

Georg Seisenberger

**Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. C. Bräuchle betreut.

**Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 21. Februar 2001

Georg Seisenberger

Mikroskopische Untersuchungen  
zum Infektionsweg von  
Adeno-assoziierten Viren in lebenden HeLa-Zellen  
auf der Ebene einzelner Moleküle  
und  
Modelluntersuchungen zu FRET



Dissertation eingereicht am 1. März 2001  
1. Gutachter: Prof. Dr. C. Bräuchle  
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Hallek  
Mündliche Prüfung am 26. März 2001

Dissertation aus dem Fachgebiet Physikalische Chemie  
Angefertigt im Arbeitskreis Prof. Dr. C. Bräuchle  
Department für Chemie  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Mikroskopische Untersuchungen  
zum Infektionsweg von  
Adeno-assoziierten Viren in lebenden HeLa-Zellen  
auf der Ebene einzelner Moleküle  
und  
Modelluntersuchungen zu FRET

Georg Seisenberger  
aus  
München

2001

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Grundlagen der Einzelmoleküldetektion	9
2.1 Optischen Übergänge	9
2.1.1 Jablonski-Termschema	9
2.1.2 Einführung von Zwei- und Dreiniveausystem	11
2.1.3 Das Ratenmodell: mathematische Behandlung von Zwei- und Dreiniveausystem	12
2.1.4 Sättigungsverhalten: Lösung der Ratengleichungen	15
2.1.5 Photobleichen - Einführung eines vierten Niveaus	22
2.1.6 Kurzer Abriss der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	23
3. Möglichkeiten der Einzelmoleküldetektion	27
3.1 Techniken der Einzelmoleküldetektion	27
3.1.1 Das Problem von Signal-zu-Rauschen	27
3.1.2 Spektrale versus räumliche Isolierung	28
3.1.3 Einzelmoleküldetektion durch konfokale Mikroskopie	30
3.1.4 Einzelmoleküldetektion durch Imaging mit Weitfeldanregung	33
3.1.5 Einzelmolekülmikroskopie mit räumlicher Separation: verschiedene Techniken	35
3.2 Bedeutung von Einzelmoleküluntersuchungen	36
3.2.1 Einzelmoleküluntersuchungen im Vergleich zu Ensemblemessungen: prinzipielle Unterscheidung	36
3.2.2 Experimentelle Möglichkeiten der Einzelmoleküldetektion	37
3.2.3 Bislang bearbeitete experimentelle Fragestellungen der Einzelmoleküldetektion in Life Science	41
4. Theorie der Diffusion von Biomolekülen	43
4.1 Diffusionsgesetze	43

4.1.1 Mikroskopischer Ansatz	43
4.1.2 Makroskopischer Ansatz	45
4.1.3 Diffusion bis hin zur Adsorption	48
4.1.4 Diffusion mit Drift	50
4.1.5 Berechnung von Diffusionskoeffizienten mit dem Gesetz von Einstein-Stokes	52
4.2 Methoden der Diffusionsmessung	54
4.3 Diffusion in biologischen Systemen	58
5. Adeno-Assoziierte-Viren (AAV)	62
5.1 Bedeutung und Replikation	62
5.2 Genomorganisation von AAV	63
5.3 Struktur des Kapsids	65
5.4 AAV als Vektor in der Gentherapie	66
5.5 Der Eindring-Mechanismus von AAV in HeLa-Zellen	69
6. Experimenteller Aufbau	72
6.1 Konfokale Mikroskopie	72
6.1.1 Optischer Anregungs-Strahlengang	72
6.1.2 Bewegung der Probe	74
6.1.3 Optische Detektion	74
6.2 Durchführung der Messungen mit dem konfokalen Aufbau	75
6.2.1 Aufnahme optischer Bilder	75
6.2.2 Aufnahme von Fluoreszenzzeitspuren lokaler Stellen	76
6.2.3 Aufnahme von Fluoreszenzspektren	76
6.2.4 Verwendung der polarisationsdrehenden Einheit	77
6.3 Imaging mit Weitfeldanregung durch Modifikation des konfokalen Mikroskops	77
6.3.1 Imaging-Aufbau	77
6.3.2 Optimierung der Fokussierung	78
6.3.3 Einstellung des Pinholes	80
6.4 Probensysteme und ihre Präparierung	82
6.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe in dünnen Polymerfilmen aus Polyvinylbutyral	82
6.4.2 HeLa-Zellen und gelabelte Biomoleküle: IgG gelabelt mit Cy5 und AAV gelabelt mit Cy5	83

7. Experimentelle Ergebnisse und Diskussion	88
7.1 Testproben	88
7.2 Typische Einzelmolekülexperimente bei Raumtemperatur (TDI in PVB)	94
7.3 Sättigungsverhalten und Photostabilität von Fluoreszenzfarbstoffen: Cy5 in verschiedenen Matrizen und TDI in PVB	100
7.4 Einzelmolekülnachweis in Zellen: IgG-Cy5 in lysierten HeLa-Zellen	107
7.5 Diffusion in wässrigem Medium und in Glycerol-Wasser-Mischungen	112
7.5.1 Diffusionskoeffizientenbestimmung durch Single Particle Tracking	112
7.5.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von IgG und AAV mit SPT	114
7.6 Aufnahme-Mechanismus von AAV in lebende HeLa-Zellen	118
7.6.1 Beobachtung der Stationen der Infektion	119
7.6.2 Andocken und Eindringen	122
7.6.3 Diffusionsverhalten im Plasma	134
7.6.4 Bewegung im Kern	141
8. Untersuchungen zum Förster-Resonanz-Energie-Transfer	147
8.1. Prinzipielle Möglichkeiten der Energieübertragung	147
8.2 Förster-Theorie des dipolaren Energietransfers	150
8.3 Bedeutung des FRET für die Einzelmoleküldetektion in der Biologie	151
8.4 Der Bichromophor Perylen gekoppelt mit Terrylendiimid	155
8.5 Experimente zum Energietransfer	156
8.5.1 Qualitative Voruntersuchungen	156
8.5.2 Bestimmung der Orientierung der individuellen Chromophore durch Polarisationsspektroskopie	158
8.5.3 Modellrechnung zur theoretischen Identifikation der Konformationen des Bichromophors	161
8.5.4 Versuch der Identifizierung einzelner Konformationen durch Vergleich Experiment mit Rechnung	162
8.5.5 Zusammenfassung und Problembewertung des Experiments	166
9. Zusammenfassung	167
Literaturverzeichnis	169

geklärt werden, inwieweit der Transport von AAV über sog. Endosomen stattfindet. Außerdem sollte der Einfluß von intrazellulären Strukturen auf des freie Diffusionsverhalten des Virus aufgeklärt werden. Beide Problematiken wurden wieder mit SDT untersucht. Der letzte Schritt der viralen Wanderung in der Zelle ist das Eindringen in den Zellkern bzw. die Wanderung darin. Dazu sollte die Art der Bewegung von AAV wieder mit Hilfe von SDT charakterisiert werden. Umgekehrt sollte die Frage geklärt werden, in wie fern das Wanderungsverhalten im Kern Hinweise auf die intranukleare Strukturen geben kann. Die Bestimmung der Zeitspanne von Viruszugabe bis zum Nachweis von immobilisierten Viren im Kern sollte schließlich der Charakterisierung der Infektionszeit des Virus dienen.

Die vorliegende Arbeit ist im wesentlichen in einen theoretischen und einen experimentellen Teil gegliedert. Unter Theorie fallen dabei Grundlagen der Einzelmoleküldetektion (Kapitel 2), Möglichkeiten der Einzelmoleküldetektion (Kapitel 3), Grundlagen der Diffusionstheorie (Kapitel 4) und die Biochemie von AVV (Kapitel 5). Der experimentelle Teil umfaßt den apparativen Aufbau und die untersuchten Probensysteme (Kapitel 6) sowie experimentelle Ergebnisse und Diskussion der mikroskopischen Untersuchungen an Einzelmolekülsystemen (Kapitel 7). Das Kapitel 8 skizziert Arbeiten zum Energietransfer an einem Modellsystem.

## 1. Einleitung

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen Experimente mit einzelnen Farbstoffmolekülen, die als Label für biologische Systeme genutzt oder auch per se in einer Polymerrmatrix untersucht werden. Die einzelnen Chromophore werden, räumlich separiert, durch Einstrahlung von monochromatischem Laserlicht elektronisch angeregt. Ihre Fluoreszenz wird optisch-mikroskopisch detektiert. Diese Form der Einzelmoleküldetektion (*single molecule detection, SMD*) hat in den letzten Jahren u.a. dazu geführt, daß neuartige biowissenschaftliche Fragestellungen beantwortet werden konnten. Die historische Entwicklung von den ersten Schritten des Einzelmolekülnachweises hin zu biologischen Anwendungen der SMD werden im folgenden umrissen.

Noch 1952 war Erwin Schrödinger der Überzeugung, daß es niemals möglich sein werde, mit einzelnen Elektronen, Atomen oder Molekülen zu experimentieren [1]. Bereits acht Jahre später legte Richard Feynman dar, daß es keine prinzipiellen physikalischen Grenzen gäbe, gezielt mit Atomen zu hantieren [2]. Die experimentelle Wissenschaft hat seither, vor allem in den letzten 15 Jahren, auf dem Weg zur Analysierbarkeit immer kleinerer Strukturen erhebliche Fortschritte gemacht. Exemplarisch sei hier nur an die Verleihung des Nobelpreises (Physik) für Binnig und Rohrer 1986 erinnert, die die Rastertunnelmikroskopie (*STM, Scanning Tunneling Microscopy*) entwickelten, mit der detaillierte Aufnahmen und Experimente mit einzelnen Atomen und Molekülen auf metallisch leitenden Oberflächen möglich sind [3]. Fragestellungen der modernen Nanotechnologie auf der Ebene einzelner Moleküle sind bis heute eng mit STM-Experimenten verbunden [4]. Mit rasterkraft-mikroskopischen Verfahren [5] (*atomic force microscopy, AFM*), ist es möglich, atomare Auflösung auch auf Isolatoroberflächen zu erzielen. 1995 konnte Giessibl erstmals auf Silizium-Oberflächen zeigen, daß durch den Einsatz von Frequenzmodulationstechniken AFM-Experimente mit einer lateralen Auflösung von etwa 0,1 nm auch auf die Untersuchungen solcher Oberflächen ausgeweitet werden können, bei denen Spitze und Probe miteinander Bindungen eingehen [6]. Neben den physikalischen Techniken STM und AFM entstand im Bereich der Biologie schon Mitte der siebziger Jahre ein optisches Verfahren, das auf Hirschfeld zurückgeht. Damit war es möglich, einzelne Antikörper, die mit etwa 100 Fluorophoren gelabelt waren, nachzuweisen [7]. Zusammen mit Block und Mueller konzipierte er wenig später ein auf diesem Verfahren basierendes Gerät zum Nachweis und Klassifizierung von Viren [8]. Er versuchte erstmals beim Nachweis von einzelnen Teilchen mit kleinen Anregungsvolumina und sog. *time-gated detectors* zu arbeiten, um das Fluoreszenzsignal gegenüber dem Untergrund zu verbessern. In den achtziger Jahren versuchte eine Gruppe um Keller die Sensitivität der Detektion von fluoreszierenden Molekülen durch die Verwendung des sog. *hydrodynamical focussed flow* zu

verbessern [9, 10]. Der erste Nachweis eines einzelnen Fluorophors in biologisch relevanter Umgebung gelang 1990 mit dieser Methode [11]. Etwa zur selben Zeit konnten in den unabhängig voneinander arbeitenden Gruppen von Moerner und Orrit Einzelmoleküle, die in Wirtskristalle eingebaut waren, bei tiefen Temperaturen durch spektrale Selektion nachgewiesen werden [12, 13]. Anfang der neunziger Jahre wurden dann weitere Techniken etabliert, die es ermöglichten, einzelne Biomoleküle durch den Einsatz von gläsernen Mikronadeln [14, 15] oder von sog. *optical tweezers* [16, 17] gezielt zu fixieren oder zu manipulieren. Parallel dazu gelang in der SMD ein entscheidender Fortschritt durch den Einsatz von mikroskopischen Verfahren, die bei Raumtemperatur an in dünnen Polymerfilmen oder auf Glasoberflächen immobilisierten Fluorophoren arbeiteten. Zunächst entstanden hierbei Techniken im optischen Nahfeld (*scanning nearfield optical microscopy, SNOM*). Durch den Einsatz von metallbedampften Glasfaserspitzen konnte hierbei mit Anregungsvolumina gearbeitet werden, die das Beugungslimit unterschritten [18-22]. Später wurde auf die beugungslimitierte Mikroskopie im Weitfeld [23, 24], z. B. die konfokale Mikroskopie, zurückgegriffen. Da diese Methode „bei hundertmal weniger Aufwand nur etwa fünfmal schlechtere Auflösung“ als SNOM [25] bietet, die Signalqualität keinesfalls schlechter ist und keinerlei optische Informationen verlorengehen, ist die Bedeutung der konfokalen Mikroskopie in jüngster Zeit gestiegen, die der Nahfeldmikroskopie stark zurückgegangen. Mitte der neunziger Jahre gelang es, durch die stetige Verbesserung des Signal-zu-Untergrund-Verhältnisses und nicht zuletzt durch den Einsatz hochempfindlicher CCD Kameras einzelne Moleküle mit Imaging Techniken im Nah- und Weitfeld zu untersuchen. Erstmals konnten mobile Moleküle in ihrer Bewegung individuell und in Echtzeit verfolgt werden: In der Gruppe von Yanagida und Kinosita wurde die ATP getriebene Wanderung von Myosin auf Actin-Filamenten untersucht [26, 27], Vale berichtete über die Wanderung von Kinesin entlang von Mikrotubuli [28], die Gruppe um Schmidt und Schindler charakterisierte die zweidimensionale Diffusion einzelner Farbstoffmoleküle in Lipiddoppelschichten [29], und Moerner beobachtete die dreidimensionale Diffusion von Farbstoffmolekülen in Gelen [30]. Etwa um diese Zeit gelang es, aus der im Flüssigkeitsstrom arbeitenden Methode heraus Einzelmoleküluntersuchungen im Laserfokus in wäßrigem Medium durchzuführen. Keller sah in dieser Technik die Möglichkeit einer schnellen DNA-Sequenzierung. Wenn es gelänge, jede Base durch einen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und die DNA genügend schnell durch den Fokus zu schießen sowie die erhaltenen Daten der Sequenz mit Computern genügend schnell auszulesen, wäre die Entschlüsselung des menschlichen Genoms prinzipiell möglich. Die Identifizierung von Chromophortypen wurde durch die Analyse des Fluoreszenzsignals im Laserfokus, der sog. *Bursts*, in sehr kurzer Detektionszeit möglich, indem man beispielsweise Fluoreszenz-Lebensdauer oder spektrale Position bestimmen konnte [31]. Rigler und Nie erweiterten die Detektionsmethode im Laserfokus u.a. durch die Kombination mit der statistischen Auswertung der Autokorrelationsfunktion [32-34]. Weitere Versuche, das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis bei der Einzelmoleküldetektion zu verbessern, führten in jüngster Zeit zur Anwendung der Zweiphotonenanregung [35-37]. Ein entscheidender Nachteil, den diese Technik allerdings mit sich bringt, ist die Erhöhung der Photobleichwahrscheinlichkeit der untersuchten Farbstoffe.

In den letzten fünf Jahren trug die Einzelmoleküldetektion dazu bei, daß Forschungsgebiete, die bislang mit klassischer Fluoreszenzmikroskopie arbeiteten, weiterentwickelt werden konnten. Besondere Aktualität kommt dabei vor allem den Biowissenschaften zu. Dies hängt in erster Linie damit zusammen, daß die neue Technik der SMD Fragestellungen beantworten kann, die mit bisherigen Methoden nicht zugänglich waren. Es handelt sich hierbei

z.B. um die Aufklärung dynamischer Eigenschaften von individuellen Biomolekülen oder um die individuelle Funktionalität von Untereinheiten in molekularen Maschinen, die bislang in Ensembleexperimenten stets durch Mittelwertbildung oder summative Effekte verlorengingen. In den Feldern Biologische Motoren, DNA-Transkription, Enzymatischer Umsatz, Proteindynamik und Signaltransfer in Zellen haben sich erste SMD-Arbeitsgruppen etabliert [38].

Die vorliegende Arbeit beinhaltet Untersuchungen, die im Bereich der Virologie und Gentherapie ihren Ursprung haben. Hierbei wird der Aufnahmemechanismus des sog. *adeno associated virus (AAV)* in lebende Zellen (HeLa-Zellen) mit SMD untersucht. Die Methode bietet in diesem speziellen Fall den Vorteil, mit physiologisch relevanten Virenkonzentrationen arbeiten zu können. Die Grundlagenforschung im Bereich der Gentherapie, die versucht, rekombinante Vektoren von AAV als sog. *Genshuttle* im Kampf gegen Krankheiten einzusetzen, kann mit SMD, speziell mit *single dye tracing (SDT)*, letztendlich auf ein bildgebendes Verfahren zurückgreifen, das mit einer Ortsauflösung im Bereich von etwa 40 Nanometer in Echtzeit Trajektorien von einzelnen Viren bestimmen kann. Damit kann Einblick in mechanistische Vorgänge erhalten werden, die sich in lebenden Zellen abspielen. Solche Untersuchungen sind aber nach dem derzeitigen Kenntnisstand auch innovativ für den Bereich der Einzelmolekülmikroskopie, da sie erstmals belegen, daß einzelne Farbstoffmoleküle in lebenden Zellen, im Cytoplasma und im Zellkern, nachgewiesen und zur Bestimmung von Wanderungs-Trajektorien von Viren mittels SDT eingesetzt werden können. Denkbar ist auch, daß das Potential der SDT-Methode in Bereichen, wie etwa bei der Entwicklung antiviraler Substanzen in der Pharmaforschung, Anwendung findet, selbst wenn die Einschätzung konkreter Perspektiven bislang noch schwierig ist.

Im einzelnen wurden folgende experimentelle Fragestellungen bearbeitet. Zunächst galt es die Photostabilität des Sondenmoleküls Cyanin5 (Cy5) zu charakterisieren. Hierzu wurde an einer statistisch relevanten Zahl von einzelnen Cy5-Molekülen, die in dünne Polymerfilme eingebettet waren, das Sättigungs- und das Bleichverhalten des Farbstoffes studiert und quantifiziert. In einem weiteren Schritt mußte der Nachweis erbracht werden, daß Cy5-Einzelmoleküle in zellulären Systemen detektierbar sind. Dieser wurde mit Hilfe von Cy5-gelabelten Antikörpern (Immunglobulin G) in permeabilisierten menschlichen Tumorzellen, sog. HeLa-Zellen, durchgeführt. Im dritten Schritt sollte das Diffusionsverhalten von Immunglobulin G und von Adeno-assoziierten Viren in wäßriger Lösung charakterisiert werden. Dies sollte mit Hilfe der Methode des SDT erfolgen, bei der Einzeltrajektorien von Partikeln anhand des Sondenmoleküls verfolgt werden können. Letztendlich sollte aus Einzelbewegungsschritten ein Diffusionskoeffizient von Antikörper bzw. Virus ermittelt werden.

Nach diesen Vorarbeiten konnte die Einzelmolekül-Untersuchung von AAV in lebenden Zellen begonnen werden. Folgende Stationen des Eindringmechanismus von AAV in lebende HeLa Zellen galt es zu untersuchen: Zum ersten sollte die Effizienz des Virus-Eintritts in die Zelle durch die Zellmembran bestimmt werden. Dazu mußte eine statistisch relevante Anzahl an Trajektorien, die Virus-Kontakt mit der Zellmembran von außen her zeigten, aufgenommen werden. Diese Trajektorien mußten untergliedert werden in solche, die ein Eindringen in die Zelle zeigten und in solche, die Membrankontakt mit anschließendem Verlassen der Zellregion zeigten. Desweiteren sollten Eindringzeiten in die Zelle ermittelt werden und mit den Zeiten verglichen werden, die mit Hilfe anderer Methoden bislang bestimmt worden waren. Außerdem sollte ein stochastisches Modell erstellt werden, um die Häufigkeit des negativen Andockverhaltens des Virus an der Zellmembran erklären zu können. Bei der zweiten Station der Virus-Wanderung, nämlich der Wanderung innerhalb des Cytoplasmas, sollte die Frage

### 2.1.3 Das Ratenmodell: mathematische Behandlung von Zwei- und Dreiniveausystem

Mit Hilfe einer kinetischen Betrachtung der Modelle Zwei- und Dreiniveausystem kann man wichtige Größen ableiten, die zur Definition der sog. *Fluoreszenzzählrate*  $R_F$  nötig sind. Diese ist die zentrale Meßgröße der Einzelmoleküldetektion.

Geht man von einem Zweiniveausystem aus, lassen sich die zeitlichen Änderungen der Besetzungswahrscheinlichkeiten  $n_i$  für Grund- ( $i=1$ ) und angeregten Zustand ( $i=2$ ) gemäß Gleichung (2-1) formulieren. Es soll eine Lösung von  $n_2$  hergeleitet werden. Dabei ist  $p$  die Rate der Anregung,  $k_{21}$  die Gesamt-Rate des Übergangs vom angeregten Zustand in den Grundzustand - ganz gleich, ob strahlend oder nicht strahlend.  $x$  ist entweder 1 bei Systemen, in denen die stimulierte Emission eine Rolle spielt, oder 0 bei solchen, in denen hauptsächlich nur spontane Emission auftritt.

$$\begin{aligned} \dot{n}_1 &= -pn_1 + (xp + k_{21})n_2 \\ \dot{n}_2 &= pn_1 - (xp + k_{21})n_2 \end{aligned} \quad (2-1)$$

Dieses Gleichungssystem ist im allgemeinen Fall eines inhomogenen Gleichungssystems nicht lösbar, da linear abhängige Vektoren, nämlich die Koeffizienten von  $n_1$  und  $n_2$ , auftreten.

Als homogenes Gleichungssystem, in dem beide Ableitungen Null sind, besitzt (2-1) einfach unendliche Lösungsmannigfaltigkeit.

Setzt man als Randbedingung die Normierung (2-2) ein, reduziert sich das Problem auf ein Differentialgleichungssystem erster Ordnung (2-3).

$$1 = n_1 + n_2 \quad \text{und} \quad 0 = \dot{n}_1 + \dot{n}_2 \quad (2-2)$$

$$\begin{pmatrix} -1 \\ 1 \end{pmatrix} \dot{n}_2 = \begin{pmatrix} -p \\ p \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} (x+1)p + k_{21} \\ -(x+1)p - k_{21} \end{pmatrix} n_2 \quad \dot{n}_1 = 0 \text{ (stationärer Fall)} \quad (2-3)$$

Da in beiden Zeilen die gleiche Gleichung auftritt, genügt es, das eindimensionale Problem zu lösen (2-4).

$$\dot{n}_2 = p - ((1+x)p + k_{21})n_2 \quad \text{allg.:} \quad \dot{n}_2 = -an_2 + b \quad (2-4)$$

$n_2$  läßt sich allgemein als zeitabhängige Variable ermitteln (2-5). Der erste Summand dieser Lösung ist zeitunabhängig und stellt gleichzeitig die stationäre Lösung (2-6) von (2-4) dar. Für

## 2. Grundlagen der Einzelmoleküldetektion

Wenn in dieser Arbeit von „Einzelmolekülspektroskopie“, oder „Einzelmolekülmikroskopie“, die Rede ist, wird dabei stets impliziert, daß als charakteristische Größe das *Fluoreszenzlicht*, das von einem einzelnen Molekül abgestrahlt wird, entweder spektroskopisch oder mikroskopisch detektiert wird. Damit begrenzt sich die mögliche Anzahl der mit diesen Methoden untersuchbaren Substanzen prinzipiell auf solche, die entweder selbst fluoreszieren oder fluoreszierende funktionelle Gruppen oder Untereinheiten besitzen. Es lassen sich also nur Fluoreszenzfarbstoffe oder mit solchen verknüpfte bzw. gelabelte Moleküle nachweisen.

### 2.1 Optische Übergänge

Quantenmechanische Untersuchungen der Wechselwirkung zwischen sichtbarem Licht und Materie, also Lichtwelle und Molekül, führen dazu, daß Lichtabsorption und -emission als Übergänge zwischen diskreten Energieniveaus anzusehen sind.

Allgemein können optische Übergänge eines Systems durch ein sog. *Jablonski-Termschema* dargestellt werden. Einige mathematischen Überlegungen an den in 2.1.2 eingeführten Modellen Zwei- und Dreiniveausystem führen in 2.1.3 hin zu den für die Einzelmolekülspektroskopie zentralen photophysikalischen Eigenschaften eines Fluorophors: zum *Sättigungsverhalten* (2.1.4) und zum *Photobleaching* (2.1.5). Ferner wird kurz auf die Grundlagen der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie eingegangen (2.1.6).

#### 2.1.1 Jablonski-Termschema

Die optischen Übergänge, die in einem Farbstoffmolekül auftreten, können in einem sog. *Jablonski-Termschema* (Abbildung 2.1) dargestellt werden. Die einzelnen Energieniveaus bzw. Terme setzen sich dabei aus einem elektronischen, einem vibronischen und einem rotatorischen Anteil zusammen. Die Auswahlregeln in einem System, das gemäß der Born-Oppenheimer-Näherung jedem elektronischen Niveau ein eigenes Schwingungspotential zuordnet, können nach dem Franck-Condon-Prinzip ermittelt werden. Genau kann dies der Literatur entnommen werden [39, 40, 41].

Der elektronische Grundzustand ist ein Singulett-Zustand und wird mit  $S_0$  bezeichnet, der angeregte Singulett-Zustand als  $S_1$ . Das Zweiniveausystem umfaßt nur diese beiden Singulett-Zustände, im Dreiniveausystem kommt noch der Triplett-Zustand  $T_1$  hinzu. Weitere Energieniveaus werden nicht betrachtet.

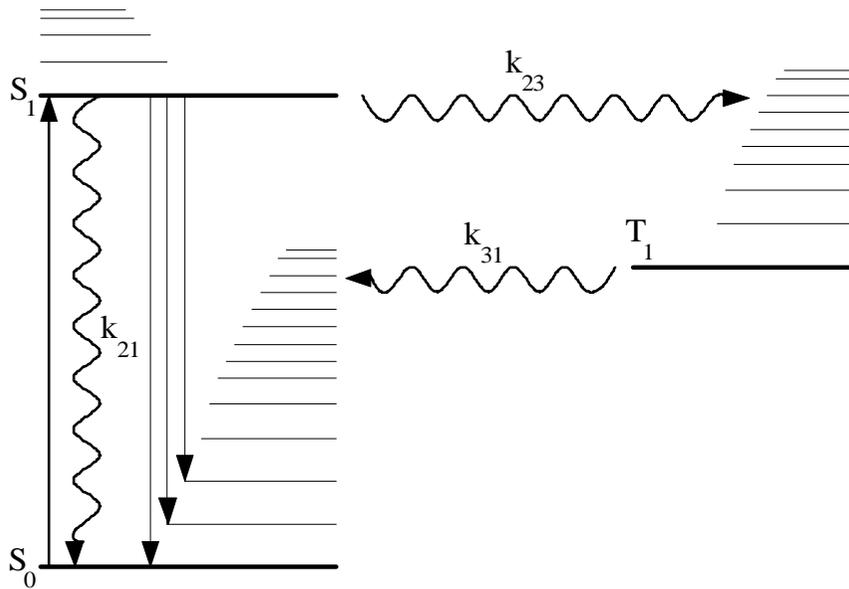


Abbildung 2.1 Jablonski-Term-Schema eines elektronischen (optischen) Dreiniveausystems. Neben den elektronischen Niveaus sind Schwingungszustände eingezeichnet. Die Rotationszustände sind in der Darstellung weggelassen.

Erfolgt die Anregung von  $S_0$  nach  $S_1$  mit einer durchstimmbaren Lichtquelle, erhält man ein Absorptionsspektrum, das im Prinzip die Superposition aller Übergänge von  $S_0$  in jedes der verschiedenen vibronischen oder rotatorischen Subniveaus von  $S_1$  darstellt, gewichtet durch die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Überganges nach dem Franck-Condon-Prinzip. Der niederenergetischste Übergang erfolgt in den vibronischen und rotatorisch niederenergetischsten Zustand von  $S_1$ . Er kann, im Vakuum gemessen, als charakteristische Größe (0,0-Übergang) betrachtet werden. In Lösung kann es je nach Solvens zu unterschiedlichen Verschiebungen relativ zur Vakuumübergangsfrequenz kommen. Zusätzlich zu diesem sog. *solvent shift* kommt es zur inhomogenen Verbreiterung der Absorptionslinie. Ähnliches gilt für die Verbreiterung der Emissionslinie [42, 43].

Schwingungsangeregte Zustände des  $S_1$ -Zustandes zerfallen innerhalb von Picosekunden. Nach dieser Schwingungsrelaxation kann das angeregte System, ausgehend vom Schwingungsgrundzustand in  $S_1$ , entweder strahlend unter Abgabe von Fluoreszenzlicht oder nicht-strahlend durch *internal conversion* in den  $S_0$ -Grundzustand zurückkehren. Im Dreiniveausystem wird zudem der eigentlich verbotene Übergang in den Triplett-Zustand  $T_1$  (*intersystem crossing*) berücksichtigt. Von hier wird in der Regel strahlungslos wieder der Grundzustand erreicht. Die bei der Fluoreszenz abgestrahlte Energie ist wegen den strahlungslosen Energieverlusten in  $S_1$  kleiner als die bei der Absorption aufgenommene. Auch hier sind Übergänge in alle Schwingungsniveaus von  $S_0$  möglich. Analog zum Absorptionsspektrum erhält man gemäß den jeweiligen Übergangswahrscheinlichkeiten nach dem Franck-Condon-Prinzip ein Fluoreszenzspektrum.

In vielen Lösungsmitteln oder Matrizen ist der (0,0-Übergang) der Fluoreszenz gegenüber dem der Absorption langwellig verschoben (*Stokes Shift*). Dieser Effekt kann nur mit Hilfe einer dynamischen Änderung der Potentialtopf-Niveaus von  $S_1$  und  $S_0$  entlang einer geometrischen Molekülkoordinate erklärt werden, nicht mit dem einfachen Jablonski-Termschema.

### 2.1.2 Einführung von Zwei- und Dreiniveausystem

Reduziert man ein Jablonski-Termschema nur auf die elektronischen Zustände, kommt man zum je nach Zahl der betrachteten Niveaus sog. Zwei- bzw. zum Dreiniveausystem. Man benennt die hier auftretenden Energieniveaus mit  $n_1$ ,  $n_2$  und  $n_3$ . Die Relaxations-Übergänge zwischen diesen Niveaus werden mit  $k_{21}$ ,  $k_{23}$ , und  $k_{31}$  bezeichnet, die Pumprate der Anregung von  $n_1$  nach  $n_2$  (und zurück) mit  $p$ . Abbildung 2.2 zeigt ein Dreiniveausystem schematisch.

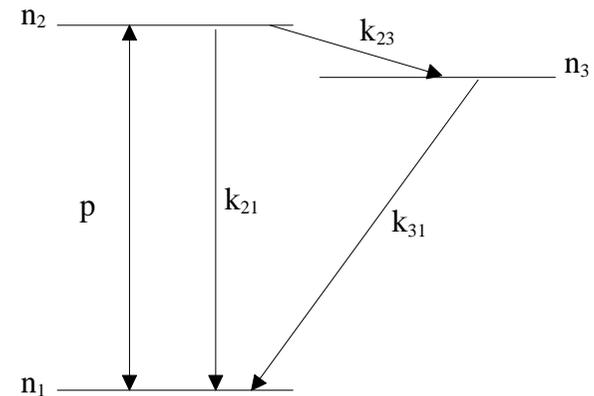


Abbildung 2.2 Dreiniveausystem als Vereinfachung eines Jablonski-Termschemas

$$s = \frac{\ln(10)e}{N_A} \quad (2-20)$$

$$I = \frac{dE}{Adt} = \frac{phc}{I s} \quad (2-21)$$

Als dritte und vierte Größe werden in (2-22) die sog. *Sättigungsintensität*  $I_s$  und die *Sättigungsrate*  $p_s$  eingeführt.

$$p_s = p(n_2 = \frac{1}{2}n_2(t = \infty))$$

$$I_s = I(n_2 = \frac{1}{2}n_2(t = \infty)) \quad (2-22)$$

Die Zahl der emittierten Photonen pro Sekunde  $R_F$  in einem Zweiniveau kann nun aus (2-19) bestimmt werden.  $R_F$  ist das Produkt aus Fluoreszenzquantenausbeute, Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Niveaus und  $S_1$ -  $S_0$ -Übergangsrate (2-23):

$$R_F = \Phi k_{21} n_2(t) = \Phi t_{21}^{-1} n_2(t) \quad (2-23)$$

Im stationären Fall ( $t \rightarrow \infty$ ) gilt dann explizit Gleichung (2-24). Der Graph einer solchen Funktion ( $x/(x+k)$ ) wird als *Sättigungskurve* (Abbildung 2.3) bezeichnet.

$$n_2^\infty = \frac{p}{p(x+1) + k_{21}} \longleftrightarrow R_F^\infty = \frac{\Phi k_{21} p}{p(x+1) + k_{21}} \quad (2-24)$$

Ihr Verlauf läßt sich durch folgende Fallunterscheidung charakterisieren (2-25).

$$a) p \gg k_{21} (p \rightarrow \infty): R_F = \Phi k_{21} \frac{1}{x+1}$$

$$b) p \ll k_{21}: R_F = \Phi k_{21} \frac{p}{k_{21}} = \Phi p \quad (2-25)$$

Im Fall a), also für große Anregungsraten, nähert sich der Funktionswert einer waagrechten Asymptote an. Im Fall b), bei kleinen Anregungsraten, ist der Kurvenverlauf linear. Aus Gleichung (2-24) kann mit Hilfe von (2-21) die Gleichung (2-26) erhalten werden, die den funktionellen Zusammenhang von Fluoreszenzzählrate  $R_F$  und Anregungsintensität  $I$  beschreiben.

unendlich große Zeiten  $t$  geht die Exponentialfunktion im zweiten Summanden gegen 0, so daß dieser wegfällt. Die Ableitung von  $n_2$  wird dann 0.

$$n_2(t) = \frac{b}{a} + \left(-\frac{b}{a} + n_2^0\right) e^{-at}$$

$$n_2(t) = \frac{p}{(x+1)p + k_{21}} + \left(-\frac{p}{(x+1)p + k_{21}} + n_2^0\right) e^{-(x+1)p + k_{21}t} \quad (2-5)$$

$$n_2^\infty = \frac{p}{(1+x)p + k_{21}} \quad (2-6)$$

Ein etwas komplexer wirkendes mathematisches Problem stellt die Lösung des analogen Gleichungssystems im Dreiniveausystem dar. Das dritte Niveau ( $i=3$ ) wird nur vom zweiten Niveau aus (ohne Anregung) bevölkert und zum ersten hin entvölkert. Die entsprechenden Raten  $k_{23}$  und  $k_{31}$  müssen zusätzlich zu  $n_3$  (und einer dritten Gleichung) eingeführt werden (2-7).

$$\begin{pmatrix} \dot{n}_1 \\ \dot{n}_2 \\ \dot{n}_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -p \\ p \\ 0 \end{pmatrix} n_1 + \begin{pmatrix} xp + k_{21} \\ -(xp + k_{21} + k_{23}) \\ k_{23} \end{pmatrix} n_2 + \begin{pmatrix} k_{31} \\ 0 \\ -k_{31} \end{pmatrix} n_3 \quad (2-7)$$

Auch dieses Gleichungssystem ist im allgemeinen, inhomogenen Fall nicht lösbar, da auch hier linear abhängige Vektoren auftreten: Zwei Zeilen lassen sich immer als Linearkombination der dritten darstellen.

Als homogenes Gleichungssystem besitzt (2-7) wieder einfach unendliche Lösungsmannigfaltigkeit.

Die Randbedingung der Normierung zeigt (2-8). Setzt man sie in (2-7) ein, erhält man (2-9).

$$n_3 = 1 - n_1 - n_2 \text{ bzw. } \dot{n}_3 = -\dot{n}_1 - \dot{n}_2 \quad (2-8)$$

$$\begin{pmatrix} \dot{n}_1 \\ \dot{n}_2 \\ -\dot{n}_2 - \dot{n}_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -p - k_{31} \\ p \\ k_{31} \end{pmatrix} n_1 + \begin{pmatrix} xp + k_{21} - k_{31} \\ -(xp + k_{21} + k_{23}) \\ k_{23} + k_{31} \end{pmatrix} n_2 + \begin{pmatrix} k_{31} \\ 0 \\ -k_{31} \end{pmatrix} n_3 \quad (2-9)$$

Das so entstandene Gleichungssystem (2-9) ist im homogenen Fall wieder exakt lösbar. Im inhomogenen Fall geht man zweckmäßig wie folgt vor: Das dreidimensionale Problem wird auf ein zweidimensionales zurückgeführt (2-10).

$$\begin{pmatrix} \dot{n}_2 \\ \dot{n}_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(xp+k_{21}+k_{23}) \\ xp+k_{21}-k_{31} \end{pmatrix} n_2 + \begin{pmatrix} p \\ -p-k_{31} \end{pmatrix} n_1 + \begin{pmatrix} 0 \\ k_{31} \end{pmatrix} \quad (2-10)$$

Dieses kann mit Hilfe der Eliminationsmethode [49] und der Lösung einer Differentialgleichung zweiter Ordnung noch exakt und ohne Transformation gelöst werden. Die allgemeine Lösung eines solchen Gleichungssystems (2-11) zeigt (2-12).

$$\begin{pmatrix} \dot{z} \\ \dot{y} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{g} \end{pmatrix} z + \begin{pmatrix} \mathbf{b} \\ \mathbf{d} \end{pmatrix} y + \begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \end{pmatrix} \quad (2-11)$$

$$z(t) = \frac{b_2 \mathbf{b} - b_1 \mathbf{d}}{\mathbf{ad} - \mathbf{bg}} + c_1 e^{\frac{1}{2}(a+d+\sqrt{(a+d)^2-4ad+4bg})t} + c_2 e^{\frac{1}{2}(a+d-\sqrt{(a+d)^2-4ad+4bg})t} \quad (2-12)$$

Damit erhält man  $n_2$  als  $n_2(t)$ , wie in (2-13) dargestellt.

$$n_2(t) = \frac{p}{p(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}})+k_{21}+k_{23}} + c_1 e^{\frac{1}{2}(-(\lambda p+k_{21}+k_{23}+p+k_{31})+\sqrt{(\lambda p+k_{21}+k_{23}+p+k_{31})^2-4(\lambda p+k_{21}+k_{23})(p+k_{31})+4(\lambda p+k_{21}-k_{31})p})t} + c_2 e^{\frac{1}{2}(-(\lambda p+k_{21}+k_{23}+p+k_{31})-\sqrt{(\lambda p+k_{21}+k_{23}+p+k_{31})^2-4(\lambda p+k_{21}+k_{23})(p+k_{31})+4(\lambda p+k_{21}-k_{31})p})t} \quad (2-13)$$

Auch hier ist der erste Summand der Lösung gleichzeitig stationäre Lösung. Die Lösung der Wurzelterme ist möglich. Im weiteren soll hier nur der Grenzfall  $x=1$  betrachtet werden. Gleichung (2-15) entsteht durch Einführung der Näherungen (2-14) aus (2-13).

$$\sqrt{X+x} \approx \sqrt{X} + \frac{x}{2\sqrt{X}} \quad ; \quad k_{21} \gg k_{31}, k_{23} \quad (2-14)$$

$$n_2(t) = \frac{p}{p(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}})+k_{21}+k_{23}} + c_1 e^{-(2p+k_{21})t} + c_2 e^{-(k_{31}+p+\frac{k_{23}}{2p+k_{21}})t} \quad (2-15)$$

Zur Bestimmung der Koeffizienten  $c_i$  in dieser Gleichung gilt es, das Anfangswertproblem des Gleichungssystems zu lösen. Es ist zweckmäßig, daß zum Zeitpunkt  $t = 0$  nur der Grundzustand als besetzt angenommen wird (2-16).

$$n_2(0) = 0 \quad ; \quad n_1(0) = 1 \quad ; \quad n_3(0) = 0 \quad (2-16)$$

Mit der Einführung der Abkürzungen  $s$  und  $t$  gemäß (2-17), kann als endgültige Lösung (2-18) dargestellt werden. :

$$s = -(2p+k_{21}) \quad t = -(k_{31} - p \frac{k_{23}}{2p+k_{21}}) \quad (2-17)$$

$$n_2(t) = \frac{p}{p(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}})+k_{21}+k_{23}} + \frac{p(s+k_{31})}{s(s-t)} e^{-(2p+k_{21})t} + \frac{-p(t+k_{31})}{t(s-t)} e^{-(k_{31}+p+\frac{k_{23}}{2p+k_{21}})t} \quad (2-18)$$

In den folgenden Abschnitten wird der Sinn der Einführung der Größe  $n_2(t)$  bzw. der Herleitung der Lösungsgleichung für  $n_2$  für Zwei- und Dreineiveausystem gezeigt.

## 2.1.4 Sättigungsverhalten: Lösung der Ratengleichungen

In der experimentellen Praxis wird als Meßgröße die Zahl der in einem bestimmten Zeitintervall detektierten Fluoreszenzphotonen eines Systems (z.B. eines Fluoreszenzfarbstoffes) benötigt. Die *Fluoreszenzzählrate*  $R_F$  ist die Anzahl der Photonen, die pro Sekunde durch den strahlenden in  $S_1$ -  $S_0$ -Übergang emittiert wird. Im vorherigen Abschnitt war  $k_{21}$  als Rate aller beliebigen  $S_1$ -  $S_0$ -Übergänge eingeführt worden. Um  $k_{21}$  und  $R_F$  nun in Relation zueinander bringen zu können, muß noch eine weitere Größe definiert werden: die sog. *Fluoreszenzquantenausbeute*  $\Phi$  (2-19).

$$\Phi = \frac{n(\text{emittierte Quanten})}{n(\text{absorbierte Quanten})} = \frac{R_F(t)}{n_2(t)(\sum_i k_{2i})} \quad (2-19)$$

Eine weitere experimentelle Meßgröße ist die Intensität  $I$ . Sie ist in (2-21) als Energieänderung  $dE$  pro Zeiteinheit  $dt$  und Fläche  $A$  definiert.  $I$  kann auch mit der in (2-20) als Funktion des *molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten*  $\epsilon$  und der *Avogadro-Zahl*  $N_A$  eingeführten Größe des Wirkungsquerschnitts  $\sigma$  formuliert werden.

$$R_F = \Phi(k_{21} + k_{23})n_2(t) = \Phi(\tau_{21}^{-1} + \tau_{23}^{-1})n_2(t) \quad (2-28)$$

$$n_2 = \frac{p}{p(1+x+\frac{k_{23}}{k_{31}}) + (k_{21} + k_{23})} \longleftrightarrow R_F = \frac{\Phi(k_{21} + k_{23})p}{p(1+x+\frac{k_{23}}{k_{31}}) + (k_{21} + k_{23})} \quad (2-29)$$

$$a) p \gg k_{21} (p \rightarrow \infty): R_F = \Phi(k_{21} + k_{23}) \frac{1}{x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}}}$$

$$b) p \ll k_{21}: R_F = \Phi(k_{21} + k_{23}) \frac{p}{k_{21}} \quad (2-30)$$

$$R_F = \frac{\Phi(k_{21} + k_{23})}{I(1+x+\frac{k_{23}}{k_{31}}) + \frac{hc(k_{21} + k_{23})}{I_s}} \quad (2-31)$$

$$\frac{1}{2(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}})} = \frac{p_s}{p(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}}) + k_{21} + k_{23}} \longleftrightarrow p_s = \frac{k_{21} + k_{23}}{(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}})} I_s = \frac{hc}{I_s} \frac{(k_{21} + k_{23})}{(x+1+\frac{k_{23}}{k_{31}})} \quad (2-32)$$

Abbildung 2.6 zeigt die Änderung der Sättigungskurve durch den Übergang vom Zwei- zum Dreineiveausystem. Fluoreszenzfarbstoffe mit kleinem Quotienten  $k_{23}/k_{31}$  können gut mit dem Zweineiveausystem beschrieben werden. Solche mit großen Quotienten zeigen hingegen geringere Fluoreszenzzählraten und müssen mit dem Dreineiveausystem beschrieben werden. Das Triplett-Niveau  $n_3$  wird in diesen Fällen stärker bevölkert als entvölkert, stellt also einen „Flaschenhals“ dar. Damit sinkt die Zahl der Photozyklen im Vergleich zu Farbstoffen, die mit dem Zweineiveausystem beschrieben werden können.

Eine Zusammenfassung zur Kurvendiskussion des Sättigungsverhaltens eines Fluoreszenzfarbstoffes zeigt Tabelle 2.1.

$$R_F = \frac{\Phi k_{21} I}{I(x+1) + \frac{hc k_{21}}{I_s}} \quad (2-26)$$

Die Sättigungsintensität, also die Intensität, die zur halben maximalen Photonenzählrate  $R_F$  führt, kann explizit bestimmt werden (2-27).

$$n_2 = \frac{1}{2(1+x)} \text{ also } \frac{1}{2(1+x)} = \frac{p_s}{p_s(x+1) + k_{21}} \longleftrightarrow p_s = \frac{k_{21}}{(x+1)} \quad I_s = \frac{hc k_{21}}{I_s (x+1)} \quad (2-27)$$

In einer in den folgenden Abbildungen dargestellten Kurvendiskussion, die von den Gleichungen (2-24) und (2-27) ausgeht, soll nun die Abhängigkeit der Meßgrößen Fluoreszenzzählrate bzw. Sättigungsintensität von den drei wichtigen Moleküleigenschaften  $\Phi$ ,  $\sigma$  und  $k_{21}$  untersucht werden.

Abbildung 2.3 beschreibt zuerst den Einfluß der Fluoreszenzquantenausbeute eines Moleküls auf  $R_F$  bzw.  $I_s$  im Zweineiveausystem. Dieser ist einfach zu verstehen: Je mehr Photonen ein

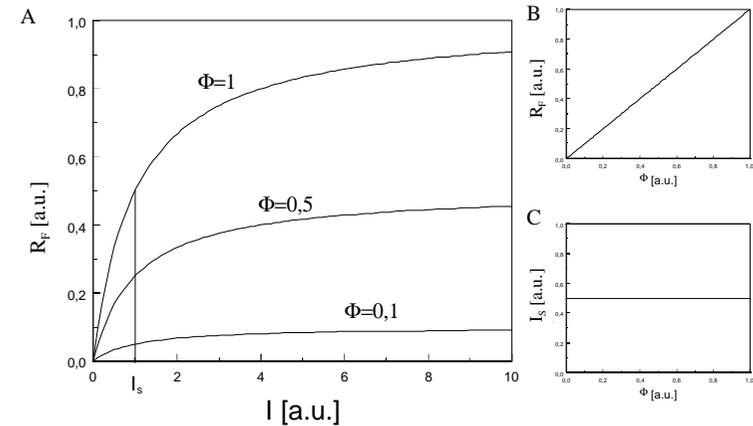


Abbildung 2.3 Einfluß der Quantenausbeute auf  $R_F$  und auf  $I_s$

A: Der qualitative Kurvenverlauf (alle Größen in a.u.) für  $R_F(I)$  ist für drei verschiedene Quantenausbeuten ( $\Phi=1$ ,  $\Phi=0,5$  und  $\Phi=0,1$ ) dargestellt. Sowohl die Steigung der Kurve für kleine Intensitäten  $I$  wie auch der Maximalwert von  $R_F$  (für große  $I$ ) wächst mit wachsendem  $\Phi$ . Die Sättigungsintensität  $I_s$  ist hingegen für alle drei Kurven identisch.

B,C: Die Graphen verdeutlichen den funktionellen Zusammenhang zwischen  $\Phi$  und  $R_F$  (B: direkte Proportionalität beider Größen) bzw. zwischen  $\Phi$  und  $I_s$  (C:  $I_s$  ist unabhängig von  $\Phi$ )

System pro bestimmte Anzahl Absorptionsquanten abstrahlt, um so höher ist die Fluoreszenzrate im System. Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  verändert im wesentlichen die Kurvenamplitude, verschiebt aber die Graphen nicht in x-Richtung.

Der Einfluß der Lebensdauer  $\tau_{21}$  des angeregten Zustandes bzw. der summativen Übergangsrate  $k_{21}$  (in Abbildung 2.4 dargestellt) ist etwas komplexer. Bei kleinen Anregungsleistungen hat sie auf die Fluoreszenzzählrate  $R_F$  keinen Einfluß (Fallunterscheidung b). Hin zu größeren Leistungen steigt  $R_F$  mit ansteigender Anregungsleistung an. Die Sättigungsintensität  $I_s$  ist direkt proportional zu  $k_{21}$ .

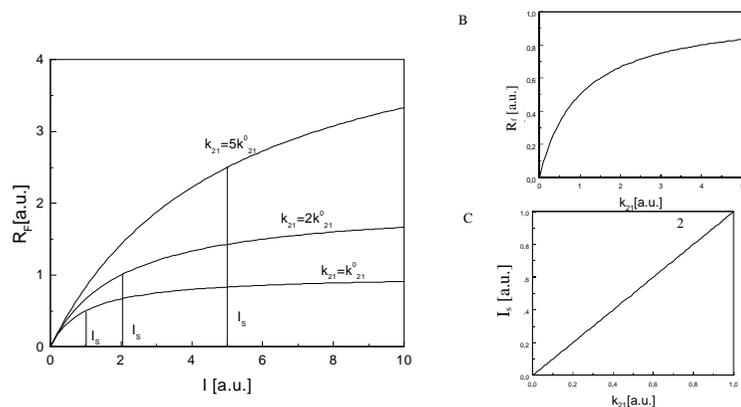


Abbildung 2.4 Einfluß der Lebensdauer des angeregten Zustandes

A: Den qualitative Kurvenverlauf (alle Größen in a.u.) von  $R_F(I)$  für drei verschiedene Übergangsraten  $k_{21}$  ( $k_{21} = 5 k_{21}^0$ ,  $k_{21} = 2 k_{21}^0$  und  $k_{21} = 1 k_{21}^0$ ) zeigt die Hauptgraphik. Man erkennt, daß im Bereich kleiner Leistungen (hier  $I \ll 1$ ) die drei Kurven nahezu identisch verlaufen. Erst für größere Anregungsleistungen steigt  $R_F$  für größere  $k_{21}$ -Werte steiler an. Die Asymptoten aller drei Kurven verhalten sich wie 5:2:1, gemäß der entsprechenden Übergangsraten.

B: Man erkennt „das Sättigungsverhalten“ im  $R_F$ - $k_{21}$ -Diagramm. Es wird am besten von rechts nach links betrachtet: Für große  $k_{21}$  (relativ zu  $p$  betrachtet) konvergiert  $R_F$  gegen einen bestimmten Wert (Fallunterscheidung b)). Dies ist genau dann der Fall, wenn  $p$  (dargestellt in der Hauptgraphik durch  $I$ ) gegenüber  $k_{21}$  klein wird (alle Kurven fallen zusammen). Wird  $k_{21}$  hingegen klein im Vergleich zu  $p$ , steigt  $R_F$  mit  $k_{21}$  an (Bereich großer Leistungen in A).

C: Die Sättigungsintensität wächst linear mit  $k_{21}$  an. Dies wird nochmals im kleinen Graph rechts unten verdeutlicht.

Die dritte wichtige Stoffeigenschaft  $\sigma$  wird in Abbildung 2.5 dargestellt.  $\sigma$  ist die Größe, die beschreibt, wie effizient ein Farbstoff Anregungsintensität einfangen kann. Sie hat keinen

Einfluß auf die Zahl der vom Farbstoff maximal emittierbaren Fluoreszenzzählrate. Allerdings kann bereits mit geringer Anregungsleistung bei hohen Wirkungsquerschnitten eine hohe Fluoreszenzrate erzielt werden.

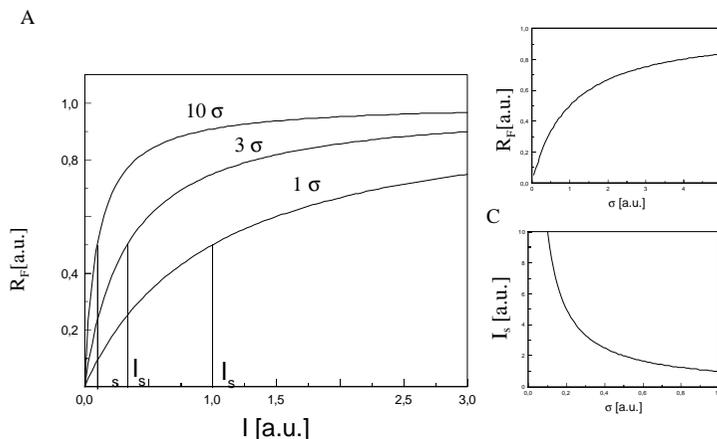


Abbildung 2.5 Einfluß der Wirkungsquerschnitts  $\sigma$  auf  $R_F$  und  $I_s$

A: Dargestellt ist der Kurvenverlauf (alle Größen in a.u.) von  $R_F(I)$  für drei verschiedene Wirkungsquerschnitte  $\sigma$  ( $\sigma = 10 \sigma^0$ ,  $\sigma = 3 \sigma^0$ ,  $\sigma = 1 \sigma^0$ ) in der Hauptgraphik. Für kleine Wirkungsquerschnitte steigt  $R_F$  steiler bis zum Maximalwert an als für große Werten. Allerdings nähern sich alle drei Kurven unabhängig von  $\sigma$  der gleichen Asymptote, sprich dem gleichen Maximalwert für  $R_F$  an (Fallunterscheidung b)).

B: Der  $R_F$ - $\sigma$ -Kurvenverlauf zeigt wieder typisches Sättigungsverhalten.

C: Die Graphik verdeutlicht nochmals die indirekte Proportionalität zwischen  $\sigma$  und  $I_s$ .

Alle drei molekulare Eigenschaften  $\phi$ ,  $k_{21}$  und  $\sigma$  können auch im Dreiniveausystem behandelt werden. Eine analoge Kurvendiskussion führt zu gleichwertigen Ergebnissen. Der wesentliche Unterschied zum Zweiniveausystem besteht in den zusätzlich auftretenden Raten  $k_{23}$  und  $k_{31}$ . Der Einfluß des Quotienten dieser beiden Größen, die beide wiederum Moleküleigenschaften sind, auf  $R_F(I)$  ist der entscheidende Unterschied, der die aufwendige mathematische Behandlung des vorigen Abschnitts und die Einführung des Dreiniveausystems nötig macht. Zunächst sind noch die Gleichungen (2-28) bis (2-32), die den Gleichungen des Zweiniveausystems (2-23) bis (2-27) entsprechen, dargestellt.

zufällig Wertepaare von Intensitäten auftreten, resultiert dies in einer Amplitudenänderung der Korrelationsfunktion bei diesen Zeitintervallen  $\tau$ . Man kann nun zeigen, daß die Art einer Lichtquelle durch die ihr zugeordnete charakteristische Korrelationsfunktionen identifiziert werden kann [45] (Abbildung 2.7). *Klassisch-chaotisches Licht* ist über alle Zeitintervalle  $\tau$  unkorreliert ( $g^{(2)}(\tau) = 1$ ). *Kohärentes Licht* zeigt Korrelationsverhalten für kleine  $\tau$  ( $g^{(2)}(\tau) > 1$ ,  $g^{(2)}(\tau)$  streng monoton fallend). *Nicht-klassisches Licht*, abgestrahlt von einem Einzelmolekül (Modell: Zweiniveausystem), zeigt dagegen eine Korrelationsfunktion, die für  $\tau = 0$  den Funktionswert  $g^{(2)}(\tau) = 0$  aufweist und für  $\tau \rightarrow \infty$  gegen  $g^{(2)} = 1$  ansteigt (Näheres in [45]).

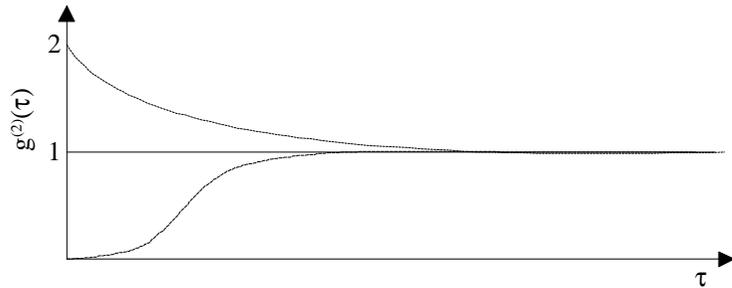


Abbildung 2.7 Autokorrelationsfunktion  $g^{(2)}(\tau)$  für verschiedene Lichtquellen [45]

*Kohärentes Licht* (durchgezogene Linie), *klassisch-chaotisches Licht* (grob-gestrichelte Linie) und *nicht-klassisches Licht*, abgestrahlt von einem Zweiniveausystem (gestrichelte Linie)

Da aus der Korrelationsfunktion und der Fluoreszenzintensität verschiedene Zeiten gewonnen werden können, die photophysikalische Eigenschaften von Einzelmolekülen charakterisieren, stellt die Korrelationspektroskopie eine etablierte Methode zur Untersuchung von einzelnen Fluoreszenzfarbstoffmolekülen dar (Näheres hierzu in [32, 33]).

Die Korrelationsfunktion zum Dreiniveausystem kann als Quotient von  $n_2(t)$  und  $n_2(\infty)$  geschrieben werden [46]. Aus Gleichung (2-31) wird dann mit Einführung der Abkürzung (2-38) die Beziehung (2-39).

$$k_{23}^{eff} = \frac{P}{2p + k_{21}} k_{23} \tag{2-38}$$

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{n_2(\tau)}{n_2(\infty)} = 1 - \frac{k_{23}^{eff} + k_{31}}{k_{31}} e^{-(2p+k_{21})\tau} + \frac{k_{23}^{eff}}{k_{31}} e^{-(k_{31}+k_{23}^{eff})\tau} \tag{2-39}$$

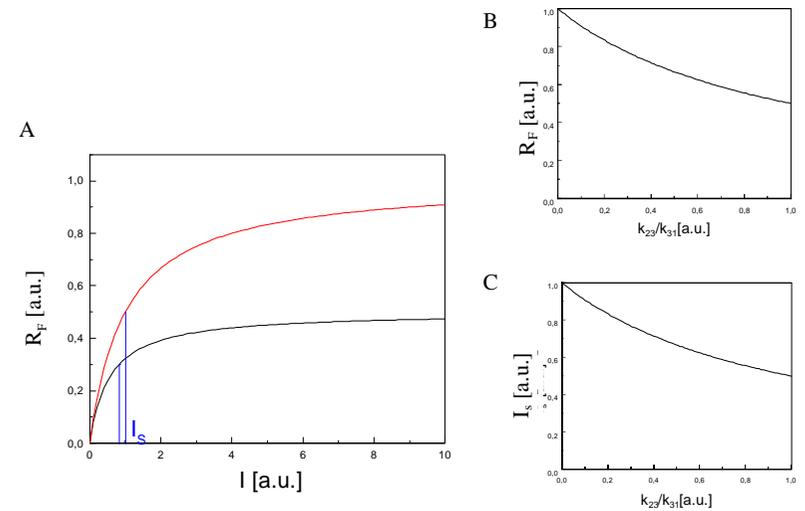


Abbildung 2.6 Einfluß des Quotienten  $k_{23}/k_{31}$  auf  $R_F$  und auf  $I_s$   
 A: Der qualitative Kurvenverlauf (alle Größen in a.u.)  $R_F(I)$  ist für zwei verschiedene Quotienten  $k_{23}/k_{31}$  ( $k_{23}/k_{31} @ 0$  (Zweiniveausystem; rot),  $k_{23}/k_{31}=1$ ) dargestellt. Man erkennt, daß im Bereich kleiner Leistungen (hier  $I < 1$ ) die beiden Kurven sehr ähnlich verlaufen. Erst für größere Anregungsleistungen sinkt  $R_F$  für größere  $k_{23}/k_{31}$ -Werte. Die Asymptoten beider Kurven verhalten sich wie  $1/(1+k_{23}/k_{31})$ .  
 B,C:  $R_F$  fällt in nicht einfach darstellbarer Weise in Abhängigkeit von  $k_{23}/k_{31}$  und dem Parameter  $k_2$  ab (B; vergleiche Gleichung 2-31), die Sättigungsintensität mit  $1/(1+k_{23}/k_{31})$  (C).

→ Meßgrößen	$R_F(I)$	$R_F(\max)$	$R_F$ für kleine I	$I_s$
↓ Stoffeigenschaft				
$\phi$	$R_F(I)$ wächst linear mit $\phi$	$R_F(\max)$ wächst linear mit $\phi$	$R_F$ (für kleine I) wächst linear mit $\phi$	$I_s$ ist unabhängig von $\phi$
$k_{21}$	$R_F(I)$ wächst sättigend mit $k_{21}$	$R_F(\max)$ wächst linear mit $k_{21}$	$R_F$ (für kleine I) ist unabhängig von $k_{21}$	$I_s$ wächst linear mit $k_{21}$
$\sigma$	$R_F(I)$ wächst unsättigend mit $\sigma$	$R_F(\max)$ ist unabhängig von $\sigma$	$R_F$ (für kleine I) wächst linear mit $\sigma$	$I_s$ sinkt indirekt proportional mit $\sigma$
$k_{23}/k_{31}$	$R_F(I)$ sinkt in Abhängigkeit von $k_{23}/k_{31}$ und des zusätzlichen Parameters $k_{21}$	$R_F(\max)$ sinkt mit $1/(1+k_{23}/k_{31})$	$R_F$ (für kleine I) ist unabhängig von $k_{23}/k_{31}$	$I_s$ sinkt mit $1/(1+k_{23}/k_{31})$

Tabelle 2.1 Zusammenfassende Übersicht zur Kurvendiskussion

### 2.1.5 Photobleichen - Einführung eines vierten Niveaus

Das einfachste Modell, um Photobleichprozesse erklären zu können, wird in diesem Abschnitt eingeführt. Unter bestimmten Voraussetzungen müssen komplexere theoretische Modelle eingesetzt werden, um die vollständige Problematik, die bei solchen Prozessen auftritt, erklären zu können. An dieser Stelle soll nur auf die entsprechende Literatur verwiesen werden [44]. Abbildung 2.6 zeigt die Einführung des „Bleaching-Niveaus“ B. In Gleichung (2-33) wird die Quantenausbeute des Bleichings  $\Phi_b$  definiert, deren Bedeutung im weiteren Verlauf dieses Abschnitts umrissen werden soll.

Das in Abbildung 2.6 dargestellte Vierniveausystem enthält einige wichtige Annahmen. Zum einen wird der Bleichzustand B als universeller Zustand für alle irreversiblen Prozesse geschrieben, die einen Anregungszyklus innerhalb des Dreiniveausystems zum Erliegen bringen können. Es spielt dabei keine Rolle, welche Art von Prozeß abläuft. Zum anderen wird davon ausgegangen, daß B ausschließlich von  $S_1$  aus bevölkert wird. Dies geschieht mit der Rate  $k_B$ , hinter der sich letztendlich ein Einzelereignis verbirgt.

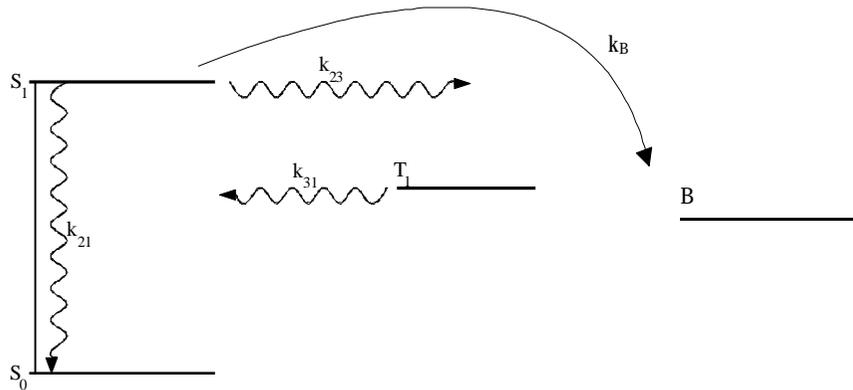


Abbildung 2.6 Photobleaching im Vierniveausystem

Ergänzend zum Dreiniveausystem wird ein vierter Energielevel B (für Bleaching) eingeführt. Es wird mit der Rate  $k_B$ , ausgehend von  $S_1$ , bevölkert. Nach einmaliger Besetzung von B ist eine weitere Anregung im System nicht mehr möglich, der Photozyklus kommt zum Erliegen.

Ganz analog zur Fluoreszenzquantenausbeute kann die Quantenausbeute des Bleichprozesses  $\Phi_b$  definiert werden (2-33). Sie ist, wie (2-34) zeigt, eine von der Anregungsrate  $p$  abhängige Größe. Am einfachsten kann sie für den Grenzfall  $p \rightarrow \infty$  bestimmt werden. In dieser Gleichung ist  $k_B$  durch den Kehrwert  $\tau_b$  substituiert.

$$\Phi_b = \frac{n(\text{Bleichprozesse})}{n(\text{absorbierteQuanten})} = \frac{k_B}{n_2(t = \infty) \sum_i k_{2i}} \quad (2-33)$$

$$\Phi_b = \frac{t_b^{-1}(p)}{(k_{21} + k_{23}) \frac{p}{p(x+1 + \frac{k_{23}}{k_{31}}) + k_{21} + k_{23}}} = \frac{t_b^{-1}(p = \infty)}{(k_{21} + k_{23}) \frac{1}{x+1 + \frac{k_{23}}{k_{31}}}} \approx \frac{t_{21}(x+1 + \frac{k_{23}}{k_{31}})}{t_b(p = \infty)} \quad (2-34)$$

$\Phi_b$  gibt also an, in welchem Verhältnis das einmalige Ereignis Photobleichen zur Zahl der Anregungszyklen steht. Bezogen auf die Zahl der Photozyklen, die fluoreszierend verlaufen, muß dieser Wert noch durch Division durch die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi$  korrigiert werden ( $\Phi_b^F$  in 2-35).

$$\Phi_b^F = \frac{\Phi^{-1} t_{21}(x+1 + \frac{k_{23}}{k_{31}})}{t_b(p = \infty)} \quad (2-35)$$

An Stelle von Quantenausbeuten  $\Phi_b$  oder  $\Phi_b^F$  ist es auch durchaus üblich, die Zahl der emittierten Fluoreszenzphotonen eines Farbstoffes bis zum Photobleichen  $n^F$  anzugeben (2-36).

$$n^F = \frac{t_b(p = \infty) \Phi}{t_{21}(x+1 + \frac{k_{23}}{k_{31}})} \quad (2-36)$$

### 2.1.5 Kurzer Abriss der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Die Bildung von Korrelationsfunktionen ist eine statistische Methode zur Analyse von Fluktuationen einer Meßgröße. Im speziellen Fall hier ist diese Größe die Fluoreszenzintensität. Die Definition der Korrelationsfunktion der Intensität zeigt (2-37).

$$g^{(2)}(\mathbf{t}) = \frac{\langle I(t)I(t+\mathbf{t}) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (2-37)$$

In der Korrelationsfunktion werden Intensitäten miteinander verglichen, die relativ zueinander um ein Zeitintervall  $\tau$  versetzt auftreten. Gibt es Zeitintervalle  $\tau$ , in denen signifikant und nicht

$$N_T = \sqrt{N_D^2 + N_R^2 + N_{ph}^2} \quad (3-1)$$

Die Wurzel des Dunkelstromsignals  $S_D$  ist  $N_D$  mit  $N_D^2 = k_D \Delta t x_{ver}^2$ . Neben dem funktional beschriebenen Zusammenhang ist  $N_D$  noch abhängig von der Temperatur des Detektors und von der Temperaturkonstanz.  $k_D$  ist die Rate des Dunkelstroms,  $\Delta t$  das Zeitintervall der Detektion.  $N_R$  hängt vom Verstärkungsfaktor  $x_{ver}$  des Amplifiers (z.B. MCP), von der Auslesezeit und dem elektronischen Design des gesamten Detektors ab. Eine funktionelle Beziehung ist jedoch schwer aufzustellen.  $N_{ph}$  kann zusammengesetzt werden aus den detektierten Fluoreszenzraten  $k_S$  des Signals  $S$  und der Rate  $k_U$  des optischen Untergrunds  $U$  ( $N_{ph}^2 = (k_U + k_S) \Delta t x_{ver}^2$ ).

Das Verhältnis von Signal zu Untergrund kann in Gleichung (3-2) beschrieben werden [50].

$$\frac{S}{N} = \frac{k_S \Delta t x_{ver}}{\sqrt{k_D \Delta t x_{ver}^2 + N_R^2 + (k_S + k_U) \Delta t x_{ver}^2}} \quad (3-2)$$

Die Wurzelabhängigkeit zwischen den einzelnen Signalgrößen und dem entsprechenden Rauschen ist auf die stochastische Beschreibung der Problematik zurückzuführen. Das Signal kann als Poisson-verteilt angenommen werden. Das Rauschen ist die Standardabweichung des Signals.  $S$  ist der Signalmittelwert  $\mu$ ,  $N$  die Standardabweichung  $\sigma = \mu^{1/2}$ .

Nimmt man vereinfachend an, daß  $N_R^2$  linear mit  $\Delta t$  variiert, so läßt sich leicht aus (3-2) ersehen, daß  $S/N$  mit  $(\Delta t)^{1/2}$  wächst. Für kleine Signale und minimale Dunkelströme kann  $S/N$  über den Verstärkungsfaktor des Amplifiers verbessert werden. Es dominiert  $N_R^2$  das Rauschen und  $N_R^2$  steigt in der Regel langsamer als mit  $x_{ver}^2$ . Bei großen Signalen ist  $S/N$  nahezu unabhängig vom Verstärkungsfaktor. Hier dominiert der Beitrag des optischen Rauschens den Nenner.

### 3.1.2 Spektrale versus räumliche Isolierung

Untersucht man ein Ensemble von gleichartigen Teilchen mit optischen Methoden, beobachtet man immer die Summe bzw. den Durchschnittswert der Wechselwirkungen aller individueller Teilchen mit dem eingestrahlenen Licht. Dabei verhalten sich die Einzelteilchen durchaus unterschiedlich, wenn sie sich hinsichtlich optisch relevanter Eigenschaften unterscheiden. Beim Nachweis von Einzelmolekülen versucht man solche individuell unterschiedlichen optischen Parameter auszunutzen. Prinzipiell unterscheidet man dabei die spektrale und die räumliche Isolierung von Einzelmolekülen.

Der spektralen Selektion von Teilchen liegt folgender Sachverhalt zugrunde: Gemäß der Heisenbergschen Unschärferelation besitzt jedes Molekül im angeregten Zustand eine endliche Lebensdauer und damit eine endliche Linienbreite sowohl bei der Absorption als auch bei der Emission. Diese *homogene Lebensdauerverbreiterung* hängt im wesentlichen von zwei unterschiedlichen Relaxationsprozessen ab, der sog. *longitudinalen* (Relaxation in Folge von Wirt-Gitter-Wechselwirkung) und der *transversalen Relaxation* (Phasenrelaxation). Die

Der Graph der Funktion (2-39) ist in Abbildung 2.9 (durchgezogene Linie) dargestellt. Für kurze Zeitintervalle  $\tau$  strebt die Funktion  $g^{(2)}$  gegen Null: Nach Emission eines Photons befindet sich das Dreiniveausystem im Grundzustand. Es dauert eine endlich große Zeitspanne, bis ein zweites Photon emittiert werden kann, weil das System vorher erst wieder angeregt werden muß. Die Wahrscheinlichkeit, für  $\tau \rightarrow 0$  also ein zweites emittiertes Photon zu finden, ist  $g^{(2)}=0$ . Man nennt dieses Phänomen, das auch als Einzelmolekülnachweis verwendet werden kann, *Antibunching* (Erklärung in Abbildung 2.8). Die endlich große Zeitspanne, die zwischen der Emission zweier Photonen auftritt, liegt im Bereich der Lebensdauer des ersten angeregten Zustandes. Bei Fluoreszenzfarbstoffen sind dies üblicherweise einige Nanosekunden. Nach einem streng monotonen, exponentiellen Anstieg (zweiter Summand in Gleichung (2-39)), fällt die Funktion  $g^{(2)}$  bei einer charakteristischen Zeitspanne  $\tau$  exponentiell ab (dritter Summand in Gleichung (2-39)): Die Photonen treten in sogenannten Bunches (Bündeln) auf, die von Dunkelphasen unterbrochen sind, in denen sich das Quantensystem im dritten Niveau befindet. Man nennt den hieraus resultierenden Abfall der Korrelationsfunktion daher *Bunching*. Nach dem streng monotonen Abfall strebt die Funktion  $g^{(2)}$  für große Zeitintervalle  $\tau$  gegen  $g^{(2)}=1$ . Im Falle nicht-kohärenter Anregung tritt noch zusätzlich die sog. Rabi-Oszillation auf (unterbrochene Linie in Abbildung 2.9), die mit dem hier verwendeten Ratenmodell zur Herleitung von  $n_2(t)$  nicht theoretisch erfaßt werden kann.

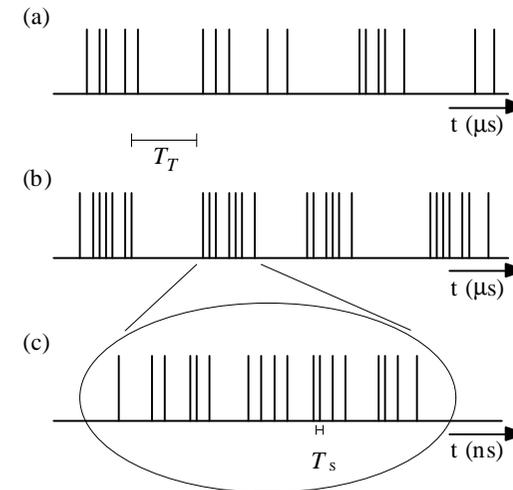


Abbildung 2.8 Erläuterung zum Bunching und Antibunching nach [45]

Die von einem Dreiniveausystem abgestrahlten Photonen-Bursts treten in Bündeln (bunches), unterbrochen durch die Wartezeit im Triplettzustand  $T_T$ , auf (a). Mit zunehmender Intensität steigt die Burst-Dichte innerhalb dieser bunches an (b). Die einzelnen Photonen können nicht schneller aufeinanderfolgend abgestrahlt werden, als durch die Dauer eines Anregungszyklus vorgegeben ist ( $T_s$  als minimale Zeitdauer, die zwischen der Emission zweier aufeinanderfolgenden Photonen vergeht).

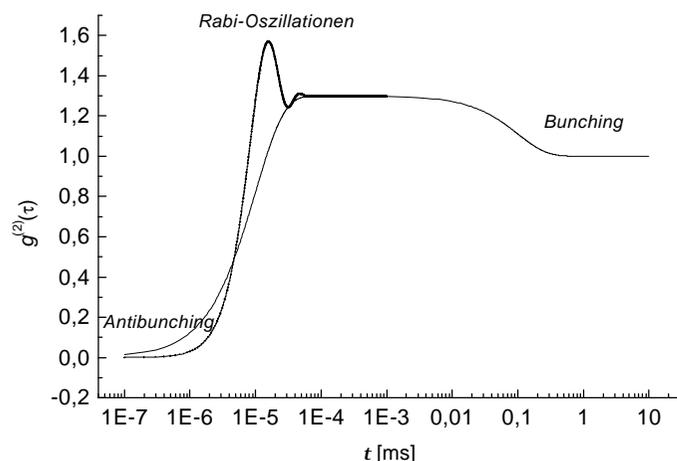


Abbildung 2.9 Korrelationsfunktion des Fluoreszenzlichts eines Dreiniveausystems (qualitative Darstellung)

Die klassische Betrachtung liefert Bunching und Antibunching (durchgezogene Linie). Mit kohärenter Anregung (Laser) treten zusätzlich Rabi-Oszillationen auf (gepunktete Linie).

In der Einzelmolekülspektroskopie können mit Hilfe der Aufnahme von Autokorrelationen die für jedes Fluoreszenzmolekül bei bestimmter Umgebung und Temperatur typischen Raten  $k_{23}$  („ins Triplett hinein“) und  $k_{31}$  („aus dem Triplett heraus“) erhalten werden [46].

### 3. Möglichkeiten der Einzelmoleküldetektion

Um das Fluoreszenzsignal von Einzelmolekülen detektieren zu können, muß das Verhältnis von Signal zu Untergrund groß genug werden.

Untergrund generierend wirken im Prinzip alle artfremden Moleküle der Umgebung eines Fluorophores. Dabei können in Folge der Laseranregung Rayleigh- oder Ramanstreuung entstehen. Fremdmoeküle können zudem Fluoreszenzstörsignale erzeugen. Rayleighstreuung kann durch den Einsatz von geeigneten Bandsper- oder Langpaßfiltern unterdrückt werden. Ramanstreuung spielt auf Grund des geringen Absorptionsquerschnitt ( $\sigma=10^{-32} \text{ m}^2$ ) nur bei sehr hohen Laserleistungen eine Rolle. Fremdfluoreszenz kann durch den Einsatz hochreiner Proben und Probenträger, sowie der Auswahl einer möglichst langwelliger Anregungs-laserlinie unterdrückt werden. Im Blauen fluoreszieren sehr viele Substanzen, im Roten nur wenige. Generell arbeitet man bei der Fluoreszenz-Einzelmolekül-Detektion bei kleinen Probenvolumina und mit optisch möglichst reinen Trägermaterialien. Zudem ist es ratsam, Fluorophore mit hohem Absorptionsquerschnitt ( $\sigma > 10^{-17} \text{ m}^2$ ) zu verwenden. Man kann dann mit geringeren Laserleistungen arbeiten, wodurch weniger Untergrund erzeugende Strahlung entsteht.

#### 3.1 Techniken der Einzelmoleküldetektion

Dieser Abschnitt umfaßt spektroskopische und mikroskopische Techniken der Einzelmoleküldetektion. Im Einzelnen wird eine quantitative Beschreibung von Signal-zu-Rauschen in 3.1 durchgeführt. Darauf folgt die Darstellung der beiden prinzipiellen Möglichkeiten der Einzelmoleküldetektion, nämlich die der spektralen und die der räumlichen Selektion von Fluorophoren (3.2). Die mit räumlicher Separation arbeitenden Verfahren werden in den Kapiteln 3.3 (konfokale Mikroskopie), 3.4 (Imaging mit Weitfeldanregung) und 3.5 (Übersicht über verschiedene Techniken) näher beleuchtet.

##### 3.1.1 Das Problem von Signal-zu-Rauschen

Statt des absoluten Untergrundwerts in counts pro Zeiteinheit ist es üblich, die stochastische Größe Rauschen in counts pro Zeiteinheit einzuführen. Zum optisch erzeugten Rauschen  $N_{ph}$  kommen noch das elektronische Ausleserauschen  $N_R$  des verwendeten Detektors (z.B. einer CCD-Kamera mit Amplifier) und evtl. das durch den Dunkelstrom  $k_D$  bedingte Rauschen  $N_D$  dieses Detektors. Das Gesamtrauschen  $N_T$  kann wie folgt berechnet werden:

Für ein Objektiv mit der numerischen Apertur  $n \sin \alpha$  gilt ein laterales Auflösungsvermögen nach dem Rayleigh-Kriterium  $\Delta x_R$ , wie in Gleichung (3-4) formuliert.

$$\Delta x_R = \frac{0,61\lambda}{n \sin \alpha} \quad (3-4)$$

Das dreidimensionale Airy-Muster ist eine Intensitätsverteilung. Der zentrale Peak kann durch ein Gauß-Profil angenähert werden. Die sog. Punktübertragungsfunktion (*point spread function, PSF*) ist die Wahrscheinlichkeitsverteilung, die räumlich genau der Intensitätsverteilung dieser Gaußfunktion entspricht.

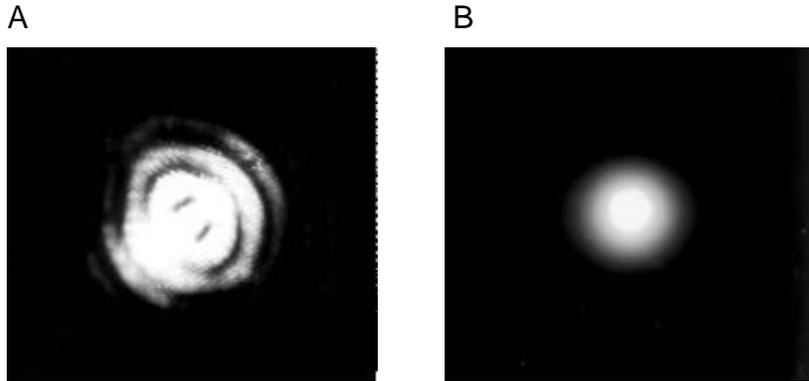


Abbildung 3.4 Darstellung des Airy-Musters

Beide Bilder sind in der Zwischenbildebene aufgenommen, in der sich das Detektionspinhole befindet: Anregung bei 450 nm (fokussiert - N.A.=0,85) ohne (A) und mit Pinhole (B)[56]

Mit Hilfe der Punktübertragungsfunktion (Abbildung 3.5) kann nun verstanden werden, daß die Auflösung des konfokalen Mikroskops gegenüber gewöhnlichen Mikroskopen verbessert ist. Die Faltung der Punktübertragungsfunktionen von Anregungslicht und Fluoreszenzlicht ist eine Punktübertragungsfunktion von geringerer Ausdehnung in alle Raumrichtungen. Das laterale Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops ist die laterale Halbwertsbreite dieser PSF  $\Delta x_{KM}$  in (3-5) [58].

$$\Delta x_{KM} = \frac{0,51\lambda}{n \sin \alpha} \quad (3-5)$$

Das axiale Auflösungsvermögen  $\Delta z_{KM}$  bzw. die axiale Halbwertsbreite der PSF wird in Gleichung (3-6) wiedergegeben.

*Phasenrelaxation*). Die Linienform entspricht einer Lorentz-Kurve, deren Halbwertsbreite  $\Delta \nu_{\text{hom}}$  von der Lebensdauer des jeweiligen Relaxationsprozesses abhängt.  $T_1$  ist die longitudinale,  $T_2^*$  die transversale Relaxationszeit.

$$\Delta \nu_{\text{hom}} = \frac{1}{2pT_1} + \frac{1}{pT_2^*} \quad (3-3)$$

In nicht-idealen Gittern oder in amorphen Systemen kommt es daneben im Ensemble zur *inhomogenen Linienverbreiterungen*, weil jeder einzelne Chromophor eine etwas andere Umgebung spürt. Die inhomogene Linienform ist gaußförmig. Bei tiefen Temperaturen ist die homogene Linienbreite deutlich kleiner als die inhomogene. Weitere Faktoren wie etwa das Auftreten von Phononenseitenbanden, auf welches hier nicht näher eingegangen werden soll, machen das Arbeiten in der Nähe des absoluten Temperaturnullpunkts notwendig [46]. Es gelingt daher mit schmalbandiger Laseranregung, Subensembles von Chromophoren selektiv anzuregen. Dies kann sowohl durch die Technik des sog. *fluorescence line narrowing* [51, 52] als auch durch das *spektrale Lochbrennen* [53] realisiert werden.

Verringert man die Konzentration innerhalb einer Farbstoffprobe bei tiefen Temperaturen, so geht die inhomogene Linie in eine Bande mit Feinstruktur über, bis schließlich die homogenen Linien einzelner Moleküle übrig bleiben. Dies zeigt die Simulation in Abbildung 3.1B Einzelne Moleküle sind innerhalb einer kleinen Menge an Farbstoffteilchen im Laserfokus spektral adressierbar. Dies kann auch am Bandenrand einer inhomogenen Absorptionslinie der Fall sein (Abbildung 3.1 A). Erstmals gelang die Detektion einzelner Farbstoffmoleküle durch spektrale Separation 1990 [53].

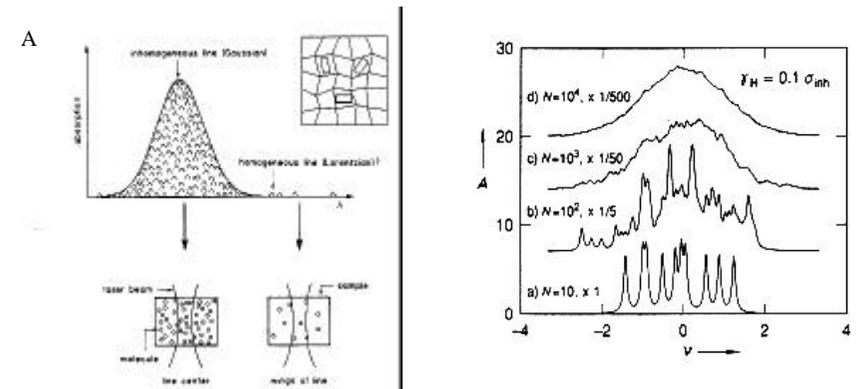


Abbildung 3.1 Prinzip der spektralen Separation von Einzelmolekülen [54]

A: Die inhomogene Absorptionslinie ist die Summe vieler homogener Linien einzelner Chromophore, die durch deren unterschiedliche Umgebung in ihrer Frequenzposition leicht verschieden sind. Am Bandenrand liegen nur mehr wenige Chromophore. Sie sind einzeln anregbar (homogene Linien).

B: Die Simulation der Abnahme der Zahl von absorbierenden Teilchen zeigt den Übergang der inhomogenen Linie zunächst in eine statistische Feinstruktur und schließlich bis hin zur Auflösung individueller homogener Absorptionslinien.

Bei der räumlichen Separation von Molekülen werden Farbstoffproben soweit verdünnt, daß im Mittel nur ein einzelnes Molekül innerhalb des Anregungsvolumens plaziert ist. Mit dieser Methode kann über den ganzen Temperaturbereich gearbeitet werden, da spektrale Eigenschaften, insbesondere schmale Linien, keine Rolle spielen. Falls es die Fragestellung erlaubt, werden Einzelmolekülexperimente, die auf räumliche Separation aufbauen, bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.1.3 Einzelmoleküldetektion durch konfokale Mikroskopie

Eine sehr wichtige Technik der Einzelmoleküldetektion, bei der die Chromophore räumlich separiert werden, ist die *konfokale Mikroskopie* [57, 58, 60, 63]. Sie stellt hinsichtlich des Auflösungsvermögens innerhalb des sog. *Beugungslimits* eine Weiterentwicklung der herkömmlichen Mikroskopie dar.

Das Prinzip eines konfokalen Mikroskops zeigt Abbildung 3.2. Das Anregungslicht eines Lasers wird über einen dichroitischen Strahlteiler auf die Apertur eines Objektivs geworfen und durch dieses auf der Probe beugungslimitiert fokussiert. Das in Reflexion mit dem gleichen Objektiv detektierte Fluoreszenzlicht einer Farbstoffprobe passiert den Strahlteiler. Dieser transmittiert bevorzugt langwelliges Licht, reflektiert dagegen kurzwelliges Laserlicht. Das Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe einer Tubuslinse auf eine Detektionsspinhole abgebildet. Das durch diese Lochblende vom Streulicht getrennte Signal trifft dann auf die aktive Fläche eines Detektors, im Falle der Einzelmolekülmikroskopie auf eine Avalanche-Photodiode. Das hier gezeigte konfokale Schema geht von parallelem Anregungslicht und einem auf unendlich korrigierten Objektiv aus. Die historisch herkömmliche Variante benutzt eigentlich eine Punktlichtquelle zur Anregung und setzt ein Anregungsspinholes vor dem Beamsplitter ein.

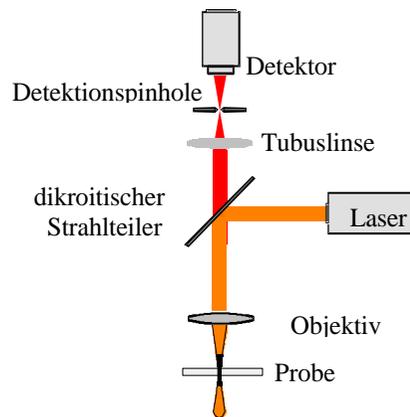


Abbildung 3.2 *Simplifiziertes konfokales Mikroskop (ohne Anregungsspinhole) mit „auf unendlich korrigiertem Objektiv,,*

Der große Vorteil des konfokalen Mikroskops ist neben der Tatsache, daß sowohl mit beugungslimitiertem Anregungsvolumen und identischen Detektionsvolumen gearbeitet wird, das Prinzip der Volumendetektion, wie es in Abbildung 3.3 dargestellt ist. Das Detektionsspinhole läßt nur das rückreflektierte Fluoreszenzlicht passieren, das in lateraler wie in axialer Ausdehnung exakt aus der Region des Anregungsfokus stammt (Abbildung 3.3A). Licht aus einer axial zum Fokus verschobenen Strahlenquelle wird dagegen vom Detektionsspinhole weitgehend ausgeblendet (Abbildung 3.3B,C). Zudem wird Licht ausgeblendet, das einen lateral gegenüber dem Fokus verschobenen Ursprung hat (Abbildung 3.3D). Das Detektionsspinhole gewährleistet damit eine dreidimensionale Abbildung von Objekten, wenn man mit Hilfe von Scan-Einheiten die Probe definiert relativ zum Fokus bewegen kann.

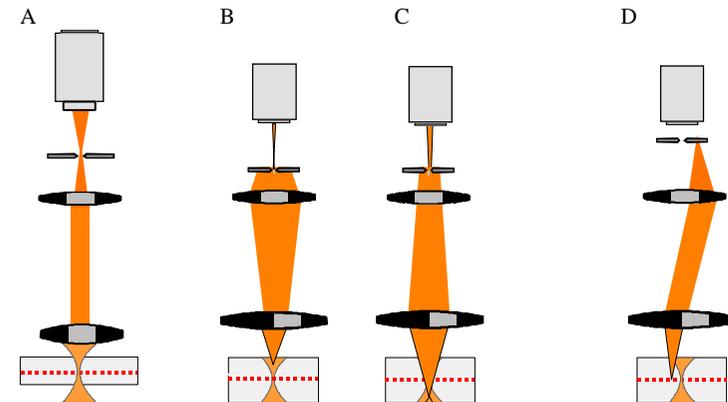


Abbildung 3.3 *Mechanismus der Volumendetektion im konfokalen Mikroskop*

A: Nur das von der Probe rückreflektierte Licht, das aus der Region des Anregungsfokus stammt, kann das Detektionsspinhole passieren.

B,C: Licht das aus axial zur Probenoberfläche verschobenen Regionen stammt, wird vom Detektionsspinhole weitgehend ausgeblendet.

D: Licht, das aus lateral zum Fokus verschobenen Regionen stammt, wird vollständig ausgeblendet.

Die Beugungsbegrenzung einer Lichtwelle kann man leicht verstehen, wenn man das Huygenssche Prinzip der Elementarwellen zu Hilfe nimmt. Demnach kann die Fokussierung von Licht behandelt werden wie die Beugung einer ebenen Welle an einer kreisförmigen Öffnung deren Durchmesser in der Größenordnung der Wellenlänge liegt. Die Intensitätsverteilung des Beugungsbildes, das sog. Airy-Muster, zeigt Abbildung 3.4. 84% der Intensität liegen im zentralen Peak. Dieser enthält alle optische Information eines abgebildeten Objekts und kann deshalb durch das Detektionsspinhole von den weiteren Nebenmaxima separiert werden. Die Intensität nimmt in den Beugungsrings nach außen hin ab. Nach Rayleigh wird das optische Auflösungsvermögen eines konventionell großflächig beleuchteten Mikroskops als Abstand zwischen Maximum und erstem Minimum festgelegt. Zwei Punktlichtquellen, die sich in diesem Abstand zueinander befinden, können gerade noch voneinander aufgelöst werden [55].

ist im optimalen Fall bei etwa  $1/10 \mu\text{m}$ , jedoch molekulare Eigenschaften durch Wechselwirkung der Spitze mit dem zu untersuchenden Chromophor verändern kann [20].

Eine Methode der Detektion einzelner Moleküle in Lösung ist die *Fluoreszenzkorrelationspektroskopie* (*fluorescence correlation spectroscopy, FCS*) [23, 24]. Durch den Fokus eines konfokalen Mikroskops läßt man dabei Farbstoffe einer niedrigen Konzentration diffundieren, so daß im Mittel ein Molekül im Fokus zu liegen kommt. Durch die statistische Auswertung des zeitkorrelierten Signals mittels Bildung der Autokorrelationsfunktion lassen sich sowohl Fluoreszenzdynamiken wie Diffusionskonstanten untersuchen bzw. ermitteln.

Eine weitere in Lösung arbeitende Variante ist die *Einzelmoleküldetektion im Flüssigkeitsstrahl* (*photon burst detection*). Dabei durchströmen die Farbstoffmoleküle eine Kapillare oder passieren eine Düse und durchqueren dabei das Anregungsvolumen eines Laserstrahls. Während des Durchtritts eines Chromophors durch das Anregungsprofil detektiert man kurze Signale, die sog. Photonen-Bursts. Diese können z.B. hinsichtlich ihrer Lebensdauer oder spektralen Position analysiert werden. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms, die mittlerweile mit einer anderen Methode gelungen ist [67], war lange Zeit Triebfeder der Weiterentwicklung dieser Methode [31, 68].

Beim *Imaging im Nahfeld* durch *total internal reflection (TIR)* [26-28] nutzt man aus, daß über die gesamte Grenzfläche eines optisch dichten Mediums, in das ein total reflektierender Laserstrahl eingekoppelt ist, ein evaneszentes Feld geringer Reichweite in die Tiefe entsteht. Mit Hilfe einer CCD-Kamera werden Moleküle simultan untersucht, die sich auf solchen Grenzflächen befinden oder dort wandern. Dabei können sowohl künstlich auf eine Trägeroberfläche aufgebrachte Chromophore wie auch solche detektiert werden, die auf natürlichen Oberflächen, wie Zellmembranen, sitzen [69].

### 3.2 Bedeutung von Einzelmoleküluntersuchungen

Einzelmoleküluntersuchungen haben in den neunziger Jahren Einzug in viele Laboratorien gehalten. Aufsehenerregende Ergebnisse und die relativ einfache Handhabung der Experimente speziell bei Raumtemperatur haben dazu geführt, daß sich in dieser kurzen Zeit eine stark anwachsende Zahl von Forschern mit großer Euphorie dieser neuen Technik bediente, um Fragestellungen auf verschiedensten Gebieten zu lösen. Welche konkreten, neuen Einblicke die Einzelmoleküldetektion geben kann, soll in diesem Abschnitt aufgezeigt werden [11].

#### 3.2.1 Einzelmoleküluntersuchungen im Vergleich zu Ensemblemessungen: prinzipielle Unterscheidung

Prinzipiell mitteln viele bisher gängige Messungen von experimentell zugänglichen Observablen über eine große Anzahl von Teilchen. Die gemessene Größe selbst ist der *Mittelwert* über das ganze untersuchte Ensemble. Die Verteilungen der Meßgröße oder ihre zeitliche Entwicklung gehen dabei in der Regel durch den Mittelungsprozeß verloren.

Ein einfaches Modellbeispiel zeigt Abbildung 3.8. Ein einfacher zeitabhängiger Prozeß, nämlich das zufällige, unsynchronisierte Ein- und Ausschalten von Glühlampen, ist nur am einzelnen Objekt beobachtbar. Viele Lampen gleichzeitig betrachtet, zeigen einen konstanten Mittelwert an Lichtsignal. Fluoreszierende Moleküle verhalten sich genau wie die Glühlampen in diesem Modellbeispiel.

$$\Delta z_{KM} = \frac{0,44\lambda}{n \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)} \quad (3-6)$$

Durch Verkleinerung des Pinholes können beide Werte für das Auflösungsvermögen noch etwas verkleinert werden [59].

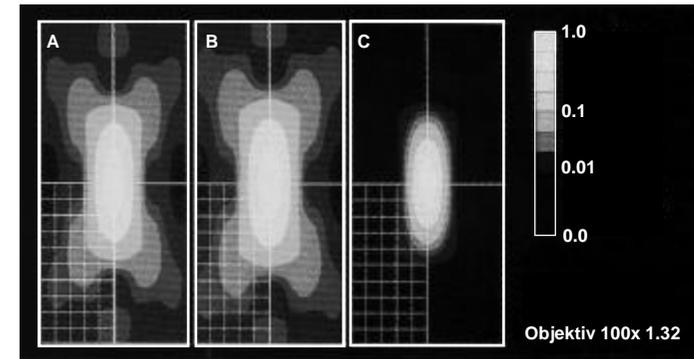


Abbildung 3.5 Graphische Darstellung der Punktübertragungsfunktion (ein Kästchen mit einer Kantenlänge von 100 nm) [57]

Die Ausbreitungsrichtung des Lichts (axiale Komponente) liegt vertikal. Die Punktübertragungsfunktion der Anregung (hier  $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) ist in Teilbild A dargestellt, die der Detektion in B. Die Punktübertragungsfunktion des konfokalen Mikroskops ist durch Faltung beider Verteilungen A und B gegeben und in C dargestellt.

Die konfokale Mikroskopie wird seit einigen Jahren standardmäßig zur Einzelmoleküldetektion herangezogen [23, 61]. Man kann Farbstoffe in optisch transparenten, nicht zu dicken dreidimensionalen Medien untersuchen. Dabei erstellt man zwei- oder dreidimensionale Rasterbilder. Auch die gezielte Auswahl bestimmter Moleküle durch Positionierung des Fokus in hinreichend stark verdünnten Proben und die Untersuchung des zeitlich-dynamischen Verhaltens ihrer Intensität sind möglich. Konfokale Mikroskope sind kommerziell erhältlich oder aus kommerziellen Lichtmikroskopen einfach aufbaubar. Sie stellen damit eine Technik dar, die ohne großen apparativen Aufwand zur Einzelmoleküldetektion eingesetzt werden kann. Man kann sie in der Regel einfach mit anderen optischen Elementen, wie Spektrographen, dichroitischen oder polarisationsteilenden Strahlteilern im Detektionsstrahlengang oder polarisationsdrehenden Einheiten im Anregungsstrahlengang, kombinieren. Der einzige Nachteil ist, daß weitgehend nur immobilisierte Proben untersucht werden können, da die Rastergeschwindigkeit die Zeitauflösung der Bilddetektion stark limitiert.

### 3.1.4 Einzelmoleküldetektion durch Imaging mit Weitfeldanregung

Will man die Bewegung von Molekülen mit Zeitauflösungen bis zu wenigen Millisekunden untersuchen, muß man auf sog. *Imaging*-Techniken zurückgreifen. Bei ihnen erfolgt keine Punkt-zu-Punkt-Abbildung wie bei Rasterverfahren. Vielmehr wird eine große Probenfläche beleuchtet und über eine sog. CCD-Kamera detektiert. Auf diese Weise kann man viele individuelle Moleküle gleichzeitig verfolgen und eventuelle Bewegungen charakterisieren. Durch die großflächige Ausleuchtung kann allerdings kein so großes Auflösungsvermögen wie im konfokalen Fall erzeugt werden. Die resultierende PSF ist im wesentlichen die PSF des Fluoreszenzlichts eines Moleküls. Außerdem erhöht sich durch die Vergrößerung des Anregungssspots in allen drei Dimensionen die optische Komponente des Untergrundes mit der Zunahme des Anregungsvolumens. Dies versucht man beim Imaging im Nahfeld, beschrieben in 3.5, zu umgehen.

Beim sog. *Imaging mit Weitfeldanregung* [62] (Abbildung 3.6) erreicht man die Fokusergrößerung durch den Einbau einer langbrennweitigen dünnen Linse in den Anregungsstrahlengang. Das Objektiv wird dann nicht mehr parallel, sondern mit leicht divergentem oder konvergentem Laserstrahl ausgeleuchtet, wodurch in seiner Brennebene eine Beleuchtungsfleck entsteht. Die Intensitätsverteilung dieses Beleuchtungsflecks kann gaußförmig genähert werden. Will man eine Anregung von möglichst gleichförmiger Intensitätsverteilung erzielen, schneidet man aus dem evtl. mit einem Teleskop aufgeweiteten Laserstrahl mit Hilfe eines variablen Pinholes nur einen kleinen Bereich aus dem Intensitätsplateau aus. Man erhält auf der Probe dann eine Fläche, deren Intensitätsprofil in etwa rechteckig angenähert werden kann. Die Größe des Beleuchtungsfläche kann durch die Pinholegröße gesteuert werden.

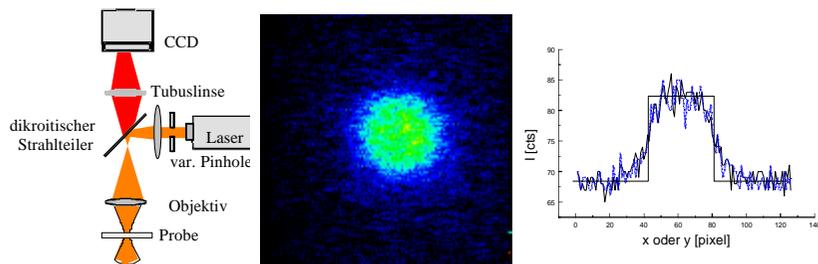


Abbildung 3.6 *Imaging mit Weitfeldanregung*

Schematischer Aufbau (rechts), auf der CCD detektiertes Anregungsprofil (Mitte) und Querschnitt dieses Anregungsprofils (rechts) im Maximum in  $x$  (blau) und  $y$ . Das Anregungsprofil wird als Rechteck angenähert. Ein Pixel entspricht 108 nm.

Die Bedeutung des Imaging mit Weitfeldanregung in der Einzelmoleküldetektion [29,30] liegt in der universellen Einsetzbarkeit für nahezu alle denkbaren Probensysteme. Die Untersuchung

von biologischen Proben, z. B. von lebenden Zellen wie in dieser Arbeit, ist mit anderen Imaging-Techniken nicht generell möglich.

### 3.1.5 Einzelmolekülmikroskopie mit räumlicher Separation: verschiedene Techniken

Die Beugungseigenschaften von Licht limitieren, wie in den vorangehenden Abschnitten gezeigt, die Größe des Anregungsvolumens eines Laserstrahls auf einen Durchmesser von einigen hundert Nanometern, so daß es die tatsächliche Ausdehnung eines einige Nanometer großen Farbstoffmoleküls um ein Vielfaches überschreitet. Es kann somit mit lichtmikroskopischen, räumlich separierenden Verfahren nicht gelingen, irgendwelche molekulare Strukturen aufzulösen. Will man Einzelmoleküle nachweisen, kann bei keinem optischen Verfahren auf die entsprechend hohe Verdünnung verzichtet werden. Dennoch hat die jüngste Entwicklung der Einzelmolekülmikroskopie gezeigt, daß es sinnvoll sein kann, verschiedene mikroskopische Techniken einzusetzen. Neben der *konfokalen Mikroskopie* und dem *Imaging im Weitfeld* haben sich noch weitere Verfahren zur Einzelmoleküldetektion etabliert. Alle Techniken sind schematisch in Abbildung 3.7 dargestellt.

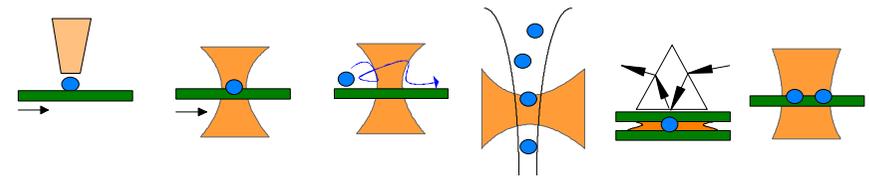


Abbildung 3.7: *Verschiedene Einzelmolekülmikroskopietechniken*

von links nach rechts: SNOM, konf. Mikroskopie, FCS, Detektion von Bursts im Flow, Imaging mit TIR, Imaging mit Weitfeldanregung

Eine Möglichkeit, ein kleiner als beugungslimitiertes Anregungsvolumen zu erzeugen und höhere Auflösung zu erreichen, bietet die Methode der *Nahfeldmikroskopie* (*scanning near field optical microscopy, SNOM*) [18, 19, 20, 21, 64]. Dabei wird das Anregungslicht durch eine kleine Apertur geschickt, deren Durchmesser kleiner ist als die Wellenlänge des Anregungslichts. In unmittelbarer Nähe der Apertur, also im Nahfeld, behält der Lichtstrahl in etwa die Dimension der Apertur. Durch Rasterverfahren gelingt es, auf Oberflächen platzierte Moleküle mit hoher Auflösung abzubilden. In der Praxis verwendet man meist Glasfaserspitzen, die am verjüngten Ende seitlich metallbedampft sind [65]. Auch der Einsatz von Streukörpern bestimmter Geometrie konnte realisiert werden [66]. Die relativ komplizierte und apparativ aufwendige Technik hat in letzter Zeit an Bedeutung verloren, da sie keine prinzipiellen Auflösungsverbesserungen bringen kann – der Durchmesser des Anregungslichts

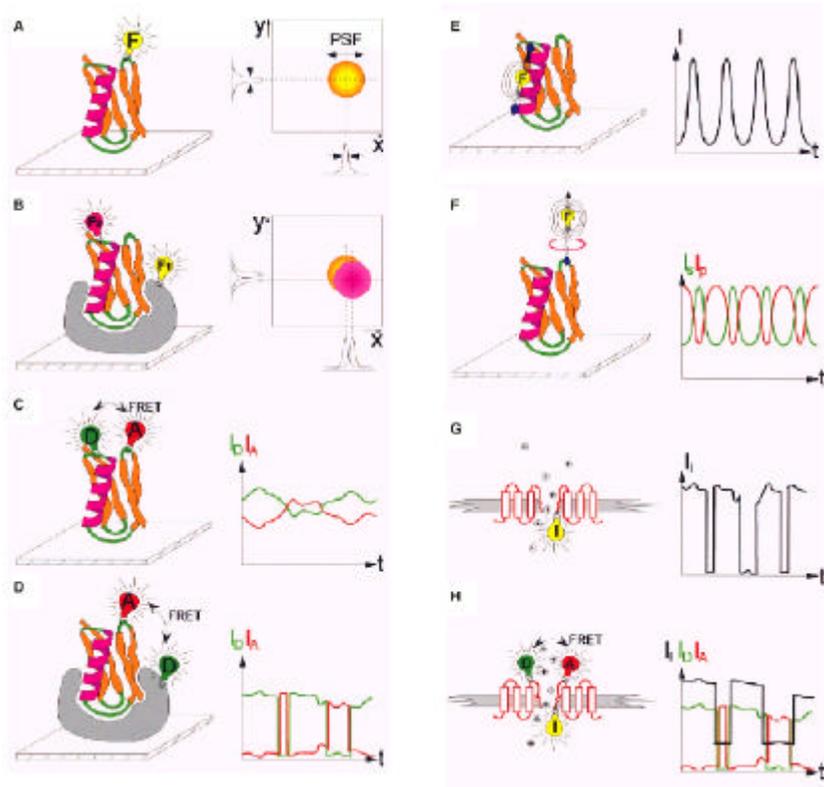


Abbildung 3.9 Experimentelle Möglichkeiten zur Untersuchung geladener Biomoleküle [75]

Die *Orientierung der Übergangsdipolmomente* von Absorption und Emission eines Chromophors kann durch den Einsatz von polarisiertem Anregungslicht oder auch durch die Analyse des emittierten Fluoreszenzlichts hinsichtlich seiner Polarisation bestimmt werden [18, 23, 89, 90, 91]. Starr eingebaute (Abbildung 3.9E) oder in ihrer Rotationsdiffusion eingeschränkte Farbstoffmoleküle (Abbildung 3.9F) [92] können dann Rotationsbewegungen (verursacht durch Konformationsänderungen, Änderungen von Ladungen, pH, sterischer Umgebung und der Stabilität) in Makromolekülen anzeigen. Der starre Einbau eines Labels könnte beispielsweise durch das Einsetzen in eine hydrophobe Proteintasche gelingen. Bereits realisiert wurde das Labeln mit zwei funktionellen Gruppen am Farbstoff zwischen zwei gentechnisch im richtigen Abstand eingebauten Cystein-Bindungsstellen [93].

Dynamische Änderungen in der Umgebung eines Biomoleküls können nicht nur die Rotationsdiffusion eines Labels beeinflussen, sondern auch andere photophysikalische Eigenschaften, wie spektrale Position, Triplett-Besetzung und Triplett-Lebensdauer. Die *Photodynamik* (der Übergang zwischen „on“- und „off“-Zuständen) eines Farbstoffs kann als Indikator für die Änderung von chemischen und elektrochemischen Potentialen genutzt

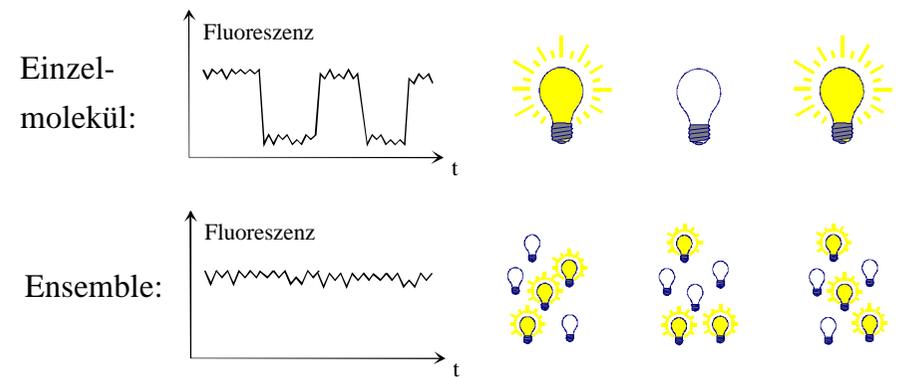


Abbildung 3.8 Modellbeispiel zur Mittelung eines nicht-synchronisierten zeitabhängigen Prozesses im Ensemble

Das zufällige Ein- und Ausschalten einer Glühlampe (hier als Analogon zu einem fluoreszierenden Einzelmolekül betrachtet) kann individuell zeitlich verfolgt werden. Unter vielen Glühlampen leuchtet immer ein konstant großer Teil, selbst wenn die einzelnen Lampen nach wie vor zufällig blinken. Der Prozess des Schaltens ist hier nicht mehr beobachtbar.

Durch das Ausbleiben des Mittelungseffektes in Einzelmoleküluntersuchungen kann man diese grob in zwei mögliche Anwendungsgebiete unterteilen.

Zum einen kann durch die Möglichkeit, jeden individuellen Vertreter einer Population separat zu untersuchen, eine Klassifikation der Population hinsichtlich verschiedener meßbarer Kriterien erfolgen. Sie kann in Subpopulationen oder Regionen unterschiedlicher Spezifität untergliedert werden. Sogar die Einführung einer komparativen Relation und damit einer Ordnung der Population hinsichtlich der Meßgröße wird in speziellen Fällen denkbar.

Zum anderen kann man sich vorstellen, mit der Einzelmoleküldetektion ein ideales Werkzeug in Händen zu haben, um zeitlich nicht-synchron ablaufende dynamische Prozesse, z.B. Reaktionswege einer photochemischen Reaktion im nicht stationären Fall wie auch Fluktuationen in Gleichgewichtsprozessen aufzulösen.

Nach diesen rein theoretischen Überlegungen soll nun auf praktische und konkrete Einzelmoleküleigenschaften und -anwendungen eingegangen werden.

### 3.2.2 Experimentelle Möglichkeiten der Einzelmoleküldetektion

Erste Experimente der Einzelmoleküldetektion bei Raumtemperatur beschränkten sich auf den Nachweis einzelner Moleküle und untersuchten schwerpunktmäßig photophysikalische Eigenschaften (z.B. Photostabilität) von Fluoreszenzfarbstoffen. Dabei wurde eine Reihe von verschiedenen experimentellen Techniken geschaffen, die den SMD-Arbeitsgruppen heute standardmäßig zur Verfügung stehen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gilt es, in verschiedene Anwendungsgebieten die Einzelmoleküldetektion zu etablieren und ihre Vorteile und Eigenschaften in solche Forschungsbereiche einzubringen. Zwei mögliche Zielbereiche sind die Materialwissenschaften und die Biowissenschaften. Dort will man gezielte Information über elementare, molekulare Prozesse und Sachverhalte gewinnen, die mit konventionellen Methoden bislang nicht zugänglich waren.

Diese Arbeit befaßt sich mit biochemischen Fragestellungen, bei denen Biomoleküle, markiert durch Farbstoffe, mit Methoden der Einzelmoleküldetektion charakterisiert oder räumlich wie zeitlich verfolgt werden können. Dabei ist es wichtig, die Rollen von Makromolekül und markierendem Label richtig einordnen zu können. Substrate, die per se fluoreszieren, sind in der Regel selten. So sind auch nur wenige Einzelmolekülexperimente dieser Art beschrieben worden (für ein Beispiel siehe [70]). Ein anderes Experiment von Lu und Xie nutzt die Fluoreszenz des Co-Enzyms FAD aus, um den enzymatischen Umsatz von Cholesterin-Oxidase bei der Steroid-Oxidation zu studieren [71]. Die weitaus größte Bedeutung haben jedoch Systeme, die aus einem vergleichsweise kleinen Farbstoffmolekül und einem großen Makromolekül (z. B. einem Protein) bestehen. Größe und Gewicht des Chromophors ( $M=10^2-10^3$  g/mol) spielen gegenüber dem untersuchten Molekül ( $M=10^5-10^7$  g/mol) normalerweise keine große Rolle, so daß dessen Eigenschaften nicht oder nur kaum verändert werden. Manchmal kann als markierender Farbstoff das Protein *GFP* (*green fluorescent protein*) verwendet werden [72]. GFP kann exprimiert werden. Es ist also ein Label, das „gentechnisch einbaubar“, ist und ohne kovalente Bindungsknüpfung auskommt.

Normalerweise werden Fluoreszenzfarbstoffe jedoch über funktionelle Aminosäurereste durch chemische Bindung an das Makromolekül angebunden. Solche funktionellen Gruppen sind zum einen freie Aminogruppen, die mit Estern oder anderen Carbonsäurederivaten, die als Kopplungsgruppen am Farbstoff hängen, zu Säureamiden reagieren. Da fast alle Biomoleküle freie Aminogruppen tragen, ist die Amidierung das verbreitetste Labelingverfahren. Allerdings ist eine Spezifität der Anbindungsstelle in der Regel nicht gegeben. Ein weiterer Nachteil ist, daß die Anzahl der angebotenen Chromophore nur stochiometrisch festgelegt werden kann, da natürlich alle Aminogruppen labelbar sind. Zum anderen kommen Cystein-Reste in Frage, die im analogen Fall Thioester bilden. Sie sind selten und sitzen an bevorzugten Stellen. Allerdings kommen sie an der Oberfläche von Proteinen kaum in freier Form vor, so daß sie in der Regel gentechnisch durch site-spezifische Mutagenese eingebaut werden müßten. Außerdem können freie Keto- oder Carbonsäuregruppen in Proteinen mit Alkohol- oder Aminogruppen am Farbstoff verknüpft werden. Sie haben vor allem in Kombination mit Cystein-Resten Bedeutung, wenn zwei verschiedene Farbstoffe an definierte Positionen gebunden werden müssen (orthogonales Labeln). Im Sonderfall des DNA-Labelings werden erst die einzelnen Nukleotide spezifisch gelabelt. Erst dann wird der DNA-Strang durch Polymerase-Kettenreaktion aus den gelabelten Nukleotiden aufgebaut. Eine Auswahl der Label in Frage kommenden wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoffe zeigt Tabelle 3.1.

Farbstoff	optimale Anregungswellenlänge [nm]	mol. Extinktionskoeffizient [l/(mol cm)]	Fluoreszenzmaximum [nm]	Medium
Cy3	550	150 000	570	hydrophil
Cy5	649	250 000	670	hydrophil
TMR	544	90 000	572	hydrophil
Alexa 532	530	81 000	555	hydrophil
Alexa 594	590	85 000	615	hydrophil
DiI	549	148 000	565	lipophil
DiI	644	260 000	665	lipophil
Fluorescein	490	88 000	514	hydrophil

Tabelle 3.1 Photophysikalische Daten ausgewählter Fluoreszenzfarbstoffe nach [73, 74]

Das gelabelte Makromolekül kann hinsichtlich verschiedener physikalischer Observablen auf Einzelmolekülebene untersucht werden. Sie sind im wesentlichen in Abbildung 3.9 dargestellt.

Das elementarste Experiment ist die *Lokalisierung des Makromoleküls* (Abbildung 3.9A) mit einer Genauigkeit von ca. 40 nm. Sie erfolgt über einen zweidimensionalen Gaußfit des vom Chromophor erzeugten Fluoreszenzspots, dessen Intensitätsverteilung der Punktübertragungsfunktion PSF einer Punktlichtquelle entspricht. Die präzise Lokalisierung von Molekülen wurde bereits erfolgreich dazu eingesetzt, die Bewegung von Motorproteinen zu charakterisieren [26-28], Diffusionstrajektorien in Lipid-Doppelschichten zu verfolgen [29, 76] und die Diffusion von Molekülen in Gelen [30], in Lösung [77] und Grenzflächen zu beschreiben [78].

Werden in einem Experiment zwei Label verwendet, die mit unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden können, so kann deren *Kolokalisierung* mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern bestimmt werden (Abbildung 3.9B) [79-81]. Dies kann dazu eingesetzt werden, Bindungen und damit indirekt auch bestimmte Funktionen, wie z. B. enzymatischen Umsatz zweier verschieden gelabelter Makromoleküle nachzuweisen [26, 28, 82].

Noch genauer ist die *Kolokalisierung durch Förster Resonance Energy Transfer FRET* [83-85]. Energietransfer dieser Art tritt zwischen einem geeigneten Donor und einem Akzeptorfarbstoff auf, wenn sich beide in einem Abstand von zwei bis acht Nanometern zueinander befinden. Allerdings hängt die Quantenausbeute des Transfers nicht nur vom Abstand, sondern auch von der relativen Orientierung der Farbstoffe zueinander ab. Mit FRET können neben der Kolokalisierung sowohl intramolekulare Konformationsänderungen, z.B. innerhalb eines Proteins (Abbildung 3.9C) [86, 87] wie auch intermolekulare Wechselwirkungen, wie Dissoziation oder Assoziation (Abbildung 3.9D), Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung [82] oder Enzym-Substrat-Interaktion [88], auf einer schnellen Zeitskala dynamisch verfolgt werden.

mikroskopischen Betrachtung der Diffusion kann diese Verbreiterung als Zunahme der Standardabweichung  $\sigma$  bezüglich der Zufallsgröße  $x$  erklärt werden (4-1).

$$s := \sqrt{\langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2} \quad (4-1)$$

Da  $\langle x \rangle = 0$  gilt, genügt es, die Größe  $\langle x^2 \rangle$  zu bestimmen. Starten alle Teilchen im Modell bei  $x = 0$ , gilt (4-2).

$$\langle x^2(n) \rangle = nd^2 \quad (4-2)$$

Da jeder Elementarschritt  $d$  genau die Zeitdauer  $\tau$  benötigt, kann  $\langle x^2 \rangle$  mit der Definition des Diffusionskoeffizienten (4-3) auch als Funktion der Zeit  $t$  geschrieben werden (4-4).

$$D := \frac{d^2}{2t} \quad (4-3)$$

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (4-4)$$

Erweitert man das oben beschriebene eindimensionale mikroskopische Modell auf zwei oder drei Dimensionen, wächst die mittlere quadratische Teilchenposition  $\langle r^2 \rangle$  je Dimension der betrachteten Bewegung um weitere  $2Dt$  an (4-5). Der Diffusionskoeffizient  $D$  ist somit unabhängig von der Dimensionalität des sogenannten *random walk* Prozesses.

$$\langle r^2 \rangle = \langle x^2 \rangle + \begin{cases} 2Dt & \text{für 1 Dimension} \\ \langle y^2 \rangle = 4Dt & \text{für 2 Dimensionen} \\ \langle y^2 \rangle + \langle z^2 \rangle = 6Dt & \text{für 3 Dimensionen} \end{cases} \quad (4-5)$$

Die relative Schritt-Position  $x$  eines Teilchens nach  $n$  Schritten kann wie eine stochastische Zufallsgröße behandelt werden. Die eindimensionale Einzelschritt-Wanderung stellt dann ein Bernoulli-Experiment dar. Anhand der Wahrscheinlichkeitsverteilung dieses Experiments kann die lokale Näherung der Wahrscheinlichkeit bezüglich  $x$  und dem lokalen Intervall  $\partial x$  gemäß (4-6) formuliert werden.

$$P(x)\partial x = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sqrt{2Dt}} e^{-\frac{1}{2} \frac{x^2}{2Dt}} \partial x \quad (4-6)$$

Man beachte, daß die eigentliche Wahrscheinlichkeit das Produkt aus  $P(x)$  und dem infinitesimal kleinen Intervall  $\partial x$  ist. Das Integral von  $P(x) \partial x$  über die ganze Dimension  $x$  ist wieder 1 (Normierung). Durch die Standardisierung entspricht  $x$  wieder der hier eingeführten Zufallsgröße  $x$  (Position). Der Mittelwert von  $\langle x \rangle$  ist Null. Die Einheit von  $P$  ist  $1/m$ , die Standardabweichung wird in  $m$  angegeben.

werden. Abbildung 3.9G zeigt den angebrachten Chromophor als Sonde für das Auf- und Zugehen von Ionenkanälen. Eine solche Dynamik könnte komplementär durch den Einsatz eines FRET-Paares bestätigt werden (Abbildung 3.9H).

### 3.2.3 Bislang bearbeitete experimentelle Fragestellungen der Einzelmoleküldetektion in Life Sciences

Die Bedeutung der Einzelmoleküldetektion (*single molecule detection, SMD*) in der Biochemie besteht vor allem in der Tatsache, daß neuartige Fragestellungen beantwortbar sind. Dies hängt in erster Linie damit zusammen, daß dynamische Eigenschaften von einzelnen Biomolekülen genauso wie die individuelle Funktionen von Untereinheiten in molekularen Maschinen in bislang bekannten Ensembleexperimenten, die in irgendeiner Weise stets Mittelwertuntersuchungen waren, verborgen blieben. Mit Hilfe der neuen Technik ist in sehr kurzer Zeit eine bedeutende Anzahl von Experimenten mit vielfältiger Fragestellung entstanden. Das erste Einzelmolekülexperiment mit einem mit Farbstoff gelabelten Protein (Myosin) wurde 1995 durchgeführt [26].

Seither gelang es, eine Reihe von biochemischen Thematiken mit der SMD zu untersuchen. Diese können in die Bereiche Motorproteine, DNA-Transkription, enzymatischer Umsatz, Protein- Dynamik und die Signaltransfer in Zellsystemen unterteilt werden (Abbildung 3.10) [102].

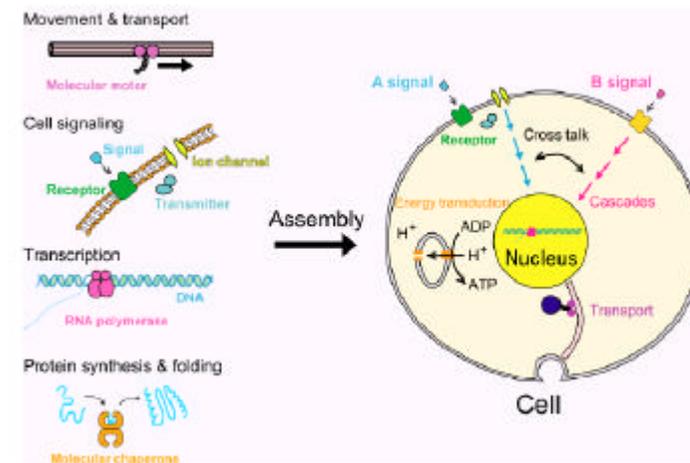


Abbildung 3.10 [102]: Einteilung der biochemischen Felder, die mit SMD untersucht werden

*Molekulare Motoren* sind typische molekulare Maschinen, die Prozesse wie Energiekonversion, Enzymaktivität, molekulare Erkennung und molekulare Selbsterkennung umfassen.

Von großer aktueller Bedeutung für die nahe Zukunft ist die *Biologie in der Zelle*. *Signaltransduktion in Zellen* ist eine sehr komplexe Thematik, weil Zellen komplizierte Gebilde sind, die aus einer Reihe von molekularen Maschinen bestehen [103, 104]. Geht man davon aus, daß Signale innerhalb der Zelle von Signalen außerhalb getriggert werden, finden erste Prozesse auf Zellmembranen statt. Die Untersuchung der Diffusion von Lipid-Molekülen in künstlichen Membranen konnte bereits in SMD-Experimenten detailliert durchgeführt werden [105,106]. Auch über Untersuchungen an artifiziellen Ionenkanälen wurde berichtet [107]. Aktuelle Ergebnisse von Messungen an Membranen lebender Zellen zeigen das Anbinden des sog. *Epidermal Growth Factor (EGF)* an seinem Rezeptor [108] (Abbildung 3.11).

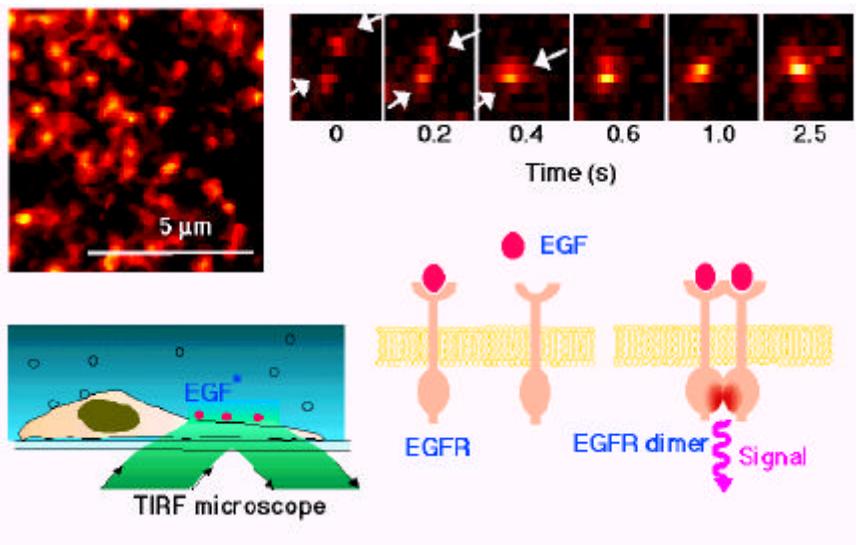


Abbildung 3.11 Anbinden von fluoreszenzgelabeltem EGF an seinem Rezeptor[102]

- A: Fluoreszenzbild einzelner EGF Moleküle auf der Zellmembran  
 B: Dimerisierung zweier EGF- Moleküle (Bilderfolge)  
 C, D: Schemata des TIR-Experiments und der Dimerisierungsreaktion

Die in der hier vorliegenden Arbeit aufgeworfene Fragestellung nach dem Wanderungsmechanismus eines Fremdmoleküls, nämlich von AAV (*adeno associated virus*) in lebenden Zellen, knüpft nahtlos an die Thematik *Biologie in der Zelle* an. Sie ist aktueller Forschungsgegenstand der Virologie und als solcher auch für medizinische Anwendungen wie für das biochemische Grundverständnis von AAV bedeutsam. Hier werden erstmals SMD-Experimente an diesem Themenkomplex vorgestellt. Die biochemische Bedeutung von AAV wird in Kapitel 5 behandelt. Die Einzelmolekülexperimente an AAV finden sich im Kapitel 7.

## 4. Theorie der Diffusion von Biomolekülen

Dieser Abschnitt behandelt im ersten Teil Diffusionstheorie. Dabei werden zunächst grundlegende Diffusionsgesetze anhand verschiedener Modelle nach [111] kurz eingeführt. Anschließend wird auf drei verschiedene Methoden (*Single Particle Tracking*, *Fluorescence Correlation Spectroscopy* und *Fluorescence Recovery after Photobleaching*) der Diffusionsmessung eingegangen, bevor im letzten Teil dieses Kapitels die Diffusion in biologischen Systemen anhand der zum Zeitpunkt der Arbeit vorliegenden Literatur behandelt wird.

### 4.1 Diffusionsgesetze

Als *Diffusion* bezeichnet man die zufällige Wanderung von Teilchen in einem Medium, die direkt auf die Brownsche Wärmebewegung zurückzuführen ist. Neben dem mikroskopischen Ansatz (Kapitel 4.1.1) kann auch eine makroskopische Betrachtung (Kapitel 4.1.2) zur Herleitung von Diffusionsgesetzen verwendet werden. Ausgehend von den Fickschen Gesetzen werden die Sonderfälle Adsorption eines diffundierenden Teilchens (in 4.1.3) und Diffusion und Drift (in 4.1.4) behandelt. Abschließend erfolgt die Berechnung von Diffusionskoeffizienten nach Stokes (in 4.1.5).

#### 4.1.1 Mikroskopischer Ansatz

Die zurückgelegte Wegstrecke  $x$  eines in einer Dimension wandernden Teilchens kann in  $n$  Einzelschritte der elementaren Wegstrecke  $d$  zerlegt werden. Jedes  $d$  wird dabei in der Zeiteinheit  $\tau$  zurückgelegt.

Setzt man den Ursprung als Startpunkt aller Teilchen, wird der Erwartungswert  $\langle x \rangle$  immer Null, egal wie viele Elementarschritte im Ensemble zurückgelegt wurden. Da alle Einzelschritte, die ein individuelles Teilchen zurücklegen kann, unabhängig voneinander verlaufen, hat kein einzelnes Teilchen eine Art „Gedächtnis“ dafür, wie viele Schritte es wo zurückgelegt hat.

Auch wenn der Mittelwert  $\langle x \rangle = 0$  konstant in bezug auf die Zahl der Elementarschritte ist, kann eine Ausbreitung des Teilchenensembles beobachtet werden. Im Modell der

$$C(r) = C_0 \left(1 - \frac{a}{r}\right) \quad (4-17)$$

$$J_r(r) = -DC_0 \frac{a}{r^2} \quad (4-18)$$

$$k_i = 4p DaC_0 \quad (4-19)$$

### 4.1.3 Diffusion bis hin zur Adsorption

Im letzten Teil des vorangegangenen Abschnitts wurde die Diffusion eines stationären Systems mit kugelförmigem Adsorber betrachtet. Hier soll - daran anknüpfend - ein zunächst ebenfalls kugelförmiger Adsorber mit Radius  $a$  gegeben sein, jedoch soll in dem stationären System

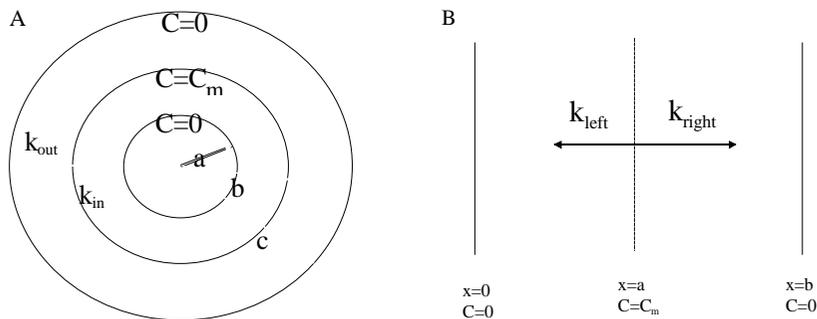


Abbildung 4.2 Verschiedene Adsorber-Modelle nach [111]

A: Adsorption von Teilchen, die von der Teilchenquelle  $C_m$  bei  $r=b$  entweder in Richtung  $r=a$  zum kugelförmigen Adsorber oder in Richtung  $r=c$  zum äußeren sphärischen Adsorber wandern.

B: Adsorption von Teilchen nach Diffusion in einer Dimension. Die Teilchenquelle  $C_m$  liegt bei  $x=a$ , die Adsorber bei  $x=0$  und  $x=b$ .

diesmal noch die Möglichkeit zugelassen werden, daß die Teilchenquelle in der Entfernung  $b$  zum Kugelmittelpunkt sitzt und für größere Entfernungen  $c$  die Teilchenkonzentration wieder gegen Null geht verursacht durch einen zweiten sphärischen Adsorber bei  $c$ . Neben diesem System (Abbildung 4.2A) soll noch ein zweites, lineares System (Abbildung 4.2B) mit Adsorbieren an beiden Enden betrachtet werden. Im kugelsymmetrischen Fall gelten folgende Gesetzmäßigkeiten: Die radiale Teilchenkonzentrationsverteilung  $C(r)$  verhält sich wie in Gleichung (4-20). Sie stellt die Lösung des zweiten Fickschen Gesetzes unter den beschriebenen Randbedingungen dar.

### 4.1.2 Makroskopische Theorie der Diffusion

Makroskopische Betrachtungen beschreiben die Diffusion als Netto-Teilchenfluß, der in Folge eines räumlichen bzw. zeitlichen Konzentrationsgefälles auftritt. Quantitative Zusammenhänge dieser Diffusionstheorie werden ausnahmslos auf die beiden Fickschen Gesetze zurückgeführt.

Als Netto-Teilchenfluß  $J_x$  in der  $x$  Richtung bezeichnet man die Anzahl der Teilchen  $\Delta N_x$ , die im Zeitintervall  $\tau$  durch die Fläche  $A$  tritt (4-7).

$$J_x = \frac{\Delta N_x}{A \Delta t} \quad (4-7)$$

Nach dem ersten Fickschen Gesetz (4-8) verhält sich der Nettofluß (zu einer bestimmten Zeit  $t$  an einem bestimmten Ort  $x$ ) proportional zum Konzentrationsgefälle entlang der Ortskoordinate. Der Diffusionskoeffizient  $D$  ist die Proportionalitätskonstante.

$$J_x = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (4-8)$$

Das zweite Ficksche Gesetz (4-9) kann aus dem ersten unter der Annahme einer konstanten Gesamtteilchenzahl hergeleitet werden. Es gibt an, wie sich eine inhomogene Teilchenverteilung mit der Zeit neu ordnet.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\partial J_x}{\partial x} = D \frac{\partial^2 C}{(\partial x)^2} \quad (4-9)$$

Die dreidimensionale Version des zweiten Fickschen Gesetzes mit dem Laplace-Operator geschrieben, zeigt (4-10).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C \quad (4-10)$$

Für sphärische Probleme gilt mit dem Radius  $r$  (4-11).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (4-11)$$

Wenn man die Randbedingungen (z.B. die Anfangsverteilung) der Differentialgleichung zweiter Ordnung (4-11) kennt, kann man Verteilungen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmen. Abbildung 4.1 zeigt zwei solche Lösungen für einfache Randbedingungen, die Bedeutung für den experimentellen Teil dieser Arbeit besitzen..

Der erste Fall, der betrachtet werden kann, ist das *isotrope Eindiffundieren* einer begrenzten Menge einer Substanz *ausgehend von einem Punkt* mit  $r=0$  für  $t=0$  in ein Medium mit

unendlicher Ausdehnung in allen drei Dimensionen. Im Modellversuch entspricht dies dem Eindiffundieren eines Farbstoffes in ein Becherglas, ausgehend von der Spitze einer Mikropipette. Dies ist in Abbildung 4.1 A dargestellt. Die räumliche Konzentrationsverteilung ist zu jeder Zeit  $t$  gaußförmig in alle drei Raumrichtungen (Gleichung (4-12)). Das zeitliche Verhalten der Konzentration an einem bestimmten Punkt im Abstand  $r$  vom Ursprung steigt dabei zunächst an, durchläuft ein Maximum bei  $t = r^2/6D$  und fällt dann wieder ab.

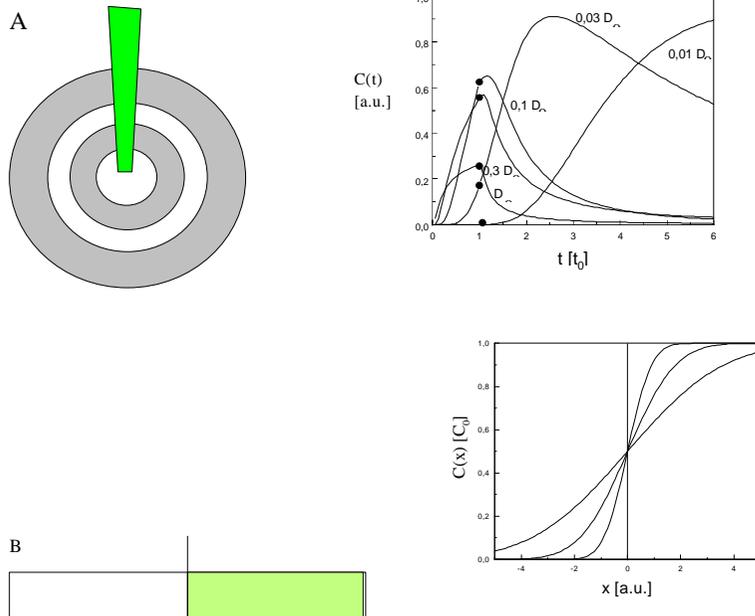


Abbildung 4.1 Lösungen des 2. Fickschen Gesetzes unter verschiedenen Randbedingungen nach [111]

A: Diffusion einer begrenzten Teilchenmenge aus der Spitze einer Mikropipette in Wasser. Die Funktionenschar simuliert die zeitliche Entwicklung der Konzentrationsverteilung an einem Ort  $r$  gemäß Gleichung (4-12). Dargestellt sind die Diffusionskoeffizienten  $D = D_0, 0,3D_0, 0,1D_0, 0,03D_0$  und  $0,01D_0$ . (Der Punkt in der Funktion deutet den stetigen Übergang der jeweiligen Funktion an der Stelle  $t=t_0$  an.)

B: Diffusion innerhalb einer Röhre (ein Reservoir (links) wird durch Trennwand entfernt in eine Röhre entlassen.). Die Konzentrationsverteilung  $C(x)$  für  $t=0, t=t_0, t=2t_0$  und  $t=4t_0$  ist rechts dargestellt.

Geht man davon aus, daß alle Teilchen  $N$  mit der konstanten Rate  $k_i$  in der Zeit  $t_0$  in die Lösung eindiffundiert sind, kann die zeitliche Abhängigkeit der Konzentration als von einem Puls mit Länge  $t_0$  erzeugtes Wellenverhalten verstanden werden.  $C$  wird dann wie in Gleichung (4-12) beschrieben. Abbildung 4.1 zeigt den zeitlichen Verlauf von  $C$  bei einem bestimmten Radius  $r$  in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D$ .

$$C(r, t) = \frac{N}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} \quad N = k_i dt \quad dt = t_0 \quad (4-12)$$

$$C(r, t) = \begin{cases} \frac{k_i}{4\pi Dr} \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4Dt}}\right) & t \leq t_0 \\ \frac{k_i}{4\pi Dr} \left[ \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4Dt}}\right) - \operatorname{erfc}\left(\frac{r}{\sqrt{4D(t-t_0)}}\right) \right] & t > t_0 \end{cases} \quad (4-13)$$

Die Funktion  $\operatorname{erfc}$  (Komplement der Fehlerfunktion  $\operatorname{erf}$ ) verläuft wie eine an einer vertikalen Achse gespiegelte  $\sigma$ -Funktion, die wiederum als Integralfunktion einer Gaußfunktion bezüglich des Ortes  $r$  verstanden werden kann.

Ein zweiter einfacher Fall ist die *eindimensionale Diffusion von Teilchen*, in der Praxis erreicht durch ihre Begrenzung innerhalb einer Röhre (Abbildung 4.1B). So ist es denkbar, eine Röhre durch eine Trennwand in zwei Reservoir - eines davon ist mit Teilchen einer konstanten Konzentration befüllt, eines nur mit Medium - zu unterteilen. Zum Zeitpunkt  $t=0$  ist dann  $C=0$  für  $x < 0$  und  $C=C_0$  für  $x > 0$ . Dieser Fall dient in der Praxis zum einfachen Messen von Diffusionskoeffizienten. Die Lösung des zweiten Fickschen Gesetzes zeigt Gleichung (4-14).

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2} \left[ 1 + \operatorname{erf}\left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}}\right) \right] \quad (4-14)$$

$$\frac{\partial C}{\partial x} = \frac{C_0}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (4-15)$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{-x}{2t} \frac{\partial C}{\partial x} \quad (4-16)$$

Man kann nun die zeitliche oder räumliche Entwicklung von  $C$  mathematisch beschreiben ((4-15) und (4-16)) und  $D$  bestimmen.

Eine Klasse von wichtigen Lösungen für das zweite Ficksche Gesetz stellen Systeme mit stationären Lösungen dar. Hier erfolgt die Diffusion ausgehend von einer „Teilchenquelle“, und endet an einem Adsorber. Der Diffusionsprozeß wird also nicht mit einer Gleichverteilung im Medium nach unendlich großer Zeit enden, sondern mit einer Gleichgewichtsverteilung mit hohen Konzentrationen nahe der Quelle und niedrigen nahe dem Adsorber. Man kann solche Systeme ganz einfach erklären: Das Konzentrationsgefälle zwischen Quelle und Adsorber ist konstant. Die zweite Ableitung der Konzentration bezüglich des Ortes ist Null. Nach Gleichung (4-11) ist dann auch die zeitliche Änderung der Konzentrationsverteilung Null. Das System befindet sich im Gleichgewichtszustand. Die exakte Form der Konzentrationsverteilung  $C(r)$  hängt nur mehr von seiner Geometrie ab. Als Beispiel sei hier eine als Adsorber wirkende Kugel mit Radius  $r=a$  in einem unendlich großen Medium betrachtet. Die Konzentration in unendlicher Entfernung zur Kugel sei  $C_0$ .  $C(r)$  ist dann in Gleichung (4-17) angegeben, der radial zur Kugelmitte gerichtete Teilchenfluß in (4-18), die Rate  $k_i$ , mit der die Teilchen in Richtung der Kugelmitte wandern in (4-19).

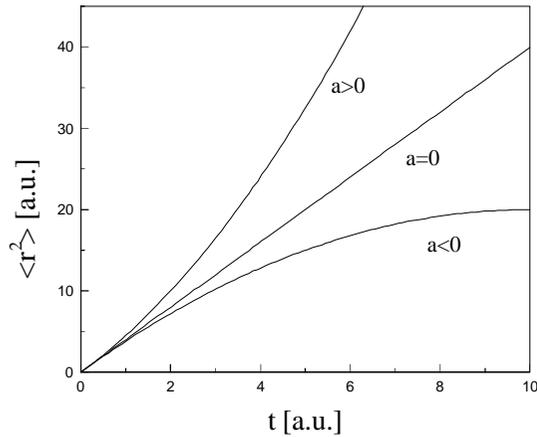


Abbildung 4.3 Funktionsverlauf von  $\langle r^2(t) \rangle$  gemäß Gleichung (4-35) nach [111]

Für  $a=0$  ist der Kurvenverlauf linear, für positive  $a$  links-, für negative  $a$  rechtsgekrümmt.

#### 4.1.5 Berechnung des Diffusionskoeffizienten mit dem Gesetz von Einstein-Stokes

In diesem Abschnitt wird gezeigt, daß der Diffusionskoeffizient eine Größe ist, die lediglich von Ausdehnung und Geometrie des diffundierenden Teilchens und der Viskosität  $\eta$  des umgebenden Mediums abhängig ist.

Nach Gleichung (4-36) kann der Diffusionskoeffizient  $D$  bestimmt werden, wenn die Reibungskoeffizient  $f$  bekannt ist.

$$D = \frac{kT}{f} \quad (4-36)$$

$f$  selbst ist eine Funktion von  $\eta$ . Der funktionelle Zusammenhang  $f(\eta)$  ist für ein kugelförmiges Teilchen mit hydrodynamischem Radius  $a$  aus Gleichung (4-37) zu entnehmen.  $a$  entspricht für ungeladene makroskopische Moleküle etwa dem tatsächlichen Teilchenradius.

$$f_{\text{Kugel}} = 6\pi\eta a \quad (4-37)$$

Aus Abbildung 4.4 wird ersichtlich, wie  $f$  für scheiben- und ellipsoidförmige Teilchen von  $\eta$

$$C(r) = \begin{cases} C_m \left(1 - \frac{a}{r}\right) \frac{b}{b-a} & \text{für } a \leq r \leq b \\ C_m \left(\frac{c}{r} - 1\right) \frac{b}{c-b} & \text{für } b \leq r \leq c \end{cases} \quad (4-20)$$

Mit dem ersten Fickschen Gesetz ergibt sich der radiale Teilchenfluß (4-21). Die beiden Raten erhält man, wenn man  $J_r(b)$  mit der Kugelschalenfläche  $A=4\pi r^2$  multipliziert.  $K_{in}$  gilt für den Fall  $r \leq b$ ,  $k_{out}$  für  $r \geq b$  (4-22).

$$J_r(r) = \begin{cases} -DC_m \frac{a}{r^2} \frac{b}{b-a} & \text{für } a \leq r \leq b \\ DC_m \frac{c}{r^2} \frac{b}{c-b} & \text{für } b \leq r \leq c \end{cases} \quad (4-21)$$

$$k_{in} = 4\pi DaC_0 \frac{b}{b-a}, k_{out} = 4\pi DcC_0 \frac{b}{c-b} \quad (4-22)$$

Die Wahrscheinlichkeit der Adsorption eines Teilchens, das bei  $b$  startet, ist der Quotient in (4-23). Er geht gegen  $a/b$  falls  $c$  sehr groß wird. Die Adsorptionswahrscheinlichkeit für diesen Grenzfall  $p$  sinkt mit  $1/b$ .

$$P_{ad} = \frac{k_{in}}{k_{in} + k_{out}} = \frac{a(c-b)}{b(c-a)} \quad (4-23)$$

Betrachtet man die Kugel als Non-Adsorber, ist die durchschnittliche Anzahl vergeblicher Adsorptionsversuche, ausgehend von  $b$  - also der Wanderungen von  $b$  Richtung Adsorberoberfläche - bis zum Wegwandern in die Region außerhalb von  $b$  in Richtung  $c$ ,  $\langle n \rangle$  (4-24).  $p$  ist wieder die Kontaktwahrscheinlichkeit des Teilchens an der Kugel, wie oben beschrieben.  $(1-p)$  ist die Wahrscheinlichkeit für ein Teilchen, das bei  $b$  startet, in Richtung  $c$  zu wandern. Falls  $b$  nicht wesentlich größer ist als  $a$ , durchläuft ein Teilchen eine riesige Anzahl von Kontaktversuchen, bis es schließlich aus dem Bereich in der Nähe des Adsorbers verschwindet.

$$\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} np^n (1-p) = \frac{a}{b-a} \quad (4-24)$$

Um ein Maß für die zeitliche Verarmung an diffundierenden Teilchen in einer Lösung zu bekommen, wir im folgenden das mathematisch einfachere lineare Modell betrachtet.

Die mittlere Zeit  $W(x)$ , in der ein Teilchen von einem beliebigen Startpunkt  $x$  aus an einem der beiden Adsorber des linearen Modells gefangen wird, kann aus folgender Differentialgleichung ermittelt werden (4-25).

$$\frac{\partial^2 W}{(\partial x)^2} + \frac{1}{D} = 0 \quad (4-25)$$

Die Lösung des Problems zeigt (4-26).

$$W(x) = \frac{1}{2D}(bx - x^2) \quad (4-26)$$

Für zwei Adsorber gilt:  $\langle W \rangle = \frac{b^2}{3D}$ ; für einen Adsorber:  $\langle W \rangle = \frac{b^2}{12D}$

Falls nur bei  $x=0$  ein Adsorber auftritt und  $x=b$  nur eine Reflexion beschreibt, steht statt  $b$  dann  $2b$  in (4-27). Über die Beziehung (4-28) kann die über alle Startpositionen gemittelte Adsorptionszeit  $\langle W \rangle$  bestimmt werden.

$$\langle W \rangle = \frac{1}{b} \int_0^b W(x) dx \quad (4-27)$$

#### 4.1.4 Diffusion mit Drift

Bislang wurde Diffusion ohne Einwirkung einer äußeren Kraft  $F_x$  auf ein diffundierendes Teilchen betrachtet. Tritt die Beschleunigung  $a$  auf, verändert sich im mikroskopischen *Random Walk Modell* die Position eines Teilchens von einem Elementarschritt zum nächsten gemäß (4-28).

$$x(n) = x(n-1) \pm v_x \tau + \int_0^\tau a t dt \quad (4-28)$$

Ist  $a$  konstant, bewegt sich das Teilchen im Verlauf eines Elementarschritts der Zeitdauer  $\tau$  mit der Geschwindigkeit  $\pm v_x + v_d$  weiter, wobei  $v_d$  durch (4-29) beschrieben wird.

$$v_d = \frac{a\tau}{2} \quad (4-29)$$

Das erste Ficksche Gesetz mit Drift als Störung ( $v_d$  konstant) des Diffusionsprozesses, kann gemäß (4-30) mit  $v_D$  als Konstante formuliert werden:

$$J_x = -D \frac{\partial C}{\partial x} + v_d C \quad (4-30)$$

Das zweite Ficksche Gesetz lautet dann:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{(\partial x)^2} - v_d \frac{\partial C}{\partial x} \quad (4-31)$$

Die Lösung des eindimensionalen Problems mit Eindiffundieren einer begrenzten Teilchenzahl aus einer Mikropipette in ein unendlich großes Reservoir mit Driftgeschwindigkeit  $v$  lautet jetzt analog zu (4-15) wie in (4-32) dargestellt.

$$\frac{\partial C}{\partial x} = \frac{C_0}{\sqrt{4Dt}} e^{-\frac{(x-vt)^2}{4Dt}} \quad (4-32)$$

Für  $\langle x^2 \rangle$  berechnet sich:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt + (vt)^2 \quad (4-33)$$

In drei Dimensionen gilt (4-35) bzw. mit nicht konstanter Drift-Geschwindigkeit (4-36).

$$\langle r^2 \rangle = 2iDt + v^2 t^2 \text{ in } i - \text{Dim} \quad (4-34)$$

$$\langle r^2 \rangle = 2iDt + \left( \int a t dt \right)^2 \text{ in } i - \text{Dim} \quad (4-35)$$

In Abbildung 4.3 ist die Abweichung im Funktionsverlauf von  $\langle r^2(t) \rangle$  vom linearen Verhalten durch den Einfluß einer externen Kraft dargestellt. Bei positiver Beschleunigung steigt die Kurve links- bei negativer Beschleunigung rechtsgekrümmt an.

$$r(t) = \int |\mathbf{r}(t+t') - \mathbf{r}(t')|^2 dt' \tag{4-43}$$

Die Formel (4-43), findet sich in der Literatur [114]. Sie sollte exakter formuliert werden als Integral über dn(ti) mit n als Wiederholungslaufzahl. Ersetzt man das Integral wieder durch ein Summenzeichen, erhält man genau (4-41).

Man kann wiederum zeigen, daß im Falle der freien Diffusion, bei der kein Teilchen die Grenze erreicht, die durch den eindimensionalen Ausdehnungsparameter L beschrieben wird, für ρ(t) (4-44) gilt.

$$r(t) = 2iDt \text{ in } i\text{-Dim falls } 4D \ll L^2 \tag{4-44}$$

Im Falle der Diffusion im begrenzten Gebiet konvergiert ρ(t) (bzw. <r<sup>2</sup>>) gegen einen von der Geometrie der Begrenzung abhängigen konstanten Wert. Die Meßmethode des *Single Particle Tracking* ganz allgemein mißt für unendlich große Zeitfenster daher immer folgendes:

$$r(\infty) = \begin{cases} 4Dt \xrightarrow{\infty} & \text{Bestimmung von } D \text{ bei freier Diffusion immer möglich} \\ \frac{R^2}{3} & \text{Bestimmung des Radius } R \text{ eines Kreises als Begrenzung} \\ \frac{a^2}{3} & \text{Bestimmung der Seitenlänge } a \text{ eines Quadrates als Begrenzung} \end{cases} \tag{4-45}$$

Die beiden weiteren hier nur kurz erwähnten Methoden zur Diffusionsmessung, die *Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)* und die Methode der *Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)*; ein Review für beide Methoden ist [115]), gehen auf die sog. *Positions Korrelations-Funktion* (4-46) zurück

$$g_r(t) = \langle [\mathbf{r}(t)\mathbf{r}(0)] \rangle = \iint \mathbf{r}\mathbf{r}' P(\mathbf{r}') P(\mathbf{r}' \rightarrow \mathbf{r}; t) d\mathbf{r} d\mathbf{r}' = \frac{1}{2} \iint [r^2 + r'^2 - (\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2] P(\mathbf{r}') P(\mathbf{r}' \rightarrow \mathbf{r}; t) d\mathbf{r} d\mathbf{r}' = \langle r^2 \rangle - \frac{1}{2} \langle r(t) \rangle$$

mit  $2\mathbf{r}\mathbf{r}' = r^2 + r'^2 - (\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2 \tag{4-46}$

Sie kann in zwei Summanden zerlegt werden, einen Geräteparameter <r<sup>2</sup>> und das Mean Square Displacement. Leider ist die Literatur an dieser Stelle etwas uneinheitlich. Das hier eingeführte <r<sup>2</sup>> ist hier das quadratische Mittel aller Ortsvektoren **r** im Raum, die als Startpositionen eines Wanderungsschrittes auftreten können. <r<sup>2</sup>> ist deshalb ein Maß für die Begrenzung des untersuchten Gebiets. Für freie Diffusion ist die Korrelationsfunktion g<sub>r</sub>(t) nicht definiert. Formal betrachtet, sind Methoden, die über Korrelation (gemäß (4-46)) Diffusion messen, daher solche, die per Methode ein begrenztes Gebiet untersuchen, in dem sie

abhängt.

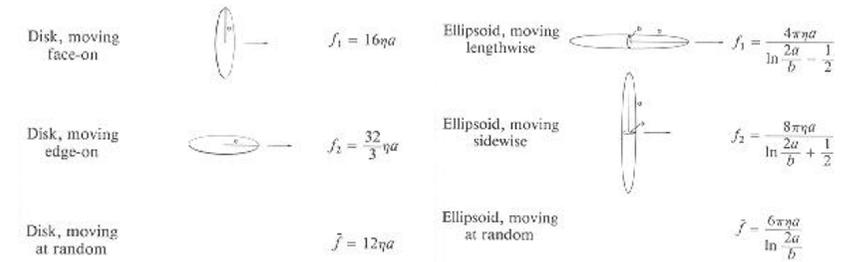


Abbildung 4.4 Reibungskoeffizienten f (**h**) für eine fläche Scheibe (links) und ein zigarrenförmiges Ellipsoid (rechts) nach [111]

f<sub>1</sub> und f<sub>2</sub> sind Reibungskoeffizienten für bestimmte Orientierung des geometrischen Körpers zur Bewegungsrichtung (vorgegeben durch Pfeil). Die dritte angegebene Reibungskoeffizient über alle Orientierungen gewichtete Mittelwert von f<sub>1</sub> und f<sub>2</sub>. Die f-Werte für das zigarrenförmige (Hauptachse a > Nebenachse b) Ellipsoid sind grobe Näherungen für stark unterschiedliche Achsen (a >> b).

Will man die Reibungskoeffizienten f von Kugel und Ellipsoid miteinander vergleichen, ist es sinnvoll beide Objekte auf gleiches Volumen zu normieren.

Im Grenzfall a=b muß der Quotient aus den Reibungszahlen beider Objekte Eins ergeben. Ansonsten sollte das Objekt mit der größeren Oberfläche, also das Ellipsoid, den größeren Reibungskoeffizienten aufweisen. Abbildung 4.5 zeigt allgemein das Verhältnis der Reibungskoeffizienten von Kugel zu Ellipsoid für variables b/a.

In der Praxis läßt sich mit der Überlegung, dargestellt in dieser Abbildung, jedes ellipsoide Teilchen mit einer maximalen Fehlergenauigkeit von 20% als Kugel annähern. Wenn man die Viskosität des Mediums kennt, kann man abhängig vom Teilchenradius den Diffusionskoeffizienten D nach (4-37) berechnen. Die Viskositäten für in dieser Arbeit (siehe Kapitel 7.5) relevante Medien sind tabellarisch dargestellt:

Medium (Massenverhältnis)	Viskosität η [g/(s m)] bei Raumtemperatur
Wasser	0,89
TRIS-Pufferlösung (w=30%)	1,41
Glycerin	934
Wasser:Glycerin (1 :1,25 )	8,34
Wasser:Glycerin (1 :5,25 )	84,3

Tabelle 4.1 Viskositäten ausgewählter Medien bei Raumtemperatur nach [109]

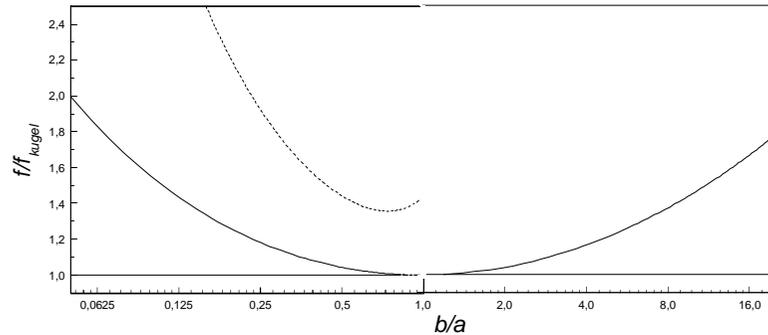


Abbildung 4.5 Simulation der Abhängigkeit des Reibungskoeffizienten  $f$  für ein allgemeines Ellipsoid nach [251,111] relativ zum Reibungskoeffizienten für eine Kugel  $f_{\text{Kugel}}$  gleichen Volumens in Abhängigkeit des Verhältnisses von Neben- zu Hauptachse  $b/a$ .

Der linke Kurvenast beschreibt zigarrenförmige ( $b < a$ ), der rechte diskusförmige ( $a < b$ ) Ellipsoide. Die Asymmetrie der Kurve rührt daher, daß die Nebenachse  $b$  eigentlich für zwei Achsen steht,  $a$  nur einmal vorkommt (siehe Abbildung 4.4). Man erkennt, daß für  $0,25 < b/a < 4$  Ellipsoide einen Reibungskoeffizienten haben, der weniger als 20% von dem einer Kugel gleichen Volumens abweicht. Die gestrichelte Kurve zeigt die in Abbildung 4.4 eingeführte Näherung für zigarrenförmige Ellipsoide.

## 4.2 Methoden der Diffusionsmessung

In diesem Abschnitt wird die Idee von drei experimentellen Methoden zur Diffusionsmessung mit Hilfe von Fluoreszenzdetektion kurz beschrieben. Diese drei Techniken sind Single Particle Tracking, Fluorescence Correlation Spectroscopy und Fluorescence Recovery after Photobleaching.

Beim sogenannten *Single Particle Tracking* (SPT; vergleiche Review [110]) nimmt man mit mikroskopisch bildgebenden Verfahren in der Regel zweidimensionale oder in zwei Dimensionen projizierte Trajektorien von einzelnen diffundierenden Teilchen auf. Dabei wird eine Bilderfolge mit konstantem Zeitintervall zwischen der Einzelbildaufnahme generiert [29, 112]. Statt der Konzentrationsverteilung  $C$  im Ensemble wird die Wahrscheinlichkeitsverteilung für Einzelteilchen betrachtet. Sie genügt wieder dem zweiten Fickschen Gesetz (4-38).

$$\frac{\partial}{\partial t} P(\mathbf{r}, t) = D \nabla^2 P(\mathbf{r}, t) \quad (4-38)$$

Die Lösung für ein Teilchen mit Startpunkt  $\mathbf{r}=0$  entspricht dem in Abbildung 4.1 dargestellten Fall des Eindiffundierens aus einer Mikropipette. Die zweidimensionale Lösung  $P d\mathbf{r}^2$  - man beachte das quadratische Differential - gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein Teilchen, das zur Zeit  $t=0$  bei  $\mathbf{r}=0$  gestartet ist, zur Zeit  $t$  in einem Radius  $r$  zu finden.

$$P(\mathbf{r}^2, t) d\mathbf{r}^2 = \frac{1}{r_0^2} e^{-\frac{r^2}{r_0^2}} d\mathbf{r}^2 \text{ mit } r_0^2 = 4Dt \quad (4-39)$$

Eine elegante mathematische Umwandlung von (4-39) stellt (4-40) dar.

$$P(\mathbf{r}^2, t) = \int_0^{r^2} \frac{1}{r_0^2} e^{-\frac{r^2}{r_0^2}} d\mathbf{r}^2 = 1 - e^{-\frac{r^2}{r_0^2}} \quad (4-40)$$

Diese Funktion kann für konstantes Zeitfenster  $t$  mit dem Parameter  $r_0^2$  gefittet werden, wenn man die Werte  $r^2$  für viele Einzelbewegungsschritte beliebig vieler Teilchen mißt. Man kann zeigen [113], daß für  $r_0^2$  gilt  $r_0^2 = \langle r^2 \rangle = 4Dt$  (vergleiche Gleichung (4-39) und (4-5)). Damit wird  $D$  bestimmbar. Ausführlicher wird die Methode des Single Particle Tracking am konkreten Experiment im Kapitel 7-4 beschrieben.

Eine andere Auswertung zu dieser Methode der Bestimmung von  $\langle r^2 \rangle$  mittels einfach die  $r^2$ -Werte über alle Einzelbewegungsschritte im Zeitfenster  $t=\Delta t$ .  $\langle r^2 \rangle$  entspricht dann dem sog. *Mean Square Displacement MSD* (4-41).

$$MSD(\Delta t) = \frac{1}{\sum_{\Delta t=t_i-t_j} 1} \sum [\mathbf{r}(t_i) - \mathbf{r}(t_j)]^2 \quad (4-41)$$

Die allgemeine Definition des *Mean Square Displacement* mit der Bezeichnung  $\rho(t)$  lautet [114]:

$$\mathbf{r}(t) := \langle [\mathbf{r}(t) - \mathbf{r}(0)]^2 \rangle = \iint P(\mathbf{r}') (\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2 P(\mathbf{r}' \rightarrow \mathbf{r}; t) d\mathbf{r} d\mathbf{r}' \quad (4-42)$$

$P(\mathbf{r}')$  ist dabei die stationäre Wahrscheinlichkeitsverteilung zur Zeit  $t=0$ ,  $P(\mathbf{r}' \rightarrow \mathbf{r}; t)$  ist die Übergangswahrscheinlichkeit, ein Teilchen, das vorher bei  $\mathbf{r}'$  war, nach  $t$  bei  $\mathbf{r}$  zu finden und  $(\mathbf{r} - \mathbf{r}')^2$  ist der Übergangoperator. Diese Gleichung läßt sich, da der Prozess völlig unabhängig von der Startzeit  $t=0$  des Experiments ist und jede Einzelwanderung unabhängig zur anderen bei  $t=t'$  beginnt, zu (4-43) vereinfachen.

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt \quad (4-52)$$

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha \quad (4-53)$$

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (vt)^2 \quad (4-54)$$

$$\langle r^2 \rangle = \langle r_c^2 \rangle [1 - A_1 e^{-\frac{4A_2 Dt}{\langle r_c^2 \rangle}}] \quad (4-55)$$

Die zugehörigen Graphen zu diesen Gleichungen zeigt Abbildung 4.6.

In Gleichung (4-53) ist  $\alpha < 1$ , in (4-54) ist  $v$  die Driftgeschwindigkeit. Directed motion ist nichts anderes als die Diffusion mit Drift, wie sie in Kapitel 4.1.4 beschrieben wird. In (4-55) ist  $\langle r_c^2 \rangle$  der quadratische Durchmesser des begrenzten Raums bei kreisförmiger Näherung und zweidimensionaler Bewegung.  $A_1$  und  $A_2$  sind geometrische Parameter des begrenzten Raums, der in der Literatur auch als *Koralle* bezeichnet wird.

Anomale Diffusion tritt in Folge der Wechselwirkung des diffundierenden Teilchens mit sog. *Obstacles* in einer Art elastischer Stoß oder mit *Traps* als temporäre Adsorption oder als anderer inelastischer Vorgang auf. Für zweidimensionale Diffusionsprozesse gibt es eine Reihe von Simulationen, die im wesentlichen zwei Fälle unterscheiden: Diffusion in Gegenwart von zufällig verteilten punktförmigen *Obstacles* [170] ist anomal für kurze Zeitfenster, aber normal für Zeitfenster oberhalb der sogenannten *crossover time*  $t_{cr}$ . Lediglich der Diffusionskoeffizient ist in diesem Fall kleiner als bei freier Diffusion in Lösung vergleichbarer Viskosität. Mit Zunahme der *Obstacle*-Konzentration sinkt  $\alpha$ ,  $t_{cr}$  steigt. Steigt die Konzentration weiter an, wird  $t_{cr}$  unendlich groß, es tritt nur mehr anomale Diffusion auf (*Percolationspunkt*). Das Diffusionsverhalten von Teilchen hingegen, die in sog. *Traps* gelangen oder an *Obstacles* binden, ist anomal über alle Zeitbereiche. Da solche Prozesse sehr komplex sind und nicht mehr leicht zu simulieren sind, sei hier nur auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen [171, 172]. Anomale Diffusion wurde erstmals von Ghosh beschrieben [173] Er untersuchte die Wanderung sog. LDL-Rezeptoren auf Zellmembranen mit SPT und stellte, dabei fest, daß 50% der Trajektorien anomale Diffusion mit  $0,2 < \alpha < 0,9$  zeigten. Auch Übergänge von normaler zu anomaler Diffusion konnte an einzelnen Trajektorien gezeigt werden. Dieser Effekt läßt sich dadurch erklären, daß verschiedene Domänen auf der Membran existieren.

Diffusion in begrenztem Bereich kann verschiedene Ursachen haben: Ein Teilchen kann sich innerhalb einer geometrischen Begrenzung befinden, kann aber auch an eine immobile Stelle in seiner Umgebung wie durch eine Leine gebunden sein [174]. Im einen Fall gibt  $\langle r_c^2 \rangle$  das Quadrat des Radiuses der kreisförmigen Begrenzung, im anderen Fall das Quadrat der Länge der Leine an. Confined Motion wurde erstmals überzeugend von Kusumi im SPT-Experiment anhand der Wanderung von Transferrin Rezeptoren auf Fibroplasten gezeigt [128, 175].

Directed motion ist die Überlagerung einer systematischen gerichteten Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit und der Diffusionsbewegung eines Teilchens. Das mobile Teilchen koppelt an ein sich gerichtet bewegendes System an. Sobald das Teilchen den Bereich im System verläßt, der mit bestimmter Geschwindigkeit driftet, diffundiert es wieder frei [176].

Wanderungsprozesse (die selbst auch freie Diffusion darstellen können) betrachten. Gelingt die Charakterisierung eines bei der Messung intrinsisch vorliegenden ortsabhängigen Parameters, kann auch die Autokorrelationsmessung das Mean Square Displacement gleichwertig bestimmen.

Bei der Methode der FCS, wird die Wanderung von Teilchen in einem beugungslimitierten Laserspot untersucht. Der charakteristische ortsabhängige Parameter ist die Halbwertsbreite des Gaußprofils  $\omega_0^2$  (zweidimensionale Näherung in Gleichung (4-47)).

$$I(r) = I_0 e^{-\frac{r^2}{\omega_0^2}} \quad (4-47)$$

Die Autokorrelation selbst lautet vereinfacht [115]:

$$g_r(t) = 1 + a \left( \frac{1}{1 + \frac{t}{t_D}} \right) \quad (4-48)$$

Zur Bestimmung von  $D$  gemäß (4-49), muß man  $\omega_0^2$  kennen und  $\tau_D$  durch Fit der Korrelationsfunktion bestimmen.

$$D = \frac{v_0^2}{4t_D} \quad (4-49)$$

Neben der FCS kann Diffusion auch mit FRAP-Experimenten [114] untersucht werden. Die Funktion  $f(t)$  gibt dabei das zeitabhängige Wiederauftreten von Fluoreszenz durch das Eindiffundieren von Teilchen in einen mit einem Laser ausgebleichten Fleck an (4-50). Es tritt wie bei der FCS die Größe  $\tau_D(D, \omega_0^2)$  auf, aus der letztendlich  $D$  bestimmt werden kann.  $\kappa$  ist die Bleicheffizienz,  $\tau_f = \omega_0/v_d$  ist die für einen meist in Systemen, die mit FRAP untersucht werden, auftretenden systematischen Drift (vergleiche Kapitel 4.1.3) der Geschwindigkeit  $v_d$  charakteristische Zeitdauer.

$$f(t) = 1 - \kappa \frac{e^{-\frac{(\frac{t}{\tau_f})^2}{(1 + \frac{t}{t_D})}}}{1 + \frac{t}{t_D}} \quad (4-50)$$

Falls kein effektiver Massentransfer auftritt ( $t \gg \tau_D$ ), vereinfacht sich die Gleichung (4-50) zu (4-51).

$$f(t) = 1 - k \frac{e^{-\left(\frac{t}{t_D}\right)^2}}{1 + \frac{t}{t_D}} \quad (4-51)$$

Aus dieser wird in der Praxis  $\tau_D(D, \omega_0^2)$  ermittelt.

Obwohl SPT, FCS und FRAP prinzipiell gleichwertige Informationen zur Charakterisierung von Bewegungen liefern, gibt es einige praktische Vorteile des Single Particle Trackings [110]. Die Ortsauflösung ist v.a. im Vergleich zu FRAP bis zu zwei Größenordnungen besser. Damit wird es möglich, kleine Domänen zu charakterisieren [114]. SPT liefert individuelle Informationen über die Wanderungsbewegung von Molekülen, wohingegen FCS und FRAP über viele hundert oder tausend Moleküle mitteln. Damit können nur mit SPT Subpopulationen von wandernden Molekülen identifiziert werden. Im Extremfall können sich Änderungen der Bewegungsart an der individuellen Trajektorie verfolgen lassen.

### 4.3 Diffusion in biologischen Systemen

Diffusion in biologischen Systemen wurde erstmals mit Hilfe von FCS in den 70er Jahren an DNA-Intercalations-Systemen von Madge und Elson durchgeführt [116]. Etwas später gelangen mit Hilfe der FRAP-Technik eine Reihe von Experimenten mit Fluoreszenzlabeln auf Zellmembranen [117-121]. Bereits 1982 wurden in der Gruppe von Webb SPT-Experimente mit vielfach fluoreszenzgelabelter Lipoprotein-Rezeptoren [122] auch auf Zellmembranen durchgeführt. De Brabander entwickelte in den 80er Jahren die sog. Nanovid-Mikroskopie, bei der als Label kolloidale Goldpartikel eingesetzt werden [123]. Durch den Einsatz von Verfahren der Differenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie, die auf Sheetz zurückgeht [124, 125], wurde die Verwendung von Gold-Partikeln, die als Streukörper lichtschluckend wirken (dunkle Spots im Weißlichtmikroskop), zu einem wichtigen Standardverfahren für die Charakterisierung aller möglicher Wanderungen auf Zellmembranen [126 - 130]. Neben Gold-Partikeln und fluoreszenten farbstoffgetränkte Latexkügelchen von variablem Radius, sog. Beads, wurden seit Ende der 80er Jahre Fluoreszenzlabel, bestehend aus vielen Farbstoffen, für SPT Experimente auf Zellmembranen eingesetzt [113, 131-134]. Diese wurden mit Hilfe von Antikörpern, Lipoprotein-Molekülen, Lipidmolekülen, Phycobiliproteinen [135] oder ähnlichen makromolekularen Strukturen [136] an die eigentlich zu beobachtenden Teilchen angebunden. Solche Label waren in der Regel 30 -100 nm groß [137] und beeinflussen auf Grund ihrer Größe oder auch ihrer Bindungsfähigkeit die Diffusionseigenschaften des Originalmoleküls unter Umständen drastisch [127, 138]. Einzelmolekül-sensitive Experimente zur Diffusion wurden erstmals Anfang der 90er Jahre durch die Weiterentwicklung der FCS in der Gruppe von Rigler möglich [139, 33]. SPT-Versuche mit einzelnen Farbstoffmolekülen wurden erst später Mitte der 90er Jahre von Schmidt und Schindler durchgeführt [29, 76, 105]. Kürzlich gelangen dort auch erste Einzelmolekülexperimente auf den Membranen lebender Zellen [141].

Die Bedeutung von FCS liegt in der hohen Zeitauflösung ( $\mu\text{s}$  bis  $\text{s}$ ), in der die Diffusion von kleinen Biomolekülen, wie etwa Nucleinsäuren [140], verfolgt werden kann. Außerdem hat FCS ein hohes Maß an analytischem und diagnostischem Potential erreicht [141-144]. Die einfache und schnelle Versuchsdurchführung inklusive Auswertung hat bereits biotechnische Anwendung, wie beim *fast enzyme screening* [145, 146], erlangt. Reine FCS-Experimente in Zellen sind bis heute jedoch nur wenige durchgeführt worden [147-151].

FRAP wurde eigens für Untersuchungen auf künstlichen oder lebenden Zellmembranen entwickelt [115]. Experimente in Zellen (Zellplasma wie Zellkern) wurden seit Mitte der 80er Jahre gemacht [152-154]. Inzwischen ist bereits von Versuchen, die Diffusionskoeffizienten in Zellorganellen bestimmen, berichtet worden [155, 156]. In vielen Experimenten wird die größenabhängige Diffusion von Makromolekülen, wie DNA oder Dextranmolekülen, innerhalb von Zellen nachgewiesen [152-154, 157,158]. In einigen Fällen ist allerdings im Cytoplasma und im Zellkern keine größenselektive Diffusion gefunden worden [159]. Die Viskosität in Cytoplasma und Zellkern ist in der Regel nur wenig, maximal um 50% größer als die in wässriger Lösung. Dies konnte unter anderem mit Hilfe von Rotations-diffusionsmessungen mit kleinen Molekülen gezeigt werden [160,161]. Dennoch zeigen viele biologischen Makromoleküle um Faktor 4 bis 5 langsamere Diffusion im Zellplasma als in Wasser [134]. Eine mögliche Erklärung ist die weiter unten näher erläuterte Annahme der *anormalen Diffusion* von Makromolekülen. Sie kann im Zellplasma auf die siebartige Wirkung von Skeleroproteinen und anderen zellulären Komponenten zurückgeführt werden [162, 163]. Da FRAP-Experimente mit unphysiologisch vielen Makromolekülen arbeiten, kann es zu systematischen Verfälschungen bei der Messung von Diffusionskoeffizienten kommen. So wurde für Diffusions-Messungen von DNA-Strängen im Zellkern absolute Immobilität gefunden, bei Dextranmolekülen vergleichbarer Größe in gleichen Zellen dagegen nicht [159]. Man nimmt an, daß die DNA-Stränge in großer Menge verklumpen, was natürlich bei geringen Konzentrationen nicht vorkommt. Mittlerweile ist man dazu übergegangen, solche Verhaltensweisen durch Simulationen erkennen zu können [164, 165].

SPT-Experimente sind mittlerweile an einer Reihe von Rezeptoren auf Membranen durchgeführt worden [166]. In allen Fällen wurden Abweichungen vom freien Diffusionsverhalten gefunden [167, 168]. Verschiedene Bewegungsarten (Näheres siehe unten) sind auf ein und denselben Zellen gefunden worden [128, 135, 169]. Das Auftreten dieser Bewegungstypen hat theoretische Überlegungen nötig gemacht, die die Abweichungen vom normalen Diffusionsverhalten (Brownsche Molekularbewegung) erklären können. Diese werden im folgenden Absatz kurz eingeführt.

Trajektorien individueller Proteine, Lipide oder anderer Bio-Makromoleküle auf Zellmembranen, in Zellorganellen, im Zellplasma oder im Zellkern lassen sich nach verschiedenen Bewegungsarten unterscheiden. Neben der reinen Brownschen Molekularbewegung (*freie Diffusion*) zeigen viele Partikel komplizierterer zu beschreibende Bewegungstypen, wie gerichtete Bewegung (*directed motion*), *anomale Diffusion* und Bewegung in begrenztem Raum (*confined motion*) [110].

Anhand des zeitlichen Abhängigkeit des MSD ( $\langle r^2 \rangle$ ) lassen sich die einzelnen Bewegungstypen mathematisch fassen.

Gleichung (4-52) zeigt freie Diffusion, Gleichung (4-53) anomale Diffusion, (4-54) directed motion und (4-55) confined motion.

Rep-Proteine kodieren. Sie starten entweder am p5-Promotor oder am p19-Promotor. Die Länge der Sequenz der abgebildeten Rep-Proteine beträgt 300 bis 600 Aminosäuren [182]. Am 3'-Ende der DNA liegt der offene Leserahmen „cap., der für drei Kapsidproteine (VP1, VP2, VP3 - VP steht für „viral particle,“) kodiert. Die entsprechenden mRNAs starten am p40-Promotor. Die Sequenz der Kapsid-Proteine umfaßt etwa 600 bis 800 Aminosäureeinheiten. Cap- und Rep-Proteine weisen eine Halbwertszeit von etwa 15 h, die entsprechenden mRNAs von etwa 4-6 h auf [184, 185]

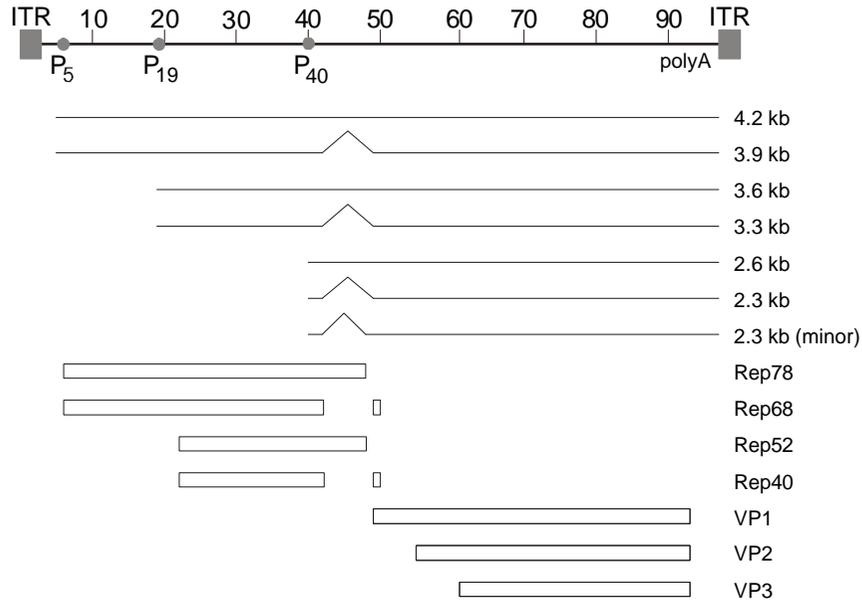


Abbildung 5.2 Genomorganisation von AAV2 [177]

Die Länge des DNA-Stranges von 4,7 kb ist schematisch in 100 Einheiten aufgeteilt. An Anfang und Ende befinden sich die invertierten terminalen Repetitionen (ITR). An den Positionen 5, 19 und 40 liegen die Promotoren, von denen aus die einzelnen mRNAs transkribiert werden. Darunter gezeichnet sind die unterschiedlich langen mRNA-Stränge (4,2 kb bis 2,3 kb), die in der Reihenfolge von oben nach unten für die entsprechenden Proteine Rep78 bis Rep40 bzw. VP1 bis VP3 (ebenfalls von oben nach unten dargestellt) kodieren.

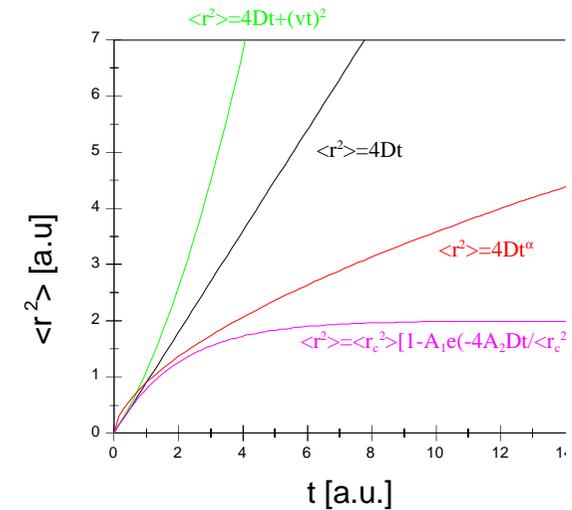


Abbildung 4.6  $\langle r^2 \rangle$  als Funktion der Zeit  $t$  für vier verschiedene Bewegungstypen nach [110]

Die schwarze Gerade zeigt freie Diffusion, die rote Kurve anomale Diffusion. Grün gezeichnet ist der Graph für directed motion und Magenta die Kurve für confined motion.

## 5. Adeno-Assoziierte-Viren (AAV)

*Adeno-assozierte Viren* (AAV) sind Mitglied der Familie der Parvoviridae, die aus linearer, einzelsträngiger DNA (einer Länge von etwa 5000 Basen) und einem ikosaedrischen, unbehüllten Kapsid (eines Durchmessers von 18-30 nm [186]) bestehen. Es sind keine kleineren DNA -Viren bekannt. Die Unterfamilie der Parvoviridae kann klassifikatorisch unterteilt werden in AAV(Gattungsname *Dependoviren*), *autonome Parvoviren* und die sog. *Densoviren*. Die ersten beiden Gattungen infizieren Wirbeltiere, die letztere Insekten. Die Fähigkeit von AAV, sich in vitro ortsspezifisch und stabil in das zelluläre Genom zu integrieren, und die Tatsache, daß die Infektion keine schwerwiegenden Erkrankungen hervorruft, lassen diese Viren als geeignete Vektoren für gentherapeutische Ansätze erscheinen. Zunächst soll auf die allgemeine Bedeutung dieser Virusgattung auch anhand der Historie eingegangen werden [177].

### 5.1 Bedeutung und Replikation

Adeno-assozierte Viren treten als Begleiter von Adenoviren auf. AAV2 wurde erstmals als Kontamination von Adenoviren entdeckt (daher auch die Namensgebung). Erst später wurde AAV als eigene Virusgattung identifiziert. Die Nummern in der Namensgebung bezeichnen unterschiedliche Serotypen, von denen nur wenige gut charakterisiert sind, eben AAV2, AAV3, AAV4, und AAV6. Diese vier Typen infizieren Menschen durch Tröpfcheninfektion. Nach der Primärinfektion im Kindesalter liegen die Viren im latenten Stadium vor. Man geht davon aus, daß 90% der Erwachsenen mit AAV infiziert sind. Trotz der hohen Durchseuchungsrate kennt man keine Erkrankungsbilder, die auf AAV-Infektion zurückgehen. IgG-Antikörper existieren gegen die Strukturproteine (ELISA-Test). IgM wird bei Schwangeren nachgewiesen. Frische Infektionen sind praktisch nicht nachweisbar, da keine Symptome auftreten. Es gibt weder Impfstoffe noch Therapeutika. Beides scheint allerdings auch unnötig. [178]

Die Vermehrung von AAV ist in der Regel nur durch Helferviren, wie Adenoviren (Ad), Herpes Simplex oder andere möglich. Zwar geht man davon aus, daß die AAV-DNA ohne Helfer stabil ins menschliche Chromosom 19p integriert wird, was postuliert für AAV2 [179], aber umstritten für rekombinantes AAV ist, jedoch scheint für die produktive Vermehrung die Induktion von Hilfsfunktionen innerhalb der Wirtszelle notwendig zu sein. Diese Induktion wird in der Regel durch Helferviren hervorgerufen, ist aber unter besonderen Bedingungen

auch durch Karzinogene möglich. Abbildung 5.1 zeigt den Lebenszyklus von AAV mit Ad als Helfervirus.

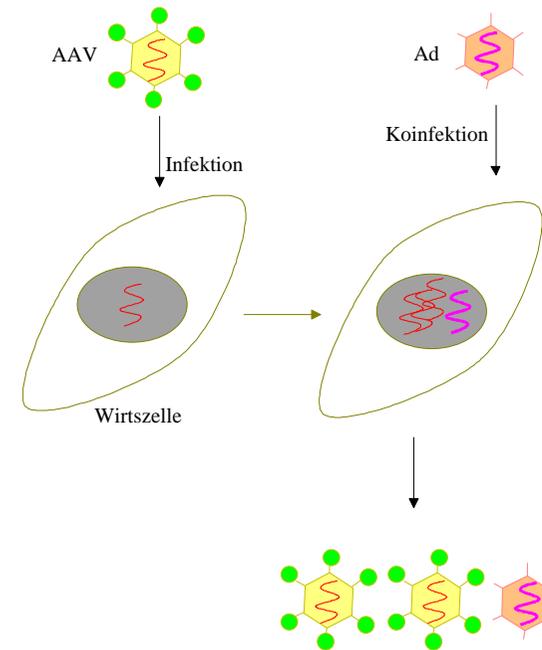


Abbildung 5.1: Lebenszyklus von AAV nach [177]

Nach der AAV-Infektion wird die Virus-DNA stabil in das Genom im Zellkern der Wirtszelle eingebaut. Durch Ko-Infektion (z.B. mit Ad) wird die produktive Virusvermehrung von AAV (und Ad) in Gang gesetzt.

### 5.2 Genomorganisation von AAV

Die DNA von AAV ist einsträngig und umfaßt 4 700 Basen. Das Genom von AAV2 besteht aus drei funktionellen Untereinheiten, den terminalen invertierten Wiederholungen *ITR*, dem sog. „*rep*„- und dem sog. „*cap*„- Gen.

Die 145 bp langen *ITR*s sind Replikations-Starter. Außerdem spielen sie sowohl bei der Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle als auch bei der Freisetzung des AAV2-Genoms eine Rolle [180, 181].

Am 5'-Ende der DNA befindet sich der offene Leserahmen „*rep*„, der die sog. *Rep-Proteine* kodiert. Diese sind Nicht-Struktur-Proteine, die vielfältige, regulatorische Funktionen haben. Abbildung 5.2 zeigt schematisch die einge tausend Basen langen mRNAs, die für die einzelnen

- 2) Wegen seiner variablen Einsetzbarkeit kann AAV für viele potentiell zu infizierende Wirtszellen in Frage kommen.
  - 3) Die Genexpression in Versuchstieren hat sich als sehr langfristig stabil erwiesen, im Einzelfall über 1 Jahr nach einer einzigen Infektion.
  - 4) Die Struktur von AAV ist stabil und einfach gebaut, was Reinigung und Konzentrierung relativ einfach macht.
  - 5) AAV kann in nicht-teilende bzw. post-mitotische Zellen eingebaut werden. Hierzu muß das einzelstrangige AAV-DNA-Templat in einen Doppelstrang umgebaut werden, was zumindest in vitro schon gezeigt werden konnte [192]
  - 6) rAAV wird vom Körper erkannt, ohne daß Antikörper gebildet werden. Man spricht von einer niedrigen Immunreaktion des Körpers.
- Den Vorteilen dieser Vektorsysteme stehen eigentlich nur zwei wesentliche Nachteile gegenüber:
- 1) Mehr als 4100 bis 4900 Nucleotide sind nicht transportierbar. Die Größe des wild-Typ-AAV bleibt also für die *Genfähre* maßgebend. Die Gen-Kapazität ist gering.
  - 2) Das "Beladen des Shuttles" ist aufwendig und teuer. Hier sind aber Verbesserungen zu erwarten.

Ein ganz entscheidender Punkt für den möglichen Einsatz von rAAV in der Genterapie ist das steuerbare Targeting von Zielzellen, also die spezifische Infektion ausgewählter Zellen mit anschließender Expression der gewünschten Gene in den transduzierten Zellen und mit dem letztendlichen Ziel der qualitativen und quantitativen Streuung.

Die allgemein mögliche Strategie des gezielten Rezeptor-Targetings nutzt aus, daß ein Virus sich nur an Zellen bindet, die spezifische Rezeptoren exprimieren. Diese Rezeptorexpression kann, wenn nötig, durch gezielt applizierte Aktivatoren und Inhibitoren gesteuert werden. Auch die Verknüpfung des Kapsids mit rezeptor-erkennenden Molekülen ist möglich. Dies kann zum einen über vermittelnde Antikörper und zum anderen durch mit dem Kapsid fusionierte Liganden erfolgen. Ebenfalls denkbar ist die gentechnische Veränderung der Kapsidoberfläche eines Vektors. Damit werden rezeptor-erkennende Regionen gezielt wandelbar. Das Wirkungsspektrum eines Virus kann mit der letztgenannten Methode komplett verändert werden.

AAV2 besitzt von Haus aus ein breites Wirkungsspektrum. Während epitheliale Gewebe effizient infiziert werden, trifft dies auf hämatopoetische Zellen nur in geringem Maße zu. Möglicher Primärrezeptor für die AAV2-Bindung ist Heparansulfatproteoglycan (HSPG). Es kommt auf vielen Zellen (Zellarten) vor und könnte im wesentlichen das breite Wirkungsspektrum von AAV2 erklären [193]. Als Sekundärrezeptoren kennt man bislang den Integrinrezeptor  $\alpha_v\beta_5$ , den Human Fibroblast Growth Factor (HFGFR) und das Glycoprotein Nucleolin. Neben diesem ersten Bindungsschritt sind noch weitere zelluläre Prozesse notwendig, um eine AAV-Aufnahme in die Wirtszelle zu ermöglichen. Genauer wird darauf noch im folgenden Abschnitt eingegangen.

Auch wenn die Forschung in der Frage des gezielten Targetings von AAV erst am Anfang steht, bietet das breite Wirkungsspektrum Vorteile für auf AAV basierende Vektorsysteme, die ihren Einsatz auch in vivo vielversprechend erscheinen lassen. Klinisch erprobt wurden bislang folgende Einsatzgebiete [191]:

- 1) Hämatologische Erkrankungen (z.B. Sichelzellenanämie)  
AAV soll als Shuttle in entsprechende Precursor Zellen eindringen.  
Genutzte Vorteile sind die langfristige Expression sowie die gezielte Integration von AAV [194].
- 2) Neurologische Erkrankungen (z.B. Parkinson [211])

### 5.3 Struktur des Kapsids

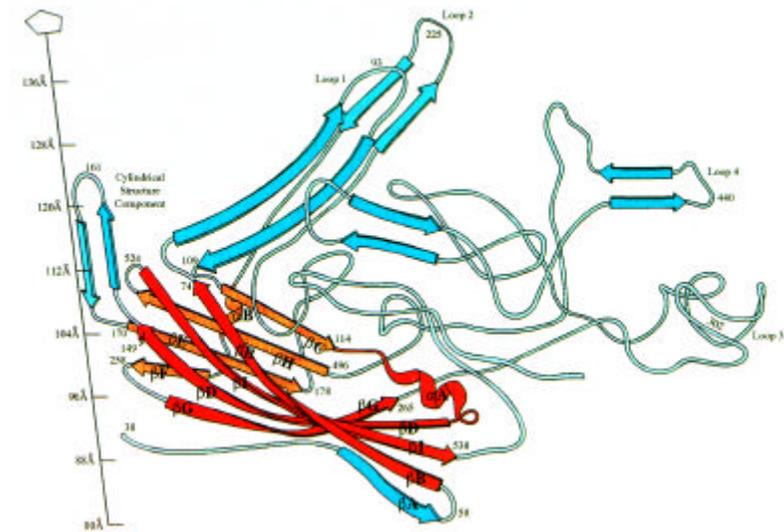
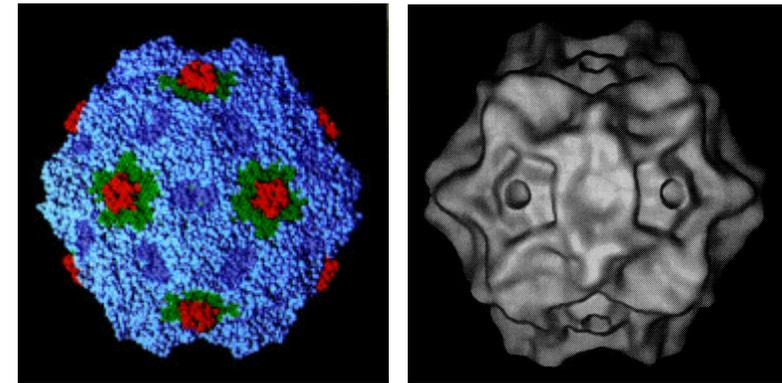


Abbildung 5.3: Struktur des CPV-Kapsids

A: Kalottenmodell von CPV [187] Die **b**-Faltblätter der fünfzähligen Zylinder sind rot hervorgehoben.

B: Strukturmodell der CPV-Oberfläche, basierend auf cryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen [187] (Auflösung 2,1 nm)

C: Röntgenstrukturmodell des VP2-Proteins von CPV, angeordnet an einer Ecke der fünfzähligen Symmetrieachse einer Zylinderstruktur [188].

Alle Parvoviren sind vom Phänotyp her ähnlich aufgebaut. Ihr ikosaedrisches Kapsid besteht aus den drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3. Am besten charakterisiert ist die Proteinhülle eines autonomen Parvovirus mit Namen CPV. Ihre Struktur kann in wesentlichen Grundzügen auch für die AAV-Proteinhülle angenommen werden. Das ikosaedrische Kapsid von CPV besitzt einen Durchmesser von 25 nm. Es kann in 60 Symmetrieeinheiten unterteilt werden. Von der einfachen Punktgruppenvorstellung ausgehend, besitzt das Kapsid  $I_h$ -Symmetrie. Es gibt drei Polyeder, die die zugehörigen Gruppeneigenschaften erfüllen (24  $C_5$ -Achsen, 30  $C_3$ -Achsen, 15  $C_2$ -Achsen, Inversions-zentrum, 15 Symmetrieebenen und dreierlei Sorten von Drehspiegelachsen, die aus den anderen Symmetrieelementen durch Kombination entstehen können): den Ikosaeder, den Dodekaeder und das Fußballen (entspricht genau einem Fußball, der aus Fünf- und Sechsecken besteht) [189]. Das Virus-Kapsid besitzt ziemlich genau Fußballen-Struktur (60 Ecken, 32 Flächen, 90 Kanten). Jede Symmetrieeinheit kann einer Ecke eines Pentagons auf der Oberfläche zugeordnet werden. Jedes Pentagon kann, ins Kapsid-Innere fortgesetzt, quasi als Zylinder betrachtet werden. Das Kalottenmodell in Abbildung 5.3A zeigt (rot) die „pentagonalen Zylinder,, die durch jeweils fünf VP-Proteine (genauer: deren  $\beta$ -Faltblätter) geformt werden. Die Röntgenstruktur des VP2-Proteins von CPV (Abbildung 4-3C) zeigt einen der 60 Symmetrieeinheiten als Ausschnitt. Die ersten 37 N-terminalen Aminosäuren sind nicht auflösbar (zu geringe Elektronendichte im Kristall). Verfolgt man die Struktur ab Aminosäure 38, ist das erste Strukturmotiv das achtfach antiparallele  $\beta$ -Faltblatt (rot). Entlang der  $C_5$ -Achse liegt ein weiteres  $\beta$ -Faltblatt, das für die zylindrische Struktur bzw. die zylindrische Hohlraumbildung maßgebend sind (vgl. oben). Die in Richtung Kapsid-Oberfläche ragenden vier Loops sind mit anderen Strukturelementen des Proteins für die Ausbildung von Spikes, Taschen oder eines Canyons verantwortlich. Ein Strukturmodell der Oberfläche anhand von cryoelektronischen Aufnahmen zeigt Abbildung 5.3 B. Man erkennt wieder die fünffach symmetrischen Zylinder und um diese herum die Spikes und den Canyon der VP-Proteine.

#### 5.4 AAV als Vektor in der Gentherapie

Will man an Stelle des AAV-Genoms ein anderes Genom, ein sog. *Transgen*, in das Virus-Kapsid „verpacken,, muß man sich der im folgenden Absatz (Abbildung 5.4) beschriebenen Technik [190] bedienen, bei der zwischen die beiden ITR-Enden des AAV-Genoms ein Transgen plaziert wird. Dieses Transgen kann nicht länger sein als das ursprüngliche Genom, also etwa 4,7 kBasen. Die entstehenden Viren heißen rekombinante Vektoren rAAV des wild-Typs wt-AAV.

Zur produktiven Vermehrung von rAAV benötigt man zwei Plasmide. Das sog. Helferplasmid trägt dabei nur das rep und cap-Gen, während das sog. Vektorplasmid das Transgen, an beiden Enden ITR-flankiert, trägt. Beide Plasmide werden in HeLa-Zellen, einer speziellen Sorte von Tumorzellen (Laborstandard), transfiziert. Nach der Koinfektion mit Adenoviren setzt die produktive Virenvermehrung ein. Dabei wird die Basensequenz des Helferplasmids in mRNA der HeLa-Zelle transkribiert. In einem weiteren Schritt erfolgt dann deren Translation der Rep- und Vp-Proteine. Das Transgen des Vektorplasmids wird dann, weil es allein ITR-flankiert ist, als linearer DNA-Strang in das Virus-Kapsid verpackt. Anschließend wird das rAAV freigesetzt.

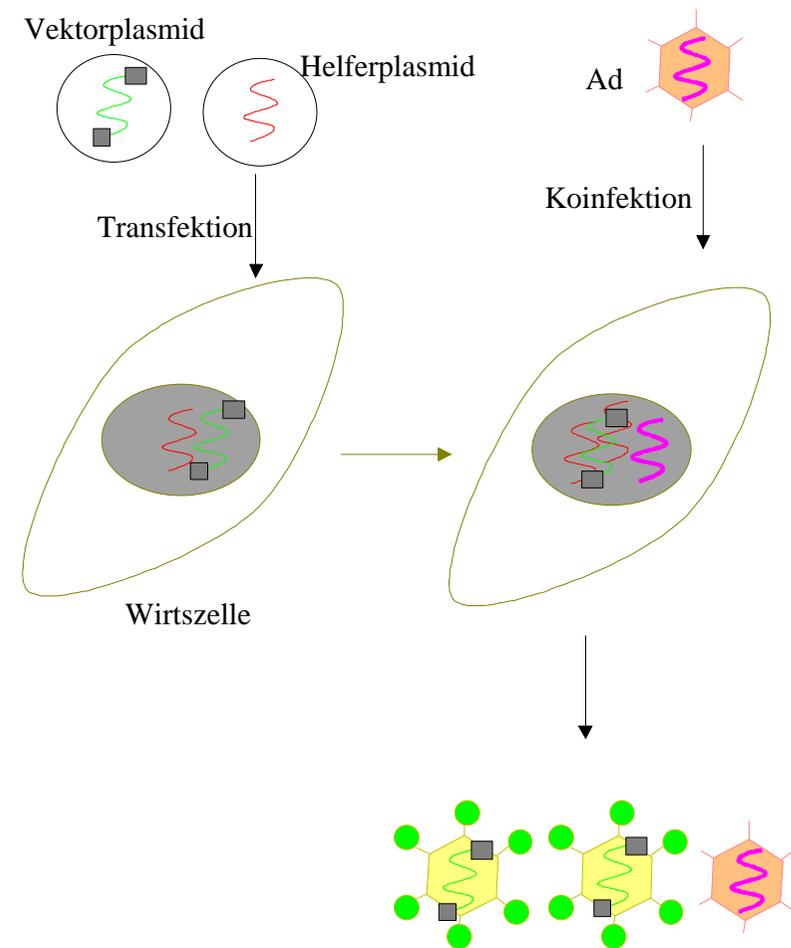


Abbildung 5.4: Strategie zur Erzeugung von rAAV

rAAV wird durch Transfektion einer Wirtszelle mit Vektor- und Helferplasmid und nach Koinfektion mit Ad freigesetzt.

Bestückt man mit der oben beschriebenen Strategie AAV2 mit therapeutischen Genen, erhält man Vektorsysteme, die für Gentherapie vielversprechend sein können [191]:

1) Sie zeichnen sich durch Ungefährlichkeit aus, da AAV für den Menschen nicht pathogen ist. Ein Restrisiko der insertionalen Aktivierung von Genen von untergeordneten Genomsequenzen oder intrinsischen Promotoren durch ITR bleibt, selbst wenn die transkriptionale Aktivierung zellulärer Onkogene unwahrscheinlich erscheint.

## 6. Experimenteller Aufbau

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen mikroskopischen Methoden gearbeitet: Mit der konfokalen Mikroskopie (6.1 und 6.2) und dem Imaging mit Weitfeldanregung (6.3). Das Schema des prinzipiellen Aufbaus sowie die Funktionsweisen der hierzu verwendeten Geräte werden in diesem Kapitel beschrieben.

### 6.1 Konfokale Mikroskopie

Die verwendeten Mikroskope detektieren Fluoreszenzlicht einzelner Farbstoffmoleküle und erlauben die Aufnahme optischer Bilder, Messungen des totalen Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Anregungszeit (sog. Zeitspuren), polarisationsabhängige und spektroskopische Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde nur bei Raumtemperatur gearbeitet. Daher wird nicht weiter auf die temperaturabhängige Funktionsweise des tiefemperatur-tauglichen konfokalen Mikroskops mit Kryostat (10CNDT Supervaritemp Optical Kryostat von Janis Research Co.) eingegangen, der prinzipiell bei Temperaturen bis zu  $T = 1.4 \text{ K}$  betrieben werden kann und in dessen Probenkammer sich der mechanische Teil des ursprünglich verwendeten Mikroskops [218] befindet. Es wurde im Verlauf der Doktorarbeit von einem kommerziellen Mikroskop abgelöst (Nikon TE 200 Eclipse), das modifiziert und dann konfokal betrieben wurde. Nach diesem jüngeren Aufbau ist Abbildung 6.1 gestaltet.

#### 6.1.1 Optischer Anregungs-Strahlengang

Insgesamt stehen drei verschiedene monochromatische, linear polarisierte CW-Laser (**Laser**) als Lichtquelle zur Verfügung. Zur Vermessung von Terryendiimid (TDI) oder Cyanin 5 (Cy5) werden Helium-Neon-Laser (Coherent 31-2140-000 bzw. NEC-GIG5700) der Wellenlänge  $\lambda_0 = 632.8 \text{ nm}$  und Ausgangsleistung  $P_0 = 35 \text{ mW}$  bzw.  $P_0 = 16 \text{ mW}$  und ein tunable Helium-Neon-Laser (PMS-Electro-Optics-LSTD-1010) mit der Wellenlänge  $\lambda_0 = 594.1 \text{ nm}$  ( $P_0 = 600 \mu\text{W}$ ) verwendet, der auch bei  $\lambda_0 = 632.8 \text{ nm}$  und  $\lambda_0 = 543.5 \text{ nm}$  betrieben werden kann. Die Wellenlänge  $\lambda_0 = 442.0 \text{ nm}$  eines Helium-Cadmium-Lasers (OMI-4074-30P,  $P_0 = 25 \text{ mW}$ ) kann zur Anregung von Perylen verwendet werden.

Jeweilige Laser-Plasmalinien werden durch den Einsatz von auf die Anregungswellenlänge abgestimmten Bandpaßfiltern (**BP**) ausgeblendet. Zwei Lochblenden (**P<sub>1</sub>**, **P<sub>2</sub>**; Durchmesser  $d = 1.5 \text{ mm}$ ), die in möglichst großem Abstand in den Anregungsstrahlengang eingebaut sind, ge-

AAV durchdringt zu 100% menschliche Neuronen ohne neurotoxische Effekte zu generieren. Hier gibt es entsprechende Versuche *in vitro* und *in vivo* (Maus oder Ratte) mit GFP-fusionierten Vektoren [195].

3) Augenerkrankungen [212] (z.B. Retinal-Degeneration)

AAV durchdringt Photorezeptoren .

4) Gehörschäden [213] (Einsatz von rAAV noch wenig untersucht)

5) Schäden der Herzkranzgefäße [214] (Einsatz von rAAV noch wenig untersucht)

6) Hauterkrankungen [215] (Einsatz von rAAV noch wenig untersucht)

7) Metabolische Krankheiten (z.B. cystische Fibrose [216])

8) Krebs

Krebserkrankungen sind das momentan am stärksten untersuchte Gebiet. Erfolge *in vitro* (HeLa Wachstum), *ex vitro* (Gebärmutterhalskrebs) und im Tierversuch geben Anlaß zu breiterer Anwendung in der Zukunft [196].

### 5.5 Der Eindring-Mechanismus von AAV in HeLa-Zellen

Um den Infektionsweg des Virus in lebenden Zellen zu verfolgen, gibt es zwei prinzipielle Möglichkeiten. Zum einen kann das Virus direkt fluoreszenzmikroskopisch (beobachtet wird mit Farbstoff gelabeltes AAV) beobachtet werden. Bei bislang in der Biochemie praktizierten mikroskopischen Verfahren wird eine Zelle mit einer Vielzahl von Viren infiziert [197] (mehrere Tausend Viren je Zelle) oder ein Virus mit einigen hundert Farbstoffmolekülen gelabelt [198]. Zum anderen kann der Abschluß des Infektionswegs indirekt über den Nachweis des Gentransfers, also der exprimierten Substanzen gezeigt werden. Um die einzelnen mechanistischen Schritte des AAV-Eintritts in die Zelle verstehen und erklären zu können, sind eine Reihe weiterer biochemischer Verfahren angewandt worden.

Folgendes kann über den Eindring-Mechanismus von AAV in HeLa-Zellen als gesichert gelten: AAV wird nach wenigen Minuten - angegeben wird eine Halbwertszeit von 10 Minuten [197] - in die Zelle durch Endozytose, einer nach innen gerichtete Abschnürung der Zellmembran, aufgenommen. Dies geschieht Rezeptor- vermittelt. HSPG fungiert als Primärrezeptor, an den AAV beim Andocken an die Zelle gebunden wird. Es konnte gezeigt werden, daß mutierte Zellen, die kein HSPG aufweisen, von AAV nicht infiziert werden können [193]. Auch der Human Fibroblast Growth Factor HFGFR, das Glycoprotein Nucleolin und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin spielen eine Rolle als Co-Rezeptoren bei der AAV-Aufnahme [198, 200]. Was nach dem Andocken auf der Zelloberfläche exakt passiert, ist allerdings noch immer umstritten [201] oder wenig bekannt.

Die *Endozytose* und das schließliche Aufgehen des Endosoms ist ein gemeinhin postulierter Mechanismus für sog. *enveloped viruses*. Es gibt auch sog. *nonenveloped viruses*, wie das Rotavirus, das nach Interaktion mit der Zellmembran direkt in die Zelle eindringt [202]. Andere "nonenveloped viruses", zu denen auch Adenoviren, Reoviren, Polioviren und Rhinoviren gehören, scheinen ähnlich wie enveloped viruses aufgenommen zu werden [198, 203 - 207]. Bei direkt mit AAV verwandten Viren, dem Parvovirus CPV [208] und dem minute virus of mice (MMV) [209], wurde die Endozytose erstmals untersucht. Letzterer bindet an bevorzugte Membranregionen, die sog. *clathrin-coated pits*, wie an unspezifische Membranregionen. Allerdings scheinen nur mit Clathrin bedeckte Regionen die Aufnahme in die Zelle zu ermöglichen. Bei der Endozytose von CPV wurde gezeigt, daß ursprüngliche kleine Abschnürungen sich zu größeren vereinigen. Das Öffnen des Endosoms kann durch frühe Zugabe von Ammoniumchlorid [210] oder Bafilomycin A1 verhindert werden, was

darauf hindeutet, daß die Endosomöffnung im Säuren stattfindet und nicht länger als etwa 30 Minuten dauert.

Bei AAV ist die cytosolische GTPase Dynamin (M = 100 kg/mol) für die Endozytose mitverantwortlich. Sie kommt an der Membran zusammen mit Clathrin bedeckten Membraneinbuchtungen vor. Eine Mutante von Dynamin (K44A) hemmt dagegen die Endozytose. Beides wurde mit AAV-lacZ gezeigt, dessen Expressionsprodukte nach 48h nachgewiesen wurden. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung des Expressionsprodukts, wenn K44A statt wt-Dynamin in den Zellen vorlag. Die Anbindung an die Membran war dagegen nicht gestört. AAV kann unabhängig vom Helfer-Virus Ad Gen-Expression in der Wirtszelle bewirken. Dies deutet auf unabhängigen Eindring-Mechanismus in der Zelle hin. Durch fluoreszenz-mikroskopische Kolokalisationsversuche konnte tatsächlich gezeigt werden, daß Ad und AAV unabhängig voneinander wandern, wohingegen AAV2 und AAV3 scheinbar gleiche Endosome bevölkern oder zumindest gleiche endosomale Pfade beschreiten [197]. Die hohe Effizienz der endosomalen Öffnung deutet darauf hin, daß die AAV- Proteine selbst dafür verantwortlich sind.

AAV2 wandert in zwei Stunden vollständig zum Kern. Fluoreszenz als Folge einer Virenanreicherung kann dort auch nach vier Stunden nachgewiesen werden. Genexpression nach 3 Stunden. Die Mehrheit der Viren im fluoreszenzmikroskopischen Experiment bleibt außen am Kern hängen, wenn die Genexpression im Kern bereits nachgewiesen werden kann. Erste Viren erreichen den Kern schon nach 30 Minuten [197]. Entweder kann der Eintritt in den Kern als eine Art Flaschenhals verstanden werden oder es gibt verschiedene Eindring-Mechanismen. Die Porengröße des Kern-Poren-Komplexes ist 23 nm, also in etwa gleich der Proteinhüllengröße (20-25 nm) des Virus. Ein Beweis für unveränderte Proteinhülle ist bislang nicht möglich.

Abbildung 5.5 zeigt zusammengefaßt das auf Grund bislang ermittelter Daten aufgestellte Modell der AAV-Aufnahme in die Zelle.

- 1) AAV bindet an HSPG auf der Zelloberfläche.
- 2) Nach der Anbindung wird AAV unmittelbar über Clathrin vermittelte Endocytose (Dynamin nötig) in die Zelle eingeschleust. Dieser Prozeß wird durch  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin unterstützt.
- 3) Das Endosom geht sauer induziert auf. AAV wird auf welchem Weg auch immer zum Kern transportiert.
- 4) AAV akkumuliert sich an der Kernmembran
- 5) AAV dringt in den Kern-Poren-Komplex ein.

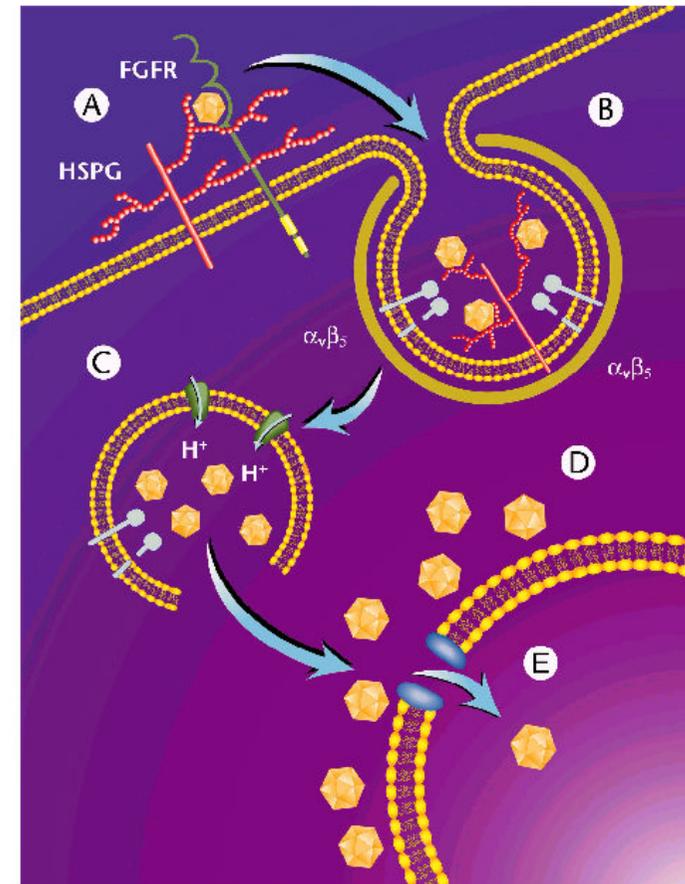


Abbildung 5.5: Stationen des Eindring-Mechanismuses von AAV in HeLa-Zellen [197]

- A) AAV bindet an HSPG auf der Zelloberfläche.
- B) Nach der Anbindung wird AAV unmittelbar über Clathrin vermittelte Endocytose (Dynamin nötig) in die Zelle eingeschleust. Dieser Prozeß wird durch  $\alpha_5\beta_1$ -Integrin unterstützt.
- C) Das Endosom geht sauer induziert auf. AAV wird auf welchem Weg auch immer zum Kern transportiert.
- D) AAV akkumuliert sich an der Kernmembran.
- E) AAV dringt in den Kern-Poren-Komplex ein.

detektierten Probenpositionen (Pixel) wird dabei die totale Fluoreszenz zugeordnet, indem sie von der **APD** in Photoelektronenpulse umgewandelt und verstärkt wird. Die verstärkten Pulse werden von einem Photonenzähler (**Photoncounter**; Stanford Research) registriert. Das hier erhaltene, der Zählrate proportionale Analogsignal wird in einem **AD-Wandler** in ein entsprechendes digitales Signal umgewandelt. Alle Signale werden vom Computer verarbeitet, der dann aus einzelnen Pixeln das optische Bild generiert. Die Darstellung der totalen Fluoreszenz erfolgt in einer Graustufen- oder auch in einer Farbstufenskala.

Die Aufnahmezeit eines Bildes beträgt etwa 30 Minuten bei einer Detektionszeit von  $\Delta t = 10$  ms je Pixel. Zur Beschleunigung der Bilddetektion empfiehlt es sich, nicht  $\Delta t$  zu verkürzen, sondern die Rasterung von  $256 * 256$  Pixeln auf  $128 * 128$  Pixel je Bildausschnitt zu verringern, wodurch das Signal-zu-Untergrund-Verhältnis erhalten bleibt. Die minimale und die maximale Fluoreszenzzählrate je Pixel in  $\Delta t$  werden zusammen mit der Anregungsleistung bei jeder Aufnahme angegeben.

### 6.2.2 Aufnahme von Fluoreszenzzeitpuren lokaler Stellen

Die totale Fluoreszenzintensität kann nicht nur in Abhängigkeit von der Probenstelle, sondern auch für eine Fokusposition zeitlich aufgelöst betrachtet werden. Hierzu wird der Scanner via Computer-Ansteuerung auf die anhand einer vorher gemachten Bildaufnahme ausgesuchte Stelle gesetzt. Die Zeitachse wird vom Computer in maximal 1024 Punkte (= kleinste Zeitintervalle) aufgeteilt. Jedem dieser Punkte wird das ganz analog zu oben erhaltene Fluoreszenzsignal (in Counts pro gewählter Detektionszeit) zugeordnet, so daß vom Computer ein Intensitäts-Zeit-Diagramm erstellt wird. Viele dieser sog. „Zeitpuren“ wurden über  $t_{\text{ges}} = 100$  Sekunden bei einer Detektionszeit von  $\Delta t = 100$  ms aufgenommen.

### 6.2.3 Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Zur Aufnahme von Spektren wird das eingesammelte Fluoreszenzlicht mit einer Linse (**L<sub>3</sub>**,  $f = 50$  mm) auf den Eintrittsspalt eines Gitterspektrographen (**Spektrograph**, HR 640 von Jobin Yvon, Gitter: 180 grooves/mm; Auflösungsvermögen:  $\Delta\lambda = 0.67$  nm bei  $\lambda_0 = 543.5$  nm) abgebildet. Das Signal wird dispergiert und vollständig auf dem Chip einer CCD-Kamera (**CCD**, Tektronix, Chip: 512\*512 Pixel; back illuminated; Pixelgröße 24  $\mu\text{m}$ ; 16 bit;  $\Phi > 60\%$  zwischen 400 und 800 nm) aufgenommen. Der Vorratstank der CCD-Kamera muß täglich mit flüssigem Stickstoff befüllt werden. Ein Thermostat regelt die Betriebstemperatur der Kamera auf  $T = -110^\circ\text{C}$ .

Ohne Verfahren des Gitters kann ein Spektralbereich von etwa  $\Delta\lambda = 200$  nm untersucht werden. Maximale Ausnutzung des Signals erreicht man durch vertikales Binnen des Chip-Rasters.

Zur Eichung des Spektrographen wurden insgesamt vier verschiedene Laserlinien ( $\lambda_0 = 594.1$ ,  $\lambda_0 = 632.8$ ,  $\lambda_0 = 543.5$  und  $\lambda_0 = 442.0$  nm) bei verschiedenen Gitterstellungen benutzt. Aufnahmezeiten und Anregungsleistungen werden bei den in Abschnitt 4 aufgeführten Spektren angegeben. Prinzipiell können Fluoreszenzspektren mit fest auf der Probe positioniertem Fokus ebenso aufgenommen werden wie durch Scannen der Probe während der Detektion.

währleisten räumliche Reproduzierbarkeit desselben beim Wechsel der Lichtquelle. Mit dem Keilabschwächer (**KA**) kann durch variable Ablenkung eines Teils der Leistung die Anregungsintensität eingestellt werden.

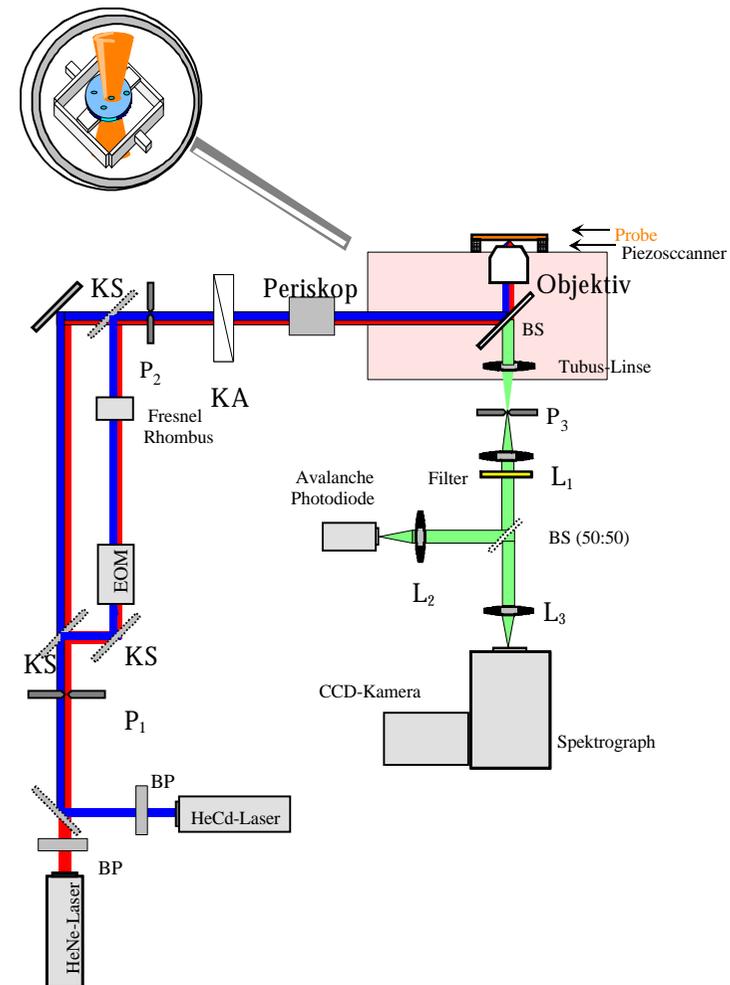


Abbildung 6.1 Schematischer Aufbau des konfokalen Mikroskops

Die nähere Beschreibung der Bestandteile bzw. der Handhabung des Aufbaus kann dem fortlaufenden Text entnommen werden.

Um die Drehung der Polarisationsebene des linear polarisierten Laserlichts zu ermöglichen, wurde für einige Messungen der Strahlengang umgelenkt (über Klappspiegel KS) und eine

polarisationsdrehende Einheit, bestehend aus EOM und Fresnel Rhombus, in den Anregungsstrahlengang eingebaut (vergleiche Kapitel 6.2.4).

Das bisher parallele Licht wird über ein **Periskop** in den Mikroskopkorpus eingekoppelt und über einen dikroitischen Strahlteiler (**BS**) auf das **Objektiv** gelenkt. Dieser Beamsplitter weist hohe Reflektivität der Anregungsleistung bei gleichzeitig hohem Transmissionsgrad des längerwelligen Fluoreszenzlichts auf.

Mit dem Mikroskopobjektiv (**Objektiv**, Newport \*60, numerische Apertur  $n \cdot \sin \alpha = 0,85$ ; oder Zeiss \*100,  $n \cdot \sin \alpha = 1,3$ ; Ölimmersion) wird auf die Probe fokussiert. Dort befinden sich die zu untersuchenden Farbstoffmoleküle in einer entsprechenden Matrix.

Kontrolliert wird die Fokussierung entweder durch eine Videokamera, die ein Bild des von der Probenseite des Glasplättchens rückreflektierten Anregungslichts zeigt oder durch das Okulars des kommerziellen Mikroskops.

Je nach Lichtquelle und Modifikation des Aufbaus ergaben sich verschiedene Werte des Transmissionsgrads T des Anregungsstrahlengangs, gemessen hinter dem Keilabschwächer bis hin zur Probe. Sie wurden für die einzelnen Experimente stets neu tabelliert.

## 6.1.2 Bewegung der Probe

Das bei Beginn der Arbeit bereits vorhandene konfokale Mikroskop entstand durch einige gezielte Umbaumaßnahmen aus einem für nahfeldoptischen Betrieb geeigneten Aufbau. Bei der ursprünglichen Erstellung des Geräts für *SNOM*-Betrieb erschien es zweckmäßig, nicht den Laserstrahl (bzw. die Glasfaser Spitze) über die Probenoberfläche wandern zu lassen, sondern die Probenhalterung samt Glasplättchen als Ganzes lateral in zwei Raumrichtungen beweglich zu halten, während der Strahlengang samt Mikroskopobjektiv fixiert bleibt.

Als zweistufige (mechanische und piezoelektrische) Verstelleinheit fungierte anfangs ein selbstgebauter piezoelektrischer Bimorph-Scanner (**Piezoscanner**). Im kommerziellen aktuellen Setup wird aktuell ein Piezoscanner (PI mit kapazitiven Sensoren) mit einer Positionsgenauigkeit von 5 nm eingesetzt (Schemabild eines Piezoscanners in Abbildung 6.1 eingefügt).

Der Scanner ermöglicht es, bei Raumtemperatur einen Probenausschnitt lateral auf einem Bereich von maximal  $A = 50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$  abzufahren (ursprünglich waren es  $A = 16 \mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$ ). Dazu wird in jede der beiden Raumrichtungen eine Spannung angelegt und von  $U = 0 \text{ V}$  ( $-10 \text{ V}$ ) bis  $U = +10 \text{ V}$  variiert. Die Grobpositionierung der Probe kann mit Hilfe des Mikroskopisches erfolgen, auf den der Scanner aufgeschraubt war.

Bei der Aufnahme optischer Bilder bewegt der Piezoscanner die Probe zeilenweise 256 mal durch den Fokus des Mikroskopobjektivs. Jeder Zeile wird wiederum in 256 Detektionsschritten unterteilt. Der Computer setzt aus den  $256 \times 256$  Rastereinheiten Pixel um Pixel das optische Bild zusammen.

## 6.1.3 Optische Detektion

Fokussiert man den Anregungsstrahl auf die Probenseite des Glasplättchens, besteht der Strahl, der in das Mikroskopobjektiv zurückgeworfen wird, aus elastisch gestreutem Laserlicht („Rückreflex“ der dem Strahlengang abgewandten Glasplättchenseite) und isotrop von der Probe abgestrahltem Fluoreszenzlicht. Die Fluoreszenzeinsamelleffizienz  $W$  gibt den durch die numerische Apertur  $n \cdot \sin \alpha = 0,85$  (für  $n = 1$  gilt  $\alpha = 58^\circ$ ) des **Objektivs** bestimmten

Raumwinkel  $\Delta\Omega = 2r^2\pi(1 - \cos \alpha)$  im Verhältnis zum maximalen Raumwinkel  $\Omega = 4r^2\pi$  an. Für einen Öffnungswinkel  $\alpha = 58^\circ$  berechnet sich  $W$  zu  $W = 0,5(1 - \cos \alpha) = 23,5\%$ .

Das ins Mikroskopobjektiv zurückgeworfene Licht nimmt nun den gleichen Weg zum Strahlteiler (**BS**) zurück, auf dem es im Anregungsstrahlengang gekommen ist. Dieser weist für Fluoreszenzlicht einen hohen Transmissions-, für Laserlicht einen hohen Reflexionsgrad auf. Die **Tube Linse** fokussiert das Licht im Detektionsstrahlengang auf das Detektionspinhole (**Pinhole**). Um restliches Anregungslicht auszublenden, werden ein auf die jeweilige Anregungswellenlänge  $\lambda_0$  angepaßter Notchfilter (Kaiser) und (oder) ein Langpaßfilter (Schott) (**Filter**) in dem zwischen zwei dünnen Linsen  $L_1$  und  $L_2$  (bzw.  $L_3$ ) parallelen Strahl platziert.

Zur Optimierung der Fokussierung dient das Okular des Mikroskops bzw. ursprünglich eine Videokamera (nicht eingezeichnet), auf deren CCD-Chip der Strahl geleitet wird. Das von ihr aufgenommene Bild wurde auf einen herkömmlichen Fernsehbildschirm übertragen.

Zur Aufnahme optischer Bilder wird das totale Fluoreszenzsignal (über  $L_2$ ) auf das aktive Fenster einer Avalanche-Photodiode (**APD**) geworfen, zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren auf einen **Spektrographen** (über  $L_3$ ). Das hier dispergierte Licht wird auf eine stickstoffgekühlte CCD-Kamera (**CCD**; Betriebstemperatur  $T = -110 \text{ }^\circ\text{C}$ ) projiziert. Setzt man an Stelle von **KS** einen Strahlteiler (**BS(50:50)** - hier eingezeichnet) ein, können beide Detektionsoptionen zugleich wahrgenommen werden.

Die Ansteuerung des Piezoscanners sowie die Verarbeitung und Darstellung der optischen Daten erfolgen über ein modulares Analoginterface durch ein von W. Göhde [219] entwickeltes Windows-kompatibles Computerprogramm auf einem Personalcomputer.

## 6.2 Durchführung der Messungen mit dem konfokalen Aufbau

Nach Einbau der Probe (eines Deckgläschens der Stärke 0,13 bis 0,16 mm) und der Justage auf den Rückreflex des Probenplättchens wird das Detektionspinhole lateral wie axial auf maximales Reflexionssignal justiert. Nach Einbau der Detektionsfilter wird diese Justage nochmals auf das Fluoreszenzsignal optimiert. Die Aufnahme von optischen Bildern, Fluoreszenzzeitspuren, Fluoreszenzspektren und die Verwendung der Polarisationsdrehenden Einheit werden in den folgenden Kurzabschnitten behandelt.

### 6.2.1 Aufnahme optischer Bilder

Zur Aufnahme optischer Bilder wird das Fluoreszenzlicht über den Klappspiegel **KS** (**BS(50:50)**) und eine feste Linse ( $L_2$ ,  $f = 25 \text{ mm}$ ) auf die sehr kleine detektionsaktive Fläche (Durchmesser  $d = 200 \mu\text{m}$ ) einer peltiergekühlten Avalanche-Photodiode (**APD**, SPCM-200-PQ von EG&G; Photoneneffizienz  $\Phi = 40\%$  bei  $\lambda = 480 \text{ nm}$ ; Zeitauflösung von  $\Delta t = 3 \text{ ns}$  für einzelne Photonen) fokussiert. Die Einstellung auf maximales Signal erfolgt durch Justage der Linsenposition in allen drei Raumrichtungen.

Die Probe wird vom Bimorph-Scanner zeilenweise durch den Fokus bewegt. Bei Raumtemperatur wird ein Probenausschnitt von  $A = 16(50) \mu\text{m} \times 16(50) \mu\text{m}$  zweimal überstrichen, da jede Zeile von links nach rechts und zurück wandert, ehe sich der Scanner in y-Richtung eine Position weiterbewegt. Jeder einzelnen der  $256 \times 256$  von links nach rechts (in umgekehrter Richtung zur Vermeidung von Hystereseeffekten kein Signal registriert)

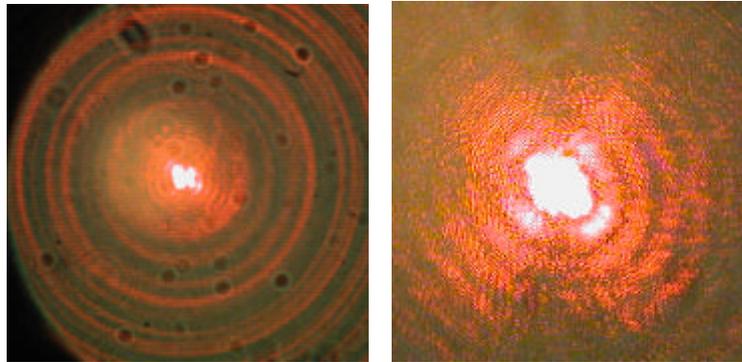


Abbildung 6.4 Justage des Anregungsstrahlenganges ohne Defokussierungslinse

Dargestellt ist zweimal das beugungsbedingte Airymuster des Rückreflexes (rechts ist der innerste Bereich vergrößert dargestellt (Zoom; Photographien mit Nikon Coolpix 990))

Das **variable Pinhole** (P1) wird im Anregungsstrahlengang noch mit Linse so eingestellt, daß der eben beobachtete Belichtungsfleck seine Größe behält, Streulicht und diffuse Randbereiche des Laserstrahles werden ausgeblendet. Das zweite **variable Pinhole** (P2) wird im Detektionsstrahlengang im Fokus des austretenden Strahls positioniert. Die zweite **plankonvexe Linse** (L2,  $f = 160\text{mm}$ ) befindet sich auf einem Verschiebetisch in etwa 160mm Abstand vom Pinhole. Sie wird in z-Richtung verschoben, bis man einen parallelen Strahl erhält. Zur Positionierung der dritten **Linse** (L3,  $f = 200\text{mm}$ ) verfolgt man das reflektierte Licht mit Hilfe der Kamera live am Bildschirm. Die bestmögliche Auflösung ist erreicht, wenn das Gaußprofil in x- und y-Richtung eine Halbwertsbreite von optimal drei Pixeln erreicht hat. Dabei entspricht ein Pixel in etwa  $0,1\mu\text{m}$ . Gegebenenfalls muß auch die zweite **Linse** (L2) nachreguliert bzw. müssen die Positionen der Linsen in x- und y-Richtung überprüft werden.

Analog verfährt man mit der vierten **Linse** (L4,  $f = 150\text{mm}$ ), die den parallelen Strahl auf die erste Linse des Spektrographen fokussiert. Auch für Ihre Positionierung verfolgt man im Imaging-Modus das reflektierte Licht live am zweiten Bildschirm. Die beste Auflösung ist bei einer Halbwertsbreite von etwa vier Pixeln erreicht.

Nun schiebt man die **Defokussierungslinse** (L1,  $f = 300\text{mm}$ ) wieder an ihre Position. Falls der Belichtungsfleck auf dem Bildschirm nicht gleichmäßig ausgeleuchtet ist, wird die **Linse** (L1) erneut arretiert. Eventuell optimiert man die Ausleuchtung noch durch Verschieben der Verschiebetische des Periskopes.

### 6.3.3 Einstellen der Pinholes

Das Anregungspinhole dient zum einen dazu, den äußeren Teil des Strahlprofils abzuschneiden, so daß der transmittierte Strahl über den ganzen Querschnitt eine relativ gleichmäßige laterale Intensität aufweist. Zum anderen wird über die Pinholegröße die Größe des Beleuchtungsfensters skaliert. Das Objekt wird also parallel ausgeleuchtet. Im Extremfall

### 6.2.4 Verwendung der polarisationsdrehenden Einheit

Für orientierungsabhängige Untersuchungen an Einzelmolekülen wurde von S. Mais eine polarisationsdrehende Einheit entwickelt, die es ermöglicht, die Polarisationsdrehung durch eine rampenförmige Spannung kontinuierlich zu drehen. Sie besteht aus einem elektrooptischen Modulator (EOM, Gsänger LM 0202) und einer  $\lambda/4$ -Platte. Zur näheren Funktion und Bedienung sei auf [46] verwiesen.

## 6.3 Imaging mit Weitfeldanregung durch Modifikation des konfokalen Mikroskops

Will man Fluoreszenzbilder als Ganzes und nicht im Rasterverfahren aufnehmen, um Bilderserien in einer Zeitauflösung zu erhalten, die nicht durch die Dauer des Rastervorgangs limitiert ist, muß der konfokale Versuchsaufbau modifiziert werden. Funktionsweise und Bedienung des resultierenden Imaging-Aufbaus sind in diesem Abschnitt beschrieben.

### 6.3.1 Imaging-Aufbau

Der Imaging-Aufbau (Abbildung 6.2 und Abbildung 6.3) setzt sich im Detail wie folgt zusammen: Als Laser verwendet man einen **Helium-Neon-Gaslaser** mit einer Ausgangsleistung von 35mW. Zum Entfernen von Plasmalinien dient ein **Laserlinienfilter** (Laser Component,  $\lambda = 632,8\text{ nm}$ ). Durch ein **Teleskop** wird der Strahl um ein Siebenfaches aufgeweitet. Zur Optimierung der Justage wird ein **Periskop** eingebaut. Dieses setzt sich aus zwei orthogonal zueinander angeordneten Spiegeln zusammen, die auf Linearverschiebetischen befestigt sind. Einer diese Tische ist in x-, der andere in y-Richtung variabel. Mit Hilfe eines **variablen Pinholes** (P1) wird der äußere Teil des optimale Strahlprofils abgeschnitten. Es sitzt in der Brennebene einer **plankonvexen Defokussierungslinse** (L1,  $f = 300\text{ mm}$ ). Von dieser wird der Strahl fokussiert und am **Beamsplitter** reflektiert, er passiert das **Ölimmersionsobjektiv** (Zeiss, N.A.=1,3;  $\times 100$ ,  $f = 1,6\text{ mm}$ ) und trifft von unten auf die Probe mit dem Fluoreszenzfarbstoff. Der Fluoreszenzstrahl passiert den **dikroitischen Strahlteiler** (640DRLP, Omega) und wird von der **Tubuslinse** ( $f = 180\text{ mm}$ ) im Mikroskopkorpus (Nikon TE 200 Eclipse) fokussiert. Im Fokus befindet sich ein zweites **variables Pinhole** (P2) mit dem sich in die Apparatur einreflektiertes Streulicht weiter ausblenden läßt. Eine weitere **plankonvexe Linse** (L2,  $f = 160\text{mm}$ ) steht in 160mm Abstand vom Fokus, man erhält einen parallelen Strahl. Je nach Messung wird ein **Graufilter** (Schott, OD4), ein **Langpassfilter** (Schott, RG 665) oder ein **Notchfilter** (Kaiser, HNPF-632.8-1.0) zusammen mit einem Langpaßfilter (Schott, RG 645) im Strahlengang postiert. Ein **Beam-splitter** (50:50) lenkt je einen Teil des Lichts auf die **Imaging-CCD-Camera** (Pentamax von Princeton Instruments, MCP, Chip:  $512 \times 512$  Pixel, EEV, Pixelgröße  $15\mu\text{m}$ , 12 bit,  $\Phi > 40\%$  zwischen 400 und 800 nm) und einen Teil auf den **Spektrographen** (Jobin Yvon; vergleiche Kapitel 6.2) mit angeschlossener **CCD-Camera** (Chip von Tektronix; vergleiche Kapitel 6.2). Dieser Strahlteiler kann auch entfernt werden, wenn nur Fluoreszenzbilder aufgenommen werden sollen. Vor der **Imaging-CCD-Camera** befindet sich eine weitere **plankonvexe Linse** (L3,  $f = 200\text{mm}$ ), in deren Brennebene sich der Chip der CCD befindet.

Vor dem **Spektrographen** befindet sich noch eine **plankonvexe Linse** (L4,  $f = 150\text{mm}$ ), deren Brennebene am Ort des Eintrittsspalts des **Spektrographen** liegt.

### 6.3.2 Optimierung der Fokussierung

Um möglichst hochaufgelöste (scharfe) optische Abbildungen der Probe zu erhalten, bedarf es mehrerer Justage-Schritte:

Das **Teleskop** wird so positioniert, daß man ein vollständiges Gaußprofil des aufgeweiteten Strahls transmittiert wird.

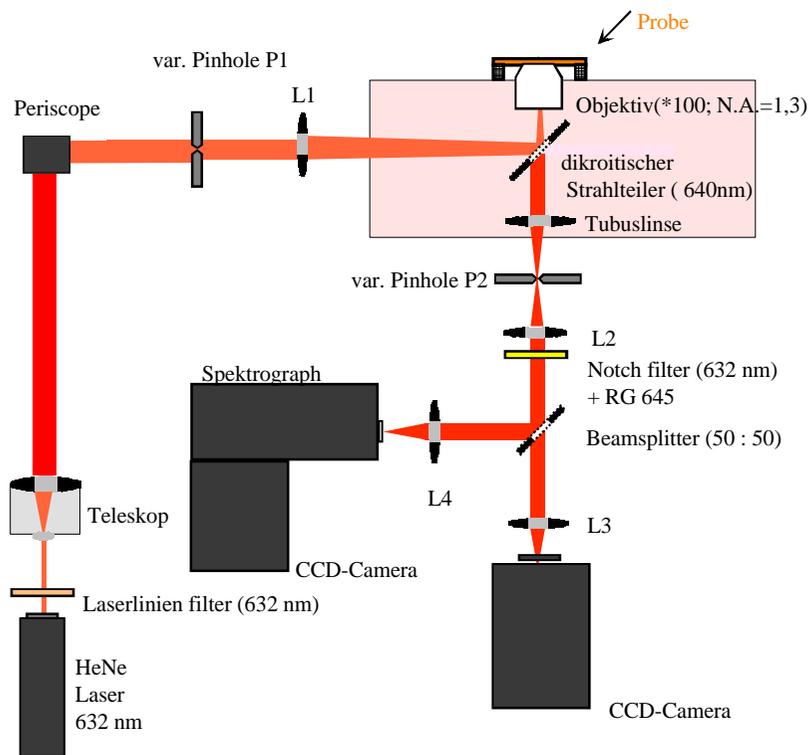


Abbildung 6.2 Schematischer Aufbau des Fluoreszenzmikroskops zum Imaging mit Weitfeldanregung

Die nähere Beschreibung der Bestandteile bzw. der Handhabung des Aufbaus kann dem fortlaufenden Text entnommen werden.

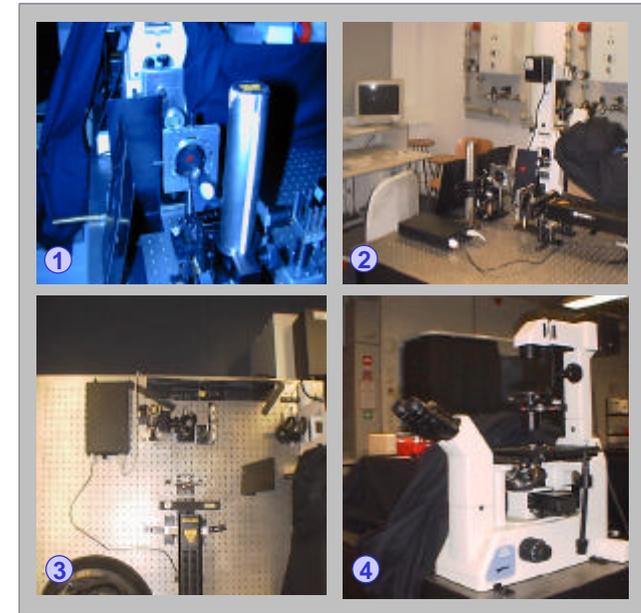


Abbildung 6.3 Photos zum Aufbau (Imaging mit Weitfeldanregung)

Da das Fluoreszenzlicht dasselbe Objektiv passiert wie das Anregungslicht, muß das Anregungslicht orthogonal auf die Probe treffen. Dies erreicht man mit Hilfe des **Periskops**. Das **variable Pinhole** (P1) wird maximal geöffnet, die **plankonvexe Defokussierungslinse** (L1,  $f = 300\text{ mm}$ ) wird aus dem Strahlengang entfernt, ebenso das Objektiv. Der Laserstrahl wird folglich direkt an die Labordecke gestrahlt. Senkrecht über der Position des Objektivs befindet sich eine Markierung. Durch Verkippen der Spiegel des **Periskops** wird der Strahl zum einen mittig auf die Apertur des Objektivrevolvers gelenkt, zum anderen läßt sich mit Hilfe der Verschiebetische durch Translationsbewegung die Strahlverkipfung gegebenenfalls nachregulieren.

Man baut das Objektiv wieder ein und verwendet zur Erstjustage einen Spiegel. Der Tisch mit dem Spiegel wird in z-Richtung solange verstellt, bis ein minimal kleiner Beleuchtungsfleck entsteht, der beim Defokussieren in konzentrische Ringe übergeht. Beobachtet man beim Defokussieren eine Verzerrung in x- oder y-Richtung, so läßt sich dieses mit Hilfe der Verschiebetische des **Periskops** nachjustieren. Ist es notwendig die Spiegel des Periskops zu Verkippen, so muß vor der weiteren Justage der vertikale Strahlaustritt zur Decke erneut überprüft werden. Abbildung 6.4 zeigt den Rückreflex des optimierten Beleuchtungsflecks nach beendeter Justage.

Anschließend befestigt man die **Defokussierungslinse** (L1,  $f=300\text{ mm}$ ), die senkrecht zur Strahlrichtung in x- und y-Richtung justierbar ist, beweglich auf einem Verschiebetisch (parallel zum Strahlengang). Sie wird in x- und y- Richtung so positioniert, daß ein gleichmäßig ausgeleuchteter Belichtungsfleck entsteht. Zur Justage der folgenden Bauteile kann die Linse vorübergehend aus ihrer Halterung entfernt werden.

transparente 30% pH-neutrale TRIS-Puffer-Lösung ersetzt. Durch Permeabilisierung mit Aceton-Methanol-Mischungen werden die Zellen fixiert und sterben ab. So präpariertes Zellmaterial kann in nicht-wässrigen Lösungsmitteln wie DMSO eingefroren und damit konserviert werden. Durchlichtbilder verschiedener lebenden HeLa-Zellen zeigt Abbildung 6.8.

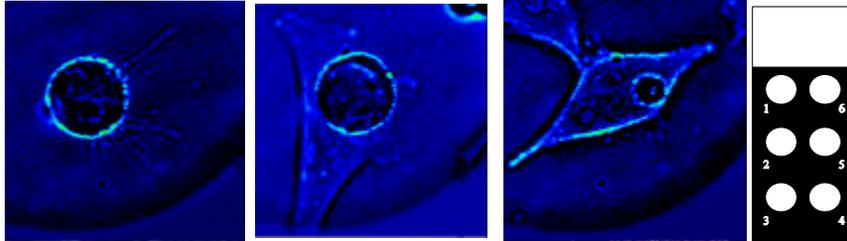


Abbildung 6.8 Durchlichtbilder verschiedener HeLa-Zellen (Bildgröße  $30\ \mu\text{m} * 30\ \mu\text{m}$ ) und Schema eines Objekträgers aus sechs durch eine schwarze Folie von wenigen  $\mu\text{m}$  Stärke abgetrennten Probenkammern mit 1 cm Durchmesser

HeLa-Zellen werden zwischen 5 und  $30\ \mu\text{m}$  (Durchmesser) in der xy-Ebene groß (die Dicke beträgt etwa 5 bis  $15\ \mu\text{m}$ ). Die linke Zelle besteht fast nur aus dem runden Zellkern, die mittlere Zelle zeigt einen großen runden Zellkern (der hier im wesentlichen die Dreidimensionalität der Zelle ausmacht) und die annähernd dreieckig aufgespannte Zellmembran. Die rechte Zelle ist in etwa rautenförmig gewachsen und zeigt einen kleinen Zellkern.

Die in dieser Arbeit untersuchten mit Cy5 gelabelte Makromoleküle waren das Immunglobulin G (IgG; rabbit anti mouse) und das Adeno-assoziierte Virus (AAV). IgG kann Cy5-gelabelt von Amersham kommerziell bezogen werden. Das Labeling von AAV wurde nebst Reinigung des Virus von M. Ried übernommen [235].

IgG (Abbildung 6.9A) ist ein Y-förmiges Makromolekül, das aus zwei sog. H-Ketten, zwei in verschiedenen Blautönen dargestellten Proteinen, besteht, die über Disulfidbrücken mit sog. L-Ketten (grün bzw. gelb) verknüpft sind. Die beiden H-Ketten sind untereinander ebenfalls disulfidisch verbrückt und weisen in ihren unteren Abschnitten Verknüpfungen zu Kohlehydratketten (rot bzw. magenta) auf. An den Enden beider Verzweigungen zeigen H- wie L-Ketten Abschnitte variabler Struktur. Durch diese variablen Teile wird ein bestimmtes Muster von reaktionsfähigen Gruppen geschaffen, die durch Nebervalenzen mit einem Antigen in Reaktion treten und dieses binden können [236].

Das Virus-Kapsid von AAV ist Ikosaeder-förmig (Abbildung 6.9B). Es weist einen Durchmesser von etwa 20-25 nm auf. Genau untersucht ist die Struktur von CPV, einem Parvovirus, das eng mit AAV verwandt ist. Ausführlicher wird der Aufbau von AAV in Kapitel 5 behandelt.

kann das **Pinhole** (P1) wie eine Punktlichtquelle wirken, die im Brennpunkte der **Defokussierungslinse** (L1) sitzt: Der Fokus ist wieder beugungslimitiert. Zum Einstellen der optimalen Größe des ersten **Pinholes** (P1) auf der Anregungsseite verwendet man eine fixierte Probe von Cy-5. Ein **Langpassfilter** (Schott, RG 665) wird im parallelen Strahlengang des austretenden Lichtstrahles, d.h. zwischen der **Linse** (L2,  $f = 160\text{mm}$ ) und dem **Strahlteiler**, positioniert.

Man öffnet das **Pinhole** (P1) maximal. Das Fokussieren auf den Rückreflex erfolgt erst mit dem Auge, und zwar zunächst ohne die **Defokussierungslinse** (L1,  $f = 300\text{mm}$ ). Der reflektierte Strahl wird wieder minimal klein eingestellt. Die **Linse** (L1) wird nun wieder im Strahlengang positioniert, der Belichtungsfleck muß gleichmäßig ausgeleuchtet sein.

Der Strahl wird auf die Kamera umgestellt. Im Run-Modus beobachtet man das Fluoreszenzlicht live am Bildschirm. Wenn nötig, verstellt man die **Linse** (L3,  $f = 200\text{mm}$ ) der Detektionsseite in z-Richtung, bis man die einzelnen Moleküle der Probe scharf sieht.

Man stellt am **Pinhole** (P1) im Anregungsstrahlengang eine Öffnungsweite von maximal 3mm ein. Beobachtet man eine ungleichmäßige Ausleuchtung, so muß das **Pinhole** (P1) in x- und y-Richtung verstellt werden, bis es sich mittig im Strahlengang befindet, was sich an einer gleichmäßigen Ausleuchtung zeigt. Man variiert nun die Öffnung des **Pinholes** (P1) in Intervallen von 1mm von  $\varnothing = 1\text{mm}$  bis  $\varnothing = 3\text{mm}$ . Dies entspricht einer Ausleuchtung auf der Probe von  $\varnothing = 5\ \mu\text{m}$  bis  $\varnothing = 15\ \mu\text{m}$ . Abbildung 6.5 zeigt die Abhängigkeit der Größe des Beleuchtungsflecks von der Öffnungsweite des variablen Pinholes im Anregungsstrahlengang. Das zweite **Pinhole** (P2) wird zunächst maximal weit geöffnet. In Intervallen von 1mm verkleinert man die Öffnungsweite. Man verfolgt die Fluoreszenz live am Bildschirm. Ziel ist es, das Streulicht, das sich nicht exakt im Fokus befindet, auszublenden und gleichzeitig die komplette beleuchtete Probenstelle abzubilden.

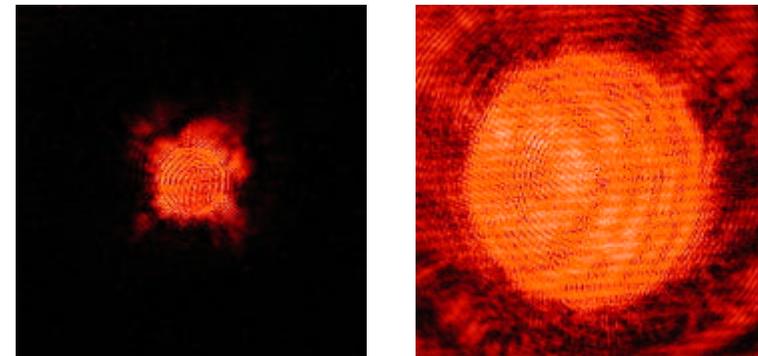


Abbildung 6.5 Steuerung der Größe des Beleuchtungsflecks durch Variation der Pinholegröße

Abgebildet ist der Rückreflex des Anregungsstrahls, einmal mit einem Pinholedurchmesser von 1mm (links), einmal mit einem Pinholdurchmesser von 3 mm (rechts) beleuchtet (maßstabgetreue Darstellung; Fotografie mit Nikon Coolpix 990).

## 6.4 Probensysteme und ihre Präparierung

In dieser Arbeit wurden zum einen die Fluoreszenzfarbstoffe Terrylendiimid und Cyanin 5 in Polymeren untersucht. Zum anderen wurden Experimente mit biologischen Molekülen, nämlich mit Immunglobulin G und mit dem Adeno-assoziiertem Virus, beide mit Cy5 gelabelt, durchgeführt.

### 6.4.1 Fluoreszenzfarbstoffe in dünnen Polymerfilmen aus Polyvinylbutyral

Terrylendiimid (TDI) ist ein tiefblauer Farbstoff, der sich erst ab 460°C thermisch zersetzen läßt. Abbildung 6.6 zeigt Strukturformel, Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von TDI in Chloroform. Man erkennt das Absorptionsmaximum bei  $\lambda=650$  nm, das Fluoreszenzmaximum bei  $\lambda=665$  nm, damit einen bathochromen Stoke-Shift von  $\Delta\lambda=15$  nm [234].

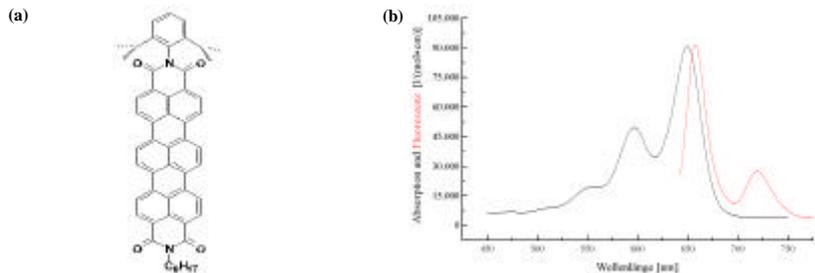


Abbildung 6.6 Terrylendiimid TDI

Strukturformel (A) und Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum (B)

Die Spektren wurden jeweils in Chloroform aufgenommen (Absorptionsspektrum mit Uvikon 486; Fluoreszenzspektrum mit Perkin Elmer)

TDI hat eine Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau = 3,3$  ns in Chloroform (Messung mit Perkin Elmer), einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 93\,000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), fast optimale Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_F = 90\% \pm 10\%$ ) und sehr gute Photostabilität. Unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 366$  nm einer Küvette mit in Chloroform gelöstem TDI trat nach einer Woche keine signifikante Veränderung der Extinktion ein [234]. Die Photostabilität am Einzelmolekül wird in Kapitel 7.3 behandelt. Auf Grund dieser photophysikalischen Daten und der relativ weit rotverschobenen Anregungswellenlänge eignet sich der Farbstoff sehr gut für Einzelmoleküluntersuchungen in Polymerfilmen von Polyvinylbutyral (PVB; vergleiche [226]). Da TDI nicht wasserlöslich ist, sind biologische Anwendungen in wässrigen Medien leider nicht möglich.

Für Einzelmoleküluntersuchungen wurde TDI in PVB-Chloroform-Lösungen (2g PVB je 1 Chloroform) in Konzentrationen von  $10^{-9} - 10^{-11} \text{ mol/l}$  durch Spincoating ( $v = 3000 \text{ U/min}$ ) auf Objektträgerdeckgläschen aufgetragen. Die nach Verdunsten des Lösungsmittels entstehenden Polymerfilme waren einige 10 nm dick [226].

Cyanin 5 (Cy 5) ist ein ebenfalls tiefblauer, in polaren Medien löslicher Farbstoff. Abbildung 6.6 zeigt Strukturformel, Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Cy 5 in Wasser [74]. Man erkennt das Absorptionsmaximum bei  $\lambda=649$  nm, das Fluoreszenzmaximum bei  $\lambda=670$  nm, damit einen bathochromen Stoke-Shift von  $\Delta\lambda=21$  nm.

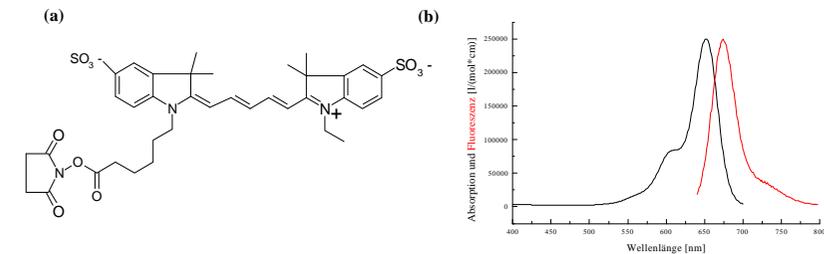


Abbildung 6.7 Cyanin 5 (Cy5)

Strukturformel (A) und Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektrum in Wasser (B) [74]

Cy5 kann als Label für freie Amino-Gruppen tragende Biomoleküle verwendet werden. Abgangsgruppe ist die Dicarbonsäureoxoamid-Gruppe.

Cy 5 weist eine Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau = 1,5$  ns in Ethanol (Messung mit Perkin Elmer), einen sehr hohen molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 250\,000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), eine relativ hohe Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_F > 28\%$ ) und gute Photostabilität auf. Die Photostabilität am Einzelmolekül wird in Kapitel 7.3 behandelt. Auf Grund dieser photophysikalischen Daten und der relativ weit rotverschobenen Anregungswellenlänge eignet sich der Farbstoff sehr gut für Einzelmoleküluntersuchungen sowohl in Polymerfilmen von PVB wie auch als Label in wässrigen biologischen Systemen.

Für Einzelmoleküluntersuchungen in PVB wurde Cy5 in PVB-Chloroform-Lösungen wie TDI präpariert. Als Lösungsmittel für Cy5 selbst wurde dabei jedoch Ethanol statt Chloroform verwendet. Für biologische Einzelmolekül-Anwendungen wurden wässrige Lösungen von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11} \text{ mol/l}$  des bereits fertig mit Cy5 gelabelt vorhandenen Makromoleküls verwendet.

### 6.4.2. HeLa-Zellen und gelabelte Biomoleküle: IgG gelabelt mit Cy5 und AAV gelabelt mit Cy5

Für Einzelmoleküluntersuchungen in Zellen wurden anfangs mit Aceton und Methanol permeabilisierte, später lebende HeLa-Zellen verwendet, die auf Objektträgern angewachsen waren und von M. Ried bereitgestellt wurden [235]. HeLa-Zellen sind menschliche Tumorzellen, die als Laborstandard in der Biochemie verwendet werden. Solche Zellen werden auf Objektträgern ausgesät und im Brutschrank bei 37°C in 5% Kohlendioxid-Atmosphäre 24 Stunden unter Nährlösung (xxx) gezüchtet, bevor sie etwa 24 Stunden lang mikroskopisch bei Raumtemperatur untersucht werden können. Dazu wird die Nährlösung gegen eine optisch

## 7. Experimentelle Ergebnisse und Diskussion

Dieses Kapitel umfaßt alle Einzelmolekülexperimente, die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführt wurden: Die Untersuchungen an Testsystemen dienen in erster Linie zur Charakterisierung der verwendeten Apparaturen. Klassische Einzelmolekülexperimente mit Farbstoffen in Polymermatrizen führen allgemeine photophysikalische Einzelmoleküleigenschaften ein, die Fluoreszenzfarbstoffe bei Raumtemperatur unter dem Mikroskop zeigen. Es folgt die nähere Charakterisierung der photophysikalischen Eigenschaften der untersuchten Farbstoffe (TDI und Cy5). Erste biologische Untersuchungen stellen die Einzelmolekülexperimente in fixierten HeLa-Zellen mit IgG-Cy5 dar. Zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von IgG und AAV werden Experimente in reiner wäßriger Lösung nach der Methode des Single Particle Tracking vorgestellt. Im Zentrum dieses Kapitels stehen die Untersuchungen zum Eindringen und Wanderungsverhalten von AAV-Cy5 in lebenden HeLa-Zellen, durchgeführt mit dem einzelnen Virus. Abschließend werden Versuche zum Förster-Resonanz-Energie-Transfer am individuellen Chromophorenpaar Pe-TDI vorgestellt, das ein Modellsystem für biologisch relevante Donor-Akzeptor-Paare sein kann..

### 7.1 Testproben

Die in diesem Abschnitt beschriebene Untersuchung von Testproben dient zur Charakterisierung der beiden mikroskopischen Setups (konfokaler Aufbau bzw. Imaging-Aufbau).

Als Maß für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops gilt die Halbwertsbreite (*full width at half maximum; FWHM*) der lateralen Intensitätsverteilung eines punktförmigen Objekts. Die axiale Auflösung spielt bei dünnen Proben keine Rolle und wurde daher für den konfokalen Aufbau nicht bestimmt. Die Rolle der z-Auflösung im Imaging-Aufbau wird unten behandelt. Die experimentelle Bestimmung der optischen Auflösung kann mit verschiedenen Testprobensystemen vorgenommen werden (vergleiche [226]). Hier wird nur auf die Bestimmung mit Hilfe von immobilisierten Einzelmolekülproben von TDI in PVB eingegangen. Nach Gleichung (3-5) ergibt sich für den konfokalen Fall bei Objektiven mit einer numerischen Apertur von  $N.A. = 0,85$  und mit einem Mittelwert von  $\langle \lambda \rangle = 650$  nm aus der Anregungswellenlänge  $\lambda = 632,8$  nm und dem Hauptmaximum  $\lambda = 665$  nm des Emissionsspektrums von TDI eine laterale Auflösung von  $FWHM_{theo} = 306$  nm [226]. Für Immersionsobjektive mit hohen numerischen Aperturen ( $N.A. = 1,3$ ) sind theoretisch noch kleinere Halbwertsbreiten möglich ( $FWHM_{theo} = 205$  nm). Im Fall der Imaging-Technik kann

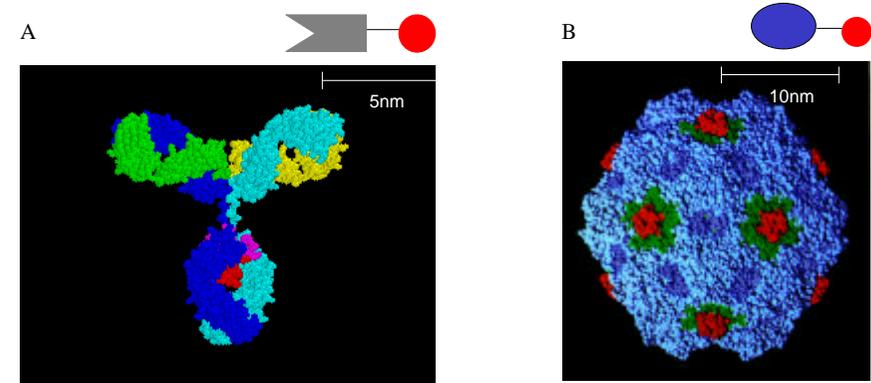


Abbildung 6.9 Kalottenmodelle von IgG (A; hier: human type) und des Kapsids eines Parvovirus (B; Näheres zu dieser Abbildung in Kapitel 5)

Zur Überprüfung des Labelings beider Biomoleküle wurde je  $1 \mu\text{l}$  aus  $10^{-9}$  molarer wäßriger Lösung zwischen zwei Objektträgerdeckgläsern gebracht und zu einem feinen Film verteilt. Nach einigen Minuten hatten sich dann einzelne Moleküle auf der Glasoberfläche abgesetzt. Sie wurden fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen. Die Intensität ihrer Fluoreszenzspots in einer bestimmten Detektionszeit wurde bestimmt und gegen diese Intensität wurde die Häufigkeit des Auftretens aufgetragen. Es fanden sich für IgG wie für AAV jeweils zwei Verteilungsmaxima, deren Intensitäts-Positionen im Verhältnis von 2:1 stehen. Sie deuten auf das Auftreten ein- und zweifach gelabelter Biomoleküle hin. Die mathematische Vorgehensweise der Auswertung wird in Abbildung 6.10 näher erläutert.

Das Verhältnis  $Q$  der Häufigkeit von einfach zu zweifach gelabeltem Biomolekül ist für beide Systeme etwa 4:1. Falls das Ergebnis der Labeling-Prozedur der Poisson-Verteilung genügt, kann aus  $Q$  die Elementarwahrscheinlichkeit  $p$  berechnet werden, mit der ein Antikörper durch den Farbstoff gelabelt wird:

$$Q = \frac{2! p e^{-p}}{p^2 e^{-p}} = \frac{2}{p}$$

Sie gibt letztendlich das stöchiometrische Verhältnis zwischen Makromolekül und Farbstoff an.  $p$  ist hier jeweils  $\frac{1}{2}$

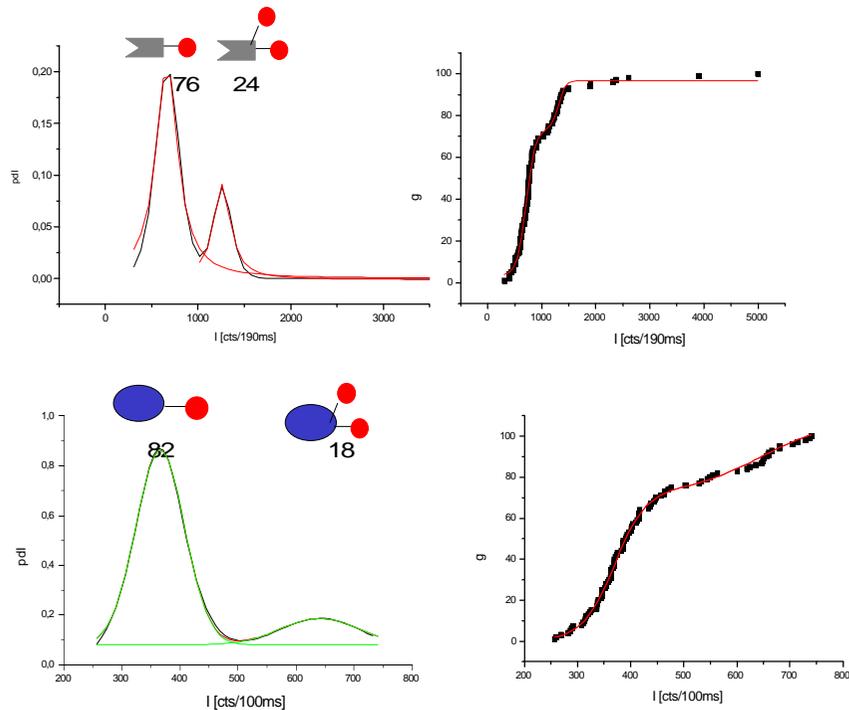


Abbildung 6.10 Die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten  $I$  einzelner Moleküle liefert Zahl und Mengenverhältnis der Farbstoff-Label pro Grundkörper von Cy5-IgG (oben) und Cy5-AAV (unten).

Die Integralfunktion  $g(I)$  (rechts) ist der Fit (rote Linie; Doppel-Sigma-Funktion) der akkumulierten Häufigkeit von  $I$  (schwarze Punkte; erhalten aus Messung von 100 Molekülen). Die Ableitung von  $g(I)$  ergibt die Dichtefunktion  $pdI$  (schwarze Linie links). Beide gelabelten Systeme zeigen zwei Verteilungsmaxima, deren Position in etwa im Verhältnis ganzer Zahlen (2:1) zueinander stehen. Sie können als das Auftreten ein- wie zweifach gelabelter Biomoleküle interpretiert werden. Während der Antikörper in seltenen Fällen (sechs im Graphen rechts oben) mit mehr als zwei Farbstoffen gelabelt sein kann, ist AAV maximal zweifach labelbar (vergleiche [197]). Das Verhältnis der beiden Flächen der Maxima gibt das Mengenverhältnis von ein- zu zweifach gelabeltem Farbstoff an (Flächenberechnung durch zweifachen Gaußfit, rote Linie oben, grüne Linie unten). Es beträgt für beide Systeme ungefähr 4:1.

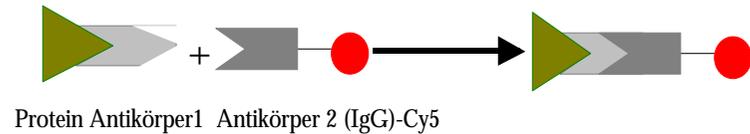
Für die ersten Messungen in Zellen mit Antikörpern (IgG) wurden permeabilisierte HeLa-Zellen verwendet, da IgG nicht durch die Zellmembran lebender Zellen dringen kann.

Der Antikörper gelangt in diesem Fall durch das Cytosol in den Zellkern, wo er an primäre Antikörper anbinden kann, die zuvor auf die permeabilisierte Zelle gegeben worden sind und ein im Zellkern in Folge von AAV-Infektion expremiertes Protein markieren (Abbildung 6.11).

Der Primärantikörper wird dabei im Überschuß zugegeben, die IgG-Cy5-Lösungen wurden in Konzentrationen von etwa  $c=10^{-5}$  mol/l bis  $c=10^{-10}$  mol/l und in Volumina von  $V=100 \mu\text{l}$  je Well bis  $V=0,5 \mu\text{l}$  je Well eingesetzt. Es wurden zunächst Experimente mit Zellen durchgeführt, bei denen die Wanderung von IgG abgeschlossen war. Hier wurden schrittweise Messungen mit abnehmender Verdünnung durchgeführt und der Nachweis von Cy5 in Zellen vom Ensemble bis zum einzelnen Molekül durchgeführt.

Später wurde dann die Wanderung von einzelnen IgG-Cy5-Molekülen in den permeabilisierten Zellen verfolgt. Diese wurden in DMSO eingefroren von M. Ried geliefert. Nach Auftauen und Beseitigung des Mediums wurde die TRIS-gepufferte IgG-Lösung zugegeben. Es wurde mit Konzentrationen von etwa  $c=10^{-9}$  mol/l und Volumina von  $V=0,5-5 \mu\text{l}$  je Well gearbeitet.

Die gleichen Konzentrationen wurden beim System AAV-Cy5 in lebenden HeLa-Zellen eingesetzt. Die Lösung gelabelter Viren wurden hierzu bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt und am Meßtag bis unmittelbar vor der Probenzugabe auf Eis gelagert (vergleiche [237]). Die HeLa-Zellen wurden von M.Ried unter Nährlösung bereitgestellt [235]. Zur Messung wurden die Nährlösung mit einer Mikropipette abgenommen und die gepufferte Virenlösung zugegeben. Ganz analog zur IgG-Lösung wurde als wäßriges Medium der TRIS-Puffer verwendet.



Protein Antikörper1 Antikörper 2 (IgG)-Cy5

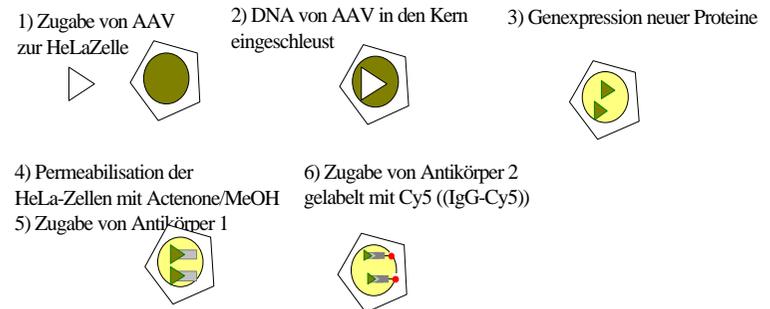


Abbildung 6.11 Prinzip der Internalisierung von IgG-Cy5 in permeabilisierten Zellen (oben) und Präparationsschema der permeabilisierten Zellen (unten)

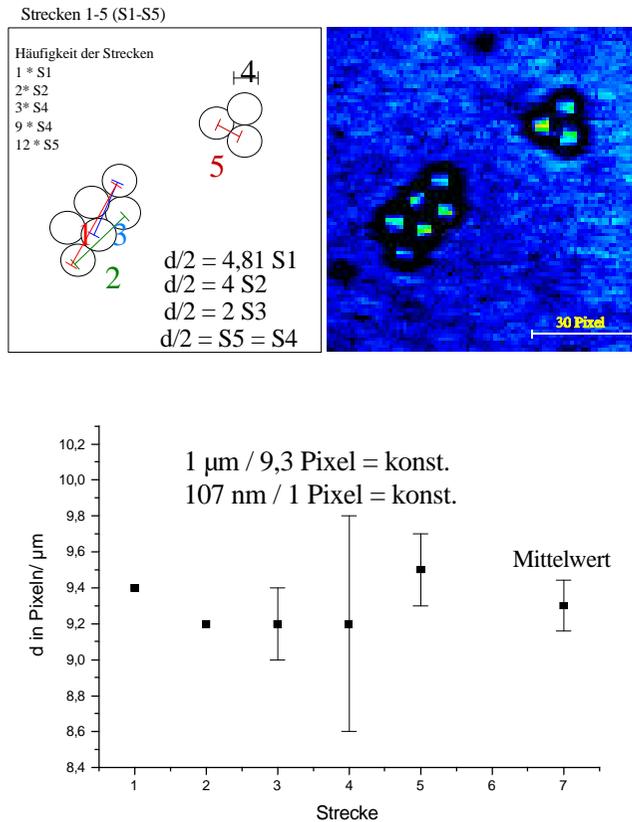


Abbildung 7.4 Bestimmung der Vergrößerung anhand einer Aufnahme von Melamin-Kügelchen mit Normdurchmesser von  $d=1,0 \mu\text{m}$

Bestimmt man die Koordinaten der Kugelmittelpunkte der mikroskopischen Aufnahme in Pixeln, kann man jede einzelne Strecke in Pixeln ausmessen und in  $\mu\text{m}$  ausrechnen. Es ergibt sich ein Mittelwert von  $O/S = 107 \text{ nm/Pixel}$ , der exzellent mit dem berechneten Wert von  $O/S_{\text{theo}} = 108 \text{ nm}$  übereinstimmt.

mehrere Moleküle in einem annähernd kugelförmigen Volumen von einigen 10 nm Durchmesser anreichern. Solche Proben können wie fluoreszierende Beads als geeignete Testproben verwendet werden. Abbildung 7.5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Halbwertsbreite FWHM (Maß für die z-Position) des Fluoreszenzspots einer solchen Insel und die xy-Position des Maximums des Spots in Abhängigkeit der Zeit. Die Annäherungen per Auge und durch Gaußfit sind auf 1 Pixel genau equivalent. Die zeitliche Entwicklung von FWHM ( $\langle \text{FWHM} \rangle = 6,3 \text{ a.u.} \pm 0,3 \text{ a.u.}$ ) und xy-Position ( $\langle (x/y) \rangle = (17,2 \mu\text{m} / 12,2 \mu\text{m}) \pm (0,1 \mu\text{m} / 0,05 \mu\text{m})$ ) des Spots zeigt über einen Beobachtungszeitraum von 2,5 Stunden keine systematische Driftbewegung der Testprobe in z (axial) oder xy (lateral).

nur ein theoretisches Auflösungsvermögen nach dem Rayleigh-Kriterium (Gleichung 3-4) von  $\text{FWHM}_{\text{theo}}=314 \text{ nm}$  ( $N.A. = 1,3$ ;  $\lambda = 670 \text{ nm}$ ) erreicht werden. In der Praxis realisiert wurden Werte von  $\text{FWHM}=300 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$  ( $N.A. = 1,3$ ;  $\langle \lambda \rangle = 650 \text{ nm}$ ) für den konfokalen Aufbau (nicht dargestellt) und  $\text{FWHM}=400 \text{ nm} \pm 50 \text{ nm}$  ( $N.A. = 1,3$ ;  $\lambda = 670 \text{ nm}$ ) für den Imaging-Aufbau (siehe Abbildung 7.1).

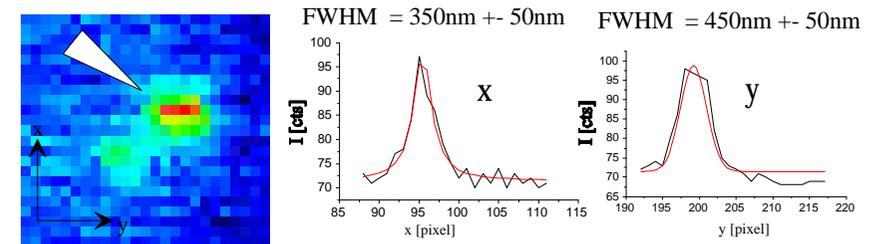


Abbildung 7.1 Auflösungsvermögen erzielbar mit dem Imaging-Setup am Beispiel eines TDI-Einzelmoleküls (mit Pfeil markierter Spot)

Die lateralen Intensitätsprofile (schwarze Kurven; x und y) werden mit einer Gaußfunktion angenähert. Die bestimmte FWHM ist die Halbwertsbreite des Fits. Die Verbreiterung des y-Profiles ist rein statistisch (kein systematisches Problem).

Imaging-Aufnahmen in dreidimensionalen Zellproben oder Flüssigkeitsproben wurden in allen Experimenten als Projektion auf eine bestimmte Ebene in der Probe durchgeführt. Diese Ebene ist durch die Fokalebene des Objektivs vorgegeben. In diesen Aufnahmen war die Bestimmung des Maximums der Fluoreszenzspots wichtig für die Bestimmung der zweidimensionalen Projektion von Trajektorien. Dabei konnten nur solche Farbstoffmoleküle nachgewiesen werden, die um maximal  $dz=\pm 3 \mu\text{m}$  zur der Detektionsebene versetzt waren. Allerdings kann man zeigen, daß die Verbreiterung der Halbwertsbreite eines Fluoreszenzspots stark mit der Abweichung von der idealen z-Position (Fokalebene) steigt.  $d\text{FWHM}$  hängt quadratisch von  $dz$  ab (Abbildung 7.2) [249]. Dies wurde an einem AAV-Cy5-Molekül, das langsam ( $11 \mu\text{m}$  in 60 Minuten) in z-Richtung durch den Zellkern einer HeLa-Zelle wandert, untersucht. Dabei wurden mehrmals Aufnahmen bestimmter Positionen des Moleküls mit verschiedenen Objektivpositionen in z durchgeführt. Trägt man die Abweichung der Halbwertsbreite  $d\text{FWHM}$  relativ zum absoluten Minimum gegen die Abweichung der z-Position  $dz$  relativ zum schärfsten Bild auf, erhält man eine Kurve, die vom Minimum aus in beide Richtungen entlang einer Parabel ansteigt. Wird  $dz$  größer als  $1 \mu\text{m}$ , wird die Halbwertsbreite bereits so groß, daß eine Maximumbestimmung in xy durch einen Gaußfit, die bei scharfen Objekten auf mindestens  $\pm 1$  Pixel möglich ist, scheitert. Es kann davon ausgegangen werden, daß nur Moleküle, die im Bereich von  $dz=\pm 1 \mu\text{m}$  relativ zur Fokalebene liegen, zur Positionsbestimmung in xy-Trajektorien verwendbar sind.

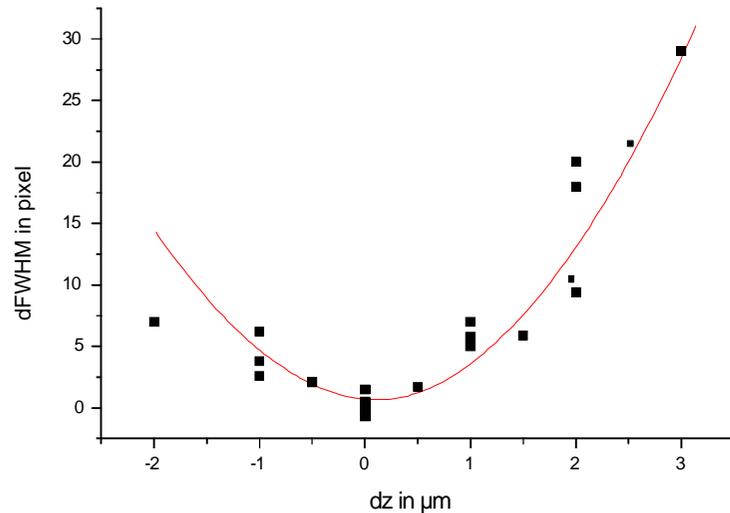


Abbildung 7.2 Bestimmung der Positionsgenauigkeit in z-Dimension

dFWHM hängt quadratisch von dz ab.

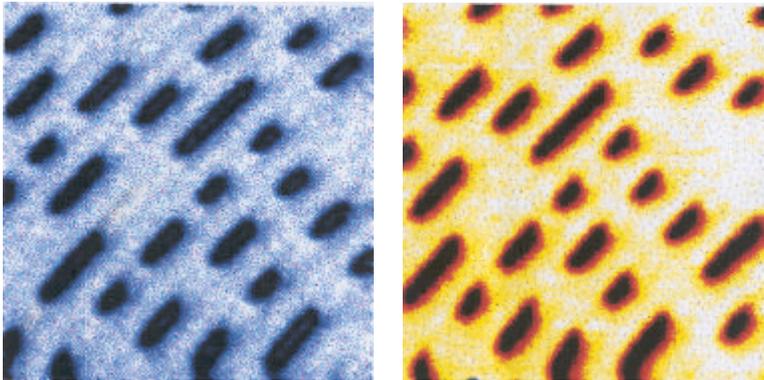


Abbildung 7.3 Testprobe zur Zweifarbenanregung (Aufnahme mit konfokaler Mikroskopie)

Dargestellt ist der Ausschnitt einer CD („T-online“, Zugangssoftware) von  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$  aufgenommen mit der Anregungswellenlänge 442 nm (links) eines HeCd-Lasers bzw. mit 633 nm (rechts) eines HeNe-Lasers. Die Rillen auf der CD haben senkrecht zur Ausdehnungsrichtung einen Abstand von  $1,2 \mu\text{m}$  voneinander. Das belegt einerseits, daß der gesamte hier abgebildete Bildausschnitt  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$  groß ist (Kontrolle des Scanners). Andererseits zeigt der Vergleich beider Abbildungen, daß der blaue Fokus etwa um einen  $\mu\text{m}$  nach rechts zum roten versetzt liegt.

Zur Kontrolle des konfokalen Setups mit Zweifarbenanregung ( $\lambda_1 = 632,8 \text{ nm}$  (HeNe);  $\lambda_2 = 442 \text{ nm}$  (HeCd)) wurde ein Stück einer CD mikroskopisch im Reflexionsmodus aufgenommen. Man erkennt in Abbildung 7.3, daß der gleiche Probenausschnitt ( $8 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$ ), einmal mit der roten Laserlinie, einmal mit der blauen Laserlinie aufgenommen, im mit Rot aufgenommenen Bild um etwa einen  $\mu\text{m}$  nach rechts verschoben erscheint. Dies liegt daran, daß das zum Zeitpunkt des Experiments zur Verfügung stehende Objektiv (Zeiss; Ölimmersion; N.A.=1,3) nicht auf mehrere verschiedene Wellenlängen korrigiert ist.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Zweifarben-Messungen zum Energietransfer (Kapitel 8) war dieser Fehler jedoch tolerierbar.

Zur Bestimmung der Vergrößerung des Imaging-Aufbaus wurden Kunststoff-Kügelchen (Melamin, Fa. Polyscience) eines Normdurchmessers von  $d=1,0 \mu\text{m}$  verwendet. Theoretisch gilt folgende laterale Vergrößerungsformel:

$$O = \frac{f_{L2} f_{Obj}}{f_{L3} f_T} S$$

- O : Originalgröße eines Objekts, das im Bild als ein Pixel dargestellt wird  
 S : Größe eines Pixels der CCD-Camera (in x oder y) ( $S=15 \mu\text{m}$ )  
 $f_{L2}, f_{L3}$  : Brennweiten der Linsen 2 und 3 ( $f_{L2}=160 \text{ mm}$ ,  $f_{L3}=200 \text{ mm}$ )  
 $f_T, f_{Obj}$  : Brennweiten der Tubuslinse des Mikroskops und des Mikroskopobjektivs ( $f_T=180 \text{ mm}$ ,  $f_{Obj}=1,6 \text{ mm}$ )

Abbildung 7.4 zeigt eine Testprobe aus Melamin-Kügelchen, verteilt auf einem Objektträgerdeckgläschen im Durchlichtbild. Nähert man Inseln aus mehreren Kügelchen durch Berührungskreise an, kann man verschiedene Streckentypen im Schemabild ermitteln, die alle einen funktionellen Zusammenhang mit dem Kreisdurchmesser ( $1,0 \mu\text{m}$ ) aufweisen. Bestimmt man die Koordinaten der Kugelmittelpunkte der mikroskopischen Aufnahme in Pixeln, kann man jede einzelne Strecke in Pixeln ausmessen und in  $\mu\text{m}$  ausrechnen. Es ergibt sich ein Mittelwert von  $O/S = 107 \text{ nm/Pixel}$ , der exzellent mit dem berechneten Wert von  $O/S_{\text{theo}} = 108 \text{ nm}$  übereinstimmt.

Zum Vergleich der Positionen eines Objekts zwischen Durchlichtbildern und in Reflexion an der Probe detektierten laser- beleuchteten Bildern wurde auch im Imaging-Aufbau eine CD vermessen. Abbildung 7.5 zeigt dieselbe Probenstelle einmal im Durchlicht (A; mit der Beleuchtungslampe des Mikroskops aufgenommen) und einmal in Reflexion (B; mit dem HeNe-Laser aufgenommen). Im vergrößerten Ausschnitt erkennt man, daß die Löcher der CD im Durchlichtbild hell, im Reflexionsmodus dunkel erscheinen. Die Koordinaten jeglicher Strukturen stimmen in beiden Bildern auf  $100 \text{ nm}$  überein. Diese Übereinstimmung ist für den Vergleich von Durchlicht-Zellbildern mit Fluoreszenzbildern der Probenmoleküle Cy5-AAV oder Cy5-IgG wichtig (Kapitel 7.6).

Zur Abschätzung, ob Driftbewegungen des Imaging-Mikroskops Bewegungen der untersuchten Probe vortäuschen können, wurde eine TDI/PVB-Probe mit hoher Farbstoffkonzentration vermessen. Der Farbstoff bildet in im Vergleich zu Einzelmoleküluntersuchungen  $10\,000$ fach überhöhten Konzentrationen Inseln, in denen sich

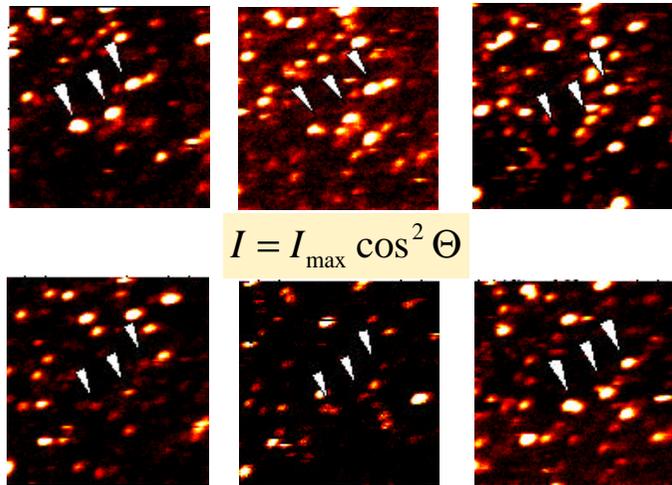


Abbildung 7.9 Intensität der Fluoreszenz von Einzelmolekülen in Abhängigkeit der Anregungspolarisation gemäß der in der Mitte dargestellten Formel nach [226] (Anregungsbedingungen:  $6.46 \text{ kW/cm}^2$ ,  $\lambda_0 = 594.1 \text{ nm}$ , linear polarisiert).

Die Bilderserie einer ausgewählten Probenstelle von  $16 \mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$  zeigt die Abhängigkeit des Signals von der Orientierung des Übergangsdipolmoments relativ zur Polarisationsrichtung des Anregungslasers. Die mit Pfeilen markierten Moleküle erscheinen in drei Aufnahmen deutlich, mit jeweils orthogonal polarisierter Anregung jedoch schwach. Die Polarisationsrichtung wurde in  $30^\circ$ -Schritten mit einer  $1/2$ -Platte variiert (dargestellt von oben links nach unten rechts).

Untersucht man Fluoreszenzspektren von einzelnen TDI-Molekülen in PVB bei Raumtemperatur, erscheinen diese in Folge schneller spektraler Diffusion stark inhomogen verbreitet. Die mittlere Halbwertsbreite ist  $\text{FWHM} = 24 \text{ nm}$ . Sie nehmen unterschiedliche spektrale Positionen je nach lokaler Umgebung ein. Die Lage der einzelnen Maxima reichte im Experiment von  $643 \text{ nm}$  bis  $693 \text{ nm}$ . Trotz der starken inhomogenen Verbreiterung können Fluoreszenzspektren vage zur Identifizierung von einzelnen Molekülen herangezogen werden. Dies hängt damit zusammen, daß bereits kleine Ensembles von einigen zehn Molekülen signifikant größere Halbwertsbreiten ( $\text{FWHM} = 38 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ ) aufweisen als die meisten Einzelmoleküle ( $\text{FWHM} = 24 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$ ). Ensemblespektren sind stets die Superposition von mehreren Einzelmolekülspektren. Wenn (wie beim System TDI in PVB) die Lage der Maxima einzelner Chromophore breit verteilt ist, schlägt sich die Breite dieser Verteilung auf die Halbwertsbreite des Ensemblespektrums nieder. Die Lage des Maximums solcher Spektren streute im Experiment dagegen noch zwischen  $663 \text{ nm}$  und  $667 \text{ nm}$ . Abbildung 7.10 zeigt exemplarisch einige Fluoreszenzspektren von einzelnen TDI-Molekülen (farbig) und ein Ensemblespektrum (schwarz).

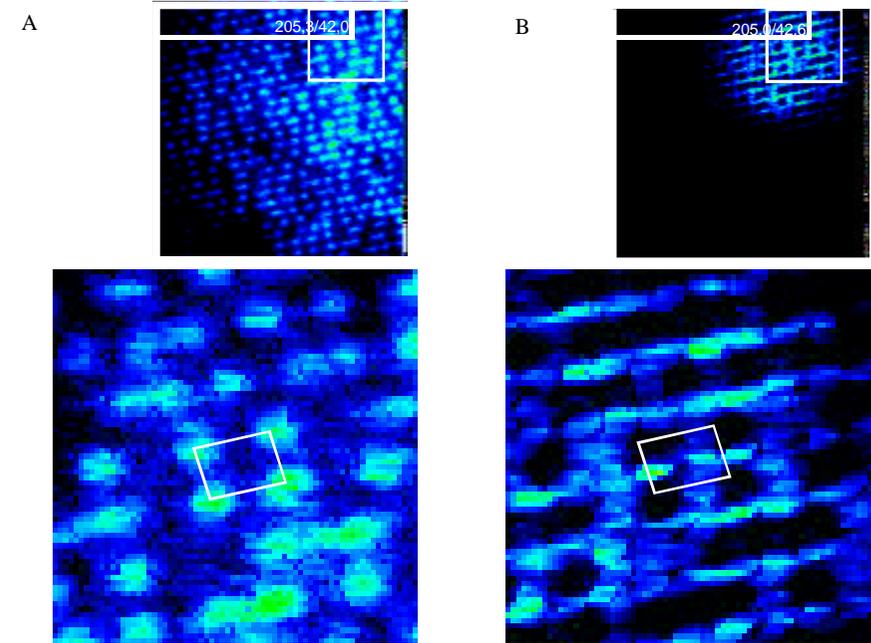


Abbildung 7.5 Aufnahmen einer CD ( $28 \mu\text{m} \times 28 \mu\text{m}$ ) zum Vergleich der Positionen eines Objekts in Durchlicht und in laserbeleuchteter Aufnahme

Die unteren Bilder sind die weiß markierten Ausschnitte der oberen Abbildungen.

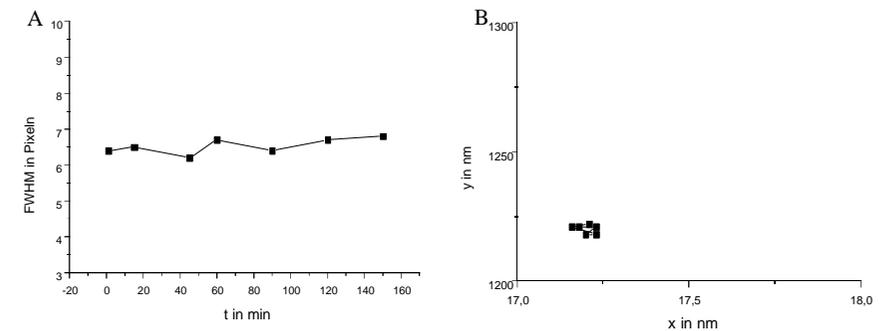


Abbildung 7.6 Untersuchung der systematischen Driftbewegung am Imaging-Mikroskop

A:  $\text{FWHM}(t)$  einer Farbstoffinsel aus TDI in PVB

B: auftretende  $xy$ -Maximumpositionen im Detektionszeitraum von 150 min

## 7.2 Typische Einzelmolekülexperimente bei Raumtemperatur (TDI in PVB)

In diesem Abschnitt werden einfache Einzelmolekülexperimente dargestellt, die mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops an TDI in PVB bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

Bereits in Kapitel 3 wurde das digitale Verhalten der Einzelmolekülfluoreszenz beschrieben: Einzelne Chromophore zeigen bei konstanter Laseranregung entweder Signal, das im Rahmen von Fluktuationen eine bestimmte Intensität zeigt, oder Nullsignal (nur Rauschen detektierbar). Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität von Molekülen wird in sog. Fluoreszenzzeitspuren, also I-t-Diagrammen, wiedergegeben. Abbildung 7.7 zeigt zwei Moleküle mit unterschiedlichem Fluoreszenzverhalten. Einmal erlischt die Fluoreszenz schlagartig nach etwa  $t=5$  s, kommt aber bei etwa  $t=16$  s wieder zurück. Ein andermal erlischt das Fluoreszenzsignal, ohne wiederzukommen. Man spricht im ersten Fall von *Blinking*, im anderen Fall von *irreversiblen Photobleichen* [226]. Ein Molekülensemble würde nicht in Stufen sondern im zeitlichen Verlauf exponentiell photobleichen. Digitales Photobleaching ist eine typische Einzelmoleküleigenschaft und kann als Nachweis von Einzelmolekülen verwendet werden. Ursachen für die auftretenden Dunkelzustände können dabei verschiedene Quenchprozesse, Photoreaktionen mit Bildung von CT-Zuständen, Besetzung des Triplettzustandes, Veränderungen in der Chromophorumgebung oder auch die Rotation des Moleküls mit seinem Übergangsdipolmoment senkrecht zur Polarisation der Anregung sein.

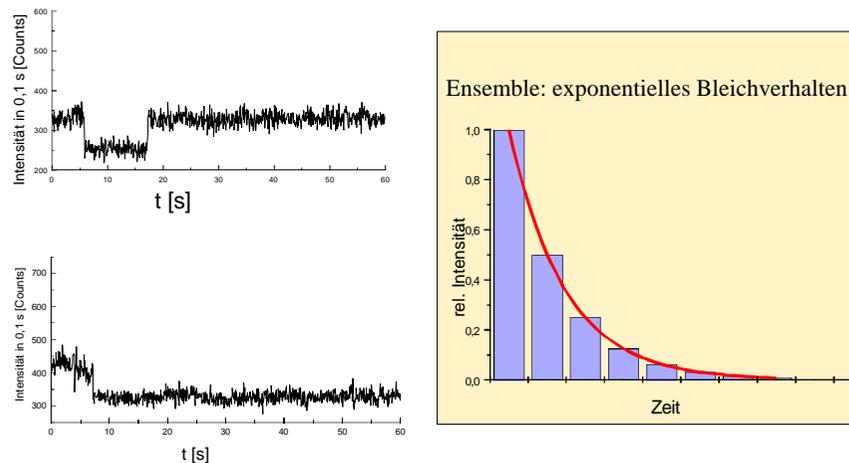


Abbildung 7.7 Reversibles (links oben) bzw. irreversibles (links unten) Photobleaching von einzelnen TDI-Molekülen nach [226] (Anregungsbedingungen:  $0,65 \text{ kW/cm}^2$ ,  $\lambda_0 = 632,81 \text{ nm}$ , linear polarisiert)

Einzelne Moleküle zeigen digitales Fluoreszenzverhalten: Sie sind entweder aus (keine Fluoreszenz) oder an (Fluoreszenz). Ein Ensemble von Molekülen zeigt exponentielles Photobleichen (Schema rechts).

Läuft das Photobleichen auf einer schnellen Zeitskala ab, kann es während der zeilenweisen Bildaufnahme (im Scanverfahren) bereits zum sog. „On,, „Off,, oder „Blinking,, kommen (Abbildung 7.8).

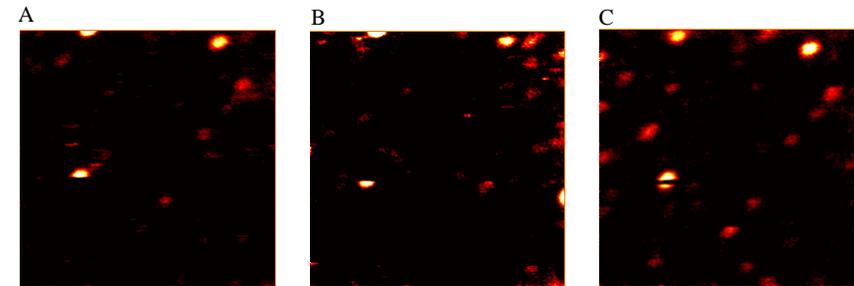


Abbildung 7.8 „On,, , „Off,, und „Blinking,, eines einzelnen TDI-Moleküls (links mittig) nach [226] (Anregungsbedingungen:  $6,46 \text{ kW/cm}^2$ ,  $\lambda_0 = 594,1 \text{ nm}$ , linear polarisiert ; Bildgröße  $16\mu\text{m} \times 16\mu\text{m}$ ; Bildaufnahme zeilenweise von unten nach oben)

Dabei kommt (A), verschwindet (B) oder kommt und verschwindet (C) das Fluoreszenzsignal während des Scanvorgangs von einer zur nächsten Detektionszeile.

Als weiterer Einzelmolekülnachweis kann die von der Orientierung der Anregungspolarisation abhängige Intensität der Einzelmolekülfluoreszenz dienen („ $\cos^2$ -Abhängigkeit,): Die Übergangswahrscheinlichkeit und damit die detektierbare Fluoreszenzintensität einzelner Moleküle hängt von der Orientierung ihres Übergangsdipolmoments relativ zur Polarisationsrichtung des Lasers ab. Der Zwischenwinkel zwischen beiden Vektoren ist  $\Theta$ . Liegen beide Vektoren parallel, erwartet man nach der Gleichung in Abbildung 7.9 ein maximales, im orthogonalen Fall gar kein Signal. Die Projektion der Orientierungen der Moleküle eines Fluoreszenzbildes auf die Glasoberfläche sollte in erster Näherung gleichverteilt in alle Richtungen der Ebene sein. Jedes Bild sollte daher verschieden helle Spots aufweisen. Mit der Drehung der Polarisationsrichtung des Anregungslasers erwartet man für jedes Molekül eine Veränderung des Fluoreszenzsignals je nach Orientierung der Projektion des Übergangsmoments auf die Ebene der Glasoberfläche. Abbildung 7.9 zeigt die Bilderserie eines Probenausschnitts, bei dem die Orientierung des Polarisationsvektors durch sukzessives Verstellen der  $\lambda/2$ -Platte um  $30^\circ$  in einer Richtung verändert wird. Drei wahllos herausgegriffene, mit Pfeilen markierte Punkte erscheinen zunächst mit maximaler Leuchtkraft ( $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ), verlieren an Intensität ( $60^\circ$ ) und sind optisch kaum mehr wahrnehmbar, wenn der Polarisationsvektor um  $90^\circ$  weitergedreht ( $90^\circ$ ,  $120^\circ$ ) wird. Danach nimmt ihre Intensität wieder zu ( $150^\circ$ ).

### 7.3 Sättigungsverhalten und Photostabilität von Fluoreszenzfarbstoffen: Cy5 in verschiedenen Matrizen und TDI in PVB

Das Sättigungsverhalten der Fluoreszenz einzelner Moleküle ist in Kapitel 2.1.4 theoretisch erläutert worden. Es ist letztendlich Resultat der dort angestellten kinetischen Betrachtung zum Dreiniveausystem. In einem solchen Dreiniveausystem kann (mit Hilfe der Gleichungen (2-29) bis (2-32)) die Variation der gemessenen Fluoreszenzintensität  $F$  ( $F$  Produkt aus detektierter Fluoreszenzrate  $R_F^e$  und Beleuchtungszeit  $\Delta t$ ) mit der Laserleistung  $I$  wie folgt beschrieben werden:

$$F = \frac{R_F^e (I \rightarrow \infty) \Delta t}{1 + \frac{I_s}{I}}$$

Dabei ist  $I$  die Laserleistung und  $I_s$  die Sättigungsleistung. Die gemessene Fluoreszenzrate  $R_F^e$  ist das Produkt der vom Molekül abgestrahlten Fluoreszenzrate mit der Detektionseffizienz  $x$  ( $x_{\text{det}} = 2\%$  [239]) des mikroskopischen Aufbaus und dem Verstärkungsfaktor  $f$  der MCP der CCD-Kamera ( $f = 0,26$  für Verstärkung Null [240]).  $R_F^e (I \rightarrow \infty)$  und  $I_s$  können nach Gleichung (2-31) bzw. (2-32) berechnet werden. Bei den experimentell untersuchten Fluoreszenzfarbstoffen TDI und Cy 5 ergeben sich mit den in Klammern angegebenen photophysikalischen Größen [241], die in Kapitel 2.1.4 zusammen mit den Gleichungen (2-30) und (2-32) eingeführt wurden, folgende Ergebnisse: TDI ( $\Phi = 1$ ;  $\sigma = 3\sigma_0(633 \text{ nm}) = 5,8 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$  [242];  $k_{23} = 2,0 \cdot 10^4 \text{ Hz}$ ;  $k_{31}^{-1} = 50 \mu\text{s}$ ;  $k_{21}^{-1} = 3,3 \text{ ns}$  ( $10^{-5} \text{ M}$  in  $\text{CHCl}_3$ ),  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ) weist einen errechneten Wert für die Fluoreszenzrate von  $R_F^e (I \rightarrow \infty) = 7,0 \cdot 10^5 \text{ cts/s}$  und für die Sättigungsintensität von  $I_s = 130,0 \text{ kW/cm}^2$  auf. Bei Cy5 ( $\Phi = 0,3$ ;  $\sigma = 3\sigma_0(633 \text{ nm}) = 5,7 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2$  [242];  $k_{\text{isc}} = 1,0 \cdot 10^4 \text{ Hz}$  [241];  $k_{31}^{-1} = 120 \mu\text{s}$  [241];  $k_{21}^{-1} = 1,5 \text{ ns}$  ( $10^{-5} \text{ M}$  in  $\text{EtOH}$ );  $\lambda_L = 633 \text{ nm}$ ) errechnen sich die Fluoreszenzrate zu  $R_F^e (I \rightarrow \infty) = 3,7 \cdot 10^5 \text{ cts/s}$  und die Sättigungsintensität  $I_s = 38,0 \text{ kW/cm}^2$ .

Zur experimentellen Bestimmung von  $R_F^e (I \rightarrow \infty)$  und  $I_s$  werden Einzelmolekülproben in Polymer (TDI bzw. Cy5 in PVB) und in wässrigem Medium (Cy5 in Agarose-Filmen mit den pH-Werten 9,5, 7 und 4,5, die analog zu PVB-Filmen durch Spincoating mit 1%-Agarose-Lösung präpariert werden) untersucht. Sie werden mit variabler Laserintensität zwischen  $I=2,4 \text{ kW/cm}^2$  und  $I=100 \text{ kW/cm}^2$  in einem Spotdrehmesser von  $4 \mu\text{m}$  angeregt. Die Detektionszeit beträgt  $\Delta t=5 \text{ ms}$ . Pro Laserleistung werden 25 Moleküle jeder Einzelprobe untersucht. Nach Subtraktion des Untergrundes wird die Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Fluoreszenzspots integriert. Die so erhaltenen Fluoreszenzintensitäten werden als akkumulierte Häufigkeit dargestellt. Daraus wird- wie am Beispiel in Abbildung 7.13 beschrieben - die Wahrscheinlichkeits-Dichtefunktion samt Mittelwert  $\langle F \rangle$  der Intensitätsverteilung ermittelt. Der Fehler von  $F$  wird so definiert, daß 2/3 der Meßwerte innerhalb des Fehlerbalken zu liegen kommen. Dies entspricht der empirische Einführung des Fehlers in Anlehnung an die Eigenschaft der Standardabweichung bei Gaußfunktionen in Zufallsexperimenten.

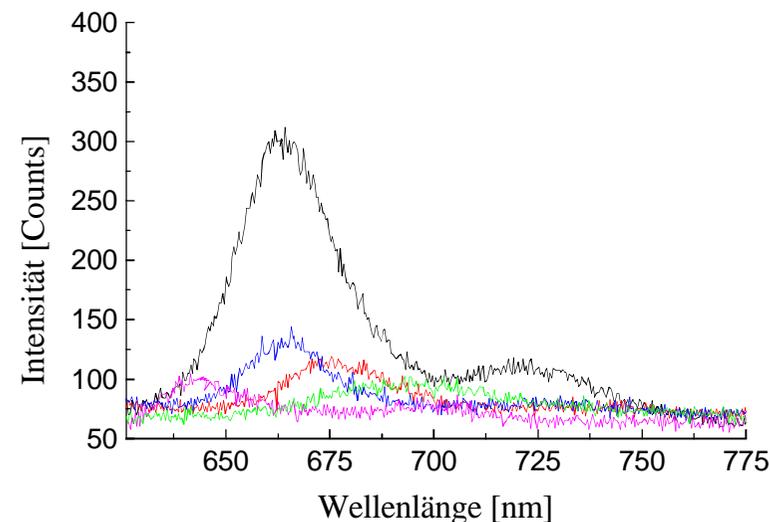
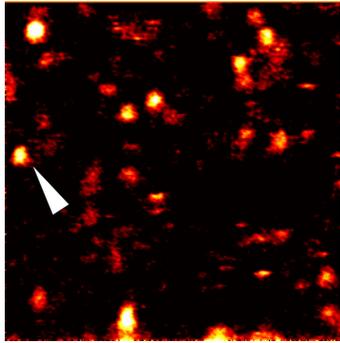


Abbildung 7.10 Verschiedene Einzelmolekülspektren im Vergleich zum Ensemble (Die Anregungsleistung ( $I_0 = 594.1 \text{ nm}$ , linear polarisiert) der Spektren beträgt  $5.80 \text{ kW/cm}^2$  über einen Scanvorgang von 600 Sekunden (Ensemble) bzw.  $0.646 \text{ kW/cm}^2$  über 100 Sekunden (einzelne Moleküle).)

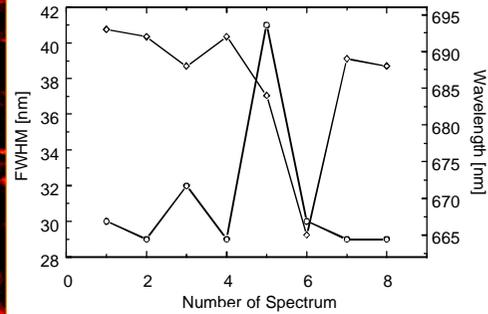
Im Vergleich zu den Einzelmolekülspektren ist das Ensemblespektrum ( $I_{\text{max}} = 663 \text{ nm}$ ;  $\text{FWHM} = 36 \text{ nm}$ ) noch stärker inhomogen verbreitert. Einzelmolekülspektren sind farbig. Ihre Hauptmaxima und Halbwertsbreiten (FWHM) werden in Klammern angegeben ( $I_{\text{max}}(\text{grün}) = 693 \text{ nm}$ ,  $\text{FWHM} = 28 \text{ nm}$ ;  $I_{\text{max}}(\text{rot}) = 676 \text{ nm}$ ,  $\text{FWHM} = 26 \text{ nm}$ ;  $I_{\text{max}}(\text{blau}) = 664 \text{ nm}$ ,  $\text{FWHM} = 24 \text{ nm}$ ;  $I_{\text{max}}(\text{magenta}) = 643 \text{ nm}$ ,  $\text{FWHM} = 22 \text{ nm}$ ).

Etwa 5 bis 10% aller TDI-Moleküle zeigten im Bereich niedriger Anregungsleistungen ( $P < 10 \text{ kW/cm}^2$ ;  $\lambda_0 = 594.1 \text{ nm}$ ) spektrale Shifts. Die Lage des Hauptmaximums in den einzelnen Fluoreszenzspektren verschob sich zwischen den einzelnen Spektren, die in gleichlangen Zeitfenstern von 10 bis 100 Sekunden aufgenommen wurden. Dieses auch als *spektrale Diffusion* bezeichnete Verhalten ist eine weitere typische Einzelmoleküleigenschaft. Sie kann verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise können photoinduzierte oder thermisch induzierte Umgebungsänderungen für die sich dynamisch verändernde spektrale Position verantwortlich sein. Abbildung 7.11 zeigt das spektrale Wanderungsverhalten eines Einzelmoleküls. Eine ausführliche Beschreibung des Experiments findet sich in [226].

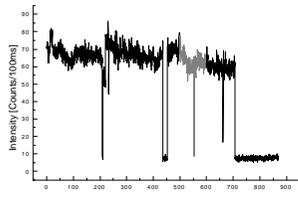
A



B



C



D

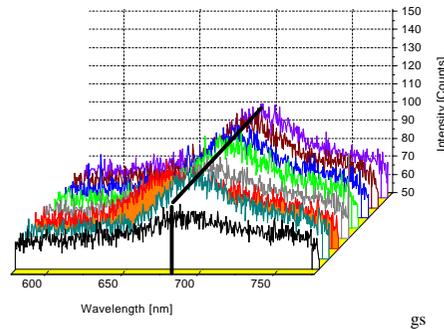


Abbildung 7.11 Spektraler Shift eines einzelnen Moleküls von  $\lambda_1 = 693 \text{ nm}$  nach  $\lambda_1 = 665 \text{ nm}$  und zurück - nach [226] (Anregungsbedingungen:  $3.64 \text{ kW/cm}^2$  für Spektren und Zeitspur,  $7.27 \text{ kW/cm}^2$  zur Bildaufnahme,  $\lambda_0 = 594.1 \text{ nm}$ , linear polarisiert,  $100 \text{ s}$  als Zeitfenster der Spektrenaufnahme)

Die Fluoreszenzspektren (D) zeigen die einzelnen spektralen Sprünge des mit Pfeil markierten Moleküls (A). Aber nicht nur Shifts der Maxima zwischen  $665 \text{ nm}$  und  $693 \text{ nm}$  (Rauten in B), sondern auch große Halbwertsbreiten (FWHM) zwischen  $29 \text{ nm}$  und  $41 \text{ nm}$  treten auf (Kreise in B). Spektrale Fluktuationen und Intensitätsfluktuationen in der simultan detektierten Fluoreszenzzeitpur (C) sind korrelierbar.

Eine weitere Möglichkeit des Einzelmolekülnachweises ist die Fluoreszenzautokorrelationspektroskopie (vergleiche auch Kapitel 2.1.5). Für dieses Experiment nimmt man die Fluoreszenz als Funktion der Zeit auf. Dabei wird das Signal der APD nicht über den Photoncounter ausgelesen, sondern über eine Korrelatorkarte (ALV-5000). Diese Karte erstellt automatisch die Korrelationsfunktion  $g^{(2)}$  der Intensität des Fluoreszenzlichts. Diese Korrelationsfunktion wurde in Kapitel 2.1.5 eingeführt (Gleichung (2-52)). Sie ermöglicht es, Triplettlebensdauern für einzelne TDI-Moleküle zu bestimmen. Die leistungsunabhängige Triplettlebensdauer liegt bei TDI im Mittel bei  $50 \mu\text{s}$  (vergleiche Abbildung 7.12). Das experimentelles Vorgehen der Wertebestimmung kann im Detail bei G. Jung eingesehen werden [238].

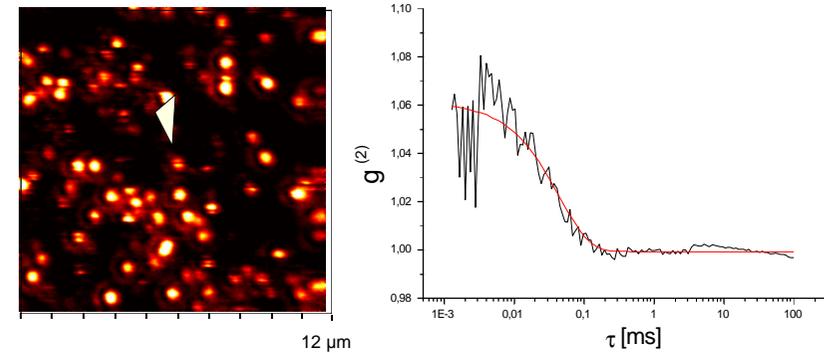


Abbildung 7.12 Intensitätsautokorrelationsfunktion  $g^{(2)}(\tau)$  der Fluoreszenzemission eines einzelnen TDI-Moleküls (mit Pfeil im Bild links markiert) bei Raumtemperatur (Anregungsbedingungen:  $3.64 \text{ kW/cm}^2$ ; Aufnahmedauer  $30 \text{ s}$ ;  $\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$ , linear polarisiert)  
Der Fit liefert eine Triplettlebensdauer von  $k^{-1} = 44 \mu\text{s} \pm 4 \mu\text{s}$ . Der asymptotische Grenzwert für unendlich große Leistungen beträgt  $k^{-1} = 50 \mu\text{s} \pm 8 \mu\text{s}$  (Kurve hier nicht abgebildet).

wurde in Gleichung (2-33) hergeleitet. Sie wird experimentell bestimmt, indem man die An-Zeit vieler Moleküle (15 bis 25 Moleküle je Leistung und Probe) bis zum Photobleaching wieder bei variabler Leistung bestimmt. Gegen die in der Messung von Bilderserien mit Zeitfenstern von  $\Delta t = 10\text{ms}$  bestimmten An-Zeiten  $t$  wird wieder für jede Leistung und jede Probe die akkumulierte Häufigkeit aufgetragen. Abbildung 7.16 zeigt exemplarisch eine Bilderserie zur Bestimmung von  $t$ .

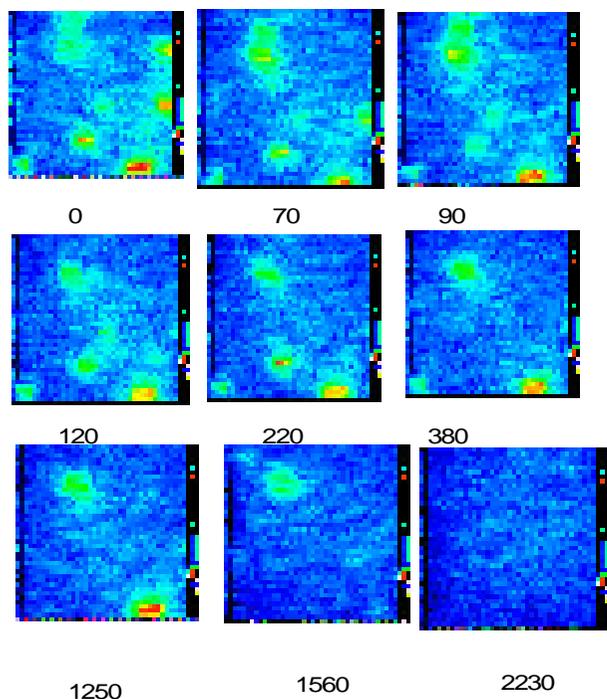


Abbildung 7.16 Ausschnitt zur Bestimmung von An-Zeiten in einer Probe von Cy5 in PVB ( $I = 100 \text{ kW/cm}^2$ ,  $\Delta t = 10 \text{ ms}$ )

Dargestellt sind die Bilder bei denen ein Molekül irreversibel ausgebleicht ist, also zum ersten Mal kein Fluoreszenzsignal mehr zeigt. Unterhalb jedes Bildes ist die An-Zeit des gerade erloschenen Moleküls in ms angegeben.

Die Kurve der akkumulierten Häufigkeiten  $n$  aufgetragen gegen  $t$  wird mit der folgenden Integralfunktion des exponentiellen Zerfalls gefittet:

$$n = -At e^{-\frac{t}{\tau}} + C$$

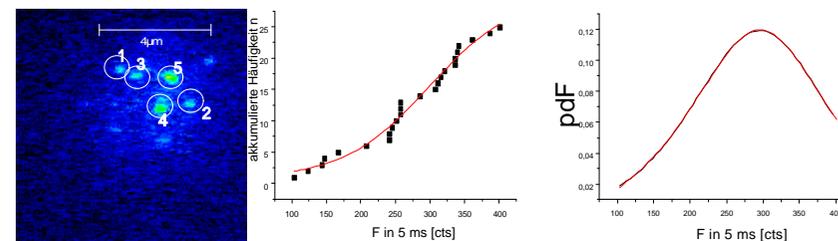
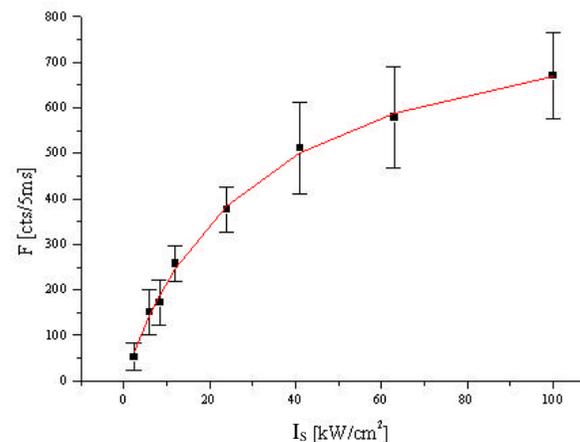


Abbildung 7.13 Verteilung der Intensitäten ( $\langle F \rangle = 270 \pm 100 \text{ cts/5ms}$ ) einzelner Cy5-Moleküle in dünnen Schichten aus 1%-Agarosegel ( $I = 24 \text{ kW/cm}^2$ ;  $\Delta t = 5\text{ms}$ )

Das Fluoreszenzbild links zeigt 5 Cy-Moleküle (eingekreist und nummeriert) mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Die Intensität jedes Spots wurde nach Abzug des Untergrundes durch Integration ermittelt.

Die akkumulierte Häufigkeit  $n(I)$  der Intensität von 25 Molekülen (schwarze Punkte im Graphen in der Mitte) ist gegen die Intensität aufgetragen. Die Kurve ist als Sigma-Funktion (rote Linie) gefittet. Die Ableitung von dieser Fitfunktion ergibt die Dichtefunktion  $\text{pdf}$  (schwarze Linie im Graphen rechts), wenn man die Fläche dieser Funktion auf  $A=1$  normiert (Flächenberechnung durch Gaußfit, rote Linie im Graphen rechts). Diese Dichtefunktion zeigt die Verteilung der Intensitäten von Cy5-Einzelmolekülen, die mit einer bestimmten Laserleistung in einem bestimmten Zeitfenster erhalten wurde ( $I = 24 \text{ kW/cm}^2$ ;  $\Delta t = 5\text{ms}$ ).

Alle so erhaltenen Erwartungswerte  $\langle F \rangle$  aller Einzelmolekülproben werden, kurz als  $F$  bezeichnet, gegen die jeweilige Laserleistung  $I$  aufgetragen. Die erhaltenen Kurven werden mit der oben dargestellten Gleichung gefittet. Der Fit liefert die Fluoreszenzrate  $R_F$  ( $I \rightarrow \infty$ ) und die Sättigungsintensität  $I_S$  für TDI in PVB bzw. Cy5 in PVB und Agarose bei verschiedenen pH-Werten. Sie sind in Abbildung 7.14 zusammen mit den Sättigungskurven dargestellt.



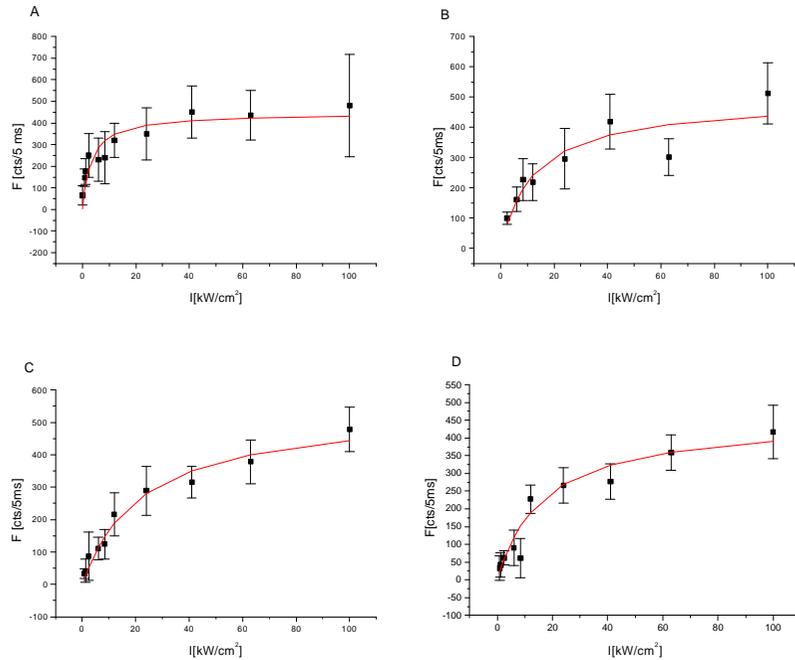


Abbildung 7.14 Sättigungskurven von TDI in PVB und von Cy5 in verschiedenen Matrizen

auf der vorherigen Seite: Sättigungskurve von TDI in PVB (Fit:  $\chi^2 = 140$ ;  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 175000 \pm 690$  cts/s;  $I_S = 31 \pm 2$  kW/cm<sup>2</sup>)

auf dieser Seite: Sättigungskurven von Cy5 a) in PVB (Fit:  $\chi^2 = 3497$ ;  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 91000 \pm 7000$  cts/s;  $I_S = 3.1 \pm 3$  kW/cm<sup>2</sup>), b) in Agarose bei pH = 7 (Fit:  $\chi^2 = 3642$ ;  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 98000 \pm 12000$  cts/s;  $I_S = 15 \pm 5$  kW/cm<sup>2</sup>), c) in Agarose bei pH = 4,5 (Fit:  $\chi^2 = 745$ ;  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 110000 \pm 8000$  cts/s;  $I_S = 25 \pm 5$  kW/cm<sup>2</sup>) und d) in Agarose bei pH = 9,5 (Fit:  $\chi^2 = 695$ ;  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 91000 \pm 7000$  cts/s;  $I_S = 18 \pm 3$  kW/cm<sup>2</sup>)

Bei TDI liegt der gemessene Maximalwert der Fluoreszenzrate bei  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 1,8 \cdot 10^5$  cts/s etwa um den Faktor vier niedriger als der berechnete Wert. Die exakte gleiche Abweichung um Faktor vier tritt auch bei allen Meßergebnissen von Cy5 (Maximalwert der Fluoreszenzrate bei allen vier Messungen im Bereich von  $R_F^e(I \rightarrow \infty) = 1 \cdot 10^5$  cts/s.) im Vergleich zum berechneten Ergebnis auf. Auch in der Literatur findet man bei anderen Farbstoffen systematisch zu kleine Ergebnisse [29]. Berücksichtigt man, daß eine große Zahl von photophysikalischen Parametern in die Rechnung eingehen, und daß nur ein einfaches Modell (Dreinevensystem) einem recht komplexen Sachverhalt zu Grunde gelegt wurde, erscheint das Ergebnis als Größenordnungsangabe als befriedigend. Als Aussagen können gewonnen werden:

- 1) TDI liefert etwa  $10^5$  bis  $10^6$  cts/s als Sättigungsmaximalwert der Fluoreszenzrate. Cy5 etwa die Hälfte des Wertes für TDI.
- 2) Cy5 zeigt dabei gleiches Verhalten in verschiedenen Matrizen (polares Polymer und im wäßrigen Medium bei variablem pH zwischen 4,5 und 9,5).

Die gemessene Sättigungsintensität  $I_S$  ist im Vergleich zur Rechnung um Faktor vier (TDI:  $I_S = 31$  kW/cm<sup>2</sup>) bis zwei (Cy5 im Mittel über alle Messungen  $I_S = 15$  kW/cm<sup>2</sup>) zu klein. Möglicherweise ist die Wahl des Zeitintervalls von  $\Delta t = 5$  ms bei großen Leistungen bereits zu groß, so daß Dunkelzustände auftreten (Blinking oder Off), die zu kleine Intensitätserwartungswerte, damit zu kleine Maxima der Fluoreszenzraten (im Vergleich zur Rechnung) und zu kleine Sättigungsintensitäten verursachen.

Die Wahl des Zeitintervalls zur Bestimmung von Erwartungswerten  $\langle F \rangle$  ist, wie sich im Experiment mit größeren Zeitintervallen als 5 ms zeigte, nur bei kleinen Leistungen ohne Belang. Hier zeigt sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $\Delta t$  und  $\langle F \rangle$  (rote Kurve in Abbildung 7.15), der mit zunehmender Laserleistung  $I$  nur mehr bei kurzen Zeitfenstern auftritt (schwarze Kurve in Abbildung 7.15).

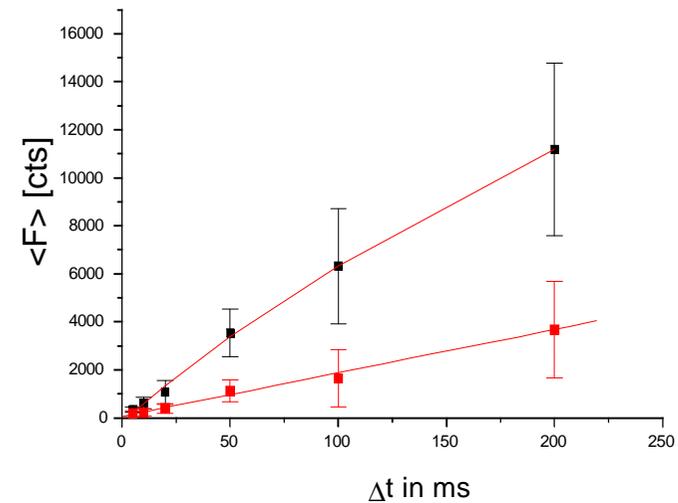


Abbildung 7.15 Mittelwerte der Intensitäten einzelner Cy5-Moleküle in dünnen Schichten aus 1%-Agarosegel ( $I = 2,4$  kW/cm<sup>2</sup> und  $I = 24$  kW/cm<sup>2</sup>) in Abhängigkeit von der Detektionszeit  $\Delta t$ .

Nur bei kleinen Intensitäten (roter Graph) zeigt das  $\Delta t$ -I-Diagramm in etwa linearen Verlauf. Anhand der Geradensteigung kann dann eine mittlere Intensität pro Zeiteinheit angegeben werden (hier: 18 cts/ms). Bei größeren Intensitäten findet sich eine deutliche Abweichung vom linearen Verhalten (schwarzer Graph).

Das Auftreten von Dunkelzuständen wird im Kapitel 2 und in der Literatur [29] in simpler Betrachtung einem vierten Niveau zugeschrieben, das für Photobleichen „verantwortlich ist“. Blinking wird in diesem Modell vernachlässigt. Die Quantenausbeute  $\phi$  des Photobleichings

durchgeführt, um zu sehen, mit welcher Probenpräparation einzelne Farbstoffmoleküle im Zellkern nachweisbar sind. Abbildung 7.19A zeigt solche HeLa-Zellen (Durchlichtbilder in grau insertiert), die mit etwa einer Million Farbstoffmolekülen besetzt waren. Es wurden 5  $\mu\text{l}$  einer Stammlösung von  $10^5$  mol/l auf ein Well des Objektträgers gegeben, dieser dann mit einem Objektträgerdeckgläschen belegt. Man erkennt in den rot colorierten Fluoreszenzbildern, daß der Antikörper weitgehend im Zellkern landet. Hier ist die Fluoreszenz viel stärker als im Cytoplasma, wo nur relativ wenig Farbstoff steckenblieb. Die Fluoreszenzzeitspur (aufgenommen an beliebiger Stelle im Zellkern des mittleren Bildes) zeigt exponentielles Bleichverhalten der Fluoreszenzintensität mit der Detektionszeit.

Durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  einer Stammlösung von  $10^{10}$  mol/l auf ein Well des Objektträgers konnten Zellproben erzeugt werden, an denen der Einzelmolekülnachweis von Cy5 gelang.

Die Fluoreszenzzeitspur eines Cy5-Moleküls in der Zelle zeigt Abbildung 7.19B. Man erkennt das digitale Ein- und Ausschalten der Fluoreszenz (On und Off). Das Signal liegt bei etwa 250 a.u., der Untergrund bei etwa 100 a.u. Die Ausschläge zu 0 sind Artefakte der Versuchsdurchführung: Die Messung schaltete nach 20 s automatisch ab und mußte neu gestartet werden. Zur zweifelsfreien Identifikation des Farbstoffs wurde sein Fluoreszenzspektrum simultan zur Zeitspur aufgezeichnet.

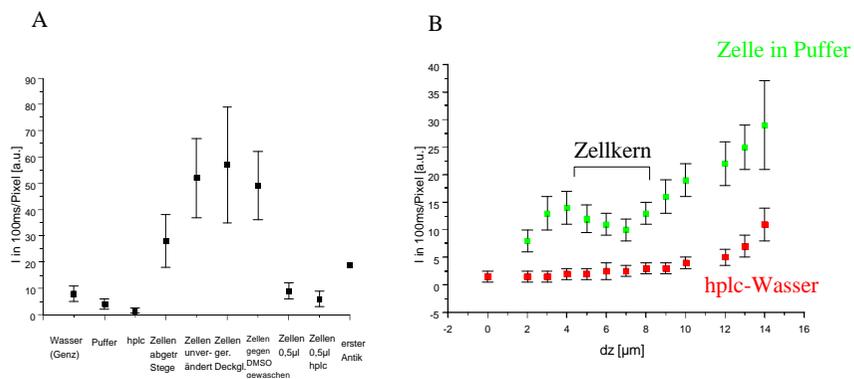


Abbildung 7.20 Messungen zum Untergrund in wässrigen Medien und in Zellen

A: Untergrundintensität je Pixel unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (genaue Erläuterung im Text)

B: Untergrundintensität  $I$  in Abhängigkeit vom Arbeitsabstand von Objektiv zu Probe  $dz$ . Die rote Kurve zeigt den Anstieg von  $I$  mit Zunahme von  $dz$ . Bei Messungen in der Zelle tritt ein lokales Minimum dort auf, wo sich der Zellkern befindet.

In einem nächsten Schritt wurde die Wanderung von Cy5-IgG in permeabilisierte HeLa-Zellen in wässriger Umgebung verfolgt. Als Vorversuch hierzu wurde der Fluoreszenzuntergrund in reinen Zellen untersucht. Dazu wurden zunächst einfache wässrige Proben als Referenz mit einer bestimmten Laserleistung ( $P = 1,0 \text{ kW/cm}^2$ ;  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) beleuchtet, dann verschieden präparierte Zellen. Abbildung 7.20A zeigt die durchschnittliche Intensität des Untergrundes (über dem elektronisch bedingten Anteil) je Pixel in 100 ms Detektionszeit. Man erkennt, daß

Dabei ist  $C$  die Gesamtzahl der in einer Meßserie je Probe und Leistung untersuchten Moleküle. Das schließt auch solche ein, die nicht innerhalb einer Bilerserie ausgegangen sind.  $C$  wird dem Fit vorgegeben.  $A$  ist ein Fitparameter.  $\tau$  ist die Halbwertszeit des exponentiellen Zerfalls. Dieser Wert ist ein Maß für die Lebensdauer des Bleichniveaus  $B$  in Kapitel 2.1.5. Abbildung 7.17 zeigt exemplarisch die Bestimmung von  $\tau$ .

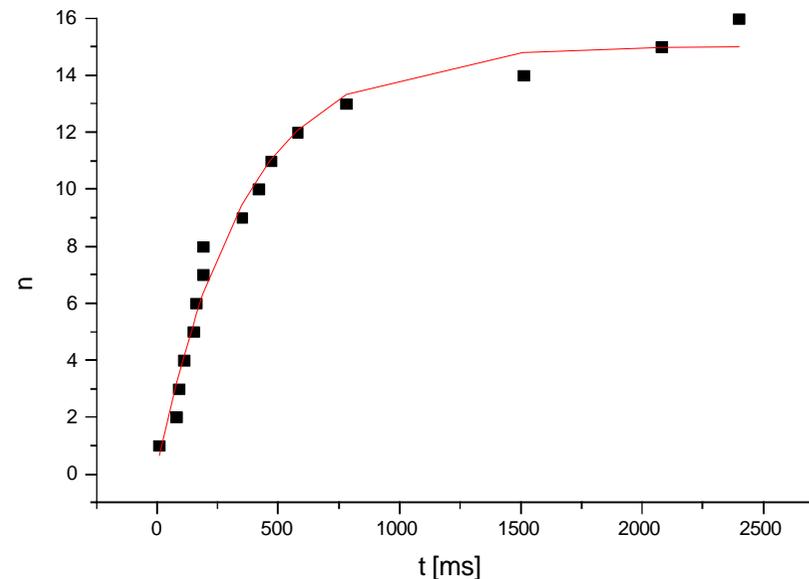


Abbildung 7.17 Bestimmung von  $\tau$  im  $n$ - $t$ -Diagramm am Beispiel der Messung von Cy5 in PVB ( $I = 100 \text{ kW/cm}^2$ , 15 Moleküle untersucht)

Die akkumulierte Häufigkeit  $n(t)$  wird mit der im Text beschriebenen Integralfunktion zur Bestimmung von  $\tau$  gefittet ( $\tau = 360 \pm 40 \text{ ms}$ ;  $A = 0,04 \pm 0,004$ ;  $C = 15$ ).

Alle zu einer Probe experimentell ermittelten Werte für  $\tau$  werden gegen die jeweilige Leistung  $I$  aufgetragen. Der asymptotische Wert  $\tau(I \rightarrow \infty)$  wird bestimmt. Hierbei bieten sich verschiedene Funktionen an, die äquivalente Lösungen liefern. Wesentliches Kriterium für die Wahl der Funktion ist lediglich das asymptotische Verhalten im Unendlichen. Die hier eingesetzte Funktion war die des einfachen exponentiellen Zerfalls. Die ermittelten Werte  $\tau(I \rightarrow \infty)$  für alle Proben zeigt Abbildung 7.18.

für jeden Wert von  $\tau(I \rightarrow \infty)$  die Zahl der emittierten Fluoreszenzphotonen  $n^F$  des Farbstoffes in seiner jeweiligen Matrix bis zum Photobleichen bestimmt werden. Auf Grund der relativ großen Ungenauigkeit der graphischen Bestimmung von  $\tau(I \rightarrow \infty)$  können größenordnungsmäßig nur folgende Aussagen gemacht werden:

- 1) TDI ist wesentlich stabiler als Cy5 und weist einen Wert von  $n^F = 10^9 - 10^{10}$  auf.
- 2) Cy 5 zeigt unabhängig von Matrix und pH einen Wert von  $n^F = 10^6 - 10^8$  emittierter Photonen.

#### 7.4 Einzelmolekülnachweis in Zellen: IgG-Cy5 in lysierten HeLa-Zellen

Die ersten Versuche, Cy5 in Zellen nachzuweisen, wurden mit permeabilisierten (lysierten) HeLa-Zellen durchgeführt (zur Präparation siehe Kapitel 6.4), in denen Cy5-IgG bereits im Zellkern gebunden vorlag. Die Proben waren von M. Ried mit einem Deckgläschen bedeckt und in einem sog. Mounting-Medium fixiert worden. Es wurden Konzentrationsreihen

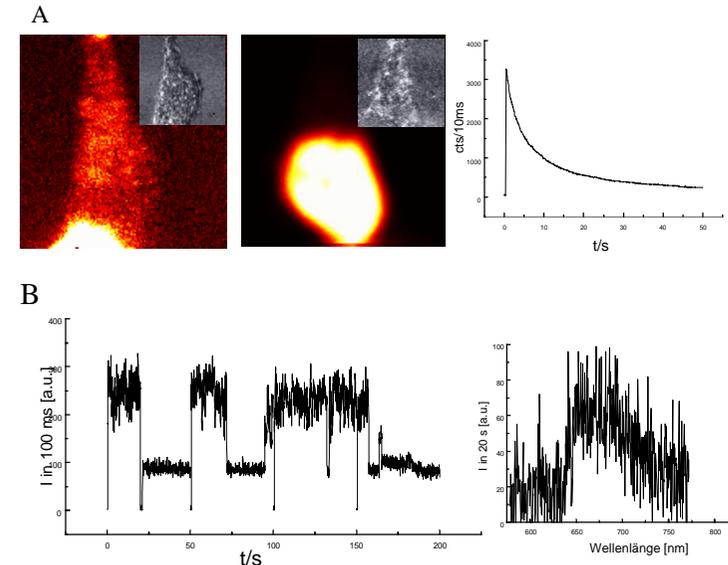


Abbildung 7.19 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen an permeabilisierten HeLa-Zellen unter Mounting Medium mit Cy5-IgG

A: Hochbelegte Probe (ca.  $10^6$  Moleküle je Zelle)

IgG-Cy5 reichert sich im Zellkern der HeLa-Zellen an, im Cytoplasma findet sich nur wenig Farbstoff (Durchlichtbilder der beiden dargestellten Zellen in Fluoreszenzbilder grau insertiert). Das zeitliche Verhalten der Fluoreszenzintensität (aufgenommen in der Zelle des mittleren Bildes) zeigt exponentielles Bleichverhalten, wie es für hochkonzentrierte Proben typisch ist.

B: Einzelmolekülnachweis von Cy5 in HeLa-Zellen

Die Fluoreszenzzeitspur zeigt mehrere digitale Schaltprozesse (On und Off). Zur Identifikation des Farbstoffes wurde ein Cy5-Einzelmolekülspektrum simultan zur Zeitspur aufgenommen.

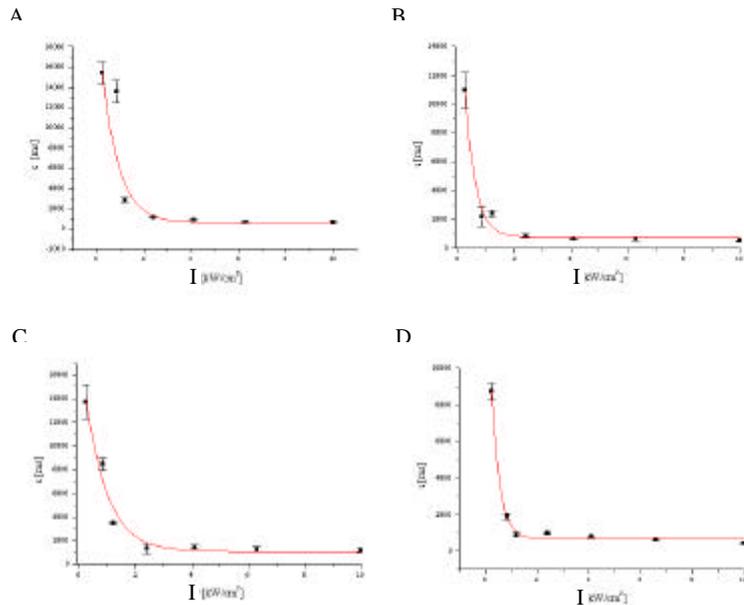
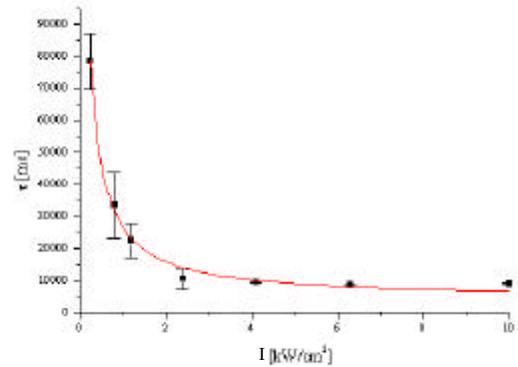


Abbildung 7.18 Bestimmung von  $\tau(I \rightarrow \infty)$  im I- $\tau$ -Diagramm

oben: Photostabilität von TDI in PVB (Fit:  $\chi^2 = 626000$ ;  $\tau_\mu = 9000 \pm 410$ )

unten: Photostabilität von Cy5 in PVB (A; Fit:  $\chi^2 = 170000$ ;  $\tau_\mu = 5500 \pm 15$ ), in Agarose bei pH = 7 (B; Fit:  $\chi^2 = 400000$ ;  $\tau_\mu = 770 \pm 320$ ), in Agarose bei pH = 4,5 (C; Fit:  $\chi^2 = 100000$ ;  $\tau_\mu = 1050 \pm 580$ ) und in Agarose bei pH = 9,5 (D; Fit:  $\chi^2 = 47000$ ;  $\tau_\mu = 700 \pm 100$ ).

## 7.5 Diffusion in wässrigem Medium und in Glycerol-Wasser-Mischungen

Voraussetzung für die Beobachtung der Wanderung einzelner fluoreszierender Moleküle in Zellen war es, die Diffusion solcher Moleküle in wässrigem Medium durch *SPT* (*Single Particle Tracking*) im Experiment beobachten und charakterisieren zu können. Dazu verfolgt man die Trajektorien der Moleküle, solange sie sich in der Fokalebene des Objektivs (mit einer Toleranz von  $\pm 1 \mu\text{m}$  in z-Richtung) aufhalten. Aus diesem Experiment erhält man einen Satz von Raum-Zeit-Koordinaten  $\{[x(t_i), y(t_i)], t_i\}$ , der die 2D-Projektion einer 3D-Trajektorie repräsentiert [112].  $t_i$  gibt dabei den Zeitpunkt der Beobachtung eines Koordinatenpaares  $[x(t_i), y(t_i)]$  an, das durch Auswertung (des zur Zeit  $t_i$  aufgenommenen) Bildes anhand der Intensitätsverteilung des Fluoreszenzspots eines einzelnen Moleküls bestimmt werden kann. Die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten durch SPT wird im folgenden genauer beschrieben.

### 7.5.1 Diffusionskoeffizientenbestimmung durch Single Particle Tracking

Abbildung 7.23 zeigt eine typische Bildersequenz ( $\Delta t = 60\text{ms}$  je Bild; keine Totzeit zwischen den Bildern; Raumtemperatur) eines diffundierenden Antikörpers (Cy5-IgG) in einer Glycerol-Wasser-Mischung (Massenverhältnis 1:1; Viskosität  $\eta = 10 \eta_{\text{H}_2\text{O}}$ ). Die Größe

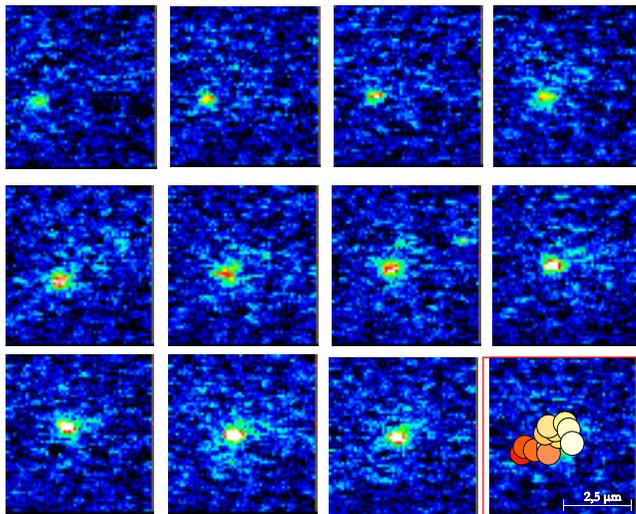


Abbildung 7.23 Bilderserie (nach Abzug des Untergrundes) einer Trajektorie eines Einzelmoleküls (Cy5-IgG) in einer Glycerol-Wasser-Mischung (Massenverhältnis 1:1) mit zehnfacher Viskosität im Vergleich zu reinem Wasser

Die Aufnahme eines Bildes benötigte  $\Delta t = 60 \text{ ms}$  (keine Verzögerungszeit zwischen den Bildern). Das letzte Bild zeigt die ganze Trajektorie schematisch.

reines hplc-Wasser (hplc) nahezu kein Signal zeigt, TRIS-Pufferlösungen (Puffer) des Genzentrums zeigten etwa dreifach erhöhte Werte, das „reine“ (!) demineralisierte Vorratswasser des Genzentrums (Wasser (Genz.)) nochmal doppelt so hohen Untergrund. Die in DMSO eingefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und jeder Objektträger wurde 15 Minuten lang in 100 ml TRIS-Puffer gelegt. Belegte man sie dann unverändert mit einem Objektträgerdeckgläschen (Zellen unverändert) und stellte die Probe auf eine Region im Zellkern der Zelle scharf, war der Untergrund bei gleicher Laserbestrahlung etwa fünffach im Vergleich zur Probe mit dem Wasser des Genzentrums erhöht. Die Reinigung der Deckgläschen in Aceton im Ultraschallbad (Zellen ger. Deckgl.) und der mehrmalige Austausch der Pufferlösung beim Waschen gegen DMSO (Zellen gegen DMSO gewaschen) vor Versuchsdurchführung brachten keine Verbesserung. Erst die gezielte Verringerung des Flüssigkeitsvolumens - zuerst durch Abtrocknen der mit Folie bedeckten Stege des Objektträgers (Zellen abgetr. Stege) und dann durch vollständiges Abnehmen der Flüssigkeit mit einer Mikropipette und Zugabe von  $0,5 \mu\text{l}$  TRIS-Puffer (Zellen  $0,5 \mu\text{l}$ ) bzw.  $0,5 \mu\text{l}$  hplc-Wasser (Zellen  $0,5 \mu\text{l}$  hplc) - brachte die entscheidende Verbesserung.

Da die Zelle aus physiologischen Überlegungen heraus unter gepufferter Umgebung gehalten werden muß (auf Grund von osmotischem Druck Platzen der Zellen in hplc-Wasser nach wenigen Minuten), mußte in allen Experimenten (auch später mit lebenden Zellen) TRIS-Puffer als Medium für Zellproben verwendet werden, obwohl der Untergrund hier nicht am niedrigsten ist. Das Signal eines Einzelmoleküls in Pufferlösung ist jedoch hoch genug, um auch in wässrigem Medium und in Zellen Cy5-Einzelmoleküle nachweisen zu können (erster Antik.).

Die Rolle des Flüssigkeitsvolumens bei der Erzeugung von Untergrund ist wie folgt erklärbar: Die Dicke des Flüssigkeitsfilms der Probe stellt im Prinzip den Abstand zwischen Objektiv und Zelle ein. Auf den Zellproben liegt das Deckgläschen dem Objektiv zugewandt, die Zellen sind auf dem Objektträger angewachsen, liegen also in bezug auf das Objektiv „jenseits des Flüssigkeitsfilms“. Liegt der Zellkern zu weit außerhalb des günstigsten Arbeitsabstandes des Objektivs, steigt der Untergrund an. Dies verdeutlicht eine weitere Messung, die auch Abbildung 7.20B dargestellt ist. Die rote Kurve zeigt den Anstieg des Untergrundes mit Zunahme des Abstandes in z-Richtung, ausgehend vom Deckgläschen in einer Probe mit reinem hplc-Wasser. Die grüne Kurve zeigt den analogen Versuch zur Untergrundmessung beim Schnitt in z-Richtung durch eine Zelle (Präparation mit  $0,5 \mu\text{l}$  Puffer). Man erkennt, daß ein leichtes lokales Minimum auftritt, wo der Zellkern beginnt (Kontrolle durch Konturen in Durchlichtbildserie; hier nicht gezeigt). Der Einzelmolekülnachweis im Zellkern sollte also etwas leichter sein als im Plasma.

Nachdem die optimale Probenpräparation für Zellen im wässrigen Medium gefunden war, wurde wieder der Einzelmolekülnachweis von Cy5 durchgeführt. Abbildung 7.21 zeigt den Nachweis eines Farbstoffmoleküls in einer HeLa-Zelle (Durchlichtbild von 4 Zellen links; Fluoreszenzbild in der Mitte). Auch in Zellen gab es Moleküle, die On, Off (Ende einer Bilderreihe mit insertierter Zeitspur rechts unten) oder Blinking (über ein Bild einer Serie; rechts oben mit insertierter Zeitspur) zeigten.

In permeabilisierten Zellen konnten auch erstmals diffundierende IgG-Moleküle beobachtet werden. Gezielte Diffusionsmessungen in lysierten Zellen wurden jedoch nicht durchgeführt, weil durch die Permeabilisierung der Membran die natürlichen physiologischen Bedingungen in so behandelten Zellen nicht mehr gegeben sind und die Interpretation von Ergebnissen daher nicht unbedingt neue Erkenntnisse über Diffusionsverhalten von Antikörpern in Zellen liefern kann.

In einigen recht effektvollen Experimenten konnte „live“ beobachtet werden, wie Antikörper-Moleküle einzeln an einer bestimmten Stelle im Zellkern ankommen und dort schließlich steckenbleiben. Ein solches Experiment als Abrundung dieses Abschnitts zeigt Abbildung 7.22.

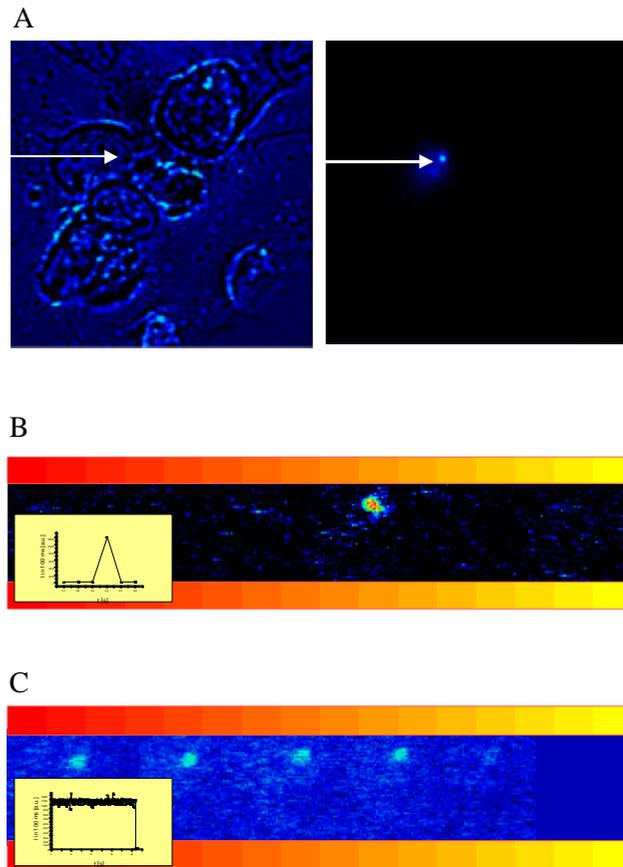


Abbildung 7.21 Einzelmolekülnachweis in Zellen in wässrigem Medium

A: Lokalisierung durch Aufnahme von Durchlichtbild zum Fluoreszenzbild. Dargestellt ist ein Durchlichtbild von vier HeLa-Zellen (links) und das korrespondierende Fluoreszenzbild mit Cy5-Einzelmolekülspot (rechts). Der Pfeil gibt die Lage des Cy5-Moleküls in der Zelle  
 B: blinkendes Cy5-Molekül (Ausschnitt der Bilderfolge; insertiert: Zeitspur)  
 C: Photobleichen eines Cy5-Moleküls (Ausschnitt der Bilderfolge; insertiert: Zeitspur)

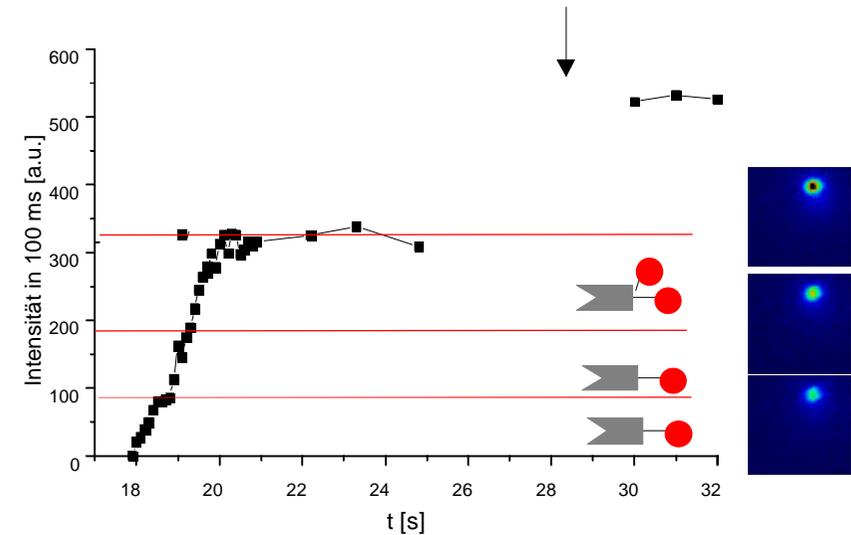


Abbildung 7.22 Ankommen einzelner IgG-Moleküle aus z-Richtung an einer Stelle im Zellkern einer HeLa-Zelle

Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit. Sie steigt zunächst kontinuierlich bis zur ersten roten waagrecht eingezeichneten Linie an, bleibt dort kurz konstant, steigt zur zweiten roten Linie an, bleibt wieder konstant, um nach einem weiteren Anstieg zur dritten roten Linie über mehrere Sekunden konstant zu bleiben. Nach Start einer neuen Messung ist das Signal auf ein noch höheres Niveau angestiegen. Der Interpretation nach kommen der Reihe nach zweimal einfach gelabelte Antikörper, deren Fluoreszenzintensität erst in der Detektionsebene maximal ist, und dann ein zweifach gelabelter Antikörper. Später sind noch zwei Farbstoffe mehr nachweisbar, was auf einen oder zwei neu angedockte IgG-Moleküle hinweist. Einzelne Bilder von Fluoreszenzspots der ersten drei durch rote Linien markierten Intensitätsniveaus sind rechts neben dem Graphen abgebildet.

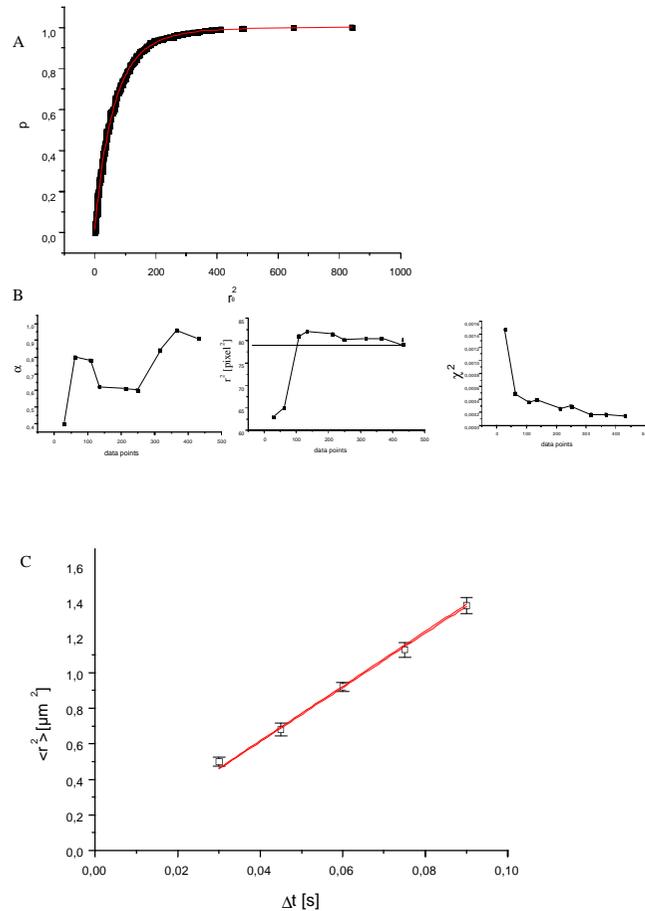


Abbildung 7.27  $p$ - $r^2$ -Diagramm zur Diffusion von IgG in Glycerol-Wasser-Mischung (1:1) (oben links) und  $\langle r^2 \rangle$ - $t$ -Diagramm von IgG in Glycerol-Wasser-Mischung (1:1)

Das  $p$ - $r^2$ -Diagramm resultiert aus 435 Datenpunktpaaren, bestimmt aus allen Cy5-IgG-Trajektorien im Zeitintervall von  $\Delta t = 60$  ms.

Aufgetragen ist die akkumulierte Häufigkeit  $g$  der einzelnen Werte  $r^2$  (square displacement, schwarze Kurve in A). Die Fitfunktion (rote Kurve) nach Gleichung(4-34) liefert die Werte  $\alpha = 0,90$ ,  $r_1^2 = 92,1 \text{ pixel}^2$  und  $r_2^2 = 90,0 \text{ pixel}^2$ . Die drei darunter eingezeichneten Kurven zeigen (jeweils mit ansteigender Zahl der Datenpunkte in B) den Abfall des Fitparameters  $\chi^2$  (rechts) mit der Zahl der Datenpunkte (oben), das konvergente Verhalten des Mittelwertes  $\langle r^2 \rangle$  (Mitte) und die Stabilisierung des Parameters  $\alpha$  in der Nähe von 1 (links). Die lineare Regression zum  $\langle r^2 \rangle$ - $t$ -Diagramm (schwarze Punkte in C) liefert einen Diffusionskoeffizienten von  $D = 3,8 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (ohne Oberflächeneffekt).

des Beleuchtungsflecks beträgt  $4 \mu\text{m}$  (Durchmesser). Der Untergrund ist in den Bildern (wie in allen folgenden Fluoreszenzbildern auch) abgezogen. Die Anzahl der Bilder in einer durchschnittlichen Trajektorie lag im Mittel bei  $\langle n \rangle = 6 \pm 2$  ( $\Delta t = 60$  ms). Der vom Laser beleuchtete Bereich wurde dabei gleichmäßig durchwandert (vergleiche Abbildung 7.24). Die Länge der Trajektorie scheint weniger vom Photobleichen des Farbstoffes als vom Verlassen des Detektionsvolumens in einer der drei Dimensionen abzuhängen. Die Probe in dieser Messung bestand aus einem Lösungsmittel-Tropfen (mit Cy5-IgG in einer Konzentration von  $10^{-9} \text{ mol/l}$ ), der auf einem Glasdeckgläschen aufgebracht unter gesättigter Atmosphäre gehalten wurde (zur experimentellen Durchführung vergleiche [237]). Die Fokalebene der Laseranregung und der Detektion lag etwa 10 bis  $20 \mu\text{m}$  (je nach Einzelversuch) oberhalb der Deckgläschenoberfläche, also 10 bis  $20 \mu\text{m}$  innerhalb des Tropfens. Zur Bestimmung eines Koordinatenpaares  $[x(t_i), y(t_i)]$  aus einem Einzelbild (aufgenommen zum Zeitpunkt  $t_i$ ) einer Trajektorie wurden die Koordinaten des Fluoreszenzmaximums des abgebildeten Fluoreszenzspots bestimmt. Dies geschah per Auge unter Verwendung des Steuerungsprogrammes Winview der CCD-Kamera, das  $x$ - und  $y$ -Querschnitte durch jede Bildzeile bzw. Bildspalte anzeigen kann. Die Zuordnung von einzelnen Spots einer Bilderserie (von maximal 250 Aufnahmen) zur gleichen Trajektorie erfolgte durch ein Maximalkriterium (vergleiche unten). Jede Trajektorie konnte als 2D-Projektion im  $x$ - $y$ -Diagramm auf ein Pixel ( $107 \text{ nm}$ ) genau bestimmt und geplottet werden. Durch Integration der Fluoreszenzspots konnten zugleich Zeitspuren zu den Bilderserien einer Trajektorie gewonnen werden. Abbildung 7.25 zeigt eine Mustertrajektorie mit Zeitspur.

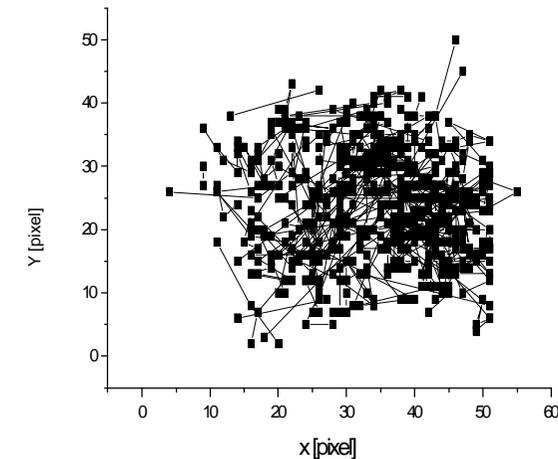


Abbildung 7.24 Schematische Darstellung der Trajektorien aller Bilderserien einer Messung ( $\Delta t = 30$  ms)

Die Abbildung zeigt qualitativ, daß alle Positionen des Beleuchtungsbereichs in etwa gleichmäßig überstrichen wurden.

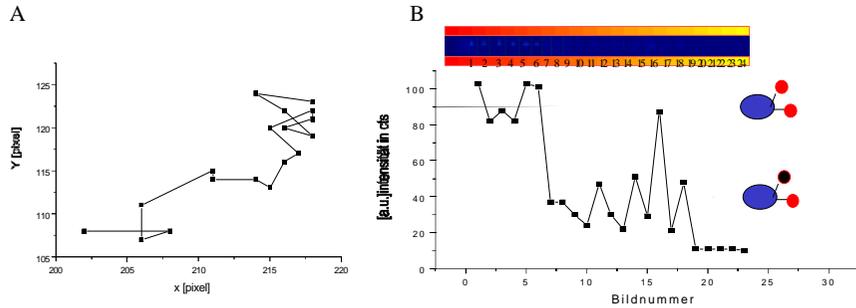


Abbildung 7.25 Schematische Trajektorie (A) und dazu ermittelte Intensitäts-Zeitspur (B) eines diffundierenden Cy-5-AAV-Moleküls in Wasser

Man erkennt das stufenweise Off der beiden Farbstofflabel an diesem AAV.

Aus den so erhaltenen Koordinatenpaaren zweier aufeinanderfolgender Bilder einer Trajektorie wurden nun die quadratischen Differenzen  $(\Delta x)^2$  und  $(\Delta y)^2$  gebildet und anschließend addiert  $((\Delta x)^2 + (\Delta y)^2 = r^2)$ . Gegen die einzelnen Werte  $r^2$  aller Trajektorien der Messung mit einem bestimmten Zeitintervall  $\Delta t$  wurde die akkumulierte relative Häufigkeit ihres Auftretens aufgetragen. Diese wurde dann analog zu Gleichung (4-39) mit folgender Funktion gefittet:

$$P(r^2, t) = 1 - [a \cdot e^{-\frac{r^2}{r_1^2}} + (1 - a) \cdot e^{-\frac{r^2}{r_2^2}}]$$

Diese Funktion beschreibt die Überlagerung von zwei verschiedenen Diffusionsbewegungen. Wenn freie Diffusion von nur einer Spezies gemessen wird, sollte sie mit Anstieg der Zahl der Meßwerte  $r^2$  nur mehr eine Komponente zeigen ( $\alpha \rightarrow 1$ ), der Mittelwert  $\langle r^2 \rangle = \alpha r_1^2 + (1 - \alpha) r_2^2$  (MSD; mean square displacement) sollte gegen einen Wert konvergieren, der Fehlerparameter  $\chi^2$  minimal werden. Trägt man alle zu den Zeitfenstern  $\Delta t$  erhaltenen Werte  $\langle r^2 \rangle$  gegen diese Zeitfenster auf, so erhält man gemäß Gleichung (4-34) den Diffusionskoeffizienten D des zu untersuchenden Makromoleküls durch lineare Regression (Näheres zu dieser Prozedur siehe unten).

### 7.4.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von IgG und AAV mit SPT

Nach dem Stokes-Einstein-Gesetz (4-37) konnten die Diffusionskoeffizienten der Moleküle IgG und AAV in wäßrigem Medium berechnet werden. Unter Annahme einer kugelförmigen Gestalt der beiden Moleküle (sinnvoll auch für Antikörper; vergleiche Kapitel 4.1.5, Abbildung 4.5) errechnen sich  $D = 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (mit  $a = 5 \text{ nm}$  für IgG) und  $D = 11 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (mit  $a = 13 \text{ nm}$  für AAV). Für Glycerol-Wassermischungen ergeben sich gemäß der steigenden

Viskosität  $\eta$  um Faktor 10 (Mischungsverhältnis 1:1) bzw. Faktor 100 (Mischungsverhältnis 5:1) erniedrigte D-Werte.

Mißt man in der Nähe von Glasoberflächen, reduziert sich die Viskosität von Flüssigkeiten drastisch. Erste Versuche zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten wurden mit kleinen Flüssigkeitsvolumina ( $V = 1 \mu\text{l}$ ), gepreßt zwischen zwei Glasdeckgläschen, durchgeführt. Die Auswertung der Trajektorien entlang der Glasoberfläche lieferten Werte von  $D = 1,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für IgG in Wasser und  $D = 0,12 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für AAV in Wasser. Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten für IgG dieser Meßserie zeigt Abbildung 7.26.

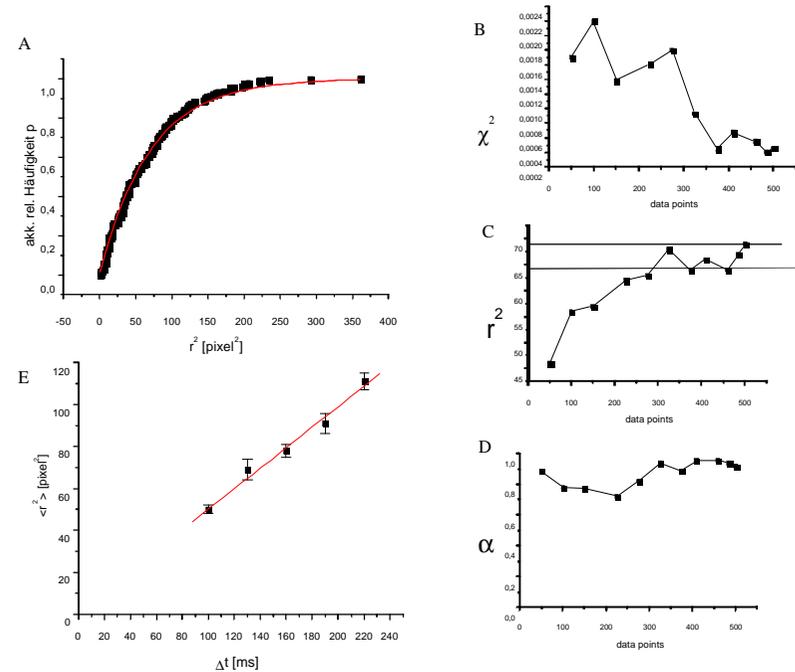


Abbildung 7.26  $p$ - $r^2$ -Diagramm zur Diffusion von IgG in wäßrigem Medium auf der Glasoberfläche (oben links) und  $\langle r^2 \rangle$ - $t$ -Diagramm von IgG in wäßrigem Medium

Das  $p$ - $r^2$ -Diagramm (A) wurde erhalten aus 501 Datenpunktpaaren, bestimmt aus allen Cy5-IgG-Trajektorien im Zeitintervall von  $\Delta t = 130 \text{ ms}$ .

Aufgetragen ist die akkumulierte Häufigkeit  $p$  der einzelnen Werte  $r^2$  (square displacement, schwarze Kurve). Die Fitfunktion (rote Kurve) nach Gleichung (4-34) liefert die Werte  $a=0,92$ ,  $r_1^2 = 69,8 \text{ pixel}^2$  und  $r_2^2 = 69,0 \text{ pixel}^2$ . Die rechts klein eingezeichneten Kurven zeigen (jeweils mit ansteigender Zahl der Datenpunkte) die Verbesserung des Fitparameters  $\chi^2$  mit der Zahl der Datenpunkte (B), das konvergente Verhalten des Mittelwertes  $\langle r^2 \rangle$  (C) und die Stabilisierung des Parameters  $a$  in der Nähe von 1 (D).

Die lineare Regression zum  $\langle r^2 \rangle$ - $t$ -Diagramm (schwarze Punkte in E) liefert einen Diffusionskoeffizienten von  $1,2 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , der die langsamere Diffusion durch den Oberflächeneffekt anzeigt.

Die überwiegende Mehrzahl (54%) der untersuchten Viren trat mit der Zellmembran erfolglos in Kontakt („negatives Andocken“). Diese Viren erreichten zwar die Membran, liefen vielfach auch an ihr entlang oder stießen immer wieder an ihr an. Sie durchdrangen Sie aber nicht und blieben ebenso wenig dort stecken. 6% der Viren saßen am Ende der jeweiligen Bilderserie in der Membran fest. 8% an AAV durchdrangen die Zellmembran von außerhalb der Zelle nach innen. 14% der Trajektorien liefen ausschließlich im Zytoplasma ab. 1% der Trajektorien zeigte den Eintritt von AAV vom Zytoplasma in den Zellkern. 2% des Virus steckten in der Kernmembran fest. 15% aller Viren bewegten sich im Kern oder saßen dort bereits fest (oder bewegten sich dort, bis sie festsäßen).

Analysiert man die im Einzelmolekülexperiment erhaltenen Daten im Hinblick auf die bislang bekanntesten Schritte des Aufnahmemechanismus in die Zelle, wie sie in Kapitel 5.5 beschrieben sind, lassen sich folgende Feststellungen treffen, die in den folgenden drei Abschnitten noch näher erläutert werden.

Die Halbwertszeit der Aufnahme von AAV in die Zelle nach dem ersten Membrankontakt beträgt etwa  $t_{1/2}(o \rightarrow cy) = 2$  min. Die in der Literatur [197] gefundene Angabe  $t_{1/2}(\text{internalisation}) \leq 10$  min ( $T = 37$  °C) ist zu groß und hängt wohl mit den dort beschriebenen experimentellen Bedingungen zusammen (vergleiche Abbildung 7.30). Nur etwa 13% der „Virenattacken“ an der Zellmembran sind erfolgreich. Da es erfolglose und erfolgreiche Eindringversuche gibt, kann die Halbwertszeit des Eindringens nur im Experiment am individuellen Virus bestimmt werden. Nur hier ist anhand der Trajektorie erkennbar, ob das Virus eindringt, in der Membran steckenbleibt oder negativ andockt. Nur aus den eindringenden Virensuren kann die Eindringzeit ermittelt werden. Die unmittelbare Eindringzeit am Ort der Membran beträgt im Mittel  $\langle \Delta t_{\text{mem}}(o \rightarrow cy) \rangle = 80$  ms mit einer Verteilung von 40 ms bis 240 ms. Auch bei erfolglosem Andocken treten keine signifikant anderen Andockzeiten auf. Vom ersten Membrankontakt bis zum Einringen dauert es im Mittel  $\langle \Delta t_{\text{contact}}(o \rightarrow cy) \rangle = 1,2$  s. Der Mechanismus der Endozytose kann auf Grund von zwei wesentlichen Fakten als wahrscheinlich angenommen werden: Zum einen findet sich bei keinem Experiment, das bei pH=9 (etwa 3% der Trajektorien wurden unter diesen Bedingungen aufgenommen) durchgeführt wurde, ein Virus im Kern. Zum anderen treten bei pH=7 zwei unterschiedlich große Diffusionskoeffizienten auf, bei pH=9 nur der kleinere von beiden, was auf die Größe des Endosoms im Vergleich zum freien AAV zurückgeführt werden kann. Eine Öffnung des Endosoms an einer einzelnen Trajektorie konnte jedoch in keinem Fall zweifelsfrei gezeigt werden, da zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten mindestens 50 Bildpunkte (besser 100) nötig sind und keine der entsprechend langen Trajektorien sich in eine „langsame“ und eine „schnelle“ Hälfte teilen ließ. Die Vereinigung von zwei Endosomen konnte in keinem Fall beobachtet werden. Sie könnte bei der „Masseninfektion“ von Zellen [208] ein Artefakt der unphysiologischen experimentellen Bedingungen sein. Auch gibt es keine Hinweise, daß mehrere Viren unter physiologischen Bedingungen in einem Endosom wandern. Alle Virentrajektorien zeigten klar definiertes Ein- und Ausschalten des Fluoreszenzsignals von einem, in wenigen Fällen (<25%) von zwei Farbstoffen (zum Labeling vergleiche Kapitel 6.4). Je nach Umgebung findet sich im Zytoplasma freie Diffusion (lineares Verhalten im t-MSD-Diagramm) wie anomale Diffusion (Abweichung vom linearen Verhalten im MSD- t-Diagramm) für das Virus wie für das Endosom. Nach einer Halbwertszeit von  $t_{1/2}(\text{infection}) = 15$  min ist in 50% der infizierbaren Zellen AAV im Kern nachweisbar. Bislang wurde ein Erreichen des Kerns nach  $t_{1/2}(\text{infection}) \geq 2$  h angenommen [197]. Eine nur sehr geringe Zahl von Viren (3%) bleibt an der Kernmembran stecken (dann aber permanent). In der Regel durchdringen die Viren die Kernmembran (nach endosomaler Öffnung) in Zeiten, die dem Eindringen durch die Zellmembran sehr nahe kommen:  $\langle \Delta t_{\text{mem}}(cy \rightarrow n) \rangle = 80$  ms (unmittelbares

Recht gut mit der Theorie übereinstimmende Werte für D erreicht man mit Messungen, die in das Innere eines Flüssigkeitstropfens hinein fokussieren. Es ergaben sich im Experiment Diffusionskoeffizienten von  $D = 3,8 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für IgG in Glycerol-Wasser (1:1) und  $D = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für AAV in Wasser (vergleiche Abbildungen 7.27 und 7.28).

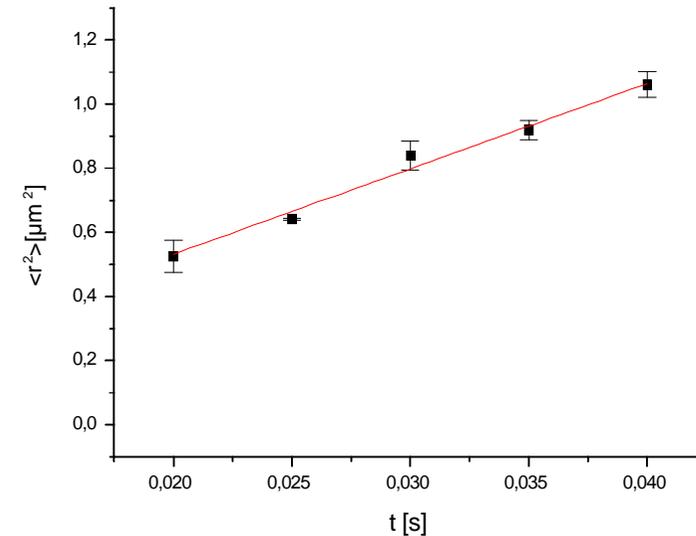


Abbildung 7.28  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm von AAV in Wasser (ermittelt analog zu IgG)

Die lineare Regression zum  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm (schwarze Punkte) liefert einen Diffusionskoeffizienten von  $D = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Die nach Stokes Einstein (4-37) berechneten Diffusionskoeffizienten von IgG in Wasser von  $D = 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bzw. von AAV in TRIS-Puffer-Lösung von  $D = 11 \mu\text{m}^2/\text{s}$  stimmen mit den gemessenen Werten von sehr gut überein. Im Falle von IgG kann der Meßwert in der Glycerol-Wasser-Mischung unter Berücksichtigung der dort zehnfach gegenüber Wasser erhöhten Viskosität auf  $D = 38 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für wäbrigem Medium extrapoliert werden. Der gemessene Wert für AAV von  $D = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  kann direkt mit der Berechnung verglichen werden. SPT-Vergleichsmessungen an IgG in Wasser von Kubitscheck ergaben ebenfalls Werte von  $D = 40 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [112].

## 7. 6 Aufnahme-Mechanismus von AAV in lebende HeLa-Zellen

Das erste und ursprüngliche Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchung war es, *einzelne Farbstoffmoleküle* durch ihre Fluoreszenz in lebenden Zellen *nachzuweisen* und die *Wanderung des AAV durch SDT* (Single Dye Tracing) *zu verfolgen*, und zwar an Membranen, im Zytoplasma und im Zellkern. SDT kann als „Einzelmolekülvariante“ des SPT (single particle tracking) verstanden werden. Der Begriff geht auf Schindler zurück [141], in dessen Gruppe erstmals SDT und Einzelmolekülnachweis auf Membranen lebender HSAM-Zellen gelang. In Zellkern und Zellplasma sind bislang keine Einzelmolekülexperimente beschrieben worden. Die hier gezeigten Experimente können unserem momentanen Kenntnisstand nach daher als erste Einzelmolekülexperimente in Zellplasma und Zellkern von lebenden Zellen angesehen werden. Das Tracking einzelner autofluoreszierender Proteine im Zytoplasma von Mammalian-Zellen [134], das kürzlich von Goulian und Simon veröffentlicht wurde, kann nicht als klassischer Einzelmolekülnachweis gewertet werden, da jedes (autofluoreszierende) Protein aus etwa 30 Chromophoren besteht.

Um verallgemeinernde Aussagen aus Einzelmolekülexperimenten treffen zu können, war es notwendig, eine genügend große Anzahl von Virentrajektorien mit AAV-Cy5 aufzuzeichnen. Dies gelang kürzlich in Folge von Verbesserungen bei der Probenpräparation (vergleiche Kapitel 6.4 und [237]). Damit konnte das zweite Versuchsziel, nämlich die *Charakterisierung des Aufnahme-Mechanismuses von AAV* in HeLa-Zellen, durch Klassifikation der gefundenen Trajektorien und statistische Auswertung des sortierten Datenmaterials erreicht werden. Viele bekannte Ergebnisse des Mechanismus der Virusaufnahme in die Zelle konnten bestätigt werden. Viele neue Erkenntnisse, vor allem was Aufnahmezeiten ins Zytoplasma oder Aufnahme in den Kern allgemein anbelangt, können helfen, das bekannte Schema der Infektion von AAV in HeLa-Zellen (vergleiche Kapitel 5.5) zu verbessern. Die Bedeutung des Einzelmolekülexperiments für den Mechanismus der AAV-Aufnahme in die Zelle begründet sich vor allem darin, daß das Experiment unter physiologischen Bedingungen abläuft. Es treffen einzelne Viren auf eine Zelle (wie bei Infektionen *in vivo*). Sie sind mit nur einem Farbstoffmolekül gelabelt sind und damit in ihrer Struktur und ihren physiologischen Eigenschaften kaum verfälscht. In bislang üblichen fluorezenzmikroskopischen Versuchen [197] mußte immer der Nachteil unphysiologischer, systematisch verfälschter Meßbedingungen in Kauf genommen werden. Entweder wurden  $10^5$ - $10^6$  Viren auf eine Zelle gegeben oder einzelne Viren wurden mit mehr als 100 Farbstoffmolekülen gelabelt [198, 203]. Die Vielfachlabelung von AAV ist auf Grund der Größe des AAV-Kapsids nicht möglich. Ein weiterer Vorteil der SDT-Methode ist die hohe Ortsauflösung von  $\Delta x = 100$ nm (Positionsgenauigkeit; bei Optimierung:  $\Delta x = 40$  nm) und die Verfolgung von Trajektorien mit einer Zeitauflösung von  $\Delta t = 10$  ms (optimiert  $\Delta t = 5$  ms).

Als weiteres Versuchsergebnis, welches in der ursprünglichen Zielvorgabe nicht vorhersehbar war, muß die *strukturelle Charakterisierung der Zelle*, vor allem innerhalb des Zellkerns, angesehen werden. Sie resultierte aus der Auswertung der Art der Bewegung von AAV in der Zelle.

In diesem Kapitel wird zunächst das Datenmaterial des Experiments je nach Typ der Virenwanderung gegliedert. Anschließend wird auf die drei Stationen des Aufnahme-Mechanismuses von AAV in HeLa-Zellen eingegangen: Andocken und Eindringen an der Zellmembran, Diffusionsvorgänge im Plasma und Bewegung im Kern.

### 7.6.1 Beobachtung der Stationen der Infektion

Die Experimente mit Cy5-gelabeltem AAV an und in lebenden HeLa-Zellen wurden standardisiert und wie folgt durchgeführt. In einem Bildausschnitt von  $18 \times 18 \mu\text{m}$  wurde der Laserspot von  $17 \mu\text{m}$  Durchmesser mittig positioniert. In diesem Spot wurde die Zelle so platziert, daß sie mit einer Seite am Rand des Beleuchtungsflecks lag, und daß zur anderen Seite hin möglichst viel Freiraum im Laserspot zu liegen kam. Die Zelle wurde zur Kontrolle im Durchlichtbild aufgenommen (vergleiche auch 7.6.2). Die einzelnen Bilderserien wurden im Zeitraum zwischen  $t_0 = 3$  min und  $t_0 = 50$  min nach der Virenzugabe zum mit Zellen bedeckten Objektträger (vergleiche Kapitel 6.4) aufgenommen. Die Detektionszeit zwischen zwei Bildern betrug  $\Delta t = 40$  ms. Jede Bilderserie umfaßte 250 Bilder und dauerte 10 Sekunden. Die Laserleistung betrug  $P = 0,3 \text{ kW/cm}^2$  bis  $P = 1,0 \text{ kW/cm}^2$ . Die Verstärkung der MCP an der CCD-Kamera wurde von Experiment zu Experiment optimiert. Die Angabe der gemessenen Fluoreszenzintensität erfolgt daher in a.u. Alle Messungen wurden bei  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Unter allen AAV-Trajektorien (insgesamt  $n = 1009$ ) treten  $n = 502$  in irgendeiner Form mit der Zelle in Wechselwirkung. Dabei konnten sieben verschiedene Typen von Virenwanderungen unterschieden werden. Sie sind in Abbildung 7.29 in der Häufigkeit ihres Auftretens dargestellt. Die hier durchgeführte Klassifikation der AAV-Trajektorien wird im weiteren Verlauf des Kapitels 7.6 noch bedeutsam.

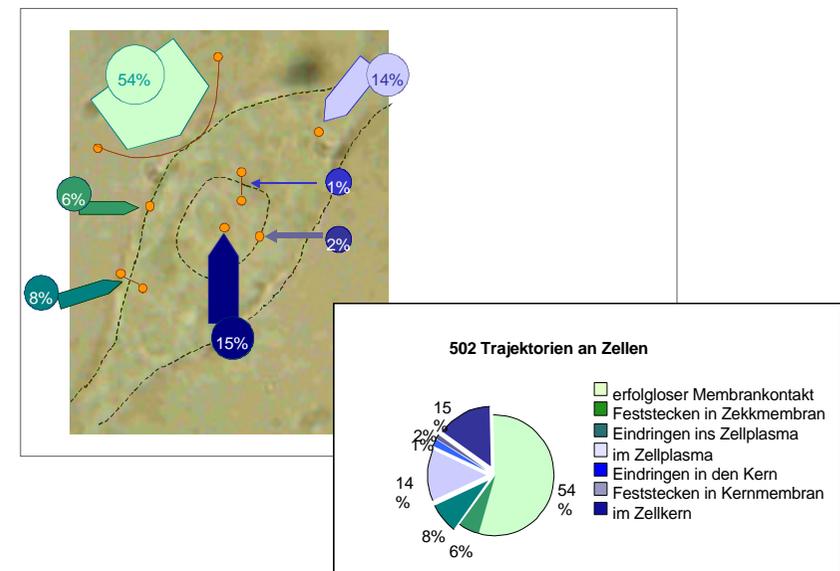
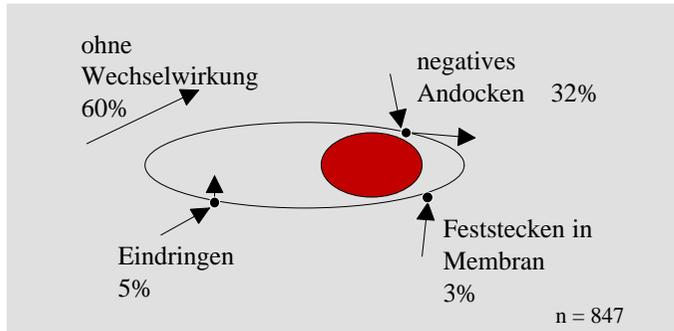


Abbildung 7.29 Klassifikation der Virentrajektorien an der Zelle nach dem Kriterium Aufenthaltsort

Gefunden wurden 1009 Trajektorien an 74 Zellen. 507 zeigten keinen Kontakt mit der Zelle. Die 502 Trajektorien, die mit der Zelle in Kontakt traten, sind klassifiziert.

Man kann den Wirkungsgrad  $\eta$  (Eindringeffizienz) der Zellmembran für die AAV-Aufnahme in die Zelle als Anteil der positiven „Eindring-Ereignisse“ an allen „Membrankontakt-Ereignissen“ definieren. Abbildung 7.31 zeigt die prozentuale Häufigkeitsverteilung aller Trajektorien, die außerhalb der Zelle starten und die Berechnung der Eindringeffizienz  $\eta$ . Aus ihr geht hervor, daß 40% aller Trajektorien Wechselwirkung mit der Zelle und 5% aller Trajektorien Eindringen in die Zelle zeigen.



$$P_{\text{Membrankontakt}} = 40\%$$

$$P_{\text{Eindringen}} = 5\%$$

Effizienz des  
Eindringens

$$h = \frac{P_{\text{Membrankontakt}}}{P_{\text{Eindringen}}} = 13\%$$

Abbildung 7.31 Häufigkeitsverteilung aller 847 Trajektorien, die außerhalb der Zelle starten, und Berechnung der Effizienz des Eindringens  $h$  von AAV in die Zelle

Der Eindringeffizienz beträgt demnach in unserem Experiment  $\eta=13\%$ . Man kann diese Effizienz als ein Maß für den Flächenanteil auf der Membran, der zur AAV-Aufnahme geeignet ist interpretieren. Inwieweit dies mechanistisch auf das Vorhandensein von Primär- und Co-Rezeptoren zurückzuführen ist, kann mit diesem Experiment nicht beantwortet und muß mit biologischen Methoden untersucht werden.

Die Lokalisierung eines von einem AAV-Cy5-Molekül stammenden Fluoreszenzspot an der Zellmembran ist experimentell nicht ganz unproblematisch. Die z-Unschärfe in Durchlichtbildern führt nämlich dazu, daß Zellaufnahmen eine relativ große Positionsungenauigkeit von Objekten, die schräg durch die Fokalebene verlaufen, auch in xy aufweisen. Deshalb ist die Grenze in Zellmembranen nicht scharf, sondern erstreckt sich über mehrere Pixel (einige 100 nm). Es kann daher sein, daß Viren anhand ihrer Position nicht eindeutig innerhalb oder außerhalb der Zelle bestimmt werden können (Abbildung 7.32) Deshalb wurde ein Kriterium für Membrankontakt für von außerhalb der Zelle kommende Viren eingeführt: Zeigen Trajektorien, die über den Grenzbereich der Zellmembran laufen (Breite von vier Pixeln in x und y), zwischen zwei Bildern Werte von MSD = 2 oder kleiner

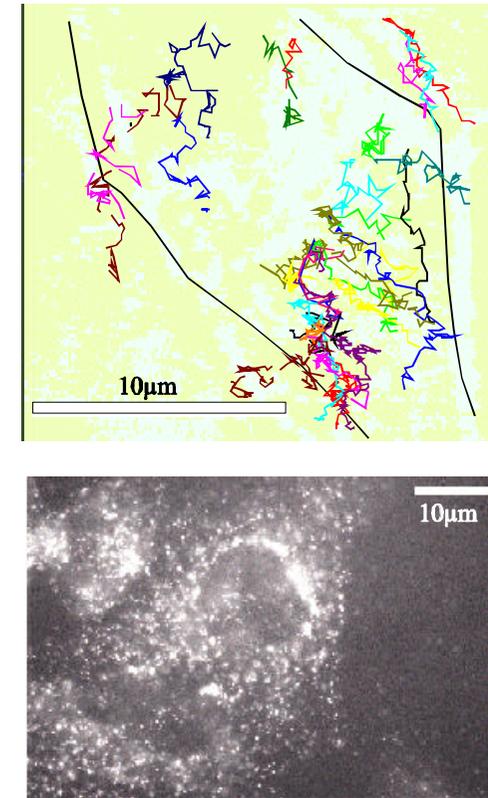


Abbildung 7.30 Aufnahme-Mechanismus von AAV, untersucht mit SDT im Vergleich zu konventioneller Fluoreszenzmikroskopie  
oben: Trajektorien, die von einzelnen AAV in lebenden HeLa-Zellen zurückgelegt werden, sind in Echtzeit verfolgbar und nach den Gesetzmäßigkeiten der Diffusionstheorie charakterisierbar.  
unten: Konventionelle Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (nach [197]) zeigen die Verteilung von AAV in der lebenden HeLa-Zelle in Minutenabständen (hier 30 Minuten nach Infektionsstart).  
Nur in Einzelmoleküluntersuchungen, nicht aber mit der konventionellen Methode kann die Vireninfektion mit hoher Orts- und Zeitauflösung unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden kann.

Eindringen) bzw.  $\langle \Delta t_{\text{contact}}(\text{cy} \rightarrow \text{n}) \rangle = 1.0 \text{ s}$  (overall contact time). Innerhalb des Kerns bewegt sich AAV linear gerichtet. Die Bewegung ist eine Diffusion mit Drift. Beide Tatsachen zusammen machen eine Strömung innerhalb des Kerns entlang von Röhren oder den Transport durch Motorproteine zwingend notwendig. Im Mittel fünf solcher Röhren durchziehen den ganzen Kern einer HeLa-Zelle. Sie haben einen Röhrendurchmesser von etwa 20 bis 200 nm

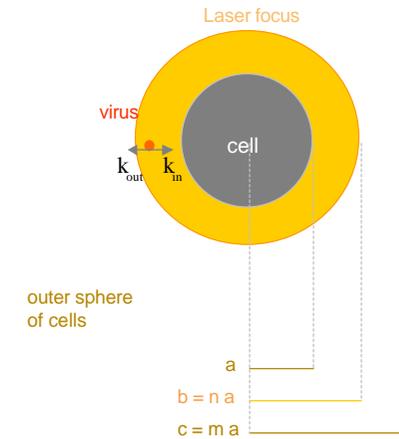
und können als Einstülpungen der Kernmembran verstanden werden [248]. An der Innenwand der Röhren befinden sich wie auf der Kernmembran auch sog. *nuclear pore complexes* (NPC), über die der Stoffaustausch zwischen Zytoplasma und Kern stattfindet. Das Röhrengerüst erhöht die effektive Austauschfläche zwischen Kern und Plasma und reduziert gleichzeitig bei einem Teilchens, das ausgehend vom Plasma an ein Ziel im Nukleus wandert, die maximale Wegstrecke durch das Kerninnere. Dort können zwischen Chromatiden-Domänen Hohlräume auftreten [281]. AAV zeigt dann charakteristisches Bewegungsverhalten für Diffusion in restriktiver Geometrie. Bis in die Röhren dringt das Virus als ganzes ein (Kapsid und Genom). Die Frage, ob AAV dabei allerdings die Kernmembran durch die Kern-Poren-Komplexe durchqueren kann, ist wie in Kapitel 7.6.4. erläutert wird, nicht eindeutig zu klären.

## 7.6.2 Andocken und Eindringen

Der erste Schritt des Eindringmechanismus von AAV in HeLa-Zellen ist die Adsorption des Virus an der Zelloberfläche (vermutlich an den Primärrezeptor HSPG): das *Andocken*. Auf diesen Prozeß folgt unmittelbar die Endozytose von AAV mit Hilfe von Co-Rezeptoren: das *Eindringen*. In diesem Abschnitt wird eine Unterscheidung getroffen zwischen Viren, die in die Zelle eindringen, und solchen, die nicht in die Zelle gelangen, obwohl sie an der Membran andocken oder gar dort steckenbleiben.

Zunächst folgt jedoch eine statistische Betrachtung deren Ziel es ist, ein Maß für die Wahrscheinlichkeit des Eindringens von AAV unter den gewählten (physiologischen) Bedingungen zu erhalten. Anschließend wird die Problematik der z-Unschärfe in mikroskopischen Fluoreszenz- und Durchlichtbildern und die daraus resultierenden Problematiken eingegangen. Danach werden Beispiele von Viren, die in der Zellmembran steckenbleiben, negatives Andocken oder Eindringen in die Zelle zeigen, dargestellt. Das Verhalten des negativen Andockens wird im weiteren mittels einer Statistik über die Wiederholungszahlen des Zellmembran-Kontakts innerhalb einzelner Trajektorien näher analysiert. Abschließend werden die Kontaktzeiten an der Zellmembran für Einringen und negatives Andocken statistisch bestimmt.

Die Adsorptionswahrscheinlichkeit von AAV unter den experimentellen Randbedingungen soll unter Zuhilfenahme folgender Überlegung abgeschätzt werden: Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Teilchen, das in einem Abstand  $b$  zum Zellmittelpunkt startet, an der Zellmembran (im Abstand  $a$  zum Zellmittelpunkt) ankommt, kann unter der Annahme, daß die Zelle als Kugel behandelt werden kann, gemäß Gleichung (4-23) (Modell in Kapitel 4.1.3) berechnet werden. Nimmt man an, daß im Radius  $c = ma$  bereits Nachbarzellen als Adsorber fungieren und der Startabstand  $b$  bei allen Teilchen zufällig zwischen  $b = a$  und  $b = na$  variiert, kann der Mittelwert  $\langle p \rangle$  von  $p = P_{ad}$  so berechnet werden:



$$\langle p \rangle = \frac{\int_a^{na} \frac{a(ma-b)}{b(ma-a)} db}{\int_a^{na} db} = \frac{\int_a^{na} \frac{1}{b} \frac{(ma-b)}{(m-1)} db}{(n-1)a} = \frac{\int_a^{na} (\frac{ma}{b} - 1) db}{(m-1)(n-1)a}$$

$$\langle p \rangle = \frac{[(ma \ln b - b)]_a^{na}}{(m-1)(n-1)a} = \frac{m \ln n - (n-1)}{(m-1)(n-1)}$$

Im Experiment mit AAV an HeLa-Zellen kann man einen mittleren Zellradius von etwa  $a = 4 \mu\text{m}$  annehmen. Der Startpunkt des Virus (betrachtet werden nur Viren, die außerhalb der Zelle starten) befindet sich irgendwo zwischen 0 und  $8 \mu\text{m}$  im Abstand zur Membran ( $b = 4$  bis  $b = 12 \mu\text{m}$  Abstand zum Zellmittelpunkt;  $n=3$ ). Der Abstand zwischen benachbarten Zellen sei etwa  $20 \mu\text{m}$  von Membran zu Membran (also ist  $m=5$ ). Unter diesen Randbedingungen, die eine sehr starke Vereinfachung der tatsächlichen experimentellen Situation widerspiegeln (Unterschiede in Belegungsdichte, Zellgröße und Lage jeder Zelle relativ zum Beleuchtungspot), läßt sich  $\langle p \rangle = 0,44$  abschätzen.

$$\langle p(m=5; n=3) \rangle = \frac{5 \ln 3 - 2}{8} = 0,44$$

Vergleicht man den abgeschätzten Wert  $\langle p \rangle = 0,44$  mit dem experimentellen Wert  $P_{\text{Membrankontakt}}$ , der angibt, welcher Anteil an Viren in irgendeiner Form an der Zellmembran ankommt, stimmen beide Werte recht gut überein (Abbildung 7.31).

Neben in die Zelle eindringenden Viren führen diejenigen, die in der Membran feststecken, ebenfalls dazu, daß das wäßrige Medium zwischen den Zellen an AAV verarmt. Der gemeinsame Anteil von beiden „Adsorptionsfällen“ im Sinne der Verarmung der Lösung an Viren beträgt  $P_{\text{adsorption}}=9\%$ .

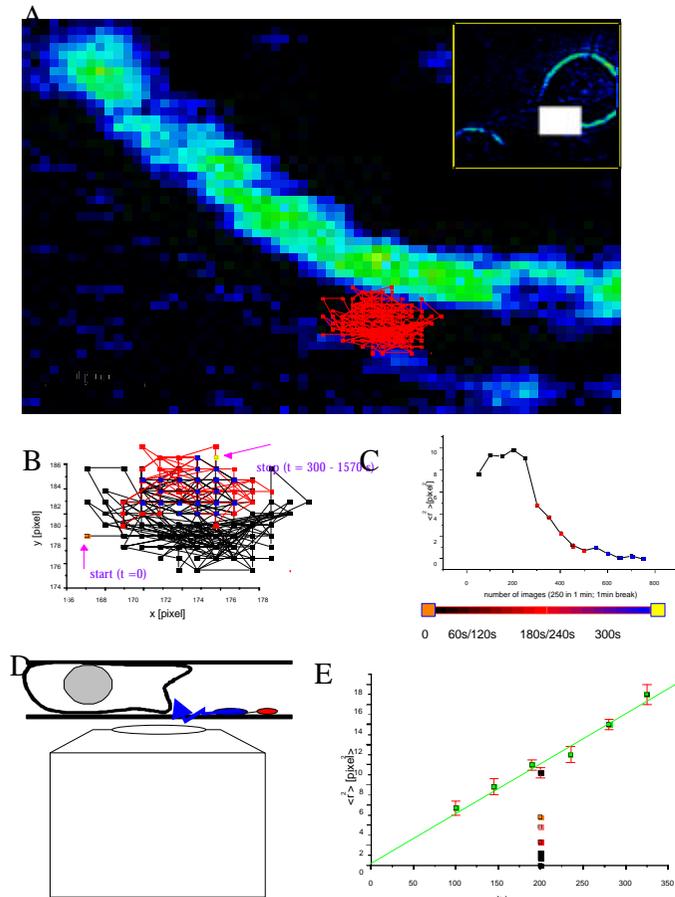


Abbildung 7.35 Andocken eines von der Glasoberfläche kommenden AAV an der Membran

A: Das Virus wandert bereits weit vor der Zelle an der Glasoberfläche entlang (Durchlichtbild mit schematischer Trajektorie; Bildausschnitt im insertierten Bild sichtbar)

B: Trajektorie noch einmal alleine dargestellt

C: Der momentane Wert für  $\langle r^2 \rangle$  (bestimmt aus je 50 Trajektorien-schritten) wird mit zunehmender Bildnummer der Trajektorie kleiner (Wechselwirkung von AAV mit der Membran). Schließlich konvergiert der momentane Wert für MSD gegen Null (Virus steckt in Membran).

D: Skizze zur Detektion der Diffusionsbewegung an der Glasoberfläche

E: Das  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm zeigt eine Gerade, die das Diffusionsverhalten von Viren in freier Pufferlösung an Glasoberflächen beschreibt. Der schwarze Punkt bei  $dt = 200ms$  für die ersten 50 Trajektorienpunkte paßt recht gut in die Gerade. Später sinkt die momentane MSD mit der Bildnummer der Trajektorie auf Null ab.

(Positionsgenauigkeit von einem Pixel in x und y) wurde dies als Verweilen beurteilt, das in Folge von Membrankontakt auftrat. Anhand der Bewegungsrichtung nach dem Verweilen konnte in Membranstecker, eindringende Viren und solche unterschieden werden, die negatives Andocken zeigten.

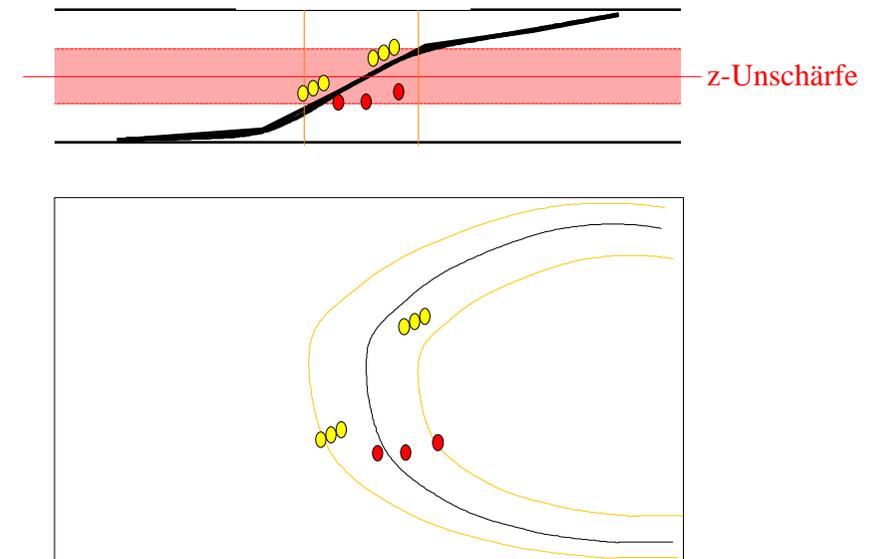


Abbildung 7.32 Probleme in der xy-Positionsbestimmung von Zellmembranen auf Grund der z-Unschärfe in Durchlichtbildern

Der Rand der Zellmembran fällt schräg ab. Die Grenze im Durchlichtbild (xy-Projektion) wird dadurch breit (orange Begrenzungslinien). Die gelb markierten Trajektorien von AAV-Cy5 liegen außerhalb, die rot markierte innerhalb der Zelle. Da die Viren sich in leicht unterschiedlicher z-Position befinden und die Membran nur unscharf abgebildet wird, erscheinen unter Umständen außerhalb der Zelle liegende (gelbe) Trajektorien weiter innen als innerhalb liegende (rote).

Die folgenden Abbildungen 7.33 bis 7.35 zeigen die unterschiedlichen Typen von Viren-Trajektorien, wie sie oben in der Statistik bereits erwähnt und klassifiziert wurden.

In Abbildung 7.33 steckt AAV an der Zellmembran einer Zelle fest und bleibt dort über den gesamten Detektionszeitraum von zehn Sekunden immobilisiert. Solche permanent in der Membran steckenden Viren lösten sich in keinem Fall wieder von der Zellmembran ab, weder nach außen noch nach innen.

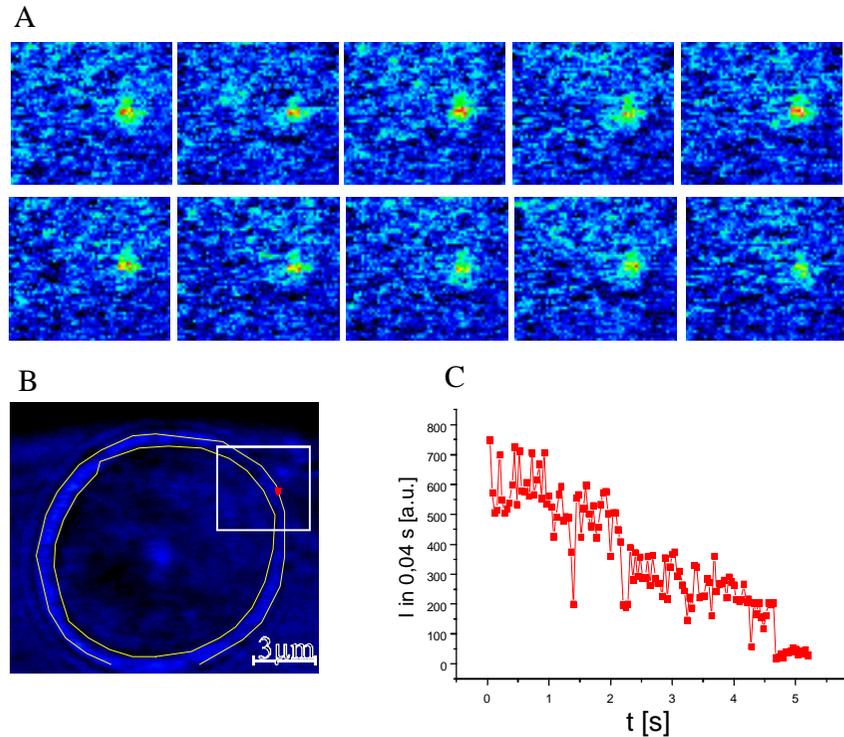


Abbildung 7.33 Beispiel eines in der Membran steckenden Virus

A: Die ersten zehn Bilder der Bilderserie sind oben vergrößert (Position entspricht dem weißen Viereck im Durchlichtbild) dargestellt.

B: Die kreisrunde Zelle ist im Durchlichtbild dargestellt. Darüber projiziert ist schematisch die Position des Cy5-Moleküls, das die Lage des Virus lokalisiert. Die Position ändert sich während der Messung nicht (Ungenauigkeit der Positionsmessung:  $\pm 1$  Pixel)

C: Die totale Intensität der Spots ist als Zeitspur rechts unten aufgetragen. Man erkennt relativ starke Schwankungen des Signals (zwischen 200 und 700 a.u.). Es scheinen zwei Farbstoffmoleküle nacheinander auszugehen: Nach etwa  $t = 2,3$  s bzw. nach  $t = 4,7$  s photobleicht ein Farbstoff, das Signal erlischt in zwei Stufen.

In Abbildung 7.34 werden zwei exemplarische Trajektorien ausführlich besprochen, die einmal das Eindringen eines AAV (orange; grobe Wanderrichtung von unten nach oben), das andere Mal das negative Andocken eines Virus (rot; wandert von unten nach oben) zeigen.

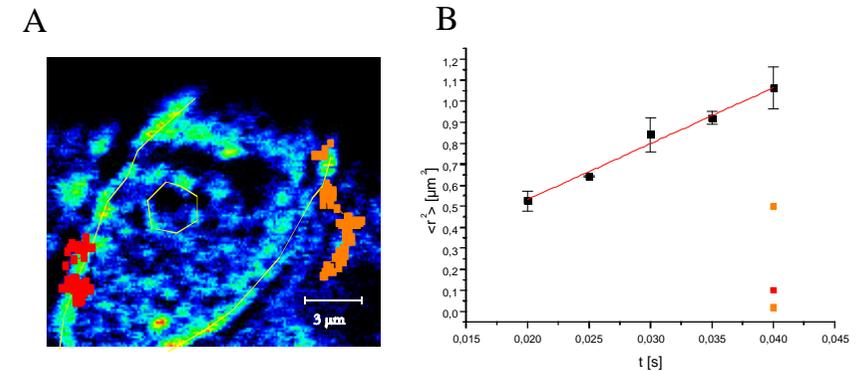


Abbildung 7.34 Eindringen und negatives Andocken

A: Schematische Darstellung zweier Virentrajektorien. Die rote Trajektorie (Verlauf im Bild von unten nach oben) zeigt negatives Andocken an der Membran. Die Trajektorie verläuft nur scheinbar innerhalb der Zelle (vergleiche Kriterium für Membrankontakt und Abbildung 7.32) Mehrmaliges Stehenbleiben (aus der Analyse der Einzelschritte erhalten) zeigt den Membrankontakt. Die orange Trajektorie ist ein Beispiel für das Eindringen durch die Membran. Das Virus bleibt beim Eindringen an der Membran kurz stehen und findet sich später innerhalb der Membranlinie wieder. Der Farbstoff ist im entscheidenden Moment leider einige Bilder lang aus (Blinking). Ein Indiz dafür, daß hier tatsächlich ein Eindringen vorliegt, ist die Tatsache, daß das Mean Square Displacement (MSD) der letzten Trajektorienpunkte deutlich größer ist als zuvor.

B: Beim Annähern von außen werden beide Viren immer langsamer. In der rechten Graphik ist das MSD ( $=\langle r^2 \rangle$ ) gegen die Zeit für freie Virendiffusion in Pufferlösung aufgetragen. Zusätzlich ergänzt sind zwei orange (bei  $\langle r^2 \rangle = 0,05$  und  $0,5$ ) und ein roter Punkt (bei  $\langle r^2 \rangle = 0,1$ ) für das verwendete Zeitfenster der Bilderserie. Sie zeigen das MSD als Ergebnis von 50 Trajektorienpunkten für den roten bzw. beim orangen AAV für die ersten 50 und die zweiten 50 Punkte. Man erkennt die deutliche Verlangsamung beider Viren.

Eine in vielen Fällen beobachtete Tatsache ist, daß Viren, sobald sie in die Nähe der Membran kommen, deutlich langsamere Bewegung zeigen. Dies scheint zum einen damit zusammenzuhängen, daß sie dann in die Nähe der Objektträgeroberfläche gelangen und dort bereits langsamer werden als in freier Lösung (vergleiche Kapitel 7.4). Zudem verlangsamt sich die Diffusionsbewegung der Viren durch Membrankontakt. Es kann dabei sowohl sein, daß Viren an der Membran entlanglaufen, als auch daß sie mehrmals an der Membran negativ andocken und sich danach nochmal von der Zelle ein kleines Stück (wenige 100 nm) wegbewegen. Wegen der Unschärfe der Bestimmung des Ortes der Zellmembran im Durchlichtbild (siehe oben) können beide Fälle nicht voneinander unterschieden werden. Ein sehr imponantes Beispiel für die Annäherung eines AAV an die Zellmembran zeigt Abbildung 7.35. Das Virus diffundiert hier zunächst mit einer Geschwindigkeit, die der Diffusion von AAV an Oberflächen entspricht. Im Verlauf der Trajektorie wird es immer langsamer (MSD für je 50 aufeinanderfolgende Trajektorienpunkte immer kleiner), bis es schließlich an einem Punkt an der Zellmembran andockt.

ausgenommen), und für solche, die in die Zelle eindringen, exakt gleich aus ( $\langle \Delta t_{\text{mem}} \rangle = 80 \text{ ms}$ ). In Abbildung 7.38 ist die Verteilung der unmittelbaren Andockzeiten für eindringende AAV abgebildet. Kein Unterschied zeigt sich bei den entsprechenden Zeiten für negatives Andocken (hier nicht gezeigt). Für den Eindring-Mechanismus von AAV in HeLa-Zellen betrachtet, heißt das, daß der Prozeß der Endozytose also nicht länger dauern kann als 80 ms. Vergebliches Anbinden an die Oberfläche ist nicht signifikant länger.

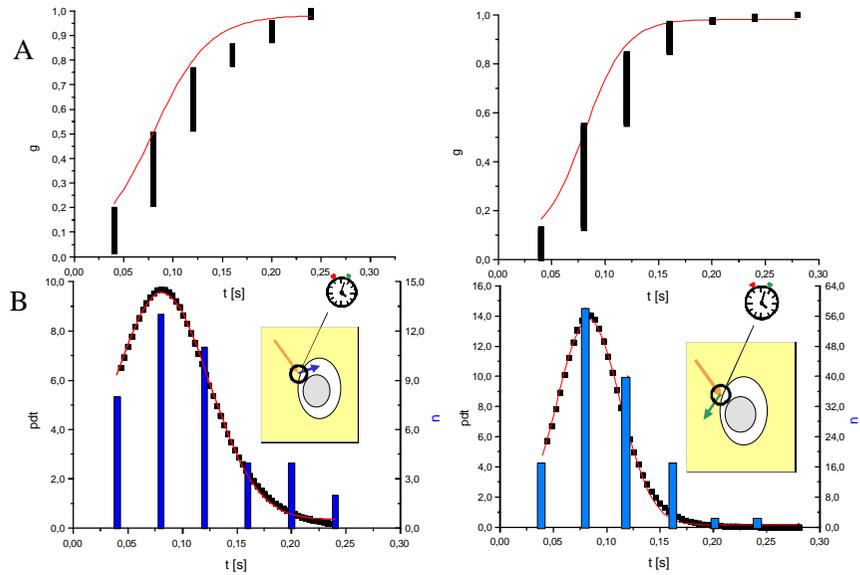


Abbildung 7.38 Verteilung der unmittelbaren Andockzeiten  $t$  an der Zellmembran für das Eindringen ( $\langle \Delta t_{\text{mem}}(\text{o} \rightarrow \text{cy}) \rangle = 80 \text{ ms}$ ) und das negative Andocken ( $\langle \Delta t_{\text{mem}}(\text{o} \rightarrow \text{o}) \rangle = 82 \text{ ms}$ )

A: Die Integralfunktion  $g(t)$  der Wahrscheinlichkeitsverteilung (oben) ist der Fit (rote Linie; Sigma-Funktion) der akkumulierten relativen Häufigkeitsdichte von  $t$  (schwarze Punkte; erhalten aus 42 Trajektorien für das Eindringen und 137 Ereignissen für das negative Andocken).

B: Die Ableitung von  $g(t)$  ergibt die Dichtefunktion  $pdt$  (schwarze Punkte unten), wenn man die Fläche dieser Funktion auf  $A=1$  normiert (Flächenberechnung durch Gaußfit, rote Linie unten). Diese Dichtefunktion zeigt die Verteilung der unmittelbaren Andockzeiten  $t$  ( $\langle \Delta t_{\text{mem}}(\text{o} \rightarrow \text{cy}) \rangle = 80 \text{ ms} \pm 11 \text{ ms}$  bzw.  $\langle \Delta t_{\text{mem}}(\text{o} \rightarrow \text{o}) \rangle = 83 \text{ ms} \pm 7 \text{ ms}$ ). In blauen Balken daneben ist die relative Häufigkeitsverteilung der Andockzeiten  $t$  dargestellt.

Neben den unmittelbaren Andockzeiten können aus den Trajektorien von Eindringen bzw. negativem Andocken die Kontaktzeiten  $\Delta t_{\text{contact}}$  (Kontaktzeiten) bestimmt werden. Dies sind die Zeitintervalle vom ersten Kontakt des Virus mit der Zellmembran bis zum letzten. Die Verteilung dieser Kontaktzeiten  $\Delta t_{\text{contact}}$  für beide Fälle zeigt Abbildung 7.39.

Im Rahmen der Positionsgenauigkeit von  $\pm 1$  Pixel bleibt das Virus dann dort, bis der Farbstoff-Label durch Photobleichen aufhört zu fluoreszieren. Dies ist über eine halbe Stunde lang der Fall. Die vorliegende Spur wurde aus drei Bilderserien erstellt, die mit einer Verzögerungszeit von 60 Sekunden zwischen den Spuren aufgenommen wurden. Das Virus wurde anschließend (mit unterbrechenden Dunkelphasen der Beleuchtung zur Schonung des Farbstoffes) bis 1570 Sekunden (Zeitpunkt des Photobleichings) nach Start der ersten Aufnahmeserie verfolgt.

In Kapitel 4.1.3 wurde für ein eindimensionales Modell die mittlere Zeit  $W(x)$  eingeführt, nach der ein Teilchen, das zwischen zwei Adsorbieren frei diffundiert, von einem der beiden eingefangen wird. Mittelt man über alle möglichen Startpositionen  $x$ , erhält man  $\langle W \rangle$  gemäß Gleichung (4-26). Auch wenn unsere experimentellen Randbedingungen sicher nicht durch ein lineares Modell wiedergegeben werden können (sondern durch das bereits oben erwähnte Kugelmodell), kann das unter der Annahme des simplifizierten linearen Modells errechnete  $\langle W \rangle$  einen Anhaltspunkt liefern, nach welcher mittleren Zeit (als Größenordnung) die Lösung an AAV verarmt sein müßte, wenn alle Zellen als vollständige Adsorber ( $\eta=100\%$ ) wirken, die Glasoberfläche(n) dagegen nicht. Für  $b = 20 \mu\text{m}$  und  $D = D_{\text{AAV}} = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  errechnet sich ein Wert für  $\langle W \rangle$ , der im Bereich von etwa 5 Sekunden liegt:

$$\langle W \rangle = \frac{b^2}{12D} = \frac{400 \mu\text{m}^2}{90 \mu\text{m}^2/\text{s}} = 5 \text{ s}$$

Tatsächlich finden sich noch nach 40 bis 50 Minuten Viren im zwischenzellulären Raum. Dies kann im wesentlichen auf zwei Faktoren zurückgeführt werden. Einerseits verlangsamt sich die Diffusion an der Glasoberfläche, zum anderen wirken die Zellen nur als sehr schlechte Adsorber ( $\eta=13\%$ ) bzw. Absorber. Viele Viren zeigen daher ja auch negatives Andocken mit einer Reihe von Andockwiederholungen  $n_{\text{Touch}}$ , bis sie aus dem Bereich der Zelle wieder verschwinden. Die mittlere Anzahl der Wiederholungen  $\langle n \rangle = \langle n_{\text{Touch}} \rangle$  kann gemäß Gleichung (4-24) hochgerechnet werden (Kugelmodell im Kapitel 4.1.3; Kugel als kompletter Nichtadsorber mit  $\eta=0$ ). Nimmt man an, daß sich ein Teilchen mit einer Wiederholungszahl  $n_{\text{Touch}}$  zwischen zwei Berührungen stets um  $b-a = 1 \mu\text{m}$  von der Zelloberfläche entfernt, ehe es die Zellregion entgültig verläßt, kann  $\langle n \rangle$  abgeschätzt werden. Für Zellen mit den Radien von  $a_{\text{min}} = 4 \mu\text{m}$  bis  $a_{\text{max}} = 6 \mu\text{m}$  ergibt sich eine mittlere Wiederholungszahl von 5.

$$\langle n \rangle_{\text{min}} = \frac{a_{\text{min}}}{b_{\text{min}} - a_{\text{min}}} = \frac{4}{5-4} = 4$$

$$\langle n \rangle_{\text{max}} = \frac{a_{\text{max}}}{b_{\text{max}} - a_{\text{max}}} = \frac{6}{7-6} = 6$$

$$\langle n \rangle = 5 \pm 1$$

Abbildung 7.36 zeigt ein AAV, das nach fünf negativen Andockversuchen die Zellmembran in Richtung freie Lösung verläßt.

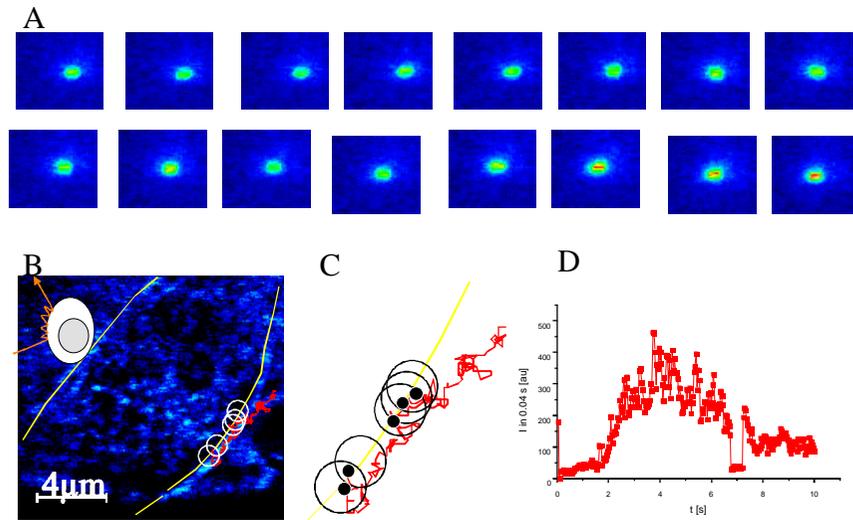


Abbildung 7.36 Negatives Andocken mit einer Reihe von 5 Wiederholungen beim Andocken

A: 16 Bilder der Fluoreszenz aus dem Bereich der zweiten bis dritten Sekunde der Zeitspur  
 B: Durchlichtbild mit Trajektorie. Die genaue Auswertung der Einzelschritte der Trajektorie ergibt fünf Stellen mit negativem Andocken. Die weißen Kreise im Zellbild links unten zeigen wo diese Stellen liegen.  
 C: Vergrößerte Darstellung der Trajektorie mit den eingekreisten Andockstellen.  
 D: Fluoreszenzzeitspur der totalen Intensität.

Die Auswertung aller 269 Trajektorien, die negatives Andocken zeigen, ergab die Verteilung der Wiederholungen  $n_{\text{Touch}}$ , die Abbildung 7.37 zeigt. Sie stimmt mit dem abgeschätzten Wert recht gut überein.

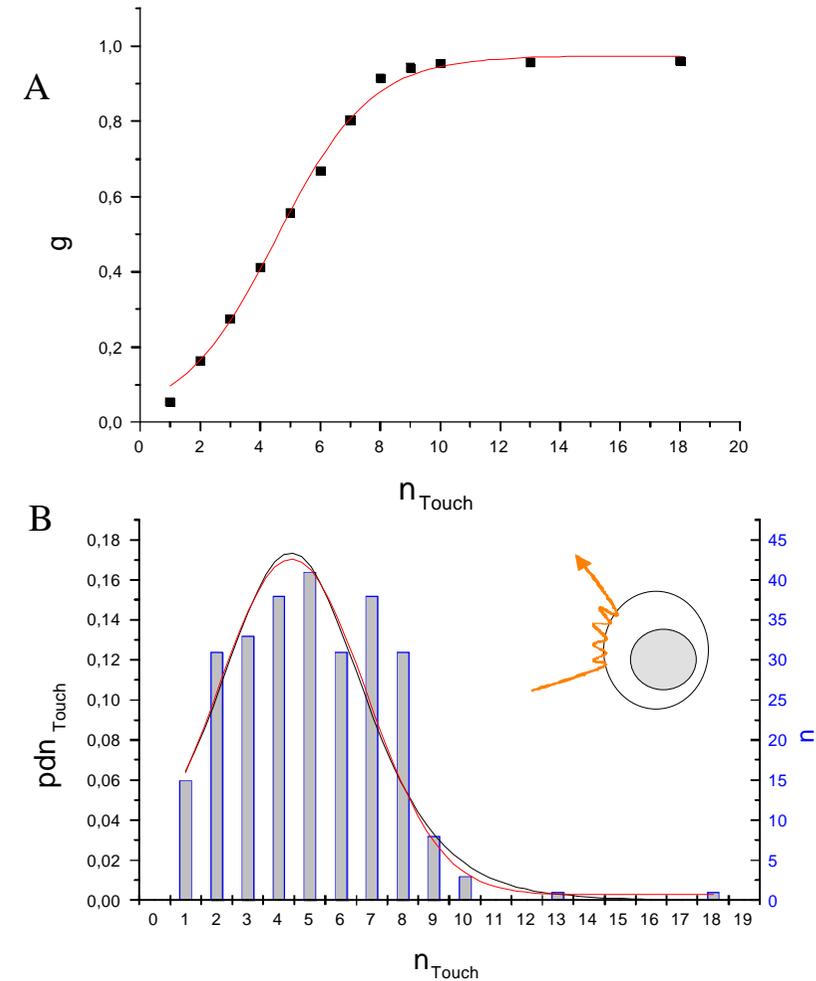


Abbildung 7.37 Verteilung der Wiederholungszahlen  $n_{\text{Touch}}$  ( $\langle n_{\text{Touch}} \rangle = 4,4 \pm 3,1$ )

A: Die Integralfunktion  $g(n_{\text{Touch}})$  der Wahrscheinlichkeitsverteilung ist (oben) der Fit (rote Linie; Sigma-Funktion) der akkumulierten relativen Häufigkeit von  $n_{\text{Touch}}$  (schwarze Punkte; erhalten aus 269 Trajektorien, die negatives Andocken zeigen).  
 B: Die Ableitung von  $g(n_{\text{Touch}})$  ergibt die Dichtefunktion  $\text{pdn}_{\text{Touch}}$  (schwarze Linie unten), wenn man die Fläche dieser Funktion auf  $A=1$  normiert (Flächenberechnung durch Gaußfit, rote Linie unten). Diese Dichtefunktion zeigt die Verteilung der  $n_{\text{Touch}}$  Wiederholungen ( $\langle n_{\text{Touch}} \rangle = 4,4 \pm 3,1$ ). In blauen Balken daneben dargestellt ist die relative Häufigkeitsverteilung von  $n_{\text{Touch}}$ .

Die Verteilung der unmittelbaren Andockzeiten  $\Delta t_{\text{mem}}$ , also der Haltezeiten an einer Membranstelle, sieht für Viren, die negativ andocken (in der Membran steckende Viren

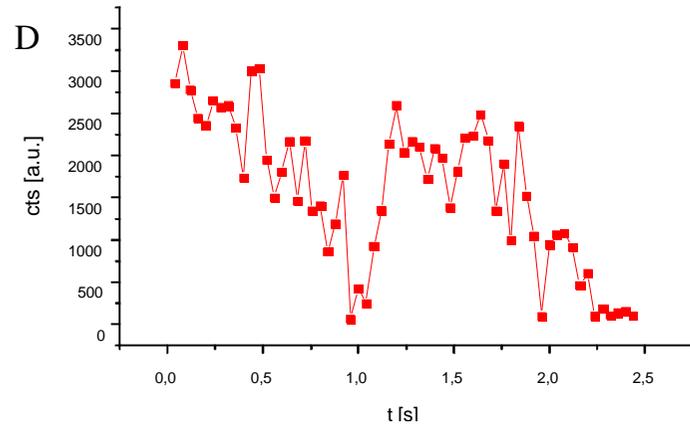


Abbildung 7.41 Endozytose und endosomaler Transport, beobachtet am einzelnen AAV

A: Photo einer HeLa-Zelle, aufgenommen mit einer CCD-Photokamera (Nikon Coolpix 990; 3,3 Mio. Pixel; links) daneben: gleiches Photo mit Skizzierung von Zellmembran und Zellkern (gelbe Linien)

B: die ersten zehn Bilder der Trajektorie

C: Durchlichtbild der Zelle. Mit Hilfe der am Photo erstellten Skizzierung können Zellmembran und Zellkern relativ exakt eingezeichnet werden. Die Trajektorie des Endosoms ist rot dargestellt.

D: Fluoreszenzzeitenspur der Trajektorie

Von dem Eindruck individueller Trajektorien aus wurde in einem weiteren Schritt versucht, anhand der Auswertung dieser Trajektorien Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Dazu wurden aus Bilderserien mit mindestens 30 Bildern (nahezu alle Trajektorien im Bereich von 30 bis 250 Bildern, mittlere Bilderzahl bei etwa 100) die einzelnen MSD- ( $\langle r^2 \rangle$ ) Werte für verschiedene Zeitfenster bestimmt. 40 ms war das Intervall der  $\langle r^2 \rangle$ -Bestimmung vom ersten zum nächsten Bild, 80 ms das Intervall derjenigen vom ersten zum dritten Bild usw. Solche  $\langle r^2 \rangle$ -Werte lassen sich natürlich nur noch dann sinnvoll angeben, wenn genügend Datenpunkte für jeden einzelnen Wert zur Verfügung stehen. Nach Saxton [110] ist es nicht sinnvoll, Zeitintervalle zu wählen, die nur mehr mit  $\frac{1}{4}$  der Datenpunkte im Vergleich zum kleinsten Zeitintervall auskommen. In unserem Fall wurde die Auswertung mit den ersten fünf möglichen Zeitfenstern durchgeführt.

Die Auswertung aller 96 Trajektorien im Zytoplasma ergab zwei unterschiedliche Typen von Wanderungsverhalten. 58% (56 Trajektorien) zeigten *freies Diffusionsverhalten*, 42% zeigten ein davon abweichendes Verhalten, nämlich *anomale Diffusion* (wie in Kapitel 4.2 beschrieben). Die frei diffundierenden Teilchen konnten in zwei Kategorien je nach Größe des Diffusionskoeffizienten ( $\langle D_{\text{End-Zyto}} \rangle = 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bzw.  $\langle D_{\text{AAV-Zyto}} \rangle = 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) unterteilt werden. Wir schreiben den ersten Diffusionskoeffizienten der Diffusion von Endosomen im Zytoplasma zu, den zweiten der Diffusion des freien Virus im Zytoplasma. Diese These wird durch folgende Überlegung unterstützt: Im Zytoplasma sind die Diffusionskoeffizienten von Makromolekülen in der Regel kleiner, als man nach der Formel von Stokes-Einstein (4-37) erwarten sollte, wenn man als Viskosität ungefähr diejenige von Wasser einsetzt. In der

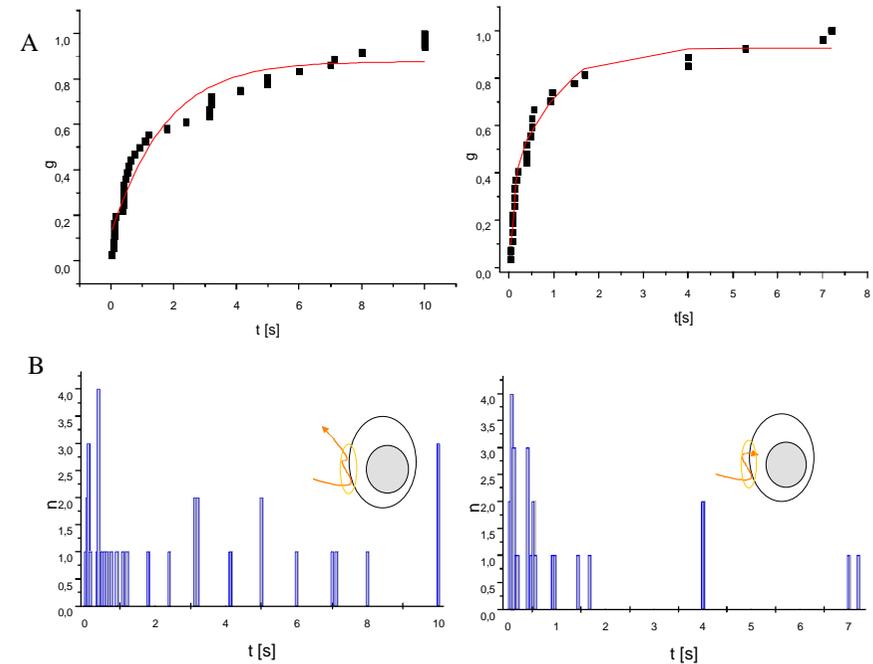


Abbildung 7.39 Verteilung der Kontaktzeiten an der Zellmembran für negatives Andocken ( $\langle \Delta t_{\text{contact}}(o \rightarrow o) \rangle = 2,7 \text{ s}$ ; links) und Eindringen ( $\langle \Delta t_{\text{contact}}(o \rightarrow cy) \rangle = 1,2 \text{ s}$ ; rechts)

A: Die akkumulierten relativen Häufigkeiten (schwarze Punkte; erhalten aus 31 Trajektorien für negatives Andocken (Stichprobe) bzw. 42 Trajektorien für Eindringen) lassen sich mit keiner Sigma- oder Mehrfachsigmafunktion sinnvoll fiten (dargestellter Fit als Sättigungsfunktion mit  $t_{1/2}(o \rightarrow cy) = 0,5 \text{ s}$  für das Eindringen).

B: In blauen Balken darunter dargestellt sind die relative Häufigkeitsverteilungen der Kontaktzeiten  $\langle \Delta t_{\text{contact}}(o \rightarrow cy) \rangle = 1,2 \text{ s} \pm 2 \text{ s}$  und  $\langle \Delta t_{\text{contact}}(o \rightarrow o) \rangle = 2,7 \text{ s} \pm 3 \text{ s}$ . Die Mittelwertbestimmung erfolgt über arithmetische Mittelung. Der Fehler ist die Standardabweichung und resultiert aus der Mittelwertberechnung.

Die Kontaktzeiten liegen in einer Größenordnung von wenigen Sekunden. Da bei der Auswertung nicht immer ein hinreichend praktikables Auswertungskriterium dafür gefunden werden konnte, ob AAV während dieser Zeit ständig an der Membran entlangläuft oder zwischen erstem und letztem Kontakt mehrmals die Membran verläßt (was bei den meisten Trajektorien ohnehin signifikant der Fall war), darf davon ausgegangen werden, daß die tatsächlichen Kontaktzeiten der Viren kürzer sind als die hier ermittelten. Die hier bestimmten Zeiten scheinen ein Maß für die Zahl  $\langle n_{\text{Touch}} \rangle$  zu sein. Daher kann es nicht verwundern, wenn die bestimmten Mittelwerte für  $t$  zwischen negativem Andocken und Eindringen unterschiedlich sind. Die Spuren, bei denen AAV in die Zelle gelangt, zeigen weniger Andockwiederholungen als diejenigen, bei denen AAV nicht in die Zelle gelangt. Wenn ein Virus in die Zelle eingedrungen ist, kann es zu keinem Zellmembran-Kontakt ereignis mehr kommen.

### 7.6.3 Diffusionsverhalten im Plasma

Nach Bartlett und Samulski [197] ist die AAV-Infektion ein so effizienter Prozeß, daß das Virus alleine (ohne Fremdsubstanzen oder Begleiterviren) ein Durchdringen der Zellmembran bewerkstelligen können muß. Tatsächlich scheint die Endosombildung an der Zellmembran den Eindringzeiten nach sogar ein sehr schneller Prozeß zu sein. AAV dockt an der Zellmembran an, und das fertige Endosom beginnt sich innerhalb von weniger als 100ms im Zellplasma zu bewegen. Dabei durchläuft es in Zeitintervallen von einer bis zehn Sekunden Wegstrecken von einigen  $\mu\text{m}$ . In vielen Fällen bewegt es sich zwischen Zellmembran und Zellkern aufgebogene Trajektorie (Abbildung 7.40) im Zytoplasma (pH = 9) zeigt das AAV-Verhalten, vom Eindringen in die Zelle ausgehend bis zum Photobleichen des Farbstoffs, recht eindrucksvoll. Zunächst wandert das Virus langsam (in kleinen Einzelschritten) an der Zellmembran entlang und findet einen Andockpunkt (mit Pfeil markiert). Hier bleibt es kurz (drei Bilder) stehen und beginnt dann von hier aus auf der dem Zellinneren zugewandten Seite mit großen Einzelschritten (der mechanistischen Interpretation nach) im Endosom weiterzuwandern. Man erkennt die Wechselwirkung mit der Kernmembran und der Zellmembran. Die Trajektorie ist zweimal unterbrochen gezeichnet, weil an diesen Stellen das Farbstoffmolekül blinkt. Die Trajektorie endet nach insgesamt 89 Einzelschritten mit dem Photobleaching von Cy5.

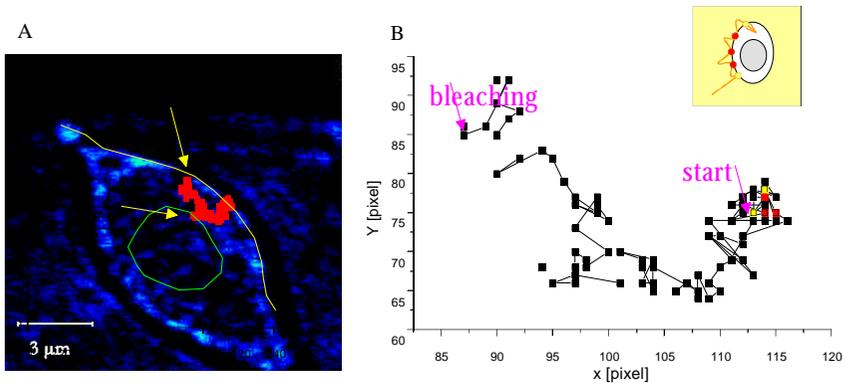


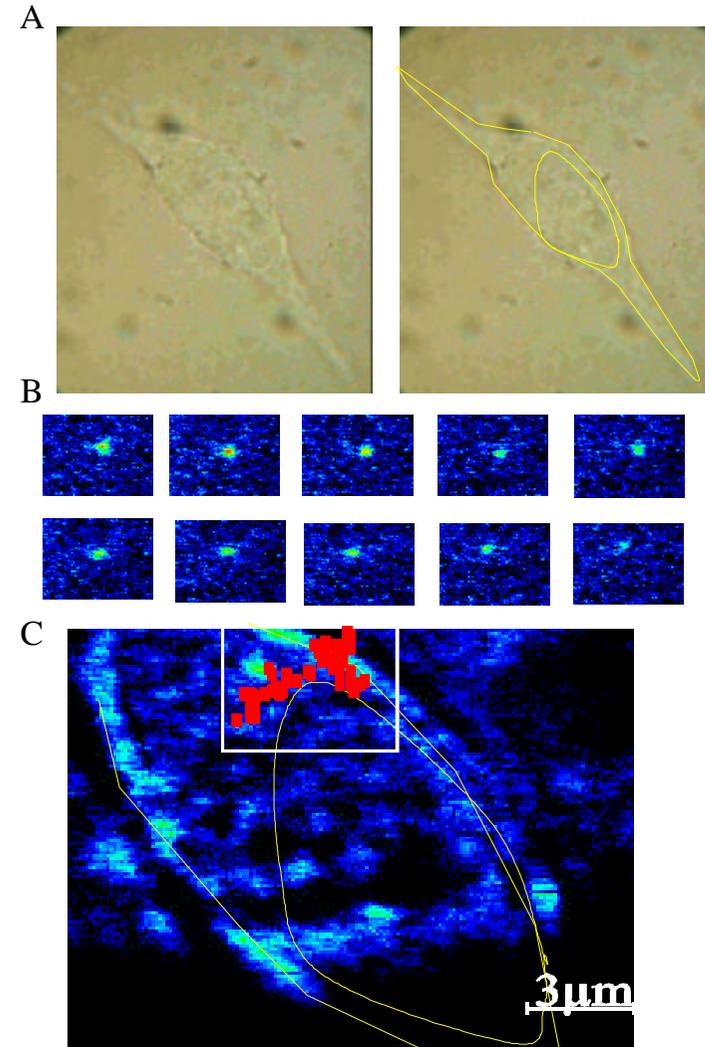
Abbildung 7.40 Die erste Trajektorie im Zytoplasma (Aufnahme bei pH = 9)

A: Durchlichtbild der Zelle mit Skizze von Zellmembran (gelb) und Kern (grün) und dem Verlauf der Trajektorie (rot). Die gelben Pfeile zeigen das „Ping-Pong-Verhalten“ zwischen Kern und Membran.

B: Verlauf der Trajektorie. Start- und Endpunkt sind mit Pfeilen hervorgehoben. Die gelben Punkte zeigen Stellen, an denen das Virus 120 ms lang, die roten Stellen, an denen es 80 ms lang an der Membran verharret. Auf vier negative Andockversuche folgt das Eindringen (vergleiche auch Schemabild).

Ausgehend von den ersten Eindrücken von SDT-Trajektorien im Zellplasma, wurde eine experimentelle Neuerung, nämlich die Installation einer Photokamera am Okularausgang des Mikroskops, eingeführt. Sie sollte es ermöglichen, zusätzlich zu den Durchlichtbildern, die mit dem herkömmlichen Setup aufgenommen werden können, bessere Zellbilder zu bekommen. Damit sollte das Wanderungsverhalten von Endosom (bzw. freiem AAV) genauer in Bezug zur

Lokalität von Zellmembran und Zellkern gebracht werden. Abbildung 7.41 zeigt eine solche Photographie und beschreibt ihre Verwendung.



Als Mittelwerte ergeben sich bei pH = 7  $\langle D_{\text{Endo-Zelle}} \rangle = 0,57 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $\langle D_{\text{Endo-Zelle}} \rangle = 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bzw. bei pH = 9  $\langle D_{\text{Endo-Zelle}} \rangle = 0,64 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Wie bei der Diffusion von Viren in wässriger Lösung sind die gemessenen D-Werte kleiner als die nach der Berechnung erwarteten Werte. Eine plausible Erklärung wurde bislang dafür nicht gefunden.

Wird die Wechselwirkung von AAV bzw. Endosom mit der lokalen Umgebung im Zytoplasma zu groß, tritt *anomale Diffusion* (siehe oben) auf. Welche Art von Wechselwirkung dabei tatsächlich auftritt ist im Einzelfall nicht zu klären. Prinzipiell mögliche Interpretationen wären: Das Auftreten einer hohen lokalen Konzentration an größeren Teilchen im Zytosol (Obstacles), die Verdichtung von zytoskeletären Substrukturen, die sich durch das Zytoplasma ziehen (Siebwirkung) oder temporäre Adsorptionsprozesse des wandernden Teilchens an Zellbestandteilen. Die Stärke solcher Wechselwirkungen, die während einer Trajektorie auftreten, nimmt mit kleiner werdendem Parameter  $\alpha$  zu. Im Experiment traten für Werte von  $\alpha = 0,6$  bis  $\alpha = 0,9$  auf. Die Verteilung der Häufigkeit von  $\alpha$  zeigt Abbildung 7.44.

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha$$

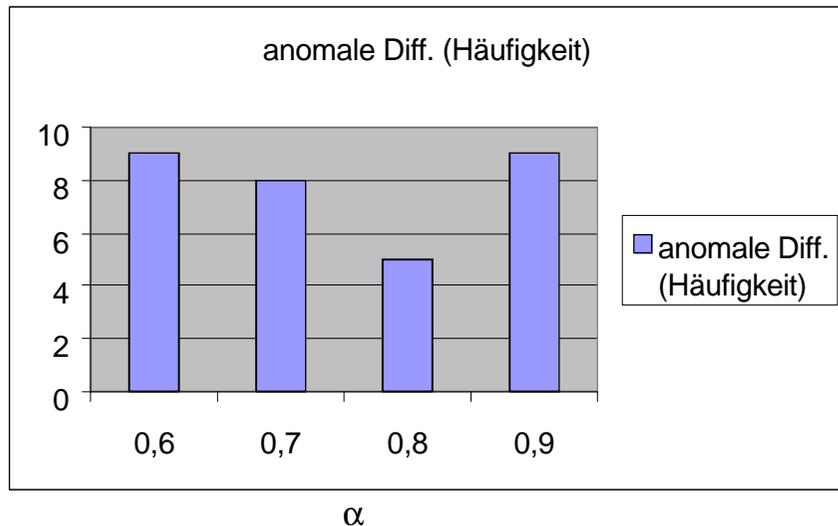
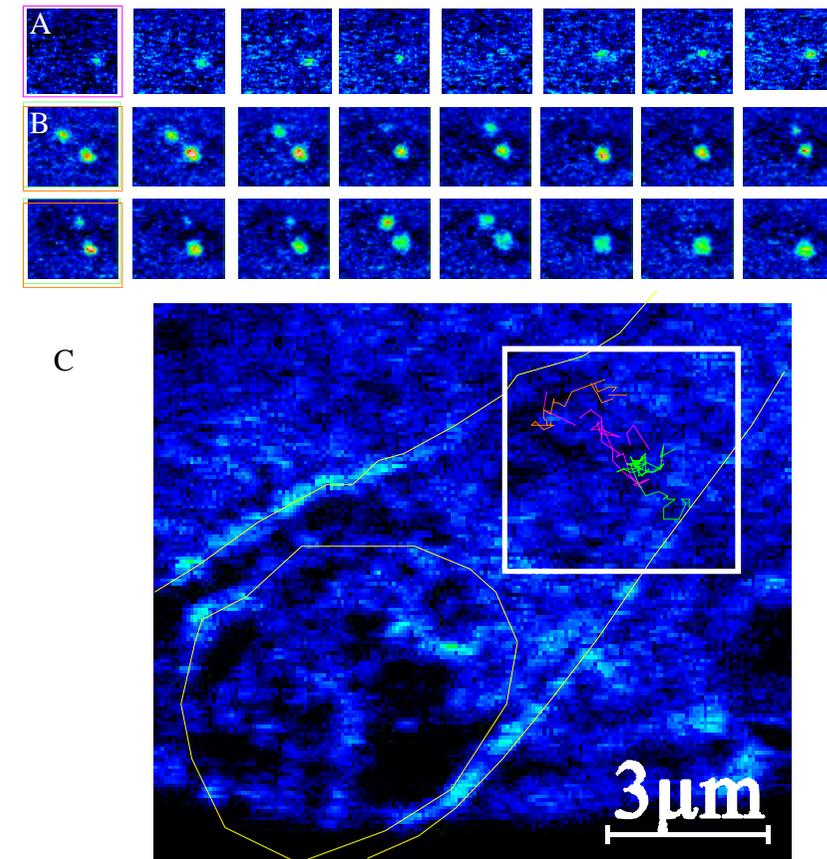


Abbildung 7.44 Häufigkeits-Verteilung der  $\alpha$ -Werte bei anomaler Diffusion

Das Balkendiagramm zeigt keine signifikanten Maxima der Häufigkeitsverteilung zwischen  $\alpha = 0,6$  und  $\alpha = 0,9$ .

Literatur [163] geht man davon aus, daß Systeme, die im Größenbereich unseres Virus liegen, um Faktor vier bis fünf erniedrigte Diffusionskoeffizienten im Zytoplasma relativ zu wässriger Lösung zeigen bzw. die effektive Viskosität im Zytoplasma für Makromoleküle scheinbar um Faktor vier bis fünf erhöht ist. Dies kann mit Modellvorstellungen erklärt werden, die zellulären Strukturen eine Art Siebwirkung zuschreiben, die zur Verlangsamung der Diffusionsbewegung von Makromolekülen führt. Obwohl die Biomoleküle dem Modell von Saxton [110] nach eigentlich *anomale diffundieren*, zeigt sich eine lineare Beziehung zwischen MSD und der Zeit  $t$  (quasi freie Diffusion). Näheres kann dem Kapitel 4.2 entnommen werden. Berechnet man nun solche „fünffmal kleineren Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{Zelle}}$ “, so ergibt sich für kugelförmige Teilchen mit Radius 13 nm (Radius von AAV) ein Wert von  $D_{\text{Zyto}}(a=13\text{nm}) = 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Für doppelt so große Radien erhält man  $D_{\text{Zyto}}(a=25\text{nm}) = 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Im Rahmen der Meßgenauigkeit kann man daher den großen gemessenen D-Wert freien AAV-Teilchen zuschreiben, den kleineren D-Wert Endosomen vor der Öffnung, die einen etwa doppelt so großen Radius (Annahme) als der freie Virus aufweisen. Diese Zuordnung erscheint sinnvoll, da bei Kontrollmessungen bei pH=9 (Zugabe von Ammoniumchlorid-Puffer), wo die sauer katalysierte Endosomöffnung



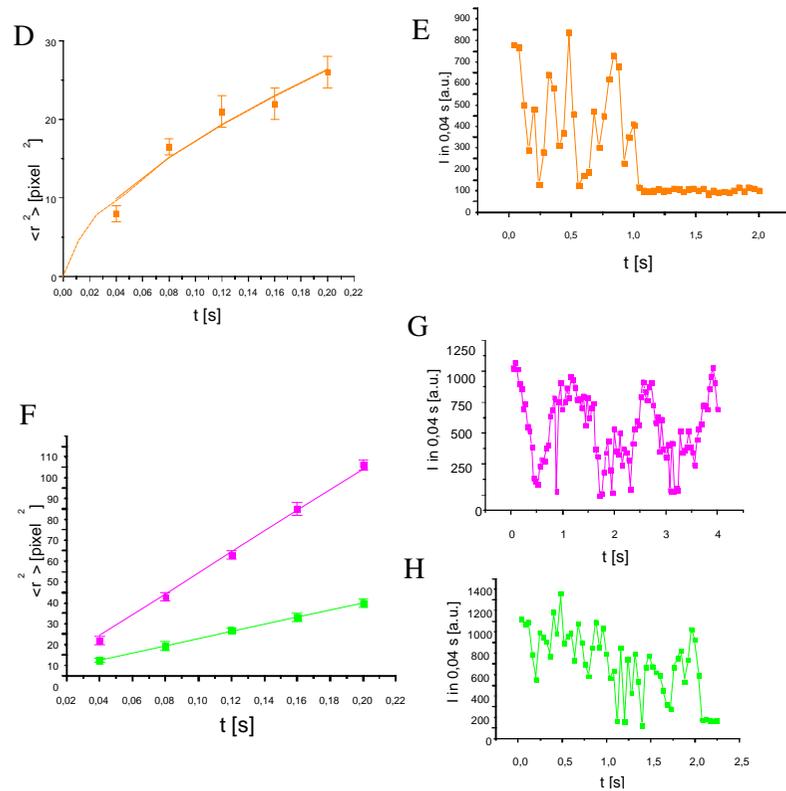


Abbildung 7.42 Vertreter der drei typischen Trajektorienarten

A, B: Bilderserien der Aufnahme von magenta-farbener (A) bzw. grüner und orangener (B) Trajektorie

C: Durchlichtbild der Zelle mit den projizierten Trajektorien

D, E:  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm und Intensitätszeitspur der orange Trajektorie

F, G, H:  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm und Intensitätszeitspur der grünen und magenta-farbenen Trajektorie

**Anomale Diffusion** zeigt die orange Trajektorie ( $D = 0,20 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $\alpha = 0,6$  im  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm; D). In der Zeitspur (E) und den ersten 16 Bildern (A) der Trajektorie (Durchlichtbild C) zeigt sich das Einzelmolekülverhalten des Labels durch Blinken.

**Lineares Diffusionsverhalten** wie es für **endosomale Wanderung** zu erwarten ist, zeigt die grüne Trajektorie (mit  $D = 0,55 \mu\text{m}^2/\text{s}$  im  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm; F). Die Folge aus 16 Bildern (B) entspricht der Zeitspur (H) ab etwa 0,5 s.

**Lineares Diffusionsverhalten** gemäß Wanderung von **freiem AAV** zeigt die magenta-farbene Trajektorie (mit  $D = 1,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  im  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm; F). Die Folge von acht Bildern (B) entspricht der Zeitspur (G) ab etwa 0,5 s.

unterdrückt ist (in keinem Fall Viren im Zellkern nachweisbar), nur ein Wert von  $D = 0,65 \mu\text{m}^2/\text{s}$  auftrat.

Die anomal diffundierenden Teilchen zeigten Werte für  $\alpha$ , die zwischen  $\alpha = 0,5$  und  $\alpha = 0,9$  lagen, und D-Werte, die von  $D = 0,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bis  $D = 1,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  reichten.

Abbildung 7.42 zeigt drei unterschiedliche Typen von Trajektorien in einer Zelle: Die orange Trajektorie zeigt anomale Diffusion, die grüne lineare Diffusion mit einem Diffusionskoeffizienten, der dem endosomalen Transport von AAV entspricht, und die magenta-farbene lineare Diffusion, wie sie der Wanderung von einem freien AAV entspricht. Die Bilderfolge der orangen Trajektorie zeigt zudem ständiges Blinking des Farbstoffes.

Die Verteilung der einzelnen Diffusionskoeffizienten der Trajektorien, die freie Diffusion zeigten, ist in den Abbildungen 7.43 für pH=9) und pH=7 wiedergegeben.

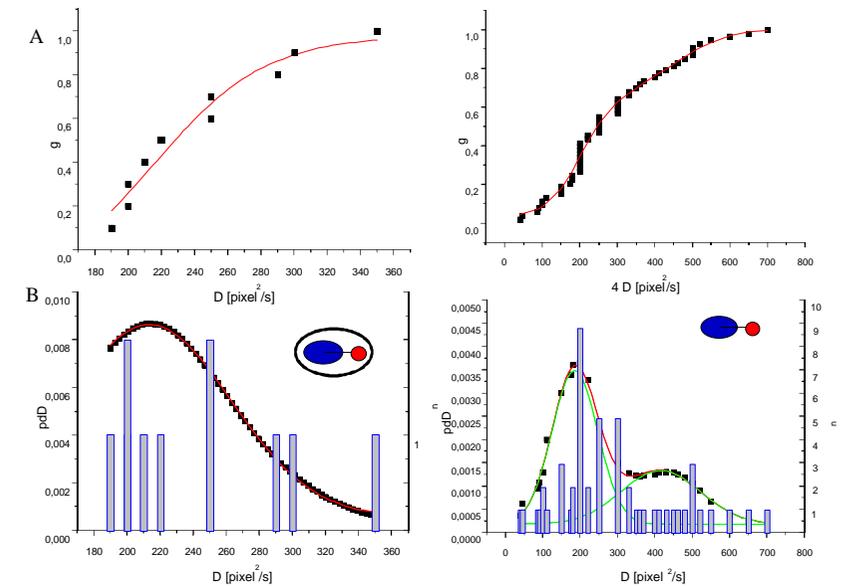


Abbildung 7.43 Verteilung der Diffusionskoeffizienten bei pH=9 (links;  $\langle D \rangle = 0,64 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) und bei pH=7 (rechts;  $\langle D_1 \rangle = 0,57 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ;  $\langle D_2 \rangle = 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ )

A: Die Integralfunktion  $g(D)$  (oben) ist der Fit (rote Linie; Sigma-Funktion), der der akkumulierten relativen Häufigkeit von  $D$  (schwarze Punkte; erhalten aus 10 Trajektorien bei pH=9 bzw. aus 53 Trajektorien bei pH=7) entspricht.

B: Die Ableitung von  $g(D)$  ergibt die Dichtefunktion  $pdD$  (schwarze Punkte unten), wenn man die Fläche dieser Funktion auf  $A=1$  normiert (Flächenberechnung durch Gaußfit, rote Linie unten). Diese Dichtefunktion zeigt die Verteilung der  $D$ -Werte ( $\langle D_{\text{Endo-Zelle}} \rangle = 0,64 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bei pH=9 bzw.  $\langle D_{\text{Endo-Zelle}} \rangle = 0,57 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $\langle D_{\text{AAV-Zelle}} \rangle = 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s} \pm 0,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bei pH=7). In blauen Balken dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung von  $D$ .

## 7.6.4 Bewegung im Kern

Die Effizienz der AAV-Infektion hängt überwiegend am effizienten Eindringen des Virus-Genoms in den Zellkern. Eine entscheidende Frage hierbei ist die Überwindung der Kernmembran. Bartlett und Samulski gehen von einer perinuklearen Anlagerung von AAV aus. Ihrer Ansicht nach verbleibt das Virus während der ersten Phase der Anlagerung möglicherweise noch im bereits teilweise stofflich abgebauten Endosom. Allerdings sind sie sicher, daß die Endosomöffnung bereits vorher abgeschlossen ist. Die perinucleare Anlagerung ist in ihren Experimenten mit unphysiologisch vielen Viren (Minimum mehrere Zehntausend je Zelle) über einen Zeitraum von 40 Minuten bis mehreren Stunden nach dem Start der Infektion zu beobachten. Zudem können sie nachweisen, daß ein Anteil an gelabeltem Virus-Kapsid (nach einigen Stunden) in den Zellkern eindringt. Sie vermuten, daß AAV als ganzes in den Zellkern gelangen kann, obwohl sie nicht mit Sicherheit davon ausgehen können, daß seine Proteinhülle unverändert bleibt [197].

Die Frage, inwieweit AAV als ganzes in den Kern eindringen kann, hängt davon ab, ob es die sogenannten Kernporenkomplexe (NPC, nuclear pore complex) durchqueren kann, die - vereinfacht betrachtet- funktionale Öffnungen an der Kernmembran zum Zellplasma hin darstellen. Der Eindringmechanismus in den Kern unterscheidet sich bei vielen Viren je nach Aufbau, Größe und Struktur des Kapsids [203, 250]. So führen RNA-Viren wie HIV- oder Influenza-Viren einen Nucleoproteinkomplex in spezieller Konfiguration über die NPC mit in den Kern ein [243-245]. Kleine DNA-Viren, wie SV40, durchdringen die NPC nach einer Konformationsänderung des Kapsids [246]. Große DNA-Viren, wie Adenoviren oder Herpes-Viren, streifen bereits vor dem Erreichen der Kernmembran einen Großteil ihres Kapsids ab. Sie docken dann - immer noch von einem Restkapsid umgeben - an den NPC an und streifen dort auch mit Hilfe der NPC die übrige Proteinhülle ab und entlassen ihr Genom ins Kernplasma [203, 247]. Als kleiner DNA-Virus mit einem Durchmesser von etwa 25 nm sollte AAV eventuell in der Lage sein, NPC (Durchmesser 23 nm) durchdringen zu können.

In unseren Experimenten konnte zweifelsfrei bestätigt werden, daß AAV, inklusive Kapsid, in die Region des Zellkern von HeLa-Zellen eindringt. Eine perinucleare Anlagerung im Sinne einer längeren Verweilzeit (im Minuten- oder gar Stundenmaßstab) an der Kernmembran konnte in keinem Fall gefunden werden. Wir halten die Verweilzeit für ein Artefakt fluorezenzmikroskopischer Untersuchungen an unphysiologisch stark infizierten Zellen. Möglicherweise kommt es in solchen Experimenten an der Kernoberfläche zu AAV-Verklumpungen, die ein Eindringen ins Kerninnere durch die NPC unmöglich machen. Innerhalb der Region des Kerns selbst wurden neben einigen immobilen Molekülen knapp einhundert SDT-Trajektorien gefunden, die Wanderungen mit gerichteter Bewegung über mehrere  $\mu\text{m}$  zeigten. Diese Bewegungen scheinen in Röhren stattzufinden, wie sie von Fricker [248] oder Broers beschrieben werden [282]. Mehrere Viren beschränkten nämlich in gleichen Zellen oft exakt gleiche Wanderungstrajektorien. Alle Trajektorien zeigen eine Bewegung, die in Kapitel 4.2 als directed motion bezeichnet wurde, und somit Abweichung vom freien Diffusionsverhalten.

Die Diffusionsbewegung ist überlagert von einer gerichteten Bewegung, verursacht entweder durch eine Strömung oder durch Motorproteine, die innerhalb von Kanälen, die den Kern durchziehen, vorhanden sind. Die gemessenen Diffusionskoeffizienten liegen zwischen  $0,25 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $0,35 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und sind, verglichen mit denen des freien Virus im Cytoplasma ( $\langle D_{\text{AAV-Zelle}} \rangle = 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), deutlich langsamer. Die Kanäle scheinen also nicht viel größer zu sein als das Virenkapsid und bremsen somit den Diffusionsanteil der Bewegung. Die Strömungsgeschwindigkeit liegt zwischen  $v = 0,2$  und  $v = 1,4 \mu\text{m}/\text{s}$ . Sie kann in gleichen Kanälen zeitabhängig unterschiedlich groß sein. Abbildung 7.45 zeigt zwei gleichzeitig

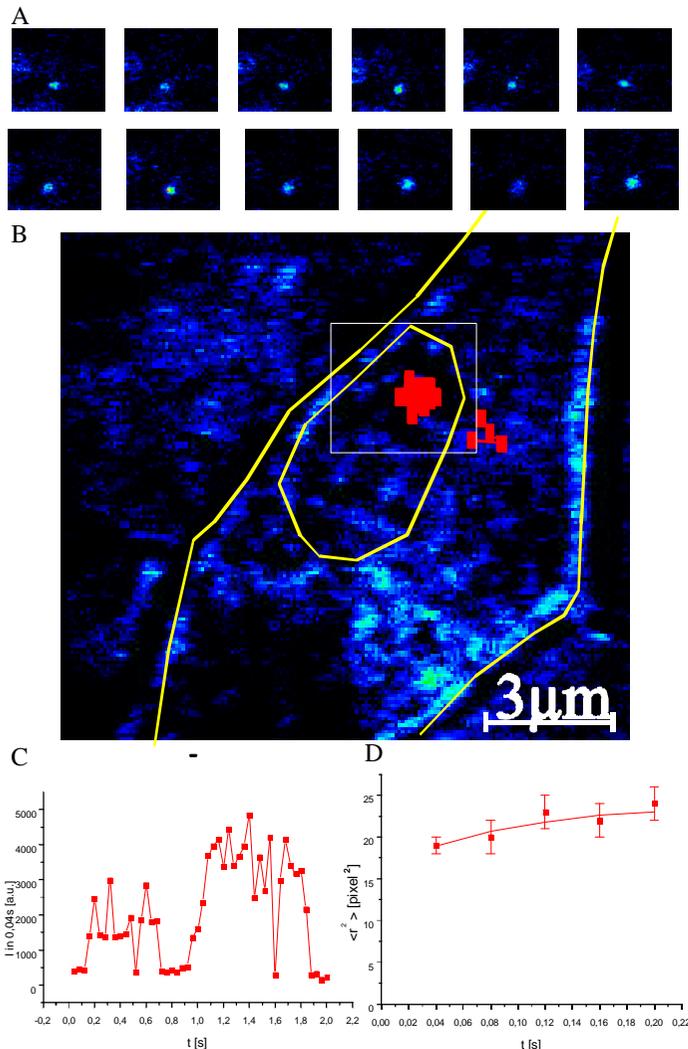


Abbildung 7.47 „Confined Motion“ im Zellkern

A: Dargestellt ist ein Ausschnitt der Bilderserie von 12 Bildern (A; Start bei etwa 1,2 s in der Zeitspur C).

B: Die Trajektorie über dem Durchlichtbild der Zelle zeigt im Teil innerhalb des Zellkerns das Verhalten ständigen Überstreichens einer Fläche mit Durchmesser von etwa  $d = 1 \mu\text{m}$ .

C: Intensitätszeitspur

D: Im  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramm (D) zeigt sich ein asymptotischer Verlauf mit einem Grenzwert von  $r_c = 25 \text{ pixel}^2$ .

aufgenommene Trajektorien in einer Zelle mit großem Zellkern. Beide Viren wandern gerichtet, aber in verschiedene Richtungen, was eine systematische Driftbewegung des ganzen Kerns als Erklärung für die gerichtete Bewegung unmöglich macht.

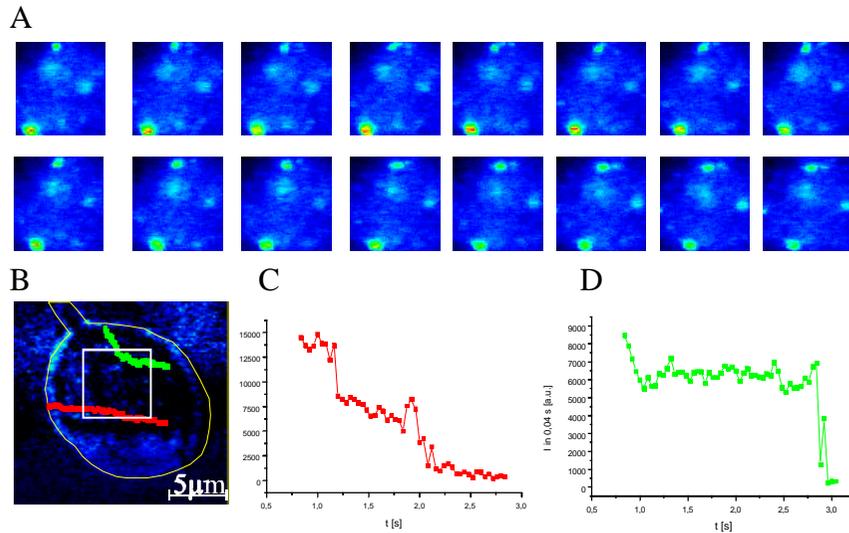


Abbildung 7.45 Diffusion mit gerichteter Bewegung im Kern

A: Ausschnitt der Bilderfolge, die in 16 Bildern die rote und grüne Trajektorie zeigt  
 B: Die beiden schematisch über dem Durchlichtbild eingezeichneten Trajektorien zeigen gerichtete Bewegung über mehr als 10  $\mu\text{m}$ . Die Lage der Fluoreszenzbilder relativ zur Durchlichtaufnahme zeigt das weiße Quadrat (unten links).  
 C und D: Die abgebildeten Zeitspuren sind so dargestellt, daß ihre jeweils ersten Punkte mit dem ersten Bild in A beginnen.

Abbildung 7.46 zeigt verschiedene Trajektorien im gleichen Zellkern. Man erkennt zwei im gleichen Kanal wandernde Viren. Die einzelnen MSD-t-Diagramme zeigen parabelähnlichen Verlauf. Interessant ist auch, daß eine Trajektorie (magenta) den ganzen Kern zu durchqueren scheint.

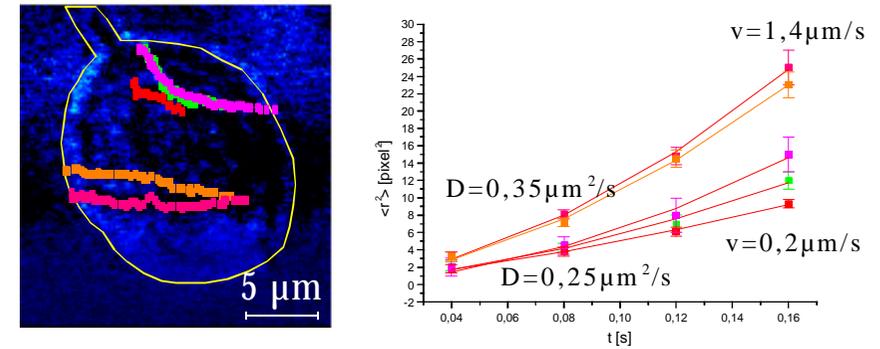


Abbildung 7.46 Trajektorien durch den Zellkern mit zugehörigen  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagrammen

Die  $t-\langle r^2 \rangle$ -Kurven zeigen, daß die Diffusion von einer gerichteten Bewegung überlagert ist (directed motion).

Eine mögliche Erklärung für das hier erstmals beschriebene Wanderungsverhalten von AAV im Zellkern bietet die von Fricker und Vaux [248] gefundene röhrenartige Struktur innerhalb des Zellkerns verschiedener Zelltypen (auch von HeLa-Zellen), die man sich als Ergebnis von Einstülpungen in der Kernmembran denken kann. Diese Einstülpungen formen Kanäle von weniger als 100 nm bis 400 nm Durchmesser, die von der Kernoberfläche bis tief ins Kerninnere reichen, teilweise sogar durch den ganzen Kern gehen und dabei feine Verästelungen zeigen. Die Oberfläche dieser Kanäle ist mit NPC bedeckt [248]. Ein nur schwach ausgeprägtes Netzwerk an Röhren vorausgesetzt, bieten diese Kanäle im Zellkerninneren den Vorteil, daß nahezu alle Transportwege vom Zellplasma zu allen Stellen des eigentlichen (von der Kernmembran umgebenen) Kerninneren wesentlich verkürzt sind, wenn man sie mit der Wanderung von der Kernumrandung aus vergleicht. AAV scheint beim Eindringen in den Zellkern diese Kanalstrukturen zu nutzen, da alle Bewegungen im Zellkern gerichtet waren und entsprechendes Bewegungsverhalten im t-MSD-Diagramm zeigten. Die Größe (der Durchmesser) der einzelnen Röhre könnte sowohl die verschiedenen Flußgeschwindigkeiten  $v$  in diesen Kanälen erklären als auch die Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten. Auch die Wanderung quer durch den Zellkern, wie sie einige Trajektorien zeigen (vergleiche auch Abbildung 7.45), könnte als Wanderung eines Virus quer durch eine den Kern komplett durchdringende Röhre erklärt werden. Die Frage, ob AAV letztendlich mit seinem Kapsid durch die NPC in den Zellkern aufgenommen oder ob nur das Virusgenom eingeschleust wird, läßt sich in diesem Experiment nicht klären. Wir können nicht ausschließen, daß AAV im Kern nicht bereits NPC durchquert hat und jenseits der Membran mit ähnlichem Bewegungsverhalten weiterwandert.

Auch ein Steckenbleiben im Kern kann zum einen auf ein Andocken des Virus an NPC mit anschließender Kapsidöffnung und Genomeinschleusung (wie etwa beim Adenovirus) hindeuten. Andererseits kann es sein, daß AAV jenseits der NPC, die in den „Einstülpungsröhren“ sitzen, nur mehr eine geringe Wegstrecke zurücklegt. Möglicherweise sind die letzten Wanderungsschritte vor dem Andocken im wirklichen Kerninneren in der Trajektorie gar nicht mehr identifizierbar, weil sie nur noch im Bereich einiger hundert nm liegen. Hier müssen etwas modifizierte Experimente durchgeführt werden, in denen mit verschiedenen Labeln an Genom und (zugleich) Kapsid gearbeitet wird.

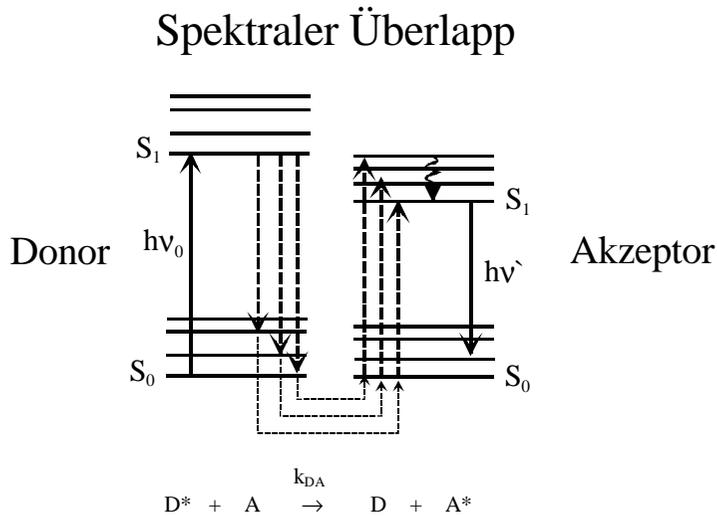


Abbildung 8.1 Termschema einer Energietransferreaktion mit Donor D und Akzeptor A und Übergangsrate  $k_{DA}$

Die zeitabhängige Schrödinger-Gleichung (vergleiche auch Kapitel 2.1), angewandt auf ein einfaches Zweiniveausystem (m: Anfangszustand, n: Endzustand), liefert die Übergangsrate  $k_{mn}$  [224] in Gleichung (8-1).

$$k_{mn} = \frac{2p}{h} \mathbf{d}(E_n - E_m) |\langle \Psi_m | H' | \Psi_n \rangle|^2 \quad \delta: \text{Diracsche } \delta\text{-Funktion} \quad (8-1)$$

Energietransfer findet nur statt, wenn  $E_m = E_n$ . Absorption von A und Emission von D treten mit gleicher Wellenlänge auf.

$$\Psi_i = \frac{1}{\sqrt{2}} (D_{(1)}^* A_{(2)} \pm D_{(2)}^* A_{(1)}) \quad \Psi_f = \frac{1}{\sqrt{2}} (D_{(1)} A_{(2)}^* \pm D_{(2)} A_{(1)}^*)$$

Seien nun  $\psi_i$  und  $\psi_f$  symmetrieangepaßte Wellenfunktionen (Gleichungen oben; m=i: initial, n=f: final), dann erhält man die Übergangsrate  $k_{DA}$  bei Berücksichtigung aller erlaubten Schwingungszustände von D und A (8-2). Der eine Zustand i im Zweiniveausystem ist, der Vorstellung der Berechnung nach, die Situation vor dem Transfer (Donor angeregt, Akzeptor nicht), der andere Zustand f die Situation nach dem Transfer (Akzeptor angeregt, Donor nicht).

Abbildung 7.47 zeigt eine Besonderheit, die in zwei von 96 Fällen auftrat. Diese könnte darauf hindeuten, daß AAV tatsächlich die NPC mitsamt Kapsid durchdringen kann. Im Inneren der Zellkernumrandung tritt eine Bewegung des Virus auf, die in Kapitel 4.3 als „confined motion“ bezeichnet worden ist. Das MSD-t-Diagramm zeigt asymptotischen Verlauf. Die waagrechte Asymptote liegt bei  $25 \text{ pixel}^2 = 0,29 \mu\text{m}^2$ . Der Radius der kreisförmigen Begrenzung liegt also bei etwa  $0,5 \mu\text{m}$ . Das wird auch aus der schematisch gezeichneten Trajektorie (Durchmesser des Kreises aller roten Punkte bei  $1 \mu\text{m}$ ) sichtbar. AAV diffundiert also frei im Kerninneren. Der zur Bewegung frei verfügbare Raum ist aber so klein, daß die einzelnen Bewegungsschritte im Zeitfenster des Experiments bereits so groß sind, daß sie an der Begrenzung stets abprallen und so deren Größe ausmessen. Inwieweit es sich um eine Bewegungen im Raum zwischen einzelnen Chromatid-Domänen [281] handelt, ist derzeit unklar.

Es wurde versucht, das Eindringverhalten in den Kern mit ähnlichen Zeitbestimmungen wie beim Eindringen durch die Zellmembran ins Cytoplasma zu charakterisieren. Nach dem oben beschriebenen Röhrenmodell ist diese Auswertung (die sich rein an der Kernumrandung orientiert) zweifelhaft. Dennoch bestätigt sich bei den wenigen Trajektorien, die ein Eindringverhalten im Sinne der Durchquerung der gedachten Kernmembranumrandung zeigten (und dann auch ihr Bewegungsverhalten änderten!), daß eine Verzögerung im Sinne einer perinuclearen Anlagerung nicht auftrat. Die Kontaktzeiten an der Kernmembran (vom ersten Kontakt zum tatsächlichen Eindringen) lagen im Bereich von etwa einer Sekunde ( $\langle \Delta t_{\text{contact}}(\text{cy} \rightarrow \text{n}) \rangle = 0,9 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ ; Abbildung 7.48).

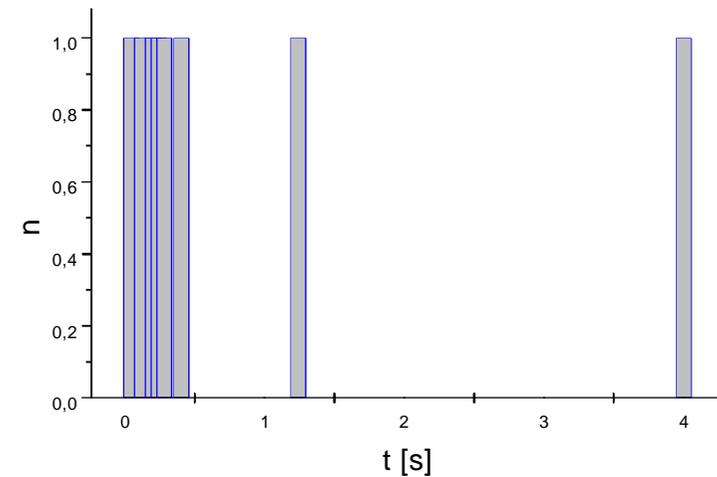


Abbildung 7.48 Kontaktzeiten an der Kernmembran bis zum Eindringen

Der Mittelwert aus sechs Trajektorien, die Eindringen in den Kern zeigten beträgt ( $\langle \mathbf{Dt}_{\text{contact}}(\text{cy} @ \text{n}) \rangle = 0,9 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ ).

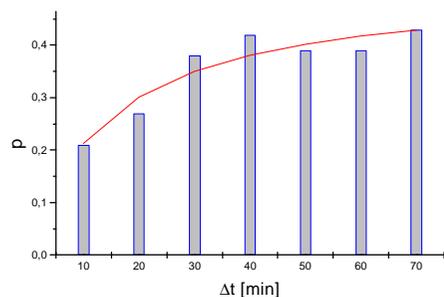


Abbildung 7.49 Zeitliche Abhängigkeit der Infektionswahrscheinlichkeit  $p$

Die Halbwertszeit der Infektion von einigen hundert gescreent Zellen betrug  $t_{1/2}(\text{infection}) = 15 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ . Infektionskriterium war die Identifizierung mindestens eines immobilisierten AAV im Zellkern.

Beim schnellen Screenen über einige hundert Zellen zeigte sich, daß nach einer Halbwertszeit von 15 Minuten mindestens ein immobilisiertes Virus im Kern der Hälfte der untersuchten Zellen gefunden werden konnte (Abbildung 7.49). Der Endpunkt der Infektion liegt also in einem kürzeren Zeitbereich als innerhalb der bislang angenommen mehreren Stunden [197]. Ähnliche Infektionszeiten finden sich auch bei Untersuchungen von Leopold et. al. für die Infektion von Adenoviren in A 549- Epithel-Karzinom-Zellen [198].

Als Fazit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Eindringmechanismus von AAV in HeLa-Zellen lassen sich folgende Punkte festhalten:

- 1) Mit Hilfe der Einzelmoleküldetektion, speziell mit single dye tracing ist es erstmals gelungen den Infektionsweg eines einzelnen Virus in einer lebenden Zelle in Echtzeit zu verfolgen.
- 2) Damit steht für auch für weitere virologische Untersuchungen ein bildgebendes Verfahren zur Verfügung, mit dem Virusinfektionen unter physiologischen Bedingungen mit hoher Orts- (100 nm Positionsgenauigkeit) und Zeitauflösung (40 ms Detektionszeit) verfolgt werden können.
- 3) Die einzelnen Stadien einer Virusinfektion sind im Detail analysierbar, bei AAV sind dies:
  - 3a) Das Andocken an der Zellmembran mit anschließendem Eindringen in die Zelle.  
Hierbei kann die Effizienz des Eindringens erstmals bestimmt werden ( $\eta=13\%$ ). Das negative Andockverhalten sowie Adsorptions- und Eindringzeiten an der Zellmembran sind statistisch charakterisierbar.
  - 3b) Die virale Wanderung im Zytoplasma mit und ohne Endosom.  
Diffusionskoeffizienten können für jede einzelne Trajektorie bestimmt werden. Sie geben Hinweis auf den endosomalen Wanderungsprozess im Zytoplasma, auf Endosomöffnung und anschließende Diffusion von freiem Virus. Die Bildung von einem Endosom für jeden einzelnen Virus konnte gefunden, die Größe des Endosoms ( $a=25 \text{ nm}$ ) bestimmt werden. Das anomale Diffusionsverhalten im Zytoplasma deutet auf Wechselwirkungen von AAV und Plasmabestandteilen hin.
  - 3c) Die Bewegung von AAV in der Region des Zellkerns.  
AAV bewegt sich mit sog. directed motion in der Region des Zellkerns. Die Art dieser Bewegung gibt Hinweise auf den Zellkern durchziehende Röhren in HeLa-Zellen. Der Transportmechanismus macht die Existenz einer Strömung oder von Motorproteinen nötig.

## 8. Modelluntersuchungen zum Energietransfer nach Förster

Unter *elektronischem Energietransfer* versteht man die Übertragung der Anregungsenergie eines Chromophors auf ein zweites, andersartiges Molekül.

In der vorliegenden Arbeit soll vor allem *strahlungsloser intramolekularer Energietransfer* [220] nach dem Förstermechanismus (*förster resonance energy transfer, FRET*) [83, 221] zwischen zwei fest verbundenen Chromophoren betrachtet werden.

### 8.1 Prinzipielle Möglichkeiten der Energieübertragung

Elektronisch angeregte Moleküle können durch verschiedene Mechanismen Energie übertragen. Abgesehen von mechanischen Prozessen (wie etwa elastische Stöße) unterscheidet man im *wesentlichen strahlende* (Reabsorption von Fluoreszenzlicht des Donors durch den Akzeptor) und *strahlungslose Energieübertragung*. In kleinen Anregungsvolumina und bei geringer Probenkonzentration ist die Wahrscheinlichkeit des strahlenden Prozesses minimal, wohingegen quantenmechanisch erklärable strahlungslose Wechselwirkungen von solchen Parametern unabhängig sind. Beide Mechanismen lassen sich durch die Bestimmung der Donorlebenszeit und die Auswertung von Donor-Fluoreszenzspektren in Abhängigkeit von der Konzentration unterscheiden. Unter den vorliegenden experimentellen Gegebenheiten der Einzelmoleküldetektion wird in dieser Arbeit nur *strahlungsloser Energietransfer* betrachtet.

Die Literatur kennt zwei unterschiedliche Mechanismen der strahlungslosen Energieübertragung, die auf Dexter [222] und Förster [83, 221] zurückgehen. Beide Varianten lassen sich als Grenzfälle der quantenmechanischen zeitabhängigen Störungsrechnung erster Ordnung charakterisieren bzw. einordnen [223, 226].

Das allgemeine Termschema einer Energietransferreaktion zeigt Abbildung 8.1 (Bezeichnungen siehe dort).

Betrachtung) der DNA-Stränge (z.B. enzym-induzierter Bruch an einer bestimmten Stelle) konnten aufgezeigt werden, ebenso wie Veränderungen an sog. Hairpins oder an CI2 (einem kleinen Protein), die durch konzentrationsabhängige Enzymzugabe steuerbar waren [87, 230, 233]. Abbildung 8.3 stellt Untersuchungen mobiler Moleküle im örtlich konstanten Laserfokus zusammenfassend dar.

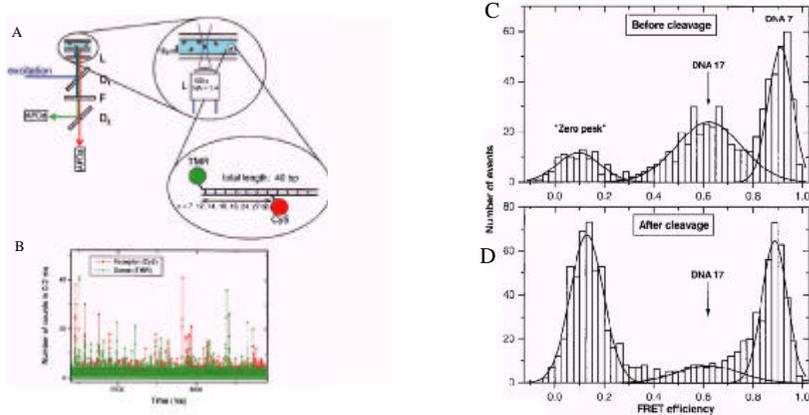


Abbildung 8.3 Energietransferexperimente im Flow [87]

A, B: schematischer Aufbau (A); markant sind die Arbeit mit konstantem Laserfokus, durch den Moleküle sich bewegen und die Teilung des detektierten Fluoreszenzlicht mit dikroitischen Strahlteilern in einen Donor- (grün) und einen Akzeptorkanal (rot). Die Bursts sind in entsprechender Farbe in B dargestellt.

C, D: FRET-Histogramm einer Probe, die DNA-Stränge zweier Längen (DNA 7 mit großer FRET-Quantenausbeute) und DNA 17 (mit kleinerer FRET-Quantenausbeute) beinhaltet (C). Der dritte auftretende sog. „Zero-Peak“, kommt von einer Fraktion, die nur das Donor-Signal zeigt. Dies tritt in C auf, weil eine gewisse Menge DNA-Strang entweder keinen Akzeptor (Cy5) aufweist (Labelproblem) oder dieser photochemisch zerstört wurde (photobleaching). Durch Enzymzugabe wird die längersträngige Fraktion gebrochen und nimmt in D in ihrer Häufigkeit ab. Die kurzkettinge Fraktion bleibt unverändert. Der Zero-Peak steigt mit der Abnahme der längersträngigen Fraktion an, weil die gebrochenen Stränge nur mehr Donor (TMR, angeregt und damit nachweisbar) oder nur mehr Akzeptor aufweisen (nicht nachweisbar).

Der Nachteil der oben angesprochenen Burst-Methode ist ihre Unzugänglichkeit bei der Messung von dynamischen Prozessen innerhalb von biologischen Makromolekülen. Diese werden in der Regel an immobilisierten Systemen studiert. Die experimentelle Anordnung der Detektion ist in solchen Untersuchungen zur Proteindynamik aber die gleiche wie in Abbildung 8.3. Proteindynamik wurde am Enzym SNase (Staphylococcal Nuclease) ausgiebig studiert [86, 232]. Die grundlegende Idee dieser Versuche zeigt Abbildung 8.4. Es kann entweder mit intra- oder intermolekularem spFRET gearbeitet werden. Antikorrelierte Fluktuationen in Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz zeigen zeitabhängig betrachtet die konformative Dynamik des Proteins.

$$k_{DA} = \frac{2p}{h} \int dE r_D(E) r_A(E) |\langle \Psi_i | H' | \Psi_f \rangle|^2 \quad \rho: \text{ Zustandsdichte} \quad (8-2)$$

Den Erwartungswert erhält  $\langle \Psi_i | H' | \Psi_f \rangle$  man durch zeitunabhängige Störungsrechnung 1. Ordnung (8-3).

$$\langle \Psi_i | H' | \Psi_f \rangle = \langle D_{(1)} A_{(2)}^* | H' | D_{(1)}^* A_{(2)} \rangle \pm \langle D_{(1)} A_{(2)}^* | H' | D_{(2)}^* A_{(1)} \rangle = C \pm A \quad (8-3)$$

Das Coulombintegral C in dieser Gleichung entspricht dem Förster-, das Austauschintegral A dem Dexter-Mechanismus.

Der Dexter-Mechanismus wird auf das Austauschintegral A zurückgeführt und tritt nur bei sehr kurzen Chromophorabständen bis zu  $R = 1 \text{ nm}$  auf. Da in den meisten biologisch relevanten Systemen und auch im in dieser Arbeit untersuchten Modellsystem Pe-TDI (Perylen gekoppelt mit Terrylendiimid) [227] die Schwerpunkte beider Chromophore wesentlich weiter voneinander entfernt sind, wird im Detail nur auf den Förster-Mechanismus eingegangen, der bei Molekülabständen zwischen 2 und 8 nm auftritt.

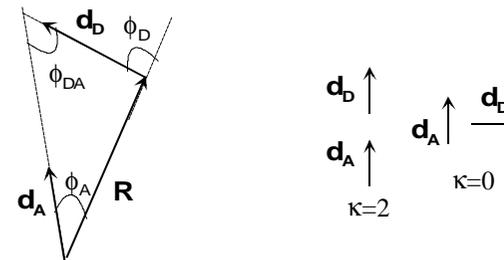


Abbildung 8.2 Vektorielle Größen zum Verständnis der dipolaren Kopplung (links) und die Extremfälle für den Orientierungsparameter  $\mathbf{k}$  (rechts)

## 8.2 Förster-Theorie des dipolaren Energietransfers

Bislang wurde nicht näher auf den Hamiltonoperator  $H'$  eingegangen, der die für den Energietransfer notwendige Störung beschreibt. In Försters Theorie wird der Erwartungswert  $\langle \Psi_i | H' | \Psi_f \rangle = H_{dd}$  als Wechselwirkung der Ladungsverteilung elektronischer Übergänge beschrieben [83]. In erster Näherung werden nur Übergangsdipolmomente betrachtet.  $H_{dd}$  ist damit nichts anderes als der Tensor der dipolaren Kopplung der Übergangsdipolmomente von Donor ( $\mathbf{d}_D$ ) und Akzeptor ( $\mathbf{d}_A$ ), wie in Gleichung 8-4 zusammen mit Abbildung 8.2 dargestellt (Bezeichnungen dort).

$$H_{dd} = \frac{3(\mathbf{R}^0 \mathbf{d}_D)(\mathbf{R}^0 \mathbf{d}_A) - (\mathbf{d}_A \mathbf{d}_D)}{n^2 R^3} = \frac{\mathbf{d}_A \mathbf{d}_D \mathbf{k}}{n^2 R^3}$$

$$\mathbf{k} = 3 \cos \mathbf{f}_D \cdot \cos \mathbf{f}_A - \cos \mathbf{f}_{DA}$$

( $\kappa$ : Winkelfaktor;  $\mathbf{R}^0$ : Einheitsvektor von  $\mathbf{R}$ ;  $n$ : Brechungsindex des Mediums) (8-4)

Gleichung (8-2) läßt sich somit in Gleichung (8-5) umformen.

$$k_{DA} = \frac{2p}{h} \frac{k^2}{n^4 R^6} \frac{1}{hc} \int d\tilde{\mathbf{n}} \mathbf{d}_A \mathbf{d}_D \mathbf{r}_D(\tilde{\mathbf{n}}) \mathbf{r}_A(\tilde{\mathbf{n}}) \quad (8-5)$$

Die Rate des Förster-Energietransfers sinkt mit  $R^6$  ( $R$ : Abstand beider Chromophore) und  $n^4$  ( $n$ : Brechungsindex des Probenmediums). Der Winkelfaktor  $\kappa$  geht quadratisch in Gleichung (8-5) ein und beschreibt den Einfluß der gegenseitigen Orientierung beider Übergangsdipolmomente zueinander.  $\kappa^2$  nimmt Werte zwischen 0 und 4 an (vergleiche Abbildung 8.2). Für statistisch verteilte Vektoren gilt  $\langle \kappa^2 \rangle = 2/3$ . Eine anschauliche Größe ist der *Förster-Radius*  $R_0$ . Er ist der Abstand zweier Chromophore, bei dem die Rate des Energietransfers  $k_{DA}$  und die der sonstigen Desaktivierung in den elektronischen Grundzustand  $k_{des}$  übereinstimmen. Die Quantenausbeute  $\Phi_{ET}$  des Energietransfers beträgt dann genau  $\Phi_{ET} = 50\%$ . Zur Bestimmung von  $R_0$  benötigt man neben der Fluoreszenzquantenausbeute des Donors  $\Phi_D$ , das Absorptionsspektrum des Akzeptors  $\epsilon_A$  ( $\epsilon_A$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient) und das normierte Fluoreszenzspektrum des Donors  $f_D^0$  [226]. Mit der Einführung des Försterradius erhält man Gleichung (8-6).

$$k_{DA} = \frac{1}{\tau_0} \frac{R_0^6}{R^6} \quad \text{mit} \quad R_0^6 = \frac{9 \ln 10 \Phi_F k^2}{128 p^5 n^4 N_A} \int f_D^0(\tilde{\mathbf{n}}) \epsilon_A(\tilde{\mathbf{n}}) \frac{d\tilde{\mathbf{n}}}{\tilde{\mathbf{n}}^4} \quad (8-6)$$

Die Berechnung der *Quantenausbeute*  $\Phi_{ET}$  des Energietransfers (Anteil des stahlungslosen Energietransfers am Gesamtprozeß der Energieabgabe von D) erfolgt gemäß Gleichung 8-7.

$$\Phi_{ET} = \frac{k_{DA}}{k_{DA} + k_{des}} = \frac{\frac{1}{\tau_0} \frac{R_0^6}{R^6}}{\frac{1}{\tau_0} \frac{R_0^6}{R^6} + \frac{1}{\tau_0}} = \frac{1}{1 + \frac{R^6}{R_0^6}} \quad (8-7)$$

## 8.3 Bedeutung des FRET für die Einzelmoleküldetektion in der Biologie

Seit dem Erscheinen des ersten Einzelmolekülartikels über FRET [225], der erstmals grundlegende experimentelle Einzelmolekül-Techniken zu FRET mit den Chromophoren Tetramethylrhodamin (Donor) und Texas-Rot (Akzeptor) beschreibt (vergleiche [226]), die über DNA-Stränge verschiedener Länge verbunden sind, hat sich FRET am einzelnen Donor-Akzeptorpaar (*single pair förster resonance energy transfer, spFRET*) als wichtiges Werkzeug zur Abstandsmessung [225] und zum Nachweis der Kolokalisation [82] von Chromophoren mit Hilfe der Einzelmoleküldetektion, vor allem in biologischen Systemen erwiesen, wo Donor und Akzeptor als Label eines Makromoleküls eingesetzt werden.

Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeiten lassen sich zwei wesentliche Richtungen von Experimenten erkennen, die biochemische Problematiken umfassen. Die erste Richtung ist rein analytischer Natur. Sie knüpft an Experimente in Lösung im örtlich konstanten Laserfokus an [228, 229], wie sie im Kapitel 3.1.5 beschrieben sind, und kann helfen, (Sub-) Ensembles mit definierter Donor-Akzeptoranordnung in Gemischen zu identifizieren. Die andere Richtung beschäftigt sich mit Proteindynamik, vor allem mit dem komplexen Feld der Proteinfaltung.

Die Messung von Fluoreszenzbursts erzeugt von Molekülen, die durch einen definierten, örtlich konstanten Laserspot strömen oder diffundieren, dient in erster Linie analytischen Zwecken. Die Zeitfenster der Detektion sind in der Regel so klein, daß makromolekulare Dynamiken nicht auflösbar (beobachtbar) sind. Durch wellenlängenabhängige Teilung des Fluoreszenzsignals mit einem dikroitischen Strahlteiler gelingt es, zwei unabhängige Detektionskanäle für Donor- und Akzeptorfluoreszenz zu erhalten. Aus den Intensitätsverhältnissen beider Kanäle kann die Quantenausbeute des Energietransfers bestimmt werden (vergleiche Kapitel 7.7). Zu jedem Burstpaar eines Donorakzeptor-Paares läßt sich die entsprechende Quantenausbeute angeben. Damit kann in experimentell sehr kurzer Zeit eine statistische Verteilung dieser Quantenausbeute in der gesamten Lösung (genauer über alle sich durch den Fokus bewegenden Teilchen) erhalten werden. Den großen Nutzen dieser analytischen Methode demonstrierten Deniz et al., die mit an beiden Enden gelabelten DNA-Strängen (TMR und Cy5 als Fluorophore) variabler Länge experimentierten. Sie konnten verschieden lange Stränge, die gleichzeitig in Lösung vorlagen, identifizieren und in ihren Mengenverhältnissen quantifizieren. Auch Veränderungen (im Sinne einer vorher-nachher

### 8.5 Experimente zum Energietransfer

An dem Modellsystem Pe-TDI, bestehend aus Perylen über eine Hexyl-Gruppe gekoppelt mit Terrylendiimid, soll die Bestimmung der Konformation an einzelnen Molekülpaaren mit Hilfe von FRET gezeigt werden. Dieser Abschnitt umfaßt einige qualitative Voruntersuchungen an einzelnen Bichromophoren, die Rolle der Polarisationsspektroskopie bei der Orientierungsbestimmung von Übergangsdipolmomenten, die theoretische Bestimmung der energetisch möglichen Konformation des Bichromophors und den Versuch der Identifizierung einzelner Konformationen im Einzelmolekülexperiment. Abschließend wird das Gesamtexperiment kurz zusammengefaßt und bewertet.

#### 8.5.1 Qualitative Voruntersuchungen

Anhand von Bulk-Untersuchungen (Aufnahme von Fluoreszenzspektren in Lösung; vergleiche Kapitel 8.4) konnte die Energietransferquantenausbeute des FRET-Prozesses zu etwa  $\Phi_{ET} = 45\%$  bestimmt werden. Diese Größe ist im wesentlichen von drei Parametern, nämlich dem Schwerpunkts-Abstand  $R$  beider Chromophore, ihrer relativen Orientierung  $\kappa$  zueinander und ihrem sog. Spektralen Überlapp  $S$ , abhängig.

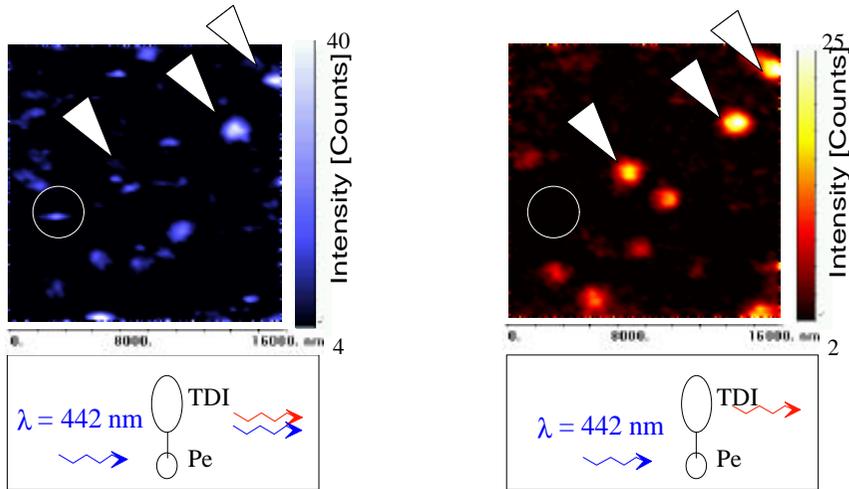


Abbildung 8.9 Bilder der Fluoreszenz von einzelnen Bichromophoren Pe-TDI (16\*16µm<sup>2</sup>)

Die Anregung erfolgt über den Pe-Teil (blau). Links wird die Gesamtfluoreszenz  $I(TDI) + I(Pe)$  detektiert, während rechts mit Hilfe von Langpaßfiltern (RG 610) die Pe-Fluoreszenz unterdrückt ist und nur die TDI-Fluoreszenz  $I(TDI)$  detektiert wird.

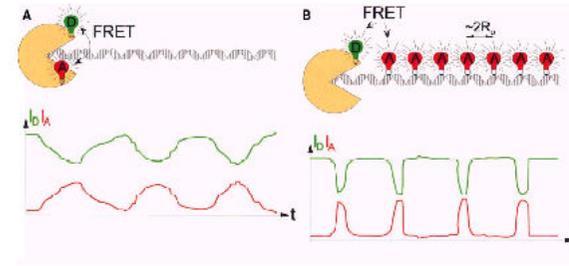


Abbildung 8.4 Proteindynamik am Enzym SNase beim Abknabbern eines DNA-Strangs [75]

A: Die Dynamik wird durch intramolekulare spFRET-Untersuchungen beobachtet.  
 B: Die Dynamik wird durch intermolekulare spFRET-Untersuchungen studiert.  
 Die abgebildeten Zeitspuren entstammen einem Gedankenexperiment und sind idealisiert dargestellt.

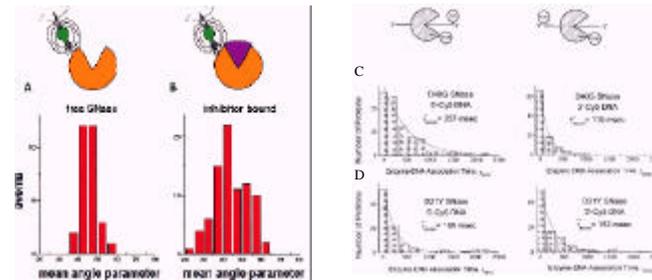


Abbildung 8.5 Experimenteller Beleg für die Proteindynamik von SNase [75]

A, B: Histogramme des über den Zeitraum der Detektion eines Moleküls gemittelten Winkels des Fluorophors (TMR = Donor). Bei freier Einstellbarkeit aller Orientierungen ist der mittlere Winkel  $45^\circ$  (freie SNase in A). Ist diese Einstellung nicht möglich, tritt über alle Moleküle eine breite Verteilung des mittleren Winkels auf (SNase mit blockiertem aktiven Zentrum in B).  
 C: Histogramme der aus der Messung von FRET-Zeitspuren erhaltenen mittleren Assoziationszeit für D40G SNase (diese baut den DNA-Strang ab) mit 5'-Cy5-ssDNA (257 ms) und 3'-Cy5-ssDNA (110 ms). Die mittlere Zeitdauer des FRET-Signals, erzeugt durch Interaktion des Donors (an der SNase) und des Akzeptors des am 5' Ende gelabelten Substrates, ist länger als die Zeitdauer des FRET-Signals, die mit dem am 3' Ende gelabelten Substrat auftritt. D.h. daß das Spaltprodukt mit dem 5' Ende länger am Enzym verweilt als das mit dem 3' Ende. Mit anderen Worten: Das Enzym katalysiert die Spaltung sukzessive von 3' in 5' Richtung (vergleiche Schemabilder über den Histogrammen).  
 D: Histogramme der aus der Messung von FRET-Zeitspuren erhaltenen Assoziationszeit für D21Y SNase (nicht fähig, abbauend zu wirken) mit 5'-Cy5-ssDNA (169 ms) und 3'-Cy5-ssDNA (162 ms). In diesem Kontrollexperiment wird belegt, daß photophysikalische Parameter des Fluorophors und statistische Abweichungen sich nicht auf die mittlere Assoziationszeit auswirken.

Die intramolekularen Untersuchungen und insbesondere die Auflösbarkeit der Dynamik auf einer ms-Zeitskala (wie sie in Zeitspuren von FRET-Experimenten auftrat) wurden gestützt von polarisationsabhängigen Messungen, die zeigten, daß die freie Rotation eines Donor-Moleküls eingeschränkt ist, wenn das aktive Zentrum von S<sub>N</sub>ase blockiert ist. Dies zeigt Abbildung 8.5 (A, B). Die konformative Änderung der Struktur des Enzyms konnte auch durch die stete Abbau-Folge eines DNA-Stranges studiert werden. Die antikorrelierten Fluktuationen in den Zeitspuren von Donor- und Akzeptorkanal zeigen das Assoziieren und Dissoziieren des Substrates. Mit dem in Abbildung 8.5 (C, D) beschriebenen Experiment konnte gezeigt werden, daß DNA-Einzelstränge in einer bestimmten Vorzugsrichtung (vom 3' Ende zum 5' Ende hin) abgebaut werden.

Eine noch sehr wenig verstandene Proteindynamik ist die Proteinfaltung. Erste Einzelmolekülexperimente, die mit FRET arbeiten, untersuchen Modellsysteme zur Proteinfaltung. Bislang behandelt wurden die Dissoziation und Assoziation von  $\alpha$ -tropomyosin [217], die Faltung eines Peptides mit Namen GCN4 [231] und ein aus RNA aufgebautes System [88], das in Abbildung 8.6 dargestellt ist. Die Idee aller Experimente ist ähnlich. Die Proteinfaltung soll anhand zweier konformativer Grenzfälle untersucht werden. Diese sind durch unterschiedliche Donor-Akzeptorabstände günstig angebrachter Label charakterisierbar. Mit Hilfe der Aufnahme von FRET-Zeitspuren gelingt es anhand der dynamischen Änderung der FRET-Quantenausbeute, die dynamische Änderung der Konformation zwischen den beiden Grenzfällen zu studieren. Oft stehen beide Konformationen in einem dynamischen Gleichgewicht zueinander.

Dieses kann durch pH-Änderung oder Fremdprotein- oder durch Ionenzugabe gezielt in eine Richtung verschoben werden. Abbildung 8.6 zeigt das Modellsystem, an dem Ha et al. 1999 [88] die oben beschriebenen Experimente durchführten. Es ist ein aus RNA-Strängen aufgebautes „Y“, das durch Zugabe des Proteins S15 seine Konformation ändert. Das Donor-Akzeptor-Paar bestand aus Fluorescein und Cy5.

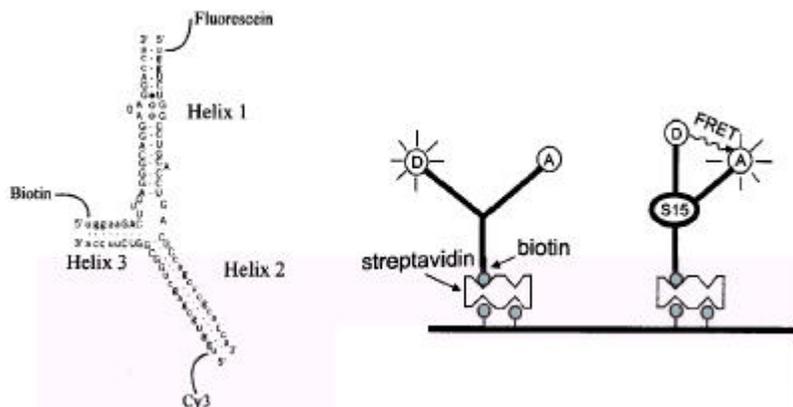


Abbildung 8.6 Modellsystem zur Proteinfaltung nach Ha et al. [88]

Aus RNA-Strängen wird ein „Y“, aufgebaut, das durch Zugabe des Proteins S15 seine Konformation ändert. Das Donor-Akzeptor-Paar aus Fluorescein und Cy5 zeigt die Konformationsänderung über das FRET-Signal an.

## 8.4 Der Bichromophor Perylen gekoppelt mit Terrylendiimid

Der von Prof. K. Müllen, MPI für Polymerforschung, Mainz, synthetisierte Bichromophor aus Perylen verknüpft über eine lineare Hexylkette mit Terrylendiimid (Pe-TDI [227]) sollte als Modellsystem für Energietransfer nach dem Förster Mechanismus untersucht werden. Die Eigenschaften von TDI, die oben erwähnt wurden, bleiben in diesem Bichromophor mit etwas modifiziertem TDI (mit Seitengruppen am aromatischen Grundgerüst) ungefähr erhalten. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich gegenüber dem ursprünglichen Chromophor in Methylchlorid um etwa  $\Delta\lambda = 15$  nm bathochrom. Perylen absorbiert im Hauptmaximum bei 452 nm. Im Fluoreszenzspektrum (Methylchlorid) treten Hauptmaxima bei 470 nm bzw. 705 nm auf (Abbildung 8.8).

TDI hat im Bichromophor eine Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau = 0,9$  ns in Chloroform (Messung mit Perkin Elmer), einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 45\,000$  mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), fast optimale Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_F = 90\% \pm 10\%$ ) und sehr gute Photostabilität. Pe hat im Bichromophor eine Fluoreszenzlebensdauer von  $\tau = 1,4$  ns in Chloroform (Messung mit Perkin Elmer), einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 18000$  mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>), eine gute Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_F = 30\% \pm 10\%$ ) und mittelmäßige Photostabilität. Auf Grund dieser photophysikalischen Daten eignet sich der Bichromophor bei Anregung des Pe-Teils im blauen Spektralbereich für Einzelmoleküluntersuchungen selbst in Polymerfilmen von PVB nicht besonders gut. Für Einzelmoleküluntersuchungen wurde Pe-TDI wie reines TDI präpariert.

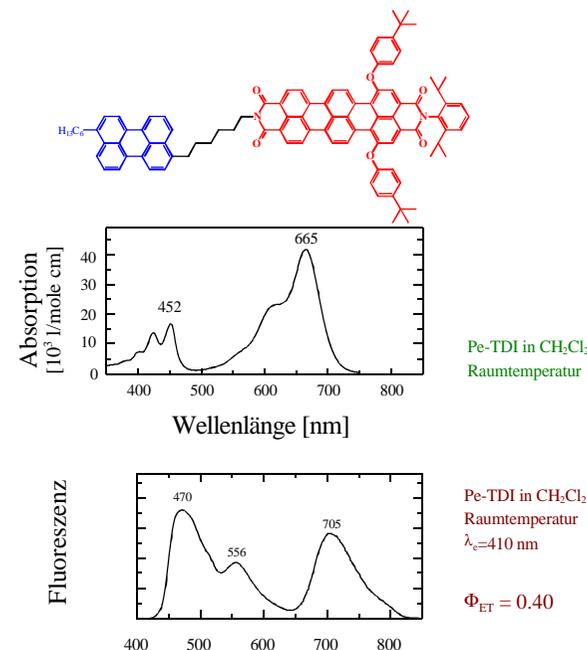


Abbildung 8.8 Der Bichromophor Pe-TDI in Strukturformel, Termschema, Absorptions- und Fluoreszenzspektrum

zeigt die Gleichverteilung von  $\phi_{(\text{exp})}$ . Da es keine Vorzugsrichtung der Orientierung von Übergangsdipolmomenten in der Polymermatrix geben sollte, kann das experimentelle Ergebnis als Bestätigung dafür gelten, daß die Meßmethode zur Bestimmung aller individuellen  $\phi_{(\text{exp})}$  später im Bichromophor geeignet ist.

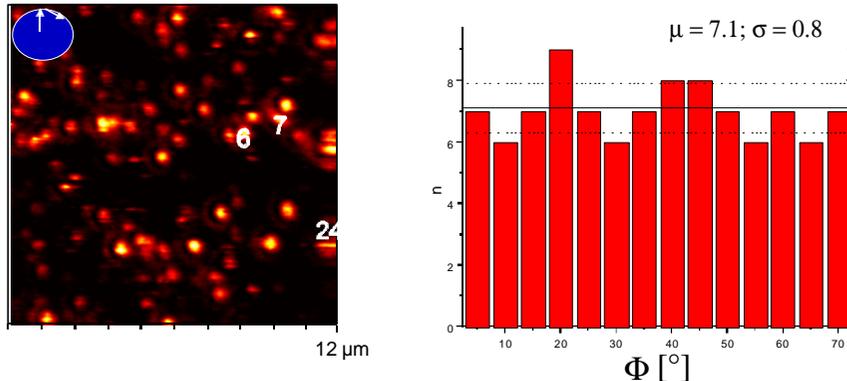


Abbildung 8.12 Häufigkeitsverteilung an Winkeln  $f$  in einer Pe-TDI-Probe

Das Fluoreszenzbild zeigt einen Probenausschnitt von  $12 \mu\text{m} \times 12 \mu\text{m}$  angeregt mit zirkularer Polarisation ( $I = 632,8 \text{ nm}$ ;  $P = 1,1 \text{ kW/cm}^2$ ). Durch Integration der Fluoreszenzspots wurden die Intensitäten der Moleküle ermittelt. Die mit der Formel aus 8.11A berechneten Winkel wurden in Winkelklassen gemäß der Zerlegung  $Z([0-7^\circ]; [7^\circ-14^\circ]; \dots)$  eingeordnet. Die Häufigkeiten der Winkelklassen zeigt die Gleichverteilung der Winkel  $f$ .

Regt man mit linear polarisiertem Licht an und variiert man die Polarisationsrichtung kontinuierlich (mit der polarisationsdrehenden Einheit) oder auch in diskreten Schritten von  $30^\circ$ , kann man die Orientierung der Projektion des Übergangsdipolmoments eines Chromophors auf die  $xy$ -Ebene (Probenebene) bestimmen. Dort wo die Intensität der Fluoreszenz maximal wird, stimmt der Winkel  $\theta$ , der die Orientierung der Anregungspolarisation angibt, mit dem Winkel  $\theta = \theta_{\text{max}}$  der Projektion des Chromophor-Übergangsdipolmoments überein.  $\theta_{\text{max}}$  tritt periodisch in  $180^\circ$ -Schritten auf ( $\cos^2$ -Abhängigkeit) und kann daher nur die Orientierung, nicht aber die Richtung des Projektionsvektors angeben. Zur Bestimmung von  $\theta_{\text{max}}$  wurden sechs Fluoreszenzbilder (in  $30^\circ$ -Intervallen der Anregungspolarisationsrichtung) einer Probenstelle aufgenommen. Die Intensität eines Chromophors wird dann gegen  $\theta$  aufgetragen. Die erhaltene Kurve wird mit der  $\cos^2$ -Funktion gefittet (Abbildung 8.11 B) und daraus  $\theta_{\text{max}}$  bestimmt.

Aufgrund des flexiblen Spacers des Pe-TDI-Bichromophors variieren sowohl der Abstand  $R$  als auch der Orientierungsparameter  $\kappa$  von Konformation zu Konformation. Jede individuelle Konformation von Pe-TDI dürfte in der Polymermatrix eingefroren sein. Damit kann jedem Molekülpaar eine individuelle, zeitlich konstante FRET-Quantenausbeute zugeordnet werden. In Einzelmolekülexperimenten kann die Verteilung der Werte für die Quantenausbeute gemessen werden, die der Verteilung der vorliegenden Konformationen der Bichromophore entspricht.

Zunächst wurden mit einem bestehenden konfokalen Mikroskop bei Raumtemperatur Einzelmolekülbilder und -spektren von Pe-TDI Molekülen, eingebettet in dünnen Filmen von PVB (Polyvinylbutyral), aufgenommen. Dazu wurden in einem Zweifarbenexperiment sowohl ein blauer Laser ( $442 \text{ nm}$ ; HeCd) zur Anregung von Pe als auch ein roter Laser ( $633 \text{ nm}$ ; HeNe) zur Anregung von TDI eingesetzt.

Durch die Aufnahme von Fluoreszenzbildern und Zeitspuren konnte die Identifizierung von Einzelmolekülen zweifelsfrei gezeigt werden. Ferner konnte in diesen Experimenten der Energietransfer, auch in individuell unterschiedlicher FRET-Quantenausbeute, an einzelnen Molekülpaaren nachgewiesen werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 8.9 dargestellt. Über die Ermittlung der Fluoreszenzintensitäten  $I(\text{TDI})$  und  $I(\text{TDI}) + cI(\text{Pe})$  ( $c$  als apparativer Korrekturparameter) läßt sich die FRET-Quantenausbeute jedes Moleküls wie folgt erhalten:

$$\Phi_{\text{ET}} = \frac{I_{\text{TDI}}}{cI_{\text{Pe}} + I_{\text{TDI}}}$$

Fluoreszenzspektren einzelner Bichromophore belegten die Detektion des Fluoreszenzlichts des Bichromophors. Dabei trat in vernachlässigbarem Maß Fremdfluoreszenz von Verunreinigungen und nur geringes Untergrundsignal auf. Alle Einzelmolekülspektren wurden bezüglich ihrer Anteile an Pe- und TDI-Fluoreszenz analysiert (Gaußfit zur Flächenbestimmung), um die jeweilige FRET-Quantenausbeute zu ermitteln. Dieses Verfahren der Quantenausbeute-Bestimmung ist genauer als die Bestimmung aus Fluoreszenzbildern. Es wurde für eine erste Auswertung an 20 Molekülen verwandt. Die Verteilung der FRET-Quantenausbeuten zusammen mit drei ausgewählten Fluoreszenzspektren von drei Einzelmolekülen ist in Abbildung 8.10 dargestellt. Sie zeigt, daß FRET-Quantenausbeuten zwischen 0% und 100% auftreten können. Um ein auswertbares Spektrum zu erhalten, mußte ein Einzelmolekülpaar etwa 20 Sekunden lang bei niedriger Leistung ( $I = 1,2 \text{ kW/cm}^2$ ) fluoreszieren. Leider limitiert die Photostabilität des Pe-Teils die Zahl der so gemessenen Fluoreszenzspektren drastisch. Unter mehr als 500 Versuchen gelang es nur, 20 stabile Moleküle aufzunehmen. Erschwerend zur Messung kam hinzu, daß selbst bei niedriger Anregungsleistung mit der Zeit die Polymermatrix durch die relativ kurzweilige Anregung ( $\lambda = 442 \text{ nm}$ ) zerstört wurde. Dabei wurden vermutlich Abfallprodukte generiert, die über den ganzen sichtbaren Bereich emittierten und den Einzelmolekülnachweis störten. Aus diesen Gründen mußte eine andere Methode zur Bestimmung von FRET-Quantenausbeuten angewandt werden: die Integration von Fluoreszenzspots aus Fluoreszenzbildern. Mit Hilfe von polarisationsabhängiger Laseranregung können solche Bilder auch zur Bestimmung von Orientierungen der Übergangsdipolmomente beider Chromophore relativ zueinander herangezogen werden (siehe folgender Abschnitt). Auf diese Weise sollte die experimentelle Ermittlung des Orientierungsparameters  $\kappa$  angestrebt werden. Jede Konformation des Bichromophors wäre dann aus den Wertepaaren ( $\kappa; \Phi_{\text{ET}}$ ) bestimmbar.

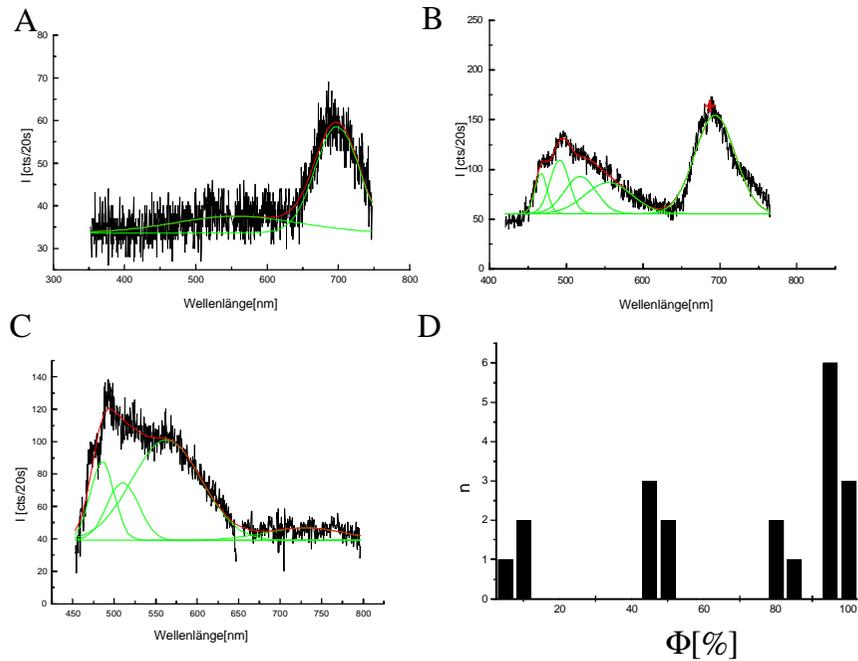


Abbildung 8.10 Bestimmung der FRET-Quantenausbeuten aus Fluoreszenzspektren

Dargestellt sind drei Einzelmolekülspektren (Detektionszeit  $\Delta t = 20\text{ s}$  je Spektrum bei  $I = 1,2\text{ kW/cm}^2$ ) von Pe-TDI von drei Molekülen mit völlig verschiedenen Quantenausbeuten  $F$  (A:  $F = 92\% \pm 2\%$ ; B:  $F = 49\% \pm 2\%$ ; C:  $F = 7\% \pm 2\%$ ). Die Häufigkeits-Verteilung der Quantenausbeuten  $F$  von 20 gemessenen Molekülen ist in D dargestellt.

## 8.5.2 Bestimmung der Orientierung individueller Chromophore durch Polarisationspektroskopie

Will man die Lage des Übergangsdipolmoments eines Moleküls im Raum bestimmen, muß man mit Laseranregung unterschiedlicher Polarisation arbeiten.

Verwendet man zirkular polarisiertes Anregungslicht, werden alle Moleküle mit gleicher Wahrscheinlichkeit maximal angeregt, deren Übergangsdipolmomente parallel zur Probenoberfläche liegen. Sie erscheinen im Fluoreszenzbild mit gleicher Intensität  $I$  ( $I = I_{\max}$ ). Abstufungen der Intensität treten nur mehr in Abhängigkeit des Winkels  $\phi$  (Zwischenwinkel von Übergangsdipol und dessen Projektionsvektor auf die Probenebene) auf. Den

funktionellen Zusammenhang zwischen  $\phi$  und  $I$  zeigt Abbildung 8.11A. Die experimentelle Bestimmbarkeit von  $\phi_{(\text{exp})}$  ist nicht eindeutig. Über die Intensität gemessen werden kann nur der Betrag von  $\phi$  ( $\phi_{(\text{exp})} = |\phi|$ ), weil man nicht zwischen Molekülen unterscheiden kann, deren Übergangsdipole „nach oben oder nach unten,, von der Probenoberfläche aus gesehen, schauen.

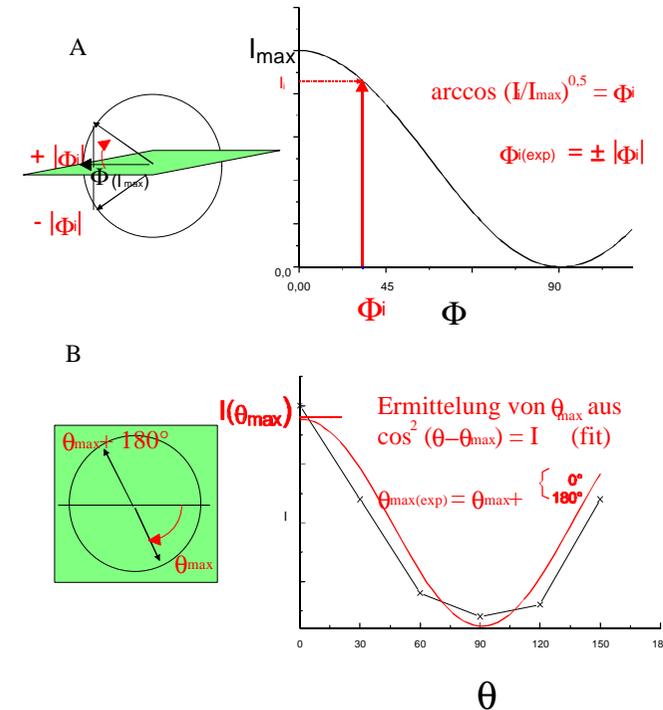


Abbildung 8.11 Experimentelle Bestimmung der Lage von Übergangsdipolmomenten

A Ermittlung von  $\phi$ , dem Zwischenwinkel zwischen Übergangsdipolmoment und seinem Projektionsvektor relativ zur Probenoberfläche

B Ermittlung von  $\theta$ , dem Winkel zwischen Polarisationsvektor und Übergangsdipolmoment

Ein Experiment mit 100 Pe-TDI-Molekülen (immobilisiert in PVB-Filmen), angeregt im TDI-Teil ( $\lambda = 632,8\text{ nm}$ ) mit zirkular polarisierter Anregung, zeigte eine Gleichverteilung der Orientierung der Übergangsdipolmomente zwischen  $\phi_{(\text{exp})} = 0^\circ$  und  $\phi_{(\text{exp})} = 70^\circ$ . Moleküle, die „noch weiter aus der Ebene heraus stehen,, werden von der Messung nicht mehr erfaßt. Abbildung 8.12 zeigt die Probe von  $20\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$  Größe. Aus hundert willkürlich ausgewählten Molekülsspots wurde die Intensität durch Integration ermittelt. Mit Hilfe der Formel aus Abbildung 8.11 wurde  $\phi_{(\text{exp})}$  bestimmt. Alle Moleküle wurden in Winkelklassen gemäß der Zerlegung  $Z([0-7^\circ]; [7^\circ-14^\circ]; \dots)$  eingeordnet. Das Histogramm in Abbildung 8.12

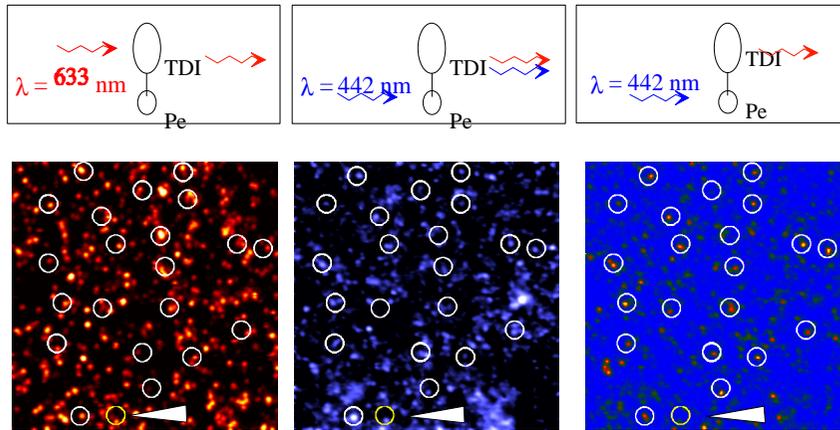
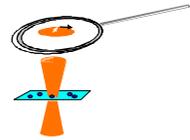
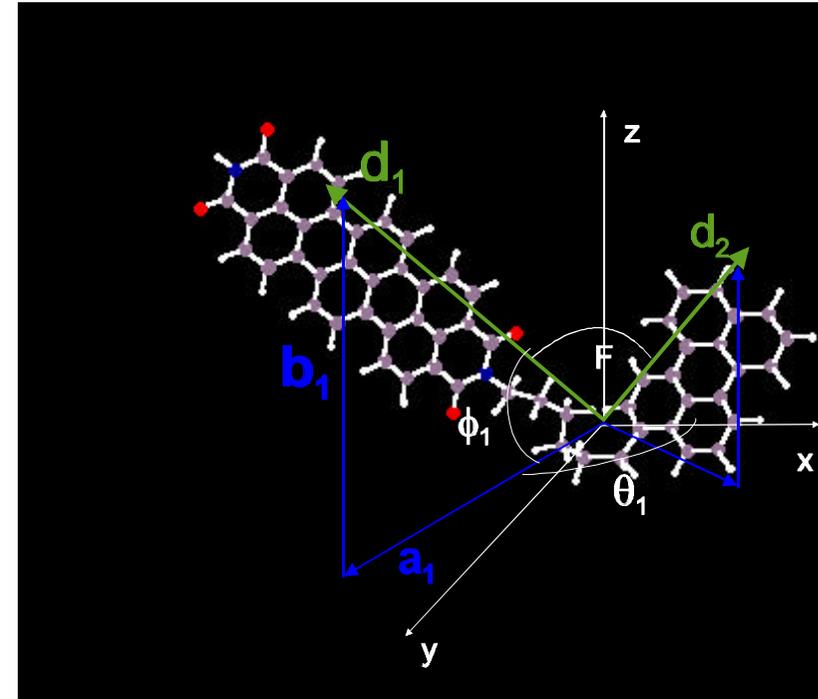


Abbildung 8.14 Bestimmung der Winkel  $f$  mit zirkular polarisierter Anregung und Bestimmung der Quantenausbeute  $F_{ET}$  aus Fluoreszenzbildern

Das rot eingefärbte Bild der Fluoreszenz wurden mit roter Laseranregung ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) bei Detektion des TDI-Fluoreszenzsignals aufgenommen, das blau eingefärbte Bild mit blauer Laserleistung ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$ ) und Detektion des Gesamtfluoreszenzsignals und das blau-rot eingefärbte Bild mit blauer Laserleistung ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$ ) und Detektion des TDI-Fluoreszenzsignals. Die Intensität jedes Moleküls wurde durch Integration bestimmt und wie in Abbildung 8.11A beschrieben zur Bestimmung der Winkel  $f_1 = f(\text{TDI})$  (rotes Bild) bzw.  $f_2 = f(\text{Pe})$  (blaues Bild) verwendet. Die FRET-Quantenausbeute  $F_{ET}$  wurde aus dem Quotienten der Intensitäten im blauen und im blau-roten Bild ermittelt (korrigiert um den apparativen Faktor  $d$ ).

Die Größe des dargestellten Probenausschnittes ist  $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ . Die Anregungsleistungen betragen jeweils  $P = 3,0 \text{ kW/cm}^2$  ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ).

### 8.5.3 Modellrechnung zur theoretischen Identifikation der Konformationen des Bichromophors



$$\mathbf{a}_i = d_i \cos \phi_i \begin{pmatrix} \cos \theta_i \\ \sin \theta_i \\ 0 \end{pmatrix} \quad \mathbf{b}_i = d_i \sin \phi_i \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix} \quad \mathbf{d}_i = \mathbf{a}_i + \mathbf{b}_i$$

$$\cos F = \frac{\mathbf{d}_1 \cdot \mathbf{d}_2}{d_1 d_2} = \cos \phi_1 \cos \phi_2 (\cos \theta_1 \cos \theta_2 + \sin \theta_1 \sin \theta_2) + \sin \phi_1 \sin \phi_2$$

Abbildung 8.13 Überlegungen zur Bestimmung des Winkels  $F$  aus den mit Polarisationspektroskopie zugängigen Größen  $f_1$  und  $f_2$ .

Der anregende Laserstrahl fällt in  $z$ -Richtung ein mit einer Polarisation in der  $xy$ -Ebene.  $d_1$  und  $d_2$  geben die Richtung der Übergangsdipolmomente der Untereinheiten TDI ( $i=1$ ) und Pe ( $i=2$ ) von Pe-TDI an.

Der Orientierungsparameter  $\kappa$ , der die Lagebeziehung zweier Dipole (parallel zur Hauptachse in den Aromaten) im Raum beschreibt, ist eine Funktion, die vom Zwischenwinkel  $\phi = F$  (F als hier eingeführte Bezeichnung) der beiden Dipole und von beider Abstand  $R$  abhängt ( $R$  bestimmt die beiden Antragswinkel in Abbildung 5.3). Da  $R$  experimentell nicht zugänglich ist, kann  $\kappa = \kappa(F; R)$  nicht eindeutig ermittelt werden. Da die Winkel  $\phi$  und  $\theta$  nicht eindeutig bestimmbar sind, kann auch  $F$  nicht eindeutig berechnet werden. Die Berechnung von  $F$  ( $\phi; \theta$ ) zeigt Abbildung 8.13.

Um auf die jeweilige Konformation eines Pe-TDI-Einzelmoleküls schließen zu können, wurde von I.Frank eine semi-quantenmechanische Modellrechnung durchgeführt, bei der für alle Konformationen mit Bindungen im Alkyl-Spacer „auf Lücke“, (staggered conformation;  $3^7 = 2187$  Konformationen) die entsprechenden  $F$ - und  $\kappa$ -Werte berechnet wurden. Dabei zeigte sich, daß aus sterischen Gründen nur 512 der 2187 Möglichkeiten berücksichtigt werden müssen. Zu all diesen Konformationen  $K$  wurde die Quantenausbeute  $\Phi_{ET}$  des Energietransfers berechnet. Es ergaben sich also 512 Zahlentripel ( $K; \Phi_{ET}; F$ ), die jeder möglichen Konformation  $K$  (eindeutig zu  $\kappa$  zuordbar) eine Energietransfer-Quantenausbeute  $\Phi_{ET}$  und einen Zwischenwinkel  $F$  zuordneten. Die Strategie des Experiments war es nun, den experimentell zu ermittelnden Größen  $F$  und  $\Phi_{ET}$  eine Konformation  $K$  zuzuordnen.

#### 8.5.4 Versuch der Identifizierung einzelner Konformationen durch Vergleich Experiment mit Rechnung

Die Abbildungen 8.14 bis 8.16 zeigen nun eine Probenstelle von 100 Molekülen des Bichromophors Pe-TDI, die mit unterschiedlichen Wellenlängen bzw. Polarisierungen angeregt wurden. Die blau eingefärbten Bilder der Fluoreszenz zeigen die Bestimmung der Winkel  $\phi(\text{Pe})$  und  $\theta(\text{Pe})$  zur Orientierungsidentifikation des Pe-Teils, die mit blauer Laseranregung ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$ ) bei Detektion des Gesamtfluoreszenzsignals erfolgte. Die roten Bilder zeigen analog dazu die Orientierungsbestimmung im TDI-Teil (Winkel  $\phi(\text{TDI})$  und  $\theta(\text{TDI})$ ). Hier wurde mit roter Laseranregung ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) bei Detektion der Gesamtfluoreszenz gearbeitet. Zur Bestimmung der FRET-Quantenausbeuten  $\Phi_{ET}$  wurden die Intensitäten der beiden mit zirkularer Polarisation und blauer Anregung ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$ ) erhaltenen Fluoreszenzbilder in Relation gesetzt. Dabei wurde in einem Falle nur die Fluoreszenz von TDI ( $I_{\text{TDI}}$ ) detektiert, im anderen Falle die Gesamtfluoreszenz ( $I_{\text{TDI}} + I_{\text{Pe}}$ ). Dieser Wert wurde mit einem experimentell ermittelten Korrekturfaktor  $d$  (apparative Größe) multipliziert, der die Wellenlängenabhängigkeit des Detektionsstrahlengangs berücksichtigt ( $d I_{\text{Pe}} + I_{\text{TDI}} = I_{\text{ges}}$ ).  $\phi$  ist der Quotient aus  $I_{\text{TDI}}$  und  $I_{\text{ges}}$ .

Abbildung 8.16 zeigt an einem Beispiel die graphische Zuordnung der experimentell ermittelten Größen  $F_{\text{exp}}$  und  $\Phi_{ET(\text{exp})}$  zu einer Konformation  $K$ . Dabei wird dem Größenordnungsbereich einer Quantenausbeute der entsprechende Bereich an Konformationen gegenübergestellt, der der theoretischen Berechnung nach vergleichbare Quantenausbeuten liefert. Der Winkel  $F$  der Berechnung, der am besten zu einem der vier experimentell möglichen Werte von  $F_{\text{exp}}$  paßt, wird ausgewählt.

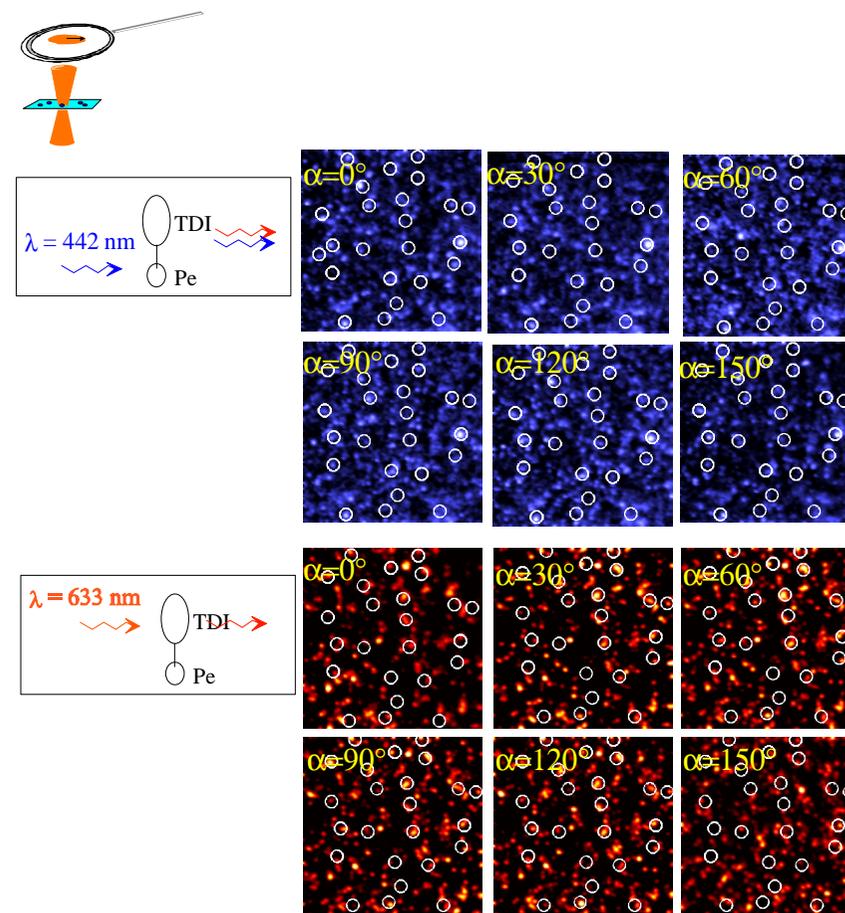


Abbildung 8.14 Bestimmung der Winkel  $q$  mit linear polarisierter Anregung

Die blau eingefärbten Bilder der Fluoreszenz wurden mit blauer Laseranregung ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$ ) bei Detektion des Gesamtfluoreszenzsignals aufgenommen. Von Bild zu Bild (von oben links nach unten rechts) wurde die Richtung der Anregungspolarisation mit der polarisationsdrehenden Einheit um  $30^\circ$  weitergedreht (von  $\alpha = 0^\circ$  bis  $\alpha = 150^\circ$ ). Die Intensität jedes Moleküls wurde durch Integration bestimmt und gegen  $\alpha$  aufgetragen. Durch Fit mit der in Abbildung 8.13B beschriebenen Formel wurde dann für jedes Molekül  $q_2 = q_{\text{max}}(\text{Pe})$  als Maß für die Orientierung des Pe-Teils bestimmt. Die roten Bilder führen analog dazu zur Orientierungsbestimmung im TDI-Teil ( $q_1 = q_{\text{max}}(\text{TDI})$ ). Hier wurde mit roter Laseranregung ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) bei Detektion der TDI-Fluoreszenz gearbeitet. Die Größe des dargestellten Probenausschnittes ist  $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ . Die Anregungsleistungen betragen  $P = 3,0 \text{ kW/cm}^2$  ( $\lambda = 442,1 \text{ nm}$ ) bzw.  $P = 0,8 \text{ kW/cm}^2$  ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ).

beide mit einzelnen Cy5-Molekülen gelabelt, bestimmt ( $\langle D_{AAV} \rangle = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bzw.  $\langle D_{\text{IgG}} \rangle = 38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Die Werte für IgG stimmen mit den in der Literatur bekannten Werten exakt überein.

Die Aufklärung des Wanderungsverhaltens von AAV in lebenden HeLa Zellen ist für die Virologie und nicht zuletzt die Gentherapie, die mit rekombinanten Viren (rAAV) arbeitet, von aktuellem Interesse. Mit SDT konnten hierbei Erkenntnisse gewonnen werden, die mit bislang üblichen mikroskopischen Methoden nicht zugänglich waren. Nur die Einzelmolekültechnik arbeitet unter physiologisch relevanten Bedingungen, mit einem Chromophor je Virus und mit wenigen Viren je Zelle. Erstmals konnte in dieser Arbeit das Wanderungsverhalten von Viren in Video-Echtzeit und mit einer Positionsgenauigkeit von bis zu 40 nm durchgeführt werden. Es gelang, neue Erkenntnisse über die Aufnahme und Wanderung von AAV in lebenden HeLa-Zellen zu erhalten.

AAV wird mit einer Effizienz von  $\eta = 13 \%$  in die Zelle aufgenommen. Dies geschieht mit einer Halbwertszeit von  $t_{1/2}(\text{o} \rightarrow \text{cy}) = 2 \text{ min}$ , gerechnet vom ersten Membrankontakt bis hin zum Eindringen. Die Zell-Internalisierung erfolgt damit wesentlich schneller, als bislang auf Grund von konventionellen mikroskopischen Untersuchungen gedacht wurde ( $t_{1/2}(\text{internalisation}) = 10 \text{ min}$ ). Die unmittelbare Eindringzeit am Ort der Membran beträgt  $\Delta t_{\text{mem}}(\text{o} \rightarrow \text{cy}) = 80 \text{ ms}$ .

Die in der Literatur postulierte Aufnahme via Endocytose konnte anhand der Verteilung von Diffusionskoeffizienten bestätigt werden. Der mittlere Diffusionskoeffizient des Endosoms liegt bei  $\langle D_{\text{Endo-Zyto}} \rangle = 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und ist etwa halb so groß wie derjenige von freiem AAV ( $\langle D_{\text{AAV-Zyto}} \rangle = 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Die Verteilung der Diffusionskoeffizienten, die für die einzelnen Trajektorien im Cytoplasma bei pH = 7 erhalten wurden, zeigte zwei Maxima bei den beiden oben angegebenen Mittelwerten für D. Bei pH = 9 trat nur der kleinere Mittelwert auf. Dies deutet darauf hin, daß die Öffnung des Endosoms im basischen Milieu nicht möglich ist. Daher kann AAV bei pH = 9 auch nicht im Kern gefunden werden. Der Diffusionskoeffizient von AAV in der Zelle ist um Faktor fünf kleiner als derjenige in freier wäßriger Lösung. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß intrazelluläre Strukturen wie „Obstacles“ wirken, die die Diffusion verlangsamen. Bei hoher Obstacle-Konzentration zeigen  $\langle r^2 \rangle$ -t-Diagramme eine Abweichung vom linearen Verhalten, wie es für anomale Diffusion typisch ist.

Nach einer Halbwertszeit von  $t_{1/2}(\text{infection}) = 15 \text{ min}$  findet sich mindestens ein AAV-Kapsid im Zellkern. Die mit SDT bestimmte Infektionszeit ist damit deutlich kürzer als in der Literatur angegeben ( $t_{1/2}(\text{infection}) = 2 \text{ h}$ ). Im Kern bewegt sich das AAV-Kapsid gerichtet über bis zu  $15 \mu\text{m}$  in eindimensionaler Bewegung. Diese Bewegung ist schneller als in freier Diffusion (directed motion). Eine mögliche Erklärung dieses Verhaltens ist die Bewegung von AAV in Kanälen innerhalb des Zellkerns mit Hilfe von dort vorhandenen Strömen. Auch Diffusion in restriktiver Geometrie konnte beobachtet werden. Die Frage, ob AAV mit Kapsid die Kernmembran durchdringen oder ob nur die virale DNA ins Kerninnere gelangen kann, ist nicht eindeutig zu klären, da zum einen die den Kern durchziehenden Röhren noch diesseits der Kernporenkomplexe liegen und zum anderen nur das Viruskapsid, nicht aber das Genom, über den Cy5-Label verfolgt werden kann. Hier werden in naher Zukunft Experimente durchgeführt werden, die mit zwei verschiedenen Labeln für Genom und Kapsid arbeiten. Eventuell sind FRET-Untersuchungen an AAV in lebenden Zellen möglich.

In einem zweiten, kleinen Teil der Arbeit wurde am Modellsystem Pe-TDI Energietransfer am einzelnen Molekülpaar gezeigt. Mit Hilfe von theoretischen Modellrechnungen von I. Frank gelang es, die Konformationsabhängigkeit der Energietransfer-Quantenausbeute nachzuweisen.

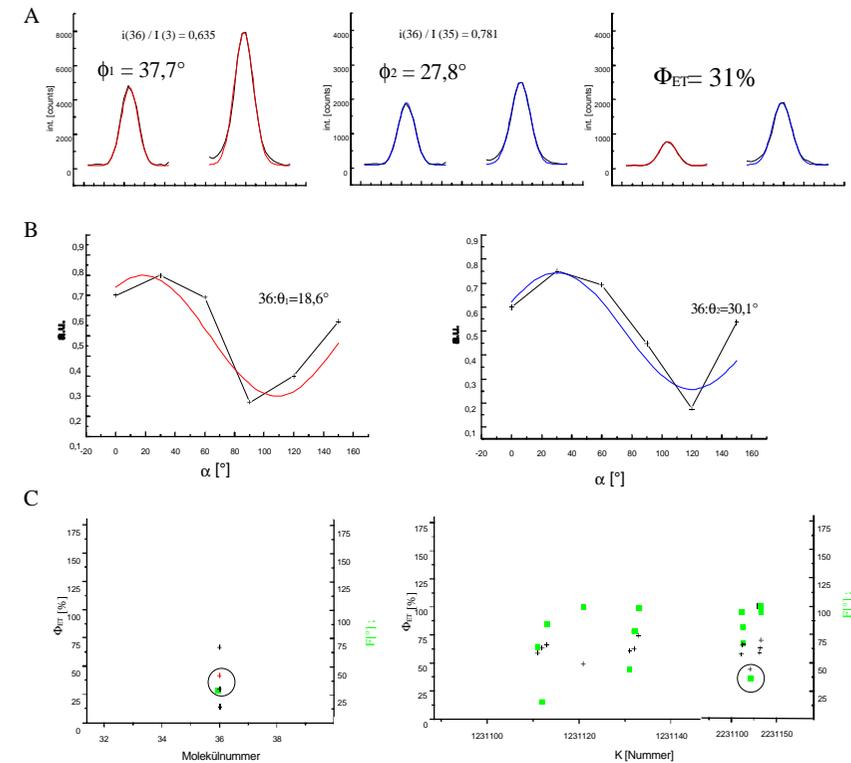


Abbildung 8.16 Bestimmung der individuellen Konformation  $K$  eines Beispielmoleküls

A: Bestimmung der Winkel  $\mathbf{f}_1$  und  $\mathbf{f}_2$  und der Quantenausbeute des Energietransfers  $F_{\text{ET}}$ . Aus dem Quotienten der Intensität  $i(36)$  des Beispielmoleküls (Molekülnummer 36) und der Intensität  $I(3)$  (bzw.  $I(35)$ ) des „hellsten Moleküls“, (Molekülnummer 3 bei roter bzw. 35 bei blauer Anregung) wurden gemäß 8.11A  $\mathbf{f}_1$  und  $\mathbf{f}_2$  berechnet. Die Quantenausbeute des Energietransfers wurde gemäß Abbildung 8.15 bestimmt. Die abgebildeten Flächen sind als Maß für die bestimmten Intensitäten dargestellt.

B: Bestimmung der Winkel  $\mathbf{q}_1$  und  $\mathbf{q}_2$

Die Intensitäten des Moleküls ermittelt aus den linear polarisierten Aufnahmen wurden gegen den Polarisationswinkel der Anregung  $\alpha$  aufgetragen. Der  $\cos^2$ -Fit führte dann zu den Winkeln  $\mathbf{q}_1$  und  $\mathbf{q}_2$ .

C: Die Wertepaare ( $F_{\text{ET}}$ ,  $F$ ) der Messung (links) wurden mit denjenigen der Modellrechnung (rechts) verglichen. Dabei wird dem Größenordnungsbereich einer Quantenausbeute  $F_{\text{ET}}$  der entsprechende Bereich an Konformationen gegenübergestellt, der, der theoretischen Berechnung nach, vergleichbare Quantenausbeuten liefert. Die eingekreiste Größen  $F$  und  $F$  stimmen am besten überein und liefern die Zuordnung zwischen Rechnung und Messung und damit die individuelle Konformation  $K$  (vergleiche Abbildung 8.17).

## 5.5 Zusammenfassung und Wertung des Experiments

Abbildung 8.17 zeigt zusammengefaßt die Ergebnisse des Experiments: Zum einen konnte eine Verteilung der individuellen Quantenausbeuten erhalten werden, die einen Mittelwert von  $\langle \Phi_{ET} \rangle = 48\%$  ergibt und im Rahmen der Meßgenauigkeit sehr gut mit den Bulkuntersuchungen übereinstimmt. Zum anderen war die Bestimmung jeder individuellen Konformation  $K$  zu einem Einzelmolekül durch Vergleich der Modellrechnung mit experimentellen Ergebnissen möglich.

Da die Bestimmung der Werte  $F$  und  $\Phi_{ET}$  jedoch sich nur auf Fluoreszenzbilder stützen kann und sehr viele Meßschritte umfaßt, sind die Ergebnisse sicherlich mit einem erheblichen Meßfehler behaftet. Die Mehrdeutigkeit von  $F$  stellt für Konformationszuordnung (Experiment zu Rechnung) ein weiteres nicht unerhebliches Problem dar.

In den meisten SMD-Arbeiten wird FRET üblicherweise als Ruler zur Abstandsmessung  $R$  in Makromolekülen (v.a. in biologischen Systemen) eingesetzt (vergleiche Kapitel 5). In Lösung wird üblicherweise ein mittlerer Orientierungsparameter angenommen ( $\kappa^2=2/3$ ). Dies ist in Lösung und bei freier Rotation („orientierungsmittelnd.“) gerechtfertigt. Das Experiment hier versucht im Gegensatz dazu die Idee einer konsequenten Konformationsanalyse an individuellen Chromophorenpaaren mit Hilfe von FRET durchzuführen.

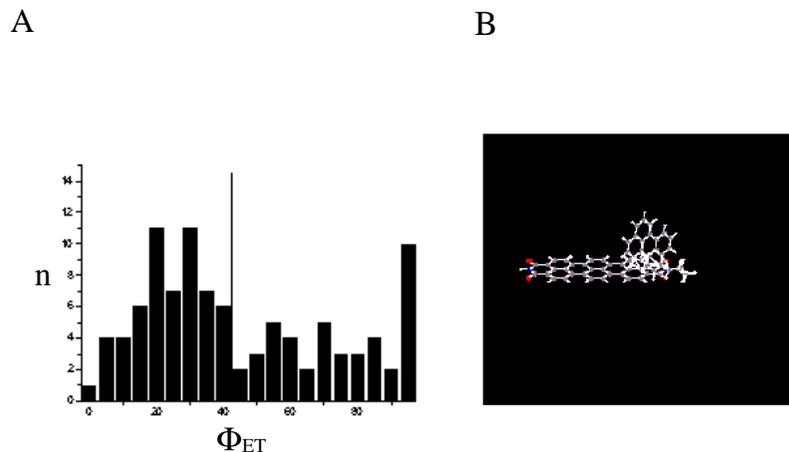


Abbildung 8.17 Ergebnisse des Experiments durchgeführt an 100 Einzelmolekülen

A: Die Häufigkeitsverteilung der Quantenausbeuten  $F_{ET}$  liefert einen Mittelwert von  $\langle F_{ET} \rangle = 48\% \pm 29\%$ . Ein Maximum der Verteilung ist nicht signifikant bestimmbar. Der Mittelwert bestätigt die Ergebnisse der Bulk-Messungen.

B: Die individuellen Konformationen  $K$  von Einzelmolekülen waren bestimmbar. Die Konformation  $K$  des Beispielmoleküls 36 ( $F_{ET} = 31\%$ ) ist dargestellt.

## 9. Zusammenfassung

Das Forschungsgebiet der Einzelmoleküldetektion SMD hat sich in den letzten Jahren stark weiterentwickelt. Stand Anfang der 90er Jahre noch der Nachweis einzelner Chromophore im Mittelpunkt, haben sich in den letzten Jahren Fragestellungen etabliert, die versuchen klassische Forschungsgebiete durch die Anwendung der SMD voranzubringen. Unter diesen Forschungsgebieten nehmen die Biowissenschaften eine wichtige Position ein. Einzelmoleküluntersuchungen können dort solche Prozesse näher beleuchten, die mit bisherigen Methoden durch summative Effekte bzw. durch Mittelung verborgen blieben. In den Feldern molekulare Motoren, DNA-Transkription, enzymatischer Umsatz, Protein-Dynamik und Signaltransfer in Zellen wurden bereits bedeutende neue Erkenntnisse mit der SMD erarbeitet. Das zentrale Thema dieser Dissertation, die Untersuchung von Viren unter physiologischen Bedingungen in lebenden Zellen, erweitert das biologische Feld der Anwendung von SMD auf den Bereich der Virologie. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmals gelungen den Infektionsweg eines einzelnen Viruspartikels in einer lebenden Zelle in Echtzeit zu verfolgen. Die dabei verwendete Methode stellt ein völlig neues bildgebendes Verfahren dar, das mit hoher Orts- und Zeitauflösung Messungen unter physiologisch relevanten Bedingungen ermöglicht.

Am Anfang der vorliegenden Arbeit standen mikroskopische Untersuchungen von einzelnen Farbstoffmolekülen (Cy5 und TDI) in Polymerfilmen. Dabei wurden klassische Einzelmolekülexperimente an beiden Chromophoren durchgeführt. Beide Moleküle können mit langwelligen Laserlinien im roten Spektralbereich angeregt werden, was Probleme mit Fremdfluoreszenz, die bei „blauer Anregung“ in Einzelmolekülexperimenten auftritt, vermeiden hilft. Sättigungsuntersuchungen und Experimente zur Photostabilität von TDI und Cy 5 belegten, daß beide Farbstoffe in ihren photophysikalischen Eigenschaften gut für Einzelmoleküluntersuchungen geeignet sind. Sie liefern in etwa  $10^9$  (TDI) bzw.  $10^6$  bis  $10^7$  (Cy5) Photonen bis zum Photobleichen, das Sättigungsmaximum liegt bei etwa  $3 \cdot 10^5$  (Cy 5) bzw.  $10^6$  Photonen (TDI) je Sekunde. TDI ist dabei hinsichtlich beider Parameter um Faktor deutlich besser. Da aber nur Cy5 wasserlöslich ist, wurde in weiteren Untersuchungen dieser Farbstoff als Label für Biomoleküle eingesetzt.

Auf dem Weg, Einzelmoleküle in lebenden Zellen nachzuweisen, wurden Cy5-gelabelte Antikörper in permeabilisierte HeLa-Zellen eingebracht. In diesen toten Systemen konnte Cy5 als einzelner Chromophor nachgewiesen werden.

Mit der Methode des Single Dye Tracings (SDT) wurden die Diffusionskoeffizienten in wäßrigen Lösungen von Immunglobulin G (IgG) und von Adeno-assoziierten Viren (AAV), beide mit einzelnen Cy5-Molekülen gelabelt, bestimmt ( $\langle D_{AAV} \rangle = 7,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bzw.  $\langle D_{IgG} \rangle = 38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Die Werte für IgG stimmen mit den in der Literatur bekannten Werten exakt überein.

- [64] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.C. Martin and R.A. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **72** (1994) 160.
- [65] D.W. Pohl, W. Denk and M. Lanz, *Appl. Phys. Lett.* **44** (1984) 651.
- [66] U.C. Fischer, H. Fuchs and J. Koglin, *J. Biomed. Opt.* **1** (1996) 75.
- [67] D. Butler, *Nature* **401** (1999) 729.
- [68] J. H. Jett *et al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **7** (1989) 301.
- [69] Y. Sako, S. Minoguchi and T. Yanagida, *Nature cell biol.* **2** (2000) 168.
- [70] Q. Xue and E.S. Yeung, *Nature* **373** (1995) 681.
- [71] H.P. Lu, L. Xun, X.S. Xie, *Science* **282** (1998) 1877.
- [72] D.W. Pierce, N. Hom-Booher and R.D. Vale, *Nature* **388** (1997) 338.
- [73] Molecular Probes, Information aus dem Internet unter: „<http://www.probes.com/handbook/sections/0000.html> /“
- [74] Amersham, Suchbegriff „Cy5“ auf der Internetseite „<http://www.apbiotech.com/search/default.html>“
- [75] S. Weiss, *Science* **283** (1999) 1676.
- [76] G.J. Schütz, H. Schindler and T. Schmidt, *Biophys. J.* **73** (1997) 1073.
- [77] X-H. Xu and E.S. Yeung, *Science* **275** (1997) 1106.
- [78] X-H. Xu and E.S. Yeung, *Science* **281** (1998) 1650.
- [79] E. Betzig, *Opt. Lett.* **20** (1995) 237.
- [80] T. Ha, T. Enderle, D.S. Chemla and S. Weiss, *IEEE J. Select. Top. Quantum Electronics* (1996) 1115.
- [81] A.M. van Oijen, J. Köhler, J. Schmidt, M. Müller and G.J. Brakenhoff, *Chem. Phys. Lett.* **292** (1998) 183.
- [82] G. J. Schütz, W. Trabesinger and T. Schmidt, *Biophys. J.* **74** (1998) 2223.
- [83] T. Förster, *Ann. Phys.* **2** (1948) 55.
- [84] L. Stryer and R.P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58** (1967) 719.
- [85] P. R. Selvin, *Methods. Enzymol.* **246** (1995) 300.
- [86] T. Ha, A.J. Ting, J. Liang, W.B. Caldwell, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz

## Literaturverzeichnis

- [1] E. Schrödinger, *Br. J. Philos.* (1952) p.233.
- [2] R. P. Feynman, *Sci. Eng.* **23** (1960) 22.
- [3] G. Binnig and H. Rohrer, *Angew. Chemie* **99** (1987) 622.
- [4] J. K. Gimzewski and C. Joachim, *Science* **283** (1999) 1683.
- [5] G. Binnig, C. F. Quate and Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930.
- [6] F. J. Giessibl, *Science* **267** (1995) 68.
- [7] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **15** (1976) 2965.
- [8] T. Hirschfeld, M.J. Block and W. Mueller, *J. Histochem. Cytochem.* **25** (1977) 719.
- [9] N.J. Dovichi, J.C. Martin, J.H. Jett and R.A. Keller, *Science* **219** (1983) 845.
- [10] D. C. Nguyen, R. A. Keller and M. Trkula, *J. Opt. Soc. Am.B* **4**, (1987) 138.
- [11] E.B. Shera, N.K. Seitzinger, L.M. Davis, R.A. Keller and S.A. Soper, *Chem. Phys. Lett.* **174** (1990) 553.
- [12] W. E. Moerner and L. Kador, *Anal. Chem.* **61** (1989) A1217.
- [13] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **65** (1990) 2716.
- [14] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada and T. Yanagida, *Nature* **352** (1991) 301.
- [15] A. Ishijima, H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funatsu and T. Yanagida, *Biophys. J.* **70** (1996) 383.
- [16] K. Svoboda, C.F. Schmidt, B.J. Schnapp and S.M. Block, *Nature* **365** (1993) 721.
- [17] J.T. Finer, R.M. Simmons and J.A. Spudich, *Nature* **368** (1994) 113.
- [18] E. Betzig and R.J. Chichester, *Science* **262** (1993) 1422.

- [19] J.K. Trautman, J.J. Macklin, L.E. Brus and E. Betzig, *Nature* **369** (1994) 40.
- [20] X.S. Xie and R.C. Dunn, *Science* **265** (1994) 361.
- [21] W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.C. Martin and R.A. Keller, *Science* **265** (1994) 364.
- [22] R.X. Bian, R.C. Dunn, X.S. Xie and P.T. Leung, *Phys. Rev.Lett.* **75** (1995) 4772.
- [23] J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris and L.E. Brus, *Science* **272** (1996) 255.
- [24] J.K. Trautman and J.J. Macklin, *Chem. Phys.* **205** (1996) 221.
- [25] Zitat Prof. Wild, ETH Zürich.
- [26] T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito and T. Yanagida, *Nature* **374** (1995) 555.
- [27] I. Sase, H. Miyata, J.E. Corrie, J.S. Craik and K. Kinoshita, *Biophys. J.* **69** (1995) 323.
- [28] R.D. Vale, T. Funatsu, D.W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada and T. Yanagida, *Nature* **380** (1996) 451.
- [29] T. Schmidt, G.J. Schutz, W. Baumgartner, H.J. Gruber and H. Schindler, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 17662.
- [30] R.M. Dickson, D.J. Norris, Y.L. Tzeng, W.E. Moerner, *Science* **274** (1996) 966.
- [31] R.A. Keller, W.P. Ambrose, P.M. Goodwin, J.H. Jett, J.C. Martin and M. Wu, *Appl. Spectrosc.* **50** (1996) A12.
- [32] M. Eigen and R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91** (1994) 5740.
- [33] U. Mets and R. Rigler, *J. Fluoresc.* **4** (1994) 259.
- [34] S. M. Nie, D.T. Chiu and R.N. Zare, *Science* **266** (1994) 1018.
- [35] J. Mertz, C. Xu and W.W. Webb, *Opt. Lett.* **20** (1995) 2532.
- [36] L. Brand, C. Eggeling, C. Zander, K.H. Drexhage and C.A.M. Seidel, *J. Phys. Chem.* **101** (1997) 4313.
- [37] E. J. Sanchez, L. Novotny, G.R. Holtom and X.S. Xie, *J. Phys. Chem.* **101** (1997) 7019.
- [38] Y. Ishii and T. Yanagida, *Single Mol.* **1** (2000) 5.
- [39] P.W. Atkins.: Quanten. Begriffe und Konzepte für Chemiker. Weinheim 1993 [40] H. Haken und H.C. Wolf: Molekülphysik und Quantenchemie. Berlin 1994<sup>2</sup>
- [41] P.W. Atkins: Physikalische Chemie. Weinheim 1990

- [42] W.M. Yen and P.M. Selzer: Laser Spectroscopy in Solids. Berlin 1986
- [43] L. Kador, *J. Phys. Chem.* **95** (1991) 5574.
- [44] W. Rettig, B. Strehmel, S. Schrader and H. Seifert: Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine. Berlin 1999
- [45] S. Kummer, Dissertation. Universität München 1996
- [46] S. Mais, Dissertation. Universität München 2000
- [47] D. Wöhrle, M. W. Tausch, W.-D. Stohrer: Photochemie. Weinheim 1998
- [48] C. Gerthsen und H. Vogel: Physik. Ein Lehrbuch zum Gebrauch neben Vorlesungen. Berlin 1993<sup>17</sup>
- [49] K. Meyberg und P. Vachenaer: Höhere Mathematik 2. Berlin 1991
- [50] Princeton Instruments Catalog of High Performance Digital CCD Cameras. Trenton 1997
- [51] A. Szabo, *Phys. Rev. Lett.* **25** (1970) 924.
- [52] I.I. Abram, R.A. Auerbach, R.R. Birge, B.E. Kohler and J.M. Stevenson, *J. Phys. Chem.* **94** (1990) 1237.
- [53] J. L. Skinner, *Ann Rev. Lett.* **25** (1970) 924
- [54] W.E. Moerner and T. Basché, *Angew. Chemie* **105** (1993) 537; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32** (1993) 457.
- [55] E. Hecht: Optik. Bonn 1989
- [56] F. Koberling, Diplomarbeit. Universität München 1996
- [57] J. Engelhardt and W. Knebel, *Physik i. u. Zeit* **24** (1993) 70.
- [58] J. B. Pawley (Hrsg.): Handbook of Biological Confocal Microscopy. New York 1995<sup>2</sup>
- [59] M. Orrit and J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.* **65** (1990) 2716.
- [60] T. Hellmuth, *Phys. Bl.* **49** (1993) 489.
- [61] J.K. Trautman and J.J. Macklin, *Chem. Phys.* **205** (1996) 221.
- [62] F. Güttler, T. Irgartinger, T. Plakhotnik, A. Renn and U.P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **217** (1994) 393.
- [63] J.W. Lichtman, *Spek. D. Wiss.* (Okt. 1994) 78.

- [150] P. Schwille, U. Haupt, S. Maiti and W.W. Webb, *Biophys. J.* **77** (1999) 2251.
- [151] M. Wachsmuth, W. Waldec, J. Langowski, *J. Mol Biol* **298** (2000) 677.
- [152] K. Luby-Phelps, P.E. Castle, D.L. Taylor and F. Lanni, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 4910.
- [153] K. Luby-Phelps, D.L. Taylor and F. Lanni, *J. Cell Biol.* **102** (1986) 2015.
- [154] I. Lang, M. Scholz and R. Peters., *J. Cell Biol.* **102** (1986) 1183.
- [155] A. Partikian, B. Ölveczky, R. Swaminathan, Y. Li, A.S. Verkman, *J. Cell. Biol.* **140** (1998) 821.
- [156] M.J. Dayel, E.F.Y. Horn, and A.S. Verkman, *Biophys. J.* **76** (1999) 2843.
- [157] M. Arrio-Dupont, S. Cribier, G. Foucault, P.F. Devaux and A. d'Albis, *Biophys. J.* **70** (1996) 2327.
- [158] M. Arrio-Dupont, G. Foucault, M. Vacher, P.F. Devaux and S. Cribier, *Biophys. J.* **78** (2000) 901.
- [159] O. Seksek, J. Biwersi and A.S. Verkman., *J. Cell Biol.* **138** (1997) 131.
- [160] K. Fushimi and A.S. Verkman, *J. Cell Biol.* **112** (1991) 719.
- [161] K. Luby-Phelps, S. Mujumdar, R.B. Mujumdar, L.A. Ernst, W. Galbraith and A.S. Waggoner, *Biophys. J.* **65** (1993) 236.
- [162] K. Luby-Phelps, *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** (1994) 3.
- [163] K. Luby-Phelps, *Int. Rev. Cytol.* **192** (2000) 189.
- [164] G.W. Gordon, B. Chazotte, X.F. Wang and B. Herman, *Biophys. J.* **68** (1995) 766.
- [165] N. Periasamy and A.S. Verkman, *Biophys. J.* **75** (1998) 557.
- [166] P.R. Smith, I.E.G. Morrison, K.M. Wilson, N. Fernandez and R.J. Cherry, *Biophys. J.* **76** (1999) 3331.
- [167] R.J. Cherry, P.R. Smith, I.E.G. Morrison, M. Koukidou, K. Wilson and N. Fernandez, *Biochem. Soc. Trans.* **25** (1997) 1097.
- [168] R. N. Ghosh and W.W. Webb, *Biophys. J.* **57** (1991) 286a.
- [169] R. Simson, B. Yang, S.E. Moore, P. Doherty, F.S. Walsh and K.A. Jacobson, *Biophys. J.* **74** (1998) 297.
- [170] M.J. Saxton, *Biophys. J.* **66** (1994) 394.

- and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96** (1999) 893.
- [87] A.A. Deniz, M. Dahan, J.R. Grunwell, T. Ha, A.E. Faulhaber, D.S. Chemla, S. Weiss and P.G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 3670.
- [88] T. Ha, X. Zhuang, H.D. Kim, J.W. Orr, J.R. Williamson and S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 9077.
- [89] T. Ha, T. Enderle, D.S. Chemla, P.R. Selvin and S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3979.
- [90] I. Sase, H. Miyata, S. Ishiwata and K. Kinoshita, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94** (1997) 5646.
- [91] D.M. Warshaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (1998) 8034.
- [92] T. Ha, J. Glass, T. Enderle, D. S. Chemla and S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **80** (1998) 2093.
- [93] S.C. Hopkins, *Biophys. J.* **72** (1997) A1.
- [94] A.D. Mehta, M. Rief, J.A. Spudich, D.A. Smith and R.M. Simmons, *Science* **283** (1999) 1689.
- [95] A. Ishijima, H. Kojima, T. Funatsu, M. Tokunaga, H. Higuchi and T. Yanagida, *Cell* **92** (1998) 161.
- [96] S.B. Smith, Y. Cui and C. Bustamante, *Science* **271**, 795 (1996).
- [97] T.R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon and V. Croquette, *Science* **271** (1996) 1835.
- [98] M.S. Kellermayer, S.B. Smith, H.L. Granzier and C. Bustamante, *Science* **276** (1997) 1112.
- [99] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J.M. Fernandez and H.E. Gaub, *Science* **276** (1997) 1109.
- [100] L. Tskhovrebova, J. Trinick, J. A. Sleep and R. M. Simmons, *Nature* **387** (1997) 308.
- [101] L. M. Mannuzzu, M. M. Moronne and E. Y. Isacoff, *Nature* **271**, 213 (1996).
- [102] Y. Ishii and T. Yanagida, *Single Mol.* **1** (2000) 5.
- [103] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson: *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim 1995<sup>3</sup>
- [104] B. Alberts, *Cell* **92** (1998) 291.
- [105] Th. Schmidt, G.J. Schütz, W. Baumgartner, H.J. Gruber and H. Schindler, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 2926.
- [106] A. Sonnleitner, G.J. Schütz and Th. Schmidt, *Biophys. J.* **77** (1999) 2638.
- [107] T. Ide and T. Yanagida, *Biophys. Res. Comm.* **265** (1999) 595
- [108] Y. Sako, S. Minoguchi and T. Yanagida, *Nature Cell Biology* **2** (2000) 168.
- [109] J.V. Sengers and J.T.R. Watson, *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **19** (1990) 371 in: D.R. Lide (Editor): Handbook of Chemistry and Physics. Boca Raton 1991<sup>72</sup>
- [110] M.J. Saxton, K. Jacobsen, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26** (1997) 373.
- [111] H.C. Berg: Random Walks in Biology. Princeton 1993
- [112] U. Kubitscheck, O. Kückmann, Th. Kues and R. Peters *Biophys. J.* **78** (2000) 2170.
- [113] C.M. Anderson, G.N. Georgiou, I.E.G. Morrison, G.V.W. Stevenson and R.J. Cherry, *J. Cell Sci.* **101** (1992) 415.
- [114] H. Qian, M.P. Sheetz and E.L. Elson *Biophys. J.* **60** (1991) 910.
- [115] E. L. Elson, *Ann. Rev. Phys. Chem.* **36** (1985) 379.
- [116] D. Magde, E.L. Elson and W.W. Webb. *Phys. Rev. Lett.* **29** (1972) 705.
- [117] R. Peters, J. Peters, K. Tews and W. Bahr, *Biochim. Biophys. Acta.* **367** (1974) 282.
- [118] D. Axelrod, D. Koppel, J. Schlessinger, E.L. Elson and W.W. Webb, *Biophys. J.* **16** (1976) 1055.
- [119] M. Edidin, M. Zagyansky and T. Lardner, *Science* **191** (1976) 466.
- [120] J. Schlessinger, D. Koppel, D. Axelrod, K. Jacobson, W. Webb and E. Elson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73** (1976) 2409.
- [121] R. Cherry, *Biochim. Biophys. Acta.* **559** (1979) 289.
- [122] L.S. Barak, W.W. Webb, *J. Cell Biol.* **95** (1982) 846.
- [123] M. de Brabander, H. Geerts, R. Nuydens, M. Moeremans, J. de Mey, *Cytobios* **43** (1985) 273.
- [124] J. Gelles, B. J. Schnapp, M.P. Sheetz, *Nature*, **331** (1988) 450.
- [125] M.P. Sheetz, S. Turney, H. Qian and E.L. Elson, *Nature* **340** (1989) 284.
- [126] M. de Brabander, R. Nuydens, A. Ishihara, B. Holifield, K. Jacobson and H. Geerts. *J. Cell Biol.* **112** (1991) 1143.

- [127] G.M. Lee, A. Ishihara and K. Jacobsen, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** (1991) 6274.
- [128] A. Kusumi, Y. Sako and M. Yamamoto, *Biophys. J.* **65** (1993) 2021.
- [129] Y. Sako and A. Kusumi. *J. Cell Biol.* **125** (1994) 1251.
- [130] R. Simson, E.D. Sheets and K. Jacobson, *Biophys. J.* **69** (1995) 989.
- [131] Y. Wang, J.D. Silverman and L. Cao. *J. Cell Biol.* **127** (1994) 963.
- [132] R.N. Ghosh and W.W. Webb, *Biophys. J.* **66** (1994) 1301.
- [133] B.W. Hicks and K.J. Angelides, *J. Membr. Biol.* **144** (1995) 231.
- [134] M. Goulian and S.M. Simon, *Biophys. J.* **79** (2000) 2188.
- [135] K.M. Wilson, I.E.G. Morrison, P.R. Smith, N. Fernandez and R. J., Cherry, *J. Cell Sci* **109** (1996) 2101.
- [136] L.S. Barak, W.W. Webb, *J. Cell Biol.*, **90** (1981) 595.
- [137] M. Rein, J. Unkeless, F.Y.S. Chuang, M. Sasaroli and R. da Costa, *J. Membr. Biol.* **135** (1993) 83.
- [138] G.M. Lee, B. Johnstone and K. Jacobsen, B. Caterson, *J. Cell Biol.* **123** (1993) 1899.
- [139] R. Rigler and J. Widengren, *Bioscience* **3** (1990) 180.
- [140] P. Schwille, F. Oehlenschläger and N. Walter, *Biochemistry* **35** (1996) 10182.
- [141] G.J. Schütz, G. Kada, V.P. Pastushenko and H. Schindler, *EMBO J.* **19** (2000) 892.
- [142] S. Maiti, U. Haupts and W.W. Webb., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** (1997) 11753.
- [143] P. Schwille, J. Bieschke and F. Oehlenschläger, *Biophys. Chem.* **66** (1997) 211.
- [144] P.Schwille, F.-J.Meyer-Almes and R.Rigler, *Biophys. J.* **72** (1997) 1878.
- [145] U. Kettling, A. Koltermann, P. Schwille and M. Eigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 14116.
- [146] A. Koltermann, U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler and M. Eigen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** (1998) 14121.
- [147] K.M. Berland, P.T.C. So and E. Gratton, *Biophys. J.* **68** (1995) 694.
- [148] R. Brock, M. Hink and T. Jovin, *Biophys. J.* **75** (1998) 2547.
- [149] J.C. Politz, E.S. Browne, D.E. Wolf and T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 6043– 6048.

- P.E. Dawson, P.G. Schultz and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** (2000) 5179.
- [234] F.O. Holtrup, G.J. Müller and K. Müllen, *Chem. Eur. J.* **3** (1997) 219.
- [235] M. Ried, mündliche Information
- [236] P. Karlsson: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Stuttgart 1988<sup>12</sup>
- [237] T. Endress, Diplomarbeit, Universität München 2000
- [238] G. Jung, Dissertation in prep.
- [239] Zur Bestimmung der Detektionseffizienz vergleiche [226]
- [240] Die Bestimmung des Verstärkungsfaktors erfolgte gemäß Tabelle des Verkäufers der CCD-Kamera, H. Gulde, Visitron Systems.
- [241] Die nicht in Kapitel 6.4 erwähnten photophysikalischen Daten ( $k_{21}$  und  $k_{31}$ ) wurden aus Autokorrelationsmessungen bestimmt.
- [242] Man geht davon aus, daß nur solche Moleküle, deren Übergangsdipolmoment parallel zur Orientierung des Laserstrahls liegt, im kurzen Zeitfenster von 5 ms bei Detektion mit der Imaging-Technik genügend hell über dem Untergrund erscheinen, um detektiert zu werden. Bei zirkular polarisierter Anregung würden alle Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmoment in der xy-Ebene liegt. In solchen Fällen kann nach [105]  $\sigma = 3\sigma_0$  angesetzt werden. Für linear polarisierte Anregung kann  $\sigma$  bis zu  $6\sigma_0$  angesetzt werden.
- [243] P. Gallay, V. Stitt, C. Mundy, M. Oettinger and D. Trono, *J. Virol.* **70** (1996) 1027.
- [244] M. Stevenson, *Trends Cell Biol.* **6** (1996) 9.
- [245] G. Whittaker, M. Bui and A. Helenius, *Trends Cell Biol.* **6** (1996) 67.
- [246] U.F. Greber and H. Kasamatsu, *Trends Cell Biol.* **6** (1996) 189.
- [247] B. Sodeik, M.W. Ebersold and A. Helenius, *J. Cell Biol.* **136** (1997) 1007.
- [248] M. Fricker, M. Hollinshead, N. White and D. Vaux, *J. Cell Biol.* **136** (1997) 531.
- [249] G. J. Schütz,\* V. Ph. Pastushenko, H. J. Gruber, H.-G. Knaus, B. Pragl, H.Schindler, *Single Mol.* **1** (2000) 25.
- [250] G. R. Whittaker, M. Kann and A. Helenius, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16** (2000) 627.
- [251] C.R. Cantor and P. R. Schimmel: Biophysical Chemistry II. Techniques for the Study of Biological Structure and Function. New York 1980

- [171] M.J. Saxton, *Biophys. J.* **70** (1996) 1250.
- [172] J.P. Bouchaud and A. Georges, *Phys. Rep.*, **195** (1990) 127.
- [173] R.N. Gosh and W.W. Webb, *Biophys. J.* **66** (1994) 1301.
- [174] M.J. Saxton, *Biophys. J.* **67** (1994) 2110.
- [175] Y. Sako and A. Kusumi, *J. Cell Biol.*, **129** (1995) 1559.
- [176] M.J. Saxton, *Biophys. J.* **69** (1995) 389.
- [177] M. Ried, Dissertation. Universität München 2000
- [178] S. Modrow und D. Falke: Molekulare Virologie. Berlin 1997
- [179] R.M. Kotin, M. Siniscalco, R.J. Samulski, X.D. Zhu, L. Hunter, C.A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzyczka, M. Rocchi and K.I. Berns, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) 2211.
- [180] M. A. Labow and K. I. Berns, *J. Virol.* **62** (1988) 1705.
- [181] S.K. McLaughlin, P. Collis, P.L. Hermonat and N. Muzyczka, *J. Virol.* **62** (1988) 1963.
- [182] E. Mendelson, J.P. Trempe and B.J. Carter, *J. Virol.* **60** (1986) 823.
- [184] B.J. Carter and J.A. Rose, *Virology* **61** (1974) 182.
- [185] B.E. Redemann, E. Mendelson and B.J. Carter, *J. Virol.* **63**(1989) 873.
- [186] G. Siegl, R. C. Bates, K. I. Berns, B. J. Carter, D. Kelly, E. Kurtak and P. Tattersall *Intervirology* **23** (1985) 61.
- [187] P.R. Chipman, M. Agbandje, S. Kajagaya, K.E. Brown, N.S. Young, T.S. Baker and MG. Rossmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 7502.
- [188] J. Tsao, M.S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Loo, T. J. Smith, M.G. Rossmann and R.W. Compans, *Science* **251** (1991) 1456.
- [189] I.P. Lorentz: Gruppentheorie und Molekülsymmetrie. Tübingen 1992
- [190] B.J. Carter, *Curr. Opin. Biotechnol.* **3** (1992) 533.
- [191] M. Hallek, *Molec. Ther.* **1** (1998) 417.
- [192] G. Podsakoff, K.J. Wong and S. Chatterjee, *J. Virol.* **68** (1994) 5656.
- [193] C. Summerford and R.J. Samulski, *J. Virol.* **72** (1998) 1438.

- [194] C.E. Wals, J.M. Liu, X. Xiao, N.S. Young, A.W. Nienhuis and R.J. Samulski, *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (1992) 7257.
- [195] J.S. Bartlett, R.J. Samulski, T.J. McCown, *Hum. Gen Ther.* **9** (1998) 1181.
- [196] G. Maass, C. Bogedain, U. Scheer, D. Michl, M. Hörer, M. Braun-Falco, M. Volkenandt, D. Schadendorf, C.M. Wendtner, E.L. Winnacker, R.M. Kotin and M. Hallek, *Hum Gene Ther* **9** (1998) 1049.
- [197] J. S. Bartlett, R. Wilcher, R. J. Samulski *J. Virol.* **74** (2000) 2777.
- [198] P. L. Leopold, B. Ferris, I. Grinberg, S. Worgall, N.R. Hackett and R.G. Crystal, *Hum. Gene Ther.* **9** (1998) 367.
- [199] H. Mizukami, N.S. Young and K.E. Brown, *Virology* **217** (1996) 124.
- [200] C. Summerford, J.S. Bartlett and R.J. Samulski, *Nat. Med.* **5** (1999) 78.
- [201] K.T. Kaljot, R.D. Shaw, D.H. Rubin and H.B. Greenberg, *J. Virol.* **62** (1988) 1136.
- [202] C. Lamaze and S. L. Schmid, *Curr. Opin. Cell Biol.* **7** (1995) 573.
- [203] U.F. Greber, M. Suomalainen, R.P. Stidwill, K. Boucke, M.W. Ebersold, and A. Helenius, *EMBO J.* **16** (1997) 5998.
- [204] M J. Varga, C. Weibull and E. Everitt, *J. Virol.* **65** (1991) 6061.
- [205] K. Wang, S. Huang, A. Kapoor-Munshi and G. Nemerow, *J. Virol.* **72** (1998) 3455.
- [206] T.J. Wickham, E.J. Filardo, D.A. Cheresch and G.R. Nemerow, *J. Cell Biol.* **127** (1994) 257.
- [207] H. Zeichhardt, K. Wertz, P. Willingman and K.-O. Habermehl, *J. Gen. Virol.* **66** (1985) 483.
- [208] S. Basak and H. Turner, *Virology* **186** (1992) 368.
- [209] P. Linser, H. Bruning and R.W. Armentrout, *J. Virol.* **24** (1977) 211.
- [210] S. Ohkuma and B. Poole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1978) 3327.
- [211] M.G. Kaplitt, P. Leone, R.J. Samulski, X. Xiao, D.W. Pfaff, K.I. O'Malley and M. J. During, *Nature Genet.* **8** (1994) 148.
- [212] J.G. Flannery, S. Zolotukhin, M.I. Vaquero, M.M. LaVail, N. Muzyczka and W.W. Hauswirth, *Proc Natl Acad Sci U S A* **24** (1997) 6916.
- [213] A. K. Lalwani, B.J. Walsh, P.G. Reilly, N. Muzyczka and A.N. Mhatre, *Gene Ther*

- 3** (1996) 588.
- [214] F. Rolling, Z. Nong, S. Pisvin, D. Collen, *Gene Ther* **4** (1997) 757.
- [215] M. Braun-Falco, A. Doenecke, H. Smola and M. Hallek, *Gene Ther* **3** (1999) 432.
- [216] T.R. Flotte, S.A. Afione, C. Conrad, S.A. McGrath, R. Solow, H. Oka, P.L. Zeitlin, W.B. Guggino and B.J. Carter, *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (1993)10613.
- [217] Y. Ishii, T. Yoshida, T. Funatsu, T. Wazawa and T. Yanagida, *Chem. Phys.* **247** (1999)163.
- [218] J. Tittel, Dissertation. Universität München 1997
- [219] W. Göhde, Dissertation. Universität Münster 1998
- [220] J.B. Birks: Photophysics of Aromatic Molecules. New York 1970
- [221] T. Förster: Delocalized Excitation and Excitation Transfer in: O. Sinanoglu: Modern Quantum Chemistry. New York 1968<sup>3</sup>
- [222] D.L. Dexter, *J. Chem. Phys.* **21** (1953) 836.
- [223] S. Mais, Diplomarbeit. Universität München 1996
- [224] F. Schwabl: Quantenmechanik. Hamburg 1992
- [225] T. Ha, Th. Enderle, D.F. Ogletree, D.S. Chemla, P.R. Selvin and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 6264.
- [226] G. Seisenberger, Diplomarbeit. Universität München 1997
- [227] P. Schlichting, B. Duscherer, G. Seisenberger, T. Basché, C. Bräuchle and C. Müllen, *Chem. Eur. J.* **5** (1999) 2388.
- [228] C. Eggeling, J.R. Fries, L. Brand, R. Gunther and C.A. Seidel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95** (1998) 1556.
- [229] M. Sauer, *Bioimaging* **6** (1998) 14.
- [230] M. Dahan, A.A. Deniz, T.J. Ha, D. Chemla, P. Schultz and S. Weiss, *Chem. Phys.* **247** (1999) 85.
- [231] Y. Jia, D.S. Talaga, W.L. Lau, H. Lu, W.F. DeGrado and R.M. Hochstrasser, *Chem Phys.* **247** (1999) 69.
- [232] T. Ha, A.Y. Ting, J. Liang, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schulz and S. Weiss, *Chem Phys.* **247** (1999) 107.
- [233] A.A. Deniz, T.A. Laurence, G.S. Belligere, M. Dahan, A.B. Martin, D.S. Chemla,

## ausgewählte Tagungsbeiträge

1. GDCH-Tagung, November 1997, Köln  
 Vortrag: Förster-Resonanz-Energietransfer am einzelnen Donor-Akzeptor-Paar  
G. Seisenberger, P. Schlichtig, K. Müllen, T. Basché, C. Bräuchle
2. DPG-Tagung, März 1998, Bayreuth  
 Poster: Förster-Resonanz-Energietransfer am einzelnen Donor-Akzeptor-Paar  
G. Seisenberger, P. Schlichtig, K. Müllen, T. Basché, C. Bräuchle
3. Tagung der VW-Stiftung: New Trends in Physics, Chemistry and Biology with Single Molecules, Juni 1999, Wiesbaden  
 Poster: Konformationsanalyse mit FRET am einzelnen Donor-Akzeptor-Paar  
G. Seisenberger, P. Schlichtig, K. Müllen, T. Basché, C. Bräuchle
4. Eurobiophysics, September 2000, München  
 Vortrag: Infectious entry pathway of the AAVirus in living HeLa cells studied with single molecule microscopy  
C. Bräuchle, G. Seisenberger, T. Endress, M. Ried, M. Hallek
5. World Congress of Cellular and Molecular Biology, Oktober 2000, Jena  
 Vortrag: Infectious entry pathway of the AAVirus in living HeLa cells studied with single molecule microscopy  
C. Bräuchle, G. Seisenberger, T. Endress, M. Ried, M. Hallek

- [252] H. Tanaka, A. Ishijima, M. Honda, K. Saito and T. Yanagida, *Biophys. J.* **75** (1998) 1886.
- [253] J.E. Molloy, J.E. Burns, J. Kendrick-Jones, R.T. Tregear and D.C.S. White, *Nature* **378** (1995) 209.
- [254] C. Veigel, M.L. Bartoo, D.C.S. White, J.C. Sparrow and J.E. Molloy, *Biophys. J.* **75** (1998) 1424.
- [255] C. Veigel, L.M., Coluccio, J.D. Jontes, J.C. Sparrow, R.A. Milligan and J.E. Molloy, *Nature* **398** (1999) 530.
- [256] K. Kitamura, M. Tokunaga, A.H. Iwane and T. Yanagida, *Nature* **397** (1999) 129.
- [257] C.M. Coppin, J.T. Finer, J.A. Spudich and R.D. Vale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (1996) 1913.
- [258] H. Higuchi, E. Muto, Y. Inoue and T. Yanagida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 4395.
- [259] M.J. Schnitzer and S.M. Block, *Nature* **388** (1997) 386.
- [260] H. Kojima, E. Muto, H. Higuchi and T. Yanagida, *Biophys. J.* **73** (1997) 2012.
- [261] W. Hua, E.C. Young, M.L. Fleming and J. Gelles, *Nature* **388** (1997) 390.
- [262] K. Visscher, M.J. Schnitzer and S.M. Block, *Nature* **400** (1999) 184.
- [263] Y. Okada and N.A. Hirokawa, *Science* **283** (1999) 1152.
- [264] Y. Inoue, A.H. Iwane and T. Yanagida, *Biophys. J.* **76** (1999) A44.
- [265] R.D. Astumian and I. Derenyi, *Biophys. J.* **77** (1999) 993.
- [266] R.D. Vale and F. Oosawa, *Biophys. J.* **26** (1990) 97.
- [267] H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita, *Nature* **386** (1997) 299.
- [268] R. Yasuda, H. Noji, K. Kinoshita Jr. and M. Yoshida, *Cell* **93** (1998) 1117.
- [269] Y. Harada, T. Funatsu, K. Murakami, Y. Nonoyama, A. Ishihama and T. Yanagida, *Biophys. J.* **76** (1999) 709.
- [270] H. Yin, M.D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S.M. Block and J. Gelles, *Science* **270** (1995) 1653.
- [271] K. Kinoshita, R. Yasuda, H. Noji, S. Ishiwata and M. Yoshida, *Cell* **93** (1998) 21.
- [272] M.D. Wang, M.J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles and S.M. Block, *Science* **282** (1998) 902.

- [273] T. Foerster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **6** (1948) 55.
- [274] T. Wazawa, Y. Ishii, T. Funatsu and T. Yanagida, *Biophys. J.* in press (2000)
- [275] T. Ha, A.Y. Tjong, J. Liang, B. Caldwell, A.A. Deniz, D.S. Chemla, P.G. Schultz, and S. Weiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999) 893.
- [276] G.S. Harms, A. Sonnleitner, G.J. Schütz, H.J. Gruber and Th. Schmidt, *Biophys. J.* **77** (1999) 2864.
- [277] D.M. Warshaw, E. Hayes, D. Gaffney, A. Lauzon, J. Wu, G. Kennedy, K. Trybus, S. Lowey and C. Berger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 8034.
- [278] M.A. Bopp, A. Sytnik, T.D. Howard, R.J. Cogdell and R.M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (1999)11271.
- [279] I. Sase, H. Miyata, S. Ishiwata and K. Kinoshita, jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (1997) 5646.
- [280] R. Yamasaki, M. Hoshino, T. Wazawa, Y. Ishii, T. Yanagida, Y. Kawata, T. Higurashi, K. Sasaki, J. Nagai and Y. Goto, *J. Mol. Bio.* **247** (2000) 163.
- [281] S. Tashiro, J. Walter, A. Shinohara, N. Kamada, and T. Cremer, *J. Cell Biol* **150** (2000) 283.
- [282] J. L. Broers, B. M. Machiels, G. J. van Eys, H. J. Kuijpers, E. M. Manders, R. van Driel and F. C. Ramaekers, *J Cell Sci* **112** (1999) 3463.

## Veröffentlichungen

### **P. Schlichting, B. Duscherer, G. Seisenberger, T. Basché, C. Bräuchle and C. Müllen.**

A Bichromophore Based on Perylene and Terrylene for Energy Transfer Studies at the Single Molecule Level.

*Chem. Eur. J.* **5** (1999) 2388.

### **G. Seisenberger, M. U. Ried, Th. Endress, M. Hallek and C. Bräuchle (2001).**

Fluorescent Dynamic Tracking of the Pathway of Adeno-associated Virus Type 2 in Living Cells by Single Molecule Spectroscopy.

Submitted to *Nature*

### **G. Seisenberger, M. U. Ried, M. Hallek and C. Bräuchle (2001).**

Analysis of Molecular Kinetics in Cellular Compartments by Single Molecule Spectroscopy. in preparation

### **G. Seisenberger, I. Frank, C. Bräuchle (2001).**

Model Studies on Förster Resonance Energy Transfer using a Bichromophore of TDI and Perylene on a Single Molecule Level.

In preparation

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Georg Seisenberger  
Geburtsdatum: 08.02.72  
Geburtsort: München  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

09/1978 - 07/1982 Josef-Maria-Lutz-Grundschule Pfaffenhofen  
09/1982 - 07/1991 Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen (Abitur)  
11/1992-05/1997 Studium der Chemie und Philosophie an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
05/1995 Vordiplom in Chemie  
11/1996 Diplom in Chemie  
12/1996-05/1997 Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Betreuer: Prof. Dr. C. Bräuchle)  
seit 07/1997 Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
seit 07/1997 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl von Prof. Dr. C. Bräuchle  
(Department of Chemistry, LMU München)