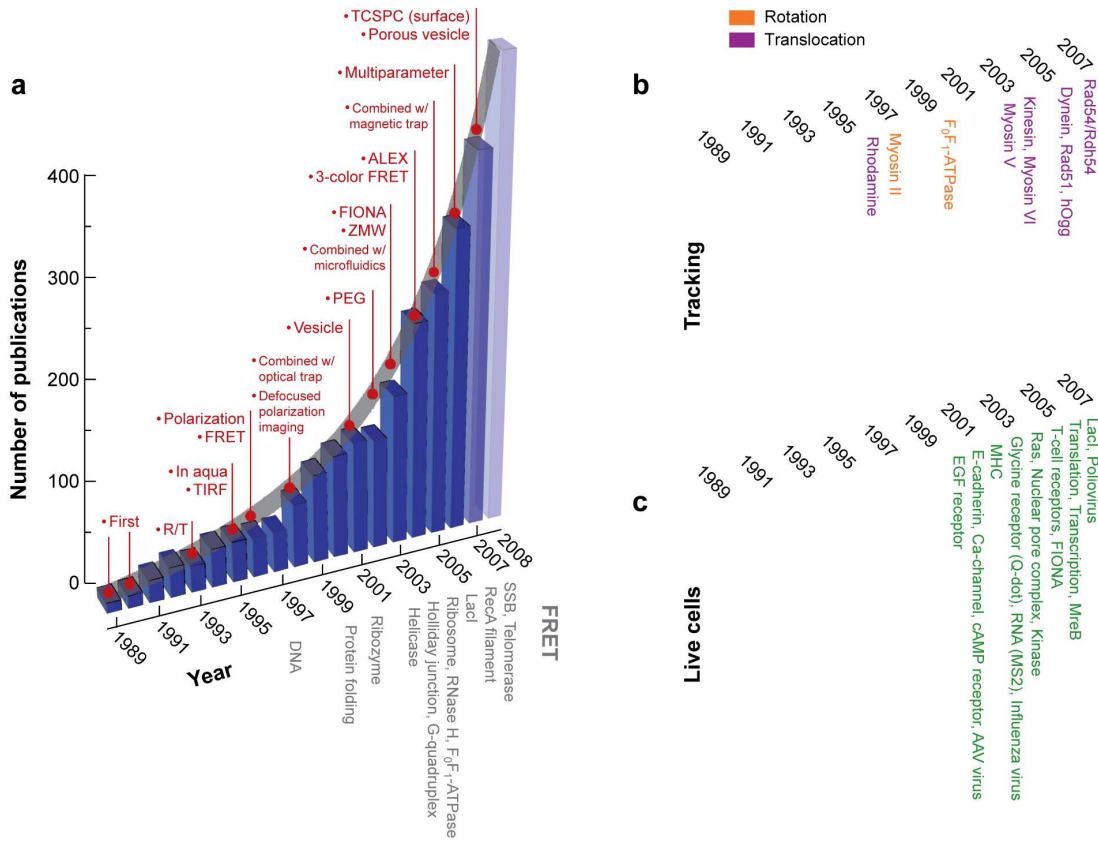


Abbildung 1.1: a) Anzahl der Veröffentlichungen pro Kalenderjahr bei der Suche nach den Schlagworten „single-molecule fluorescence“ in der Datenbank PubMed. In roter Schrift werden die wichtigsten Methodischen Entwicklungen dargestellt. In grauer Schrift, in b) und in c) werden die Themen bedeutender Arbeiten den Jahreszahlen zugeordnet. Die Farbe der Schrift gliedert diese Arbeiten in Beobachtung von resonantem Energietransfer zwischen Farbstoffen (grau), Beobachtung von Translation (violett) und Rotation (orange) und Untersuchungen in lebenden Zellen (grün) [5].

1 Einleitung

den in lebenden Zellen demonstrierten, versahen Moleküle vor dem Einbringen in Zellen mit Fluoreszenzmarkierungen. So gelang die Abbildung einzelner fluoreszenzmarkierter Viren beim Eintritt in Zellen [11] oder die Visualisierung der Bindung von fluoreszenzmarkiertem Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate (cAMP) an ein Membranprotein und deren Diffusion in der Zellmembran [12].

Durch die Verwendung autofluoreszierender Proteine insbesondere dem green fluorescent protein (GFP), für dessen Entdeckung und Weiterentwicklung der Nobelpreis für Chemie 2008 vergeben wurde [13], lässt sich in lebenden Zellen genspezifisch ein bestimmtes Protein mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen. Hierdurch wird eine hohe Spezifität der Markierung erreicht, gleichzeitig muss aber eine niedrigere Fluoreszenzintensität und niedrigere Photostabilität gegenüber chemischen Farbstoffen in Kauf genommen werden. 2001 wurden die spektralen und photophysikalischen Eigenschaften verschiedener autofluoreszierender Proteine erstmals in lebenden Zellen und auf Einzelmolekülebene charakterisiert [14].

Auf der Grundlage autofluoreszierender Proteine wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von Arbeiten, die Einzelmolekülspektroskopie in lebenden Zellen demonstrieren, veröffentlicht. So konnten Iino et al. [15] die Oligomerisierung des Proteins E-Chaderin nachweisen, Harms et al. [16] untersuchten Calcium-Kanäle, Lommerse et al. [17] verfolgten die Diffusion des Proteins H-Ras und Yu et al. [18] konnten die Produktion von Proteinen im Zellkern von *Escherichia Coli* beobachten.

Eine weitere etablierte Methode zur Markierung von Proteinen stellen fluoreszierende Halbleiter-Nanopartikel (Quantendots) dar [19]. Diese besitzen eine höhere Fluoreszenzintensität und Photostabilität als autofluoreszierende Proteine oder synthetische Farbstoffe. Im Gegensatz zu autofluoreszierenden Proteinen lassen sie sich jedoch nicht bei Experimenten in lebenden Zellen mit hoher Spezifität an bestimmte Moleküle anbinden. Da Quantendots im Gegensatz zu autofluoreszierenden Proteinen und synthetischen Farbstoffen nicht bleichen, ist hier allerdings die Beobachtung über einen langen Zeitraum möglich. 2005 konnte so der schrittweise Transport der Quantendots durch Motorproteine in lebenden Zellen nachgewiesen werden [20, 21].

Neben Quantendots gibt es weitere fluoreszierende Nanopartikel, die sich alternativ zur Markierung einzelner Moleküle eignen könnten. Nanodiamanten mit Defekten im Diamantgitter können Fluoreszenz zeigen. Das Nitrogen-Vacancy-Center (NV-Zentrum) im Diamanten bietet einige herausragende photophysikalische Eigenschaften im Vergleich zu Quantendots [22]. Untersuchungen, die Schritte zur Etablierung von fluoreszierenden

Nanodiamanten als Fluoreszenzmarkierung in lebenden Zellen darstellen, sind Teil dieser Arbeit.

Seit 2005 werden verschiedene Proteinsequenzen entwickelt, die in Fusionsproteinen eine genspezifische Bindungsstelle (Tag) bilden. über eine enzymatische Reaktion können mit einem spezifischen Bindungspartner zu diesem Tag versehene Farbstoffe mit hoher Spezifität an das Protein angebunden werden [23]. Somit werden bei der Verwendung von Tags die Vorteile von autofluoreszierenden Proteinen und synthetischen Farbstoffen im Bezug auf Einzelmolekülspektroskopie in lebenden Zellen vereint. Trotz dieser Vorteile kommen diese Techniken im Bereich der Einzelmolekülspektroskopie bislang kaum zum Einsatz. In dieser Arbeit werden Untersuchungen membrannaher Prozesse bei der Bildung zweier verschiedener Proteinkomplexe vorgestellt, die ohne die damit verbundenen Vorteile im Signal-Rausch-Verhältnis bei gleichzeitiger hoher Spezifität der Markierung nicht durchführbar gewesen wären.

Die Arbeit gliedert sich in ein Grundlagenkapitel, das eine Übersicht über die Methoden der Mikroskopie und der Einzelmolekülspektroskopie gibt. Im folgenden Kapitel werden die photophysikalischen Eigenschaften und der Herstellungsprozess von Nanodiamanten mit NV-Zentren beschrieben. Anschließend werden Grundlagen und Experimente zur Anbindung von Nanodiamanten an Proteine und zum Einbringen in Zellen vorgestellt. Im abschließenden Kapitel werden Experimente an genspezifisch markierten Proteinen (autofluoreszierende Proteine und Tags) zur Untersuchung der Ausbildung von Proteinkomplexen in der Plasmamembran lebender Zellen vorgestellt.

2 Grundlagen und Methoden

Nach einem historischen Abriss zur Entwicklung der Lichtmikroskopie werden in diesem Kapitel die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie und der im Rahmen dieser Arbeit angewandten Techniken der Einzelmolekülspektroskopie erläutert. Im Anschluss wird eine Übersicht über gängige Fluoreszenzmarkierungen an Proteinen in lebenden Zellen gegeben. Abgeschlossen wird dieses Kapitel mit einer detaillierten Beschreibung der verwendeten experimentellen Aufbauten.

2.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Vor etwa 400 Jahren wurden in Holland erste Lichtmikroskope konstruiert, die aus einem zwei-Linsen-System bestanden. Wem die Erfindung des zusammengesetzten Mikroskops zugeschrieben werden kann ist nicht sicher. Meist werden der Brillenmacher Zacharias Janssen und sein Sohn Johannes als die Erfinder des Mikroskops genannt. Diese einfachen Mikroskope wurden genutzt, um vergrößerte Abbildungen z.B. von Insekten sichtbar zu machen oder erste für den Menschen sichtbare Abbildungen von Pilzsporen oder Zellen zu erzeugen. Im Laufe der Zeit und mit Verbesserung der optischen Elemente sowie der Feinmechanik konnten mit Weitfeldmikroskopen immer kleinere Objekte und Strukturen bis hin zur optischen Auflösungsgrenze nach dem Abbe-Limit (etwa halbe Lichtwellenlänge) sichtbar gemacht werden. Zur Kontrastverstärkung in Zellen kamen immer häufiger absorptive Färbemittel zum Einsatz [24].

Durch die Verwendung von fluoreszierenden Markierungen zur Einfärbung bestimmter Strukturen wurde der Kontrast weiter verbessert. Im Fluoreszenzmikroskop wird hierzu das Anregungslicht mit optischen Filtern in der Abbildung unterdrückt, und nur die Fluoreszenz der eingefärbten Strukturen wird abgebildet.

Seit der Entdeckung des Green Fluorescent Protein (GFP) im Jahr 1961 [13, 25] und seiner Etablierung als genspezifischer Marker 1994 [26, 27] besteht die Möglichkeit, ein bestimmtes Protein mit einer fluoreszierenden Markierung bei der Synthese im Zellkern von der Zelle selber produzieren zu lassen. Somit lässt sich die Verteilung des markierten

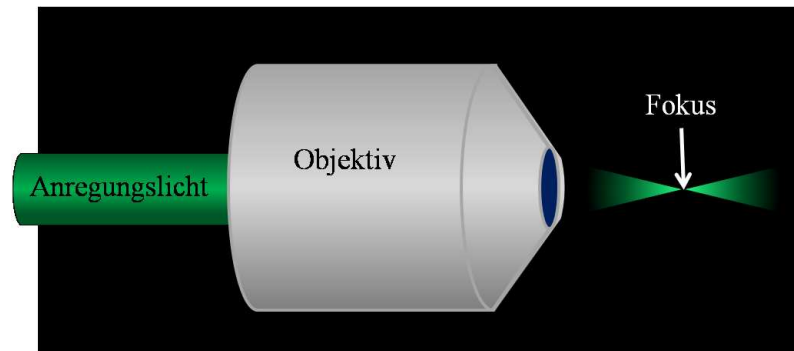


Abbildung 2.1: Skizze der Abbildung eines parallelen Lichtstrahls durch ein Objektiv in die fokale Ebene

Proteins in der Zelle im Fluoreszenzmikroskop beobachten. Für die Entdeckung und die Etablierung des GFP als Fluoreszenzmarkierung wurde 2008 der Nobelpreis für Chemie an Shimomura, Chalfie und Tsien vergeben.

In den vergangenen Jahrzehnten wurden verschiedene Mikroskopieverfahren entwickelt, die eine höhere Auflösung als die Weitfeldmikroskopie bieten. Hierbei ist zunächst das konfokale Mikroskop zu nennen, bei dem die Auflösung gegenüber dem Weitfeldmikroskop insbesondere in axialer Richtung erhöht wird. Daneben wurden in den letzten Jahren weitere Mikroskopiemethoden entwickelt, die meist durch Ausnutzung von Effekten der nichtlinearen Optik (Zweiphotonen-Mikroskopie, Stimulated Emission Depletion- (STED-) Mikroskopie) oder durch Fluoreszenzanregung mit einem evaneszenten Lichtfeld (Total Internal Reflection Fluorescence- (TIRF-) Mikroskopie) ein Auflösungsvermögen jenseits des Weitfeldmikroskops bieten [28].

2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

2.2.1 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

Das Auflösungsvermögen eines Weitfeldmikroskops ist in lateraler Richtung durch das Abbe-Limit begrenzt, in axialer Richtung ist das Auflösungsvermögen deutlich geringer. Um insbesondere die axiale Auflösung der Abbildung zu verbessern, hat sich die konfokale Mikroskopie etabliert, bei der im Gegensatz zur Weitfeldmikroskopie nicht eine Gegenstandsebene sondern lediglich ein Punkt auf eine Lochblende (Pinhole) abgebildet wird.

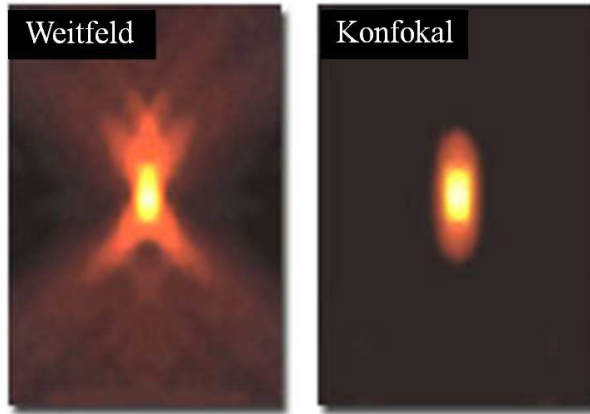


Abbildung 2.2: Point Spread Function (PSF) bei einem Weitfeldmikroskop (links) und bei einem konfokalen Mikroskop (rechts). Es wird der Schnitt durch das Zentrum der PSF in axialer Richtung dargestellt (nach [29]).

Wie in Abbildung 2.1 dargestellt, wird ein paralleler Laserstrahl durch das Mikroskopobjektiv auf die Probe fokussiert. Das Anregungsvolumen ist näherungsweise bikonisch, wobei der Durchmesser in der fokalen Ebene beugungsbegrenzt ist. Durch die Abbildung der Fluoreszenz der Probe aus der fokalen Ebene auf ein Pinhole (siehe Abb. 2.3) wird die Detektion von Fluoreszenz außerhalb der fokalen Ebene stark gegenüber der Weitfeldmikroskopie unterdrückt.

Die Abbildung eines Punktes im Mikroskop wird durch die Point Spread Function (PSF) p beschrieben (siehe Abb. 2.2). Die PSF wird in der Regel in Abhängigkeit von den generalisierten Koordinaten ζ entlang der optischen Achse und ρ als radiale Variable senkrecht dazu dargestellt [30]. Für ein Weitfeldmikroskop gilt in Näherung:

$$p(0, \rho) = \frac{2J_1^2(\rho)}{(\rho^2)}, \quad (2.1)$$

$$p(\zeta, 0) = \frac{\sin \frac{\zeta^2}{4}}{\frac{\zeta}{4}}. \quad (2.2)$$

J_1 ist die sphärische Besselfunktion 1. Ordnung.

Bei einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop gelten (2.1) und (2.2) sowohl für die Anregung als auch für die Detektion der Fluoreszenz. Somit muss zur Berechnung der PSF im

konfokalen Mikroskop die ortsabhängige Anregungsintensität mit der Detektionswahrscheinlichkeit der Fluoreszenz gefaltet werden:

$$p(\zeta, \rho)_{konf} = p(\zeta, \rho) \otimes p(\zeta, \rho). \quad (2.3)$$

Für das laterale und axiale Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops gilt dann nach dem Rayleigh-Kriterium (Abstand des Hauptmaximums zum ersten Minimum in der PSF):

$$\Delta r_{konf} = 0,44 \frac{\lambda}{NA}, \quad (2.4)$$

$$\Delta z_{konf} = 1,5 \frac{n\lambda}{(NA)^2}, \quad (2.5)$$

mit der Lichtwellenlänge λ , dem Brechungsindex der Probe n und der numerischen Apertur des Objektivs NA . Dabei hat Δr_{konf} typischerweise eine Größe von etwa 250 nm, und Δz_{konf} liegt bei etwa 1 μ m.

Dieses Auflösungsvermögen kann nur dann erreicht werden, wenn das verwendete Pinhole einen ausreichend kleinen Durchmesser besitzt. Maximale Auflösung erhält man im konfokalen Mikroskop, wenn nur der Bereich der ersten Airy-Scheibe (Maximum der PSF bis zum ersten Minimum) auf das Pinhole abgebildet wird. Auf Kosten des Auflösungsvermögens kann jedoch zu Gunsten von Fluoreszenzintensität auch die Verwendung eines größeren Pinholes sinnvoll sein.

In einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop stammt die Fluoreszenz aus dem näherungsweise ellipsoidalen konfokalen Volumen, das weniger als einen Femtoliter umfasst. Um ein konfokales Mikroskop zur Einzelmolekülspektroskopie zu nutzen, muss die Konzentration der fluoreszierenden Partikel entsprechend gering sein, so dass sich jeweils nur ein Fluorophor im Detektionsvolumen befindet.

2.2.2 Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops

Ein konfokales Mikroskop bildet lediglich einen Punkt ab. Um die Abbildung einer Probe zu erzeugen, muss diese abgerastert werden. Das kann grundsätzlich auf zwei Arten geschehen: Entweder der Anregungs- und Detektionsstrahlengang werden verkippt oder die Probe wird verschoben.

Der Aufbau eines konfokalen Mikroskops ist in Abb. 2.3 skizziert. Um ein beugungsbegrenztes fokales Anregungsvolumen zu erhalten, ist eine kohärente Lichtquelle notwendig, die mit Lasern realisiert wird. Das Anregungslicht wird über einen Strahlteiler

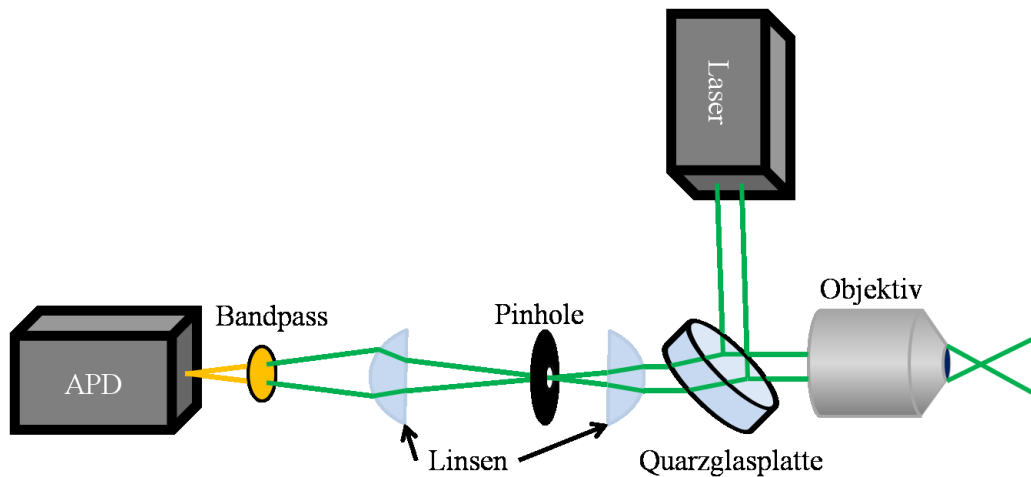


Abbildung 2.3: Aufbau eines konfokalen Mikroskops: Das Anregungslicht des Lasers wird zum Teil an einer Quarzglasplatte auf das Objektiv reflektiert, das fokale Volumen, das durch die Abbildung mit dem Objektiv entsteht, wird mit Hilfe von Linsen zunächst auf ein Pinhole und anschließend auf eine Avalanche Photo Diode (APD) abgebildet. Ein Bandpassfilter unterdrückt das Anregungslicht und unspezifische Fluoreszenz in der Detektion.

in das konfokale Mikroskop eingekoppelt. Als Strahlteiler werden Interferenzfilter, die hohe Reflektivität bei der Anregungswellenlänge und hohe Transmission bei der Fluoreszenzwellenlänge besitzen oder die Oberfläche einer Glasplatte genutzt. Hierbei wird zur Vermeidung von Fluoreszenz aus dem Glas in der Regel Quarzglas verwendet. Im Detektionsstrahlengang ist ein Sperrfilter zur Unterdrückung des Anregungslichts notwendig. Zusätzlich wird meist ein Bandpassfilter eingesetzt, der hohe Transmission im Bereich der Fluoreszenzwellenlänge des Fluorophores besitzt und unspezifische Fluoreszenz unterdrückt, was zur Verbesserung des Kontrasts führt.

2.3 Einzelmolekülspektroskopische Methoden in lebenden Zellen

Die Entwicklung der beschriebenen mikroskopischen Verfahren führte zu immer besser aufgelösten Abbildungen fluoreszierend markierter Strukturen in Zellen. Die biologischen Schlussfolgerungen, die man aus solchen Abbildungen ziehen kann, beziehen sich immer auf ein Ensemble von markierten Proteinen. Will man darüber hinaus Informationen, z. B. über die individuelle Bewegung (Diffusion/gerichteter Transport) oder die

Bindungskinetik auf Einzelmolekülniveau, zum tieferen Verständnis der biochemischen Prozesse erhalten, so ist die Anwendung von Methoden der Einzelmolekülspektroskopie notwendig.

Seitdem vor etwa 20 Jahren zum ersten Mal die Fluoreszenz einzelner Moleküle nachgewiesen wurde [1, 2], entwickelten sich eine Vielzahl von Methoden, in denen die Detektion von Fluoreszenz auf Einzelmolekülniveau zur Anwendung kommt [31, 5]. Um Methoden der Einzelmolekülspektroskopie anwenden zu können ist es essentiell, einzelne fluoreszierend markierte Moleküle räumlich gegeneinander aufzulösen. Gleichzeitig darf unspezifische Fluoreszenz aus dem Detektionsvolumen, die von nicht markierten Molekülen stammt, keine zu hohe Intensität aufweisen. Bei zu niedrigem Intensitätsverhältnis von spezifischer zu unspezifischer Fluoreszenz (Signal-Rausch-Verhältnis) sind die Methoden der Einzelmolekülspektroskopie nicht anwendbar. Somit empfiehlt es sich, eine der Fragestellung angepassten Mikroskopietechnik mit möglichst hoher Auflösung zu verwenden. Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Techniken vorgestellt.

2.3.1 Single Particle Tracking

Beim Single Particle Tracking werden die Trajektorien einzelner fluoreszierend markierter Teilchen abgebildet. Hierzu wird in einer Folge von Bildern, die in konstantem zeitlichem Abstand aufgenommen wurden, die Position des Teilchens lokalisiert. Anhand der Trajektorie eines einzelnen Proteins in einer lebenden Zelle lässt sich ableiten, welche Art der Bewegung (freie Diffusion, anomale Diffusion (orts- oder zeitabhängige Diffusionskonstante), eingeschränkte Diffusion (Diffusion in einem abgeschlossenen Bereich) und gerichteter Transport) zu Grunde liegt. Zur Auswertung der Trajektorie wird die mittlere quadratische Verschiebung $\langle (r_i - r_{i+n})^2 \rangle$ (Mean Square Displacement (MSD)) in Abhängigkeit eines Zeitintervalls Δt berechnet:

$$MSD(\Delta t) = \frac{1}{N-n} \sum_{i=1}^{N-n} (r_i - r_{i+n})^2. \quad (2.6)$$

Die Bildwiederholungsrate $\frac{1}{t_{step}}$ bestimmt hierbei die Zeitschritte in der Trajektorie und somit die Zeitauflösung im MSD ($\Delta t = n \cdot t_{step}$). N entspricht der Gesamtzahl der aufgenommenen Bilder.

Je nach Diffusionsmodell lassen sich die MSD-Kurven durch verschiedene Gleichungen annähern:

$$\text{freie Diffusion:} \quad MSD = 4D\Delta t, \quad (2.7)$$

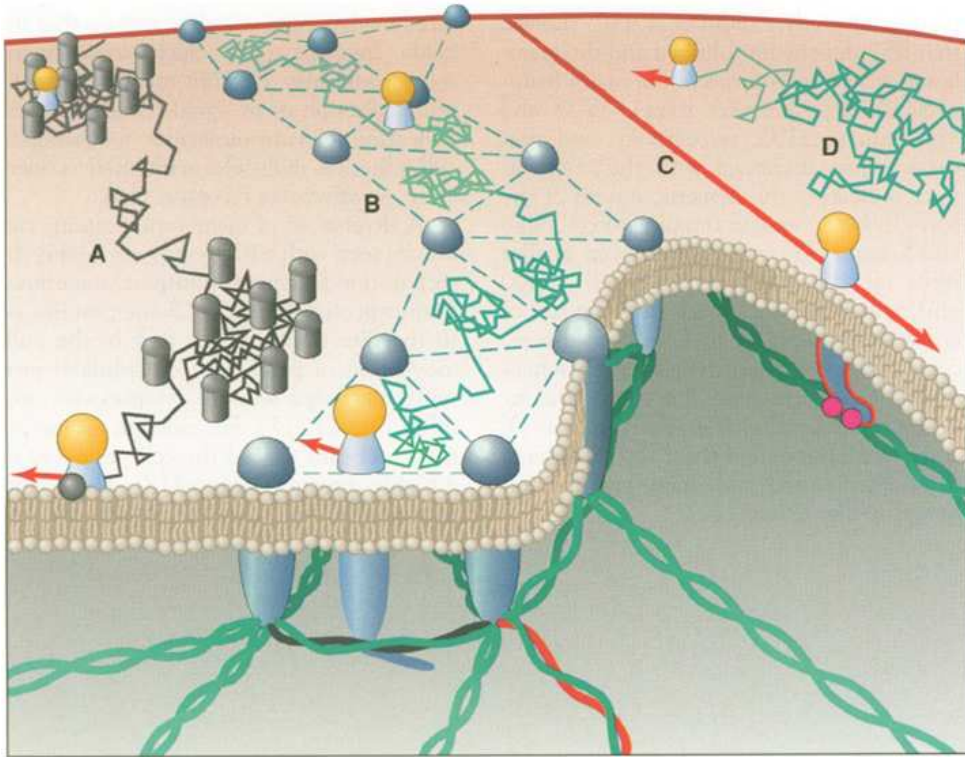


Abbildung 2.4: Visualisierung der verschiedenen Diffusionsarten anhand von Proteindiffusion in einer Membran [32]: A) anomale Diffusion, B) eingeschränkte Diffusion, C) gerichteter Transport, D) freie Diffusion.

$$\text{anomale Diffusion: } MSD = 4\Gamma(\Delta t)^\alpha, \quad (2.8)$$

$$\text{eingeschränkte Diffusion: } MSD = R_c^2[1 - e^{(-4D\Delta t/R_c^2)}], \quad (2.9)$$

$$\text{gerichteter Transport: } MSD = 4D\Delta t + v^2\Delta t^2. \quad (2.10)$$

D bezeichnet die Diffusionskonstante, Γ und α bezeichnen den Transportkoeffizienten und den anomalen Diffusionsexponenten der anomalen Diffusion, R beschreibt den Radius der Projektionsfläche bei eingeschränkter Diffusion und v die Geschwindigkeit des gerichteten Transports (siehe Abb. 2.4) [32].

Verwendet man fluoreszenzmikroskopische Methoden, die die Probe zur Bildgebung abrastern, so liegt die Bildwiederholungsrate in der Regel lediglich in der Größenordnung von Sekunden oder gar Minuten. Zur Beobachtung von Prozessen, die sich auf kleineren Zeitskalen abspielen, sind diese Methoden folglich nur bedingt geeignet. Meist wird stattdessen zum Single Particle Tracking lediglich ein sehr kleiner Teil der zu beobachtenden Proteine mit Markierungen versehen. Somit reicht die Auflösung eines Weitfeldmikroskops aus, um die Partikel lokalisieren zu können, und die Bildwiederholungsrate kann gegenüber einem konfokalen Mikroskop deutlich erhöht werden.

Von zentraler Bedeutung für Fluoreszenzmarkierungen bei Single Particle Tracking ist eine möglichst hohe Photostabilität, die eine lange Beobachtbarkeit bietet, und eine möglichst hohe Fluoreszenzintensität der Markierung, um ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Markierungen, die bleichen oder blinken sind nur bedingt für Single Particle Tracking geeignet.

2.3.2 Fluorescence Fluctuation Analysis (FFA)

Mikroskopische Verfahren, die ein möglichst kleines Volumen abbilden, lassen sich nicht nur zur hochaufgelösten Bildgebung durch Abrastern der Probe nutzen, sondern auch um Aufschluss über Konzentration und Diffusion fluoreszierender Moleküle zu erlangen. Hierbei wird die Fluoreszenz aus dem Abbildungsvolumen detektiert und hinsichtlich ihrer Intensitätsfluktuationen untersucht. Es handelt sich allerdings im eigentlichen Sinne nicht um die Untersuchung eines einzelnen Moleküls, da viele verschiedene Moleküle zu diesen Fluktuationen beitragen. Befinden sich nur einzelne oder wenige fluoreszierende Moleküle gleichzeitig im Detektionsvolumen, können statistische Analysen verschiedene Populationen, die sich beispielsweise in ihrer Fluoreszenzintensität oder Diffusionskonstante unterscheiden, zeigen. Da dies in Ensemblemessungen nicht möglich ist, zählt man solche Methoden in der Regel zu den Einzelmoleküluntersuchungen.

Zur Analyse der Fluoreszenzzeitspur werden verschiedene Verfahren genutzt, die im Folgenden erläutert werden [33, 34].

Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) werden Fluktuationen der Fluoreszenzintensität untersucht, die durch die Diffusion der fluoreszierenden Teilchen durch das fokale Volumen entstehen. Man beobachtet zeitliche Fluoreszenzintensitätsfluktuationen entsprechend der mittleren Aufenthaltsdauer eines Fluorophores im Detektionsbereich. Mit Hilfe der FCS können Konzentration und Diffusionskonstante des Fluorophores bestimmt werden.

Zur Analyse der Fluoreszenzfluktuationen wird die Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle \delta F(t) \rangle^2} \quad (2.11)$$

berechnet. Hierbei ist $\delta F(t)$ die Abweichung von der mittleren Fluoreszenzintensität zur Zeit t .

Zur quantitativen Analyse der so berechneten Autokorrelationsfunktion werden die diffusionsbedingten Konzentrationsfluktuationen gemäß dem 2. Fickschen Gesetz

$$\dot{\rho} = D \nabla^2 \rho \quad (2.12)$$

modelliert. ρ bezeichnet dabei die Teilchendichte und D die Diffusionskonstante der fluoreszierenden Teilchen.

Zur Näherung der Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit der mittleren Teilchenzahl und der Diffusionszeit wird für das Anregungsvolumen in guter Näherung ein Rotationsellipsoid mit gaußförmiger Intensitätsverteilung angenommen. Zusätzlich wird Blinken berücksichtigt, das heißt ein temporäres Absinken der Fluoreszenzzählrate aus nicht fluoreszierenden Zuständen (z.B. Triplettzustände) mit langer Lebensdauer im Vergleich zur Fluoreszenzlebensdauer. Für die Diffusion identischer Teilchen erhält man somit

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(1 - \frac{F_{UG}}{F_{tot}}\right)^2 \left(1 + \frac{P^{-\tau/\tau_p}}{1 - P}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\omega \cdot \tau}{z \cdot \tau_{diff}}\right)^{-1/2}. \quad (2.13)$$

$\langle N \rangle$ ist das zeitliche Mittel der Teilchenanzahl im fokalen Volumen, F_{UG} und F_{tot} sind die mittleren Intensitäten der unkorrelierten Untergrundfluoreszenz bzw. der gesamten Fluoreszenz, P bezeichnet den Anteil der Teilchen, die sich in einem dunklen Zustand mit

2 Grundlagen und Methoden

der Lebensdauer τ_p befinden, τ_{diff} ist die mittlere Aufenthaltsdauer eines diffundierenden Teilchens im fokalen Volumen, und ω und z sind die laterale und axiale Ausdehnung des fokalen Volumens.

Der erste Term in Gleichung (2.13) entspricht dem Kehrwert der mittleren Teilchenzahl im fokalen Volumen, der zweite Term berücksichtigt den Einfluss von nicht korrelierter Untergrundfluoreszenz. Der dritte Term beschreibt das Blinkverhalten der Fluorophore, der vierte und fünfte Term entsprechen der Diffusion der Teilchen in drei Dimensionen bei freier Diffusion. Für Diffusion in zwei Dimensionen, wie zum Beispiel bei der Diffusion von markierten Proteinen in der Plasmamembran einer Zelle, entfällt der fünfte Term und die Gleichung vereinfacht sich entsprechend [30, 35].

Anhand der so bestimmten mittleren Aufenthaltsdauer im Fokus τ_{diff} lässt sich die Diffusionskonstante

$$D = \frac{\omega^2}{4\tau_{diff}} \quad (2.14)$$

und der hydrodynamische Radius

$$r_{HD} = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.15)$$

der fluoreszierenden Teilchen bestimmen. Dabei ist k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und η bezeichnet die Viskosität des umgebenden Mediums.

Liegen in der untersuchten Probe verschieden hell fluoreszierende Teilchen oder Teilchen mit verschiedenen Diffusionskonstanten vor, so muss die Korrelationsfunktion als Summe der einzelnen Komponenten wie folgt beschrieben werden:

$$G(\tau) = \frac{\sum_s \langle N \rangle^{(s)-1} \eta^{(s)2} \tilde{G}^{(s)}(\tau)}{(\sum_s \langle N \rangle^{(s)-1} \eta^{(s)})^2}. \quad (2.16)$$

Der Index s bezeichnet die verschiedenen Spezies mit unterschiedlichen Helligkeiten bzw. Diffusionskonstanten, $\langle N \rangle^{(s)}$ ist die mittlere Teilchenzahl im fokalen Volumen und $\eta^{(s)}$ die relative Helligkeit der jeweiligen Spezies bezogen auf die Detektion. $\tilde{G}^{(s)}$ beschreibt die normierte Korrelationsfunktion bei $\langle N \rangle^{(s)} = 1$, die der Korrelationsfunktion dieser Spezies in Abwesenheit der anderen Spezies entspricht [36].

Bei der Untersuchung von Fluorophoren in wässriger Umgebung, insbesondere bei fluoreszenzmarkierten Proteinen in lebenden Zellen ist zu beachten, dass Fluoreszenz auch von anderen Molekülen als den zu beobachtenden Fluorophoren detektiert wird. In lebenden Zellen führt die Fluoreszenz verschiedener Proteine (z. B. Flavine) zu Un-

tergrundfluoreszenz. Durch die Verwendung eines konfokalen Mikroskops wird das beobachtete Volumen minimiert und das Signal-Rausch-Verhältnis optimiert.

In Gleichung (2.13) geht das Signal-Rausch-Verhältnis über den Term $(1 - \frac{F_{UG}}{F_{tot}})^2$ ein. Es ist leicht zu sehen, dass dieser Term für $F_{UG} \ll F_{tot}$ gegen eins geht. Da die Autofluoreszenz lebender Zellen stark von Zelle zu Zelle variiert und von der Position in der Zelle abhängig ist, ist es prinzipiell nicht möglich, den Anteil der Untergrundfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz exakt zu quantifizieren. Eine genaue Konzentrationsbestimmung ist also prinzipiell nur für die Näherung $F_{UG} \ll F_{tot}$ möglich.

FCS-Experimente zur Konzentrationsbestimmung müssen also an solchen Zelllinien durchgeführt werden, die eine möglichst geringe Autofluoreszenz zeigen. Gleichzeitig sollten die Fluoreszenzmarkierungen der Proteine eine möglichst hohe molekulare Fluoreszenzintensität aufweisen.

Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy (FCCS)

Werden zwei spektral separierbare Farbstoffe zur Markierung unterschiedlicher Moleküle verwendet, kann bei getrennter Detektion der Fluoreszenz neben der Autokorrelation für beide Farben die Kreuzkorrelation zwischen beiden Detektionskanälen berechnet werden. Im Folgenden wird der kürzerwellig fluoreszierende Farbstoff repräsentativ als Grün (g) und der längerwellige als Rot (r) bezeichnet.

$$G_{gr}(\tau) = \frac{\langle \delta F_g(t) \delta F_r(t + \tau) \rangle}{\langle F_g(t) \rangle \langle F_r(t) \rangle} \quad (2.17)$$

Kreuzkorrelation tritt dann auf, wenn diffundierende Teilchen beide Farbstoffe als Markierung tragen. Insbesondere kann man Kreuzkorrelationsanalysen benutzen, um die Bindung von zwei unterschiedlich markierten Reaktionspartnern zu beobachten. Die Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion ist dann abhängig von dem Anteil der beobachteten Bindungspartner, die beide Farbstoffe tragen. Der Anteil an gebundenen Reaktionspartnern, die beide Fluorophore tragen, lässt sich aus dem Verhältnis von Kreuzkorrelations- und Autokorrelationsamplitude

$$\frac{G_{gr}(0)}{G_g(0)} = \frac{\sum_s c^{(s)} \eta_g^{(s)} \eta_r^{(s)} \sum_s \eta_g^{(s)} c^{(s)}}{\sum_s c^{(s)} \eta_g^{(s)2} \sum_s \eta_r^{(s)} c^{(s)}} \quad (2.18)$$

ableiten. Alle diffundierenden Teilchen mit derselben grünen und roten Fluoreszenzintensität werden hierbei als eine Spezies s aufgefasst. $c^{(s)}$ bezeichnet die Konzentration

und $\eta_g^{(s)}$ bzw. $\eta_r^{(s)}$ die relative Intensität der detektierte Fluoreszenz im jeweiligen Detektionskanal.

Trägt nur ein grüner und ein roter Farbstoff zur Kreuzkorrelation bei, so ist die Heligkeit der jeweiligen Spezies proportional zur Anzahl grüner bzw. roter Farbstoffe. Zur Bezeichnung einer Spezies (s) wird die Anzahl grüner bzw. roter Farbstoffe mit einem g bzw. r pro Farbstoffmolekül als Index in Klammern verwendet. Somit lässt sich Gleichung (2.18) in Abhängigkeit der Anzahl grüner bzw. roter Farbstoffe einer Spezies ($n_g^{(s)}$ bzw. $n_r^{(s)}$) schreiben als

$$\frac{G_{gr}(0)}{G_g(0)} = \frac{\sum_s c^{(s)} n_g^{(s)} n_r^{(s)} c_0^{(g)}}{\sum_s c^{(s)} n_g^{(s)2} c_0^{(r)}}, \quad (2.19)$$

wobei $c_0^{(g)} = \sum_s n_g^{(s)} c^{(s)}$ und $c_0^{(r)} = \sum_s n_r^{(s)} c^{(s)}$ die Gesamtkonzentration grüner bzw. roter Farbstoffe darstellt. Für den Fall einer eins-zu-eins-Stöchiometrie von rot und grün markiertem Bindungspartner gilt $c_0^{(g)} = c^{(g)} + c^{(gr)}$ und $c_0^{(r)} = c^{(r)} + c^{(gr)}$, und das Verhältnis der Amplituden entspricht dem Anteil gebundener Bindungspartner:

$$\frac{G_{gr}(0)}{G_g(0)} = \frac{c^{(gr)}}{c^{(gr)} + c^{(r)}}, \quad \frac{G_{gr}(0)}{G_r(0)} = \frac{c^{(gr)}}{c^{(gr)} + c^{(g)}}. \quad (2.20)$$

Bislang wurde der Einfluss von Untergrundfluoreszenz auf Kreuzkorrelationsmessungen außer Acht gelassen. Analog zur Beschreibung des Untergrundterms bei Autokorrelationsmessungen im vorangegangenen Abschnitt muss das Verhältnis der Signal- zur Untergrundfluoreszenz bei der Kreuzkorrelation mit einem Term $(1 - \frac{F_{UG}^{(g)}}{F_{tot}^{(g)}})(1 - \frac{F_{UG}^{(r)}}{F_{tot}^{(r)}})$, bezogen auf die grüne bzw. rote Fluoreszenz, berücksichtigt werden. Zur Quantifizierung der Bindungseffizienz ist somit in beiden spektral getrennten Detektionskanälen ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis notwendig [36].

Verschiedene Effekte wie z.B. Bleichen oder eine Verschiebung des fokalen Volumens, die die gesamte Fluoreszenz betreffen, führen zu einem kreuzkorrelierten Signal, das nicht auf die Bindung zweier unterschiedlicher Bindungspartner zurückzuführen ist. Es wird ein kreuzkorreliertes Signal mit der Zeitkonstante der Veränderung in der Gesamtfluoreszenzzählrate beobachtet. Da im Gegensatz zur Autokorrelation nur ein Teil der fluoreszenzmarkierten Moleküle zum kreuzkorrelierten Signal beitragen, aber Bleichen oder die Verschiebung des fokalen Volumens bei Auto- und Kreuzkorrelation gleichermaßen die Gesamtfluoreszenz betreffen, ist die Kreuzkorrelationsanalyse deutlich anfälliger gegen diese Effekte.

Photon Counting Histogram (PCH)

Bei der Auswertung der Auto- oder Kreuzkorrelation der gemessenen Fluoreszenzintensität werden lediglich die in der Zeitspur enthaltenen Informationen über die Verweildauer von fluoreszierenden Teilchen im Fokus, nicht aber die Fluoreszenzintensität betrachtet. Beispielsweise sind zwei verschiedene Fluorophore mit gleichen Diffusionskonstanten aber unterschiedlicher molekularer Helligkeit mit Hilfe einer Autokorrelationsanalyse nicht unterscheidbar. Über die Berechnung eines Photon Counting Histogram (PCH) kann man beide Spezies unterscheiden.

Zur Erstellung eines PCH wird ein Histogramm der Fluoreszenzzählrate innerhalb einer festen Mittelungszeit aufgetragen. Die Mittelungszeit sollte ein bis zwei Größenordnungen kleiner als die mittlere Aufenthaltsdauer im fokalen Volumen gewählt werden, damit innerhalb eines Zeitschrittes eine konstante Helligkeit des beobachteten Fluorophores zu erwarten ist.

Zur theoretischen Beschreibung des so erstellten PCHs betrachtet man zunächst ein einzelnes fluoreszierendes Teilchen, das durch das Detektionsvolumen diffundiert. $p^{(1)}$ ist die Wahrscheinlichkeit, k Photonen in einem Zeitschritt von diesem einzelnen Teilchen zu detektieren:

$$p^{(1)}(k; V_0, \epsilon) = \frac{1}{V_0} \int \text{Poisson}[k, \epsilon W(\vec{r})] d\vec{r}. \quad (2.21)$$

Die Poissonverteilung wird wie folgt berechnet:

$$\text{Poisson}(k, \lambda) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}. \quad (2.22)$$

Um sicherzustellen, dass alle detektierten Photonen aus dem Volumen V_0 stammen, wird ein ausreichend großes Volumen um das konfokale Volumen herum gewählt. ϵ bezeichnet die molekulare Fluoreszenzzählrate. $W(\vec{r})$ beschreibt die normierte ortsabhängige Wahrscheinlichkeit, ein Photon von einem fluoreszierenden Teilchen am Ort \vec{r} zu detektieren. Im Zentrum des fokalen Volumens ist $W(\vec{r}) = 1$.

Die Wahrscheinlichkeit, k Photonen von einem einzelnen fluoreszierenden Teilchen in einem Zeitschritt zu detektieren muss nun mit der Wahrscheinlichkeit, N Teilchen im Volumen V_0 vorzufinden, verknüpft werden:

$$p^{(N)}(k; V_0, \epsilon) = \underbrace{(p^{(1)} \otimes p^{(1)} \otimes \dots \otimes p^{(1)})}_{N \text{ mal}}(k; V_0, \epsilon). \quad (2.23)$$

Die Wahrscheinlichkeit, P Photonen von N Teilchen in einem Zeitschritt zu detektieren lässt sich dann in Abhängigkeit der Konzentration der fluoreszierenden Teilchen c und ihrer molekularen Helligkeit ϵ als Summe wie folgt ausdrücken:

$$P(k; c, \epsilon) = \sum_{N=0}^{\infty} p^{(N)}(k; V_0, \epsilon) \text{Poisson}(N, cV_0). \quad (2.24)$$

Für nicht korrelierte Untergrundfluoreszenz muss noch ein weiterer Term $\text{Poisson}(k, F_{UG})$ zur Beschreibung der Poissonverteilung der Untergrundfluoreszenz addiert werden.

Bei Proben mit vernachlässigbarer Untergrundfluoreszenz lassen sich aus dem PCH auch für Gemische von mehreren gelösten Farbstoffen die Anzahl der Farbstoffe, ihre Konzentration und ihre molekulare Fluoreszenzintensität bestimmen [37].

Erstellt man anhand von Fluoreszenzzeitpuren von markierten Proteinen in lebenden Zellen ein PCH, so ist zu beachten, dass die Untergrundfluoreszenz hier nicht nur nicht vernachlässigbar, sondern auch nicht exakt bestimmbar ist, da die Autofluoreszenz von Zelle zu Zelle und abhängig vom Ort in der Zelle stark variiert.

Weitere Abweichungen vom oben beschriebenen Modell entstehen, wenn die Teilchen keine freie Diffusion zeigen. Man kann davon ausgehen, dass Proteine in einer Zelle nicht völlig frei diffundieren und sich die Abweichungen von der freien Diffusion nicht absolut quantifizieren lässt. Zu einer quantitativen Analyse der Konzentration und der molekularen Helligkeit verschiedener Fluorophore ist dies jedoch notwendig.

In der Regel gilt aber bei Messungen in lebenden Zellen, dass die verwendeten Fluorophore und ihre molekulare Helligkeit bekannt sind. Wenn nur ein Farbstoff verwendet wird, der spektral im Detektionsbereich liegt, lässt sich seine Konzentration aus der Analyse der Autokorrelationsfunktion ableiten. In diesem Fall eignet sich die Analyse eines PCH zur Untersuchung der Stöchiometrie der markierten Proteine. Zwei Proteine, die jeweils eine fluoreszierende Markierung tragen und in einem Proteinkomplex vorliegen, zeigen die doppelte Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einzelnen Markierungen.

Die beschriebenen Abweichungen vom Modell, das PCHs, die Anhand von Messungen in gereinigten Lösungen erstellt wurden, gut beschreibt, können nicht vollständig in das Modell eingebunden werden. Somit ist eine analytische Auswertung der PCHs, wie in [37] beschrieben, in lebenden Zellen nicht möglich. Stattdessen werden zur Analyse Monte Carlo Simulationen durchgeführt, bei denen die Art der Diffusion, die molekulare Helligkeit, die Konzentration und die Untergrundzählrate so exakt wie möglich vorgegeben werden. Diese Simulationen können entsprechend für Monomere, Dimere, Trimere usw. des Fluorophores durchgeführt werden. Vergleicht man nun das PCH einer Messung mit

den PCHs aus den Simulationen, so lassen sich die Messwerte als lineare Superposition der Simulationen zu verschiedenen Stöchiometrien beschreiben und somit Kenntnisse über die Stöchiometrie erlangen.

2.3.3 Förster Resonant Energy Transfer (FRET)

Die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren sind abhängig von ihrer Umgebung. Der Dipol des Fluorophoren im angeregten elektronischen Zustand koppelt an andere Dipole in seiner unmittelbaren Umgebung. Dies kann zur Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer und zum Energieübertrag auf benachbarte Dipole führen. Die Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer wird bei Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) betrachtet, die Energieübertragung von einem Fluorophor auf einen zweiten durch Dipolwechselwirkung wird mit FRET (Förster Resonant Energy Transfer) untersucht [38].

Bei FRET beobachtet man den strahlungslosen Energietransfer durch Dipol-Dipol Wechselwirkung von einem Fluorophor zu einem Zweiten. Da die Wahrscheinlichkeit für FRET im Wesentlichen vom Abstand der beiden Fluorophore abhängt, eignet sich FRET zur Abstandsbestimmung im Bereich einiger Nanometer zweier unterschiedlich markierter Proteine.

Für die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers E zwischen zwei Fluorophoren im Abstand r gilt:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6}. \quad (2.25)$$

Der Försterradius R_0 ergibt sich entsprechend [39]

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9(\ln 10)Q_D\kappa^2 J}{128\pi^5 n^4 N_A}} = \sqrt[6]{Q_D\kappa^2 J n} \cdot 0,211[\text{Å}]. \quad (2.26)$$

Hierbei ist Q_D die Quantenausbeute des Donors, κ^2 ein Orientierungsfaktor der beiden Dipole, der Werte zwischen 0 und 4 einnehmen kann (für frei bewegliche Dipole im zeitlichen Mittel $\frac{2}{3}$), n der Brechungsindex des Mediums, N_A die Avogadrozahl und J das normierte Überlappungsintegral von normierter Donorfluoreszenz $F_D(\lambda)$ und Akzeptor-extinktionskoeffizient $\epsilon_A(\lambda)$.

$$J = \int F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4] \quad (2.27)$$

Für Einzelmolekül-FRET Messungen muss man verschiedene FRET-Paare optisch gegeneinander auflösen.

Eine hohe Spezifität der Bindung und hohe Photostabilität der Markierungen für beide FRET-Partner ist von zentraler Bedeutung. Um eine möglichst hohe Anzahl von Photonen vom FRET-Paar beobachten zu können, muss der FRET-Donor einen möglichst hohen Extinktionskoeffizienten und beide beteiligten Farbstoffe eine möglichst hohe Quantenausbeute aufweisen.

2.4 Markierung einzelner Proteine

Um Proteine mit Methoden der Einzelmolekülspektroskopie untersuchen zu können, müssen diese eine fluoreszierende Markierung besitzen. Im Idealfall ermöglicht die Markierung eine Detektion über beliebig lange Zeiträume bei gutem Signal-Rausch-Verhältnis, ohne dabei die biologischen und biochemischen Eigenschaften des markierten Moleküls zu verändern.

Dabei ist zu beachten, dass die Autofluoreszenz von Zellen nicht unerheblich ist. Verschiedene Proteine wie z.B. Flavine zeigen Autofluoreszenz, die sogar auf Einzelmolekülniveau nachweisbar ist. Zur Beobachtung einzelner fluoreszierend markierter Proteine in zellulärer Umgebung muss die Fluoreszenz der beobachteten Markierung im Vergleich zur unspezifischen Fluoreszenz, die von der Autofluoreszenz der Zelle herrührt, ausreichend intensiv sein.

Die perfekte Lösung für eine fluoreszierende Markierung, die alle Anforderungen voll erfüllt, gibt es nicht. Dies liegt unter anderem daran, dass die Anforderungen, die an die Fluoreszenzmarkierung gestellt werden, stark von der einzelmolekülspektroskopischen Methode und von der biologischen Fragestellung abhängen [40].

2.4.1 Fluoreszierende Markierungen zur Einzelmolekülspektroskopie in lebenden Zellen

Eine gängige Möglichkeit, Proteine mit einer fluoreszierenden Markierung zu versehen, ist die kovalente Bindung eines Farbstoffmoleküls an das Protein. Hierzu werden Farbstoffmoleküle mit funktionellen Gruppen (z.B. einer Maleimid-Gruppe) versehen, die am Protein an einer spezifischen Stelle binden.

Die gebräuchlichsten Farbstoffe für Einzelmoleküluntersuchungen sind Cyanine (Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, Alexa555, Alexa647) und Rhodamine (Tetramethylrhodamin (TMR), Rhodamin 6G (R6G), Texas Red, Sulforhodamin, Alexa488, Alexa546) die sich durch

einen hohen Absorptionskoeffizienten, hohe molekulare Helligkeit, eine gute Quantenausbeute und Photostabilität auszeichnen.

Die Anbindung von Farbstoffmolekülen an Proteine eignet sich gut zur Markierung von aufgereinigten Proteinen in wässriger Lösung. Bei der Markierung von Proteinen in lebenden Zellen kommt es häufig zu unspezifischen Bindungen an andere Proteine und zur Aufnahme von freien Farbstoffmolekülen in die Zelle. In vielen Fällen bleibt ein beträchtlicher Anteil der zu markierenden Proteine unmarkiert, was für einige Untersuchungsmethoden von großem Nachteil ist.

Genspezifische Markierungen zur Anwendung bei FFA und FRET

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde 1961 von Osamu Shimomura in Tiefseequallen entdeckt [13]. Es wurde erstmals 1994 von Martin Chalfie genspezifisch an andere Proteine angebunden [27]. Neben GFP, das sich mit blauem Licht anregen lässt und grün fluoresziert, wurden unter anderem unter Roger Tsien verschiedene Mutanten dieses Proteins mit spektraler Verschiebung in Anregung und Fluoreszenz entwickelt [41, 42]. Gemeinsam erhielten die drei Wissenschaftler für ihre Leistungen im Jahr 2008 den Nobelpreis für Chemie.

Um ein Protein mit GFP oder einer Mutante zu markieren, werden diese genspezifisch fusioniert, so dass Zellen das Fusionsprotein im Zellkern produzieren. Gegenüber der Markierung von Proteinen mit Farbstoffmolekülen liegen die Vorteile der Verwendung fluoreszierender Proteine in der hohen Spezifität der Markierung und der hundertprozentigen Markierungseffizienz. Darüber hinaus bieten einige Mutanten des GFP durch Lichteinstrahlung bestimmter Wellenlängen veränderbare photophysikalische Eigenschaften (photo-activatable, photo-convertable und photo-switchable fluorescent proteins). Eine Übersicht über Mutationen des GFP bietet [43].

Im Vergleich zu den im vorangegangenen Abschnitt aufgeführten Farbstoffen besitzt das GFP ebenso wie alle seine Mutanten eine geringere molekulare Helligkeit und geringere Photostabilität.

Die Vorteile hoher Spezifität der Markierung bei fluoreszierenden Proteinen und der photophysikalischen Eigenschaften von Cyaninen und Rhodaminen lassen sich seit wenigen Jahren durch die Verwendung von so genannten Tags (Snap-Tag, ACP-Tag) verbinden. Hierzu wird genspezifisch eine Bindungsstelle am zu untersuchenden Protein eingefügt. Der Farbstoff wird mit einer Bindungsstelle versehen, die über eine enzymatische Reaktion ausschließlich an dieser Bindungsstelle anbinden kann (siehe Abb. 2.5) [23]. Liegt die Bindungsstelle in Membranproteinen auf der Außenseite der Zelle, so kann

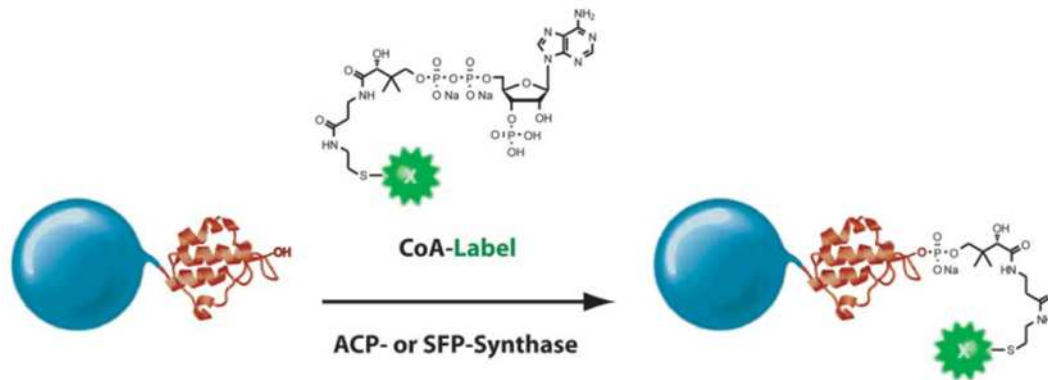


Abbildung 2.5: Ein mit einem ACP-Tag versehenes Protein wird über eine enzymatische Reaktion mit einem Farbstoff verbunden [44].

durch die Verwendung von entsprechenden Farbstoffkonstrukten die Internalisierung der Farbstoffe unterbunden werden.

Die mit der Verwendung von Tags verbundene Verbesserung im Signal-Rausch-Verhältnis gegenüber der klassischen Verwendung fluoreszierender Proteine führt zu signifikanten Verbesserungen in der Beobachtbarkeit von Resultaten bei FFA-Experimenten. Darüber hinaus ermöglicht die genspezifische Anbindung von Farbstoffen über Tags an Proteine, Einzelmolekül-FRET in lebenden Zellen mit hohem Signal-Rausch-Verhältnis zu beobachten.

Nicht bleichende Markierungen für Single Particle Tracking-Experimente

Für einige biophysikalische oder biochemische Fragestellungen ist eine hohe Photostabilität der Markierung von zentraler Bedeutung. Will man beispielsweise im Rahmen eines Single Particle Tracking-Experiments ein einzelnes Protein über einen Zeitraum von Minuten verfolgen, so ist dies weder mit einzelnen Farbstoffmolekülen noch mit fluoreszierenden Proteinen zu realisieren. Halbleiterpartikel mit einem Durchmesser von einigen Nanometern, so genannte Quantendots, wurden hierzu als Markierungsmöglichkeit etabliert [45, 19].

Die photophysikalischen Eigenschaften eines Quantendots hängen ausschließlich von der Größe des Halbleiterpartikels ab. Sie können nicht bleichen, allerdings können Quantendots in langlebige nicht fluoreszierende Zustände übergehen und somit blinken. Da Quantendots in der Regel aus toxischem Material bestehen, müssen diese durch eine Polymerummantelung von der Zelle abgeschirmt werden. Am Ende resultieren im Vergleich

zu Farbstoffen und fluoreszierenden Proteinen relativ große Partikel. Dadurch vergrößert sich die Wahrscheinlichkeit, dass die Markierung sich auf die Eigenschaften des Proteins auswirkt.

Es existieren eine Reihe von fluoreszierenden Defektzentren in Diamanten. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde das Konzept verfolgt, Nanodiamanten mit so genannten Nitrogen-Vacancy-Zentren (NV-Zentren) (Abb. 3.1) als Markierung für biologische Anwendungen zu etablieren. Bei einem NV-Zentrum ist ein Kohlenstoffatom im Diamantgitter durch ein Stickstoffatom ersetzt und ein zum Stickstoff benachbarter leerer Gitterplatz bildet die Fehlstelle (Vacancy). Das NV-Zentrum zeigt im Gegensatz zu den bisher aufgeführten fluoreszierenden Markierungen keinerlei Bleichen oder Blinken [22].

Für die Verwendung als Markierung zum Single Particle Tracking liegen die Vorteile von Nanodiamanten mit NV-Zentren bei der nicht vorhandenen Toxizität und der konstanten Fluoreszenzintensität.

2.5 Experimentelle Aufbauten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden experimentelle Daten an unterschiedlichen Mikroskopen aufgenommen. Für Experimente zur Analyse von Fluoreszenz-Fluktuationen und FRET wurde ein konfokales Mikroskop konzipiert und aufgebaut, das je nach Experiment mit einfarbiger oder zweifarbiger Anregung und dem entsprechend mit einem bzw. zwei Detektionskanälen versehen war. Single Particle Tracking wurde zum Teil im Weitfeldmikroskop, zum Teil in einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop realisiert.

2.5.1 Konfokale Mikroskopie zur Durchführung von FFA und FRET

Die Messungen zur Fluoreszenz-Fluktuations-Analyse und zu FRET wurden an einem konfokalen Mikroskop durchgeführt, das um ein Olympus IX70-Mikroskop (siehe Abb. 2.6) aufgebaut ist. Zur Fluoreszenzanregung stehen verschiedene cw-Laser zur Verfügung: ein Argon-Ionen-Laser (Innova 300, Coherent), ein frequenzverdoppelter Nd:Yag-Laser (Verdi, Coherent) und ein Helium-Neon-Laser (PL-610, Polytec). Das Anregungslicht wird über eine runde Planparallele Quarzplatte von zwei Zoll Durchmesser und einem Zentimeter Dicke über den Sideport des Mikroskopstativs (siehe Abb. 2.6) eingekoppelt. Als Objektiv wird ein 60× Wasserimmersionobjektiv UPlanApo 60×/1,20 W von Olympus verwendet. Die untersuchten Proben werden mit Hilfe eines Probenhalters an einem Piezo-Scantisch der Firma PI mit einem Verschiebebereich von 200 μm in lateraler

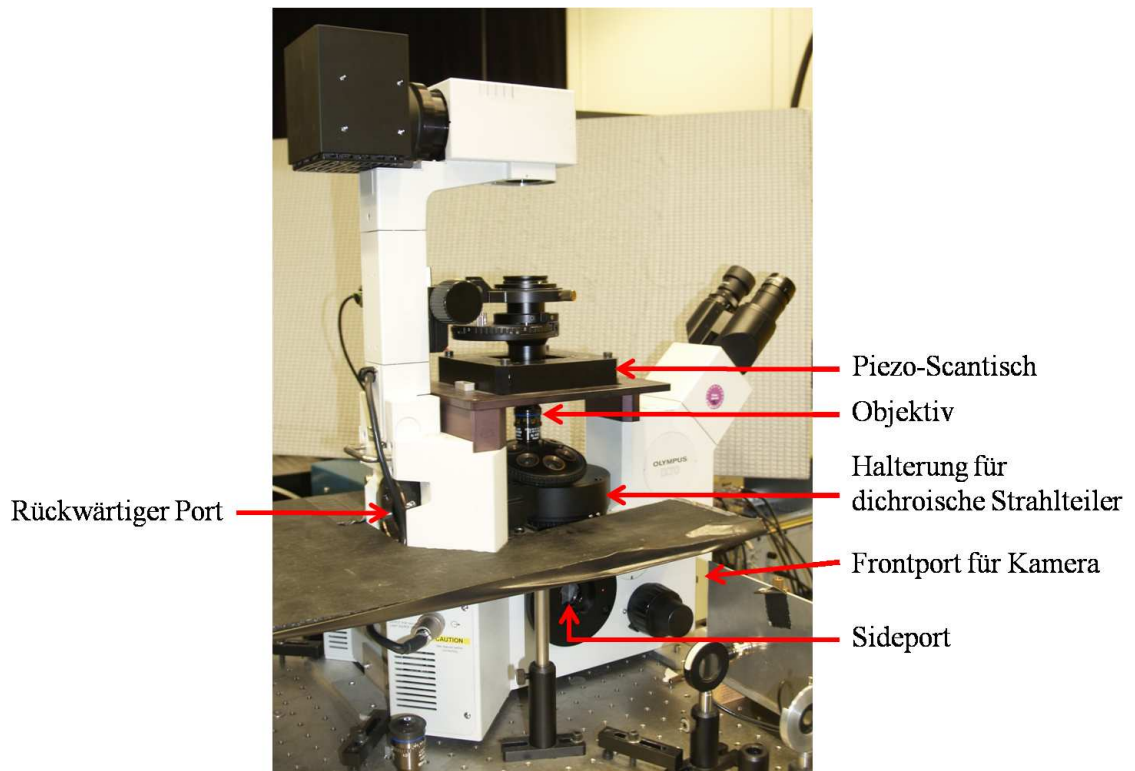


Abbildung 2.6: Olympus IX70-Mikroskop, zur konfokalen Mikroskopie wurde das Anregungslicht durch den Sideport geführt, zur Anregung bei Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie wurde das Anregungslicht durch den rückwärtigen Port über einen dichroischen Strahlteiler eingekoppelt. Bei Anregung über den rückwärtigen Port kann eine Bildaufnahme mit einer Kamera am Frontport durchgeführt werden.

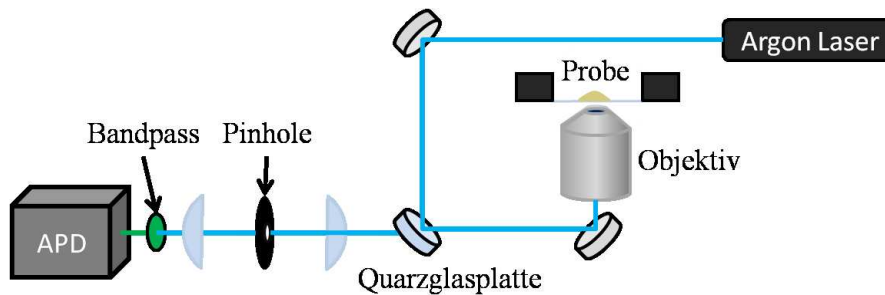


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Durchführung von FCS an fluoreszierenden Nanodiamanten.

Richtung und $20\ \mu\text{m}$ in axialer Richtung angebracht. Zur Bilderzeugung wird die Probe mit Hilfe des Piezo-Scanners abgerastert.

Zur Detektion der Fluoreszenz dienen Avalanche-Photodioden (APDs) vom Typ SPCM-AQR-14 der Firma Perkin Elmer. Das Signal der APDs (TTL-Pulse) wird auf verschiedene Messkarten zur Verarbeitung und Auswertung der Daten geleitet. Zur Bildgebung und zur Darstellung der Fluoreszenzzeitspur wird das Fluoreszenzsignal über eine Zählerkarte (6001, National Instruments) an den Rechner gegeben, der auch den Piezo-Verschietisch ansteuert. Zur Darstellung der Autokorrelations- bzw. Kreuzkorrelationsfunktion der Fluoreszenzzeitspuren wird ein Hardwarekorrelator (ALV5000) genutzt. Darüber hinaus werden die Daten mit einer Single-Photon-Counting Karte (SPC630, Becker&Hickl) aufgezeichnet.

FCS-Messungen mit einfarbiger Anregung und einem Detektionskanal

Bei der Untersuchung der Diffusion von Nanodiamanten mit NV-Zentren wird zur Anregung der Fluoreszenz die Argon-Laser-Linie mit der Wellenlänge $514,5\ \text{nm}$ verwendet. Zur Unterdrückung des Anregungslichtes und unspezifischer Fluoreszenz werden ein Notch514 und ein Langpassfilter 667LP in den Detektionsstrahlengang eingesetzt (siehe Abb. 2.7).

FCFS und FRET mit Zweifarbanregung und zwei Detektionskanälen

Die zeitgleiche Anregung zweier verschiedener Farbstoffe in der $488\ \text{nm}$ -Linie des Argonlasers und der $633\ \text{nm}$ -Linie des HeNe-Lasers erreicht man durch Überlagerung mit Hilfe eines dichroischen Spiegels und Einkoppelung in das konfokale Mikroskop über dieselbe Glasfaser. Zur spektralen Trennung der Fluoreszenz der verschiedenen Farb-

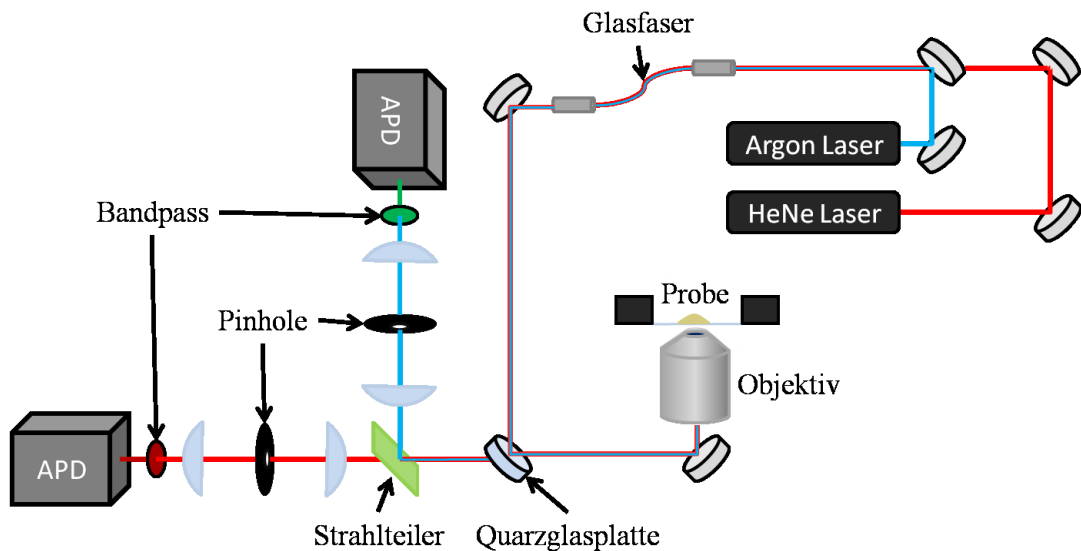


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Zweikanalaufbaus zur Durchführung von FFA und FRET am CNTF-Rezeptorkomplex.

stoffte wird ein dichroischer Strahlteiler DCLP650 in den Detektionsstrahlengang eingebaut. Im kurzwelligen Detektionsstrahlengang wird ein gründurchlässiger (532/35BP), im langwelligen Detektionsstrahlengang ein rot durchlässiger Interferenzfilter (675/60BP) zur Unterdrückung von Anregungslicht und unspezifischer Fluoreszenz eingesetzt (siehe Abb. 2.8).

2.5.2 Imaging für Single Particle Tracking-Experimente

Single Particle Tracking mit Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie

Zur Realisierung von Single Particle Tracking von Nanodiamanten in Glycerin wird das Anregungslicht mit einer Linse von 500 mm Brennweite durch den rückwärtigen Port über einen dichroischen Einkoppelstrahlteiler (siehe Abb. 2.6) auf die rückwärtige Fokalebene des Objektivs fokussiert. In der fokalen Ebene entsteht so ein Beleuchtungsfleck mit gaußförmiger Intensitätsverteilung von etwa 10 μm Durchmesser. Zur Anregung dient die 514,5 nm Linie des Argonlasers. Die Fluoreszenz wird auf eine Kamera gelenkt, die am Frontport des Mikroskopgehäuses (siehe Abb. 2.6) angebracht ist (siehe Abb. 2.9).

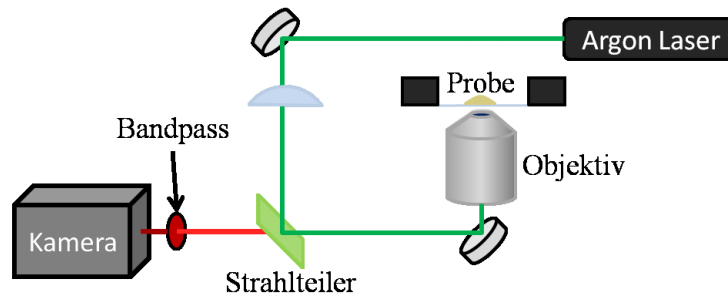


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Aufbaus zur Durchführung von Single Particle Tracking-Experimenten an fluoreszierenden Nanodiamanten in Glycerin.

Single Particle Tracking im konfokalen Laserscanning-Mikroskop

Zum Single Particle Tracking in lebenden Zellen wird ein kommerzielles invertiertes konfokales Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica (Leica DM IRBE) verwendet.

3 Nanodiamanten mit Nitrogen-Vacancy-Zentren

In diesem Kapitel wird zunächst das Nitrogen-Vacancy-Zentrum (NV-Zentrum) in Diamant charakterisiert und die Herstellung von fluoreszierenden Nanodiamanten beschrieben. Zur Etablierung dieser Diamanten als Fluoreszenzmarker für Proteine sind darüber hinaus die Beherrschung der Oberflächenchemie, die Stabilität kolloidaler Nanodiamantenlösungen und das Einbringen von Nanodiamanten in lebende Zellen wichtige Aspekte. Hierzu werden zunächst die Grundlagen und anschließend die im Rahmen der Arbeit durchgeführte Experimente vorgestellt. Abschließend wird Single Particle Tracking an Nanodiamanten demonstriert.

3.1 Theoretische Grundlagen

3.1.1 Aufbau und Eigenschaften des NV-Zentrums

Charakterisierung des NV-Zentrums

Das NV-Zentrum in Diamant wird von einem Stickstoffatom, das ein Kohlenstoffatom im Diamantgitter substituiert und einer direkt benachbarten Leerstelle im Diamantgitter gebildet (siehe Abb. 3.1). Es kann in zwei unterschiedlich geladenen Zuständen vorliegen, dem elektrisch neutralen NV^0 und dem einfach negativ geladenen NV^- . In welchem Zustand das NV-Zentrum vorliegt, ist im Wesentlichen von der Dichte der Elektronendonatoren und -akzeptoren in der Umgebung des NV-Zentrums abhängig. Liegen keine Donatoren in der Umgebung des NV-Zentrums vor, so befindet sich das Zentrum im NV^0 -Zustand in einem Spin $\frac{1}{2}$ -System. Bei den im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Nanodiamanten, die bis zu 200 ppm Stickstoffatome im Diamantgitter enthalten, die als Elektronendonatoren fungieren können, liegen in der Regel NV^- -Zentren vor. Der Grundzustand des NV^- ist ein Triplettzustand mit Spin 1.

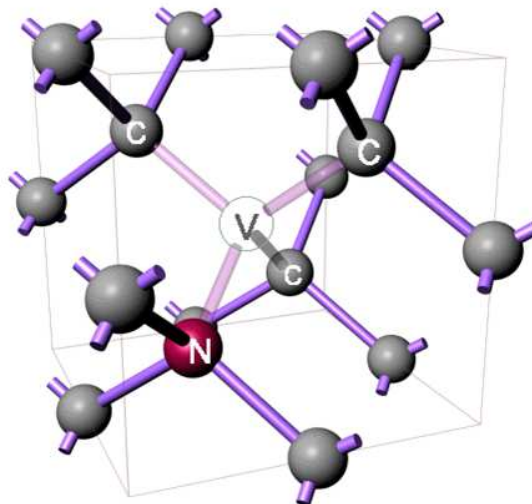


Abbildung 3.1: Aufbau eines NV-Zentrums im Diamantgitter (Kohlenstoffatome (C) in grau, Stickstoffatom (N) in rot, Leerstelle (V) in weiß)

Photophysikalische Eigenschaften des NV-Zentrums

Das NV-Zentrum in Diamant besitzt herausragende photophysikalische Eigenschaften. Insbesondere die absolute Photostabilität der Fluoreszenz unter physiologischen Bedingungen ist für Einzelmoleküluntersuchungen attraktiv. Die Fluoreszenzeigenschaften des NV-Zentrums können anhand von experimentell bestimmten Energieniveaus und Übergangsraten beschrieben werden [46].

Die Fluoreszenzübergänge (Null-Phononen-Linie) vom angeregten Zustand in den Grundzustand liegen beim NV^- -Zentrum bei 1,945 eV entsprechend einer Fluoreszenzwellenlänge von 638 nm, beim NV^0 bei 2,156 eV entsprechend 575 nm. Durch die Kopplung an Phononen im Kristall bei physiologischen Temperaturen kommt es zur Verbreiterung des Fluoreszenzspektrums (Abb. 3.2B). Die Fluoreszenz lässt sich bei deutlich höheren Energien in einem breiten Spektrum anregen. In dieser Arbeit werden i. d. R. Anregungswellenlängen von 514 nm oder 532 nm verwendet [22, 48].

Beim NV^- -Zentrum sind angeregter (3E) und Grundzustand (3A) des Fluoreszenzüberganges Triplettzustände. Für den angeregte Zustand 3E wurden unterschiedliche Lebensdauern von 11,6 bis 17 ns berichtet, entsprechend [47] wird hier ein Wert von 13 ns angenommen. Durch strahlungslose Übergänge kann das System vom Zustand 3E in den Singulettzustand 1A übergehen, der mit einer Lebensdauer von etwa 300 ns in den Grundzustand 3A übergeht (siehe auch Abb. 3.2 A) [47].

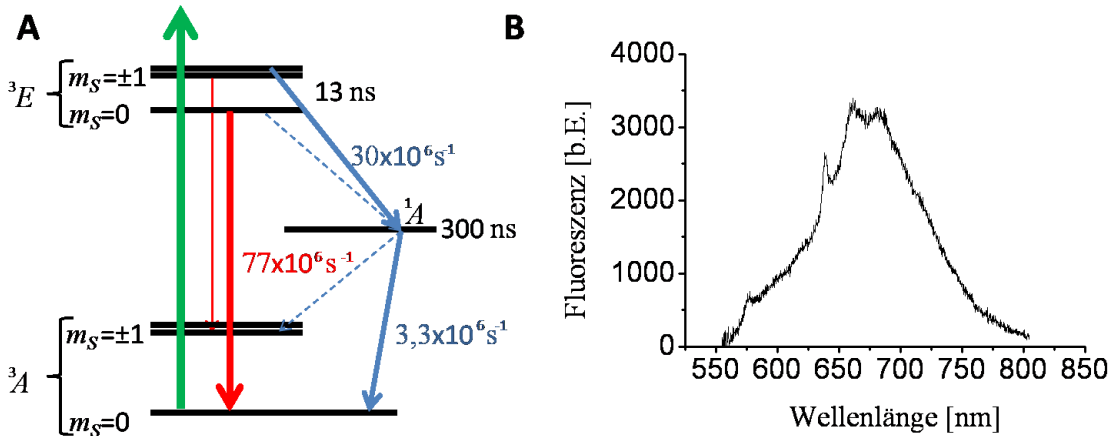


Abbildung 3.2: (A) Die Energieniveaus und -übergänge und Lebensdauern der angeregten Zustände sowie Übergangsraten der wahrscheinlichsten Übergänge (nach [47]) im NV⁻-Zentrum. (B) Fluoreszenzspektrum des NV-Zentrums bei Raumtemperatur.

Bezogen auf typische Mittelungszeiten in der Fluoreszenzzeitspur für Fluorescence Fluctuation Analysis-Experimente oder auf die Bildwiederholungsrate bei Single Particle Tracking-Experimenten ist die Lebensdauer des dunklen Zustand um Größenordnungen kleiner, so dass das NV-Zentrum hier kein Blinken zeigt. Darüber hinaus kann das NV-Zentrum unter physiologischen Bedingungen nicht bleichen, da die Gitterstruktur des Diamanten unter solchen Bedingungen absolut stabil ist.

3.1.2 Herstellung fluoreszierender Nanodiamanten

Für die Herstellung fluoreszierender Nanodiamanten zur Proteinmarkierung sind drei Punkte von Bedeutung. Zum Ersten müssen möglichst kleine Nanodiamanten homogener Größenverteilung, nach Möglichkeit mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern, erzeugt werden. Zum Zweiten sollen diese eine möglichst hohe Dichte von NV-Zentren enthalten. Drittens muss die Oberflächenchemie der so erzeugten fluoreszierenden Nanodiamanten zur Anbindung an Proteine und zur Stabilisierung kolloidaler Lösungen von Nanodiamanten in physiologischen Pufferlösungen beherrscht werden.

Die Herstellung von fluoreszierenden Nanodiamanten lässt sich in zwei unabhängigen Schritten beschreiben. Es müssen Kristallite der gewünschten Größe erzeugt und es muss eine möglichst hohe Dichte an NV-Zentren im Diamant gebildet werden.

Herstellung von Nanodiamanten

Es bestehen zwei Methoden, Nanodiamanten zu produzieren. Einerseits können natürliche Diamanten als Ausgangsmaterial zur Vermahlung verwendet werden. Die Fraktion der Diamanten mit der gewünschten Größe wird durch Zentrifugation abgetrennt. Die zweite Methode nutzt eine Reaktionskammer, in der sich bei geeignetem Druck und Temperatur Kristallite (Detonationsdiamanten) bilden.

Vermahlen von Diamanten: Da Diamanten ein ausgesprochen hartes Material darstellen, ist die Vermahlung von Diamanten nicht trivial. Als Ausgangsmaterial dienen Diamanten von etwa $150\ \mu\text{m}$ Durchmesser. Diese werden zunächst in einer Strahlmühle zerkleinert. Hierzu werden Diamanten über Düsen im Luftstrom gegeneinander geschossen. Bei der Vermahlung mit dieser Technik entstehen nahezu keine Verunreinigungen. Auf diese Weise lassen sich Diamanten bis zu einer Größe von minimal $1\ \mu\text{m}$ herstellen.

Zur weiteren Vermahlung dient eine Rührwerkskugelmühle. Hierzu werden die vorzerkleinerten Diamanten aus der Strahlmühle mit Mahlkörpern aus einem möglichst harten Material (Korngröße ca. $100\ \mu\text{m}$) und Wasser vermischt und in einen Zylinder mit Rührwerk gegeben. Durch das Rühren zerreiben die Mahlkörper die Kristallite weiter. Die kleinsten so erzeugten Partikeln besitzen einen Durchmesser von wenigen Nanometern. Hierbei kommt es zwangsläufig zum Abrieb der Mahlkörper, des Mahlwerks und des Zylinders. Zur Vermahlung in Rührwerkskugelmühlen werden meist Mahlkörper aus Zirkoniumoxid verwendet. Da sich auf Grund ähnlicher chemischer und physikalischer Eigenschaften Abrieb der Zirkoniumoxidnanopartikel nur unter erheblichem Aufwand von den Nanodiamanten abtrennen lässt, bietet es sich allerdings an, einen Teil der Diamanten des Ausgangsmaterials mit $150\ \mu\text{m}$ Durchmesser als Mahlkörper zu verwenden (autogenes Malen). Am Ende erhält man so ein Gemisch aus Diamanten, Polymeren (Mahlwerk) und metallischen Rückständen (Mahlzylinder). Polymer- und Metallrückstände lassen sich über nasschemische Verfahren auflösen und aus der Probe entfernen.

Abschließend muss die Fraktion der Diamanten mit gewünschter Größe durch Zentrifugation abgetrennt werden.

Detonationsdiamanten: Bei passenden Phasenbedingungen (Druck, Temperatur) ordnen sich Kohlenstoffatome beim Kristallwachstum im Diamantgitter an. Dies macht man sich bei der Erzeugung von Detonationsdiamanten zu Nutze [49]. In der Regel wird ein Reaktionsgemisch von TNT und Hexogen verwendet, das unter Sauerstoffabschluss in einem Reaktor zur Explosion gebracht wird. Dabei erhöhen sich schlagartig für kurze

Zeit der Druck und die Temperatur. Für einen kurzen Moment (ca. 500 ns) herrschen im Reaktor Phasenbedingungen ($T = 2500 - 3000$ K, $P = 10 - 30$ GPa), bei denen Diamanten aus den Kohlenstoffatomen des TNT wachsen können. Es entstehen Kristallite definierter Größe, die von der Dauer der passenden Phasenbedingungen bestimmt wird. Diese lässt sich allerdings nur über die Geometrie des Reaktors in geringfügigem Maße beeinflussen. Die so erzeugten Kristallite haben eine Größe von 4-5 nm [50].

Nach Ablauf der Reaktion liegen die Kristallite in einer graphitischen Matrix vor, die sich nach Abfall des Druckes um die Diamanten herum bildet. Diese Nanodiamantengglomerate werden vermahlen und chemisch gereinigt. Als Produkt erhält man kleine Agglomerate von wenigen Kristalliten oder einzelne Kristallite [51].

Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Erzeugung von Nanodiamanten durch Vermahlen liegt in der bekannten und homogenen Größe und Form der Kristallite.

Erzeugung von NV-Zentren in Diamanten

Diamanten, die als Ausgangsmaterial zur Vermahlung verwendet werden, enthalten bis zu 2000 ppm Stickstoffatome [52]. Durch Bestrahlung der Diamanten mit Elektronen, Protonen oder Ionen werden Leerstellen erzeugt, die beim anschließenden Ausheizen der Diamanten im Diamantgitter migrieren. Trifft dabei eine Leerstelle auf eine Stickstofffehlstelle, so bildet sich ein stabiles NV-Zentrum. Die Konzentration von Stickstoff in Detonationsdiamanten liegt bei 2 – 5 %, die Stickstoffatome liegen hier allerdings vorzugsweise an der Oberfläche der Kristallite vor [53]. Erst vor Kurzem konnten erstmals NV-Zentren in Detonationsdiamanten nachgewiesen werden [54].

Bestrahlung von Diamanten: Diamanten, die eine hohe Dichte von Stickstoffzentren enthalten, erscheinen aufgrund der Absorption der Stickstoffzentren gelb (siehe Abb. 3.3 A). Um zusätzlich Leerstellen im Gitter zu erzeugen, werden die Diamanten entweder mit Elektronen, Protonen oder Ionen bestrahlt. Bei der Streuung der Teilchen an Kohlenstoffatomen im Diamantgitter werden einige Kohlenstoffatome aus dem Kristallgitter herausgeschlagen. Protonen und Ionen mit Energien in der Größenordnung von keV geben ihre gesamte Energie auf einigen Nanometern, bei MeV-Energien im Bereich von μm ab. Da die Energie im Wesentlichen an dem Ort abgegeben wird, wo die Ionen bzw. Protonen im Diamantgitter gestoppt werden, erreicht man so mit geringer Strahlungsdosis lokal hohe Dichten von Leerstellen im Gitter. Will man über ein größeres Probenvolumen in Diamant eine homogene Verteilung von Leerstellen erreichen, verwendet man Elektronen der Energie von einigen MeV. Diese verlieren etwa 1 MeV ihrer Ener-

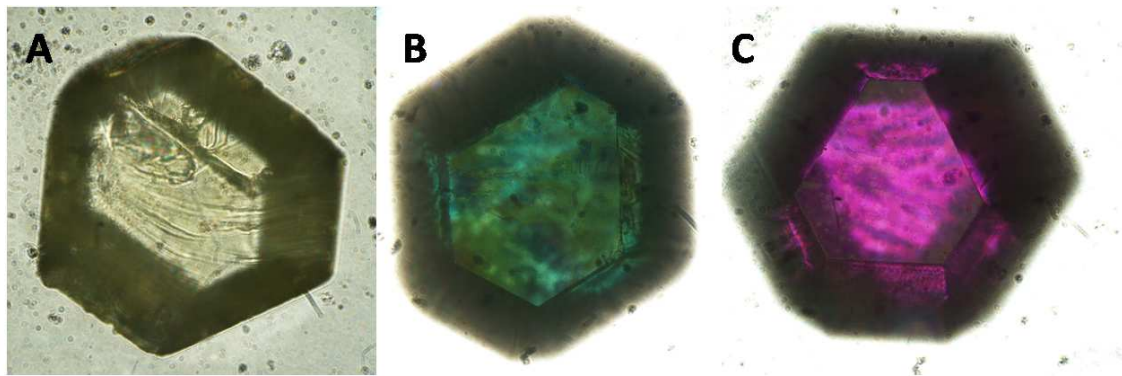


Abbildung 3.3: 150 μm große Diamanten, A) Diamant mit Stickstoffzentren (gelb), B) Diamant mit nicht gekoppelten Stickstoffzentren und Leerstellen (grün), C) Diamant mit NV-Zentren (violett).

gie pro Zentimeter Weg durch Diamant. Somit kann bei einer Probentiefe von einigen Millimetern die mittlere Weglänge zwischen zwei Stößen und somit die Dichteverteilung der erzeugten Leerstellen als nahezu homogen über das Probenvolumen angenommen werden.

Die Dichte von NV-Zentren wird zum einen von der Dichte der Stickstofffehlstellen im Kristallgitter zum anderen von der Bestrahlungsdosis, die linear mit der Dichte der erzeugten Leerstellen im Kristallgitter zusammenhängt, bestimmt. Die maximale Strahlungsdosis wird von der zunehmenden Graphitisierung des Diamanten bei einer zu hohen Dichte von Leerstellen im Gitter begrenzt [55]. Bei Diamanten, die eine hohe Konzentration von Stickstoffatomen aufweisen, stellt diese Graphitisierung den limitierenden Faktor für die maximale Dichte von NV-Zentren dar.

Ausheizen bestrahlter Diamanten: Nach der Bestrahlung liegen im Diamantgitter sowohl Stickstoffatome als auch Leerstellen vor. Solche Diamanten erscheinen grün (siehe Abb. 3.3 B). Heizt man die Diamanten im Vakuum bei ca. 800 °C aus, so migrieren die Leerstellen im Gitter. Trifft dabei eine Leerstelle auf ein Stickstoffatom, bilden sie ein stabiles NV-Zentrum. Durch das Ausheizen graphitisiert die Oberfläche der Diamanten. Nach dem Ausheizen erscheinen die Diamanten aufgrund der Absorption der NV-Zentren violett, wie in Abbildung 3.3 C zu sehen ist.

3.1.3 Oberflächenchemie an Nanodiamanten

Nanodiamanten, die durch Vermahlung erzeugt wurden, tragen nur wenige funktionelle Gruppen an der Oberfläche. Der Anteil an sp^2 hybridisierten Kohlenstoffatomen ist dabei meist gering. Der Anteil von sp^2 Kohlenstoff an der Oberfläche von monokristallinen aufgereinigten Detonationsdiamanten ist dagegen beträchtlich. Dem entsprechend tragen diese auch etliche funktionelle Gruppen, wie Carboxyl-, Hydroxylgruppen, Ketone oder Lactone. Diese Gruppen können genutzt werden, um entsprechende Reaktionspartner an die Oberfläche des Nanodiamanten zu binden [56]. Bei Nanodiamanten, die zur Erzeugung von NV-Zentren ausgeheizt wurden, graphitisiert die Oberfläche, ohne dabei funktionelle Gruppen zu hinterlassen.

Insbesondere bei Detonationsdiamanten besteht eine große Inhomogenität in der Oberflächenbeschaffenheit der Kristallite. Um diese zu beseitigen und die Dichte an reaktiven Gruppen bei allen Kristalliten auf ein einheitliches, möglichst hohes Niveau zu bringen, werden die Nanodiamanten in stark oxidierenden Säuren, teilweise unter erhöhtem Druck und bei erhöhten Temperaturen behandelt. Graphitschichten werden so von der Oberfläche der Kristallite entfernt und Kohlenstoffatome an der Oberfläche des Diamanten werden oxidiert, so dass diese durch Carboxyl-Gruppen terminiert werden. Verschiedene Moleküle können dann in weiteren Schritten angebunden werden. Ein weiterer Ansatz besteht darin, funktionelle Gruppen, die Sauerstoffatome enthalten, zu Hydroxyl-Gruppen zu reduzieren. An diese kann ein Silanlinker angebunden werden, über den dann weitere Moleküle kovalent angebunden werden können [56].

3.1.4 Stabilität kolloidaler Lösungen in physiologischem Puffer (DLVO-Theorie)

Kolloidale Teilchen liegen nur unter geeigneten Bedingungen gelöst in Flüssigkeiten vor. Zur Erläuterung, unter welchen Bedingungen Nanodiamanten sich in einer stabilen kolloidalen Lösung befinden, wird hier zunächst eine Einführung in die DLVO-Theorie, benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek [57], gegeben.

Die DLVO-Theorie betrachtet zunächst das Potential zweier paralleler Oberflächen, die einander in wässriger Lösung angenähert werden. Tragen diese Oberflächen keinerlei Ladung, so wirken lediglich attraktive van der Waals-Kräfte auf kurzen Distanzen (Abb. 3.4a). Nähern sich diese Oberflächen auf wenige Nanometer einander an, ziehen sie sich an und werden über die van der Waals-Kräfte zusammengehalten.

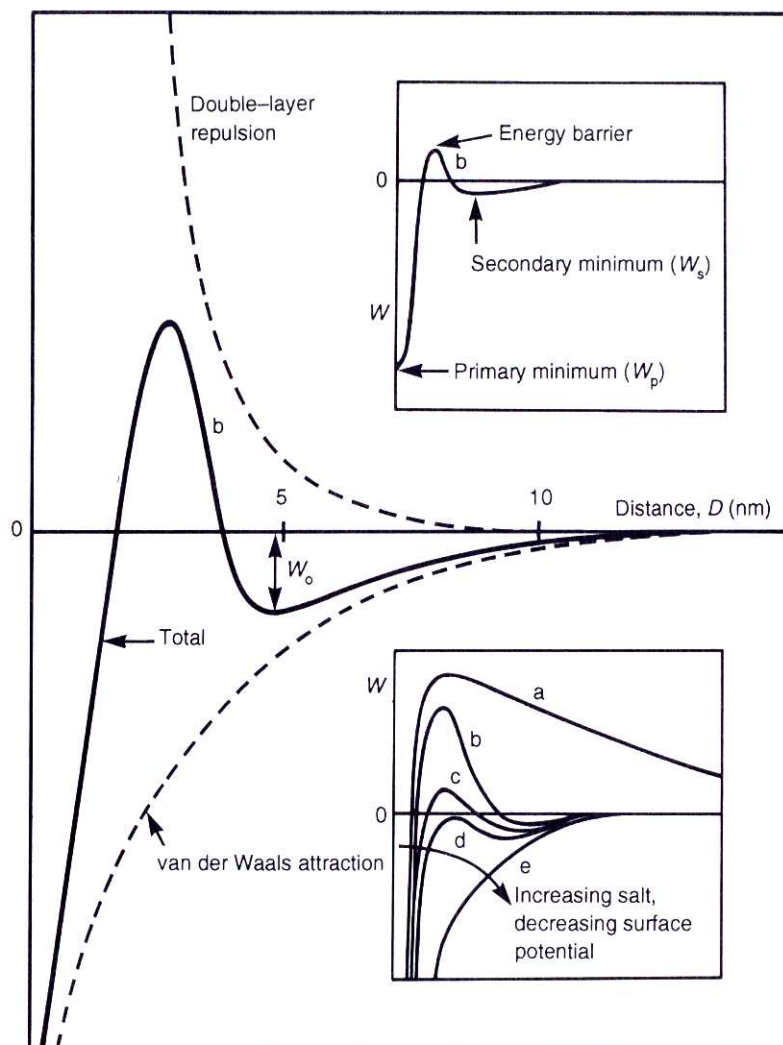


Abbildung 3.4: Potential zwischen zwei parallelen Oberflächen in wässriger Lösung nach der DLVO-Theorie. Das Potential setzt sich aus abstoßender elektrostatischer Wechselwirkung und attraktiven van der Waals-Kräften zusammen. a) Starke Abstoßung; kolloidale Partikel bleiben stabil in Lösung. b) Ausprägung eines geringen sekundären Potentialminimums; aufgrund ihrer kinetischen Energie bilden Kolloide keine stabilen Agglomerate. c) Stärker ausgeprägtes sekundäres Potentialminimum; die Kolloide agglomerieren nach einiger Zeit. d) Die Potentialbarriere zwischen sekundärem und primärem Potentialminimum wird kleiner; es bilden sich zunächst Agglomerate, die mit der Zeit in Aggregate übergehen. e) Durchgehend attraktives Potential; es kommt zur raschen Aggregation von Kolloiden (nach [57]).

Betrachtet man nun zwei gleich geladene Oberflächen, so konkurrieren elektrostatische Abstoßung und attraktive van der Waals-Kräfte. Das elektrische Feld wird im Wasser durch eine erhöhte Dichte von andersgeladenen Elektrolyten auf einer charakteristischen Längenskala, der Debye-Länge, auf einen Faktor $\frac{1}{\epsilon}$ reduziert. Für die Debye-Länge λ_D gilt:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon\epsilon_0 k_B T}{\sum_i \rho_i e^2 z_i^2}} \quad (3.1)$$

Hierbei wird über die Beiträge verschieden geladener Ionen mit ihrer mittleren Dichte in der Lösung ρ_i und ihrer Ladungszahl z_i summiert. Auch in destilliertem Wasser erfolgt Abschirmung durch dissoziiertes Wasser. Bei Raumtemperatur liegt die Debye-Länge in reinem Wasser bei $1 \mu\text{m}$. In einer 100 mM Kochsalzlösung, die etwa den Bedingungen von physiologischen Pufferlösungen entspricht, liegt die Debye-Länge bei nur noch 1 nm .

In der Summe bildet sich ein Potential aus, das für Abstände unter einem Nanometer von van der Waals-Kräften dominiert wird und in diesem Bereich attraktiv bleibt und das bei Abständen in der Größenordnung der Debye-Länge verschwindet. Der weitere Verlauf des Potentials ist im Wesentlichen von der Ladungsdichte an der Oberfläche und der Ionenkonzentration im Wasser abhängig (siehe dazu Abb. 3.4). Dabei gilt: Je höher die Ionenkonzentration in der Lösung und je niedriger das Oberflächenpotential, desto mehr überwiegen attraktive Wechselwirkungen. Insbesondere durch Ausheizen graphitisierte Nanodiamanten, deren Oberflächen ungeladen sind, liegen in destilliertem Wasser nicht in stabiler kolloidaler Lösung vor.

Bei den betrachteten Nanodiamanten kann man zunächst von einer in Luft neutralen Oberflächenladung ausgehen, die in wässriger Umgebung durch Dissoziation von Säure- oder Basegruppen (z.B. Carboxyl- und Hydroxylgruppen) zu einer negativ bzw. positiv geladenen Oberfläche wird. Der Anteil an Säure- und Basegruppen an der Oberfläche eines Kristalliten, der in wässriger Lösung dissoziiert vorliegt, ist abhängig vom pH-Wert der Lösung. Die hieraus resultierende Abhängigkeit der Stabilität einer kolloidalen Lösung lässt sich als Phasendiagramm von Ionenkonzentration und pH-Wert darstellen. Exemplarisch zeigt Abb. 3.5 die pH- und Ionenkonzentrationsbereiche, bei denen Latexpartikel in einer CsNO_3 -Lösung stabil in kolloidaler Lösung vorliegen [57].

Ist der Verlauf des Potentials zwischen den Teilchen einer kolloidalen Lösung für alle Abstände attraktiv (siehe Abb. 3.4 e), so werden diese über van der Waals-Kräfte miteinander verbunden. Diesen Prozess nennt man Aggregation. Die so verbundenen Teilchen lassen sich nur unter erheblichem Aufwand wieder voneinander trennen, insbesondere reicht hier die Behandlung mit Ultraschall nicht aus, um die Kristallite zu separieren.

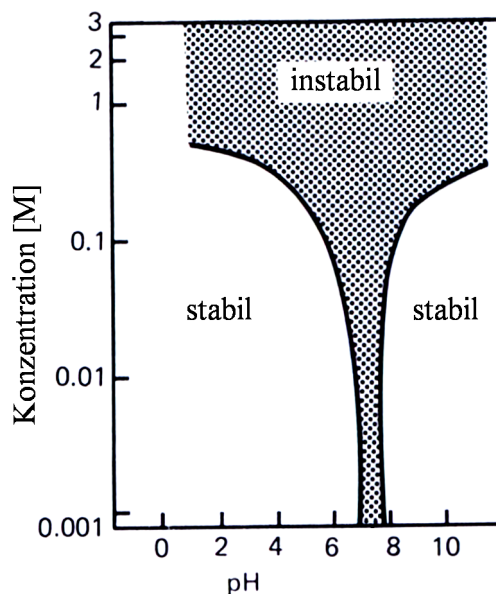


Abbildung 3.5: Bereiche von stabilen und instabilen kolloidalen Lösungen von Latexpartikeln, die COO^- - und NH_3^+ -Gruppen an der Oberfläche tragen in Abhängigkeit von pH-Wert und Ionenkonzentration in einer CsNO_3 -Lösung (nach [57]).

Bei einem Potentialverlauf, der ein lokales Minimum aufweist (siehe Abb. 3.4 b), bleiben kolloidale Teilchen ebenfalls nicht in einer stabilen Lösung, wenn das lokale Minimum $|W_0| > k_B T$ ist. Bei so verbundenen Teilchen spricht man von Agglomeraten. Die Kräfte, die die Teilchen eines Agglomerats miteinander verbinden, sind deutlich geringer als die Kräfte, die in einem Aggregat wirken. Mit Hilfe von Ultraschall ist es hier möglich, die Teilchen wieder in Lösung zu überführen.

Da der Ionenkonzentration und dem pH-Wert bei Untersuchungen an lebenden Zellen aus biochemischen Gesichtspunkten enge Grenzen gesetzt sind, muss die Oberfläche der Nanodiamanten eine ausreichende Ladungsdichte aufweisen, um das Aggregieren der Kristallite zu verhindern.

Neben dem Ansatz, die Aggregation oder Agglomeration von Nanodiamanten über eine hohe Ladungsdichte zu verhindern, ist eine Polymerummantelung der Kristallite eine alternative Möglichkeit, die Stabilität einer kolloidalen Lösung in physiologischem Puffer zu gewährleisten. Nähert man zwei mit Polymeren besetzte Oberflächen einander an, so reduziert sich das Volumen, in dem die Polymere fluktuieren können. Auf Grund

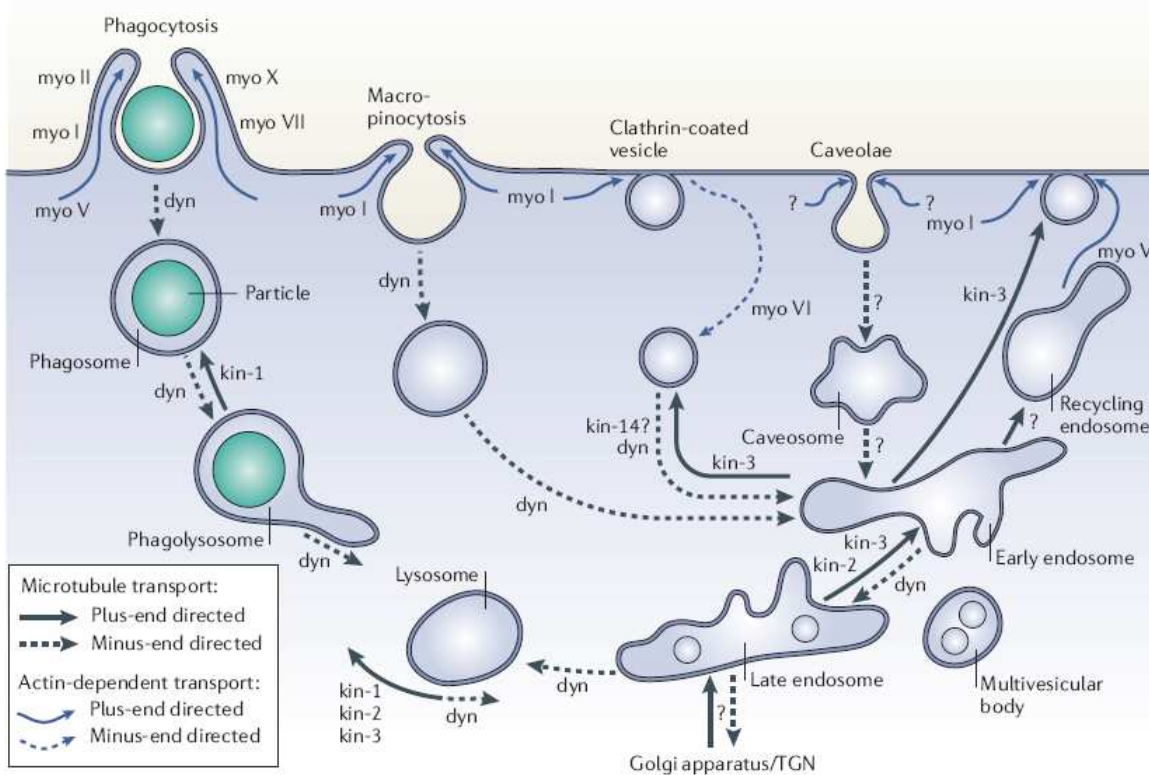


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung verschiedener Prozesse, die zur Internalisierung von extrazellulärem Material führen. Solche Prozesse fasst man unter dem Begriff Endozytose zusammen. Über verschiedene Mechanismen können Endosome gerichteten Transport erfahren (nach [58]).

der damit verbundenen Reduktion der Entropie verhindern die Polymere somit eine Aggregation [57].

3.1.5 Einbringen von Nanopartikeln in lebende Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Nanodiamanten in lebende Zellen eingebracht. Dies wurde über Endozytose oder alternativ über Mikroinjektion durchgeführt.

Endozytose

Es ist bekannt, dass lebende Zellen kleine Flüssigkeitsvolumina oder Partikel mit Größen von weniger als 100 nm, die an der Plasmamembran der Zelle anhaften, über Endozytose aufnehmen können. Endozytose ist ein Prozess, bei dem sich ein Teil der Plasmamembran einstülpt und anschließend abschnürt, so dass das Endosom das eingeschnürte Volumen

in die Zelle transportiert. Abbildung 3.6 stellt die verschiedenen Mechanismen dar, die unter dem Begriff Endozytose zusammengefasst werden. Über verschiedene Zwischenschritte, in denen die Vesikel temporär einen gerichteten Transport erfahren, werden die Endosome entweder zum biochemischen Abbau des Inhalts in Lysosome, oder zum Recycling über Exosome wieder aus der Zelle heraus transportiert. Den gerichteten Transports bewerkstelligen ATP-getriebene Motorproteine (Myosin, Kinesin und Dynein) entlang von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten [58].

Mikroinjektion

Bei Mikroinjektion wird eine Mikropipette mit einer Lösung befüllt, die ins Innere einer Zelle injiziert werden soll. Zur Injektion wird die Mikropipette manuell an eine Zelle herangefahren und anschließend automatisiert so verfahren, dass sie die Plasmamembran einer Zelle durchsticht und durch kurzzeitig erhöhten Druck der Injektionsflüssigkeit ein definiertes Volumen von der Größenordnung eines Femtoliters in das Innere der Zelle injiziert.

3.2 Experimente

Die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen stellen in verschiedenen Aspekten (Oberflächenchemie, Stabilität kolloidaler Nanodiamantenlösungen, Einbringen von Nanodiamanten in lebende Zellen und Single Particle Tracking an einzelnen Nanodiamanten) einzelne Schritte auf dem Weg dar, fluoreszierende Nanodiamanten als Markierung für Proteine in lebenden Zellen zu etablieren.

3.2.1 Oberflächenchemie

Um fluoreszierende Nanodiamanten zur Untersuchung biologischer Fragestellungen als Markierung für Proteine heranziehen zu können, müssen die Kristallite so funktionalisiert werden, dass sie spezifische Bindungen mit dem gewünschten Protein eingehen. Zur Demonstration einer spezifischen Bindung von Proteinen an Nanodiamanten wurde über Silanlinker Biotin kovalent angebunden [59]. Der tetramere Proteinkomplex Streptavidin, der aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut ist, bindet mit hoher Affinität an Biotin. Dabei besitzt jede der vier Untereinheiten eine Bindungsstelle, d. h. der Streptavidin-Komplex kann vier Biotine binden.

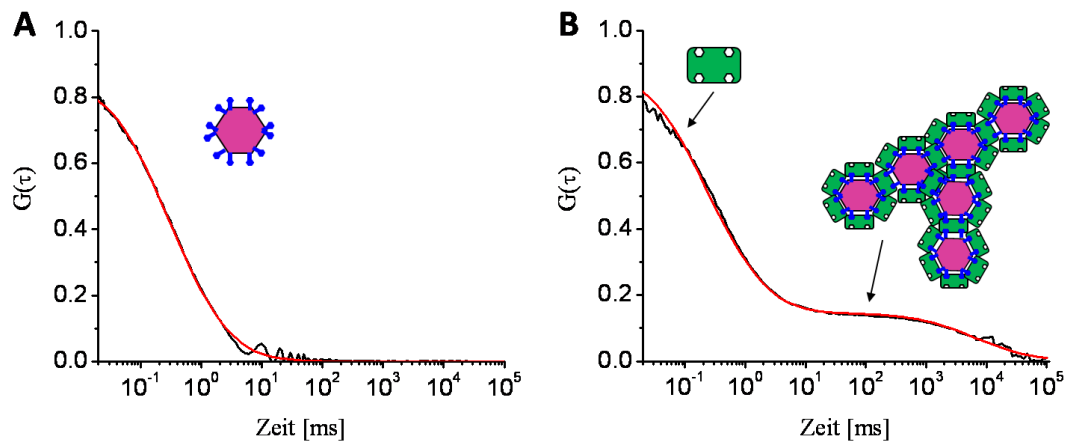


Abbildung 3.7: Biotinylierte Diamanten vernetzt über Streptavidine. A) Autokorrelation der freien Diffusion von Detonationsdiamantenagglomeraten im Streulicht. Aus der Autokorrelation lässt sich ein mittlerer hydrodynamischer Radius von 33 nm ableiten. B) Autokorrelation von Alexa488-markiertem Streptavidin. Es lässt sich eine schnell diffundierende Komponente von freiem Streptavidin erkennen. Die langsame Komponente in der Autokorrelation stammt von Agglomeraten, die durch die Vernetzung der ca. 30 nm großen biotinylierten Detonationsdiamantenagglomeraten über Streptavidin erzeugt werden [60].

Für das im Folgenden beschriebene Experiment wurden biotinylierte, etwa 30 nm große Aggregate von Detonationsdiamanten verwendet. Zur Bindung an diese Diamanten wurde mit dem Farbstoff Alexa 488 markiertes Streptavidin eingesetzt. Der mittlere hydrodynamische Radius der biotinylierten Nanodiamanten wurde zunächst über Streulicht mittels FCS nach Gleichung (2.15) zu 33 nm bestimmt (Abb. 3.7A). Analog wurde für den hydrodynamische Radius von Streptavidin ein Wert von 3 nm über die Fluoreszenz der Alexa 488-Markierung ermittelt. Nach Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin war zu beobachten, dass in der Autokorrelationsfunktion neben der Diffusion von freiem Streptavidin eine langsamer diffundierende Komponente zu beobachten ist.

Über die vier hochaffinen Bindungsstellen für Biotin kommt es zur Vernetzung der 30 nm großen Detonationsdiamantaggregate über das Streptavidin und damit zur Ausbildung von großen Agglomeraten. Aus der Diffusionskonstante der langsam diffundierenden Komponente lässt sich ableiten, dass der hydrodynamische Radius dieser Agglomerate um 2 bis 3 Größenordnungen über dem der einzelnen Detonationsdiamantaggregate liegt (Abb. 3.7B).

Die Anzahl der Detonationsdiamantaggregate, die ein solches Agglomerat bilden, liegt maximal (bei dichtester Packung) bei $10^6 - 10^9$. Aufgrund von Beobachtungen im Lichtmikroskop lässt sich bei den Agglomeraten von einigen μm Größe eher von vernetzten als von dicht gepackten Teilchen ausgehen. Zur Bildung von Agglomeraten dieser Größe reicht dann eine deutlich geringere Zahl von Teilchen aus (ca. $10^4 - 10^6$).

Somit konnte die Anbindung von Proteinen in Form von Streptavidin an Nanodiamanten über eine biotinylierte Oberfläche demonstriert werden.

3.2.2 Überprüfung der Stabilität von kolloidalen wässrigen Nanodiamantenlösungen

In vielen Fällen zeigt sich die Instabilität einer kolloidalen Lösung von Nanodiamanten in Wasser oder in einer Pufferlösung im Ausfallen der Kristallite. Dies kann sich aber abhängig von Konzentration und Beschaffenheit der Nanodiamanten in der Probe auf sehr unterschiedlichen Zeitskalen ereignen. Darüber hinaus ist zu beachten, dass das Aggregationsverhalten der einzelnen Kristallite, das zum Ausfallen der Nanodiamanten führt, stark von Kristallit zu Kristallit variieren kann. Das Aggregationsverhalten ist dabei abhängig von Form, Größe und insbesondere der Ladungsdichte, die jeweils sta-

tistisch verteilt sind. In vielen Fällen lassen sich stabile kolloidale Lösungen gewinnen, indem der Überstand nach Sedimentation (1-3 Tage) verwendet wird.

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden vermahlene Diamanten mit einer mittleren Größe von 50 nm nach der Behandlung mit stark oxidierenden, kochenden Säuren (1:1:1-Gemisch von konz. Salpeter-, Schwefel- und Perchlorsäure) verwendet [61]. Um den mittleren hydrodynamischen Radius der diffundierenden Teilchen zu bestimmen, wurden FCS-Messungen durchgeführt. Bei Proben, die stabil in Lösung vorlagen, ließ sich die entsprechende Autokorrelation der Fluoreszenzzeitspur gut mit der Diffusion von Teilchen mit einem hydrodynamischen Radius von 40 – 60 nm annähern werden. Dieser kann als mittlerer hydrodynamischer Radius der Kristallite angenommen werden.

Die Stabilität der kolloidalen Lösung wurde für pH-Werte im Bereich zwischen 5,7 und 8 mit Hilfe eines 10 mM Phosphatpuffers überprüft, da in diesem pH-Bereich der Großteil der physiologisch relevanten Untersuchungen durchgeführt wird. Es ist zu beachten, dass die Zugabe des Phosphatpuffers nicht nur über den pH-Wert die Probe beeinflusst, sondern auch eine 10 mM Konzentration der zugesetzten Ionen mit sich bringt. Bei Proben von säurebehandelten Nanodiamanten, die im destillierten Wasser dauerhaft als stabile kolloidale Lösung vorlagen, wurde im betrachteten pH-Bereich keine signifikante Veränderung des aus FCS-Messungen bestimmten hydrodynamischen Radius und der Konzentration der diffundierenden Teilchen beobachtet (siehe Abb. 3.8 A).

Analog hierzu wurde einer kolloidalen Nanodiamantenlösung Kochsalz in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt. Für eine NaCl-Konzentration unterhalb von 10 mM lässt sich auch hier aus der Autokorrelation keine Veränderung des hydrodynamischen Radius der diffundierenden Teilchen beobachten. Bei Salzkonzentrationen von mehr als 20 mM verlangsamt sich die Diffusion, da der hydrodynamische Radius der diffundierenden Teilchen auf Grund von beginnender Agglomeration bzw. Aggregation ansteigt. (siehe Abb. 3.8 B). Offensichtlich reicht die Ladungsdichte der Nanodiamantenoberfläche, die von dissoziierten Carboxylgruppen ausgeht, in diesem Salzkonzentrationsbereich nicht mehr aus, um Agglomeration und Aggregation zu verhindern.

Da in physiologischen Pufferlösungen die Ionenkonzentrationen in der Regel bei mindestens 100 mM liegen, ist es aber wichtig, die Stabilität der kolloidalen Lösung auch in diesem Salzkonzentrationsbereich noch zu gewährleisten.

Alleine durch das verwendete Protokoll zur Säurebehandlung konnte keine so hohe Ladungsdichte an der Oberfläche von Nanodiamanten erzeugt werden, dass diese auch in 100 mM Kochsalzlösung noch in stabiler kolloidaler Lösung vorliegen würden.

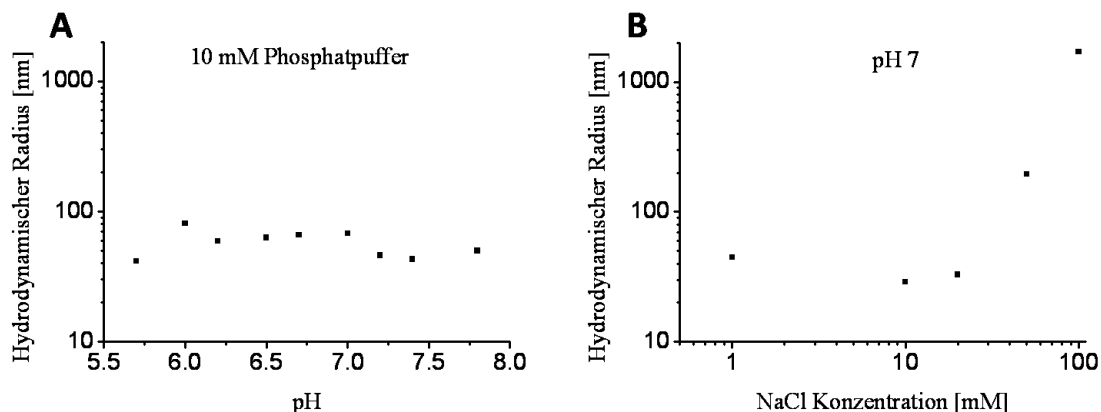


Abbildung 3.8: A) Im pH-Bereich zwischen 5,7 und 8 liegen säurebehandelte Nanodiamanten in einer 10 mM Phosphatpufferlösung als stabile kolloidale Lösung vor. Der mittlere hydrodynamische Radius, der anhand von Autokorrelationsmessungen bestimmt wurde, liegt hier bei allen Messungen um 50 nm. B) Abhängigkeit der Stabilität von säurebehandelten Nanodiamanten in kolloidaler Lösung von der NaCl-Konzentration. Der mittels FCS bestimmte hydrodynamische Radius nimmt bei Konzentrationen von mehr als 20 mM rapide zu.

Es ist somit notwendig, alternativ zur durchgeführten Säurebehandlung ein Protokoll zur Behandlung von Nanodiamanten zu entwickeln, die zu einer weiteren Erhöhung der Ladungsdichte an der Oberfläche der Kristallite führt. Ein alternativer Ansatz die Stabilisierung der kolloidaler Lösung zu erreichen, besteht in der Anbindung von Polymeren an die Oberfläche der Kolloide.

3.2.3 Nanodiamanten in lebenden Zellen

Endozytose

Zur Untersuchung der Internalisierung von Nanodiamanten über Endozytose wurden säurebehandelte vermahlene Nanodiamanten mit einer durchschnittlichen Größe von 40 nm und im Mittel drei NV-Zentren pro Kristallit verwendet, die bei 20 mM Kochsalzkonzentrationen noch in stabiler kolloidaler Lösung vorliegen. Diese wurden dem Zellmedium in einer Petrischale mit eingeklebtem Deckglas zugegeben, auf dem sich adhären HeLa-Zellen befanden. HeLa-Zellen sind Krebszellen (Gebärmutterhalskrebs) und werden in der Zellbiologie weit verbreitet zu Untersuchungen an Humanzellen genutzt. Der Name dieser Zelllinie leitet sich von Henrietta Lacks ab, einer Frau, der 1951

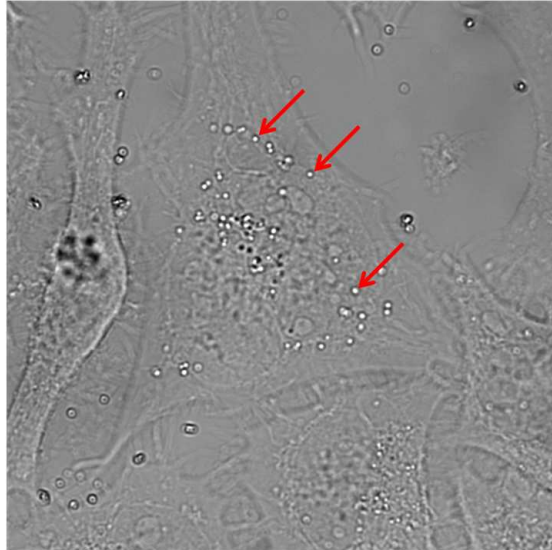


Abbildung 3.9: Mikroskopaufnahme im Durchlicht (Weitfeld) von lebenden HeLa-Zellen, die eine größere Anzahl Nanodiamanten (ca. 40 nm Durchmesser) über Endozytose aufgenommen haben. Die Nanodiamanten sind als stark streuende Punkte im Bild zu erkennen (rote Pfeile).

Gewebe von einem Tumor entnommen wurde, diese Probe wurde seitdem kultiviert und verbreitete sich über Laboratorien der ganzen Welt. Da die verwendeten Kristallite im physiologischen Puffer mit der Zeit aggregieren würden, müssen die Diamanten in geringer Konzentration zugegeben werden. So wird erreicht, dass die Nanodiamanten mit hoher Wahrscheinlichkeit zunächst mit einer Zelle interagieren, bevor sie in enge Wechselwirkung mit einem zweiten Kristalliten treten können.

Belässt man nach Zugabe der Diamanten die Petrischale für drei Stunden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ (ideale Bedingungen für HeLa-Zellen), kann man die Aufnahme von Diamanten über Endozytose in die Zelle beobachten. Abbildung 3.9 zeigt die mikroskopische Aufnahme von solchen Zellen im Durchlicht. Die stark streuenden Punkte, die sich im Bild erkennen lassen, stammen von Diamanten. Auf Grund der geringen Auflösung in axialer Richtung lässt sich hier allerdings nicht zweifelsfrei sagen, ob sich diese Kristallite an der Oberfläche oder im Inneren der Zelle befinden. Um die Kristallite eindeutig innerhalb der Zelle lokalisieren zu können, ist wegen der erhöhten axialen Auflösung die Verwendung eines konfokalen Mikroskops sinnvoll. Zur Lokalisation der Diamanten bezogen auf die Plasmamembran wurden die Plasmamembranen der Zellen unmittelbar vor der mikroskopischen Untersuchung mit einem grünen Fluoreszenzmarker (Wheat Germ Agglutinin Conjugate mit Tetramethylrhodamin-Markierung)

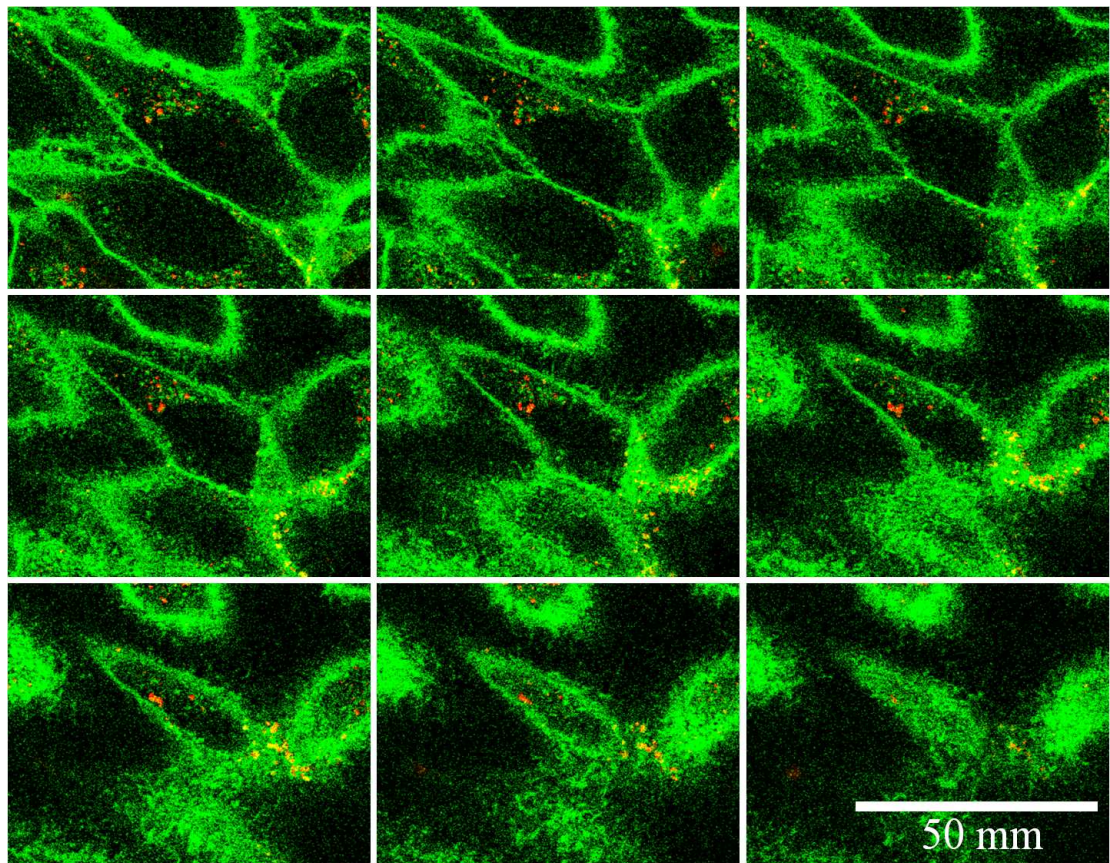


Abbildung 3.10: Konfokale Schnitte durch mehrere HeLa-Zellen, die Schnitte liegen axial jeweils $0,47 \mu\text{m}$ auseinander. Das reflektierte Licht der Nanodiamanten ist in Rot dargestellt, die Fluoreszenz der Plasmamembran ist in Grün dargestellt. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica DM IRBE-Mikroskop aufgenommen.

eingefärbt. Die etwa 40 nm großen Diamanten wurden über ihre Lichtstreuung, die bei 40 nm großen Kristalliten mit einzelnen NV-Zentren höhere Signalintensität und besseren Kontrast bietet als die Fluoreszenz, sichtbar gemacht. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica DM IRBE) erstellt.

Abb. 3.10 zeigt mehrere Schnitte durch HeLa-Zellen. In Grün ist die Plasmamembran dargestellt, die Reflektion der Diamanten ist in Rot auf den Abbildungen zu erkennen. Es lässt sich beobachten, dass nach der dreistündigen Inkubationszeit etwa 60% der Diamanten mit der Zelle interagieren. Ein Großteil dieser Kristallite haftet an den Plasmamembranen der Zellen an, etwa 10% dieser Diamanten werden internalisiert. Diese lassen sich in Schnitten auf mittlerer Höhe durch die Zelle eindeutig innerhalb der Plas-

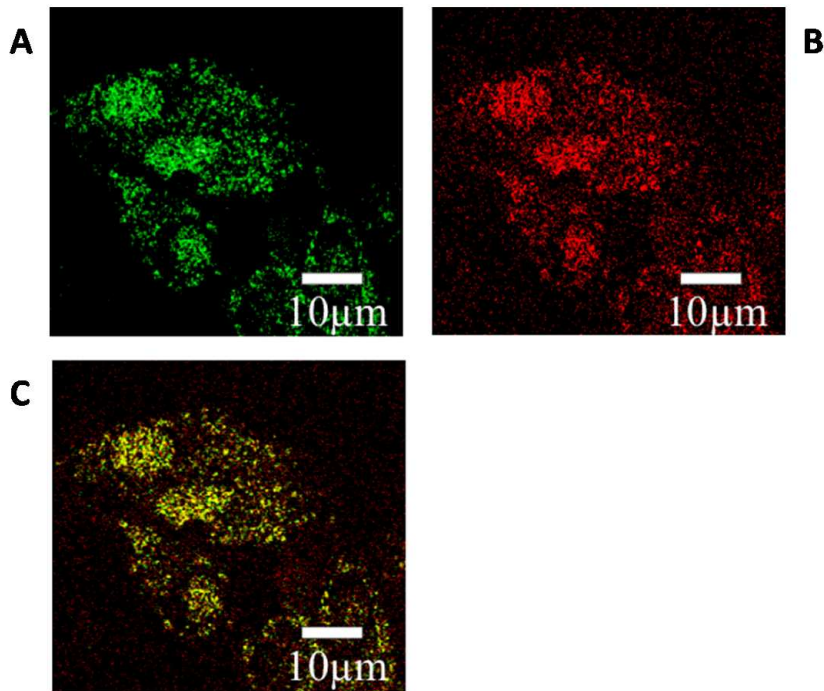


Abbildung 3.11: Konfokale Aufnahmen von Nanodiamanten in lebenden Zellen; die Nanodiamanten wurden über Mikroinjektion in die Zellen eingebracht. Sowohl Reflektion als auch Fluoreszenz können zur Lokalisierung der Kristallite genutzt werden: A) In Grün ist das gestreute Anregungslicht dargestellt, B) in Rot die Fluoreszenz der NV-Zentren. C) Im dritten Bild ist die Überlagerung von Streulicht und Fluoreszenz abgebildet. Die Aufnahmen wurden mit einem Leica DM IRBE-Mikroskop aufgenommen.

mamembran lokalisieren. Die Aufnahme der Kristallite in die Zelle fand über Endozytose statt [60].

Mikroinjektion

Alternativ zur Endozytose wurden Proben der gleichen Nanodiamanten auch über Mikroinjektion mittels einer Mikropipette (Eppendorf, Femtotip II, Innendurchmesser $0,5 \mu\text{m}$, Außendurchmesser $0,7 \mu\text{m}$) in lebende Zellen eingebracht. Da eine kolloidale Nanodiamantenlösung, die in physiologischer Pufferlösung nicht stabil ist, sehr schnell Aggregate bildet, die die Injektionsspitze verstopfen, muss die Mikropipette mit einer Lösung mit geringerer Ionenkonzentration als im Zellinneren befüllt werden. Durch einen konstanten Fluss von Nanodiamantenlösung aus der Injektionsspitze kann gewährleistet werden,

dass auch beim Austritt keine Aggregation oder Anhaftung von Diamanten an das Glas der Mikropipette den Durchfluss aus der Injektionsspitze behindert.

Für die Injektion wurde eine kolloidale Lösung von säurebehandelten Nanodiamanten mit einer durchschnittlichen Größe von 35 nm und im Mittel drei NV-Zentren pro Kristallit verwendet. Diese können mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica DM IRBE) über reflektiertes Licht detektiert werden (Abb. 3.11 A). Analog können die Nanodiamanten auch über die Fluoreszenz der NV-Zentren lokalisiert werden (Abb. 3.11 B). Um die Fluoreszenz einzelner Nanodiamanten signifikant vom Untergrund zu unterscheiden, war hierbei allerdings eine deutlich höhere Mittelungszeit bei der Datenaufnahme notwendig. Für die Aufnahme des reflektierten Lichts wurde eine Aufnahmezeit von $10 \mu\text{s}$ pro Pixel verwendet, für die Aufnahme der Fluoreszenz war auf Grund der niedrigeren Signalintensität eine Aufnahmezeit von $600 \mu\text{s}$ pro Pixel notwendig.

Abbildung 3.11 C zeigt die Überlagerung von Fluoreszenz und Reflexion. Anhand dieser Bilder kann gezeigt werden, dass beide Detektionsmöglichkeiten Nanodiamanten gleichermaßen lokalisieren können [60].

Anhand der durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass Diamanten sowohl über Endozytose als auch über Mikroinjektion in Zellen eingebracht werden können. Diese können, wenn sie NV-Zentren besitzen, über ihre Fluoreszenz oder – ab einer Größe von 20 nm – im konfokalen Mikroskop über das an den Kristalliten gestreute Licht lokalisiert werden.

3.2.4 Single Particle Tracking von fluoreszierenden Nanodiamanten

Single Particle Tracking in Glycerin

Zur Demonstration von Single Particle Tracking wurde zunächst die Diffusion an im Mittel 40 nm großen Nanodiamanten mit einzelnen NV-Zentren in Glycerin beobachtet. Hierzu wurde ein Bereich von ca. $10 \mu\text{m}$ mit einem gaussförmigen Anregungsprofil bei einer Leistung von 100 mW bei der Wellenlänge 514 nm angeregt. Somit ist die Leistungsdichte vergleichbar zu einer konfokalen Anregungsleistung von $100 \mu\text{W}$ (Siehe Abb. 2.9). Der beleuchtete Bereich wurde auf eine EMCCD-Kamera (Cascade) abgebildet. Es wurden Filme von im Glycerin diffundierenden fluoreszierenden Nanodiamanten über mehrere Minuten erstellt und mit Hilfe des Programms ImageJ mit dem Plugin MTrack2 analysiert. Zunächst werden die Bilder in Schwarz-Weiß Bilder konvertiert. MTrack2 berechnet in jedem Bild für zusammenhängende Flächen, in denen NV-Fluoreszenz de-

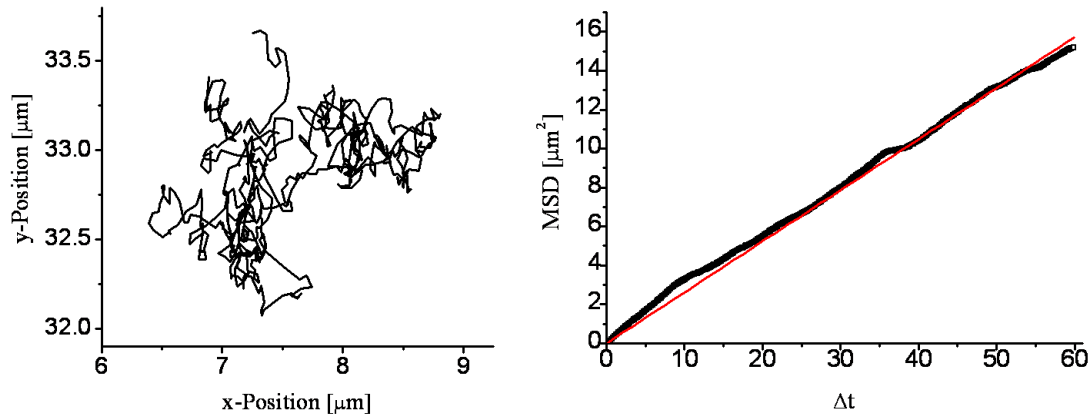


Abbildung 3.12: A) Trajektorie eines fluoreszierenden Nanodiamanten in Glycerin. (B) Mean Square Displacement des Diamanten aus Abbildung 3.12. Anhand des MSD kann eine Diffusionskonstante von $D = 2,6 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ berechnet werden. Der hydrodynamische Radius des Diamanten beträgt 21 nm.

tektiert wurde, den Schwerpunkt. Anhand der Lokalisation zu jedem Zeitschritt wird die Trajektorie der Teilchen berechnet.

Abbildung 3.12 zeigt die so berechnete Trajektorie. Anhand der zweidimensionalen Projektion der Trajektorie wurde ein MSD-Plot erstellt. Der MSD-Plot lässt sich gut mit dem Modell für freie dreidimensionale Diffusion annähern. Für die Diffusionskonstante erhält man so einen Wert von $2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, der hydrodynamische Radius des hier beobachteten Kristallits beträgt somit 21 nm.

Single Particle Tracking in lebenden Zellen

Single Particle Tracking von Nanodiamanten in lebenden Zellen wurden an Zellen demonstriert, die die im Mittel 40 nm großen Kristallite über Endozytose aufgenommen hatten. Zur Lokalisierung der Nanodiamanten wurde nicht die Fluoreszenz von NV-Zentren, sondern das an Diamanten gestreute Anregungslicht detektiert. Aufgrund der höheren Signalintensität und des guten Kontrastes im Vergleich zur Fluoreszenz einzelner NV-Zentren ermöglicht dies eine deutlich höhere Bildwiederholungsrate (ca. ein Bild pro Sekunde). Zur Analyse der Bewegung von Nanodiamanten wurden Serien von 100 Bildern mit einem zeitlichen Abstand von jeweils 1,61 Sekunden aufgenommen.

Die Trajektorien, die wie im vorigen Abschnitt beschrieben berechnet wurden, weisen deutliche Abweichung von freier Diffusion auf. Ein Großteil der berechneten Trajektorien

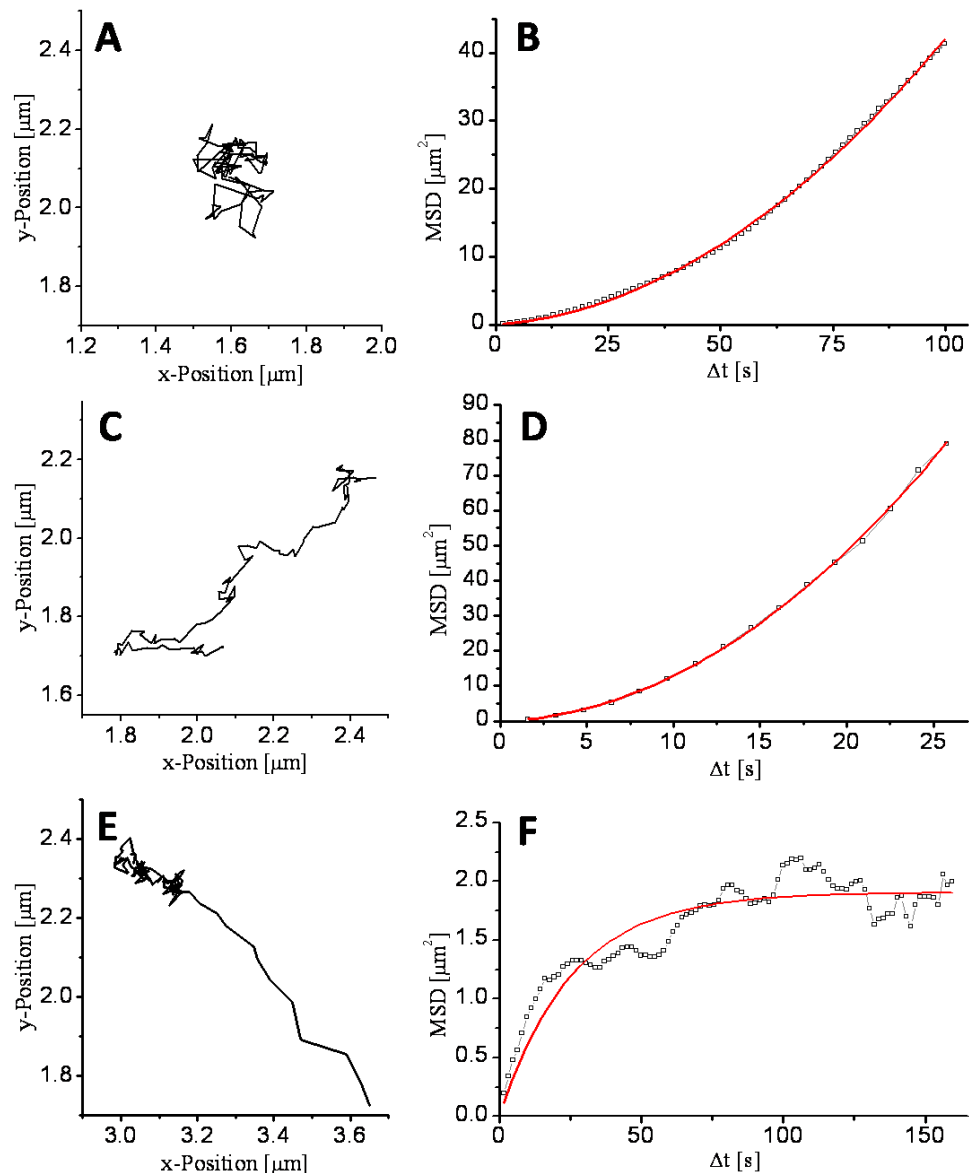


Abbildung 3.13: A), C), E) Trajektorie über Endozytose aufgenommener Diamanten in einer HeLa-Zelle. B) MSD-Plot zu Trajektorie A, die Kurve wurde mit dem Modell für eingeschränkte Diffusion (2.9) angepasst. Für den Radius der Projektionsfläche ergibt sich ein Wert von $1,3 \mu\text{m}$, für die Komponenten der freien Diffusion ergibt sich eine Diffusionskonstante von $D = 1,9 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. D) MSD-Plot zu Trajektorie C, diese lässt sich mit dem Modell für gerichteten Transport (2.10) anpassen. Für die Geschwindigkeit des Transports ergibt sich ein Wert von $0,06 \mu\text{ms}^{-1}$, für die Komponente der freien Diffusion ergibt sich eine Diffusionskonstante von $D = 1,2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. F) MSD-Plot der letzten halben Minute zur Trajektorie E. Diese lässt sich mit dem Modell für gerichteten Transport (2.10) anpassen. Für die Geschwindigkeit des Transports ergibt sich ein Wert von $0,3 \mu\text{ms}^{-1}$, für die Komponenten der freien Diffusion ergibt sich eine Diffusionskonstante von $D = 3,6 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$.

lässt sich gut mit dem Modell der eingeschränkten Diffusion annähern. Abb. 3.13 A zeigt beispielhaft eine solche Trajektorie. Für den Durchmesser des Bereichs, in dem der Kristallit diffundiert, erhält man nach (2.9) einen Wert von $1,3\ \mu\text{m}$, und für die Komponente der freien Diffusion $D = 1,9 \cdot 10^{-10}\ \text{cm}^2\text{s}^{-1}$ (siehe Abb. 3.13 B).

Bei einige beobachteten Trajektorien (siehe Abb. 3.13 C), legen die Kristallite eine Strecke entlang einer Geraden zurück. Der MSD-Plot dieser Trajektorien lässt sich mit dem Modell für gerichteten Transport annähern (Abb. 3.13 D). Da Endosome entlang von Aktinfilamenten bzw. Mikrotubuli gerichteten Transport erfahren können, ist diese Beobachtung gut mit den biologischen Modellen zur Endozytose in Einklang zu bringen. Für die Geschwindigkeit des gerichteten Transports erhält man hier nach (2.10) einen Wert von $0,06\ \mu\text{ms}^{-1}$ und für die Komponente der freien Diffusion $D = 1,2 \cdot 10^{-10}\ \text{cm}^2\text{s}^{-1}$.

In Abbildung 3.13 E ist die Trajektorie eines Nanodiamanten abgebildet, der in den ersten zwei Minuten der Aufnahme eingeschränkte Diffusion an einem Ort zeigt und in den letzten 25 Sekunden der Beobachtungszeit einen gerichteten Transport erfährt. Der dazu abgebildete MSD-Plot 3.13 F zeigt den gerichteten Transport der letzten 25 Sekunden. Die Geschwindigkeit des hier beobachteten Transports lag bei $0,3\ \mu\text{ms}^{-1}$, die Diffusionskonstante zur Komponente der freien Diffusion betrug $D = 3,6 \cdot 10^{-10}\ \text{cm}^2\text{s}^{-1}$.

Die Dynamik verschiedener endosomaler Prozesse wurden bereits in verschiedenen Experimenten untersucht [62, 63]. Typische Geschwindigkeiten für gerichteten Transport von Endosomen liegen in der Größenordnung $0,1 - 1\ \mu\text{ms}^{-1}$. Für den Transport entlang von Aktinfilamenten durch Myosin werden z. B. Geschwindigkeitsverteilungen mit einer durchschnittliche Geschwindigkeiten von $0,2\ \mu\text{ms}^{-1}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $1\ \mu\text{ms}^{-1}$ beobachtet, die Komponente für die freie Diffusion lag hier bei $D = 0,5 \cdot 10^{-10}\ \text{cm}^2\text{s}^{-1}$ [64].

Die beobachteten Transportgeschwindigkeiten liegen in dem Geschwindigkeitsbereich, der auch für andere endosomale Prozesse berichtet wird. Die Diffusionskonstante der Komponente der freien Diffusion ist der Größe nach vergleichbar der freien Diffusionskomponente, die in [64] genannt wird. Die freie Diffusion eines Nanodiamanten im Zytoplasma würde eine um mehrere Größenordnungen höhere Diffusionskonstante aufweisen. Der Radius der eingeschränkten Diffusion lässt sich als Bereich der Zelle interpretieren, in dem das Endosom im Zytoplasma weitgehend frei diffundieren kann, ohne dabei durch Membranen oder andere Strukturen behindert zu werden.

Es wurde somit demonstriert, dass Nanodiamanten als mögliche Markierung für Single Particle Tracking-Experimente geeignet sind.

3.3 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Experimente mit der Zielsetzung durchgeführt, Nanodiamanten mit fluoreszierenden NV-Zentren als Fluoreszenzmarkierung in lebenden Zellen nutzbar zu machen. Hierbei wurden zunächst Untersuchungen an Nanodiamanten mit funktionalisierter Oberfläche durchgeführt. Es konnte mit Hilfe von FCS-Experimenten gezeigt werden, dass biotinylierte Nanodiamanten [59] Streptavidin binden. Dabei kommt es über die vier Biotin-Bindungsstellen am Streptavidin-Komplex zur Vernetzung von mehreren Kristalliten [60]. Somit wurde das spezifische Anbinden eines Proteins (Streptavidin) an Nanodiamanten demonstriert.

Die Behandlung von Nanodiamanten mit stark oxidierenden Säuren führt zur Ausbildung von Carboxylgruppen an der Oberfläche der Kristallite [65, 61]. Untersuchungen zur Stabilität säurebehandelter Nanodiamanten in kolloidaler Lösung wurden in Abhängigkeit des pH-Werts und der Kochsalzkonzentration der Lösung durchgeführt. Für die nach dem Protokoll aus [61] behandelten Kristallite wurde im 10 mM Puffer im pH-Wert-Bereich von 5,7 – 8 keine Veränderung der Stabilität der kolloidalen Lösung beobachtet. Bei Kochsalzkonzentrationen bis zu 20 mM war bei einem pH-Wert von 7 die kolloidale Lösung ebenfalls stabil. Bei Kochsalzkonzentration von 50 mM und höher wurde dagegen das Agglomerieren und Aggregieren der Kristallite beobachtet.

Bei Nanodiamanten, die ausschließlich durch Behandlung mit stark oxidierenden Säuren mit Carboxylgruppen funktionalisiert wurden, konnte bei keinem der verwendeten Protokolle [65, 61] eine stabile kolloidale Lösung in physiologischen Pufferlösungen erreicht werden. Anhand von Nanodiamanten, die in hoher Dichte mit Benzoesäuregruppen funktionalisiert wurden [66], war eine höhere Stabilität im Phosphatpuffer zu beobachten. Diese zeigen im Zeitraum von Tagen in geringem Maße Agglomeration, die Agglomerate können allerdings bereits durch Ultraschall wieder aufgelöst werden [66]. Der alternative Ansatz, Polymere zur Stabilisierung der kolloidalen Lösung an die Oberfläche der Kristallite anzubinden, wird derzeit ebenfalls verfolgt [67].

Zur Nutzung von Nanodiamanten als Markierung in lebenden Zellen müssen die Kristallite in Zellen eingebracht werden. Hierzu wurden Experimente durchgeführt, die sowohl das Aufnehmen von Nanodiamanten über Endozytose als auch das Einbringen von Kristalliten via Mikroinjektion demonstrierten.

Beim Einbringen von Nanodiamanten via Endozytose liegen die Kristallite mit einer Membranhülle vor. In der Regel können so aufgenommene Kristallite nicht als spezifische Markierung dienen, da die Membran eine Interaktion einer funktionellen

Gruppe an der Oberfläche des Kristalliten mit einem Protein außerhalb des Endosoms verhindert. Mittels Mikroinjektion kann nur eine relativ kleine Zahl von Zellen mit Diamanten, die frei im Zytoplasma diffundieren können, versorgt werden. Ein Flüssigkeitsvolumen mittels Mikroinjektion in Zellen einzubringen stellt darüber hinaus einen relativ hohen Aufwand dar.

Ein alternativer Ansatz, Partikel durch die Plasmamembran in das Innere einer Zelle einzubringen und dort als Markierung von bestimmten Proteinen zu nutzen, besteht darin, sogenannte Carrier-Peptide zu verwenden [68]. Durch Ummantelung mit geeigneten Proteinen werden diese Partikel ohne das Einkapseln in einem Vesikel durch die Membran geschleust. Ebenso wie bei Mikroinjektion liegen diese dann frei im Zytoplasma vor. Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche durchgeführt. Bei Nanodiamanten, die im Rahmen dieser Versuche von Zellen aufgenommen wurden, konnte allerdings nicht bestimmt werden, ob diese Aufnahme aufgrund der Carrier-Peptide oder über Endozytose stattgefunden hatte.

Zur Demonstration von Single Particle Tracking an Nanodiamanten wurden Nanodiamanten mit einer durchschnittlichen Größe von 40 nm und im Mittel drei NV-Zentren pro Kristallit in Glycerin auf einer Fläche mit einem Durchmesser von 10 μm mit Licht der Wellenlänge 514 nm zum Fluoreszieren angeregt. Die Fluoreszenz wurde mit einer Cascade-Kamera detektiert. Anhand der Aufnahmen wurden Trajektorien berechnet und ein MSD-Plot erstellt. Auf diese Weise wurde die freie Diffusion der Kristallite in Glycerin nachgewiesen.

Single Particle Tracking in lebenden Zellen wurde an Zellen demonstriert, die 40 nm große Nanodiamanten über Endozytose aufgenommen hatten. Hierzu wurde ein kommerzielles konfokales Laserscanning-Mikroskop (Leica DM IRBE) verwendet. Zur Lokalisierung der Nanodiamanten wurde das an den Kristalliten gestreute Licht genutzt. Anhand der Trajektorien und der daraus berechneten MSD-Plots konnte für einen großen Teil der Nanodiamanten eingeschränkte Diffusion, für einen kleineren Teil ein gerichteter Transport aufgezeigt werden. Die beobachteten Trajektorien lassen sich gut mit der Beobachtung der Diffusion der Endosome, die die Kristallite aufgenommen haben, interpretieren.

Es wurde somit übereinstimmend mit [65] gezeigt, dass Nanodiamanten mit NV-Zentren über Ihre Fluoreszenz und ab einer ausreichenden Größe (< 20 nm Durchmesser) über das an ihnen gestreute Licht für Single Particle Tracking zugänglich sind.

3 Nanodiamanten mit Nitrogen-Vacancy-Zentren

Wie beschrieben, konnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente verschiedene Beiträge im Hinblick auf das Ziel liefern, fluoreszierende Nanodiamanten als Markierung für Proteine in lebenden Zellen zu etablieren. Nach wie vor sind in Bereichen der Oberflächenchemie und der Stabilisierung von Kristalliten in kolloidaler Lösung weitere Fortschritte im Bezug auf dieses Ziel notwendig. Im Bezug auf Größe und Fluoreszenzintensität sind fluoreszierende Nanodiamanten bereits vergleichbar mit anderen Fluoreszenzmarkierungsmöglichkeiten wie Quantendots.

Die kleinsten durch Vermahlung produzierten Nanodiamanten, in denen NV-Zentren nachgewiesen wurden, haben einen Durchmesser von 7 nm. Bei der Probe mit der derzeit höchsten Dichte von NV-Zentren befindet sich in einem 20 nm großen Kristallit im Mittel ein NV-Zentrum [69]. Erst kürzlich konnten erstmals in Detonationsdiamanten mit 5 nm Durchmesser ebenfalls NV-Zentren nachgewiesen werden [54]. Theoretische Betrachtungen [53] haben ergeben, dass bei Nanodiamanten mit zu geringem Durchmesser Stickstoffdefektstellen aus dem Kristallit heraus an seine Oberfläche migrieren. Diese Berechnungen wurden für 2,3 nm große Nanodiamanten durchgeführt. Bei Berücksichtigung dieser Berechnungen als untere Grenze von Nanodiamanten mit NV-Zentren ist also davon auszugehen, dass die Minimierung der Größe von Nanodiamanten mit NV-Zentren limitiert ist und dass die Kristallite eine Mindestgröße zwischen 2,3 nm und 7 nm aufweisen müssen.

Durch eine einfache Erhöhung der Dosis bei der Bestrahlung zur Erzeugung von Defektstellen im Diamanten ist keine wesentliche Erhöhung der Dichte der NV-Zentren zu erwarten, da so der Kristallit aufgrund der wachsenden Leerstellendichte zu graphitisieren beginnt [55]. Mit Hilfe einer Versuchsanordnung, die das Ausheizen der Nanodiamanten zeitgleich mit der Bestrahlung durchführt, könnte es möglich sein, die Dichte der NV-Zentren weiter zu erhöhen. Die erzeugten Leerstellen migrieren dann während der Bestrahlung. Leerstellen, die nicht Teil eines stabilen NV-Zentrums werden, diffundieren an die Oberfläche des Kristalliten und aus dem Kristall heraus. Somit kann die Dichte der Leerstellen im Gitter niedrig gehalten werden und es kann prinzipiell solange bestrahlt werden, bis jedes Stickstoffatom zum Teil eines NV-Zentrums geworden ist. Bei 1000 ppm Stickstoffatomen im Gitter bedeutet dies, dass ein 5 nm großer Kristallit im Mittel bereits 25 NV-Zentren enthalten würde. Ein solcher Kristallit wäre im Vergleich zu einem Quantendot deutlich kleiner und würde eine um etwa eine Größenordnung höhere Fluoreszenzintensität aufweisen.

In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe verschiedener Anwendungen von Nanopartikeln in der Zellbiologie etabliert. Metallische Nanopartikel (in der Regel aus Gold, Silber oder Kupfer) zeigen Plasmonenresonanz bei Anregung mit geeigneter optischer Wellenlänge. Die Anregung solcher Resonanz kann zur lokalen Erwärmung in Zellen bzw. im Gewebe (photothermal therapy) oder zur optischen Detektion über die starke Absorption im Dunkelfeldmikroskop genutzt werden. Magnetische Nanopartikel kommen als Kontrastmittel im Gewebe bei der Magnetresonanztomographie zum Einsatz. In Zellen finden sie Verwendung bei der Manipulation von angebondenen Biomolekülen über äußere Magnetfelder. Quantendots sind etablierte Fluoreszenzmarker für Biomoleküle. Es wird außerdem der Ansatz verfolgt, Nanopartikel zum Medikamententransport in Zellen zu nutzen. Hierzu müssen die Nanopartikel über spezifische Oberflächenmodifikationen an die gewünschten Zellen adressiert werden und dort das gewünschte Medikament zum Einsatz bringen [70].

Quantendots sind als nicht bleichende Fluoreszenzmarkierung, insbesondere zu Langzeitbeobachtungen und Single Particle Tracking, in der Zellbiologie bereits weit verbreitet [71]. Da die Wellenlänge der Fluoreszenz im Quantendot nur vom Material und der Größe abhängt, ist der Durchmesser des Halbleiterkerns vorgegeben. Dieser beträgt typischerweise nur wenige Nanometer. Auf Grund der Zytotoxizität, zur Verhinderung von Oxidation und zur Stabilisierung von Quantendots in kolloidaler Lösung muss dieser Kern allerdings ummantelt werden. Hierzu wird der Kern in der Regel mit einer Schicht von Zinksulfid überzogen, auf die anschließend Polymere angebunden werden. Am Ende resultieren Teilchen, die typischerweise einen hydrodynamischen Radius von 20-40 nm aufweisen [72].

Photostabile Markierungen sind erforderlich, wenn man mit Hilfe von Single Particle Tracking das Verhalten bestimmter Proteine in einer Zelle auf Einzelmolekülniveau untersuchen will. Für die Durchführung solcher Experimente kamen in den vergangenen Jahren in der Regel Quantendots zum Einsatz [73]. Verschiedene Arbeiten der letzten Jahre zeigen das große Potential von fluoreszierenden Nanodiamanten als Proteinmarkierung in lebenden Zellen [74, 65, 60]. So wurden dreidimensionale Trajektorien von endozytotisch aufgenommenen Nanodiamanten in lebenden Zellen erstellt [75] und die zugrundeliegenden Endozytosemechanismen bei der Aufnahme von Nanodiamanten untersucht [76, 77]. Langzeituntersuchungen in Zellkulturen, in denen die Zellen über Endozytose Nanodiamanten aufgenommen hatten, zeigten keine Beeinträchtigung der Ausdifferenzierung und Teilung von Zellen [78]. Eine Übersicht zu Anwendungen fluo-

reszierender Nanodiamanten in zellbiologischen und medizinischen Bereichen wird in [79, 80] gegeben.

Das Blinken von Quantendots führt dazu, dass diese zeitlich nicht konstant beobachtbar bleiben. Durch den Einsatz von fluoreszierenden Nanodiamanten zum Single Particle Tracking bleiben Lücken in der Trajektorie aus. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von Nanodiamanten besteht darin, dass bei der Verwendung von Kristalliten mit einer hohen Zahl von Fluoreszenzzentren die Mittelungszeit für ein einzelnes Bild deutlich reduziert und die zeitliche Auflösung der Trajektorie so erhöht werden kann.

Neben der Verwendung von Nanodiamanten mit NV-Zentren als Fluoreszenzmarkierung können diese auch als Spin-Markierung verwendet werden. Hierbei nutzt man die Eigenschaften des Triplettzustands des NV^- mit Spin 1 (siehe Abb. 3.2). Im äußeren Magnetfeld wird die Endartung der Zustände $m_s = \pm 1$ und $m_s = 0$ aufgehoben. Bei der Anregung vom Grundzustand in den angeregten Zustand gilt die Auswahlregel $\Delta m_s = 0$. Da die Übergangswahrscheinlichkeit vom angeregten Zustand 3E mit $m_s = \pm 1$ in den metastabilen, nicht fluoreszierenden Singulettzustand 1A eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt als der Übergang vom Zustand 3E mit $m_s = 0$ nach 1A , lässt sich der Ausgangszustand anhand der Fluoreszenzintensität optisch detektieren. Da sowohl der fluoreszierende Übergang von 3E mit $m_s = 0$ als auch der nicht fluoreszierende Übergang von 1A in den Grundzustand 3A mit $m_s = 0$ stattfinden, befindet sich das NV-Zentrum im Grundzustand meist im Zustand $m_s = 0$. Durch Einstrahlen einer resonanten Mikrowellenfrequenz kann der Übergang von $m_s = 0$ nach $m_s = \pm 1$ induziert werden. Anhand der sinkenden Fluoreszenzrate lässt sich so das Magnetfeld am Ort des NV-Zentrums mittels optisch detektierter magnetischer Resonanz (ODMR) bestimmen. Diese Technik kann genutzt werden, um in inhomogenen Magnetfeldern NV-Zentren mit einer Auflösung von wenigen Nanometer zu detektieren [81] oder um Diamanten als Nanometer große Magnetfeldsonden einzusetzen [82].

4 Untersuchungen von Signaltransduktionsprozessen in der Plasmamembran lebender Zellen

In diesem Kapitel wird zunächst eine kurze Einführung in Signaltransduktionsprozesse und die biologischen Hintergründe der untersuchten Fragestellungen gegeben. Die durchgeführten Experimente an fluoreszierenden Membranproteinen zur Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen werden im Folgenden vorgestellt. Abschließend werden das Potential und die weitere Entwicklung von Untersuchungen membrannaher Prozesse mit Methoden der Einzelmolekülspektroskopie diskutiert.

4.1 Grundlagen

4.1.1 Signaltransduktionsprozesse

Höhere Organismen, wie z. B. der Mensch sind aus einer Vielzahl von Zellen aufgebaut. Dabei stellen die einzelnen Zellen im biochemischen Sinne weitgehend autarke Einheiten dar, die durch eine Plasmamembran von Ihrer Umgebung abgegrenzt sind. Um das lebensnotwendige Zusammenspiel der Zellen eines Organismus zu ermöglichen, muss der Austausch von Informationen zwischen den Zellen gewährleistet sein.

Es gibt eine Vielzahl von äußeren Reizen, die in Form von Hormonen, Neurotransmittern oder auch durch direkte Sinneswahrnehmungen, auf eine Zelle übertragen werden. Diese Reize werden in der Regel über eine Vielzahl von beteiligten Enzymen und anderen Proteinen in mehreren Schritten zunächst ins Zellinnere und weiter bis in den Zellkern geleitet. Solche Prozessfolgen bezeichnet man als Signaltransduktion.

Häufig wird die Signaltransduktion durch die spezifische Bindung eines Botenstoffes an ein membranständiges Protein eingeleitet. Dabei kommt es durch die Bindung im extrazellulären Bereich des Proteins zu einer Konformationsänderung, die sich entweder in den

zytosolischen Teil des Proteins überträgt oder zur Ausbildung eines Rezeptor-Komplexes führt. Die Konformationsänderungen oder die Formierung eines Proteinkomplexes initiieren nun die folgenden Schritte der Signalkaskade [83].

Eine Gruppe von kleineren Proteinen, die die Funktion eines Botenstoffes übernehmen, werden Zytokine genannt. Diese haben die Rolle, Signaltransduktionsprozesse zu initialisieren, die Wachstum und Differenzierung von Zellen regulieren.

Eine Vielzahl von Signaltransduktionsprozessen regulieren Immunreaktionen, entsprechend wird eine große Anzahl von Krankheiten mit Fehlfunktionen in diesen Signaltransduktionsprozessen assoziiert. Das Erlangen eines detaillierten Verständnisses der zu Grunde liegenden Prozesse und der Ursachen von Fehlfunktionen, die mit Krankheitsbildern assoziiert werden, stellen somit wichtige aktuelle Forschungsschwerpunkte in der Zellbiologie und Medizin dar.

Mit etablierten zellbiologischen Methoden [68] lassen sich in Ensemble-Messungen die beteiligten Reaktionspartner und die Bindungsstellen an den Proteinen identifizieren. Protein-Protein-Interaktionen lassen sich mittels Co-Immunpräzipitation nachweisen. Hierzu werden Antikörper auf einem Substrat genutzt, die spezifisch ein bestimmtes Protein binden. Gibt man auf dieses Substrat ein Lysat (Lösung molekularer Bestandteile aufgelöster Zellen) so binden die Proteine bzw. die Komplexe, die dieses Protein beinhalten, an den Antikörper. Durch Zugabe eines weiteren Antikörpers, der spezifisch an ein zweites Protein bindet, lässt sich nun prüfen, ob Komplexe existieren die diese beiden Proteine enthalten.

Zur Untersuchung der Rolle eines bestimmten Proteins in einem Signaltransduktionsprozess lässt sich die Bildung dieses Protein in der Zelle mittels eines Inhibitors unterdrücken. Anhand der Veränderungen in Signaltransduktionsprozessen lassen sich so die Funktionen des fehlenden Proteins identifizieren. Häufig müssen zur Anwendung solcher Methoden allerdings die beteiligten Proteine in unphysiologisch hohen Konzentrationen in den Zellen vorliegen. Diese biochemische Standardverfahren werden auch in [68] ausführlich beschrieben.

Die Bindungskinetik und die Bindungsverhältnisse weisen im Allgemeinen eine Konzentrationsabhängigkeit auf. Um Artefakte auszuschließen, ist die Untersuchung bei physiologischen Konzentrationen anzustreben. Darüber hinaus sind die Diffusionseigenschaften, die Stöchiometrie und die Bindungskinetik in lebenden Zellen nicht direkt mit diesen Methoden untersuchbar. Mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie besteht dagegen die Möglichkeit, diese Größen in lebenden Zellen und bei physiologischen Konzentrationen zu quantifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen der membrannahen Prozesse bei der Initialisierung von Signaltransduktionsprozessen durch Zytokine durchgeführt.

4.1.2 Einzelmolekülspektroskopie an Membranproteinen in der Plasmamembran lebender Zellen

Zur Durchführung von einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen (FFA, FRET) an markierten Proteinen in lebenden Zellen wird ein konfokales Mikroskop zur Minimierung des Detektionsvolumen genutzt. Bei der Diffusion von Membranproteinen in der Plasmamembran adhärenter Zellen handelt es sich um zweidimensionale Diffusion in einer im Raum fluktuierenden Ebene. Da hierdurch räumlich und zeitlich veränderliche Bedingungen für das beobachtete konfokale Volumen herrschen, kommt es zu Abweichungen gegenüber den bisherigen Betrachtungen im Bezug auf die Messung von Größen wie der Diffusionskonstante und der Konzentration der beobachteten Proteine. Zunächst reduziert sich bei geeigneter Positionierung des fokalen Volumens die Anzahl der zellulären Moleküle, die zur Untergrundfluoreszenz beitragen. Weiterhin unterscheiden sich in der Regel die Diffusionskonstanten von Membranproteinen und Molekülen, die sich im Zytosol bewegen um ein bis zwei Größenordnungen, wodurch der zytosolische Fluoreszenzuntergrund in Korrelationsmessungen vom Fluoreszenzsignal der markierten Membranproteine unterscheidbar wird.

Lebende Zellen sind keine starren Gebilde. Der Inhalt des konfokalen Volumens ist somit zeitlich nicht konstant. Fluktuationen, die um Größenordnungen langsamer verlaufen als die Diffusion in der Membran durch das konfokale Volumen, können in der Regel mit Fluktuationen der Membranposition relativ zum fokalen Volumen assoziiert werden. Die Fluoreszenz von Proteinmarkierungen und die Autofluoreszenz der Zelle, die in Membranen stärker ausfällt als im Zytoplasma, tragen gleichermaßen zu diesen Fluktuationen bei. Bei niedrigem Signal-Rausch-Verhältnis kann so die Autokorrelationsfunktion von der Fluktuation der Membran dominiert werden, und die Diffusionskonstante der Proteindiffusion in der Membran lässt sich nicht mehr ableiten. Kreuzkorrelationsexperimente reagieren noch deutlich empfindlicher auf Membranfluktuationen, da nur kolokalisierte Markierungen zum Signal beitragen und die übrigen Fluoreszenzmarkierungen als Teil des Untergrunds zu betrachten sind.

Durch die Verwendung von ACP-Tags in Verbindung mit entsprechenden synthetischen Farbstoffen (siehe Abschnitt 2.4.1) kann im Vergleich zu GFP und dessen Mutanten eine signifikante Verbesserung im Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden. Zum

einen ermöglicht der ACP-Tag die Markierung von Proteinen mit photostabilen Farbstoffen hoher molekularer Helligkeit, zum anderen werden nur Proteine an der Plasmamembran, die einen ACP-Tag tragen, eingefärbt. Intrazelluläre Proteine bleiben unmarkiert und tragen so nicht zum Untergrund bei. Die Verwendung von Fusionsproteinen mit einem ACP-Tag führt somit zu signifikanten Verbesserungen der Messergebnisse insbesondere in Bezug auf Kreuzkorrelationsmessungen.

4.2 TNF-Rezeptor-Komplex

4.2.1 Biologischer Hintergrund

Das Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) wird im Körper des Menschen von aktivierten Immunzellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten produziert, die beide auch als weiße Blutkörperchen bezeichnet werden. Es aktiviert über verschiedene Prozesse Zellen des Immunsystems und kann Apoptose (programmierter Zelltod), die Ausdifferenzierung aktivierter Zellen und die Produktion von weiteren Zytokinen auslösen. Im Organismus kann sich die Ausschüttung von TNF in Form von Fieber oder Entzündungen äußern. Bei Fehlfunktionen in der Regulierung (Überregulierung) kann TNF zu rheumatischen und chronisch entzündlichen Krankheitsbildern führen, während bei Unterregulierung die fehlende Initialisierung der Apoptose die Ausbildung von Tumoren begünstigt [84].

Es gibt mehrere konkurrierende Signalkaskaden mit teilweise gegensätzlichen zellbiologischen Antworten, die aus der Stimulierung von Zellen mit TNF resultieren können. Zum Beispiel kann TNF Signalkaskaden sowohl mit apoptotischer als auch antiapoptotischer Wirkung auslösen. Etablierte biochemische Verfahren [68] eignen sich, um qualitativ die Signalkaskaden und die dabei involvierten Proteine zu identifizieren. Die Faktoren, die den Verlauf der Signalkaskade in einer Zelle regulieren, lassen sich so allerdings nur unzureichend, meist bei unphysiologisch hohen Konzentrationen der beteiligten Proteine und nicht direkt in lebenden Zellen, bestimmen. Abbildung 4.1 zeigt schematisch verschiedene Signalwege, bei denen unterschiedliche Proteine an der Signalkaskade beteiligt sind. Um diese Faktoren in lebenden Zellen bei physiologischen Konzentrationen und auf Einzelmolekülniveau zu bestimmen, können einzelmolekülspektroskopische Methoden eingesetzt werden. Ein detailliertes Verständnis der Regulierung konkurrierender Signalwege ist zum besseren Grundlagenverständnis vieler Krankheiten notwendig, bei denen diese Regulierungsmechanismen nicht fehlerfrei verlaufen.

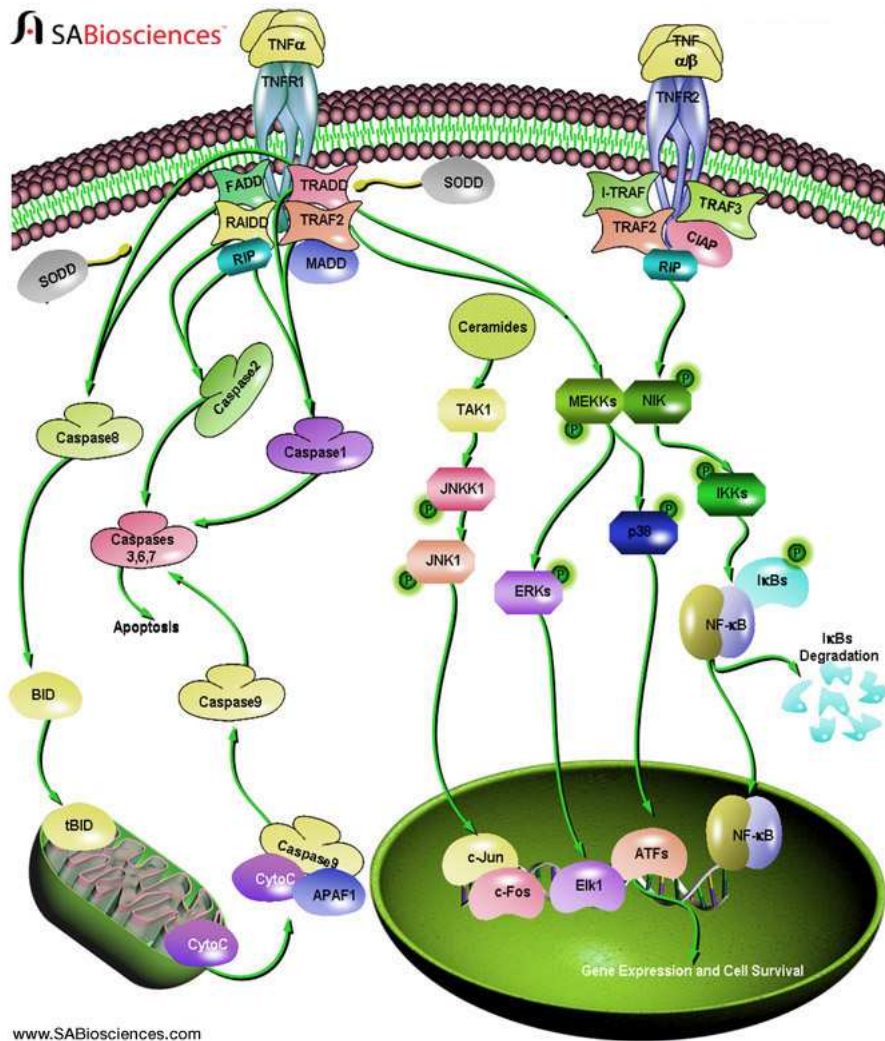


Abbildung 4.1: Durch Stimulierung mit TNF können eine Reihe verschiedener Signalkaskaden in der Zelle ausgelöst werden. In die intrazellulären Prozesse der Signalkaskaden ist eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen involviert [84]. Die verschiedenen Signalkaskaden führen dabei zu unterschiedlichen, teilweise gegensätzlichen Reaktionen in der stimulierten Zelle (nach [85]).

TNF kann zur Initialisierung von Signaltransduktionsprozessen an die Rezeptoren TNF-Rezeptor 1 und TNF-Rezeptor 2 binden. Es kann sowohl in einer membrangebundenen Form als auch in einer löslichen Form vorliegen und bildet nicht kovalent gebundene Homotrimere aus. Beide Formen des TNF können an beide Rezeptoren (TNF-Rezeptor 1 und TNF-Rezeptor 2) binden [86], allerdings lassen sich bei TNF-Rezeptor 2 durch lösliches TNF nicht sämtliche biochemische Folgeprozesse beobachten, woraus geschlossen wird, dass nur membrangebundenes TNF die Signaltransduktion via TNF-Rezeptor 2 vollständig aktiviert [87].

Die meisten Modelle, die durch TNF ausgelöste Signaltransduktionsprozesse beschreiben, gehen von der Ausbildung von TNF-Rezeptorkomplexen aus, die über drei Bindungsstellen am TNF-Homotrimer auch drei TNF-Rezeptoren anbinden [88]. Allerdings gibt es ebenfalls Hinweise auf Komplexe mit nur zwei TNF-Rezeptoren [89]. Verschiedene Untersuchungen geben darüber hinaus Hinweise darauf, dass es bei Aktivierung der Signalkaskade durch TNF teilweise zum Clustern von Rezeptor-Zytokin-Komplexen an der Plasmamembran entsprechend Abbildung 4.2 A kommt [90, 91]. Da diesen Untersuchungen Bedingungen mit unphysiologisch hohen TNF-Rezeptorkonzentrationen zu Grunde lagen, kann diese Beobachtung des Clustern jedoch unter Umständen als konzentrationsbedingtes Artefakt interpretieren werden.

Bei Untersuchungen zur Diffusion des TNF-Rezeptor 2 vor und nach Stimulierung mit TNF wurde beobachtet, dass TNF-Rezeptor 2 vor der Stimulierung deutlich schneller ($D = 3,1 \text{ cm}^2/\text{s}$) als nach der Stimulierung ($D = 0,9 \text{ cm}^2/\text{s}$) diffundiert [92]. Für TNF-Rezeptor 1 wurde vor ($D = 1,2 \text{ cm}^2/\text{s}$) und nach Stimulierung ($D = 1,1 \text{ cm}^2/\text{s}$) eine ähnliche Diffusionskonstante bestimmt. Die Diffusionskonstante von TNF-Rezeptor 1 ist also sowohl vor als auch nach Stimulierung vergleichbar zu der am TNF-Rezeptor 2 nach Stimulierung beobachteten Diffusionskonstante [92].

Ein Modell, das dieses Diffusionsverhalten erklärt, besteht in der Annahme, dass TNF-Rezeptor 2 vor Stimulierung frei in der Plasmamembran diffundiert und TNF-Rezeptor 1 vor der Stimulierung mit langsam diffundierenden Strukturen wie z. B. Caveolae (Einstülpungen in der Plasmamembran) assoziiert ist. Die Verlangsamung des TNF-Rezeptor 2 durch Stimulierung auf eine vergleichbare Diffusionskonstante wie die des TNF-Rezeptor 1 lässt sich dann entweder durch die Assoziation mit den selben Strukturen in Folge der Stimulierung oder mit Clustern der TNF-Rezeptoren (siehe Abb. 4.2 A) erklären. Zu der im Experiment gemessenen Verringerung der Diffusionskonstante aufgrund der Größe des Komplexes wäre eine Vergrößerung um mehr als eine Größen-

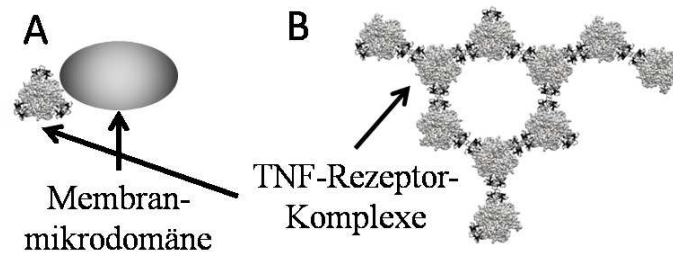


Abbildung 4.2: TNF-Rezeptor 2: A) Modell für einen trimeren TNF-Rezeptor 2-Komplex, dessen Diffusionskonstante durch Bindung an eine langsam diffundierende Struktur bestimmt wird. B) Modell für ein Oligomer, das aufgrund seiner Größe langsame Diffusion zeigt.

ordnung notwendig. Gemäß der Saffman-Delbrück-Näherung ist hierzu ein Cluster von etwa 7000 TNF-Rezeptoren notwendig [92].

4.2.2 PCH-Analysen zu FCS-Untersuchungen an TNF-Rezeptor 2

Um eines dieser beiden Modelle für TNF-Rezeptor 2 nach Stimulierung zu verifizieren, eignet sich die Untersuchung von Fluoreszenzzeitspuren in der Membran diffundierender markierter TNF-Rezeptoren mittels PCHs. Die PCHs werden hier anhand von Fluoreszenzzeitspuren erstellt, die im Rahmen von [92] aufgenommen wurden. Dabei wurden Fluoreszenzzeitspuren von GFP-markiertem TNF-Rezeptor 2 vor und nach Stimulierung analysiert. Zur Aufnahme der Fluoreszenzzeitspuren wurden Zellen ausgewählt, in denen GFP-markierte TNF-Rezeptoren in relativ geringen Konzentrationen (Größenordnung von 0,1 GFP-markierter TNF-Rezeptor 2 im zeitlichen Mittel im fokalen Volumen) vorlagen, um möglichst im Bereich physiologischer Konzentrationen von TNF-Rezeptor 2 zu liegen. Für die Aufnahme der Fluoreszenzzeitspur wurden Zeitschritte von 28 ms gewählt. Abbildung 4.3 zeigt exemplarisch zwei Fluoreszenzzeitspuren. In 4.3 A ist die Fluoreszenzzeitspur vor Stimulierung, in 4.3 B nach Stimulierung dargestellt.

Abbildung 4.4 A zeigt die anhand dieser Messungen erstellten PCHs vor (schwarz) und nach Stimulierung (rot). Ein Cluster, der 7000 fluoreszierende TNF-Rezeptoren besitzt, müsste in jedem Fall um Größenordnungen höhere maximale Fluoreszenzzählraten aufweisen. Da sich dies in den erstellten PCHs nicht abzeichnet und nur ein geringer Unterschied in der maximalen Zählrate in den PCHs nach Stimulierung zu erkennen ist, kann ein Modell ausgeschlossen werden, das Clustern der Rezeptor-Zytokin-Komplexe als Grund für die Verlangsamung der Diffusion betrachtet. Somit wird das Modell bestätigt,

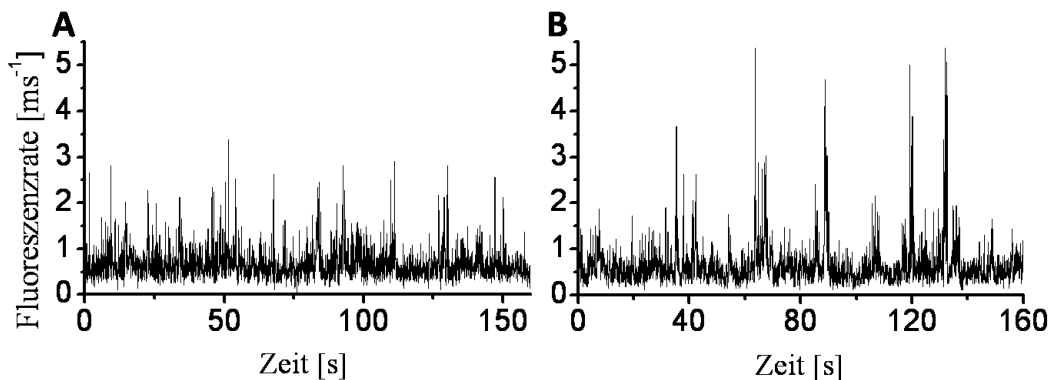


Abbildung 4.3: Fluoreszenzzeitspur der Fluoreszenz membranständiger GFP-markierter TNF-Rezeptor 2, A) vor Stimulierung und B) nach Stimulierung.

das die stimulationsbedingte Assoziation des TNF-Rezeptor 2-Komplexes an eine langsam diffundierende Struktur annimmt.

Zur Analyse der exakten Stöchiometrie des TNF-Rezeptor 2-Komplexes (zwei oder drei Rezeptoren), wurden Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt und die PCHs der simulierten Fluoreszenzzeitspuren mit den PCHs der gemessenen verglichen. Zur Durchführung der Simulationen wurde ein Modell zugrundegelegt, das mit geringfügigen Anpassungen dem in [93] entspricht. Die Simulationen wurden für ein Volumen von $3 \times 3 \times 10 \mu\text{m}$ durchgeführt. Die Grundfläche dieses Quaders stellte in der Simulation einen Ausschnitt der Plasmamembran dar, das darüber liegende Volumen das Zytoplasma. Auf der Fläche der Membran wurde die freie zweidimensionale Diffusion von drei TNF-Rezeptoren simuliert. Da in den zugrundeliegenden Experimenten ebenfalls freie Diffusion von GFP im Zytoplasma beobachtet wurde [92], wurde zusätzlich die freie dreidimensionale Diffusion von vier GFP-Molekülen im gesamten Volumen simuliert. Am Rand des simulierten Volumens werden die Teilchen reflektiert. Als fokales Volumen (Anregungswahrscheinlichkeit verknüpft mit Fluoreszenzintensität) wurde eine mittig in der Grundfläche positionierte dreidimensionale Gaußverteilung mit lateraler Ausdehnung von 300 nm und einer axialen Ausdehnung von $1 \mu\text{m}$ angenommen.

Jedes Teilchen führt in der Simulation einen Zufallsschritt mit zufälliger Richtung durch, die Zeitintervalle wurden auf $280 \mu\text{s}$ gesetzt, um sicherzustellen, dass die Schrittweite der Teilchen in einem Zeitschritt klein gegen die Abmessung des fokalen Volumens ist. Für die Schrittweite in einem Zeitintervall wurde eine Gaußverteilung mit Mittelwert 0 und einer Standardabweichung von $SD_{\text{mem}} = \sqrt{4D_{\text{mem}}\Delta t}$ für membrange-

bundene Teilchen und $SD_{\text{cyt}} = \sqrt{6D_{\text{cyt}}\Delta t}$ für Teilchen im Zytoplasma vorgegeben. Die zugrunde liegenden Parameter wie die molekulare Helligkeit, die Konzentration, die Diffusionskonstanten für freie und membrangebundene Teilchen und die mittlere Untergrundfluoreszenzrate durch Autofluoreszenz der Zelle, wurden auf die durch FCS ermittelten Werte angepasst [92]. Für die Fluoreszenzzählrate in einem Zeitschritt wurde eine Poissonverteilung verwendet. Hierzu wurde für den Untergrund (Autofluoreszenz und elektronisches Rauschen) ein mittlerer Wert von 1000 s^{-1} und für die Fluoreszenzintensität der simulierten Teilchen eine mittlere Zählrate von 2000 s^{-1} im Zentrum des Fokus festgelegt. Um PCHs für Dimere und Trimere zu simulieren, wurde die molekulare Helligkeit bezogen auf die Messungen am TNF-Rezeptor 2 vor Stimulierung verdoppelt bzw. verdreifacht. Abbildung 4.4 B zeigt die so durch Simulation erzeugten PCHs, die direkt mit den gemessenen vergleichbar sind.

Es ist zu erkennen, dass sowohl die Simulationen als auch die gemessenen PCHs größtenteils vom Untergrund bestimmt werden, da in dem niedrigen Konzentrationsbereich mit im Mittel 0,1 fluoreszierendem Molekül im fokalen Volumen ein Großteil der Zeitschritte nur Autofluoreszenz zeigt. Die maximale Zählrate, die anhand der PCHs ermittelt werden kann, ist allerdings wesentlich von der Stöchiometrie bestimmt und steigt näherungsweise proportional mit der Anzahl der markierten Proteinen im Komplex.

Der genaue Vergleich der gemessenen PCHs mit den Simulationen zeigt, dass zwar eine geringe Erhöhung der maximalen Zählrate durch Stimulierung zu beobachten ist, dass dieser Effekt allerdings deutlich geringer ausfällt, als es zu erwarten wäre, wenn die Rezeptoren nach Stimulierung ausschließlich als Dimere bzw. Trimere vorlägen (siehe Abb. 4.4 B).

Es stellt sich heraus, dass eine genaue Aussage zur Stöchiometrie nicht möglich ist. Zunächst ist davon auszugehen, dass nicht stimulierte TNF-Rezeptoren beobachtet werden, die nicht als Teil eines TNF-Rezeptor 2-Komplexes in der Membran diffundieren. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass einzelne Fluoreszenzmarkierungen im Komplex bleichen. Somit ist es durchaus plausibel anzunehmen, dass mit zunehmender Messdauer selbst bei Trimeren mit hoher Wahrscheinlichkeit nur ein fluoreszierendes Protein zu beobachten ist.

Es konnte ein Modell verifiziert werden, das die Verlangsamung von TNF-Rezeptor 2 durch stimulationsbedingte Anbindung an eine langsam diffundierende Struktur wie z. B. Caveolae erklärt. Für den TNF-Rezeptor 2-Komplex lässt sich allerdings keine eindeutige Aussage zur exakten Stöchiometrie machen.

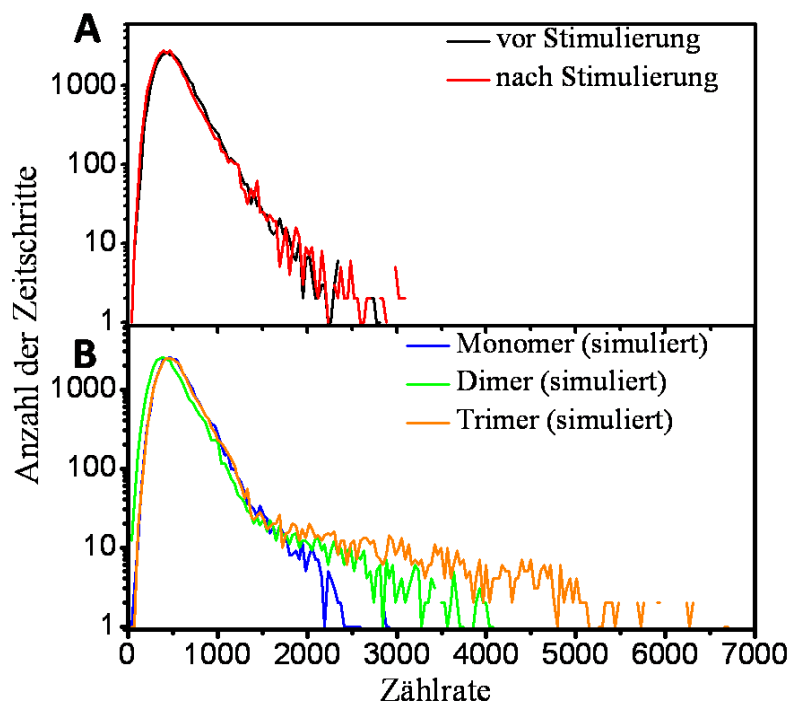


Abbildung 4.4: TNF-Rezeptor 2: PCHs, die anhand von gemessenen Daten und simulierten Daten erstellt wurden. A) Gemessene PCHs (Schwarze Punkte: Messung vor Stimulierung, rote Punkte: Messung nach Stimulierung) B) Simulierte PCHs (blaue Linie: Simulation mit Monomeren, grüne Linie: Simulation mit Dimeren, gelbe Linie: Simulation mit Trimeren.)

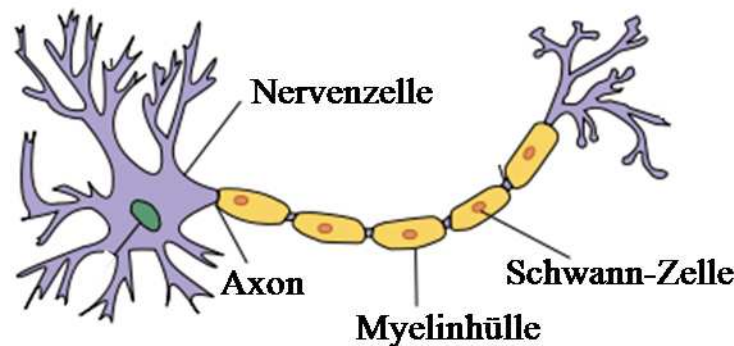


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung eines Neurons. In gelb sind die Schwann-Zellen dargestellt, die bei Schädigung CNTF freisetzen.

4.3 CNTF-Rezeptor-Komplex

4.3.1 Biologischer Hintergrund

Das Zytokin Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) wird von geschädigten Schwann-Zellen freigesetzt und fördert das Wachstum und die Ausdifferenzierung der umgebenden neuronalen Zellen [94]. Die Schwann-Zellen haben die Funktion, eine Isolationsschicht um Axone in Form einer Myelinhülle zu bilden. Somit gewährleisten sie das Weiterleiten von elektrischen Pulsen in einem Axon. Eine Aufgabe des CNTF besteht darin, bei Verletzung einer Schwann-Zelle durch Stimulierung der Nachbarzellen das Wachstum der Myelinhüllen zu fördern und die Isolation aufrecht zu erhalten. Darüber hinaus wirkt es auf Muskel-, Leber- und Fettzellen ein und nimmt regulatorisch Einfluss auf Fettleibigkeit [95, 96]. Abbildung 4.5 zeigt eine schematische Darstellung der Anordnung eines Axons und der angelagerten Schwann-Zellen.

Zur Signaltransduktion bindet das Zytokin zunächst an einen CNTF-Rezeptor an der Plasmamembran einer umgebenden Zelle an. Der CNTF-Rezeptor wird über einen GPI-anker nur in einer Hälfte der Lipiddoppelschicht der Membran gehalten und besitzt somit keine zytoplasmatische Domäne. Die Initiierung der Signalkaskade im Inneren der Zelle erfolgt durch Ausbildung eines Proteinkomplexes, der aus den Proteinen CNTF, dem CNTF-Rezeptor und den beiden Transmembranproteinen LIF-Rezeptor und gp130 aufgebaut wird. Abbildung 4.6 zeigt eine schematische Darstellung der extrazellulären

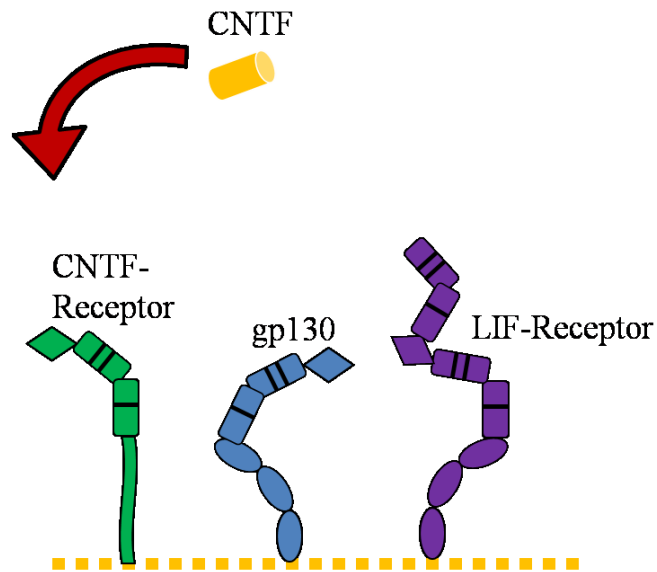


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung der extrazellulären Domänen der Proteine des CNTF-Rezeptor-Komplexes.

Domänen der beteiligten Proteine. Der Proteinkomplex führt anschließend zum sogenannten Jak/Stat-Signalweg [97].

Ein möglichst detailliertes Verständnis dieser Prozesse ist aus biologischer und medizinischer Sicht wichtig, da Fehlfunktionen in den Prozessen dieser Signalkaskade eine Rolle bei Krankheiten wie Multiple Sklerose [98], Huntington [99], Fettleibigkeit und Typ2 Diabetes [100] spielen.

Für die Stöchiometrie des Komplexes werden zwei verschiedene Modelle diskutiert: Ein hexamerer Komplex bestehend aus zwei CNTF, zwei CNTF-Rezeptoren, einem LIF-Rezeptor und einem gp130 [101, 102, 103] oder ein tetramerer Komplex, der je eines der beteiligten Proteine enthält [104, 105]. Die Untersuchungen, die zu diesen widersprüchlichen Modellen geführt haben, wurden an Modellsystemen und bei nicht physiologischen Konzentrationen durchgeführt.

Skiniotis et al. [105] konnten bei Experimenten an den löslichen extrazellulären Domänen im Transmissionselektronenmikroskop die Struktur eines tetrameren Komplexes aufzeigen (Abb. 4.7 B). Vertreter der Hypothese eines hexameren CNTF-Rezeptorkomplexes vermuten aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit der beteiligten Proteine eine Konformation, wie sie für den IL6-Rezeptorkomplex beobachtet wurde. Hier würde dann der CNTF-Rezeptor den Platz des IL6-Rezeptors einnehmen, CNTF würde IL6 ersetzen und anstelle des LIF-Rezeptors träte ein zweites gp130 (Abb. 4.7 A).

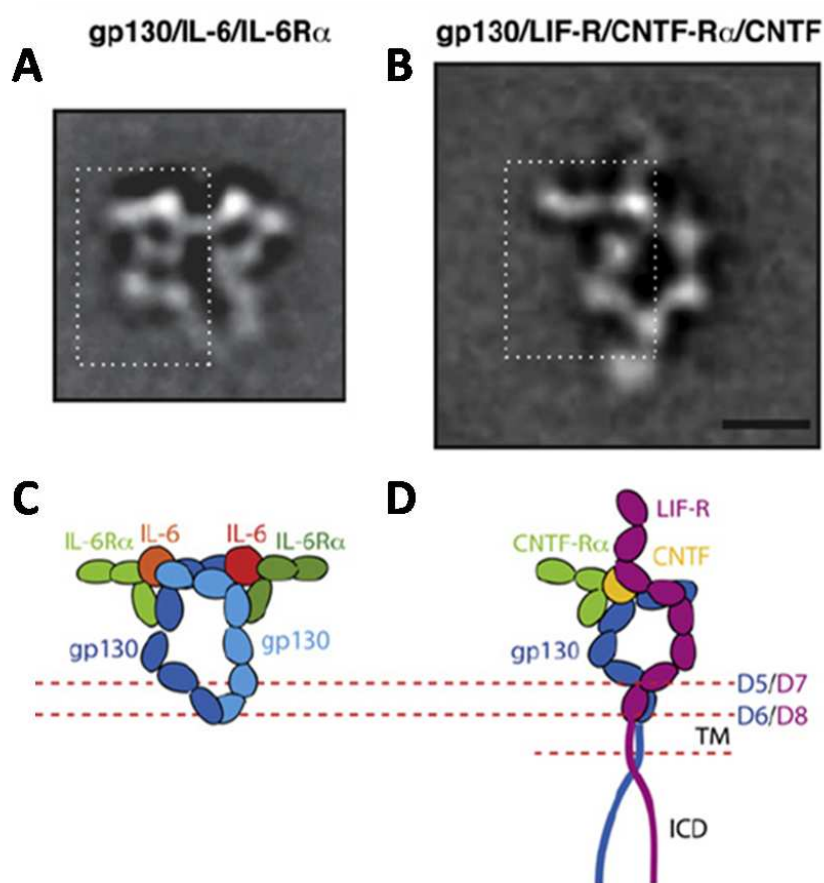


Abbildung 4.7: Aufnahmen im Transmissionselektronenmikroskop der Komplexe bestehend aus den löslichen extrazellulären Domänen vom A) IL-6-Rezeptorkomplex und B) CNTF-Rezeptorkomplex. Schematische Darstellung der Anordnung der beteiligten Proteine C) im IL-6-Rezeptorkomplex und D) im CNTF-Rezeptorkomplex (nach [105]).

Mit Hilfe von Methoden der Einzelmolekülspektroskopie soll die Stöchiometrie und Konformation des Proteinkomplexes in lebenden Zellen untersucht werden.

4.3.2 FCS-Untersuchungen an den Proteinen des CNTF-Rezeptor-Komplexes

Markierung der Proteine des CNTF-Rezeptor-Komplexes

Zur Untersuchung der Stöchiometrie des CNTF-Rezeptor Komplexes in lebenden Zellen wurden einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen an fluoreszierend markierten CNTF-Liganden und CNTF-Rezeptoren durchgeführt. Zur Markierung der Proteine wurde die Anbindung eines Farbstoffes über einen ACP-Tag gewählt, da diese gegenüber den zur Markierung weit verbreiteten autofluoreszierenden Proteinen GFP, YFP oder CFP deutlich höhere molekulare Helligkeit und bessere Photostabilität bieten. Darüber hinaus können zur Markierung in Zwei-Farb-Experimenten Farbstoffe verwendet werden, deren Fluoreszenz keinen spektralen Überlapp zeigen. In den folgenden Experimenten wurden die CNTF-Liganden bzw. die CNTF-Rezeptoren über CoA-Markierungen, die den Atto-Tec-Farbstoff Atto 488 (CoA-488) bzw. den Dyomics-Farbstoff DY-647 (CoA-647) trugen, eingefärbt.

Für Messungen an den weiteren am Komplex beteiligten Proteinen standen Mutanten von gp130 mit GFP und YFP und LIF-Rezeptor mit YFP zur Verfügung.

Diffusion der Proteine des CNTF-Rezeptor Komplexes in der Plasmamembran

Das Diffusionsverhalten von Membranproteinen ist abhängig von der Membranzusammensetzung in der Umgebung des Proteins und kann durch Interaktion mit intra- oder extrazellulären Proteinen stark beeinflusst werden. Da GPI-verankerte Proteine lediglich in einer der beiden Lipidschichten verankert sind, zeigen diese teilweise deutlich schnellere Diffusion als Transmembranproteine, die durch die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran diffundieren. Durch die Bindung an weitere Proteine im Verlauf der Ausbildung eines Proteinkomplexes kann es zu Veränderungen im Diffusionsverhalten der Proteine des Proteinkomplexes kommen.

In einem ersten Schritt wurden an den einzelnen Proteinen des CNTF-Rezeptor-Komplexes Autokorrelationsmessungen zur Untersuchung der Diffusionskonstanten jeweils vor und nach der Stimulierung der Signaltransduktion durch Zugabe von CNTF durchgeführt. Hierbei wurden gp130 und der LIF-Rezeptor mit YFP-Markierungen verwendet, CNTF- und CNTF-Rezeptor-ACP-Tag wurden mit CoA-488 eingefärbt. Zur

Anregung der Fluoreszenzmarkierungen wurde eine Leistung von $5 \mu\text{W}$ in der zum Fluorophor passenden Wellenlänge (488 nm bzw. 514 nm) gewählt. Der experimentelle Aufbau ist in Abb. 2.7 beschrieben.

Die Analyse der Autokorrelationsmessungen der Membranproteine ergab, dass keine signifikanten Unterschiede in den Diffusionskonstanten der Membranproteine des Komplexes zu beobachten sind. Sowohl vor als auch nach der Stimulierung der Signaltransduktion mit CNTF ließ sich die Diffusionskonstante bei 37°C mit ca. $2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ sowohl für den GPI-verankerten CNTF-Rezeptor (siehe Abb. 4.8 A) als auch für die Transmembranproteine gp130 und den LIF-Rezeptor bestimmen. Die Diffusionskonstante des Liganden CNTF wurde vor der Stimulierung in wässriger Lösung zu $7 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ bestimmt. Nach Stimulierung bindet das Zytokin an seinen Rezeptor und diffundiert mit der selben Diffusionskonstante von $2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (siehe Abb. 4.8 B).

Neben der beobachteten Veränderung in der Diffusionskonstante des Zytokins CNTF, aus der sich die Anbindung an den CNTF-Rezeptor ableiten lässt, geben die weiteren Messungen der Diffusionskonstanten des CNTF-Rezeptor-Komplexes keine Hinweise auf die Stöchiometrie des Komplexes. Hierzu sind weiterführende Kolokalisations-, Kreuzkorrelations- und FRET-Messungen an unterschiedlich farbig markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF-Liganden notwendig.

4.3.3 FCCS- und FRET-Untersuchungen an mit zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF-Liganden

Kolokalisation und Kreuzkorrelation von CNTF und CNTF-Rezeptor

Zum Nachweis der Bindung von CNTF an CNTF-Rezeptoren wurden Zellen transient mit CNTF-Rezeptor-ACP-Tag transfiziert und mit dem Farbstoff CoA-488 eingefärbt. Anschließend wurde mit CoA-647 eingefärbtes CNTF zur Stimulierung 30 min lang bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Überschüssiges, d. h. nicht gebundenes eingefärbtes CNTF wurde durch mehrfaches Waschen entfernt. Zur Anregung wurde für alle FCCS-Untersuchungen sowohl bei 488 nm als auch bei 633 nm Anregungswellenlänge eine Anregungsleistung von $5 \mu\text{W}$ gewählt. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 2.8 skizziert.

Die Bindung des CNTF an den CNTF-Rezeptor wurde durch Kolokalisationsanalysen der gescannten Bilder (nach [106]) und Kreuzkorrelationsmessungen an der Plasmamembran nachgewiesen. Hierbei wurden Zellen betrachtet, die im Mittel zwischen

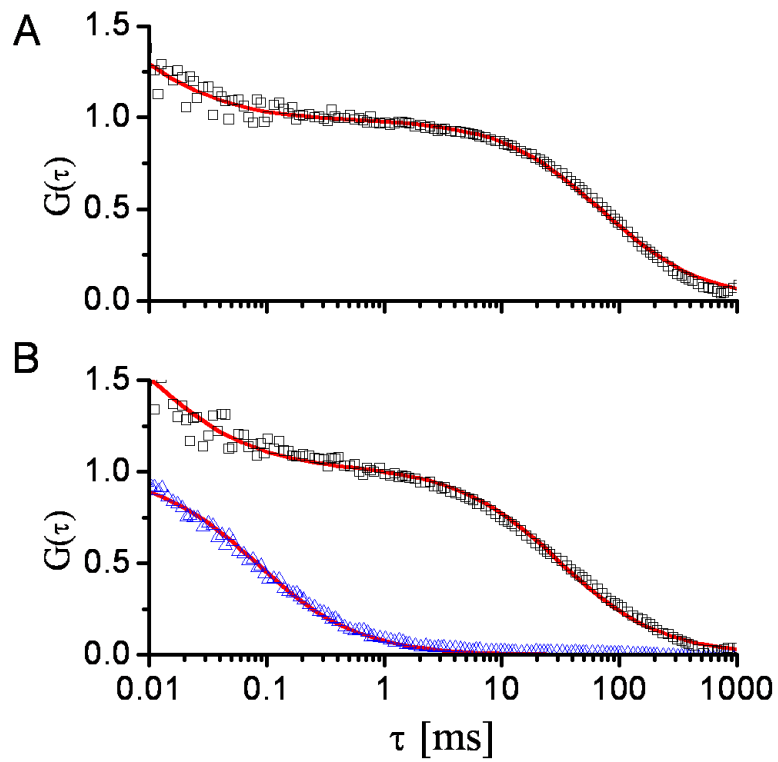


Abbildung 4.8: Autokorrelation von A) CNTF-Rezeptor (schwarze Quadrate), B) freies CNTF in Pufferlösung (blaue Dreiecke) und membrangebundenes CNTF (schwarze Quadrate). Die nach Gleichung (2.13) angepassten Kurven sind in rot eingezeichnet.

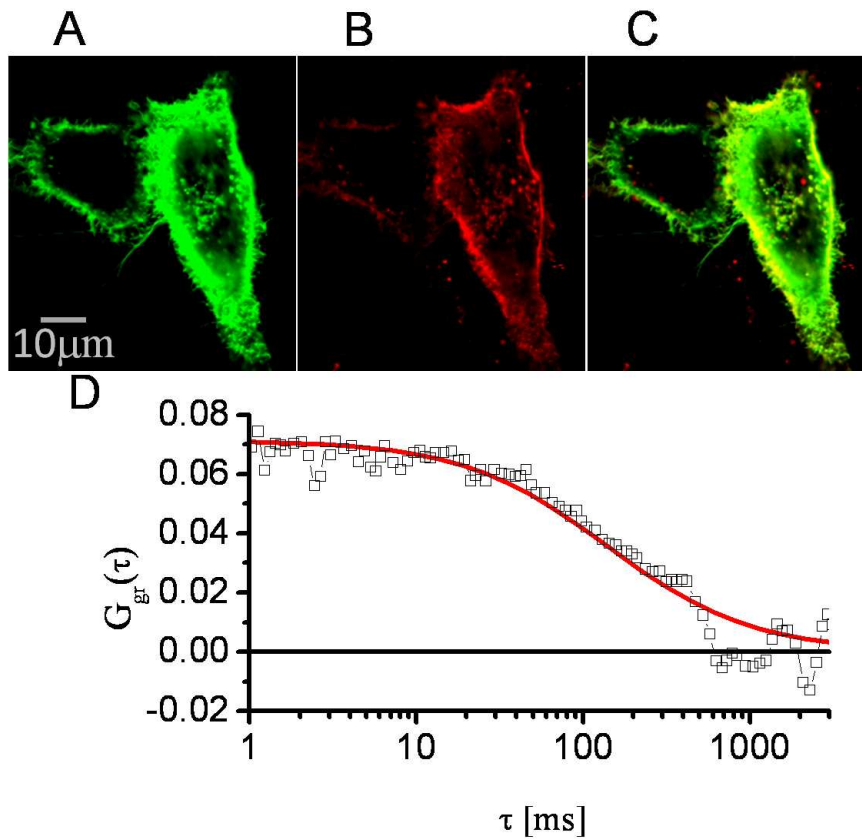


Abbildung 4.9: Konfokale Scanbilder zur Kollokalisationsanalyse A) CNTF-Rezeptor mit CoA-488 markiert, B) CNTF mit CoA-647 markiert, C) Überlagerung beider Bilder. D) Kreuzkorrelation von CNTF-Rezeptor und CNTF

einem und zehn fluoreszierenden CNTF-Rezeptoren pro fokalem Volumen an der Plasmamembran aufwies. Aus der Kollokalisationsanalyse der Bilder (Abb. 4.9 A-C) ergab sich unabhängig von der Konzentration der CNTF-Rezeptoren an der Plasmamembran einer Zelle, dass 95 % der fluoreszierenden CNTF-Moleküle an einen markierten CNTF-Rezeptor mit intaktem Farbstoff binden. Analog ergibt sich, dass 8 % der fluoreszierenden CNTF-Rezeptoren ein fluoreszierendes Zytokin gebunden haben.

Die Spezifität der Bindung des eingefärbten CNTF-Liganden an den CNTF-Rezeptor wurde an Zellen gezeigt, die keinen CNTF-Rezeptor exprimieren. Inkubiert man diese mit fluoreszierendem CNTF, so lässt sich keine Bindung von markiertem CNTF beobachten.

Neben der Kolokalisationsanalyse wurde die Bindung von CNTF an seinen Rezeptor auch mit Korrelationsmessungen untersucht. Für die relative Kreuzkorrelationsamplitude, bezogen auf die Autokorrelation des CNTF, wurde ein Verhältnis von 7,5 % ermittelt (Abb. 4.9D). Für die Bindung von zwei unterschiedlich gefärbten Bindungspartnern bei eins zu eins Stöchiometrie gilt Gleichung (2.20). Somit lässt sich anhand der relativen Kreuzkorrelationsamplitude von 7,5 % ein Anteil von 7,5 % CNTF-Rezeptoren, die ein fluoreszierendes CNTF gebunden haben, beziffern.

Es ergibt sich übereinstimmend aus der Kolokalisationsanalyse und den Korrelationsmessungen, dass etwa 8 % der CNTF-Rezeptoren ein CNTF binden und diese anschließend im Beobachtungszeitraum gemeinsam diffundieren. Eine mögliche Erklärung dafür, dass lediglich für 8 % der CNTF-Rezeptoren die dauerhafte Anbindung eines Liganden beobachtet wird, besteht darin anzunehmen, dass zur Ausbildung eines stabilen Komplexes ebenfalls gp130 und der LIF-Rezeptor notwendig sind. Analysen mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)) [68] ergaben, dass die Konzentrationen dieser beiden Proteine in den betrachteten Zellen deutlich niedriger sind als die CNTF-Rezeptor-Konzentration [107].

Experimente an mit zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF-Liganden

Stöchiometrie des Signalingkomplexes: Kreuzkorrelation von in zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF-Liganden: Zur Untersuchung der Stöchiometrie des CNTF-Rezeptor-Komplexes wurden im folgenden Experimente an CNTF-Rezeptoren mit ACP-Tag durchgeführt, die je zur Hälfte mit den Farbstoffen CoA-488 und CoA-647 eingefärbt waren. Die Beobachtung eines kreuzkorrelierten Signals nach der Stimulierung mit CNTF bedeutet dann, dass mindestens zwei CNTF-Rezeptoren in den Komplexen vorliegen.

Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurden die Fluoreszenzzeitspuren sowohl von nicht stimulierten als auch von stimulierten Zellen aufgenommen. Die Messungen an stimulierten Zellen begannen 10 Minuten nach der Stimulierung. Aufgrund von Fluktuationen der Membran werden hierbei kreuzkorrelierte Fluktuationen der Fluoreszenzintensität im Bereich von einigen Sekunden beobachtet. Deshalb wurden zur Bestimmung der Kreuzkorrelationsamplitude, die aus der Kodiffusion grün und rot markierter CNTF-Rezeptoren herrührt, jeweils zehn Intervalle zu je 180 s zur Berechnung der Kreuzkorrelation verwendet. Es wurde jeweils lediglich der Messbereich von 1 ms bis 200 ms ausgewer-

tet, um den Einfluss langsamer Fluktuationen auf die Datenanalyse weiter zu minimieren. Die Diffusionskonstante wurde anhand der Autokorrelation bestimmt; somit kann die Kreuzkorrelationsfunktion ausschließlich in Abhängigkeit der Amplitude angepasst werden (siehe Abb. 4.10 A).

Die ermittelten Kreuzkorrelationsamplituden fluktuieren stark von Messung zu Messung. Die Werte für die relativen Kreuzkorrelationsamplituden wurden statistisch ausgewertet und in einem Histogramm (siehe Abb. 4.10 B) aufgetragen. Hieraus geht hervor, dass ein signifikanter Anstieg der relativen Kreuzkorrelationsamplitude durch Stimulierung zu beobachten ist. Im Mittel liegt dieser Wert nach Stimulierung bei 4%.

Anhand einzelner Messungen vor der Stimulierung, für die eine mittlere Kreuzkorrelationsamplitude von 1% der Autokorrelationsamplitude ermittelt wurde, lässt sich nicht mit Bestimmtheit sagen, dass diesen eine Kodiffusion von zwei unterschiedlich gefärbten Proteinen zugrunde liegt. Wie sich beispielsweise in Abbildung 4.10 A erkennen lässt, kann die Fluktuation der Werte der berechneten Kreuzkorrelation in dieser Größenordnung bereits zu entsprechenden Amplituden der genäherten Funktion führen. Darüber hinaus führen langsamere Fluktuationen aus Membranbewegungen oder durch Bleichen von Markierungen auch im Zeitregime von 1 ms bis 200 ms zu einem geringen Abfall der Kreuzkorrelationsamplitude. Aus der Verteilung der relativen Amplituden vor der Stimulierung lässt sich somit keine Kodiffusion (Präassoziation in Komplexen) ableiten.

In Komplexen, die zwei CNTF-Rezeptoren enthalten, ist zu erwarten, dass diese auch zwei CNTF-Liganden binden. Um dies zu demonstrieren wurden analog zur oben beschriebenen Untersuchung der Stöchiometrie des CNTF-Rezeptor-Komplexes zwei verschieden gefärbte Fraktionen CNTF zur Stimulierung nicht fluoreszierender Zellen verwendet. Da unbehandelte HeLa-Zellen keinen endogenen CNTF-Rezeptor produzieren, wurden Zellen verwendet, die CNTF-Rezeptor-ACP-Tag produzieren. Die Rezeptoren blieben in diesen Untersuchungen uneingefärbt.

Nach 30 minütiger Stimulierung im Inkubator (37°C, 5% CO₂) mit eingefärbtem CNTF wurden Messungen durchgeführt, wie sie im vorigen Abschnitt beschrieben sind: die Kreuzkorrelation grün und rot markierter CNTF-Moleküle wurde gemessen. Die Amplitude der Kreuzkorrelation lag bei etwa 7% der Autokorrelationsamplitude (Abb. 4.11 B). Die im Vergleich zu den Messungen an in zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren höhere Amplitude bedeutet gleichzeitig ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis. Aus diesem Grund sind die statistischen Fluktuationen der relativen Amplituden verschiedener Messungen deutlich geringer als bei den Messungen am Rezeptor, so dass

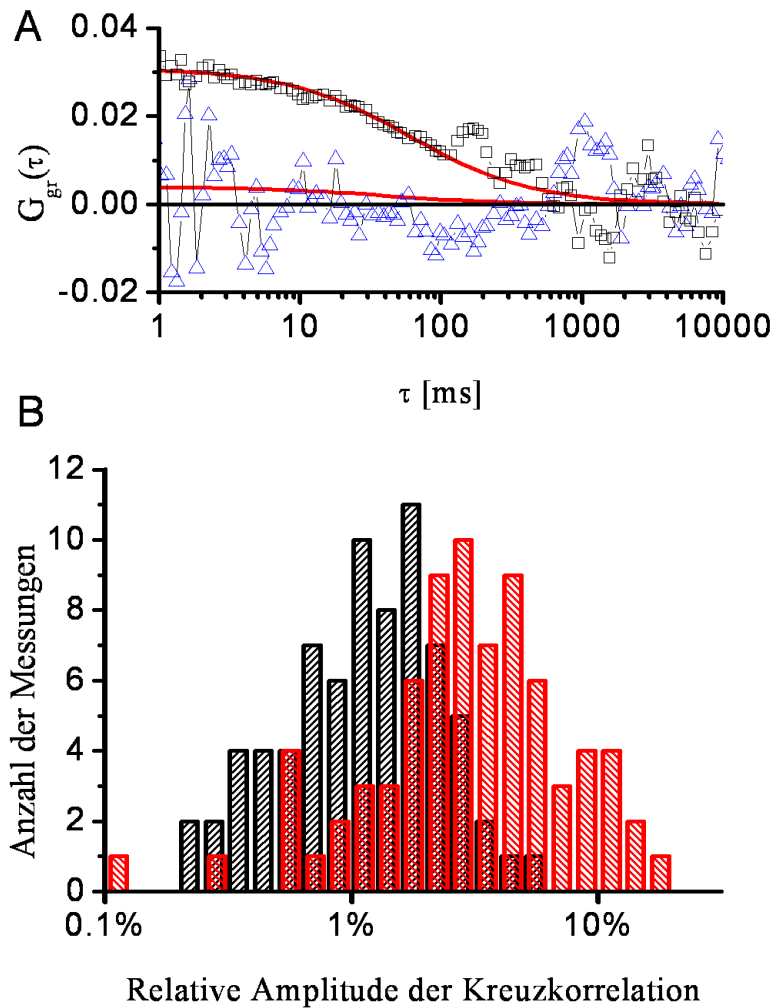


Abbildung 4.10: A) Kreuzkorrelation von CNTF-Rezeptoren, die zur Hälfte mit CoA-488 und zur Hälfte mit CoA-647 eingefärbt waren (vor Stimulierung blaue Dreiecke, nach Stimulierung schwarze Quadrate, Anpassung der Kurven nach (2.13) in rot) B) Histogramm über die gemessenen relativen Kreuzkorrelationsamplituden (vor Stimulierung schwarz, nach Stimulierung rot).

eine statistische Auswertung nicht notwendig ist, um die Kodiffusion der Liganden nachzuweisen.

Somit wurde mittels Kreuzkorrelationsexperimente in lebenden Zellen das Vorhandensein von CNTF-Rezeptor-Komplexen gezeigt, die zwei CNTF-Rezeptoren bzw. zwei CNTF-Liganden beinhalten.

Konformation des Signalingkomplexes: FRET zwischen unterschiedlichfarbig markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTFs:

Die Kreuzkorrelationsexperimente an in zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren und CNTF zeigen, dass zumindest teilweise Komplexe mit zwei CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF-Liganden vorliegen. Mit der Untersuchung, ob ein Energieübertrag (FRET) zwischen diesen stattfindet, lässt sich eine Aussage über den Abstand zweier CNTF-Rezeptoren bzw. CNTF im Komplex machen.

Zur Untersuchung des Abstands wurde ausschließlich der grüne Farbstoff (CoA-488) mit $5\ \mu\text{W}$ Anregungsleistung direkt angeregt. Findet ein Energieübertrag statt, so lässt sich Fluoreszenz der roten Farbstoffe (CoA-647) beobachten. Der Försterradius für das verwendete Fluorophorenpaar liegt bei 5,6 nm.

Bei unterschiedlich eingefärbten CNTF-Rezeptoren lässt sich bei Anregung mit der Wellenlänge 488 nm in der roten Fluoreszenzintensität vor und nach Stimulierung mit CNTF kein signifikanter Unterschied erkennen. Auch die berechnete Autokorrelation der roten Fluoreszenz zeigt keinerlei Anzeichen einer Diffusion mit einer für Membranproteine typischen Zeitkonstante. Somit ist davon auszugehen, dass zwischen CNTF-Rezeptoren kein Energieübertrag stattfindet.

Bei Experimenten an mit zwei Farben markierten CNTF-Liganden konnte FRET beobachtet werden. Dies lässt sich anhand der Autokorrelation der roten Fluoreszenzzeitspur demonstrieren. Im Gegensatz zu den Messungen an in zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren ist hier ein korreliertes Signal zu beobachten (Abb. 4.11 C). Da die beobachtbare Fluoreszenz der roten Farbstoffe durch Energieübertrag aber geringer war als die Untergrundfluoreszenz, war es nicht möglich, die Rate des Energieübertrags auf Einzelmolekülniveau zu quantifizieren.

Aufgrund des beobachteten Energieübertrags zwischen zwei CNTF-Liganden im CNTF-Rezeptor-Komplex lässt sich schließen, dass der Abstand zwischen zwei Liganden im Komplex im Bereich des Försterradius des verwendeten Fluorophorenpaars von 5,6 nm liegt. Da zwischen den Markierungen zweier CNTF-Rezeptoren kein Energieübertrag

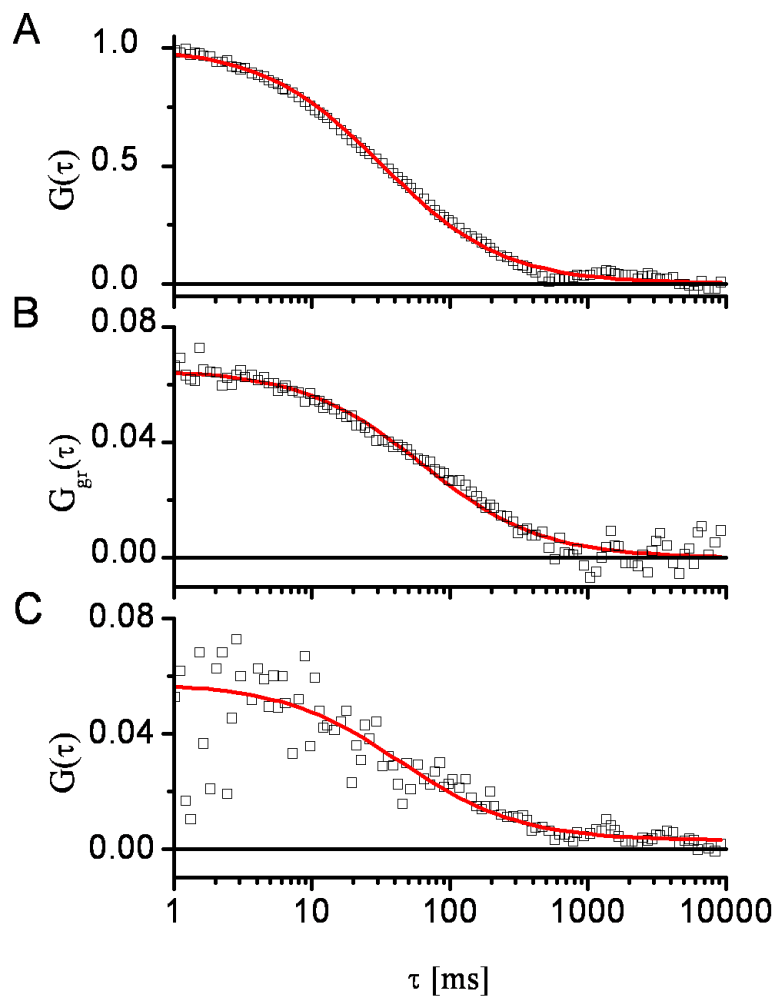


Abbildung 4.11: A) Autokorrelation von CNTF eingefärbt mit CoA-647 an der Plasmamembran. B) Kreuzkorrelation von mit zwei Farben markiertem CNTF (50 % CoA-488, 50 % CoA-647). C) Autokorrelation der roten Fluoreszenz bei mit zwei Farben markiertem CNTF (50 % CoA-488, 50 % CoA-647) durch indirekte Anregung über FRET.

beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass der Abstand der Rezeptoren im Komplex größer ist als der Abstand der Liganden zueinander.

Quantitative Analyse der Experimente an in zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren bzw. CNTFs

Bis hier wurden die beobachteten Kreuzkorrelationen und FRET-Messungen lediglich qualitativ betrachtet. Die Quantifizierung der CNTF-Rezeptor-Komplexe, die zwei CNTF-Liganden bzw. -Rezeptoren beinhalten und die Quantifizierung der Abstände, die sich aus den FRET-Untersuchungen ableiten lassen, werden im Folgenden erläutert.

Quantifizierung der Komplexe mit zwei CNTF-Rezeptoren: Da bei CNTF-Rezeptoren kein FRET beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Helligkeit der beobachteten Proteine und Komplexe proportional zur Anzahl grüner und roter Markierungen ist, und es gilt Gleichung (2.19).

Bei den hier durchgeführten Messungen war das Signal-Rausch-Verhältnis für beide Detektionskanäle größer als 10, also kann in guter Näherung der Untergrundvorfaktor vernachlässigt werden.

Bei einem Modell mit zwei CNTF-Rezeptoren pro Rezeptorkomplex ergibt sich für das Verhältnis der Amplituden von Kreuz- zu Autokorrelation der grünen Fluoreszenz bei der Annahme von 50% grün und 50% rot eingefärbten Rezeptoren nach (2.19):

$$RatioG = \frac{c^{(gr)}}{c^{(g)} + 4c^{(gg)} + c^{(gr)}}. \quad (4.1)$$

Analog gilt für das Verhältnis der Kreuzkorrelationsamplitude zur Autokorrelation des roten Kanals:

$$RatioR = \frac{c^{(gr)}}{c^{(r)} + 4c^{(rr)} + c^{(gr)}}. \quad (4.2)$$

Hierbei ist $c^{(g)}$ bzw. $c^{(r)}$ die Konzentration an Teilchen mit einer grünen bzw. roten Markierung (CoA-488 bzw. CoA-647), also einzeln diffundierende CNTF-Rezeptoren, $c^{(gg)}$, $c^{(gr)}$ und $c^{(rr)}$ sind dem entsprechend CNTF-Rezeptor-Komplexe, die zwei CNTF-Rezeptoren mit Fluoreszenz-Markierung tragen (zwei grüne, einer grüne und eine rote bzw. zwei rote Markierungen).

Drückt man die Konzentrationen der jeweiligen Fraktionen $c^{(g)}$, $c^{(gg)}$, $c^{(gr)}$ in Abhängigkeit des Anteils der Rezeptoren, die als Dimer in einem Komplex diffundieren f_{dimer} , und

in Abhängigkeit der Markierungseffizienz f_{label} aus, so erhält man bei gleicher Ausgangskonzentration roter und grüner Farbstoffe folgende Ausdrücke:

$$c^{(gr)} = \frac{1}{2} f_{dimer} f_{label}^2, \quad (4.3)$$

$$c^{(gg)} = c^{(rr)} = \frac{1}{4} f_{dimer} f_{label}^2, \quad (4.4)$$

$$c^{(g)} = c^{(r)} = f_{label} - c^{(gr)} - c^{(gg)} - c^{(rr)}. \quad (4.5)$$

Somit lassen sich die Gleichungen (4.1) und (4.2) bei gleichen Ausgangskonzentrationen beider Farbstoffe in Abhängigkeit vom Anteil der CNTF-Rezeptor-Dimere in Rezeptorkomplexen und der Markierungseffizienz ausdrücken als

$$Ratio = \frac{\frac{1}{2} f_{dimer} f_{label}}{\frac{1}{2} f_{dimer} f_{label} + 1}. \quad (4.6)$$

Anhand der mittleren gemessenen relativen Amplitude von 4% bei Kreuzkorrelationsexperimenten an in zwei Farben markierten CNTF-Rezeptoren lässt sich so bei einer zu erwartenden Markierungseffizienz von 90% (Herstellerangabe) ein Anteil von 8,5% der CNTF-Rezeptoren als Teil von Komplexen mit zwei CNTF-Rezeptoren bestimmen.

Der so ermittelte Anteil von 8,5% stimmt gut mit dem anhand von Kollokalisations- und Kreuzkorrelationsmessungen ermittelten Wert von 8% der CNTF-Rezeptoren, die einen Liganden binden, überein.

Quantifizierung der Komplexe mit zwei CNTF: Zur Quantifizierung des Anteils von CNTF-Molekülen, die sich in Komplexen mit zwei CNTF-Molekülen befinden, ist eine Betrachtung nach Gleichung (2.19) nicht zulässig, da die Helligkeiten bei Rezeptorkomplexen mit einer grünen und einer roten Markierung sich gegenüber der Helligkeit einzelner Fluorophore aufgrund von Energieübertrag deutlich verschieben. Verwendet man wie oben beschrieben ein Modell mit einem Komplex, der in diesem Fall zwei CNTF-Moleküle enthält, so ergibt sich nach Gleichung (2.18) in Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität im Grünen (η_g) und im Roten (η_r)

$$RatioG = \frac{c^{(gr)} \eta_g^{(gr)} \eta_r^{(gr)}}{c^{(g)} \eta_g^{(g)2} + c^{(gg)} \eta_g^{(gg)2} + c^{(gr)} \eta_g^{(gr)2}} \frac{c^{(g)} \eta_g^{(g)} + c^{(gg)} \eta_g^{(gg)} + c^{(gr)} \eta_g^{(gr)}}{c^{(r)} \eta_r^{(r)} + c^{(rr)} \eta_r^{(rr)} + c^{(gr)} \eta_r^{(gr)}}. \quad (4.7)$$

Näherungsweise gilt $2\eta_g^{(g)} = \eta_g^{(gg)}$. Drückt man $\eta_g^{(gr)}$ und $\eta_r^{(gr)}$ in Abhängigkeit der FRET-Effizienz F , das heißt des Anteils der Energie, der vom Donor an den Akzep-

tor transferiert wird, und der Wahrscheinlichkeit e , dass ein vom Akzeptor absorbiertes Photon detektiert wird, aus, so lässt sich $\eta_g^{(gr)}$ als $(1 - F)\eta_g^{(g)}$ und $\eta_r^{(gr)}$ als $(1 + eF)\eta_r^{(r)}$ schreiben. Der Faktor e ist dabei abhängig von der Quantenausbeute sowie der Detektionseffizienz der Apparatur. Gleichung (4.7) vereinfacht sich dann zu

$$RatioG = \frac{c^{(gr)}(1 - F)(1 + eF)}{c^{(g)} + 4c^{(gg)} + c^{(gr)}(1 - F)^2} \frac{c^{(g)} + 2c^{(gg)} + c^{(gr)}(1 - F)}{c^{(g)} + 2c^{(gg)} + c^{(gr)}(1 + eF)}, \quad (4.8)$$

analog gilt

$$RatioR = \frac{c^{(gr)}(1 - F)(1 + eF)}{c^{(g)} + 4c^{(gg)} + c^{(gr)}(1 + eF)^2} \frac{c^{(g)} + 2c^{(gg)} + c^{(gr)}(1 + eF)}{c^{(g)} + 2c^{(gg)} + c^{(gr)}(1 - F)}. \quad (4.9)$$

Drückt man diese Verhältnisse nun in Abhängigkeit des Anteils von CNTF-Molekülen, die in Komplexen mit zwei CNTFs eingebunden sind, und in Abhängigkeit der Markierungseffizienz aus, so erhält man

$$RatioG = \frac{\frac{1}{2}f_{dimer}f_{label}(1 - F)(1 + eF)(1 - Ff_{dimer}f_{label})}{(\frac{1}{2}f_{dimer}f_{label}(1 - F)^2 + 1)(1 + eFf_{dimer}f_{label})} \quad (4.10)$$

(siehe Abb. 4.12) und

$$RatioR = \frac{\frac{1}{2}f_{dimer}f_{label}(1 - F)(1 + eF)(1 + eFf_{dimer}f_{label})}{(\frac{1}{2}f_{dimer}f_{label}(1 + eF)^2 + 1)(1 - Ff_{dimer}f_{label})}. \quad (4.11)$$

Die FRET-Effizienz lässt sich aus den durchgeführten Messungen nicht exakt bestimmen. Bei der Anregung mit der Wellenlänge 488 nm von Zellen, die mit zwei Farben markierten CNTF stimuliert wurden, kann auf Grund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses die Erhöhung der Zählrate durch FRET nicht auf Einzelmolekülniveau quantifiziert werden.

Analog zum den in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Monte-Carlo-Simulationen wurden hier verschiedene Simulationen durchgeführt, um die Trajektorien und die Autokorrelationsfunktionen der Akzeptorfluoreszenz mit den Messungen zu vergleichen. Die Zeitschritte der Simulation lagen bei $100 \mu\text{s}$, für den Untergrund wurde entsprechend den experimentellen Fluoreszenzzeitspuren eine mittlere Zählrate von 1000 s^{-1} angenommen, für die maximale Fluoreszenzintensität wurden variable Werte in Abhängigkeit der FRET-Effizienz F verwendet.

Ein Vergleich der simulierten Fluoreszenzzeitspuren und der Akzeptorautokorrelation mit den experimentell ermittelten Kurven konnte die FRET-Effizienz im Bereich von

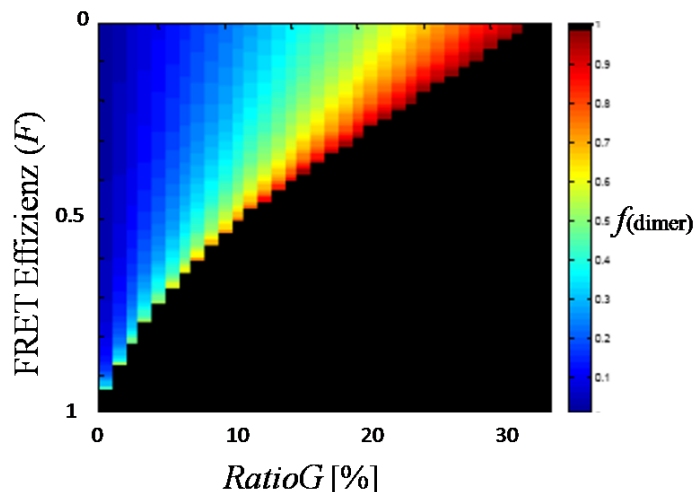


Abbildung 4.12: Anteil an CNTF-Rezeptoren bzw. CNTFs, die Teil eines Signalingkomplexes sind in Abhängigkeit von der FRET-Effizienz und der gemessenen relativen Kreuzkorrelationsamplitude nach Gleichung (4.10) für $e = 0,27$ und $f_{label} = 0,9$.

20 % bis 65 % eingrenzen. Bei geringerer FRET-Rate würde die Autokorrelation der Akzeptorfluoreszenz aufgrund eines zu niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses signifikant größere Fluktuationen zeigen. Bei höherem Energietransfer würde sich die Erhöhung der Zählrate im roten Fluoreszenzkanal signifikant stärker abzeichnen als in den Messungen beobachtet.

Zur Berechnung von f_{dimer} wird für e ein Wert von 0,27 angenommen. Dieser entspricht der Quantenausbeute des dem CoA-647 vergleichbaren Cy5 [108]. Für die Markierungseffizienz f_{label} wird nach Herstellerangaben ein Wert von 0,9 verwendet. Für Werte von $RatioG = 0,07$ und $0,2 < F < 0,65$ ergibt sich nach (4.10) ein Anteil an CNTF-Molekülen, die in Komplexen mit zwei CNTFs diffundieren, von 20 - 100 % (siehe Abb. 4.13).

Quantifizierung des Abstands zwischen CNTF- bzw. CNTF-Rezeptor-Molekülen

mittels FRET: Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurde, konnte die FRET-Rate anhand des Vergleichs der gemessenen Daten mit Monte Carlo Simulationen für in zwei Farben markierte CNTFs quantifiziert werden. Ausgehend von einem Energieübertrag, der zwischen 0,2 und 0,65 liegt, ergibt sich anhand des Försterradius von 5,6 nm für das verwendete Fluorophorenpaar ein Abstand zwischen 5 nm und 7 nm.

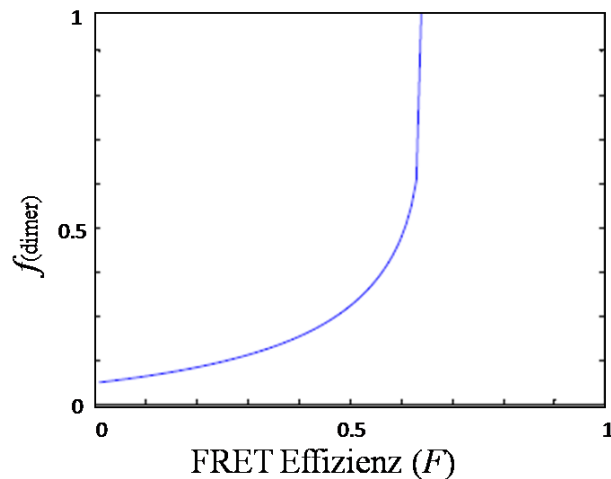


Abbildung 4.13: Anteil an CNTFs in Komplexen mit zwei CNTF-Molekülen in Abhängigkeit von der FRET-Rate bei einer gemessenen relativen Amplitude von 7% für in zwei Farben markierte CNTFs nach Gleichung (4.10) für $e = 0,27$ und $f_{label} = 0,9$.

Entsprechend kann man davon ausgehen, dass bei nicht beobachtbarem Energieübertrag zwischen zwei CNTF-Rezeptoren der Abstand mindestens 8 nm betragen muss.

Zusammenfassung der Ergebnisse zum CNTF-Rezeptor Komplex

Die aus biologischer Sicht wichtigsten Resultate der hier durchgeführten Messungen sind: 1.) Der GPI-verankerte CNTF-Rezeptor zeigt bereits vor der Ausbildung des Proteinkomplexes eine ähnliche Diffusionskonstante wie die Transmembranproteine LIF-Rezeptor und gp130. 2.) Es konnte mit Hilfe von Kreuzkorrelationsanalysen verschiedenefarbter CNTF-Rezeptoren bzw. CNTFs gezeigt werden, dass nach Stimulierung der Zellen CNTF-Rezeptorkomplexe in der Plasmamembran vorliegen, die zwei CNTF-Rezeptoren bzw. zwei CNTFs enthalten. Etwa 8,5% der CNTF-Rezeptoren und 20 – 100% der CNTF-Liganden sind in diese Komplexe eingebunden. 3.) Anhand von FRET-Messungen wurde gezeigt, dass der Abstand zwischen CNTF-Rezeptoren bei mehr als 8 nm, der Abstand zwischen CNTFs im Bereich 5-7 nm liegen muss.

4.4 Diskussion und Ausblick

Die Anwendung von einzelmolekülspektroskopischen Methoden der Fluoreszenz-Fluktuations-Analyse oder von FRET konnte in den vergangenen Jahren an einer Reihe von Experimenten an Modellsystemen gezeigt werden [5]. Am Beispiel von Untersuchungen am TNF- und CNTF-Rezeptorkomplex wurde demonstriert, dass sich mit diesen Methoden biologische Fragestellungen, die etablierten zellbiologischen Methoden nicht zugänglich sind, auch direkt in lebenden Zellen beantworten lassen. Hierbei stellte die Verwendung von Fusionsproteinen mit einem ACP-Tag, an den mit hoher Spezifität ein Farbstoff nach Wahl angebunden werden kann, einen großen Fortschritt gegenüber der Verwendung von fluoreszierenden Proteinen wie GFP dar.

Die Analyse von PCHs zu Fluoreszenzzeitspuren von membranständigen GFP-markierten TNF-Rezeptor 2 und der Vergleich der Messungen mit Monte-Carlo-Simulationen wurde genutzt, um ein Modell zu verifizieren, nach dem TNF-Rezeptor 2 durch Stimulierung einen Komplex ausbildet, der an langsam diffundierende Strukturen in der Zelle anbindet. Die genaue Stöchiometrie des Komplexes konnte am bestehenden System allerdings nicht geklärt werden. Die niedrige Fluoreszenzintensität und Photostabilität von GFP führen zu niedrigem Signal-Rausch-Verhältnis und zu einer hohen Wahrscheinlichkeit, dass nicht alle TNF-Rezeptoren eines Komplexes fluoreszieren. Der Übergang von fluoreszierenden Proteinen auf Snap- oder ACP-Tags würde in diesen Aspekten zu Verbesserungen führen, die die Bestimmung der Stöchiometrie des Komplexes via PCH möglich machen könnten. Alternativ könnten dann auch Kreuzkorrelations- oder FRET-Messungen zur Untersuchung dieser Fragestellung herangezogen werden.

Die Resultate, die anhand der Experimente am CNTF-Rezeptorkomplex erzielt wurden, stehen im Gegensatz zu einem rein tetrameren Modell, das von Skiniotis et al. [105] aufgrund von Abbildungen der Struktur des Komplexes im Transmissionselektronenmikroskop (siehe Abb. 4.7B) vorgeschlagen wird. Da diesen Aufnahmen allerdings lediglich Komplexe der löslichen extrazellulären Teile der beteiligten Proteine zugrunde lagen und die Ausbildung der Komplexe nicht in der natürlichen Membranumgebung durchgeführt wurde, sind diese Resultate nur bedingt mit den hier durchgeführten Untersuchungen vergleichbar.

Es konnte gezeigt werden, dass CNTF-Rezeptorkomplexe in der Plasmamembran vorliegen, die mindestens zwei CNTFs bzw. CNTF-Rezeptoren enthalten. Ausgehend von den beiden Modellen (tetrameres und hexameres Modell), die für den Proteinkomplex im

Vorfeld dieser Arbeit diskutiert wurden, wurde für diese Komplexe das tetramere Modell ausgeschlossen. Somit lässt sich davon ausgehen, dass die beobachteten Komplexe mit dem hexameren Modell übereinstimmen. Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Komplexen um Oligomere handelt, die eine deutlich größere Zahl von CNTFs bzw. CNTF-Rezeptoren enthalten, wurden PCHs von den entsprechenden Messungen erstellt.

Zur Erstellung der PCHs wurden Messungen am fluoreszierenden CNTF-Rezeptor jeweils vor und nach Stimulierung herangezogen. Die Konzentration wurde so gewählt, dass im Mittel 0,1 Rezeptoren im Fokus waren. Veränderungen der Stöchiometrie lassen sich dann im Vergleich der PCHs vor und nach Stimulierung anhand der Änderungen in der maximalen Zählrate erkennen. Darüber hinaus wurden diese PCHs mit Monte-Carlo-Simulationen verglichen.

Aufgrund des hohen Anteils an CNTF-Rezeptoren (92%), die trotz Stimulierung kein CNTF binden und nicht Teil eines Komplexes werden, lassen sich bei PCHs vor und nach der Stimulierung nur geringfügige Veränderungen beobachten. Da nur geringfügige Veränderungen in der maximalen Zählrate zu beobachten waren, konnte auch in Übereinstimmung mit den Simulationen ein Oligomer für den CNTF-Rezeptorkomplex mit vielen CNTF-Rezeptoren ausgeschlossen werden. Bezieht man die Ergebnisse biochemischer Untersuchungen [102] ein, die zu einem Modell mit jeweils genau zwei CNTF und zwei CNTF-Rezeptoren führen, können die PCHs als weiterer Hinweis auf einen Komplex mit zwei CNTF und zwei CNTF-Rezeptoren gewertet werden.

Skiniotis et al. [105] beobachteten die Ausbildung von tetrameren Strukturen bei der Interaktion der löslichen extrazellulären Domänen. Geht man davon aus, dass sich auch in lebenden Zellen zunächst solche tetrameren Komplexe ausbilden, so kann die Entstehung eines hexameren Komplexes mit einem Modell erklärt werden, das nach der Ausbildung eines Tetramers anschließend einen weiteren CNTF-Rezeptor mit Liganden anbindet. (siehe Abb. 4.14 A)

Ein bislang nicht diskutiertes Modell, das aus zwei Tetrameren ein Oktamer aufbaut, stellt eine Alternative zum Hexamer da. (siehe Abb. 4.14 B). Hierfür spricht zunächst, dass in den Untersuchungen von Skiniotis et al. [105] keine Dimere bestehend aus CNTF-Rezeptoren und CNTF, beobachtet wurden. Giese et al. [109] konnten die Ausbildung von Homodimeren zweier gp130 mit FRET zeigen. Die Bindungsstelle hierzu liegt im cytoplasmatischen Teil des Proteins. Bildet die Bindung zweier gp130 die Grundlage für die Entstehung eines oktameren Komplexes, so ist diese nicht an den extrazellulären Domänen der Proteine beobachtbar. An einem anderen Proteinkomplex (granulocyte-

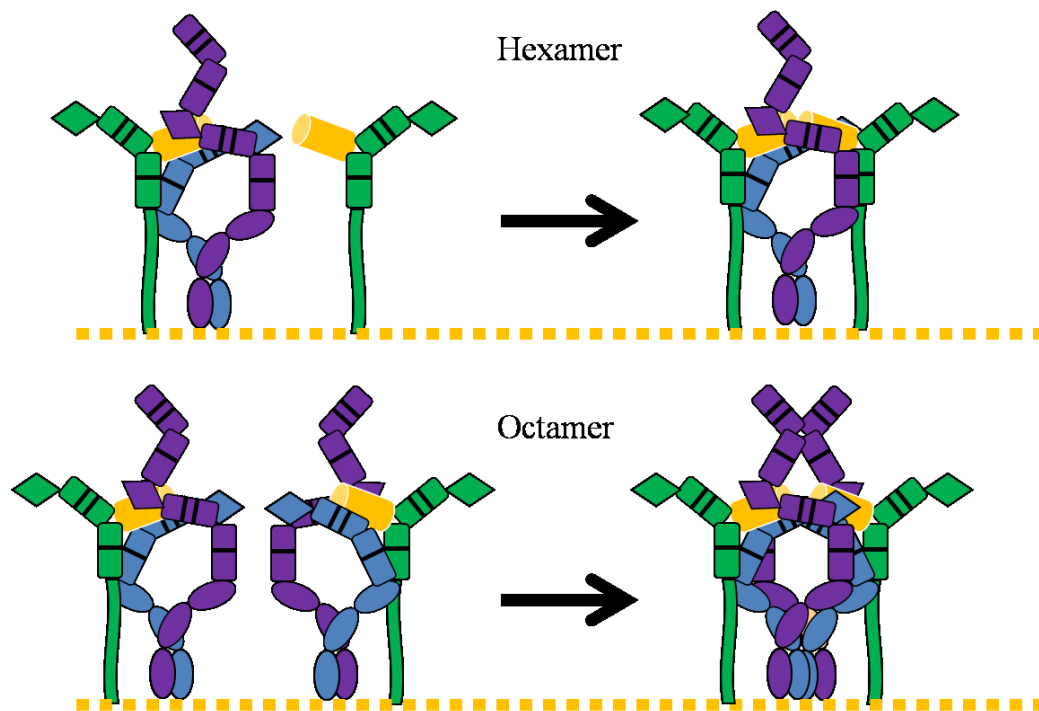


Abbildung 4.14: Skizzen zur möglichen Bildung eines hexameren bzw. octameren CNTF-Rezeptorkomplexes.

macrophage-colony-stimulating factor receptor complex) konnte von Hansen et al. [110] die Bindung von zwei hexameren Proteinkomplexen über ein strukturell dem gp130 ähnelnden Protein (β c-chain) gezeigt werden.

Um eines der beiden Modelle zu falsifizieren, ist im nächsten Schritt ein Kreuzkorrelationsexperiment mit unterschiedlich eingefärbtem LIF-Rezeptor sinnvoll. Bei einem oktameren Komplex sind zwei LIF-Rezeptoren, bei einem hexameren Komplex lediglich einer pro Signalingkomplex zu erwarten.

Anhand der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente wurde demonstriert, dass biologische Fragestellungen im Bezug auf die Untersuchung von membrannahen Prozessen bei der Signaltransduktion, die etablierten biochemischen Verfahren nicht zugänglich sind, mit Methoden der Einzelmolekülspektroskopie in geeigneten Systemen beantwortbar werden. Die Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch den Übergang von fluoreszierenden Proteinen wie GFP auf Fusionsproteine mit einem ACP-Tag bietet dabei die entscheidende Verbesserung der Resultate. Im Hinblick auf breite Anwendbarkeit dieser Methoden zur Untersuchung membrannaher Prozesse gibt es weitere Ansätze, die

zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses oder zur Vermeidung von Artefakten aufgrund von Membranfluktuationen [111] oder spektralem Überlapp verschiedener Fluoreszenzmarkierungen [112] dienen.

Adhärente, lebende Zellen sind nicht absolut ortsfest an das Deckglas gebunden, an dem sie anhaften. Bei der Durchführung von Fluoreszenz-Fluktuations-Analysen mit einem konfokalen Mikroskop besteht somit die Gefahr, dass Bewegungen der Zelle die Ursache für Fluktuationen der gemessenen Fluoreszenz darstellen. Zur Vermeidung von Artefakten besteht die Möglichkeit, insbesondere für Messungen an Membranen, das konfokale Volumen entlang einer Linie zu verschieben. Anhand des Fluoreszenzverlaufs entlang der Linie lässt sich nun die Position der Membran ermitteln. Zur Berechnung der Korrelationsfunktion wird die Fluoreszenzintensität einer jeden Linie am Ort der Membran berücksichtigt [113, 114].

Durch solche Linienscans können Membranfluktuationen als Ursache für ein korreliertes Signal ausgeschlossen werden. Im Gegenzug muss allerdings eine geringere Zeitauflösung (Frequenz des Linienscans) und eine längere Aufnahmezeit (geringere Statistik) in Kauf genommen werden. Insbesondere die längere Aufnahmezeit gegenüber einem festen fokalen Volumen kann bei Untersuchungen an lebenden Zellen von Nachteil sein, wenn Veränderungen untersucht werden sollen, die sich im Sekunden- oder Minutenmaßstab abspielen.

Werden für Kreuzkorrelations- oder FRET-Experimente zwei Farbstoffe zur Markierung verwendet, deren Fluoreszenz sich spektral überlappt, so lässt sich auch bei nicht kodiffundierenden Molekülen vermeintlich Kreuzkorrelation bzw. FRET beobachten. Sind die zwei Farbstoffe allerdings spektral getrennt anregbar, so kann durch eine alternierte Anregung die Fluoreszenz zeitlich einem Anregungspuls und entsprechend einem Farbstoff zugeordnet werden [115]. Diese Technik wird auch PIE (Pulsed Interleaved Excitation) [116] oder ALEX (Alternated Laser Excitation) [117] genannt.

Gepulste Anregung eines Farbstoffes kann neben der alternierten Anregung auch dazu verwendet werden, die Fluoreszenzlebensdauer des Farbstoffes zu bestimmen. Die Fluoreszenzlebensdauer ist dabei stark von Wechselwirkungen des Dipols des Farbstoffes mit seiner Umgebung abhängig. Z.B. lässt sich bei FRET eine Verringerung der Fluoreszenzlebensdauer des Donor-Farbstoffes beobachten. Dieser Effekt wird beim sogenannten Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) ausgenutzt [118].

Im konfokalen Mikroskop werden die Fluktuationen innerhalb eines beugungsbegrenzten Volumens beobachtet. Dies ermöglicht lediglich die Charakterisierung der Diffusionseigenschaften eines fluoreszenzmarkierten Moleküls auf der Längenskala der Licht-

wellenlänge. Weitergehende Informationen zur temporären Bindung eines fluoreszierenden Moleküls an die Plasmamembran oder zur Diffusion in der Membran über eine größere Strecke werden durch Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRF-Microscopy) zugänglich [119].

Bei totaler Reflexion entsteht ein exponentiell abfallendes evaneszentes Lichtfeld. Dieses Lichtfeld kann genutzt werden, um Fluoreszenz außerhalb des reflektierenden Mediums anzuregen. Zur experimentellen Realisierung für ein entsprechendes Fluoreszenzmikroskop wird das Anregungslicht entweder über ein Prisma oder durch ein Mikroskopobjektiv im flachen Winkel durch Immersionsöl in das Deckglas geleitet, auf dem sich die Probe in wässrigem Medium befindet. Das Lichtfeld in der Probe hat in Abhängigkeit vom Brechungsindex des Deckglases und des Einfallswinkel eine Eindringtiefe von der Größenordnung 10 nm. Somit lässt sich ein Fluoreszenzmikroskop realisieren, bei dem oberflächennahe Strukturen mit einer axialen Auflösung in der Größenordnung 10 nm abgebildet werden können [120].

Aufgrund der geringen Eindringtiefe des evaneszenten Lichtfeldes in die Zelle erhält man neben der hohen axialen Auflösung auch sehr wenig unspezifische Fluoreszenz aus dem Zellinneren. Die Kombination von TIRF-Mikroskopie und Single Particle Tracking eignet sich sehr gut, um die Diffusion von Proteinen mit einer nicht bleichenden fluoreszierenden Markierung in der Plasmamembran einer adhärenen Zelle zu beobachten [121].

Durch Anwendung der Methoden der Einzelmolekülspektroskopie werden zellbiologische Fragestellungen adressierbar, die bisher mit etablierten zellbiologischen Methoden nicht untersucht werden konnten. Die Umsetzung dieser Methoden in kommerziellen Systemen, die teils in den letzten Jahren durchgeführt wurde, teils in der Entwicklung steht, wird zu einer weiteren Verbreitung dieser Methoden insbesondere unter Biologen und Medizinern führen.

5 Zusammenfassung

Die Methoden der Einzelmolekülspektroskopie werden seit Mitte der 90er Jahre in anstiegenderem Maße für Untersuchungen in Modellsystemen in der Biochemie und Molekularbiologie angewandt [5]. Die Anwendung dieser Methoden auf biologische Fragestellungen zu Untersuchungen in lebenden Zellen stellt dagegen ein noch junges und noch kaum verbreitetes Fachgebiet dar. Die Herausforderungen, Einzelmolekülspektroskopiemethoden, die in Modellsystemen etabliert wurden, auf die Bedingungen in lebenden Zellen zu übertragen, liegen in einem verminderten Signal-Rausch-Verhältnis und in der Notwendigkeit, bestimmte Moleküle in ihrer zellulären Umgebung hoch spezifisch zu markieren. Um eine größere Verbreitung dieser Methoden zur direkten Untersuchungen biologischer Fragestellungen in lebenden Zellen zu erreichen, sind Verbesserungen vor allem der photophysikalischen Eigenschaften der Fluoreszenzmarkierungen gegenüber den bisher verbreiteten Markierungen notwendig.

In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, Konzepte zu alternativen Fluoreszenzmarkierungen mit Hinblick auf verbesserte photophysikalische Eigenschaften zu untersuchen und anzuwenden. Zum einen wurden an fluoreszierenden Nanodiamanten mit NV-Zentren eine Reihe von Experimenten durchgeführt mit dem Ziel, diese als Fluoreszenzmarkierung zur Anwendung in lebenden Zellen zu etablieren. Zum Anderen wurde die bislang wenig verbreitete Markierungsmethode der Tags (ACP-Tag) genutzt, um die Vorteile einer genspezifischen Markierung von autofluoreszierenden Proteinen und die photophysikalischen Eigenschaften von synthetischen Farbstoffen zu kombinieren. Das gegenüber autofluoreszierenden Proteinen erhöhte Signal-Rausch-Verhältnis führte hierbei zu Resultaten, die bei der Verwendung von autofluoreszierenden Proteinen nicht zu erreichen gewesen wären. Die wichtigsten Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

Nanodiamanten mit NV-Zentren

Ziel der Experimente war es, auf die Nutzung fluoreszierender Nanodiamanten als Fluoreszenzmarkierung in lebenden Zellen hinzuführen. Dabei wurden verschiedene Aspekte wie die spezifische Anbindung eines Proteins, die Stabilität der Nanodiamanten als

kolloidale Lösung in physiologischem Puffer und das Einbringen und Beobachten von Nanodiamanten in lebende Zellen untersucht.

Die Bindung funktionalisierter Nanodiamanten an ein Protein konnte am Beispiel von biotinylierten Kristalliten demonstriert werden. Zum Nachweis der Bindung wurden FCS-Messungen durchgeführt, die die Diffusion des fluoreszenzmarkierten Streptavidin und der Nanodiamanten charakterisieren.

Nanodiamanten, deren Oberfläche nach der Herstellung nicht chemisch modifiziert wurde, liegen in wässriger Umgebung in der Regel nicht als stabile kolloidale Lösung vor. Insbesondere in physiologischer Pufferlösung aggregieren solche Kristallite. Zur Stabilisierung der kolloidalen Lösung wurden durch eine Behandlung mit konzentrierten, stark oxidierenden Säuren Carboxylgruppen an der Oberfläche der Kristallite erzeugt. Diese dissoziieren in Wasser, somit liegen die Nanodiamanten mit geladenen Oberflächen in wässriger Umgebung vor. Die Oberflächenladung führt zu erhöhter Stabilität der Kristallite in kolloidalen Lösungen. Durch ausschließliches Behandeln mit Säure konnte so aber keine stabile kolloidale Lösung in physiologischem Puffer erzeugt werden, da die Ladungsdichte nicht ausreicht, um ein abstoßendes Potential zwischen den Kristalliten zu bilden. Hierzu ist eine weitere Erhöhung der Ladungsdichte oder ein Anbinden von Polymeren an die Oberfläche notwendig.

Das Einbringen von Nanodiamanten in lebende Zellen wurde über Endozytose und über Mikroinjektion demonstriert. Zur Verifizierung, dass sich Kristallite im Inneren der Zellen befinden, wurden Aufnahmen im konfokalen Mikroskop durchgeführt. Die Plasmamembran wurde eingefärbt. Die Detektion der 40 nm großen Kristallite innerhalb der Zelle erfolgte wahlweise über Streuung der Kristallite oder Fluoreszenz der NV-Zentren. Die Nanodiamanten im Inneren der Zelle konnten sowohl lateral als auch axial innerhalb des Volumens, das von der markierten Plasmamembran eingeschlossen wurde, lokalisiert werden.

Single Particle Tracking wurde an Nanodiamanten sowohl in Glycerin als auch in lebenden Zellen erfolgreich eingesetzt. Die Analyse der Diffusion endozytotisch aufgenommener Kristallite in der Zelle zeigte, dass sowohl eingeschränkte Diffusion auf einer Projektionsfläche mit ca. $1\ \mu\text{m}$ Radius als auch gerichteter Transport mit einer Geschwindigkeit der Größenordnung $0,1\ \mu\text{m s}^{-1}$ zu beobachtet waren. Diese Werte sind vergleichbar mit den Diffusionseigenschaften, die für Endosome berichtet werden [62].

Zur Etablierung von Nanodiamanten mit NV-Zentren als Fluoreszenzmarker in lebenden Zellen sind weitere Schritte notwendig. Um auch bei kleinen Durchmessern (< 10 nm) noch eine hohe Dichte der NV-Zentren im Kristalliten zu erreichen, ist eine Erhöhung der Dichte der NV-Zentren in Diamant erforderlich. Darüber hinaus ist die Stabilisierung kolloidaler Nanodiamantenlösung in physiologischem Puffer notwendig.

Gegenüber der Mikroinjektion und der Aufnahme über Endozytose kommt die Aufnahme von Fremdkörpern über Carrier-Peptide als weitere Möglichkeit in Betracht, Nanodiamanten in Zellen einzubringen. Auf diesem Weg wird die Umhüllung der Kristallite durch eine Lipidmembran (Endozytose) verhindert, und sie binden bei geeigneter Funktionalisierung an ein Protein im Zytoplasma. Gleichzeitig nehmen im Gegensatz zur Mikroinjektion sämtliche Zellen Kristallite auf. Zur Markierung von Proteinen in lebenden Zellen stellt dieser Weg somit eine weitere aussichtsreiche Methode dar. Bisher konnte eine solche Aufnahme über Carrier-Peptide jedoch nicht verifiziert werden.

Untersuchungen von Signaltransduktionsprozessen in der Plasmamembran lebender Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Experimente an genspezifisch markierten Proteinen (autofluoreszierende Proteine und Tags) zur Untersuchung der Ausbildung von Proteinkomplexen in der Plasmamembran lebender Zellen vorgestellt. Dabei wurden Experimente durchgeführt, die ohne Verwendung von Tags nicht realisierbar gewesen wären. Die Methoden der Einzelmolekülspektroskopie wurden zur Untersuchung der Ausbildung zweier verschiedener Proteinkomplexe benutzt.

Der TNF-Rezeptor-Komplex wird durch äußere Stimulierung mit dem Liganden TNF in der Plasmamembran lebender Zellen ausgebildet. Anhand früherer Messungen wurde bei der Ausbildung des TNF-Rezeptor 2-Komplexes eine deutliche Verlangsamung der Diffusion nach Stimulierung beobachtet. Zwei Modelle, die diese Beobachtung erklären, wurden im Vorfeld dieser Arbeit diskutiert. Mit der Erstellung und Analyse von PCHs aus Fluoreszenzzeitspuren von GFP-markiertem TNF-Rezeptor 2 konnte ein Modell verworfen werden, das die Ausbildung eines Clusters beschreibt. Somit ist davon auszugehen, dass das alternative Modell einer Anbindung des Rezeptor-Komplexes an eine langsam diffundierende Struktur der Zelle, wie z. B. Caveolae, gültig ist. Die detaillierte Aufklärung der Stöchiometrie des Rezeptor-Komplexes, ob also TNF-Rezeptor 2 im Komplex dimer oder trimer vorliegt, war auf Grund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses, bedingt durch die Verwendung autofluoreszierender Proteine, nicht möglich.

CNTF-Rezeptor-Komplexe bilden sich in der Plasmamembran durch Stimulierung mit dem Liganden CNTF aus. Zur Untersuchung der Stöchiometrie dieses Komplexes wurden mit ACP-Tag markierte CNTF-Liganden und CNTF-Rezeptoren verwendet. Anhand von Auto- und Kreuzkorrelations-, FRET-Experimenten und PCH-Analysen wurde verifiziert, dass Komplexe mit zwei CNTF-Liganden und zwei CNTF-Rezeptoren in der Plasmamembran vorliegen. Die quantitative Analyse der Daten ergab, dass 8% der CNTF-Rezeptoren einen Liganden banden und diese Rezeptor-Ligand-Paare zu 20 – 100% in Komplexen mit je zwei CNTF-Rezeptoren bzw. zwei CNTF-Liganden vorlagen. Darüber hinaus wurde aus den FRET-Messungen der Abstand zwischen zwei CNTF-Liganden in einem solchen Komplex auf 5 – 7 nm bestimmt. Der Abstand zwischen zwei Rezeptoren betrug mehr als 8 nm.

Im Vorfeld dieser Untersuchungen wurden ein tetrameres und ein hexameres Modell für den CNTF-Rezeptor-Komplex diskutiert (siehe Abb. 4.7). Anhand der Messungen wurde das tetramere Modell ausgeschlossen. In Kombination mit weiteren Untersuchungen [109, 110] wird im Rahmen dieser Arbeit neben dem hexameren Modell auch ein octamerer Modell vorgeschlagen (siehe Abb. 4.14). Das hexamere Modell beinhaltet dabei nur einen LIF-Rezeptor, das octamere dagegen zwei. Somit kann ein weiterführendes Experiment, das die Kreuzkorrelation unterschiedlich markierter LIF-Rezeptoren untersucht, zur Verifizierung des hexameren bzw. oktameren Modells führen.

Die erfolgreichen Untersuchungen am CNTF-Rezeptor-Komplex mit Kreuzkorrelations- und FRET-Experimenten an Proteinen mit ACP-Tag waren nur durch die Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses gegenüber Messungen an einem System mit autofluoreszierenden Proteinen möglich.

Die Anwendung der in dieser Arbeit vorgestellten Methoden der Einzelmolekülspektroskopie ermöglicht es, zellbiologische Fragestellungen zu beantworten, die mit bisher etablierten zellbiologischen Methoden nicht untersucht werden konnten. In den letzten Jahren wurden solche Methoden bereits in kommerzielle Systeme eingeführt bzw. sie stehen in der Entwicklung. So ist in den kommenden Jahren eine weitere Verbreitung der Methoden der Einzelmolekülspektroskopie insbesondere unter Biologen und Medizinern zu erwarten.

Literaturverzeichnis

- [1] WE MOERNER and L KADOR. Optical-Detection and spectroscopy of single molecules in a solid. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, 62(21):2535–2538, May 1989.
- [2] M ORRIT and J BERNARD. Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a Para-Terphenyl crystal. *PHYSICAL REVIEW LETTERS*, 65(21):2716–2719, November 1990.
- [3] E BETZIG and RJ CHICHESTER. Single molecules observed by Near-Field scanning optical microscopy. *SCIENCE*, 262(5138):1422–1425, November 1993.
- [4] T FUNATSU, Y HARADA, M TOKUNAGA, K SAITO, and T YANAGIDA. Imaging of single fluorescent molecules and individual atp turnovers by single myosin molecules in Aqueous-Solution. *NATURE*, 374(6522):555–559, April 1995.
- [5] C Joo, H Balci, Y Ishitsuka, C Buranachai, and T Ha. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY*, 77:51–76, 2008.
- [6] T Ha, T Enderle, DF Ogletree, DS Chemla, PR Selvin, and S Weiss. Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF*, 93(13):6264–6268, June 1996.
- [7] T Schmidt, GJ Schutz, W Baumgartner, HJ Gruber, and H Schindler. Imaging of single molecule diffusion. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF*, 93(7):2926–2929, April 1996.
- [8] H Noji, R Yasuda, M Yoshida, and K Kinosita. Direct observation of the rotation of F-1-ATPase. *NATURE*, 386(6622):299–302, March 1997.

- [9] T Nishizaka, K Oiwa, H Noji, S Kimura, E Muneyuki, M Yoshida, and K Kinoshita. Chemomechanical coupling in F-1-ATPase revealed by simultaneous observation of nucleotide kinetics and rotation. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*, 11(2):142–148, February 2004.
- [10] A Yildiz, JN Forkey, SA McKinney, T Ha, YE Goldman, and PR Selvin. Myosin v walks hand-over-hand: Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *SCIENCE*, 300(5628):2061–2065, June 2003.
- [11] G Seisenberger, MU Ried, T Endress, H Buning, M Hallek, and C Brauchle. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *SCIENCE*, 294(5548):1929–1932, November 2001.
- [12] M Ueda, Y Sako, T Tanaka, P Devreotes, and T Yanagida. Single-molecule analysis of chemotactic signaling in dictyostelium cells. *SCIENCE*, 294(5543):864–867, October 2001.
- [13] O SHIMOMURA, FH JOHNSON, and Y SAIGA. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, aequorea. *JOURNAL OF CELLULAR AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY*, 59(3):223–&, 1962.
- [14] GS Harms, L Cognet, PHM Lommerse, GA Blab, and T Schmidt. Autofluorescent proteins in single-molecule research: Applications to live cell imaging microscopy. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 80(5):2396–2408, May 2001.
- [15] R Iino, I Koyama, and A Kusumi. Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 80(6):2667–2677, June 2001.
- [16] GS Harms, L Cognet, PHM Lommerse, GA Blab, H Kahr, R Gamsjager, HP Spaink, NM Soldatov, C Romanin, and T Schmidt. Single-molecule imaging of l-type ca²⁺ channels in live cells. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 81(5):2639–2646, November 2001.
- [17] PHM Lommerse, GA Blab, L Cognet, GS Harms, BE Snaar-Jagalska, HP Spaink, and T Schmidt. Single-molecule imaging of the H-Ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic lealet of the cell membrane. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 86(1):609–616, 2004.

- [18] J Yu, J Xiao, XJ Ren, KQ Lao, and XS Xie. Probing gene expression in live cells, one protein molecule at a time. *SCIENCE*, 311(5767):1600–1603, March 2006.
- [19] X Michalet, FF Pinaud, LA Bentolila, JM Tsay, S Doose, JJ Li, G Sundaresan, AM Wu, SS Gambhir, and S Weiss. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *SCIENCE*, 307(5709):538–544, 2005.
- [20] C Kural, H Kim, S Syed, G Goshima, VI Gelfand, and PR Selvin. Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: A tug-of-war or coordinated movement? *SCIENCE*, 308(5727):1469–1472, June 2005.
- [21] XL Nan, PA Sims, P Chen, and XS Xie. Observation of individual microtubule motor steps in living cells with endocytosed quantum dots. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*, 109(51):24220–24224, December 2005.
- [22] A Gruber, A Drabenstedt, C Tietz, L Fleury, J Wrachtrup, and C vonBorczykowski. Scanning confocal optical microscopy and magnetic resonance on single defect centers. *SCIENCE*, 276(5321):2012–2014, June 1997.
- [23] Helen M O’Hare, Kai Johnsson, and Arnaud Gautier. Chemical probes shed light on protein function. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(4):488–494, August 2007. PMID: 17851069.
- [24] Dieter Gerlach. *Geschichte der Mikroskopie*. Deutsch, Harri, Verlag GmbH, 1 edition, November 2008.
- [25] O Shimomura. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *JOURNAL OF MICROSCOPY-OXFORD*, 217:3–15, 2005.
- [26] DC PRASHER, VK ECKENRODE, WW WARD, FG PRENDERGAST, and MJ CORMIER. Primary structure of the Aequorea-Victoria Green-Fluorescent protein. *GENE*, 111(2):229–233, February 1992.
- [27] M CHALFIE, Y TU, G EUSKIRCHEN, WW WARD, and DC PRASHER. Green fluorescent protein as a marker for Gene-Expression. *SCIENCE*, 263(5148):802–805, February 1994.
- [28] SW Hell. Far-field optical nanoscopy. *SCIENCE*, 316(5828):1153–1158, May 2007.
- [29] W Wallace, LH Schaefer, and JR Swedlow. A workingperson’s guide to deconvolution in light microscopy. *BIOTECHNIQUES*, 31(5):1076–+, November 2001.

- [30] RH Webb. Confocal optical microscopy. *REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS*, 59(3):427–471, March 1996.
- [31] WE Moerner and DP Fromm. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS*, 74(8):3597–3619, August 2003.
- [32] K JACOBSON, ED SHEETS, and R SIMSON. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *SCIENCE*, 268(5216):1441–1442, June 1995.
- [33] Y Chen, JD Muller, KM Berland, and E Gratton. Fluorescence fluctuation spectroscopy. *METHODS-A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY*, 19(2):234–252, October 1999.
- [34] VV Skakun, MA Hink, AV Digris, R Engel, EG Novikov, VV Apanasovich, and AJWG Visser. Global analysis of fluorescence fluctuation data. *EUROPEAN BIOPHYSICS JOURNAL WITH BIOPHYSICS LETTERS*, 34(4):323–334, June 2005.
- [35] P Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 34(3):383–408, 2001.
- [36] T Weidemann, M Wachsmuth, M Tewes, K Rippe, and J Langowski. Analysis of ligand binding by two-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy. *SINGLE MOLECULES*, 3(1):49–61, 2002.
- [37] B Huang, TD Perroud, and RN Zare. Photon counting histogram: One-photon excitation. *CHEMPHYSICHEM*, 5(10):1523–1531, October 2004.
- [38] T FORSTER. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *ANNALEN DER PHYSIK*, 2(1-2):55–75, 1948.
- [39] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Berlin, 3rd ed. edition, August 2006.
- [40] BNG Giepmans, SR Adams, MH Ellisman, and RY Tsien. Review - the fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *SCIENCE*, 312(5771):217–224, April 2006.

- [41] R Hein and RY Tsien. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *CURRENT BIOLOGY*, 6(2):178–182, February 1996.
- [42] G Patterson, RN Day, and D Piston. Fluorescent protein spectra. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 114(5):837–838, March 2001.
- [43] A Muller-Taubenberger and KI Anderson. Recent advances using green and red fluorescent protein variants. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 77(1):1–12, November 2007.
- [44] ACP Synthase(P9301), ACP-tag, NEB. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productP9301.asp>
- [45] X Michalet, F Pinaud, TD Lacoste, M Dahan, MP Bruchez, AP Alivisatos, and S Weiss. Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling. *SINGLE MOLECULES*, 2(4):261–276, 2001.
- [46] AT COLLINS, MF THOMAZ, and MIB JORGE. Luminescence decay time of the 1.945 eV center in type Ib diamond. *JOURNAL OF PHYSICS C-SOLID STATE PHYSICS*, 16(11):2177–2181, 1983.
- [47] NB Manson, JP Harrison, and MJ Sellars. Nitrogen-vacancy center in diamond: Model of the electronic structure and associated dynamics. *PHYSICAL REVIEW B*, 74(10), September 2006.
- [48] F Treussart, V Jacques, E Wu, T Gacoin, P Grangier, and JF Roch. Photoluminescence of single colour defects in 50 nm diamond nanocrystals. *PHYSICA B-CONDENSED MATTER*, 376:926–929, April 2006.
- [49] VM TITOV, VF ANISICHKIN, and IY MALKOV. Synthesis of ultradispersed diamond in detonation-waves. *COMBUSTION EXPLOSION AND SHOCK WAVES*, 25(3):372–379, June 1989.
- [50] B.P. Tolochko, V.M. Titov, A.P. Chernyshev, K.A. Ten, E.R. Prueel, I.L. Zhogin, P.I. Zubkov, N.Z. Lyakhov, L.A. Lukyanchikov, and M.A. Sheromov. Physical-chemical model of processes at detonation synthesis of nanodiamonds. *Diamond and Related Materials*, 16(12):2014–2017, December 2007.

- [51] A Krueger, M Ozawa, G Jarre, Y Liang, J Stegk, and L Lu. Deagglomeration and functionalisation of detonation diamond. *PHYSICA STATUS SOLIDI A-APPLICATIONS AND MATERIALS SCIENCE*, 204(9):2881–2887, September 2007.
- [52] ZZ Liang, X Jia, HA Ma, CY Zang, PW Zhu, QF Guan, and H Kanda. Synthesis of HPHT diamond containing high concentrations of nitrogen impurities using NaN₃ as dopant in metal-carbon system. *DIAMOND AND RELATED MATERIALS*, 14(11-12):1932–1935, December 2005.
- [53] AS Barnard and M Sternberg. Can we predict the location of impurities in diamond nanoparticles? *DIAMOND AND RELATED MATERIALS*, 16(12):2078–2082, December 2007.
- [54] BR Smith, DW Inglis, B Sandnes, JR Rabeau, AV Zvyagin, D Gruber, CJ Noble, R Vogel, E Osawa, and T Plakhotnik. Five-Nanometer diamond with luminescent Nitrogen-Vacancy defect centers. *SMALL*, 5(14):1649–1653, July 2009.
- [55] C. Uzan-Saguy, C. Cytermann, R. Brener, V. Richter, M. Shaanan, and R. Kalish. Damage threshold for ion-beam induced graphitization of diamond. *Applied Physics Letters*, 67(9):1194–1196, 1995.
- [56] A Krueger. Diamond nanoparticles: Jewels for chemistry and physics. *ADVANCED MATERIALS*, 20(12):2445–+, June 2008.
- [57] Jacob N. Israelachvili and Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces: With Applications to Colloidal and Biological Systems*. Academic Pr Inc, 0002 edition, November 1991.
- [58] T Soldati and M Schliwa. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY*, 7(12):897–908, December 2006.
- [59] Anke Krueger, Jochen Stegk, Yuejiang Liang, Li Lu, and Gerald Jarre. Biotinylated nanodiamond: Simple and efficient functionalization of detonation diamond. *Langmuir*, 24(8):4200–4204, April 2008.
- [60] F Neugart, A Zappe, F Jelezko, C Tietz, JP Boudou, A Krueger, and J Wrachtrup. Dynamics of diamond nanoparticles in solution and cells. *NANO LETTERS*, 7(12):3588–3591, December 2007.

- [61] JR Rabeau, P Reichart, G Tamanyan, DN Jamieson, S Prawer, F Jelezko, T Gae-
bel, I Popa, M Domhan, and J Wrachtrup. Implantation of labelled single nitrogen
vacancy centers in diamond using n-15. *APPLIED PHYSICS LETTERS*, 88(2),
2006.
- [62] G Apodaca. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: Role of the actin and
microtubule cytoskeleton. *TRAFFIC*, 2(3):149–159, March 2001.
- [63] M Lakadamyali, MJ Rust, and XW Zhuang. Ligands for clathrin-mediated en-
docytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes.
CELL, 124(5):997–1009, March 2006.
- [64] ZY Liang, N Xu, YH Guan, M Xu, QH He, QD Han, YY Zhang, and XS
Zhao. The transport of alpha(1A)-adrenergic receptor with 33-nm step size in
live cells. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICA-
TIONS*, 353(2):231–237, February 2007.
- [65] Chi-Cheng Fu, Hsu-Yang Lee, Kowa Chen, Tsong-Shin Lim, Hsiao-Yun Wu, Po-
Keng Lin, Pei-Kuen Wei, Pei-Hsi Tsao, Huan-Cheng Chang, and Wunshain Fann.
Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular
biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3):727–732,
2007.
- [66] Anke Krüger. Persönliche mitteilung.
- [67] Anke Krueger and Thorsten Boedeker. Deagglomeration and functionalisation of
detonation nanodiamond with long alkyl chains. *Diamond and Related Materials*,
17(7-10):1367–1370, 2008.
- [68] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and
Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 5 edition, November
2007.
- [69] Julia Tisler, Gopalakrishnan Balasubramanian, Boris Naydenov, Roman Kolesov,
Bernhard Grotz, Rolf Reuter, Jean-Paul Boudou, Patrick A. Curmi, Mohamed Sen-
nour, Alain Thorel, Michael Börsch, Kurt Aulenbacher, Rainer Erdmann, Philip R.
Hemmer, Fedor Jelezko, and Jörg Wrachtrup. Fluorescence and spin properties of
defects in single digit nanodiamonds. *ACS Nano*, 3(7):1959–1965, July 2009.

- [70] JH Gao and B Xu. Applications of nanomaterials inside cells. *NANO TODAY*, 4(1):37–51, February 2009.
- [71] YP Chang, F Pinaud, J Antelman, and S Weiss. Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots. *JOURNAL OF BIOPHOTONICS*, 1(4):287–298, September 2008.
- [72] MA Walling, JA Novak, and JRE Shepard. Quantum dots for live cell and in vivo imaging. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 10(2):441–491, February 2009.
- [73] V Levi and E Gratton. Exploring dynamics in living cells by tracking single particles. *CELL BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 48(1):1–15, 2007.
- [74] SJ Yu, MW Kang, HC Chang, KM Chen, and YC Yu. Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 127(50):17604–17605, December 2005.
- [75] YR Chang, HY Lee, K Chen, CC Chang, DS Tsai, CC Fu, TS Lim, YK Tzeng, CY Fang, CC Han, HC Chang, and W Fann. Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *NATURE NANOTECHNOLOGY*, 3(5):284–288, May 2008.
- [76] Orestis Faklaris, Damien Garrot, Vandana Joshi, Frederic Druon, Jean-Paul Boudou, Thierry Sauvage, Patrick Georges, Patrick A. Curmi, and Francois Treussart. Detection of single photoluminescent diamond nanoparticles in cells and study of the internalization pathway. *Small*, 4(12):2236–2239, 2008.
- [77] Orestis Faklaris, Vandana Joshi, Theano Irinopoulou, Patrick Tauc, Hugues Girard, Celine Gesset, Mohamed Senour, Alain Thorel, Jean-Charles Arnault, Jean-Paul Boudou, Patrick A. Curmi, and François Treussart. Determination of the internalization pathway of photoluminescent nanodiamonds in mammalian cells for biological labeling and optimization of the fluorescent yield, July 2009.
- [78] KK Liu, CC Wang, CL Cheng, and JI Chao. Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells. *BIOMATERIALS*, 30(26):4249–4259, September 2009.
- [79] V Vaijayanthimala and HC Chang. Functionalized fluorescent nanodiamonds for biomedical applications. *NANOMEDICINE*, 4(1):47–55, 2009.

- [80] AS Barnard. Diamond standard in diagnostics: nanodiamond biolabels make their mark. *ANALYST*, 134(9):1751–1764, 2009.
- [81] G Balasubramanian, IY Chan, R Kolesov, M Al-Hmoud, J Tisler, C Shin, C Kim, A Wojcik, PR Hemmer, A Krueger, T Hanke, A Leitenstorfer, R Bratschitsch, F Jelezko, and J Wrachtrup. Nanoscale imaging magnetometry with diamond spins under ambient conditions. *NATURE*, 455(7213):648–U46, October 2008.
- [82] Steffen Steinert. Unveröffentlichte daten.
- [83] Bastien D. Gomperts, Ijsbrand M. Kramer, and Peter E. R. Tatham. *Signal Transduction*. Academic Press, new edition edition, October 2003.
- [84] H Wajant, K Pfizenmaier, and P Scheurich. Tumor necrosis factor signaling. *CELL DEATH AND DIFFERENTIATION*, 10(1):45–65, 2003.
- [85] Pathway central: TNF signaling. http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=TNF_Signaling.
- [86] RM Locksley, N Killeen, and MJ Lenardo. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *CELL*, 104(4):487–501, February 2001.
- [87] M GRELL, E DOUNI, H WAJANT, M LOHDEN, M CLAUSS, B MAXEINER, S GEORGOPOULOS, W LESSLAUER, G KOLLIAS, K PFIZENMAIER, and P SCHEURICH. The transmembrane form of Tumor-Necrosis-Factor is the prime activating ligand of the 80 kda Tumor-Necrosis-Factor receptor. *CELL*, 83(5):793–802, December 1995.
- [88] DW BANNER, A DARCY, W JANES, R GENTZ, HJ SCHOENFELD, C BROGER, H LOETSCHER, and W LESSLAUER. Crystal-Structure of the soluble human 55 kd tnf Receptor-Human TNF-Beta complex - implications for tnf receptor activation. *CELL*, 73(3):431–445, May 1993.
- [89] Peter Scheurich. Persönliche mitteilung.
- [90] N Holler, A Tardivel, M Kovacsovics-Bankowski, S Hertig, O Gaide, F Martignon, A Tinel, D Deperthes, S Calderara, T Schulthess, J Engel, P Schneider, and E Tschopp. Two adjacent trimeric fas ligands are required for fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 23(4):1428–1440, February 2003.

- [91] A Krippner-Heidenreich, F Tubing, S Bryde, S Willi, G Zimmermann, and P Scheurich. Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 277(46):44155–44163, November 2002.
- [92] Margarita Gerken. *FCS investigations on the diffusional behaviour of TNF-Receptors upon stimulation in living cells*. Univ., Diss., 2008 (Nicht für den Austausch), Stuttgart, 2008.
- [93] T Wohland, R Rigler, and H Vogel. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 80(6):2987–2999, June 2001.
- [94] M SENDTNER, GW KREUTZBERG, and H THOENEN. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *NATURE*, 345(6274):440–441, May 1990.
- [95] PD Lambert, KD Anderson, MW Sleeman, V Wong, J Tan, A Hjarunguru, TL Corcoran, JD Murray, KE Thabet, GD Yancopoulos, and SJ Wiegand. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF*, 98(8):4652–4657, April 2001.
- [96] MA Febbraio. Gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, 117(4):841–849, April 2007.
- [97] PC Heinrich, I Behrmann, G Muller-Newen, F Schaper, and L Graeve. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *BIOCHEMICAL JOURNAL*, 334:297–314, September 1998.
- [98] RA Linker, M Maurer, S Gaupp, R Martini, B Holtmann, R Giess, P Rieckmann, H Lassmann, KV Toyka, M Sendtner, and R Gold. CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: A neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *NATURE MEDICINE*, 8(6):620–624, June 2002.
- [99] DF Emerich, SR Winn, PM Hantraye, M Peschanski, EY Chen, YP Chu, P McDermott, EE Baetge, and JH Kordower. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of huntington’s disease. *NATURE*, 386(6623):395–399, March 1997.

- [100] I Gloaguen, P Costa, A Demartis, D Lazzaro, A DiMarco, R Graziani, G Paonessa, F Chen, CI Rosenblum, LHT VanderPloeg, R Cortese, G Ciliberto, and R Laufer. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF*, 94(12):6456–6461, June 1997.
- [101] G PAONESSA, R GRAZIANI, A DESERIO, R SAVINO, L CIAPPONI, A LAHM, AL SALVATI, C TONIATTI, and G CILIBERTO. 2 distinct and independent sites on il-6 trigger gp130 dimer formation and signaling. *EMBO JOURNAL*, 14(9):1942–1951, May 1995.
- [102] A DESERIO, R GRAZIANI, R LAUFER, G CILIBERTO, and G PAONESSA. In-Vitro binding of ciliary neurotrophic factor to its receptors - evidence for the formation of an IL-6-Type hexameric complex. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY*, 254(5):795–800, December 1995.
- [103] D Man, W He, KH Sze, K Gong, DK Smith, G Zhu, and NY Ip. Solution structure of the c-terminal domain of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) receptor and ligand free associations among components of the CNTF receptor complex. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 278(26):23285–23294, June 2003.
- [104] G Skiniotis, MJ Boulanger, KC Garcia, and T Walz. Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *NATURE STRUCTURAL & MOLECULAR BIOLOGY*, 12(6):545–551, June 2005.
- [105] G Skiniotis, PJ Lupardus, M Martick, T Walz, and KC Garcia. Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *MOLECULAR CELL*, 31(5):737–748, September 2008.
- [106] SV Costes, D Daelemans, EH Cho, Z Dobbin, G Pavlakis, and S Lockett. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 86(6):3993–4003, June 2004.
- [107] Felix Neugart, Andrea Zappe, Deborah M. Buk, Inna Ziegler, Steffen Steinert, Monika Schumacher, Eva Schopf, Ralph Bessey, Kathrin Wurster, Carsten Tietz, Michael Börsch, Jörg Wrachtrup, and Lutz Graeve. Detection of ligand-induced CNTF receptor dimers in living cells by fluorescence cross correlation spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(9):1890–1900, September 2009.

- [108] RB MUJUMDAR, LA ERNST, SR MUJUMDAR, CJ LEWIS, and AS WAGONER. Cyanine dye labeling reagents - sulfoindocyanine succinimidyl esters. *BIOCONJUGATE CHEMISTRY*, 4(2):105–111, April 1993.
- [109] B Giese, C Roderburg, M Sommerauer, SB Wortmann, S Metz, PC Heinrich, and G Muller-Newen. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *JOURNAL OF CELL SCIENCE*, 118(21):5129–5140, November 2005.
- [110] G Hansen, TR Hercus, BJ McClure, FC Stomski, M Dottore, J Powell, H Ramshaw, JM Woodcock, YB Xu, M Guthridge, WJ McKinstry, AF Lopez, and MW Parker. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *CELL*, 134(3):496–507, August 2008.
- [111] J Ries and P Schwille. New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS*, 10(24):3487–3497, 2008.
- [112] K Bacia, SA Kim, and P Schwille. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *NATURE METHODS*, 3(2):83–89, February 2006.
- [113] QQ Ruan, MA Cheng, M Levi, E Gratton, and WW Mantulin. Spatial-temporal studies of membrane dynamics: Scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCS). *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 87(2):1260–1267, August 2004.
- [114] J Ries and P Schwille. Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 91(5):1915–1924, September 2006.
- [115] E Thews, M Gerken, R Eckert, J Zapfel, C Tietz, and J Wrachtrup. Cross talk free fluorescence cross correlation spectroscopy in live cells. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 89(3):2069–2076, September 2005.
- [116] BK Muller, E Zaychikov, C Brauchle, and DC Lamb. Pulsed interleaved excitation. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 89(5):3508–3522, November 2005.
- [117] NK Lee, AN Kapanidis, Y Wang, X Michalet, J Mukhopadhyay, RH Ebright, and S Weiss. Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *BIOPHYSICAL JOURNAL*, 88(4):2939–2953, April 2005.

- [118] H Wallrabe and A Periasamy. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY*, 16(1):19–27, February 2005.
- [119] D AXELROD. Total Internal-Reflection fluorescence microscopy. *METHODS IN CELL BIOLOGY*, 30:245–270, 1989.
- [120] GI Mashanov, D Tacon, AE Knight, M Peckham, and JE Molloy. Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy. *METHODS*, 29(2):142–152, February 2003.
- [121] RM Shaw, AJ Fay, MA Puthenveedu, M von Zastrow, YN Jan, and LY Jan. Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *CELL*, 128(3):547–560, February 2007.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu allererst geht mein Dank an Prof. Jörg Wrachtrup, der mir die Möglichkeit gegeben hat, am 3. Physikalischen Institut zu promovieren. Prof. Clemens Bechinger danke ich für die freundliche Übernahme des Mitberichts.

Für die Betreuung und für zahlreiche Ratschläge in biophysikalischen Fragen danke ich Carsten Tietz und Fedor Jelezko für die Unterstützung bei experimentellen Problemen und bei Fragen aller Art im Zusammenhang mit Nanodiamanten.

Für Ratschläge jeder Art zu Beginn der Promotion sowie für konstruktive Kritik beim Anfertigen dieser Abhandlung danke ich Sebastian Schuler. Andrew Aird, der während der Anfertigung dieser Abhandlung stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir mit vielen guten Ratschlägen helfen konnte, gilt mein ganz besonderer Dank.

Im Rahmen der Durchführung der Experimente an lebenden Zellen wurde eine große Zahl von Proben benötigt. Für die Bereitstellung dieser Proben und die gute Zusammenarbeit danke ich Andrea Zappe. Steffen Steinert danke ich für die schöne Zeit der Zusammenarbeit und für etliche Ratschläge besonders bei Fragen zu MATLAB. Für die Bereitstellung des Programms Burst Analyzer sowie für die Unterstützung bei den durchgeführten Simulationen danke ich Nawid Zarrabi

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des 3. Physikalischen Instituts möchte ich für die gute Stimmung und Arbeitsatmosphäre am Institut danken.

Diese Arbeit wäre ohne Kooperationspartner anderer Institute nicht möglich gewesen. Prof. Lutz Graeve und seinen Mitarbeitern von der Universität Hohenheim danke ich für die Kooperation im Rahmen der Untersuchung des CNTF-Rezeptor Komplexes. Prof. Peter Scheurich vom Institut für Zellbiologie und Immunologie an der Universität Stuttgart danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen der Studien am TNF-Rezeptor

Komplex. Für Ratschläge und die Bereitstellung verschiedener Proben danke ich Prof. Anke Krüger von der Universität Würzburg.

Nicht zuletzt Danke ich meinen Eltern, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht haben, für ihre Unterstützung und Ratschläge in allen Lagen.

