

# INAUGURAL - DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen  
Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

Vorgelegt von

Dipl. Chemiker Christian Michael Roth

aus Neuss/Rh.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2006



Untersuchungen in lebenden Zellen mit Hilfe neuer  
Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Gutachter: Prof. Dr. Markus Sauer  
Prof. Dr. Jürgen Wolfrum



»Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.«

JUSTUS VON LIEBIG (1803-1873)

Für meine Eltern  
Für meine Familie



# ZUSAMMENFASSUNG

Die Arbeiten von ERNST ABBE in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts brachten der Mikroskopie eine neue Leistungsfähigkeit und konnten so die Forschungsmöglichkeiten in der Biologie, vor allem in der Botanik, Zellbiologie und Mikrobiologie, und der Medizin deutlich verbessern. Im Jahr 1930 wurde die Fluoreszenzmikroskopie entwickelt und eröffnete völlig neue Möglichkeiten. Bis heute wurden zahlreiche Varianten der Fluoreszenzmikroskopie entwickelt. Hervorzuheben sind dabei die stimulierte Emissionslöschung (*Abk.:* STED), sowie die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie (*engl.:* single molecule fluorescence spectroscopy, *Abk.:* SMFS), zu denen Methoden, wie Totalreflexions-Fluoreszenz Mikroskopie (*engl.:* total internal reflection fluorescence microscopy, *Abk.:* TRIFM) und die konfokale Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie gehören. Die Stärke der Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie liegt in der geringen Konzentration der verwendeten, fluoreszenten Sonden. Der Einsatz solcher Sonden kann wiederum als Reporter für molekulare Interaktionen dienen, oder strukturelle Änderungen, z.B. in der Nanoumgebung, aufzeigen, die eine Heterogenität besitzen. Die Entwicklungen im Bereich der optischen Techniken, ermöglicht eine höhere Auflösung sogar unter die Auflösungsgrenze von ABBE (STED). Dies eröffnet den Biowissenschaften neue Einblicke in molekulare Prozesse in Zellen und leistet somit einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der komplexen Vorgänge in lebenden Organismen.

Im Gegensatz zu Ensemble-Methoden, welche nur einen Mittelwert wiedergeben, kann man durch Betrachtung einzelner Moleküle Subpopulationen auflösen. Zu den Parametern, die der SMFS zugänglich sind, gehören die Fluoreszenzintensität, die Fluoreszenzlebensdauer, Orientierung des Dipols oder die Wellenlänge. Die Verwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*engl.:* fluorescence correlation spectroscopy, *Abk.:* FCS) ermöglicht eine Analyse der Dynamik innerhalb eines gewählten Zeitfensters. Dabei können Diffusionsgeschwindigkeit von Fluorophoren, aber auch photophysikalische Übergänge und der Konformation beobachtet werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Anwendung neuer Methoden der SMFS für Untersuchungen in lebenden Zellen, insbesondere von Transportprozessen. Daher setzt sich diese Arbeit im Wesentlichen mit zwei Schwerpunkten auseinander: (i) das gezielte Einschleusen fluoreszierender Sonden in lebenden Zellen, (ii) die Entwicklung einer Methode zur Beobachtung von schnellen Transport- und Diffusionsprozessen in lebenden Zellen.

Die Verfügbarkeit endogen erzeugter Fluoreszenzfarbstoffe, also innerhalb der Zelle synthetisierter Farbstoff, ist begrenzt. Aufgrund der zusätzlichen geringen Photostabilität und komplizierter Photophysik, bedarf es hier alternativer Methoden. Organische Fluorophore, die entweder endogen oder exogen an den Protagonisten, z.B. ein Protein, gekoppelt werden, müssen die Zellmembran, entsprechend vor oder nach der Kopplung durchqueren. Dieser Transport wird durch die Zellmembran erschwert. Die Internalisierung solcher Stoffe kann z.B. durch Rezeptor vermittelten Transport oder Endozytose geschehen. Jedoch ist der Anspruch an den Transporter und seine Fracht in Bezug auf Größe und Form sehr hoch. Durch manuelle Methoden wie die Elektroporation oder Mikroinjektion werden die Zellen gestresst oder geschädigt und bieten nur bedingt eine Alternative mit Zukunft.

Die Verwendung von zellmembrangängigen Proteinen ist in den vergangenen Jahren zu einer neuen Methode zur Aufnahme in Zellen gereift. Die Peptide sind für die pharmazeutische Industrie aufgrund der Zellmembrangängigkeit, die auch zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ausgenutzt werden könnte und somit Arzneistoffe direkt in die entsprechenden Zellen transportiert, von großer Bedeutung. Zellmembrangängige Proteine, die in Viren oder auch in eukaryotischen Zellen vorkommen, gelangen durch die Zellmembran direkt in den Zellkern, um sich schließlich in den Nukleoli anzureichern. Bisherige Untersuchungen der viralen Proteine, wie z.B. das Tat-Protein des HI-Virus, haben gezeigt, dass die Aminosäuren Arginin und Lysin für den Erkennungs- und Aufnahmeprozess verantwortlich sind. Entsprechende Modifikationen des Tat-Proteins wurden teilweise sogar besser von den Zellen aufgenommen, als das Tat-Protein selber. Durch Verwendung von Homologen zu den nativen Aminosäuren besteht die Möglichkeit, die Peptide resistenter gegen einen möglichen Abbau durch Peptidasen zu machen. In Kooperation mit Prof Dr. D. SEEBACH, von der ETH-Zürich, wurden HeLa-Zellen mit Fluorescein markierten  $\beta$ -Peptiden inkubiert. Die inkubierten  $\beta$ -Peptide, basierend auf den  $\beta$ -Aminosäuren, konnten mit Hilfe der Fluoreszenz des Farbstoffes mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet und dokumentiert werden. Ebenso wie bei den  $\alpha$ -Peptiden konnte bei den  $\beta$ -Peptiden das typische Anfärbungsmuster der Zellen ab einer Peptidlänge von acht Aminosäuren beobachtet werden. Das Dekamer wurde nahezu in allen Zellen vor allem in den Nukleoli gebunden. Die Aufnahmeeffizienz erfolgte nicht kontinuierlich über die Konzentration, sondern benötigte eine bestimmte Schwellenkonzentration, ab der der Internalisierungsprozess stattfindet.

Durch die Experimente über das Aufnahmeverhalten der  $\beta$ -Peptide in Zellen zeigten sich die Peptide als zuverlässige Transporter für molekulare Fracht durch die Zellmembran



hindurch. Mit Hilfe dieses Transporters können neben Pharmazeutika, auch fluoreszente Sonden für die Diagnostik eingeschleust werden. Die Verwendung des Transporters für die Einschleusung fluoreszenter Sonden kann helfen, Signal- und Transportprozesse in der Zelle zu verfolgen. Durch Einschleusen einer Sonde und Aussetzen in der Nanoumgebung einer Zelle kann es, z.B. zur Verlangsamung durch Interaktionen, aber auch zu einer Erhöhung der Diffusion durch aktiven Transport kommen. Im Folgenden galt es eine Methode zu entwickeln, die derartige Unterschiede sichtbar machen.

Die Kombination der konfokalen, zeitaufgelösten Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie (*engl.*: fluorescence lifetime imaging microscopy, *Abk.*: FLIM) mit der FCS ermöglicht die Verbindung der Vorteile zweier empfindlicher Methoden. Während FLIM mit einer hohen Empfindlichkeit Photonen einzelner Fluoreszenzfarbstoffe mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung detektieren kann, liefert die FCS Informationen über die Dynamik in dem beobachteten Bereich. Durch die Beobachtung mehrerer diffundierender Moleküle, z.B. in Lösung lassen sich, durch die aus der Fluoreszenzfluktuation erhaltene Korrelation, Aufschlüsse über die Dynamik, z.B. die Wechselwirkungen zwischen der Sonde und der Nanoumgebung, in dem beobachteten System geben. Die Verbindung der beiden Techniken erzeugt eine Diffusionskarte des beobachteten Systems, wie z.B. einer Zelle. Unterschiede in der Diffusionszeit können so Aufschlüsse über die fluoreszenten Reporter geben, die z.B. durch Interaktionen der fluoreszenzmarkierten Protagonisten mit zellulären Komponenten auftreten oder aufgrund erhöhter Viskositäten längere Diffusionszeiten erfahren. Auch aktiver Transport z.B. entlang von Microtubuli ließe sich von der normalen Zelldiffusion diskriminieren. Bisherige Arbeiten, welche diese Techniken verknüpften brachten das Scanning-FCS hervor. Durch schnelles mehrmaliges Abtasten eines Bereiches einer Probe konnten bisher lediglich langsamere Diffusionsprozesse von Membranproteinen beobachtet werden. In dieser Arbeit wird die Entwicklung der bildgebenden Diffusionsmikroskopie gezeigt, die eine Kombination aus FLIM und FCS darstellt und auch schnellere Diffusionsprozesse bis in den Mikrosekundenbereich abbilden kann.

Die Methode der bildgebenden Diffusionsmikroskopie wurde an verschiedenen Systemen getestet, um die Anwendbarkeit abzuschätzen. Die ersten Versuche Heterogenitäten in Lösungen zu erkennen wurden mit einer Spitze einer Mikrokapillare erreicht, die in eine Lösung mit einem Farbstoff markiertem Oligonukleotid eintauchte. Zwei Elektroden, eine davon in der Mikrokapillare als Anode, sorgten für einen gerichteten elektrophoretischen Fluss der Oligonukleotide zur Öffnung der Mikrokapillare und auch hinein. Beobachtet wurde ein Anstieg der Diffusionszeit innerhalb der Kapillaröffnung. Da die Moleküle entlang der

optischen Achse wanderten, befanden sie sich, auf Grund der ellipsenartigen Asymmetrie des Laserfokus, länger im Beobachtungsvolumen und ergaben so länger Diffusionszeiten. Diese Experimente zeigten dass es möglich ist in der Diffusion räumlich aufgelöst darzustellen.

Die Entwicklung der bildgebenden Diffusionsmikroskopie für zelluläre Systeme eröffnet die Möglichkeit Diffusionsprozesse über eine ganze Zelle hinweg zu beobachten. Zu diesem Zweck wurden wiederum fluoreszente Farbstoffe, als Sonden an ein dT<sub>20</sub>-Oligonukleotid gekoppelt, eingesetzt. Die Analyse der mittels der bildgebenden Diffusionsmikroskopie zeigte Heterogenitäten in der Diffusion. Prinzipiell wurde damit die Möglichkeit geschaffen die Einschleusung fluoreszenter Sonden, wie z.B.  $\beta$ -Peptiden, zu untersuchen

## INTRODUCTION

The work done by ERNST ABBE in the second half of the 19<sup>th</sup> century lead to new abilities in microscopy. His discoveries strongly enhanced research in biology, mainly in botany, cell biology and micro biology, and also in medicine. In 1930 fluorescence microscopy was developed and revealed new opportunities. Up to date a lot of methods in fluorescence microscopy have been developed. Novel approaches are stimulated emission depletion (*abbr.:* STED) and single molecule fluorescence spectroscopy (*abbr.:* SMFS), e.g. total internal reflection fluorescence microscopy (*abbr.:* TIRFM) and the confocal single molecule fluorescence microscopy. The power of single molecule fluorescence microscopy is the low concentration needed for the detection of fluorescent probes. Such probes can act as a reporter for molecular interactions, and reveal structural changes, e.g. in the nanoscale environment. Developments of optical techniques like STED of the techniques allow a higher resolution even below the resolution limit by ABBE. This leads to new insight in life science, exploring molecular processes in cells and contributes the understanding of complex procedures in life organisms.

In contrast to ensemble methods, which only observe average values, one can reveal subpopulations by looking at single molecules. A lot of parameters can be obtained by SMFS, like fluorescence intensity, fluorescence lifetime and orientation of the absorption dipole or wavelength. The application of fluorescence correlation spectroscopy (*abbr.:* FCS) allows the analysis of dynamics within a certain time window. One can determine the velocity of diffusion of fluorophores, and also study photo physical processes or changes in the molecular scaffold.

The goal of this work was the development and application of new methods in SMFS that allow the observation of transport processes in living cells. To this end this works deals with two main topics: (i) the concerted infiltration of fluorescent probes in living cells, (ii) the development of a new method for the observation of fast transport or diffusion processes in living cells.

The availability of endogenous synthesized fluorescent dyes, which means synthesized inside the cell, is limited. As a result of the lower photo stability and complicated photo physics, there is a need for alternative methods. Organic fluorescent dyes, which are endogenously or exogenously, attached to a protagonist, e.g. a protein, have to transit the cell membrane at least once, before or after the coupling. This transport across the cell membrane can be complicated. The internalisation of such substances can be mediated by receptors or by

endocytosis. However, the demand to the transport system and the cargo concerning size and shape are limited. Manual methods like electroporation or micro injection might stress or even damage the cells and are a future-limited option.

The application of cell penetrating peptides (CPP) in recent years has grown to a new method in cellular uptake. For the pharmaceutical industry, the CPP are very interesting, because of their cell permeability, which can be used for crossing over the blood-brain-barrier. CPP, which can be found in viruses, but also in eukaryotic cells, can traverse the cell membrane and directly translocate in the cell nucleus to accumulate in the nucleoli. Previous studies of viral proteins, e.g. the Tat-protein derived from the HI-virus, revealed, that the amino acids arginine and lysine are a crucial part of the protein transduction domain (PTD) and the nuclear localisation sequence. Specific changes within the Tat-protein sequence shows the same or even better uptake into the cells, than the Tat-protein itself. By using a  $\beta$ -homologous amino acid as a monomer one can achieve a peptide, which is more stable against proteolytic degradation. In cooperation with Prof. Dr. D. SEEBACH, from ETH Zurich, HeLa cells were treated with Fluorescein labelled  $\beta$ -peptide. The  $\beta$ -peptides, consisting of  $\beta$ -amino acids, were observed by fluorescence microscopy. Similarly,  $\beta$ -peptides were showing the same staining pattern than the native  $\alpha$ -peptides. Starting with a length of eight amino acids the cellular uptake was studied. The decamer was taken up by nearly all of the cells mainly localising in the nucleoli. The efficiency of the uptake was not continuous with increasing across the concentration. It was necessary to pass over a certain concentration, at which the uptake process was starting.

With these studies of the behaviour of the cellular uptake of the  $\beta$ -peptides it was shown that they can be used as reliable transporters of molecular cargo across the cell membrane. According to this it is possible to infiltrate pharmaceuticals, but also fluorescent probes for diagnostics. The infiltration of fluorescent probes by the peptides may help investigating the signalling or transport processes in cell, and could also be used to explore the nano environment inside the cells, where interactions have an influence on, e.g., the diffusion behaviour of the probe. Interactions are slowing down the diffusion of the probe, whereas an increase of the diffusion might be observed when the probe undergoes active transport. The following section describes the development of a method which could allow the visualization of suchlike phenomena.

The combination of confocal fluorescence lifetime imaging (*abbr.*: FLIM) and FCS allows the connection of advantages of both techniques. Whereas, the collection of photons of

single fluorophores with high sensitivity and high temporal and spatial resolution represents FLIM, FCS yields information about the dynamic of the observed volume. By monitoring many fluorophores, e.g. in solution, the correlation of the fluorescence fluctuation abandons interactions of the probe with its nano environment. The connection of both techniques generates a diffusion map of the observed area, e.g. a cell. Differences within the diffusion times contain information about the behaviour of the fluorescent probe, e.g. the protagonist can undergo interactions with cellular components or diffusion can be slowed down due to higher viscosities. The active transport, e.g. along microtubule, might be discriminated from regular cellular diffusion. Previous work applied regular confocal laser scanning for scanning FCS. The probe is scanned with high repetition rate and the correlation of subsequent pixels reveals only slow diffusion processes, e.g. membrane proteins. In this work the development of the diffusion imaging microscopy, a combination of FLIM and FCS, is presented, which allows to determine even faster diffusion processes down to the micro second time scale.

The method of diffusion imaging microscopy (*abbr.:* DIM) was tested on different experimental systems to proof the feasibility. The heterogeneity of the diffusion has been observed at the tip of a micro capillary, dipped into a solution containing a fluorescent labelled oligonucleotide. The anode inside the micro capillary caused an electric field along which the oligonucleotides travelled. Within the capillary an apparently slower motion has been observed. Those experiments showed diffusion times can be used to give contrast in microscopic images.

The development of the diffusion imaging microscopy on cellular systems gives the possibility to perform a diffusion analysis over a whole cell. To this end fluorophores linked to a dT<sub>20</sub>-oligonucleotide were brought into a cell and investigated by diffusion imaging microscopy. The resulting diffusion maps showed heterogeneities in cells. By development of this method the investigation of transport processes like uptake of  $\beta$ -peptides, has become possible.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>I</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>A EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<i>A.1 ZELLMEMBRANGÄNGIGE PEPTIDE.....</i>	<i>3</i>
<i>A.2 BILDGEBENDE DIFFUSIONSANALYSE.....</i>	<i>5</i>
<b>B THEORIE</b>	<b>7</b>
<hr/>	
<i>B.1 SPEKTROSKOPISCHE GRUNDLAGEN.....</i>	<i>7</i>
B.1.1 Absorption .....	7
B.1.2 Emission .....	9
B.1.3 Fluoreszenzquantenausbeute .....	11
B.1.4 Fluoreszenzlebensdauer.....	12
<i>B.2 EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPIE .....</i>	<i>13</i>
B.2.1 Das konfokale Fluoreszenzmikroskop .....	14
B.2.2 Konfokale Mikroskopie auf Einzelmolekül-Niveau .....	17
B.2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) .....	17
<i>B.3 ZELLKULTUR.....</i>	<i>25</i>
<i>B.4 ZELLMEMBRANGÄNGIGE PEPTIDE.....</i>	<i>26</i>
B.4.1 Die poly- $\beta$ -Arginine .....	28
<b>C MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
<hr/>	
<i>C.1 EINZELMOLEKÜLFLUORESZENZMIKROSKOP.....</i>	<i>31</i>
C.1.1 Das Mikroskop .....	31
C.1.2 Die Anregungslichtquelle.....	33
C.1.3 Die Detektoren.....	33
C.1.4 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC).....	35

<b>C.2 EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPIE .....</b>	<b>37</b>
C.2.1 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer .....	37
<b>C.3 DATENAKQUISITION UND –AUSWERTUNG .....</b>	<b>38</b>
C.3.1 Datenakquisition.....	38
C.3.2 Datenauswertung .....	38
<b>C.4 BERECHNUNG DER KORRELATIONEN.....</b>	<b>40</b>
C.4.1 Schnelle FOURIER Transformation (FFT).....	40
C.4.2 „bin and correlate“ .....	41
C.4.3 Bildgebende Diffusionsanalyse .....	42
<b>C.5 STANDARDLABORGERÄTE .....</b>	<b>44</b>
C.5.1 Absorptionsspektrometer.....	44
C.5.2 Fluoreszenzspektrometer.....	44
<b>C.6 FARBSTOFFE .....</b>	<b>44</b>
C.6.1 Tetramethylrhodamin .....	44
C.6.2 ATTO488 .....	45
C.6.3 Fluorescein .....	46
C.6.4 Halbleiternanoteilchen.....	47
<b>C.7 ZELLKULTUR.....</b>	<b>49</b>
C.7.1 Zellkultur zur Peptiduntersuchung .....	49
C.7.2 Zellinkubation ( $\beta$ -Peptide) .....	49
C.7.3 Zellkultur zur Diffusionsmessung .....	50
<b>C.8 UNTERSUCHUNGEN DER <math>\beta</math>-PEPTIDE.....</b>	<b>50</b>
C.8.1 Die Mikroskopie.....	50
C.8.2 Determinierung des Zellzyklus mit PCNA.....	51
<b>C.9 DIM VORUNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>52</b>
C.9.1 Mikrokapillare und Mikrokapillarennpuffer .....	52
<b>C.10 OLIGONUKLEOTIDE UND PEPTIDE.....</b>	<b>53</b>
C.10.1 Oligonukleotide .....	53
C.10.2 Peptide .....	54
<b>D EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>

---

<b>D.1 UNTERSUCHUNG DER <math>\beta</math>-PEPTIDE AN ZELLEN.....</b>	<b>55</b>
-----------------------------------------------------------------------	-----------

---



---

D.1.1	Aufnahme in Abhängigkeit der Peptidlänge .....	56
D.1.2	Konzentrationsreihe.....	60
D.1.3	Aufnahmewege des Arginins .....	62
D.1.4	Untersuchung zur zellzyklusabhängigen Aufnahme .....	64
<b><i>D.2 DIFFUSION IMAGING MICROSCOPY (DIM)</i></b> .....		<b>66</b>
D.2.1	Vergleich der Korrelationsmethoden .....	67
D.2.2	Voruntersuchungen Korrelation .....	72
D.2.3	Voruntersuchungen zu DIM .....	75
D.2.4	Das Mikrokapillarexperiment.....	79
D.2.5	DIM in Zellen .....	84
<b>E</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	<b>89</b>

---

<b><i>E.1 ZELLMEMBRANGÄNIGE PEPTIDE</i></b> .....		<b>89</b>
<b><i>E.2 DIFFUSION IMAGING MICROSCOPY</i></b> .....		<b>92</b>

---

<b>F</b>	<b>ANHANG</b>	<b>95</b>
----------	---------------	-----------

---

<b><i>F.1 ABKÜRZUNGEN</i></b> .....		<b>95</b>
<b><i>F.2 PUBLIKATIONEN</i></b> .....		<b>96</b>
F.2.1	Zeitschriften.....	96
F.2.2	Tagungsberichte .....	97
F.2.3	Poster .....	97

---

<b>G</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>99</b>
----------	------------------	-----------

---



## A EINLEITUNG

Die großen Herausforderungen in der *life science* sind heutzutage Prozesse in Zellen auf molekularer Ebene zu erforschen und zu verstehen. Hierbei gilt es vor allem die grundlegenden Signal- und Transportprozesse experimentell zu erfassen und theoretisch zu modellieren. Zusätzlich bedeutet das Verständnis der Regulationsprozesse, verursacht durch Störungen, in Hinblick auf Diagnose und Therapie eine neue Herausforderung in der Biomedizin. Diese Erkenntnisse können zur Verbesserung von Therapeutika benutzt werden, die gezielter und effektiver eingreifen können. Um diese Prozesse zu verstehen, helfen neben den biologischen Methoden auch die analytischen Methoden der Nachbarwissenschaften. Physikalische Methoden, wie die Mikroskopie, so auch chemische Methoden, wie die Synthese von Fluoreszenzfarbstoffen, tragen zur Aufklärung bei. Aus dieser Interdisziplinarität entwickelten sich Verfahren wie die der Fluoreszenzmikroskopie, mit der es möglich ist, die Zellprozesse hochpräzise und bildgebend darzustellen. Zellsysteme und sogar Gewebe können beobachtet werden.

Vor allem in der Biologie, aber auch in der Chemie, Medizin und Physik konnte sich die konfokale Fluoreszenzmikroskopie, auch durch die kommerzielle Vermarktung der Technik, erfolgreich als anerkannte, analytische Methode festigen. Durch die Verbindung biologisch aktiver Moleküle, wie Proteine oder DNA, mit fluoreszenten Sonden wird die Beobachtungsmöglichkeit durch die Fluoreszenzmikroskopie eröffnet. Die Stärke der konfokalen Mikroskopie gegenüber der konventionellen weitfeldangeregten Fluoreszenzmikroskopie liegt in deren Auflösungsvermögen, das an die von ABBE gefundene Auflösungsgrenze reicht. Dies zu erreichen bedarf besonderer Anregungslichtquellen: Laser. Die beugungsbegrenzte Fokussierung von Licht einer monochromatischen Wellenlänge in die Probe ermöglicht eine Kontrolle in der Tiefenschärfe. Das gesammelte Fluoreszenzsignal aus dem Anregungsvolumen des Lasers wird dabei auf eine Lochblende abgebildet. Streulicht, sowie Fluoreszenz außerhalb des beobachteten Bereiches wird eliminiert und führt so zu einer Verbesserung des Signal-zu-Rausch Verhältnisses. Die Vorteile des konfokalen Prinzips erlauben es die Fluoreszenz in Zellen oder Zellverbänden, durch optische Schnitte, in einer dreidimensionalen Auflösung darzustellen. Das Spektrum der fluoreszenten Moleküle, welche dabei als Sonden eingesetzt werden können, ist groß. Neben den organischen Fluoreszenzfarbstoffen, die *in vitro* mit Proteinen, DNA, etc. gekoppelt werden, können *in vivo* erzeugte fluoreszente Fusionsproteine, wie z.B. das grünfluoreszierende Protein (*engl.:*

green-fluorescent protein, *Abk.*: GFP) in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Ebenso interessant sind anorganische Halbleiterkristalle, die mit biokompatiblen Molekülen ausgestattet, z.B. mit Streptavidin oder Antikörpern gekoppelt, mehr und mehr in die Welt der Fluoreszenzmikroskopie eindringen.

Die Geschichte der optischen Einzelmolekülspektroskopie beginnt im Jahre 1976, in dem THOMAS HIRSCHFELD einzelne, mit Fluoreszenzfarbstoffen hochmarkierte Antikörper, in Lösung nachweisen konnte.<sup>1</sup> Dreizehn Jahre später wurden von zwei unabhängigen Gruppen (W.E. MOERNER und L. KADOR, sowie M. ORRIT und L. BERNARD) einzelne in einer festen Matrix eingebettete Dotierungen bei Tieftemperaturen nachgewiesen.<sup>2,3</sup> Kurze Zeit später gelang es, die Fluoreszenz einzelner Moleküle bei Raumtemperatur zu beobachten.<sup>4</sup> Die Kombination der Einzelmolekülspektroskopie mit einem konfokalen Mikroskop brachte den endgültigen Durchbruch der Einzelmolekülspektroskopie. Diese Revolution in Auflösung und Sensitivität ermöglicht eine detaillierte Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen, den fluoreszenten Sonden. Beeinflusst von der Umgebung oder auch seines Protagonisten verändern sich seine Fluoreszenzeigenschaften, wie z.B. Fluoreszenzlebensdauer, Intensität oder auch sein Triplett-Verhalten, die im Ensemble, d.h. im gemittelten Signal, verloren gehen. Heute ist die Einzelmolekülspektroskopie und –mikroskopie eine etablierte Methode in der Chemie, Biologie und Medizin.<sup>5,6,7,8,9</sup>

Durch die in einem Volumenelement beobachteten Fluktuationen der Fluoreszenzintensität, können Aussagen über die Dynamik der im Beobachtungsvolumen aufhaltenden Moleküle gegeben werden. Die Korrelation der Fluoreszenzfluktuationen, die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*engl.*: fluorescence correlation spectroscopy, *Abk.*: FCS), wurde 1972 experimentell von MAGDE, ELSON und WEBB benutzt um die Dynamik der DNA Denaturierung zu beobachten. Die Kombination der FCS mit der konfokalen Mikroskopie ermöglicht die Beobachtung der Dynamik in einem nur wenige Femtoliter großen Volumenelement und ist heute in vielen konfokalen Fluoreszenzmikroskopen implementiert. Die Untersuchung von Dynamiken in Zellen kann somit nur punktuell beobachtet werden.

Das Einschleusen fluoreszenter Sonden in Zellen und deren anschließende Beobachtung, unter spezieller Berücksichtigung der räumlichen Auflösungen von Heterogenitäten in der Diffusion der Sonde, ist das Ziel dieser Arbeit.

## **A.1 ZELLMEMBRANGÄNGIGE PEPTIDE**

Allen Zellen gemeinsam ist die Zellmembran. Sie bildet die äußere Schicht einer Zelle, in der die Zellkompartimente von der Umgebung abgetrennt sind. Eine der Hauptaufgaben, der aus einer Doppellipidschicht bestehenden, 10 nm dicken, semipermeablen Membran, ist der Aufbau eines Zellpotentials. Die Bewahrung des Potentials bedingt eine nur begrenzte Durchlässigkeit der Membran, die wiederum anhand des Energieverbrauchs eingeteilt wird. Während der passive Transport durch Diffusion oder durch Ionenkanäle ohne Energieverbrauch geschieht, benötigt der aktive Transport den Energielieferanten ATP um mittels, z.B. Endozytose oder Rezeptorproteine, die Membran zu durchqueren. In den Biowissenschaften ist das Interesse, Moleküle oder auch Makromoleküle in die Zelle einzuschleusen ohne sie dabei zu beschädigen oder gar in den Zelltod zu treiben, groß. Vor zwei Jahrzehnten war man überzeugt, dass der endozytotische Weg, für die Internalisierung von Makromolekülen, nicht umgangen werden kann. Durch die Entdeckung der zellmembrangängigen Peptide öffnete sich eine neue Möglichkeit, z.B. Proteine, DNA, Botenstoffe oder auch Fluoreszenzfarbstoffe als molekulare Fracht sicher in die Zelle einzuschleusen.

Zellmembrangängige Peptide (*engl.*: cell penetrating peptides, *Abk.*: CPP) sind Peptide, die die Zellmembran ohne Hindernis durchdringen können und sich im Kern lokalisieren. Diese Peptide kommen in vielen verschiedenen biologischen Systemen vor. Die Unterteilung erfolgt in zwei Kategorien die nach ihrer Herkunft entscheidet: (i) die viralen Proteine und (ii) die Homeoproteine, die in eukaryotischen Organismen vorkommen. Die beiden Proteinarten unterscheiden sich in der Erkennungssequenz. Während für die viralen Proteine eine kleine Abfolge von Aminosäuren ausreicht, sind für die Aufnahme der Homeoproteine drei Helices, welche die so genannte Homeobox bilden, verantwortlich.

Ein Beispiel eines viralen CPP ist das Tat-Protein, welches im menschlichen Immunschwächevirus Typ 1 (*engl.*: human immunodeficiency virus, *Abk.*: HIV-1), in der frühen Phase der Infektion auftritt. Eingedrungen im Zellkern aktiviert es die Replikation des viralen Genoms. Die Erkennungssequenz des 86 Aminosäuren langen Peptids ist nur eine kurze Abfolge aus mehreren benachbarten, positiv geladenen Aminosäuren, Arginin und Lysin. Diese Erkennungssequenz repräsentiert einerseits die Proteintransduktionsdomäne (*engl.*: protein transduction domain, *Abk.*: PTD) und andererseits eine Kernlokalisierungssequenz (*engl.*: nuclear localization sequence, *Abk.*: NLS). Unabhängige Untersuchungen der beiden Gruppen um GREEN und um FRANKEL beschrieben 1988 zum ersten Mal die

Eigenschaften des Tat-Proteins. Damals kam es nach der Zugabe von exogenem Tat-Protein zu einer Transaktivierung eines transfizierten Reportergens im Zellkern.<sup>10,11,12</sup> Die Gruppe um VIVES untersuchte das Tat-Protein detaillierter und zeigte, dass die elf Aminosäuren lange Arginin reiche Region für die Aufnahme relevant ist. Die Aufnahme des Peptids nach Zugabe erfolgte innerhalb weniger Minuten bei 37°C und auch bei 4°C. Die Aufnahme des Peptids bei 4°C deutet auf einen nichtendosomal Aufnahmeprozess hin. Trotz des vorherigen Verbrauchs der ATP-Reserven konnte ebenfalls das Peptid im Zellkern gefunden werden.<sup>13,14</sup>

Zellmembrangängige Proteine, wie das Tat-Protein, sind für die pharmazeutische Industrie interessant. Die Hoffnungen stützen sich darauf, dass diese Peptide molekulare Arzneistoffe durch die Blut-Hirn-Schranke hinweg schneller und zuverlässiger zu ihrem Bestimmungsort bringen können.<sup>15</sup>

Bei Untersuchungen von *in vitro* hergestellten Peptiden, die ausschließlich aus einer kleinen Abfolge von Argininen oder Lysinen bestand, wurde eine verbesserte Aufnahme des D-Analogons in die Zelle festgestellt, als mit dem der nativen L-Aminosäure. Das Ziel ist, durch die Verwendungen der  $\beta$ -homologen Aminosäure Arginin eine neue, pharmazeutisch relevante Gruppe der Peptidomimetika zu erschaffen, deren Vorteile in der enzymatischen Stabilität liegen.

Durch die Kopplung der Peptide mit einer molekularen Fracht erhalten diese, wie schon erwähnt, eine große Bedeutung. Das Interesse für diese Arbeit bestand darin, die  $\beta$ -Peptide als zuverlässige, molekulare Transporter für fluoreszente Sonden in Zellen zu benutzen. Um nachzuweisen, dass die  $\beta$ -Peptide für die Aufnahme ebenso zuverlässig sind wie die  $\alpha$ -Peptide, wurde die Längenabhängigkeit der Aminosäurenkette des Peptids in Bezug auf die Aufnahme durch die Zelle beobachtet. Verwendet wurden hierbei verschiedene Fluorescein markierte  $\beta$ -Arginin-Kettenlängen, hergestellt in Kooperation mit der Gruppe um Prof. Dr. D. SEEBACH, von vier bis zehn Aminosäuren, die mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet wurden. Wie schon bei den  $\alpha$ -Homologen wird auch bei den  $\beta$ -Peptiden eine Längenabhängigkeit erwartet, wobei bei längeren Ketten eine verbesserte Internalisierung in die Zelle beobachtet werden konnte. Zum anderen wurde die Konzentrationsabhängigkeit untersucht, welche ebenfalls, wie bei den  $\alpha$ -Homologen, eine gewisse Schwellenkonzentration aufweist.

## **A.2 BILDGEBENDE DIFFUSIONSANALYSE**

Für die Aufklärung von Signalprozessen innerhalb einer Zelle besteht seitens der Biologie ein großes Interesse. Die derzeitig kommerziell erhältlichen Systeme bieten die Möglichkeit, dreidimensionale komplexe Strukturen darzustellen und somit spektral- und zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie (*engl.*: spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy, *Abk.*: SFLIM) zu verwirklichen. Mit der FCS ist es möglich räumliche und zeitliche Fluoreszenzfluktuationen in einem kleinen Volumenelement oder Gebiet zu untersuchen. Eines der besonderen Vorteile der FCS-Methode ist, dass die gemessene Korrelationsfunktion Unterschiede im Aggregationszustand des Fluorophors empfindlich wiedergeben kann. Die Verfügbarkeit der FCS-Methode stieg seit der Verwendung in konfokalen Laserscanningmikroskopen (*engl.*: confocal laser scanning microscope, *Abk.*: CLSM) stark an.

Mit einer neuen Technik, die die statische Bildgebung mit der dynamischen Analyse vereinigt, kann es möglich sein, Heterogenitäten in der Dynamik eines Systems in einem Bild darzustellen. Verschiedene Ansätze, Diffusionsaussagen über einen größeren Bereich zu machen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen (PETERSEN, WESTON) gezeigt. Die Methode der Bildkorrelationsspektroskopie (*engl.*: image correlation spectroscopy, *Abk.*: ICS) ging als Nachfolger des Scanning-FCS (*Abk.*: sFCS) hervor. Die hier zu Grunde liegende Hypothese ist, dass die Dynamik innerhalb einer Zelle, auf Grund erhöhter Viskosität, relativ langsam ist. Die Diffusion in der Zelle ist also langsamer als in Lösung. Durch eine erhöhte Abtastrate, die das Volumen in kürzeren Zeitintervallen abtastet bevor es zu Veränderungen in der Fluoreszenzintensität kommt, kann es möglich sein, die Veränderungen in der Fluoreszenzfluktuation über die Zeit zu beobachten. Dies funktioniert nur so lange die Moleküle langsamer diffundieren als die Abtastrate. Diese Technik lässt sich für Diffusionsprozesse von Membranproteinen anwenden, die auf einer Zeitskala von mehreren Millisekunden ablaufen.<sup>16,17</sup> In dieser Technik fehlt jedoch die Kombination von Ortsauflösung und der dazugehörigen Dynamik.

Einen ersten Schritt in diese Richtung unternahm die Gruppe um KENNETH D. WESTON. Hier wurde die Kombination aus Rasterscanning und der Korrelation von Photonen genutzt, um Geschwindigkeitsprofile in Mikrokanälen aufzunehmen. In ihren Experimenten wurde die Fluoreszenzfluktuation fluoreszenter Polystyrolkugeln in einem Mikrokanal punktweise aufgenommen und die jeweiligen Fluoreszenzfluktuationen korreliert.<sup>18</sup> Hierbei

konnte das zweidimensionale Flussprofil in Mikrokanälen mit hoher räumlicher Auflösung aufgenommen werden.

Die Idee der bildgebenden Korrelationspektroskopie hatte zum Ziel, die Methode von WESTON weiter auszubauen, und für die Darstellung von Transportprozessen in lebenden Zellen nutzbar zu machen. Die Methode von WESTON wurde um die FLIM, also die zeitaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie, erweitert, um zusätzlich die Fluoreszenzlebensdauer zur Diskriminierung der Autofluoreszenz benutzen zu können. Durch den gewählten Ansatz, eine Probe punktweise abzutasten und in jedem Bildpunkt eine separate Korrelation zu erzeugen, wird die Erfassung schnellerer Diffusionen, die mit der sFCS-Methode nicht zu realisieren wäre, ermöglicht. Die Umsetzung wird mit einem Objektscanning-Mikroskop durchgeführt, das einem die Möglichkeit eröffnet, die Probe präzise punktweise abzutasten. Die Ansteuerung der Bildpunkte durch Laserabtastung hingegen hat nicht die Möglichkeit die geringen Schrittweiten, die beim Objektscanning notwendig sind, zu realisieren. Der Vorteil des Laserscannings liegt in der Schnelligkeit der Abtastung. Andere bildgebende Verfahren wie die Aufnahme mit einer elektronisch verstärkten CCD-Kamera, erreichen nahezu die Empfindlichkeiten der Lawinenphotodioden, jedoch ist die kleinste Zeitauflösung der Kameras im Bereich von 1 ms, also im und über dem Bereich von Diffusionsprozessen.

Durch die Internalisierung fluoreszenter Sonden in Zellen, die spezifische Signal- oder Transportprozesse markieren, können unterschiedliche Diffusionsprozesse mit Hilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie wiedergegeben werden. Mit der räumlichen Auflösung eines konfokalen Mikroskops könnten die Unterschiede der Diffusion bis in die einzelnen Kompartimente der Zelle dargestellt werden. Für die Internalisierung fluoreszenter Sonden kann das Transportersystem mit dem Prinzip der zellmembrangängigen Peptide benutzt werden, um eine schnelle effiziente Aufnahme zu gewährleisten. Neben einer Erhöhung der Diffusionszeit durch die erhöhte Viskosität innerhalb der Zelle werden höhere Diffusionszeiten durch den aktiven Transport oder durch Bindung erwartet.



## **B THEORIE**

Sir ISAAC NEWTON stellte sich das Licht in Form von Lichtteilchen vor. Anfangs des 19. Jahrhunderts bestärkten die Experimente am Doppelspalt von THOMAS YOUNG die größer werdende Skepsis an der Teilchentheorie und zeigten die Betrachtung des Lichts als elektromagnetische Welle zur Erklärung der Wellchencharakteristik.

Die Entdeckung des äußeren photoelektrischen Effekts durch das Experiment von HEINRICH HERTZ 1886 und deren Nobelpreis gekrönte mathematische Erklärung von ALBERT EINSTEIN 1905 brachte einen Durchbruch in der Erklärung des Welle-Teilchen-Dualismus.<sup>19</sup> Dies gilt seither als das Schlüsselexperiment zur Begründung der Quantenphysik.

### ***B.1 SPEKTROSKOPISCHE GRUNDLAGEN***

Die Spektroskopie bezeichnet die Beobachtung der Wechselwirkungen von Molekülen mit elektromagnetischen Feldern. Die optische Spektroskopie beschäftigt sich mit der Wechselwirkung von Atomen und Molekülen und deren Erzeugungen, Streuung oder Reflektion von Licht. Die Beobachtung, Registrierung und Deutung der Spektren, dient vor allem dem Nachweis und der Bestimmung der Eigenschaften der Atome und Moleküle, wobei mit den Mitteln der Quantentheorie und der theoretischen Chemie Einblicke in die Struktur der Materie möglich sind.

#### **B.1.1 Absorption**

Absorption ist die Wechselwirkung zwischen elektromagnetischen Wellen und der Materie. Der Wechselwirkung liegt das Resonanzverhalten der Oszillatoren in der Materie zugrunde. Bei bestimmten Photonenenergien entziehen die Oszillatoren dem Strahlungsfeld Energie, das heißt, sie absorbieren die Welle und gehen auf einen höher gelegenen Energiezustand über. Die Wechselwirkung zwischen Molekülen und Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich, von 400 – 750 nm (1,6 – 3,1 eV), treten bei vielen ungesättigten, organischen Molekülen auf. Chromophor nennt man denjenigen Atomverband, der als Einheit Licht aufnehmen kann, diejenigen Einheiten, die Licht emittieren können gelten in der Fluoreszenz als Fluorophore. Die Absorption und die Emission von Licht werden von einigen wichtigen Parametern bedingt wie der Struktur, der Lage und der Dynamik elektronisch angeregter Zustände.

Für Bindungselektronen, die mit dem Licht interagieren gelten scharfe Kriterien für die Erfüllung der Resonanzbedingungen. Erstens muss die Energieerhaltung erfüllt werden. Diese Voraussetzung bezieht sich auf die quantenmechanische Struktur der elektronischen Zustände. Im klassischen Fall wird die maximale Energieabsorption nur im Resonanzfall erfüllt. Quantenmechanisch kann ein Elektron bei der Absorption von Licht der Wellenlänge  $\lambda$  unter Aufnahme der Energie  $\Delta E$  aus dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  auf einen energetisch höher gelegenen Singulettzustand  $S_n$  unter Erfüllung der BOHR'schen Resonanzbedingung übergehen:

Die Energie des Photons muss folgende Bedingung erfüllen:

$$\Delta E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Formel 1}$$

Typischerweise liegt die Zeit der Absorption eines Photons im Bereich der Frequenz der in der Bindung oszillierenden Elektronen. Diese liegt etwa bei  $10^{-15}$  bis  $10^{-16}$  s und entspricht etwa dem sichtbaren Licht.

Als zweite Bedingung für die Absorption eines Photons muss der elektrische Feldvektor der Lichtwelle parallel zum elektronischen Übergangsmoment des Moleküls stehen. Dieser Übergang muss quantenmechanisch erlaubt sein, d.h. das Übergangsmoment muss ungleich Null sein. Neben der Anregung des elektronischen Übergangs werden auch verschiedene Rotations- und Schwingungszustände angeregt, so dass eine Vielzahl von Übergangsmomenten, vor allem bei großen Molekülen, direkt nebeneinander liegen. Aus diesem Grund beobachtet man bei Raumtemperatur Bandenspektren für Moleküle, im Gegensatz zu Linienspektren bei Atomen. Wechselwirkungen mit Lösungsmittelmolekülen können diese zusätzlich verbreitern.

Absorption ist die Schwächung von Strahlen  $dI$  beim Durchgang durch Materie  $J$ . Diese Abnahme ist proportional zur Schichtdicke  $dx$  und der Konzentration  $[J]$ . Hieraus lässt sich das LAMBERT-BEERSche Gesetz formulieren:

$$dI = -\kappa[J]I dx \quad \text{Formel 2}$$

wobei  $\kappa$  der Proportionalitätskoeffizient ist. Bekannter ist die folgende Darstellung bei der  $\kappa$  über die Beziehung  $\kappa = \varepsilon \cdot \ln 10$  durch  $\varepsilon$ , den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten oder auch Extinktionskoeffizienten ersetzt wurde:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon[J]l \quad \text{Formel 3}$$

Befinden sich in einer Lösung mehrere absorbierende Moleküle in unterschiedlichen Konzentrationen, so ist  $\varepsilon \cdot [J]$  durch  $\sum_i \varepsilon_i [J_i]$  zu ersetzen.

Ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines elektronischen Übergangs kann man aus der Fläche der Absorption  $A$  ( $\varepsilon_\nu$ : der molare Absorptionskoeffizient) über den Wellenbereich erhalten.

$$A = \int \varepsilon_\nu d\nu \quad \text{Formel 4}$$

In der Einzelmolekülspektroskopie spielt der Absorptionsquerschnitt eine entscheidende Rolle. Er repräsentiert die Wahrscheinlichkeit, dass das Molekül von einem Photon getroffen wird. Der Absorptionsquerschnitt wird als Fläche um das Molekül verstanden aus der ein Photon eingefangen werden kann. Wird das Molekül als Zielscheibe angesehen, so ist der Absorptionsquerschnitt  $\sigma$  (in  $\text{cm}^2$ ) bei gegebenen Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  ungefähr  $10^{20} a$ .<sup>20</sup> Für organische Farbstoffe, wie Rhodamine und Oxazine, die einen maximalen molaren Extinktionskoeffizienten von ungefähr  $10^5 \frac{1}{\text{cm} \cdot \text{M}}$  haben, kann ein Absorptionsquerschnitt von ca.  $a_{\max} \approx \frac{10^5}{10^{20}} = 10 \cdot 10^{-16} \text{ cm}^2 = 10 \text{ \AA}^2$  berechnet werden.

### B.1.2 Emission

Der Effekt der Lumineszenz wurde erstmals 1565 von dem spanischen Arzt und Botaniker NICOLAS MONARDES in einem Extrakt aus *Lignum nephriticum* beobachtet. 1833 berichtete Sir DAVID BREWSTER der Royal Society über ein außergewöhnliches Phänomen, welches er beobachtete. Er gab ihm den Namen „interne Dispersion“.<sup>21</sup> In seinem Experiment fokussierte er einen Sonnenstrahl in eine Lösung aus Chlorophyll. Die an sich grüne Lösung erschien um den Sonnenstrahl herum in einer blutroten Farbe. Sir JOHN HERSCHEL beobachtete den Effekt in einer Lösung aus Chinonsulfat. Er beschrieb es als eine himmelblaue Farbe und nannte es „epipolische Dispersion“. Sir GEORGE GABRIEL STOKES schließlich beobachtete den Effekt 1852 an Fluorit (Flussspat) und nannte es erstmals *Fluoreszenz*.<sup>22,23</sup>

Durch Absorption eines Photons geht das bestrahlte Molekül von seinem elektronischen Grundzustand in einen thermodynamisch nicht stabilen schwingungs- und rotationsangeregten ersten elektronisch angeregten Zustand über. Durch Emission von Photonen einer höheren Wellenlänge kann das Molekül wieder in den elektronischen

Grundzustand zurückkehren. Diesen Vorgang bezeichnet man als Lumineszenz. Zur Lumineszenz zählen die Phosphoreszenz und die Fluoreszenz. Das JABLONSKI-Diagramm in Abbildung 1 verdeutlicht die stattfindenden Übergänge.

Fluoreszenz ist ein erlaubter Übergang zwischen Zuständen gleicher Multiplizität. Phosphoreszenz hingegen ist ein verbotener Übergang, z.B. von einem Triplett in den Singulett-Grundzustand.

Aus dem Grundzustand wird ein Molekül innerhalb von  $10^{-15}$  s in Schwingungsniveaus der elektronisch angeregten Zustände angeregt. Die Kernabstände bleiben während der elektronischen Anregung gleich, da die Geschwindigkeit der Anregung schneller erfolgt, als eine Schwingung der Atomkerne dauert (FRANCK-CONDON-Prinzip).

Höhere elektronische Zustände gehen strahlungslos in den  $S_1$ -Zustand über. Diese interne Konversion (*engl.*: internal conversion, *Abk.*: IC) dauert  $10^{-13}$  bis  $10^{-12}$  s. Durch strahlungslose Desaktivierung ( $10^{-12}$  s) gelangt das Molekül in den Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  (Schwingungsrelaxation, *engl.*: vibrational relaxation, *Abk.*: VR), aus welchem nach der KASHA-Regel die Fluoreszenz erfolgt. Höhere Schwingungszustände werden zwar gemäß der BOLTZMANN-Statistik auch besetzt, die Desaktivierung höherer Schwingungsniveaus durch Stöße z.B. mit Lösungsmittelmolekülen oder der Wand ist aber ein schnellerer Prozess als die Fluoreszenz.

Moleküle können aus Singulett-Zuständen über Interkombinations-Prozesse (*engl.*: intersystem crossing, *Abk.*: ISC) in Triplett-Zustände übergehen. Die Desaktivierung von  $T_1$  nach  $S_0$  ist spinverboten und läuft deswegen mit geringerer Wahrscheinlichkeit ab als ein Singulett-Singulett-Übergang. Daher hat der  $T_1$ -Zustand eine längere Lebensdauer von Millisekunden bis Sekunden.

Gelangt ein Molekül durch ISC nach  $T_1$ , so kann es aufgrund der langen Triplettlebensdauer im Bereich von Millisekunden durch weitere Absorption in höhere Triplettzustände manchmal bis zur Ionisierung angeregt werden.

Die Prozesse sind hier noch einmal zusammengefasst:

- |                             |                                      |                                   |
|-----------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| • Absorption                | $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$         | Dauer: $\sim 10^{-15}$ s          |
| • Fluoreszenz               | $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu'$        | Dauer: $\sim 10^{-9} - 10^{-7}$ s |
| • Phosphoreszenz            | $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu''$       | Dauer: $\sim 10^{-3} - 10^2$ s    |
| • Interne Konversion        | $S_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$ | Dauer: $10^{-14} - 10^{-10}$ s    |
| • Schwingungsrelaxation     | $S_1' \rightarrow S_1$               | Dauer: $10^{-12} - 10^{-10}$ s    |
| • Interkombinations-Prozess | $S_1 \rightarrow T_1$                | Dauer: $10^{-10} - 10^{-8}$ s     |

Weil das Molekül aus dem Schwingungsgrundzustand in  $S_0$  in höhere Schwingungszustände in  $S_1$  angeregt wird und aus dem Schwingungsgrundzustand in  $S_1$  in höhere Schwingungszustände in  $S_0$  emittiert, ist das Emissionsspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum bathochrom verschoben.

Wenn sich die Geometrien des  $S_0$ - und  $S_1$ -Zustandes nicht stark voneinander unterscheiden, verhalten sich Absorptions- und Emissionsspektrum nahezu wie Bild und Spiegelbild.

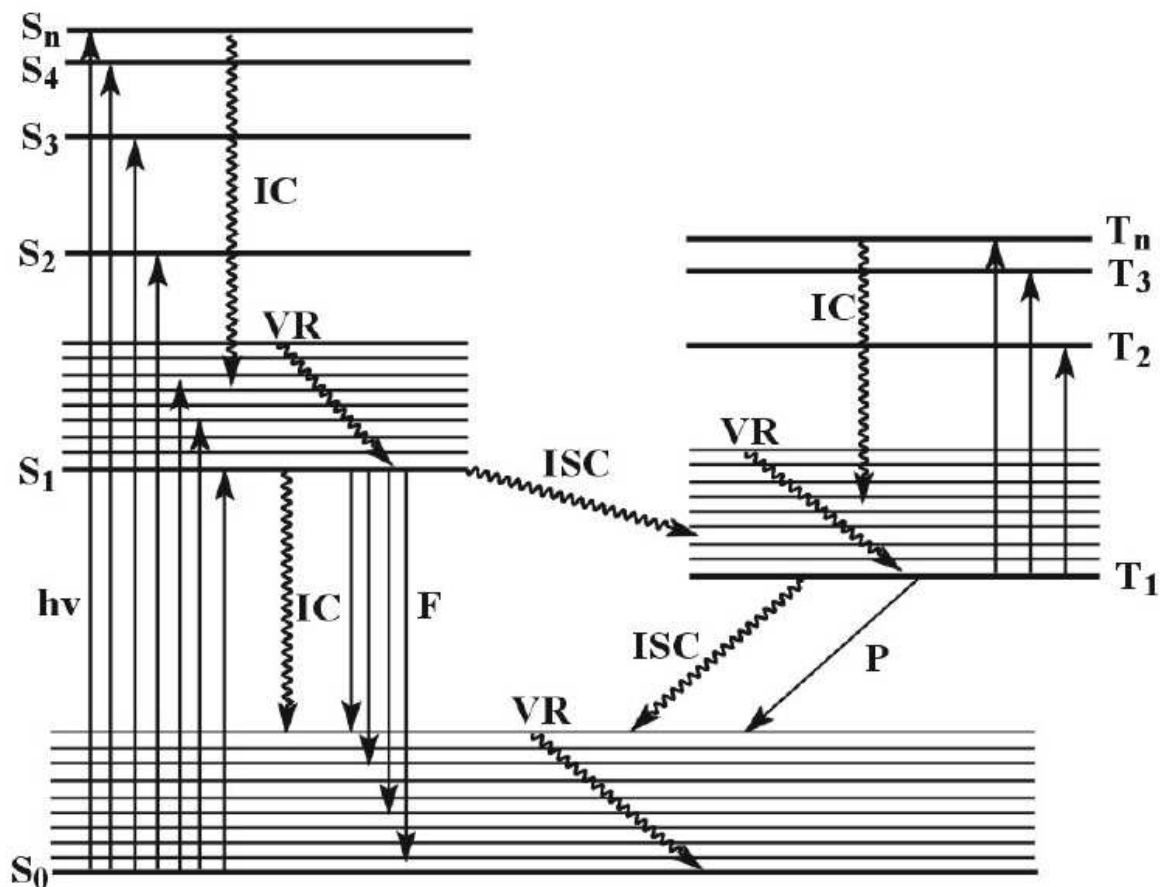


Abbildung 1: JABLONSKI-Diagramm ohne Berücksichtigung der Rotationsenergieniveaus. Strahlungslose Übergänge sind mit wellenförmigen Pfeilen angedeutet. Vorgänge mit Photonen sind als gerade Linien dargestellt. F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, IC: Internal Conversion (strahlungslose Desaktivierung), ISC: Intersystem Crossing (Übergang mit verbotener Spinumkehr),  $S_x$ : Singulettzustände,  $T_x$ : Triplettzustände, VR: Schwingungsrelaxation (Übergang in den Schwingungsgrundzustand)

### B.1.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute  $\Phi_f$  gibt das Verhältnis der von einem Molekül emittierten zu den absorbierten Photonen an:

$$\Phi_{fl} = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad \text{Formel 5}$$

Diese lässt sich auch über die Geschwindigkeitskonstanten aller Desaktivierungsprozesse beschreiben

$$\Phi_{fl} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{st}} \quad \text{Formel 6}$$

wobei  $k_{fl}$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und  $k_{st}$  die Summe aller Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Prozesse darstellt.

Zur experimentellen Bestimmung von Quantenausbeuten gibt es verschiedene Methoden, die von DEMAS und CROSBY<sup>24</sup> beschrieben werden. Zur Bestimmung von absoluten Quantenausbeuten kann die Methode des „thermal blooming“ angewendet werden.<sup>25,26</sup> Hierbei wird durch strahlungslose Desaktivierung freiwerdende Wärme über Brechungsindexänderungen gemessen.

Farbstoff	Lösungsmittel	$\lambda_{ex}$ [nm]	Temperatur [°C]	Quantenausbeute
Fluorescein	0,1M Natronlauge	496	22	0,95
Tryptophan	Wasser	280		0,13
Phenol	Wasser	275	23	0,14
Rhodamin 6G	Ethanol	488		0,94
Rhodamin 101	Ethanol	450	25	1
$\beta$ -Carotin	1N Schwefelsäure	350	25	0,6

Tabelle 1: Quantenausbeuten verschiedener Fluorophore. *Siehe Referenz*<sup>27</sup>.

### B.1.4 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  ist die Zeit, in der  $\frac{1}{e}$  der angeregten Moleküle wieder in den elektronischen Grundzustand  $S_0$  zurückgekehrt sind. Die Fluoreszenzintensität einer Probe fällt bis zur Zeit  $\tau$  auf  $\frac{1}{e}$  des Anfangswertes ab. Die Lebensdauer lässt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten berechnen:

$$\tau = \frac{1}{k_{fl} + k_{st}} \quad \text{Formel 7}$$

Als natürliche Lebensdauer  $\tau_n$  ist die Lebensdauer definiert, die nur durch Fluoreszenz in Abwesenheit strahlungsloser Desaktivierung zustande kommt:

$$\tau_n = \frac{1}{k_{fl}} \quad \text{Formel 8}$$

Die natürliche Lebensdauer lässt sich grob über  $\tau_n \approx 1/10^4 \cdot \epsilon_{\max}$  abschätzen. Die Quantenausbeute und die Lebensdauer hängen über folgende Gleichung zusammen:

$$\Phi = \frac{\tau}{\tau_n} \quad \text{Formel 9}$$

Bei unimolekularer Desaktivierung nimmt die Fluoreszenzaktivität monoexponentiell ab.

$$I(t) = I(0) \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Formel 10}$$

wobei  $I(t)$  die Fluoreszenzintensität zur Zeit  $t$  und  $I(0)$  die Intensität zur Zeit  $0$  ist.

Bei komplizierteren Desaktivierungsprozessen nimmt die Intensität mehr exponentiell ab, und die Abklingkurve  $I(t)$  kann durch eine Summe von  $e$ -Funktionen dargestellt werden:

$$I(t) = I(0) \sum_i a_i \cdot e^{-t/\tau_i} ; \sum_i a_i = 1 \quad \text{Formel 11}$$

Freie organische Farbstoffe zeigen oft eine monoexponentielle Fluoreszenzkinetik. Mehr exponentielle Fluoreszenzkinetiken treten z.B. bei gebundenen Farbstoffen, bei Farbstoffen in viskosen Lösungsmitteln oder durch photoinduzierten Elektronentransfer mit funktionellen Gruppen auf. Durch die Ankopplung eines Farbstoffes an ein Oligonukleotid erhält man meistens eine Verteilung von Fluoreszenzlebensdauern entsprechend den verschiedenen Konformationsmöglichkeiten.

## B.2 EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPIE

MOERNER und KADOR gelang es 1989 unabhängig von ORRIT und BERNARD die ersten einzelnen Moleküle bei tiefer Temperatur in einer festen Matrix spektroskopisch zu beobachten<sup>2,3</sup>, was der Anfang der optischen Einzelmolekülspektroskopie (*engl.*: single molecule spectroscopy, *Abk.*: SMS) ist. Seither entwickelte sich diese Spektroskopie zu einer sehr variantenreichen Methode<sup>28</sup> und findet heutzutage Anwendungen in der Chemie, Biologie und in der Medizin.<sup>5,6</sup> Mittels Laser-induzierter Fluoreszenz und hochsensitiver Detektion besteht heute die Möglichkeit, im Gegensatz zu Ensemble-Messungen, welche über viele Moleküle mittelt, Subpopulationen in unterschiedlichen Mikroumgebungen zu beobachten. Mit Hilfe verschiedener Einzelmolekültechniken, wie TIR-FM (Totalreflexionsmikroskopie, *engl.*: total internal reflexion fluorescence microscopy), bei der durch Totalreflexion ein evaneszentes Feld entsteht, werden bei bildgebende Techniken mit hochempfindliche und elektronisch verstärkte CCD-Kameras benutzt. Im Folgenden wird die

etwas ältere, aber für die Einzelmolekülmikroskopie empfindlichere Methode mittels des konfokalen Prinzips erklärt.

### **B.2.1 Das konfokale Fluoreszenzmikroskop**

Die konfokale Mikroskopie wurde 1957 von MARVIN MINSKY erstmals verwirklicht und patentiert.<sup>29</sup> Mehr als dreißig Jahre später benutzte RUDOLF RIGLER schließlich diese Methode 1992, um einzelne Moleküle zu detektieren.<sup>30,31</sup> Seitdem ist die konfokale Mikroskopie der meistgenutzte Aufbau der Einzelmolekülspektroskopie, und stellt auch in dieser Arbeit das mikroskopische Gerüst dar. Die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie sollen in diesem Abschnitt näher erläutert werden.

ERNST ABBE beschäftigte sich in der zweiten Hälfte des neunzehnten Jahrhunderts mit der Theorie der Lichtmikroskopie. Er zeigte hierbei die Grenzen der Lichtmikroskopie auf, die von dem Brechungsindex der Probe und durch die Objektivlinsen begrenzt ist. Selbst beste Optiken ohne chromatische und sphärische Aberrationen stellen kein perfektes Bild dar. Eine Punktlichtquelle erscheint in einem beugungsbegrenzten Bild wie eine leuchtende Scheibe mit konzentrischen Kreisen abnehmender Intensität, das so genannte AIRY Scheibchen (*engl.*: AIRY disc, nach dem englischen Astronomen GEORGE B. AIRY). Dieses Beugungsmuster, ein Ergebnis der Wellennatur des Lichtes, ist ein Spezialfall der Fraunhofer Beugung. Die Qualität eines Bildes lässt sich gemäß ABBE an der Anzahl der Beugungsringe im Verhältnis zum Brechungsindex und der numerischen Apertur des Objektivs beschreiben. Der Radius  $r_{AIRY}$  des ersten dunklen Rings in dem AIRY Scheibchen ist abhängig von der eingestrahnten Wellenlänge  $\lambda_0$  und der numerischen Apertur  $NA$  des Objektivs.

$$r_{Airy} = 0,61 \frac{\lambda_0}{NA} \quad \text{Formel 12}$$

Liegen zwei gleich helle Punkte in einem kleinen Abstand  $d$  in der Objektebene entfernt, so liegen ihre Beugungsbilder nebeneinander in der Bildebene. Die Bilder sind dann aufgelöst, wenn deren Abstand  $d$  größer als der Radius des AIRY Scheibchens ist. Dies ist das RAYLEIGH Kriterium und beruht auf der Annahme, dass zwei Punktlichtquellen inkohärent leuchten.

Die theoretische laterale Auflösung kann bei der Verwendung von perfekten Optiken und einer planaren Struktur erreicht werden. In einer dreidimensionalen Struktur verursachen fluoreszierende Objekte oder Streulicht, auch wenn sie außerhalb der Fokusebene sind, ungewollt Licht, welches von dem Mikroskopobjektiv eingesammelt wird und zu einer



Reduzierung des Kontrastes um die Region des Fokus führen. Anders gesagt, Objekte die nicht unendlich schmal sind haben scheinbar eine Tiefenschärfe, die größer ist als die axiale Auflösung. Die konfokale Mikroskopie eliminiert das Licht, wodurch die Tiefenschärfe vergrößert wird. (Abbildung 2 und Abbildung 3)

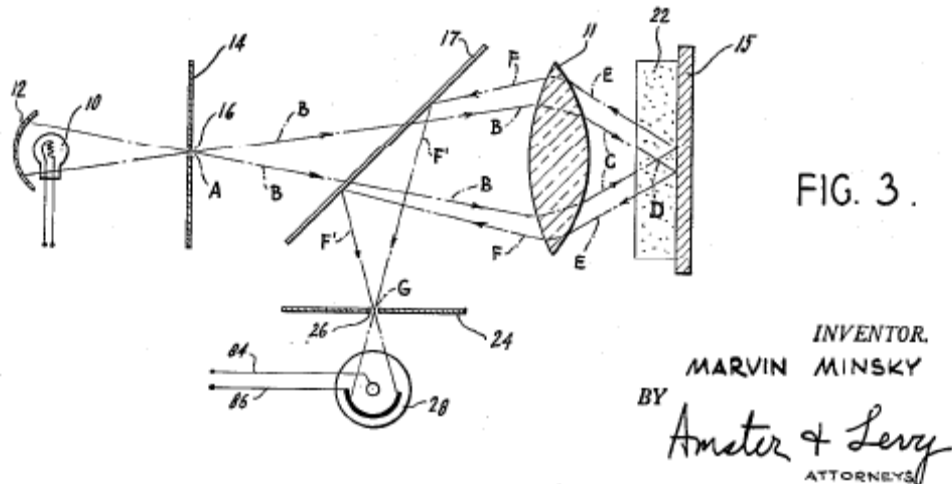
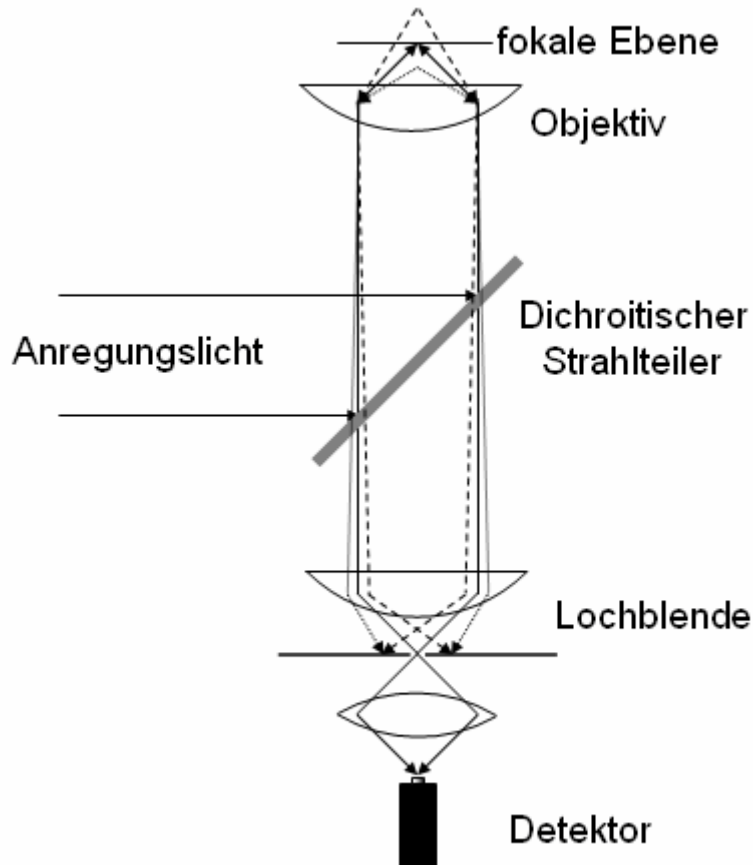


Abbildung 2: konfokaler Aufbau nach MINSKY. 10: Lichtquelle, 11: Objektiv/Linse, 14 und 24: Lochblende (pinhole), 17: Dichroitischer Strahlteiler, 22: Probe, 28: Detektor. (Bild aus Referenz 29)

Lediglich das Fluoreszenz- oder Streulicht, das von Objekten, die in der fokalen Ebene und Tiefenschärfe des Systems liegen, ausgestrahlt wird, wird beobachtet und gesammelt. Die laterale Auflösung ist bei einem verschwindend kleinen Beobachtungsbereich um den Faktor 1,41 besser.<sup>32</sup> Daraus ergibt sich eine konfokale Auflösung von lateral  $r = \frac{0,8\lambda}{2.NA}$  und axial  $r = \frac{1,4\lambda}{NA^2}$ .<sup>33</sup> Punktlichtquellen könnten somit bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von  $NA=1,45$  ab einem lateralen Abstand von 130 nm und axialen Abstand von 325 nm aufgelöst werden.

„Konfokal“ ist definiert als „den gleichen Fokus haben“. In der Mikroskopie bedeutet dies, dass das Bild entweder denselben Fokus hatte wie das Objekt, oder dieser Fokus bezieht sich auf den Fokus im Objekt. So werden Objekt und sein Bild konfokal. Wenn normalerweise ein Objekt von einem Fluoreszenzmikroskop abgetastet wird, erhält man Signale die aus der gesamten Dicke der Probe stammen. Die meisten Signale kommen jedoch nicht aus der fokalen Ebene. Das konfokale Mikroskop blendet mit Hilfe einer Lochblende in der Bildebene die störende, nicht fokale Strahlung aus und dient somit als Tiefenfilter. Abbildung 3 verdeutlicht das konfokale Prinzip.



**Abbildung 3: Schematisches Diagramm des konfokalen Prinzips. Licht, welches außerhalb der fokalen Ebene emittiert wird, wird nahezu vollständig durch die Lochblende ausgeblendet.**

Die hauptsächlichen Vorteile eines konfokalen Mikroskops gegenüber einem konventionellen Mikroskop sind hier aufgezeigt:

- Störendes Licht, welches nicht aus der fokalen Ebene kommt, wird nicht detektiert.
- Aus Defokussieren resultiert keine Unschärfe, sondern erlaubt es, die Betrachtung in einer anderen fokalen Ebene der Probe vorzunehmen. Objekte die vorher in der fokalen Ebene lagen werden durch Defokussieren langsam dunkler und verschwinden schlussendlich.
- Durch systematisches Abtasten einer fokalen Ebene ( $x$ ,  $y$ -Ebene) und anschließender Veränderung in der  $z$ -Richtung – entlang der optischen Achse – wird eine reale dreidimensionale Aufnahme des Objekts ermöglicht. Dieses Verfahren nennt man „optisches Schneiden“ (*engl.*: optical sectioning)
- Streulicht wird aufgrund der kleinen Ausdehnung der Beleuchtung in der fokalen Ebene minimiert.

### **B.2.2 Konfokale Mikroskopie auf Einzelmolekül-Niveau**

Nach den Anfängen von THOMAS HIRSCHFELD einzelne Antikörper, die mit 80 bis 100 Fluoreszenzmarkern versehen waren, nachzuweisen,<sup>1</sup> gelang es der Gruppe um RICHARD KELLER einzelne Moleküle in Lösung und bei Raumtemperatur zu detektieren.<sup>4</sup> Nach den ersten Versuchen stellte sich heraus, dass für die Untersuchung an einzelnen Molekülen nicht das Fluoreszenzsignal und deren empfindliche Detektion, sondern die Rauschunterdrückung der limitierende Faktor war. Elastische RAYLEIGH-Streuung, sowie die unelastische RAMAN-Streuung, störten die Fluoreszenz.

1992 machte sich RUDOLF RIGLER den konfokalen Aufbau zu Nutze, um einzelne, frei diffundierende Moleküle zu detektieren.<sup>5,6</sup> Durch Erzeugung eines beugungsbegrenzten Anregungsvolumens mit hoher Laserintensität können in nur diesem kleinen Volumen die Fluorophore zum Fluoreszieren angeregt werden. Mit Hilfe einer Lochblende, um unerwünschtes Streulicht für die Detektion einzugrenzen, sowie durch die Wahl geeigneter Bandpassfilter, kann die Fluoreszenz isoliert werden.

Das durch den erwähnten Aufbau erzeugte Detektionsvolumen besitzt nur noch eine Größe von wenigen Femtolitern ( $10^{-15}$  l), in denen sich ungefähr  $10^{11}$  Lösungsmittelmoleküle befinden. Die von diesen Molekülen ausgehende RAMAN-Streuung ist, im Vergleich zur emittierten Fluoreszenz eines Farbstoffmoleküls, vernachlässigbar gering.

Der letzte für die Einzelmolekülmikroskopie wichtige Faktor ist die Konzentration der zu beobachtenden Moleküle. Während der Beobachtung sollte sich nur ein Molekül im Beobachtungsvolumen aufhalten. Bei einem Volumen von einem Femtoliter würde die Konzentration des Farbstoffs in der Lösung etwa  $2 \cdot 10^{-11}$  M betragen. Zur Minimierung der Wahrscheinlichkeit zwei Moleküle gleichzeitig im Fokus zu detektieren sind also Konzentrationen kleiner als  $2 \cdot 10^{-11}$  M notwendig.

### **B.2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)**

Die Emission von Fluoreszenzphotonen von gleichartigen Molekülen über einen längeren Zeitraum enthält Informationen, die einer Selbstähnlichkeitsanalyse zugänglich sind. In der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*engl.*: Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Abk.*: FCS), einer mathematischen Methode zur Signalanalyse von Zeitreihen, wird das Fluoreszenzsignal durch Korrelation einzelner Photonen verarbeitet. Die Anfänge der FCS liegen in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts. Das Ziel der damaligen Untersuchungen galt der Dynamik der Denaturierung von DNA.<sup>34</sup> Die FCS entwickelte sich

bis heute zu einer verbreiteten Technik, um molekulare Diffusionsprozesse in hochverdünnten Lösungen oder auf Membranen, chemische Kinetiken und Konformationsdynamiken und seit einigen Jahren auch die Beobachtungen der Dynamik molekularer Prozesse in und auf lebenden Zellen und Geweben zu beobachten. Seit 1992 wurde die konfokale Mikroskopie um die FCS erweitert.<sup>35,36</sup>

Die FCS benötigte in den Anfangsjahren mehrere Minuten und reduzierte sich im Laufe der Zeit auf wenige Sekunden und ist somit mit ihrer Empfindlichkeit zu einer sehr schnellen Spektroskopie geworden.<sup>37</sup>

Das Fluoreszenzsignal eines kleinen Volumens, welches durch die optischen Grenzen der beugungsbegrenzten Anregung limitiert ist, wird als Funktion der Zeit  $F(t)$  aufgenommen. Die Fluoreszenzfluktuation  $\delta F(t)$  um das zeitliche Mittel des Signals spiegelt die Anzahl der Moleküle wieder die durch das Detektionsvolumen diffundieren.

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad \text{Formel 13}$$

mit

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad \text{Formel 14}$$

Diese Annahme gilt, solange nicht die Grenzen der Methode erreicht werden, zu denen zum Beispiel die optische Sättigung oder die Photozerstörung der Farbstoffe, welche ein Resultat aus einer zu starken Laseranregung sind, gehört. In der Praxis wird das fokale Volumen nie einheitlich ausgeleuchtet. Somit ergibt sich ein uneinheitliches, räumliches Profil, das sich aus dem Faltungsprodukt der tatsächlichen Ausleuchtung (und somit der Anregung des Fluorophors) mit dem Detektionsvolumen ergibt. Im Falle der konfokalen Optik, welche erstmals von Koppel 1976 zur FCS eingesetzt wurde<sup>38</sup>, wird aus einem winzig kleinen Volumen (Femtoliter) die Fluoreszenz gesammelt, inmitten einer durch ein doppeltes konisches Laserprofil erzeugten Anregung. Der Einfachheit halber kann man das fokale Volumen als eine räumliche Detektierbarkeitsfunktion  $\Phi(\vec{r})$  ansehen. Die lokale Fluktuation der Spezies  $\delta C(\vec{r}, t)$  enthält den zugehörigen Beitrag zur Fluktuation des Fluoreszenzsignals. Somit erhält man

$$\delta F(\vec{r}, t) = \Phi(\vec{r}) \delta C(\vec{r}, t). \quad \text{Formel 15}$$

Die Integration über diese punktuellen Beiträge über das Volumen definiert das fluktuierende Fluoreszenzsignal

$$\delta F(t) = \int \Phi(\vec{r}) \delta C(\vec{r}, t) d^3 r \quad \text{Formel 16}$$

beziehungsweise das Fluoreszenzsignal an sich

$$F(t) = \int \Phi(\vec{r}) C(\vec{r}, t) d^3 r. \quad \text{Formel 17}$$

Das fokale Volumen  $V$  welches durch die räumliche Verteilung der Detektierbarkeitsfunktion  $\Phi(\vec{r})$  definiert ist kann wie folgt ausgedrückt werden

$$V = \frac{\left[ \int \Phi(\vec{r}) d^3 r \right]^2}{\int [\Phi(\vec{r})]^2 d^3 r}. \quad \text{Formel 18}$$

Mit dieser Formel für das fokale Volumen ist man nun in der Lage eine Aussage über die Fluorophor Konzentration zu machen

$$\langle C \rangle = \frac{\langle N \rangle}{V}. \quad \text{Formel 19}$$

Die Autokorrelationsfunktion der relativen Fluoreszenzfluktuation

$$G(\tau) \equiv \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Formel 20}$$

stellt die Basis der FCS Analyse dar. Die Korrelation zur Verzögerungszeit 0 stellt die normalisierte Abweichung der Fluoreszenzfluktuation  $F(t)$  um den Mittelwert dar. In dieser enthalten ist die durchschnittliche Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  und somit auch die Konzentration  $\langle C \rangle$

$$G(0) \equiv \frac{\langle [\delta F(t)]^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\langle C \rangle N}. \quad \text{Formel 21}$$

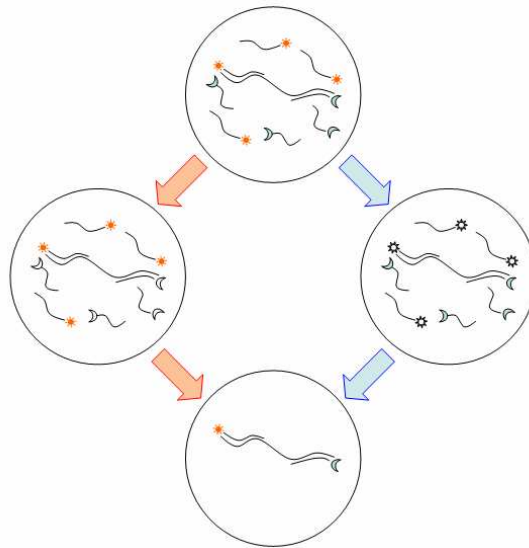
Gewöhnlich nimmt man für die räumliche Detektierbarkeitsfunktion  $\Phi(\vec{r})$  ein zylindrisches, zweidimensionales GAUSS-Profil oder einen GAUSSförmig gestrecktes, dreidimensionales Ellipsoid an. Diese Näherung vereinfacht die Formel und ergibt die Diffusionszeiten in der Autokorrelationsfunktion, welche für den zweidimensionalen Fall

$$\left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \quad \text{Formel 22}$$

ergibt, wobei  $\tau_D \propto \frac{w^2}{4D}$  mit  $w$  als Radius des Volumens bei  $\Phi(w)/\Phi(0) \propto e^{-2}$  bzw.  $e^{-4}$  abhängig von der angewandten Form von  $\Phi(\vec{r})$ . Anzumerken sei hier, dass  $\Phi(\vec{r})$  als Produkt aus zwei Faktoren besteht, die in der Punktabbildungsfunktion wieder zu finden sind. Bei der

Zweiphotonenanregung ohne konfokale Apertur ist  $\Phi(\vec{r})$  das Quadrat des Laseranregungsprofils. Die Zweiphotonenanregung ist eine Alternative zur Einphotonenanregung mit der man eine Verkleinerung des Anregungsvolumens erzielen kann. Durch hohe Laserenergien, die benötigt werden um die entsprechenden Photonendichten zu erreichen, kann es jedoch zu einer Erwärmung der Probe führen.

Mit Hilfe der FCS ist es möglich, dynamische Prozesse zu beobachten. Zu diesen gehören die Messung der Diffusionsgeschwindigkeit<sup>39</sup> der molekularen Masse oder auch photophysikalische Prozesse, wie zum Beispiel Übergänge in nicht leuchtende Triplettzustände, Protonierungen<sup>40</sup>, sowie Isomerisierung<sup>41</sup>. Diese Prozesse lassen sich über die charakteristischen Abklingkurven beobachten und bestimmen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der spektral getrennten Kreuzkorrelation. Im oberen Bild sind verschiedene Sonden dargestellt, die spektral unterschiedliche Fluoreszenz emittieren (hier blau und rot). Durch spektrale Trennung der Information (links rot; rechts blau) werden nur die spektral getrennten Fluoreszenzfluktuationen berücksichtigt. Durch Kreuzkorrelation beider Fluoreszenzfluktuationen wird ausschließlich eine Korrelationsfunktion der kombinierten Spezies erhalten.**

Über die Autokorrelation hinaus ist die *Kreuzkorrelation* eine Erweiterung der Korrelationsanalyse eines Fluoreszenzsignals. Im Gegensatz zur Autokorrelation, bei der das Fluoreszenzsignal mit sich selbst verglichen wird, werden zwei Signale unterschiedlichen Ursprungs (z.B. aufgenommen mit unterschiedlichen Detektoren) miteinander korreliert. Folglich wird bei einem aufgenommenen Signal bei der Autokorrelation ein Vergleich mit sich selbst unternommen dessen Ergebnis die immer wiederkehrende signifikante Verweildauer im fokalen Volumen ist. Bei der Kreuzkorrelation zweier unterschiedlichen Signale hingegen wird der dahinter liegende Mechanismus deutlich. Die Kreuzkorrelation lässt eine Vielzahl von Messvarianten zu, von denen sich zwei einfache Methoden etabliert haben.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der Zwei-Volumen-Kreuzkorrelation und der Zwei-Foki-Kreuzkorrelation (siehe Abbildung 4). Betrachtet man zwei verschiedene Molekülspezies  $i$  und  $j$ , welche eine gemeinsame Spezies  $ij$  bilden und somit ein für die Kreuzkorrelation relevantes Signal, so gilt die allgemeine Form der Korrelationsfunktion. Sie wird dabei wie folgt erweitert:

$$G_{ij}(\tau) = \frac{\langle \delta F_i(t) \cdot \delta F_j(t + \tau) \rangle}{\langle F_i(t) \rangle \langle F_j(t) \rangle} \quad \text{Formel 23}$$

wobei bei man bei  $i = j$  die Autokorrelation erhält und bei  $i \neq j$  die Kreuzkorrelation. Daraus ergibt sich dann auch, dass die Amplitude der Kreuzkorrelation direkt proportional zur Konzentration der gemeinsamen Molekülspezies  $ij$  ist. Betrachtet man die Formel genau wird man feststellen, dass alle fluoreszierenden Moleküle erfasst werden, wohingegen der Zähler ausschließlich die Molekülspezies  $ij$  repräsentiert.

Eine wichtige Größe in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist die genaue Definition des effektiven Messvolumens. Es ist bekannt, dass die gewöhnliche konfokale Optik mit dem beugungsbegrenzten Anregungsvolumen und die Lochblende in der Bildebene mit Hilfe der FOURIER-Optik beschrieben wird<sup>42,43</sup>, wobei die Punktabbildungsfunktion des Objektivs mit der geometrischen (meist zirkularen) Funktion der Lochblende gefaltet wird. In dem Fall des beugungsbegrenzten Anregungsvolumens wird die Punktabbildungsfunktion als BESSEL-Funktion beschrieben. Für eine vollständig überstrahlte Objektivöffnung kann man in Näherung ein GAUSS-Profil im Radial und ein LORENTZ-Profil in axialer Richtung annehmen. Eine analytische Lösung für die Faltung im Bildraum existiert nicht, deswegen geht man dazu über, das System als eine dreidimensionale GAUß-Verteilung anzusehen, welche detektiert wird. Das Faltungsprodukt zwischen dem Profil der Laseranregung und dem Profil der Detektionseffizienz ergibt:

$$E(\vec{r}) = \eta_i W(\vec{r}) = \underbrace{I \sigma \Phi_f}_{\eta_i} \underbrace{\kappa \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{r_0^2} - \frac{2z^2}{z_0^2}\right)}_{w(\vec{r})}, \quad \text{Formel 24}$$

wobei  $\sigma$  der Absorptionsquerschnitt und  $\Phi_f$  die Fluoreszenzquantenausbeute des Farbstoffs,  $\kappa$  den maximalen Wert für die Lichtsammelleffizienz und  $I$  die maximale Laserintensität darstellt.  $x$ ,  $y$  und  $z$  stellen die Raumkoordinaten dar, wobei  $z$  die optische Achse ist. Die Parameter  $r_0$  und  $z_0$  beschreiben die räumliche Ausdehnung des Detektionsvolumens, wobei hier die Verteilungsfunktion  $E(\vec{r})$  auf den jeweiligen Halbachsen

auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Diese Emissionsverteilungsfunktion ist durch den gesamten Raum größer als Null, somit kann das Konzept einer hart begrenzten Kugel nicht länger gelten. Da das konfokale Detektionsvolumen in der Praxis nie unendlich groß ist, kann man in guter Näherung davon ausgehen, dass die Konvergenz des Strahlprofils ein endliches Volumen beschreibt, das effektive Volumen  $V_{eff}$ . Dieses erlaubt uns bei gegebener mittlerer Konzentration die Anzahl der im Volumen befindlichen Moleküle mit der inversen Korrelationsamplitude anzugeben:

$$N = G(0)^{-1} = V_{eff}^{-1} \langle C \rangle^{-1} \quad \text{Formel 25}$$

Die Beziehung zwischen der Anzahl  $N$  und der normalisierten Amplitude  $G(0)$  gehorcht der POISSON-Statistik, in welcher der Mittelwert gleich der Standardabweichung ist. Die Autokorrelation einer Ein-Farben-Anregung mit nur einer Farbstoffspezies ist:

$$G(\tau) = \frac{\iint W(\vec{r})W(\vec{r}')\eta^2\Phi(\vec{r},\vec{r}',\tau)dVdV'}{\left(\langle C \rangle \eta \int W(\vec{r})dV\right)^2} \quad \text{Formel 26}$$

Für den Fall  $\Phi(\vec{r},\vec{r}',0) = \langle C \rangle \delta(\vec{r} - \vec{r}')$  erhält man für das effektive Volumen

$$V_{eff} = \frac{\left[\int W(\vec{r})dV\right]^2}{\int W^2(\vec{r})dV} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0. \quad \text{Formel 27}$$

Dieses effektive Volumen unterscheidet sich von dem der Zwei-Farben-Kreuzkorrelation in dem Sinne, dass die Laserprofile unterschiedliche Größen besitzen. Somit verändert sich das effektive Volumen bei der Kreuzkorrelation zu

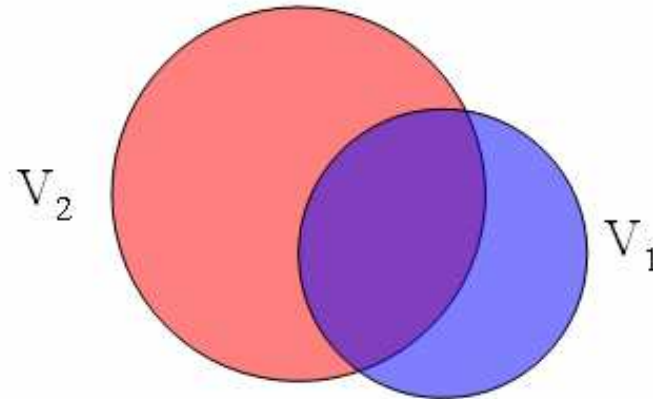
$$V_{eff,\times} = \frac{\left[\int W_1(\vec{r})dV\right]\left[\int W_2(\vec{r})dV\right]}{\int W_1(\vec{r})W_2(\vec{r})dV} = \pi^{\frac{3}{2}} \frac{(r_1^2 + r_2^2)}{2} \sqrt{\frac{(z_1^2 + z_2^2)}{2}}, \quad \text{Formel 28}$$

wobei nun die beiden GAUSS-Profile mit  $W_1(\vec{r})$  und  $W_2(\vec{r})$  beschrieben werden.

Bei der Kreuzkorrelation wird angenommen, dass sich die beiden fokalen Volumina perfekt überlappen. Jedoch ist das in der Praxis häufig nicht der Fall. Bei der Anregung mit zwei Laserlichtquellen kann aufgrund der unterschiedlichen Wellenlänge nie ein vollständiger Überlapp erreicht werden. Diese können durch kleine Versätze bei der Justierung, sowie die unterschiedlichen Fokusgrößen des Laserlichts aufgrund von Abberationen bei Aufbauten ohne Glasfaser zum nicht vollständigen Überlapp führen. Chromatische Abberationen des Mikroskopobjektivs auf der Seite der Detektion verursachen dort zusätzlich Fehler im Überlapp der Volumina. Das bedeutet, dass das effektive Volumen, welches beide Detektoren



sehen, nur die Schnittmenge der einzelnen Volumina ist. Bei kleinen Abweichungen kann man diese Fehljustierung herausrechnen.



**Abbildung 5: Skizze zweier nicht vollständig überlappender Volumina.**  $V_{eff,12} = V_1 \cap V_2$

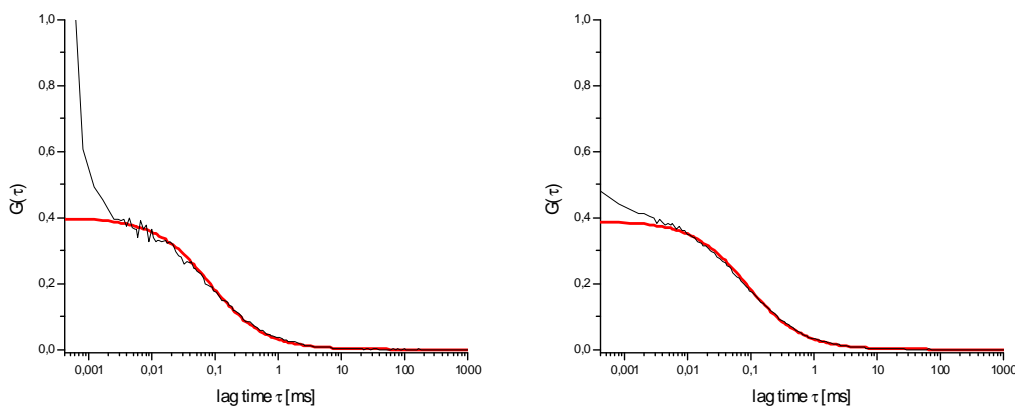
Nimmt man an, dass die beiden effektiven Volumina  $V_1$  und  $V_2$  zu den jeweiligen Bruchteilen  $v = \frac{V_{eff,12}}{V_1}$  und  $w = \frac{V_{eff,12}}{V_2}$  an dem gemeinsamen effektiven Volumen relativ beteiligt sind, so kann man weiterhin für die jeweiligen Konzentrationen entsprechend die Beziehungen  $\langle C_{ij} \rangle = v \langle C_i \rangle$  und  $\langle C_{ij} \rangle = w \langle C_j \rangle$  ansehen. Die Konzentration in den jeweiligen Volumina, die nicht zum gemeinsamen Volumen beitragen ist dementsprechend  $(\langle C_i \rangle - \langle C_{ij} \rangle)$  und  $(\langle C_j \rangle - \langle C_{ij} \rangle)$ . Nur der Beitrag der Spezies innerhalb des gemeinsamen Volumens gibt einen Anteil ungleich null zu dem Zähler der Korrelationsfunktion, wohingegen in dem gesamten Volumen  $V_1 \cup V_2$  sämtliche Spezies zu dem Nenner beitragen. Dies führt also zu einer fälschlicherweise kleineren Kreuzkorrelationsamplitude, für die Kreuzkorrelation interessante Spezies  $ij$ . Die Amplitude der Korrelation, also bei der Zeitverschiebung 0 schreibt sich wie folgt:

$$G_{1 \times 2}(0) = \frac{v \cdot w \cdot \langle C_{12} \rangle}{V_{eff,x} (\langle C_1 \rangle + \langle C_{12} \rangle) (\langle C_2 \rangle + \langle C_{12} \rangle)} \quad \text{Formel 29}$$

Eine andere Fehlerquelle in der Zwei-Farben-Kreuzkorrelation stellt das so genannte Übersprechen (*engl.*: cross-talk) dar. Hierbei ist der Absorptionsquerschnitt, des zu längeren Wellenlängen verschobenen Farbstoffs (roten Farbstoffs) ungleich null, so dass zu einem kleinen Anteil auch der rote Farbstoff bei kürzeren Wellenlängen angeregt wird. Diese Tatsache lässt sich auch von der anderen Seite her denken, bei der die Emission des bei

kürzeren Wellenlängen emittierenden Farbstoffs (blauen Farbstoffs) im Detektionsbereich des roten Farbstoffs liegt und somit zum Fluoreszenzsignal des roten Detektors dazukommt.<sup>44</sup>

Die Kreuzkorrelation birgt viel Potential. So ist es möglich, störende Artefakte wie das so genannte Nachpulsen (*engl.*: afterpulsing) der APDs,<sup>45,46</sup> welche durch gefangene Photonen in Unreinheiten der Halbleiterschichten in der photosensiblen Schicht zurückzuführen ist und charakteristisch für jede APD ist, zu eliminieren. Das Hintergrundsignal wird in einer Kreuzkorrelation, da es in jeder Spur willkürlich auftaucht, besser unterdrückt. Dies bringt eine Steigerung der Qualität der Korrelationsfunktion zugunsten des erwünschten Signals. (*siehe* Abbildung 6)



**Abbildung 6:** Vergleich einer Autokorrelationskurve (*links*) mit einer Kreuzkorrelationskurve (*rechts*). Deutlich sieht man in der Autokorrelation Artefakte, die von den Detektoren stammen. Diese treten in einem Zeitbereich von wenigen Mikrosekunden auf.

Diffundiert ein Farbstoffmolekül durch ein dreidimensionales GAUSSprofil mit den Halbachsen für die radiale Ausdehnung  $r_0$  und die axiale  $z_0$ , so kann man die Autokorrelationsfunktion wie folgt formulieren:

$$\begin{aligned}
 G(\tau) &= \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{4D\tau}{r_0^2} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \\
 &= \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \left( \frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-\frac{1}{2}}
 \end{aligned}
 \tag{Formel 30}$$

mit

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}
 \tag{Formel 31}$$

, wobei  $\tau_D$  die Diffusionszeit und  $D$  den stoffspezifischen Diffusionskoeffizienten darstellt. Die Diffusionszeit  $\tau_D$  hat somit einen direkten Bezug zum Diffusionskoeffizienten

*D*. Auf Oberflächen wie zum Beispiel Zellmembranen vereinfacht sich die Formel aufgrund der Annahme, dass  $z \gg w$  ist zu der Gleichung mit der zweidimensionalen Diffusion

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right)^{-1} \quad \text{Formel 32}$$

Den Diffusionskoeffizienten *D* eines kugelförmigen Moleküls wird nach der Beziehung von STOKES und EINSTEIN mit der Gleichung

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta_v R_h} \quad \text{Formel 33}$$

berechnet, wobei  $\eta_v$  die Viskosität und  $R_h$  den hydrodynamischen Radius ausdrückt. Durch Umformen und Einsetzen erhält man so eine direkte Beziehung zwischen der Viskosität und der Diffusionszeit:

$$\eta_v = \frac{2\tau_D kT}{3\pi\omega^2 R_h} \quad \text{Formel 34}$$

Die mittels der FCS gewonnenen Informationen beschränken sich nicht nur auf die Analyse von Diffusionsprozessen, auch andere Dynamiken, wie Bindungsstudien, Triplettzustände oder Isomerisierungen lassen sich mit der FCS erfassen.

### **B.3 ZELLKULTUR**

Für die moderne Biologie sind Experimente in kultivierten und reproduzierbaren Systemen von großer Bedeutung. Nach den anfänglichen Erkenntnissen, dass größere Lebewesen aus mehreren Zellen bestehen, interessierte man sich schließlich immer mehr für Prozesse, die im Inneren einer Zelle ablaufen. Durch Differenzierung und Isolierung von Zellen eines Organismus ist es möglich, Prozesse innerhalb einer Zelle mit den immer exakter werdenden Methoden der Analytik zu untersuchen und weitere Erkenntnisse über die Zelle und ihren Einfluss auf einen größeren Organismus zu erlangen. Die Untersuchungen über deren Physiologie, ihren Zellzyklus im Speziellen, die Zellteilung und den plötzlichen oder programmierten Zelltod, sowie ihre Wechselwirkung mit ihrer Umwelt, helfen nicht nur der Biologie die Zellen zu verstehen, sondern sie auch zu beeinflussen. Für diese Untersuchungen macht man sich die Zellkultur zu Nutze. Die Eukaryoten (Mehrzeller) werden in einer künstlichen Umgebung, die mit Nährmedien, angemessener Temperatur und entsprechendem pH-Wert erzeugt wird, nicht nur am Leben erhalten sondern vermehren sich dabei.

Um eine aus Tieren stammende Zelle oder besser noch die entsprechende Zelllinie zu kultivieren, entnimmt man dem Tiergewebe Zellen und versucht mittels der Wahl bevorzugter Konditionen das Wachstum einer Kultur von Zellen zu erreichen und diese zu vervielfältigen. So gewonnene Zelllinien haben allerdings eine begrenzte Lebensdauer, jedoch können diese über Mutationen oder Kreuzung mit einer unsterblichen Zelllinie zu einer wesentlich längeren Lebenszeit gelangen. Der Schlüssel des Erfolges einer wachsenden Zellkultur liegt in der Imitation der ursprünglichen Umgebung, aus der sie stammen.

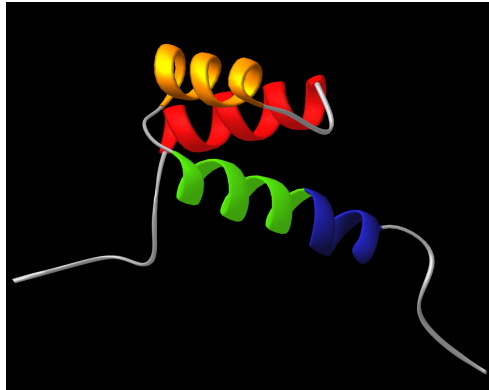
#### ***B.4 ZELLMEMBRANGÄNGIGE PEPTIDE***

Das Tat-Protein ist ein Protein bestehend aus 86 Aminosäuren, welches in der Replikation des menschlichen Immunschwächevirus Typ 1 (*engl.*: human immunodeficiency virus, *Abk.*: HIV-1), in der frühen Phase der Infektion eine Rolle spielt. Einige Studien haben sich damit beschäftigt, die Aktivität von exogenem Tat-Protein zu untersuchen,<sup>47</sup> wobei festgestellt wurde, dass das Protein die Fähigkeit besaß, durch die Plasmamembranen hindurch zum Zellkern zu wandern und dort die Replikation des viralen Genoms zu aktivieren. Ein kleiner Bereich von wenigen Aminosäuren in der Sequenz ist für die Aufnahme des Peptids essentiell und konnte durch Ersetzen der einzelnen Aminosäuren herausgefunden werden.

Diese Art von membrangängigen Proteinen könnte vor allem für die pharmazeutische Industrie interessant sein, da diese Proteine die Blut-Hirn-Schranke überwinden könnten und somit schneller und zuverlässiger den Wirkstoff an seinen Bestimmungsort bringen. Interzelluläre Signale können auch über Signalpeptide, die an einen Rezeptor in der Membran andocken, als sekundäre Botenstoffe weitergegeben werden.

Neben diesen viralen, zellgängigen Peptiden existieren auch in eukaryotischen Zellen ähnliche Peptide. Zu diesen Homeoproteinen zählt zum Beispiel das *Antennapedia* Protein (*pAntp*) der *Drosophila melanogaster* oder KNOTTED-1 (*KNI*), ein Protein welches im Mais vorkommt. Diese Proteine haben im Gegensatz zu den viralen Proteinen eine größere Region, die für die Membrangängigkeit notwendig ist. Dieser Bereich, der etwa 60 Aminosäuren umfasst, bildet die so genannte Homeobox, welche Helices ausbilden kann, die an spezifische DNA bindet. Diese Sequenz wurde bei vielen Transskriptionsfaktoren gefunden. Durch Eliminierung des Tryptophans und des Phenylalanins in der Homeodomain konnte die Aufnahme verhindert werden. Die beiden eliminierten Aminosäuren aus der dritten Helix des

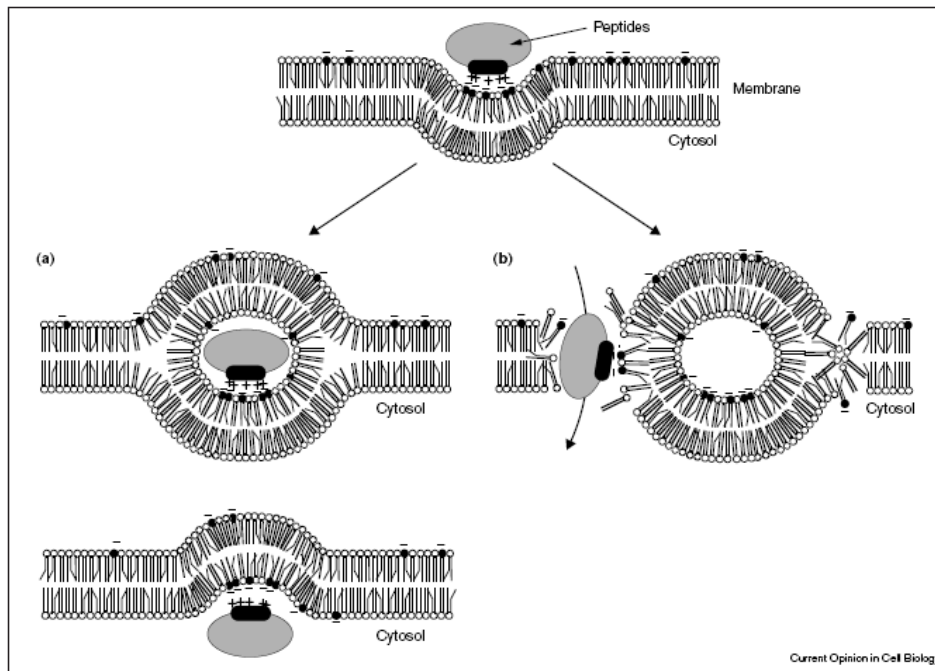
Proteins weisen daraufhin, dass diese Helix eine Hauptrolle in der Aufnahme des Proteins spielt.<sup>48</sup>



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Antennapedia-Protein (*pAntp*) mit seinen drei Helices. (Bild-Quelle: <http://www-nmr.cabm.rutgers.edu/photogallery/structures/html/page20.html> Stand: 20. April 2006)**

Für den Aufnahmemechanismus der Homeoproteine wurde ein Mechanismus vorgeschlagen welcher in Abbildung 8 abgebildet ist.<sup>49</sup> Die positive Ladung des Peptids bindet an die negativ geladene äußere Membran der Zelle. Der so gebildete Ladungsausgleich bewirkt eine Einstülpung der Membran und ein Durchschleusen des Peptids.

Die Aufnahme der Tat-Proteine ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Zuerst vorgeschlagene Mechanismen – welche auch bei den Homeoproteinen vorgeschlagen wurden – die Proteine könnten über Endozytose in die Zelle gelangen, konnten durch Zelleexperimente bei Temperaturen von 4°C und durch Verarmung des Energielieferanten Adenosintriphosphat (Abk.: ATP) widerlegt werden.<sup>50</sup> Ebenso konnte die Aufnahme über Rezeptoren in der Zellmembran bisher ausgeschlossen werden. Einzig bleibt nun der direkte Diffusionstransport durch die Zellmembran ähnlich zu dem in Abbildung 8 vorgeschlagenem Mechanismus.<sup>51</sup>



**Abbildung 8: Vorgeschlagener Mechanismus zur Aufnahme der Homeoproteine. (Bild aus Referenz <sup>49</sup>)** Der positiven Ladung des Peptids steht eine negative Ladung in der hydrophilen Schicht der Zellmembran gegenüber. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Bildung einer inversen Mizelle und der Translokation des Peptids Penetrin unter Einbeziehung elektrostatischer Wechselwirkungen und Einwirkung eines Tryptophans in der Homeodomain. (a) Zeigt das in der inversen Mizelle gefangene Peptid und die Öffnung der Mizelle zur Zelle hin. (b) Zeigt ein Modell einer Zelle, die die Doppelschicht stört um durch die Membran hindurchzukommen.

#### B.4.1 Die poly- $\beta$ -Arginine

Die Tat-Proteine unterscheiden sich von den Homeoproteinen deutlich. Im Gegensatz zu der für die Aufnahme wichtigen Sekundärstruktur in der Homeobox, konnte man durch gezielte Mutation die Sequenz des Tat-Proteins verändern und die für die Aufnahme verantwortliche Sequenz erkennen. Die Region (Tat<sub>49-57</sub>), in dem 86 aminosäurelangem Tat-Protein (MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALGISY**GRKK-RRQRRR**APQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE, hier rot markiert), besteht hauptsächlich aus den Aminosäuren Arginin (R) sowie Lysin (K). Diese beiden Aminosäuren haben, als einzige unter den natürlichen Aminosäuren, die Eigenschaft unter zellulären pH-Bedingungen in protonierter Form vorzuliegen. Bei der Untersuchung über die Aufnahmefähigkeit des Peptids bzw. Analoga stellte man fest, dass das Peptid aufgebaut aus den D-Aminosäuren und deren Retro-inverses sogar noch besser von den Zellen aufgenommen wurde, als sein natives Vorbild.<sup>52,53</sup>

Die Verwendung der  $\beta$ -Peptide (*siehe* Abbildung 9) ist ein anderer Ansatz zur Erzeugung von Peptidomimetika. Im Gegensatz zu ihrem nativen Analogon den  $\alpha$ -Aminosäuren, sind diese vollkommen stabil gegenüber der proteolytischen Zersetzung von Enzymen.<sup>54,55,56,57</sup> Durch Imitation von kurzen  $\alpha$ -Hormonen durch das entsprechende  $\beta$ -Analogon konnte sogar die biologische Wirksamkeit der Analoga gezeigt werden.<sup>58</sup> Die Toxizität konnte bei Inkubationszeiten von 12 h nicht bestätigt werden.<sup>59</sup>

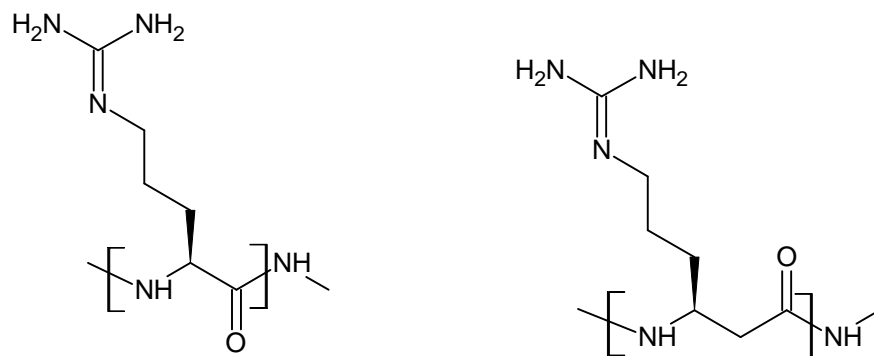


Abbildung 9:  $\alpha$ -Arginin und das Homologe  $\beta$ -Arginin.

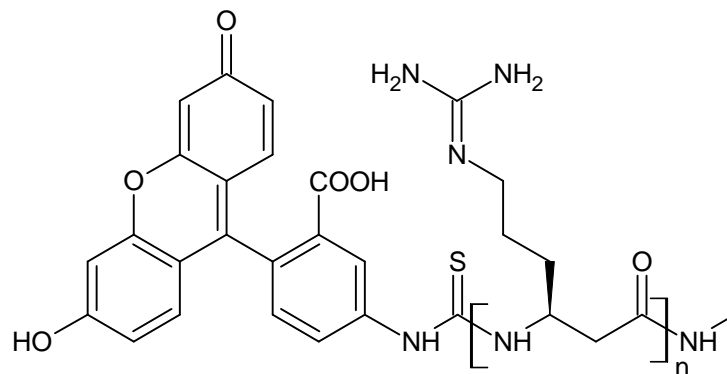


Abbildung 10: Fluorescein markiertes  $\beta$ -Arginin.





## C MATERIAL UND METHODEN

### C.1 EINZELMOLEKÜLFLUORESZENZMIKROSKOP

#### C.1.1 Das Mikroskop

In diesem Abschnitt werden die wichtigen Komponenten vorgestellt, die zur bildgebenden Fluoreszenz-Korrelations-Mikroskopie benötigt und verwendet wurden.

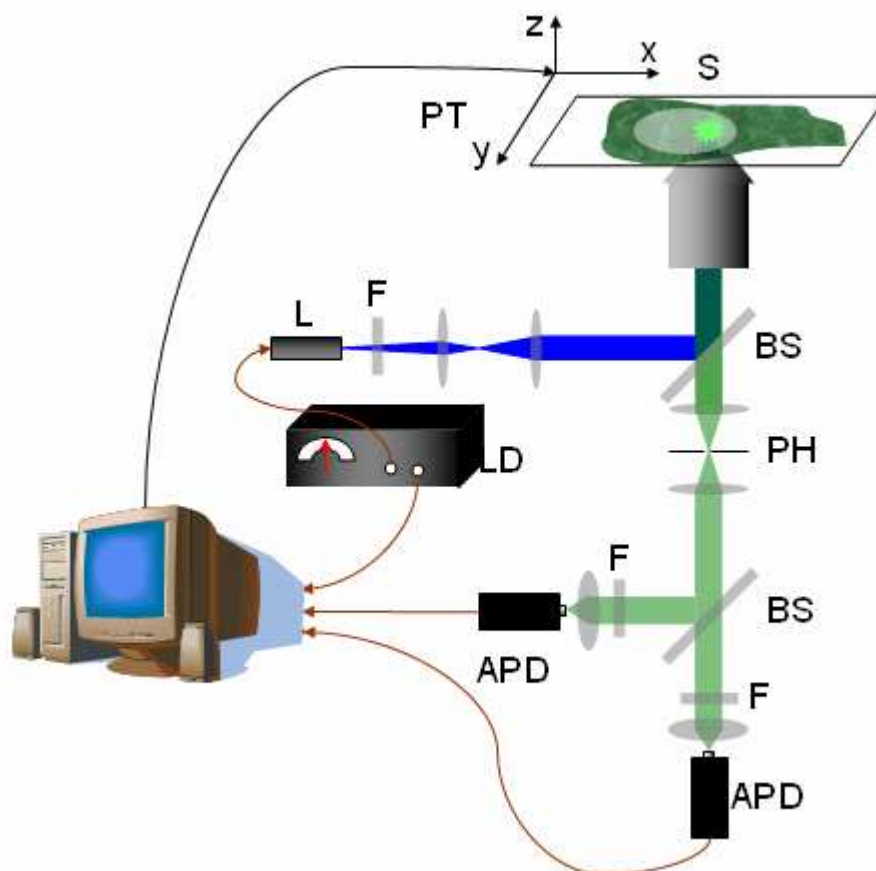


Abbildung 11: Schematische Darstellung des konfokalen spektral aufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-mikroskops.

In Abbildung 11 ist der Aufbau eines konfokalen Mikroskops schematisch dargestellt. Zur Anregung wird eine monochromatische Laserlichtquelle (L) benutzt, die über Spiegel seitwärts in ein Mikroskop (Axiovert 100TV, Zeiss, Deutschland) gelenkt wird. Über einen dichroitischen Strahlteiler (BS) wird das parallele Licht rückwärtig in ein Objektiv (100x, NA 1,45 und 1,40, Olympus, Japan) mit hoher numerischer Apertur geführt. Das Objektiv fokussiert das Anregungslicht in die Probe (S) und bewirkt so eine Anregung der

Fluoreszenzmoleküle. Innerhalb weniger Nanosekunden geben die Fluoreszenzmoleküle ihre Energie unter anderem auch in Form von längerwelligem Licht ab, welches durch dasselbe Objektiv wieder eingesammelt wird. Dieses Fluoreszenzlicht wird von dem dichroitischen Strahlteiler transmittiert und mittels einer anschließenden Sammellinse auf die Lochblende (PH) abgebildet. Hierbei wird das Licht außerhalb der Anregungsebene, also aus höheren bzw. tieferen Schichten ausgeblendet. Die hinter der Lochblende befindliche Sammellinse im einfachen Brennweitenabstand kollimiert das Licht. Durch einen zweiten Strahlteiler kann die Fluoreszenz spektral oder durch Verwendung eines nicht-polarisierenden Strahlteilerwürfels gleichwertig auf die Detektoren verteilt werden. Letztere Option ist hauptsächlich interessant für die Koinzidenzanalyse und die FCS-Analyse. Die vor den Lawinenphotodioden (*engl.*: avalanche photodiodes, kurz: APD, *siehe* C.1.3, Perkin-Elmer, USA) stehenden, stark fokussierenden Sammellinsen ( $f \approx 20 \text{ mm}$ ), richten das Licht auf einen sehr kleinen Bereich der aktiven Fläche der APDs (*auch* Photonenzählwerke *genannt*, *engl.*: single photon counting module, *Abk.*: SPCM) die typischerweise einen Durchmesser von  $175 \mu\text{m}$  hat.

Mit F und BS sind in Abbildung 11 die Filter und Strahlteiler (BS) gekennzeichnet (AHF-Analysentechnik, Deutschland), die für die entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen angepasst werden müssen. In Tabelle 2, sowie in Abbildung 12 sind die verwendeten Strahlteiler aufgeführt.

Anregungswellenlänge [nm]	470nm	532nm	635nm
<i>Aufreinigungsfilter</i>	HQ470/10	HQ532/10	HQ635/10
<i>Strahlteiler Mikroskop</i>	z470/635RDC	565DCXR	z470/635RDC
<i>Emissionsfilter</i>	HQ515/70M	HQ620/60M	HQ685/70

**Tabelle 2: Exemplarische Zusammenstellung der verwendeten Filter im Einzelmolekülmikroskop.**

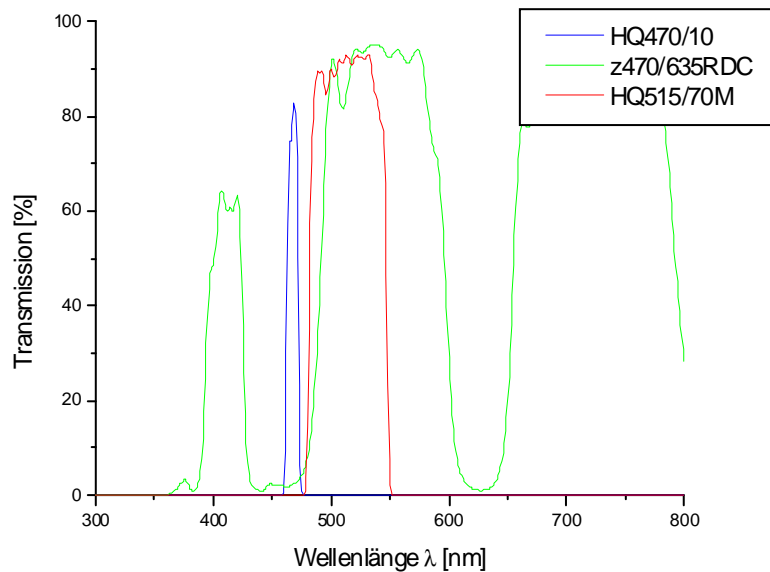


Abbildung 12: Filtersatz für die Anregung mit der blauen Laserdiode bei 470 nm.

### C.1.2 Die Anregungslichtquelle

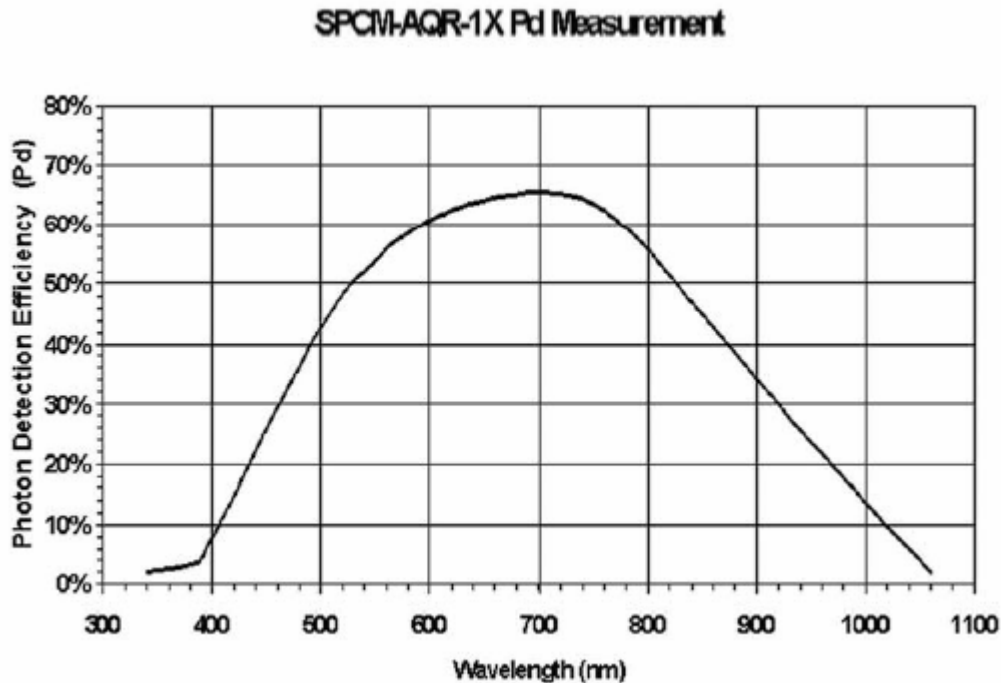
Zur Anregung werden zwei gepulste Laserdioden mit den Wellenlängen 470 nm und 635 nm benutzt die durch einen Pulstreiber PDL-808 „Sepia“ betrieben werden (PicoQuant GmbH, Deutschland). Die einstellbaren Repetitionsraten reichen von 5 MHz bis zu 80 MHz, zusätzlich kann die Repetitionsrate durch eine externe Pulsquelle gesteuert werden. Die fasergekoppelte blaue Laserdiode LDH-P-C-470 erreicht eine Leistung von ca. 1,5 mW und hat eine maximale, leistungsabhängige Halbwertsbreite von 300 ps bei der maximalen Repetitionsrate von 40 MHz. Die rote Laserdiode hat bei 80 MHz eine maximale Halbwertspulsbreite von 400 ps. Ihre Leistung kann bis auf 2 mW kontinuierlich durchgestimmt werden. Das Strahlprofil der nicht fasergekoppelten Diode entsprach der Kavität nach einer Ellipse.

Als weitere Anregungsquelle steht ein frequenzverdoppelter 532 nm Nd:YAG Dauerstrichlaser (Lasergate, USA) zur Verfügung. Seine Leistung von 10 mW muss zur Detektion einzelner Moleküle mittels eines Filtrerrades mit kontinuierlich steigender optischer Dichte (*Abk.*: OD) stark abgeschwächt werden.

### C.1.3 Die Detektoren

Mittels eines Einzelphotonen Lawinendetektors (SPCM-AQR-15, Perkin-Elmer, USA) werden Photonen mit einer Wellenlänge von 400 bis 1000 nm auf dem

Hochleistungssiliziumchip detektiert. Die Detektionseffizienz des Detektors ist wellenlängenabhängig. Die beste Effizienz der verwendeten APDs liegt in einem Bereich von 640 bis 720 nm.



**Abbildung 13: Detektionseffizienz einer Einzelphotonendetektors. Die höchste Detektionseffizienz liegt in einem Bereich von 640 bis 720 nm. (Bildquelle: LASER COMPONENTS GmbH, Deutschland, [http://www.lasercomponents.de/de/fileadmin/user\\_upload/home/Datasheets/pe/spcmaqr.pdf](http://www.lasercomponents.de/de/fileadmin/user_upload/home/Datasheets/pe/spcmaqr.pdf) Stand: 20. April 2006)**

Der durchschnittliche Durchmesser der aktiven Fläche einer Diode liegt bei ca. 175  $\mu\text{m}$  und ist thermoelektrisch gekühlt und -temperaturkontrolliert. Der Arbeitsbereich der benutzten Photodiode kann von 50 Hz (Photonen pro Sekunde) Dunkelphotonenzählrate bis zu Sättigung von bis zu 15 MHz mit einer Totzeit von typischerweise 50 ns genutzt werden, wobei aufgrund von Nichtlinearitätseffekten der Totzeit, eine Zählrate von bis zu 200 kHz realistisch ist. Die Totzeit resultiert auf der aktiven Löschung (*engl.*: quenching) des Detektors nach einer von einem Photon ausgelösten Lawine. Das Ausgangssignal, ein 50  $\Omega$  TTL-Signal (*Abk. f.*: Transistor-Transistor-Logik) mit einer Breite von ca. 35 ns und einer Höhe von 2 V gilt als Photonensignal für die Messkarte.

Die APD wird im GEIGER Modus betrieben, das bedeutet, dass an der APD in Sperrichtung eine Sperrspannung (typischerweise: 20-40 V) angelegt wird. Die Sperrspannung ist diejenige Spannung die bei einer Diode in Sperrichtung anliegt. Ab einer

bestimmten charakteristischen Spannung kommt es zu einem Durchbruch und es fließt Strom in Sperrrichtung.

Trifft nun ein einzelnes Photon auf den Detektor wird ein Elektron aufgrund der hohen Feldstärke freigesetzt. Durch das hohe vorherrschende Feld beschleunigt das Elektron und löst so einen Lawineneffekt aus. Ein Vorwiderstand verhindert den Durchbruch der Diode und kann ermöglicht so eine Rückkehr in der Diode in den Ausgangszustand zurückkehren.

#### **C.1.4 Zeitkorreliertes Einzelphotonenzählen (TCSPC)**

Das zeitkorrelierte Zählen einzelner Photonen ist (*engl.*: time-correlated single photon counting, *Abk.*: TCSPC) eine empfindliche Technik um geringste Lichtsignale mit einer Auflösung von wenigen Pikosekunden in einer hohen zeitlichen Präzision aufzunehmen. Dabei werden bei einer gepulsten periodischen Anregungsquelle Photonen mit drei Informationen versehen und gespeichert. Die Messkarte arbeitet im inversen Modus. Der inverse Modus nutzt die Tatsache aus, dass nicht bei jedem Laserpuls ein Photon detektiert wird. Aufgrund dieser Wahrscheinlichkeit wird die Aufzeichnung des Photons durch das Auftreffen desselbigen ausgelöst und durch den nachfolgenden Laserpuls gestoppt, es wird invers gemessen. Trifft ein Photon auf den Detektor so sendet dieser ein TTL-Signal an die TCSPC-Karte aus. Das TTL-Signal wird mit einer Makrozeit versehen, die der Zeit seit dem Beginn der Messung entspricht. Zusätzlich löst das Signal einen Rampengenerator aus, der nach der Ankunft des nächsten Signals des Laserpulses gestoppt wird. Diese Spannung kann mittels eines Analog-Digital-Wandlers (*engl.*: analog to digital converter, *Abk.*: ADC) in eine Zeit, die Mikrozeit, umgerechnet werden, die in Abhängigkeit zum Messfenster des TAC steht. Je nach Kartentyp stehen bis zu 4096 Kanäle für die Mikrozeit zur Verfügung, die den Bereich des TAC abdecken. Als dritter Parameter fließt schließlich noch die Information des Kanals bzw. der APD ein, um eine eindeutige Zuordnung zum Detektor und seinem Meßsystem herzustellen.

Die Größe des TAC hat die Größe des Abstands zweier Laserpulse. Durch die Umwandlung mit Hilfe des ADC werden die Daten digitalisiert und in bis zu 4096 verschiedene Kanäle sortiert, die der Ankunftszeit des Photons relativ zum Laserpuls entspricht. Bei einer Repetitionsrate von 80 MHz und ADC-Auflösung von 4096 Kanälen bedeutet dies eine Kanalbreite und zeitliche Auflösung von 3 ps. Sammelt man die Mikrozeiten der einzelnen detektierten Photonen über einem gewählten Zeitraum in einem

Histogram, so erhält man eine Verteilung, die der Faltung des Laserpulses mit der exponentiellen Abklingkurve der Fluoreszenz entspricht.

Nach jedem angekommenen Signal eines aufgetroffenen Photons benötigt das System einige Zeit um die Information über die verschiedenen Prozesse, wie TAC und ADC zu verarbeiten und zu speichern. Innerhalb dieser Zeit kann die Messkarte keine neuen Signale verarbeiten. Man spricht hier von einer Totzeit.

Die TCSPC-Messkarte speichert die detektierte Fluoreszenz über einen Zwischenspeicher (FIFO Speicher, *engl.*: first-in first-out) als Strom einzelner Photonen in einem komprimierten, herstellereigenen Dateiformat (FIFO-Format) auf der Festplatte. Hierbei sind jedem Photon drei verschiedene Informationen zugeordnet: (i) die Makrozeit, (ii) die Mikrozeit und (iii) der Detektionskanal. Zur Auswertung der Daten müssen die Informationen aus diesem Rohdaten-Format extrahiert werden.

Für die Messungen wurden die Karten SPC-630 und SPC-132 (*beide* Becker&Hickl GmbH, Deutschland) verwendet. Die Weiterentwicklung der SPC-630, die SPC-132, besteht aus zwei von einander getrennten Messkarten. Jede Messkarte wird mit nur einem Detektor verbunden. Im Gegensatz zur SPC-630, die durch die Verwendung eines Routers nur jeweils das jeweils innerhalb der Verarbeitungszeit nur das erste ankommende Photon verwerten kann, führt dies zu einer Verbesserung der Signalausbeute. Diese so genannte Totzeit, die Zeit in der ein Signal verarbeitet wird und die Messkarte keine weiteren Signale verarbeiten kann, ist bei der Einzelkarte der SPC-132 um einige Nanosekunden geringer, als die der SPC-630.

Für die Synchronisation der gesamten Anlage steht ein analoges Ausgabegerät zur Verfügung. Diese 8-Kanal, 12-bit Analogkarte (NI-PCI-6713, National Instruments, USA) kann bis zu 1 MHz Signal auf einen geschirmten Anschlussblock ausgeben. In dem Aufbau wurde sie dazu benutzt, TTL-Signale (Anstieg der Spannung von Null auf fünf Volt bzw. umgekehrt) oder Rampensignale auszugeben, um die Geräte extern zu starten bzw. zu stoppen. Für die Ansteuerung der beiden SPC-130 Karten (SPC-132) war es notwendig, das TTL-Signal in seiner Flankensteilheit zu schärfen, da es ansonsten auf Grund unterschiedlicher Erkennungsparameter zu einem ungleichen Auslösezeitpunkt gekommen wäre. Mit Hilfe eines elektronischen Bauteils, der TTL-SCHMIDT-Trigger-Schaltung, konnte der Flankenanstieg des Signals auf 1,6 ns geschärft werden.

## C.2 EINZELMOLEKÜLSPEKTROSKOPIE

### C.2.1 Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer wurde die Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (Abk.: TCSPC) angewandt. (siehe C.1.4) In der Theorie geht man idealisierend von einer Anregung durch einen  $\delta$ -Puls aus, in der Praxis hat dieser jedoch eine nicht vernachlässigbare Breite, was zu einer Verlängerung der gemessenen Lebensdauer der angeregten Zustände führt. Die eigentliche Fluoreszenzantwort  $F(t)$  ist mit dem zeitlichen Profil der Anregungslichtquelle  $L(t)$  gefaltet und ergibt so die gemessene Abklingkurve  $R(t)$ :

$$R(t) = \int L(t^*) \bullet F(t - t^*) dt^* \quad \text{Formel 35}$$

Zur Berechnung der tatsächlichen Lebensdauer muss die Fluoreszenzabklingkurve  $R(t)$  entfaltet werden. Dies geschieht durch Abschätzen der Parameter  $\alpha_i$  und  $\tau_i$ . Das Faltungsintegral  $R_c(t)$  wird für die vorgegebenen Parameter berechnet und das Ergebnis mit der gemessenen Abklingkurve  $R(t)$  verglichen. Die Parameter werden solange variiert und das entsprechende Faltungsintegral neu berechnet, bis die Abweichung ein Minimum erreicht hat.

$$R_c(t) = \int_0^t L(t^*) \bullet \left[ \sum_i \alpha_i e^{-\frac{(t-t^*)}{\tau_i}} \right] dt^* \quad \text{Formel 36}$$

Die Bestimmung der besten Ausgleichskurve erfolgt nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate ( $\chi^2$ )

$$\chi^2 = \sum_i \omega_i [R_i(t) - R_c(t)]^2 \quad \text{mit} \quad \omega_i = \frac{1}{R_i(t)} \quad \text{Formel 37}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  der mit dem TCSPC-Verfahren bestimmten Fluoreszenzzerfälle wird mit dem Maximum-Likelihood-Schätzer bestimmt.<sup>60,61</sup>:

$$\frac{\omega}{e^{-\frac{\omega}{\tau}} - 1} - \frac{k\omega}{e^{\frac{k\omega}{\tau}}} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \omega}{\sum_{i=1}^k n} \quad \text{Formel 38}$$

wobei  $\omega$  die Breite des Zeitkanals,  $k$  ihre Anzahl,  $n$  die Zahl der betrachteten Photonen und  $n_i$  die Zahl der Photonen im Zeitkanal  $i$  sind. Diese Gleichung kann zum Beispiel mit dem NEWTON-Verfahren numerisch gelöst werden.

### **C.3 DATENAKQUISITION UND –AUSWERTUNG**

Sowohl die Datenakquisition als auch die Datenauswertung wurden mit Hilfe der graphischen Programmiersprache LabVIEW<sup>®</sup> (LabVIEW<sup>®</sup> 6.0, sowie 7.1; National Instruments Corp., USA) geschrieben. Kompliziertere und rechenzeitaufwendigere Routinen wurden in C programmiert und über so genannte Schnittstellen im Code (*engl.*: Code Interface Nodes) in LabVIEW<sup>®</sup> eingebunden.

#### **C.3.1 Datenakquisition**

Die Datenakquisition erfolgt über die in LabVIEW<sup>®</sup> geschriebenen Programme DAQLinescan und DAQFIFO<sup>62</sup>. Diese Programme bilden das koordinierende Zwischenglied zwischen den einzelnen Mikroskopkomponenten und dem Computer. Über diese lassen sich die verschiedenen piezogesteuerten und spindelbetriebenen Verfahrtsche, ggf. ein elektrooptischer Modulator (*engl.*: electro-optical modulator, *Abk.*: EOM) und die verschiedenen TCSPC-Messkarten ansteuern. Die bei der Aufnahme erzeugten Daten der Messkarte werden in dem oben beschriebenen FIFO-Modus (beim Abtasten bzw. Scannen) Zeile für Zeile oder bei Lösungsmessungen in einer Datei gespeichert.

Die Datenakquisition im Abtast- oder Scanbetrieb erfolgte durch eine Zeile hindurch kontinuierlich. Durch einen bestimmten Versatz des piezogesteuerten Scantisches, welcher sich aus der Verweildauer in einem Bildpunkt und der Schrittweite zwischen zwei Bildpunkten zusammensetzt, lassen sich die Daten in der Analyse wieder auf die Position zurückrechnen, von der sie stammen. Dadurch entsteht später in der Analyse ein vollständiges Bild.

Die Fahrtische werden unidirektional betrieben, das heißt am Ende jeder Zeile fährt der Tisch zum Ausgangspunkt der Zeile zurück und versetzt sich um eine Zeilenbreite, um hier die nächste Zeile abzuscannen. Durch den unidirektionalen Betrieb des Scantisches wird eine Hysterese vermieden und führt zu einer präziseren Abtastung der Probe. Dies hat ebenfalls zur Folge, dass die Dauer der Aufnahme sich um mehr als das Doppelte verlängert.

#### **C.3.2 Datenauswertung**

Die Datenauswertung erfolgte über die in LabVIEW<sup>®</sup> geschriebenen Programme Anna\_linescan und dem DatascreenerDbl. Die graphische Programmiersprache LabVIEW<sup>®</sup> bietet die Möglichkeit



Hier wurden verschieden Auswertetechniken, wie Lebensdauerbestimmung aus Fluoreszenzabklingkurven<sup>63</sup>, Koinzidenzanalyse<sup>64</sup> zusammengefasst. Ebenfalls wurde die bildpunktbezogene Korrelation implementiert.

Eine Übersicht der Funktionen des Programms ist in Tabelle 3 dargestellt. Nach der Header-Datei, die verschiedene Einstellungen der Messung gespeichert hat, werden die FIFO-Daten eingelesen und interpretiert. Die Interpretation der Daten erfolgte hier separiert nach den verschiedenen Datenformaten, wie sie die entsprechende Messkarte gespeichert hatte. Die so erhaltenen Daten wurden zunächst für die Erstellung eines Intensitätsbildes genutzt. An dieser Stelle hatte der Benutzer die Möglichkeit, zwischen den verschiedenen Formen der Bildanalyse, oder auch der Analyse eines selektierten Bereiches, zu wählen. Während die Information über einen selektierten Bereich aufgerechnet wurde, stellte die Bildanalyse eine punktweise Untersuchung der Daten mit den Methoden dar. In der letzten Version des Programms konnten Analysen über die spektrale Verteilung, die Fluoreszenzlebensdauer, die bildgebende Diffusionsmikroskopie, sowie eine Koinzidenzanalyse durchgeführt werden. Nach der Bearbeitung konnten die Daten entweder in einem Bildformat, als auch in ASCII-Format zur Weiterverarbeitung gespeichert werden.

<b>Daten Import</b>	<i>Einlesen der Datenheader vom Typ .hdr, .hd2 und .txt</i>	
	<i>Einlesen und Interpretation der FIFO-Rohdaten</i>	Format SPC-630 (.fifo, .ifif, .spc) Format SPC-830 (.fifo, spc) Format SPC-132 (.fifo, spc)
	<b>Bilddarstellung</b>	<i>Erzeugung eines Intensitätsbildes</i>
	<i>Darstellung in</i>	RGB-Skalierung Falschfarbencodierung
<b>Bildanalyse</b>	<i>Bildanalyse von selektierten Bereichen oder des ganzen Bildes</i>	spektrale Verteilung Fluoreszenzlebensdauerbestimmung Parametrisiert bildgebende Diffusionsmikroskopie Parametrisiert Koinzidenz Analyse
	<b>Export</b>	<i>Export von</i>
		Bildern in verschiedene Formate Daten in ASCII-Text zur Weiterverarbeitung

**Tabelle 3: Übersicht über die einzelnen Funktionen des Auswerteprogramms Anna\_linescan zur Analyse von Scandaten.**

## C.4 BERECHNUNG DER KORRELATIONEN

Für die Kombination von SFLIM mit FCS ist die Korrelation der Daten von entscheidender rechenzeitlicher Bedeutung. Im Folgenden sind die zwei gängigsten und ein neuer Algorithmus, die für die Korrelation interessant sind aufgeführt.

### C.4.1 Schnelle FOURIER Transformation (FFT)

Eine der üblichen Methoden Korrelationen zu erstellen ist die Variante über die FOURIER-Transformation. Rechentechnisch wird die Korrelation über die inverse FOURIER-Transformation des Leistungsspektrums ermittelt. Das Leistungsspektrum baut auf den FOURIERSpektren des Fluoreszenzsignals  $F(f)$  auf und berechnet sich wie folgt

$$S_F(f) = F(f)^* \cdot F(f) = |F(f)|^2. \quad \text{Formel 39}$$

Durch anschließende FOURIER-Rücktransformation des Leistungsspektrums erhält man die Autokorrelation  $R_F(\tau)$  des Fluoreszenzsignals  $F(t)$ .

$$R_F(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} S_F(f) \cdot e^{2\pi i f \tau} df \quad \text{Formel 40}$$

Im Zeitalter modernster Computertechnik ist es wichtig die immer größer werdenden Datenmengen immer schneller zu verarbeiten. Bei der Problemstellung der FOURIER-Transformation haben COOLEY und TUKEY den Algorithmus der schnellen FOURIER-Transformation<sup>65</sup> (engl.: *Fast FOURIER-Transformation*, Abk.: FFT) entwickelt. Die schnelle FOURIER-Transformation ist ein Algorithmus der diskreten FOURIER-Transformation. Sie reduziert die Anzahl der Berechnungen für  $N$  Punkte, wobei  $\log_2 N$  ganzzahlig sein soll, von  $2N^2$  auf  $2N \log_2 N$ .

Die Grundidee hinter der schnellen FOURIER-Transformation ist die diskrete FOURIER-Transformation der Länge  $N$  gleich der Summe der beiden diskreten FOURIER-Transformationen der jeweiligen Länge  $N/2$  ist.

$$\begin{aligned} F_k &= \sum_{j=0}^{N-1} e^{2\pi i j k / N} f_j \\ &= \sum_{j=0}^{N/2-1} e^{2\pi i (2j) k / N} f_{2j} + \sum_{j=0}^{N/2-1} e^{2\pi i (2j+1) k / N} f_{(2j+1)} \\ &= \sum_{j=0}^{N/2-1} e^{2\pi i (2j) k / N} f_{2j} + e^{2\pi i k / N} \sum_{j=0}^{N/2-1} e^{2\pi i (2j) k / N} f_{(2j+1)} \end{aligned} \quad \text{Formel 41}$$

Diese Methode ist für größere Datenmengen sehr gut geeignet. Der Nachteil an dieser Methode ist die enorme Datenmenge, die durch die lineare Verteilung der Verzögerungszeiten zustande kommt. So passiert es schnell, dass zu so einer Korrelation über 10'000 Datenpunkte gehören (bei Korrelationszeiten von 10  $\mu$ s bis 100 ms). Für den LEVENBERG-MARQUARDT-Algorithmus, mit welchem die Ausgleichsgerade an die Daten angepasst wurde, bedeutet dies sehr viel Rechenzeit und enorme Speicherbelegung.

#### C.4.2 „bin and correlate“

Eine weitere Variante ist die „Fußweg“-Methode „bin and correlate“, bei der die Datenspur in ein zeitliches Histogramm mit der Schrittweite der kleinsten gewünschten Verzögerungszeit  $\tau$  überführt wird. Um die anfallende Datenmenge klein zu halten, kann man die Korrelation in quasi-logarithmischen Schritten durchführen. Die Modelfunktion für die Diffusion in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zeigt für große Verzögerungszeiten immer ein asymptotisches Verhalten gegen den Korrelationswert 0. Durch die Verwendung von Datenpunkten im quasi-logarithmischen Abstands muss ein Fehler für die angegebenen Datenpunkte angegeben werden, die die Gewichtung, oder anders die Verlässlichkeit des Datenpunktes widerspiegeln. Um eine Standardabweichung für die Korrelation zu erhalten wird zunächst die gesamte Zeitspur in Segmente gleicher zeitlicher Länge geteilt. Durch Anwendung der Korrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad \text{Formel 42}$$

mit quasi-logarithmischen Schritten auf jedes Segment, lässt sich dann die durchschnittliche Korrelationskurve bestimmen und mit ihrer Hilfe dann auch die Standardabweichungen.<sup>66,67,68</sup>

$$G(\tau) = \frac{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta F_i(t) \cdot \delta F_i(t + \tau)}{\left( \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N F_i(t) \right)^2} \quad \text{Formel 43}$$

$$\sigma(\tau) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (G_i(\tau) - G(\tau))^2}{N - 1}} \quad \text{Formel 44}$$

Mit Hilfe dieser Standardabweichung ist es möglich, den LEVENBERG – MARQUARDT Algorithmus zur nicht-linearen Abschätzung der kleinsten Fehlerquadrate zu benutzen. Die

Anpassung der Datenpunkt der Korrelation und deren Standardabweichung an die Modellfunktion (*siehe* Formel 32) erfolgt numerisch.

Mittels des  $\chi^2$  (*siehe* Formel 45) lässt sich eine Aussage über die Güte der Ausgleichskurve formulieren. Dabei ist ein typischer Wert für eine gute Anpassung  $\chi^2 \approx N - M$ , wobei  $N$  die Anzahl der Datenpunkte und  $M$  die Anzahl der Freiheitsgrade (Parameter) darstellt. Ist das  $\chi^2$  deutlich kleiner als  $N - M$ , so wurden die Fehler zu konservativ gewählt und überbewertet. Ist  $\chi^2$  deutlich größer als  $N - M$ , so wurden entweder die Fehler zu klein angenommen oder das Model war falsch. Das  $\chi^2$  setzt sich zusammen aus den Werten der Datenpunkte, der Ausgleichgeraden und den Werten der jeweiligen Standardabweichung für den Datenpunkt:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(y_i - y(a_1; \dots; a_M))^2}{\sigma_i^2} \quad \text{Formel 45}$$

Zur Vereinfachung kann man  $\chi^2$  durch  $N - M$  teilen und erhält so einen allgemeinverständlichen Wert Eins für eine gute Anpassung.

### C.4.3 Bildgebende Diffusionsanalyse

Für die bildgebende Diffusionsanalyse können zwei Verfahren angewandt werden:

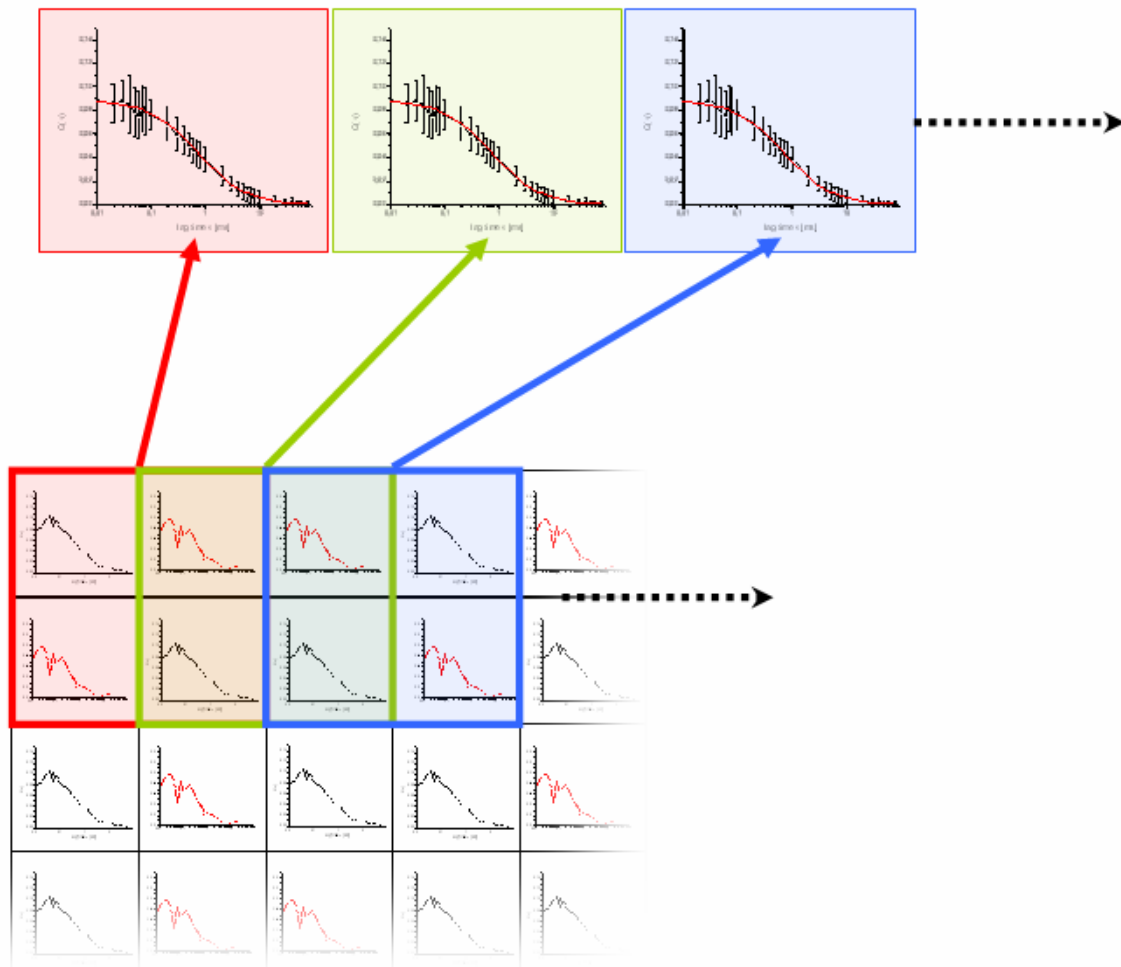
- Bildpunktweise Korrelation der Bildpunkte
- Zusammenfassen von  $x$ ,  $y$  Bildpunkten zu einem Bildpunkt und anschließender Darstellung
- in einem Bildpunkt (*Datenverringering*)
- in einem Bildpunkt und anschließender Wiederverwendung der Daten (*Glättung, siehe auch* Abbildung 14)

Im Folgenden wird auf die verschiedenen Methoden einzeln eingegangen.

Die *Bildpunktweise Korrelation* der Daten hat den Vorteil, dass die Bildauflösung nicht herabgesetzt wird. Allerdings muss durch den Korrelationsansatz „bin and correlate“ die Datenspur, die aus einem Bildpunkt erhalten wird, in mehrere Teile unterteilt, korreliert und gemittelt werden um die Information über den Fehler der Korrelation zu bestimmen. Anschließend werden die Daten bildpunktweise an die Modellfunktion angepasst und nach Parametern getrennt dargestellt.

Bei der *Datenverringering*smethode werden Bildpunkte zusammengefasst. Die innerhalb eines Bildpunktes erhaltenen Photonen werden korreliert. So erhält jeder Bildpunkt

seine eigene Korrelation. Durch eine vorzugsweise quadratische Zusammenfassung der korrelierten Bildpunkte, die zwar zu einer Verkleinerung der Bildauflösung führt, jedoch nicht zu einer Verzerrung, kann eine mittlere Korrelationsfunktion wie in C.4.2 beschrieben erhalten werden. Dieses kann an das erwartete oder erwünschte Model angepasst werden. Die erhaltenen Parameter können schließlich getrennt dargestellt werden. Schon verwertete Bildpunkte werden nicht für weitere Korrelationen verwendet.



**Abbildung 14:** Schematische Darstellung der glättenden Bildanalyse. **Rot:** Jeweils die Korrelationen der vier benachbarten Bildpunkte werden zu einer Korrelationsfunktion zusammengefasst und an die Modellfunktion angeglichen und ergeben so farbkodiert eine Diffusionszeit. **Grün und blau:** Das Muster bewegt sich nur einen Bildpunkt weiter und verfährt wie oben beschrieben.

Bei der Methode der *glättenden* Diffusionsanalyse, eine Abwandlung der Datenverringermethode, wird eine Maske (*skizziert in* Abbildung 14) Bildpunkt für Bildpunkt und anschließend zusätzlich Zeile für Zeile über das Bild gefahren und die beinhaltenden Bildpunkte zu einer gemittelten Korrelation zusammengefasst. Dabei kommt es

zu einer Glättung über das Bild. Die Bildgröße von anfangs  $x \cdot y$  Bildpunkten verringert sich zu  $(x - P_x + 1) \cdot (y - P_y + 1)$  Bildpunkten wobei  $P_x$  und  $P_y$  die Größe der Maske angeben.

## **C.5 STANDARDLABORGERÄTE**

### **C.5.1 Absorptionsspektrometer**

Alle UV/Vis-Spektren wurden auf einem Cary 500 Scan Spektrometer (Varian, Deutschland) in Quarzglas-Halbmikroküvetten (Suprasil) und Quarzglasküvetten (Hellma, Deutschland) aufgenommen.

### **C.5.2 Fluoreszenzspektrometer**

Die Fluoreszenzemissionsspektren und Fluoreszenzanregungsspektren wurden mit einem Cary Eclipse (Varian, Deutschland) in Quarzglas-Halbmikroküvetten (Suprasil) und Quarzglasküvetten (Helma, Deutschland) aufgenommen.

## **C.6 FARBSTOFFE**

Die gängigsten Fluorophore kann man in drei Strukturklassen einteilen: Carbocyanine, Rhodamine und Oxazine. In den durchgeführten Versuchen wurden zwei Rhodaminderivate (Tetramethylrhodamin und ATTO488), sowie Fluorescein verwendet. Für ein Zellexperiment wurden Halbleiterkristalle verwendet.

### **C.6.1 Tetramethylrhodamin**

Das Tetramethylrhodamin ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem Rhodamin-Grundgerüst. Sein molarer Absorptionskoeffizient liegt beim Absorptionsmaximum von 560 nm bei  $95'000 \text{ l/mol cm}$ . Das Emissionsmaximum liegt bei 582 nm. Die Quantenausbeute des Rhodaminderivats liegt bei 90%.

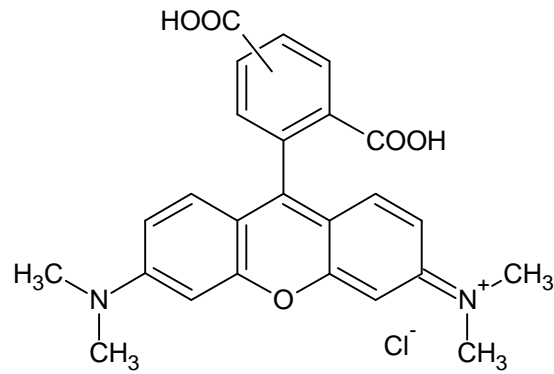


Abbildung 15: Strukturformel von Tetramethylrhodamin.

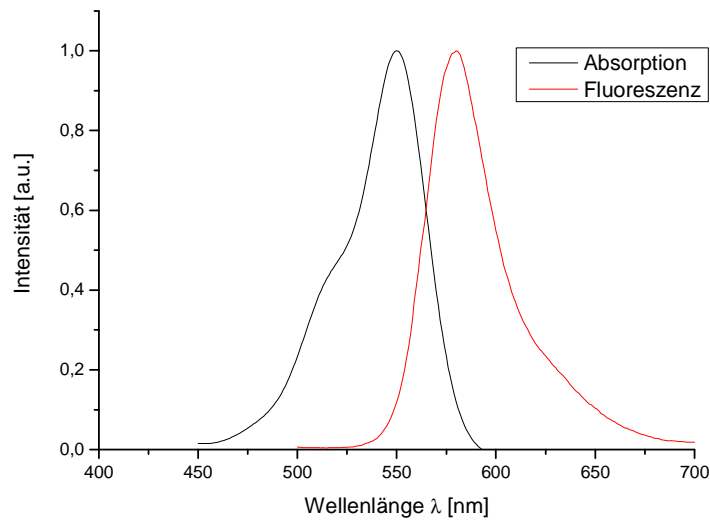


Abbildung 16: Absorption- (*schwarz*) und Emissionsspektren (*rot*) von Tetramethylrhodamin.

## C.6.2 ATTO488

Der Farbstoff ATTO488 (Atto-Tec GmbH, Deutschland) ist ein neuer, hydrophiler und kommerziell erhältlicher Farbstoff, der im blauen Wellenlängenbereich angeregt werden kann. Das Absorptionsmaximum bei 500 nm hat einen Absorptionskoeffizienten von  $90'000 \text{ l/mol cm}$ . In Wasser hat der Farbstoff eine Quantenausbeute von 82% und eine Lebensdauer von 3,2 ns. Das Emissionsmaximum liegt bei 523 nm.

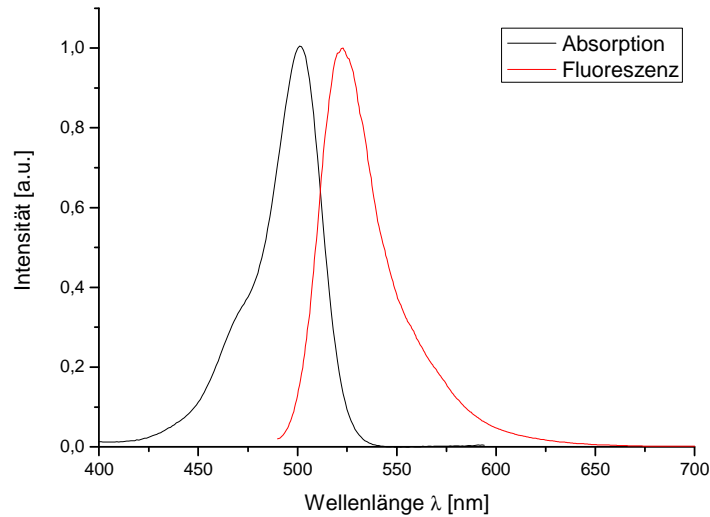


Abbildung 17: Absorption- (*schwarz*) und Emissionsspektrum (*rot*) von ATTO488.

### C.6.3 Fluorescein

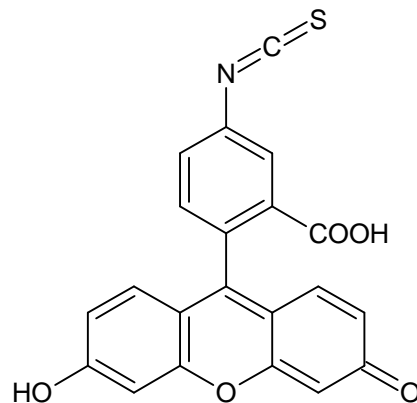
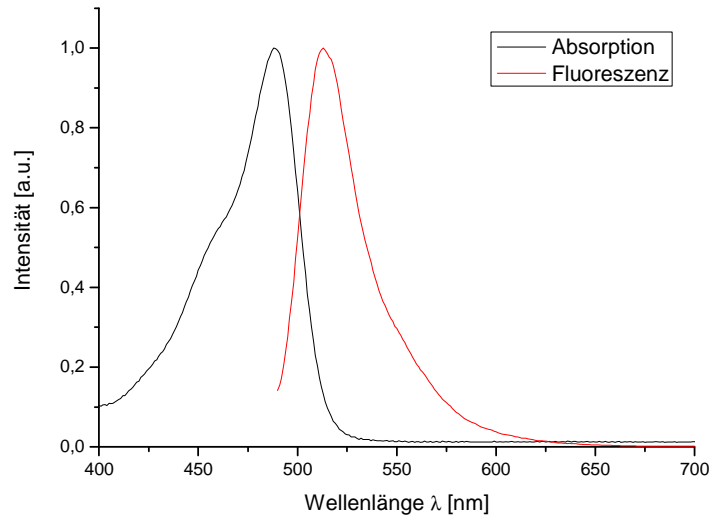


Abbildung 18: Strukturformel von Fluoresceinisothiocyanat

Fluorescein, der wohl bekannteste und billigste Fluoreszenzfarbstoff, besitzt eine starke Fluoreszenz, die jedoch aufgrund der geringen Photostabilität sehr schnell abnimmt.<sup>69</sup> Der 1871 von VON BAEYER entdeckte Farbstoff besitzt eine Quantenausbeute von 93%. Seine pH-Abhängigkeit beeinflusst auch seine spektroskopischen Eigenschaften. Um den  $pK_a$ -Wert von 6,4 zeigen Absorption und Emission unterschiedliche Spektren.



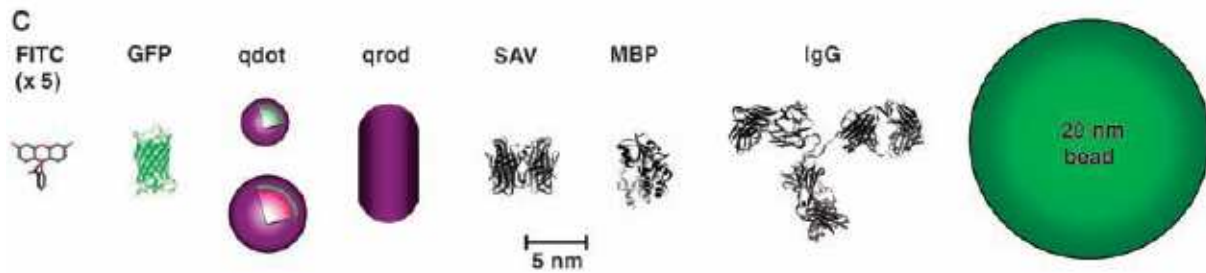


**Abbildung 19: Absorption- (schwarz) und Emissionsspektrum (rot) von Fluorescein.**

Fluorescein findet heutzutage selbst einen Einsatz in der Medizin, wo er intravenös in die Blutbahn gespritzt wird und einige Krankheiten die sich auf der Retina befinden sichtbar macht.

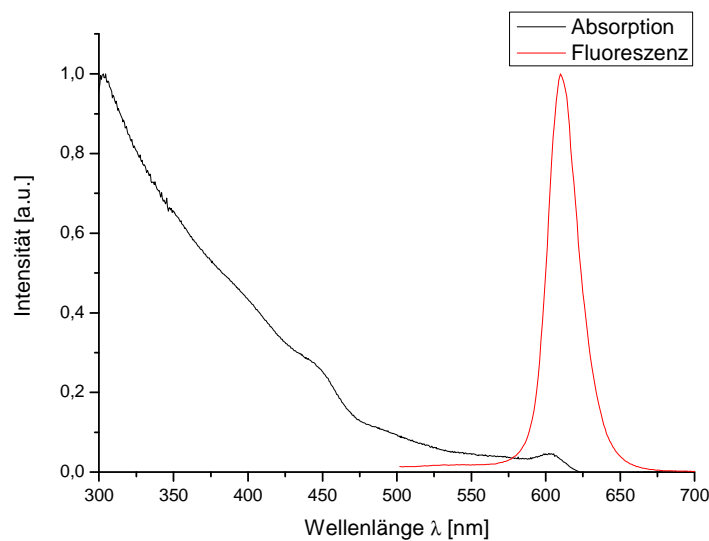
#### C.6.4 Halbleiternanoteilchen

In der modernen fluoreszenzbasierten Analytik von Zellen und Zellsystemen werden vermehrt fluoreszierende Nanokristalle eingesetzt. Biofunktionalisiert an Antikörpern oder mit Streptavidin besetzter Oberfläche stehen sie vielfältigen Anwendungen in der Biologie zur Verfügung. Über ihre Größe und Zusammensetzung lassen sich die Halbleiternanoteilchen (*auch*: Quantenpunkte oder *engl.* quantum dots genannt) in ihrer Emissionswellenlänge steuern. Je größer der Halbleiterkristall ist, desto längerwelliger ist die Emission, entsprechend dem „Teilchen im Kasten“-Prinzip. Die Anregung erfolgt über eine breite Absorptionsbande mit steigendem Absorptionskoeffizienten zu kürzeren Wellenlängen.<sup>70</sup> Dies wird ausgenutzt zur gleichzeitigen Anregung verschieden farbig emittierender Nanoteilchen.<sup>71,72</sup> Nanoteilchen kamen auch schon zum Einsatz in Zellen in denen man die Diffusion der Nanoteilchen über einen längeren Zeitraum beobachtete.<sup>73</sup>



**Abbildung 20: Größenvergleich zwischen organischen Farbstoffmolekülen über GFP, Halbleiternanokristallen bis zu Kügelchen. (Bild aus Referenz 73).**

Nanoteilchen befinden sich in einem Zwischengebiet zwischen atomaren Eigenschaften und typischen Festkörpereigenschaften. Nanoteilchen sind aus Halbleitermaterialien wie CdSe und CdS hergestellt und sind in etwa so groß wie die Ausdehnung eines Excitons im Makrokristall. Durch den Größenquantisierungseffekt liegen HOMO und LUMO des Nanoteilchens nah beieinander und können durch Einstrahlung eines Photons, z.B. aus dem UV-Bereich, ein Elektron-Lochpaar erzeugen. Im Nanoteilchen sind die Energieniveaus immer noch diskret getrennt während der Festkörper Valenz- und Leitungsbänder besitzt.<sup>74</sup>



**Abbildung 21: Absorption- (schwarz) und das schmale Emissionsspektrum (rot) von QDot605®.**

Zusätzlich zu diesen Eigenschaften besitzen die Nanokristalle gegenüber den organischen Fluoreszenzfarbstoffen eine deutlich höhere Photostabilität, was zu einer deutlich längeren Beobachtung des Experiments führt. Dies und die schon erwähnte gleichzeitige Anregung mit einer Wellenlänge verschiedener Nanokristalle im UV-Bereich machen die Nanokristalle zu einer Alternative in der biologischen Forschung.

## C.7 ZELLKULTUR

### C.7.1 Zellkultur zur Peptiduntersuchung

Für die Untersuchungen an den  $\beta$ -Peptiden wurden HeLa-Zellen (DSMZ, Deutschland) verwendet. Diese menschlichen Epithelzellen entstammen aus einem zerivaklen Krebsbefall einer Amerikanerin der ihr 1951 entfernt wurde. Man stellte im Labor fest, dass man diese Zellen kultivieren konnte und man begann sie zu vervielfältigen. Heute ist diese Zelllinie zwar nicht mehr mit dem ursprünglichen Zelltyp vergleichbar, aber immer noch ein beliebte Zelllinie in den Laboren.<sup>75</sup>

Die Zellen wurden in phenolrotfreiem Dulbecco's modified Eagle medium (*Abk.*: DMEM, Biochrom AG, Deutschland) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (*engl.*: fetal calf serum, *Abk.*: FCS, Biochrom AG, Deutschland) kultiviert. Präventiv wurde dem Medium eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin (Biochrom AG, Deutschland) beigegeben, um gegen Bakterien und Pilze vorzubeugen.

Vor dem Erreichen der Konfluenz (Bedeckung der Kulturfläche von 80-90%) wurden die Zellen passagiert. Die hier angewandte Methode der Subkultivierung ist wohl die meist verbreitete. Hierzu wurde zuerst das alte Medium entfernt und zweimal mit einer warmen PBS-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) gewaschen um mögliche Trypsin-Inhibitoren aus der Kultur zu entfernen. Die Ablösung der Zellen aus den T-75 Gewebekulturflaschen (Greiner, Deutschland) erfolgte proteolytisch mit 3 ml erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%, Biochrom AG, Deutschland). Trypsin spaltet die Peptidketten vorzugsweise zwischen Arginin und Lysin und löst somit nicht nur die Ankerproteine, sondern kann auch bei zu langer Einwirkung irreversible Schäden der Zelle durch Zerstörung von Membranrezeptoren führen. EDTA (*Abk.*: Ethylendiamintetraacetat) ein Komplexbildner wird zur Entfernung von für die Bindung stabilisierend wirkenden Calciumionen verwendet.

### C.7.2 Zellinkubation ( $\beta$ -Peptide)

Während des Subkultivierens der Zellen wurde auch ein kleiner Teil zur Kultivierung in 8-Kammerdeckgläschen (LabTek<sup>®</sup>, Nunc Deutschland) mit 200  $\mu$ l phenolrotfreiem DMEM-FCS-Nährlösung angesetzt. Diese Kammerdeckgläschen haben ein Borsilikat-Deckglas welches die Beobachtungen der Zellen mit einem inversen Mikroskop ermöglicht. Zur Inkubation mit den Peptiden wurden diese vorher mit einem Tag alten Medium gemischt

um schon eine optimale Verteilung der Peptide in der Lösung zu haben. Einen Tag altes Medium beinhaltet auch schon wieder Wachstumsfaktoren, die die Zelle während der Kultivierung benötigt und nicht in frischem Medium vorhanden ist. Durch die Verwendung von ein Tage altem Medium wird der Stress der Zelle minimiert, welches im Zusammenhang mit ungewünschter Autofluoreszenz steht.

### **C.7.3 Zellkultur zur Diffusionsmessung**

Für die bildgebenden Diffusionsmessungen (DIM) wurden NIH-3T3 Zellen (DSMZ, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden in phenolrotfreiem Dulbecco's modified Eagle medium (*Abk.*: DMEM) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (*engl.*: fetal calf serum, *Abk.*: FCS, beides Biochrom AG, Deutschland) kultiviert. Die Zellen wurden in T-75 Gewebekulturflaschen in einer Atmosphäre mit 5% Kohlendioxidgehalt bei 37°C gehalten. Alle drei bis vier Tage wurden die subkonfluenten Zellen unter Verwendung von 3 ml Trypsin (0,05%/0,02%, Biochrom AG, Deutschland) abgelöst und passagiert.

Zur Verwendung in den Experimenten wurden die Zellen in LabTek®-Kammern (Nunc, Deutschland) gesetzt, wo sie nach Adhärenz an der Oberfläche zur Inkubation bereit waren. Bei der Inkubation der Zellen wurde das vorhandene Medium entfernt und durch einen Tag altes Medium mit definiertem Volumen ersetzt. Der Lösung war noch farbstoffmarkierte einsträngige DNA beigemischt. Als Farbstoff für die Diffusionsexperimente diente ATTO488 (Atto-Tec GmbH, Deutschland).

## **C.8 UNTERSUCHUNGEN DER $\beta$ -PEPTIDE**

### **C.8.1 Die Mikroskopie**

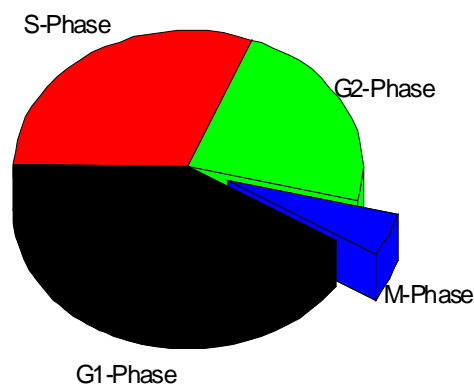
Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmikroskopen aufgenommen. Zum einen mit einem gewöhnlichen inversen und epiilluminierten Fluoreszenzmikroskop mit einem 60fach Ölimmersionsobjektiv. (Nikon TE300 Eclipse; Nikon, Japan) Als Anregungsquelle diente eine 100 W Quecksilberdampf Lampe. Das weiße Licht der Lampe wurde über einen Anregungsfilter HQ 480/40 auf einen Strahlteiler Q 505 LP gelenkt, der das aufgereinigte Licht über das Mikroskop auf die Probe lenkte. Das über das Objektiv gesammelte Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe eines Emissionsfilters HQ 560/80 aufgereinigt und auf eine Kamera abgebildet. Zur Aufnahme stand eine CCD-Kamera (Imager3, LaVision,

Deutschland) zur Verfügung. Mit Hilfe der dazugehörigen Software konnten die Bilder aufgenommen und anschließend noch bearbeitet werden.

Das zweite Mikroskop, ein konfokales, inverses Laserscanningmikroskop LSM (Carl Zeiss AG, Deutschland), war mit verschiedenen Laserquellen ausgerüstet, wobei nur zwei Laserlinien 488 nm und 568 nm des Argon-Ionen zum Einsatz kamen. Die Laser wurden im Dauerstrichmodus betrieben. Das Mikroskop stellte die Arbeitsgruppe Spatz freundlicherweise zur Verfügung.

### C.8.2 Determinierung des Zellzyklus mit PCNA

Während des Zellzyklus befinden sich die Zellen die meiste Zeit in den beiden Wachstumsphasen (G1 und G2, *siehe* Abbildung 22). Nur während der kurzen M-Phase sind die Nukleoli aufgelöst und die eigentliche Zellteilung findet statt. Hierbei kommt es zur Centriolenbildung an entgegengesetzten Polen der Zelle (*Prophase*), zur Spindelbildung (*Prometaphase*), zur Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle (*Metaphase*), zur Chromosomentrennung (*Anaphase*) und zur abschließenden Zellkern- und Zellteilung (*Telophase*). Nach dem Austritt aus der Zellteilung und dem Eintritt in die erste Wachstumsphase G1 bilden sich die Nukleoli wieder aus.



**Abbildung 22: Diagramm der Dauer der einzelnen Zellzyklen. Ablauf im Uhrzeigersinn. Diese Werte sind ungefähre Werte einer humanen Tumorzelle. Ein kompletter Zellzyklus dauert je nach Zellsorte ca. 19-24 h.**

Für die Untersuchung des Zellzyklus einer Zelle stehen drei entscheidende Möglichkeiten zur Verfügung. Die erste Methode ist die Beeinflussung des Zellzyklus durch Chemikalien, die z.B. die Zellteilung aktivieren und somit alle Zellen in einen Takt bringen.

Kritiker dieser Methode sehen Nachteile in der Nativität der Zellen. Die Möglichkeit besteht, dass die Zellen durch die Chemikalien stark beeinflusst werden und so andere Reaktionen, z.B. die Aufnahme von Proteinen, zeigen als natürliche, unbeeinflusste Zellen. Die zwei anderen Methoden sind optische Differenzierungen. Zum einen gibt es die Möglichkeit den Zellzyklus durch zellzyklusmarkierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. DAPI, zu identifizieren. Diese Methode unterliegt denselben Nachteilen wie den taktgebenden Chemikalien. Die letzte und verwendete Methode ist die Differenzierung der Zellen durch die Beobachtung eines exprimierten Reporter-Protagonist-Konstrukts. Der Protagonist ist dabei ein natives Protein, welches von den Zellen zellzyklusabhängig produziert wird oder zellzyklusabhängige Muster in der Zelle zeigt. Das verwendete PCNA-Protein (*engl.*: proliferating cell nuclear antigen) gehört zu dieser Kategorie.

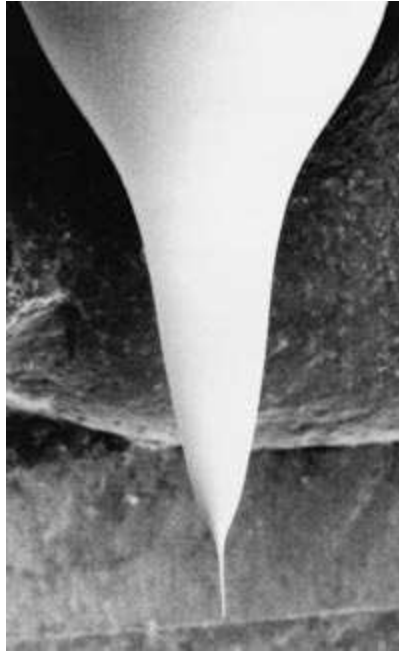
PCNA spielt eine entscheidende Rolle in der Entscheidung über Leben oder Tod einer Zelle. Das PCNA Gen wird von p53 induziert während es wiederum mit p53-kontrollierenden Proteinen interagiert. Wenn viel PCNA in Abwesenheit von p53 in der Zelle vorherrscht wird die DNA-Replikation eingeleitet. Ist hingegen viel PCNA und p53 in der Zelle vorhanden beginnt die Reparatur der DNA. Liegt in der Zelle wenig PCNA vor, tritt die Apoptose, der programmierte Zelltod, ein. Während der Evolution von den Prokaryoten zu den Eukaryoten unterlag die Funktion von PCNA einem Wandel von einem Nebenprotein der DNA-Replikation zum zellbeeinflussenden Kontrollprotein.<sup>76</sup>

Während der S-Phase vervielfältigt die Zelle mit Hilfe der Replikationszentren ihre DNA. Mit Hilfe eines PCNA-RFP-Konstrukts (*engl.*: red fluorescent protein), welches ausschließlich im Zellkern exprimiert wurde, kann man den Zellzyklus, speziell die S-Phase determinieren. Während der S-Phase, der DNA-Vervielfältigung, und bei der Reparatur der DNA bindet PCNA an die Replikationszentren, die Polymerase.<sup>77</sup>

## ***C.9 DIM VORUNTERSUCHUNGEN***

### **C.9.1 Mikrokapillare und Mikrokapillarenpuffer**

In den ersten Messungen zur DIM wurde eine Mikrokapillare (Femtotip<sup>®</sup>, Eppendorf, Deutschland) in eine Lösung mit Tetramethylrhodamin-markierten Oligonukleotiden (Abbildung 15) getaucht. Diese Mikrokapillaren werden unter anderem in der Biologie eingesetzt um schnell und präzise Injektionen in Zellen vorzunehmen. Der innere Durchmesser dieser Mikrokapillare beträgt 500 nm der Außendurchmesser 1,0 µm.



**Abbildung 23:** Vergrößerung eines Femtotips<sup>®</sup> I. Die intakte Spitze der Mikrokapillare hat einen Außendurchmesser von 1,0  $\mu\text{m}$ , der inner Durchmesser beträgt 0,5  $\mu\text{m}$ . (Bild von <http://www.eppendorf.com>)

Für die Messungen mit der Mikrokapillare wurde ein spezieller Kapillarenpuffer<sup>78</sup> verwendet um die Oberflächenspannung zu vermindern und mögliche Lufteinschlüsse in der Spitze der Mikrokapillare zu minimieren.

Der Kapillarenpuffer enthielt:

- 20 mM Trisborat pH = 8,4 (Roth und Sigma-Aldrich, Deutschland)
- 3% (w/v) Polyvinylpyrolidone (PVP, MW 1'000'000) (Polyscience Inc., USA)

In einer Lösung aus:

- 69,9% Wasser
- 30% Glycerin (Riedel de Haen, Deutschland)
- 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, Deutschland)

## ***C.10 OLIGONUKLEOTIDE UND PEPTIDE***

### **C.10.1 Oligonukleotide**

Die Oligonukleotide wurden von der Firma IBA GmbH (Deutschland) hergestellt.

Für das DIM Experiment mit der Mikrokapillare wurde das folgende Tetramethylrhodamin markierte Oligonukleotid, aus Desoxyribonukleinsäuren, verwendet:

- Biotin-HEGL - 5'-CCC GCG CTT GCT TTG CGT TTT T-3' - TMR

Für das DIM Experiment in Zellen wurde ein ATTO488 markiertes 20-mer synthetisiert:

- ATTO488 - 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA-3'

### **C.10.2Peptide**

Neben den, von in Kooperation der Gruppe von Prof. Dr. D. SEEBACH, synthetisierten  $\beta$ -Peptiden wurde, für die Aufnahmeexperimente mit Nanoteilechen, in biotinyliertes  $\alpha$ -Peptid von der Firma Thermo (Deutschland) verwendet:

- Biotin - N-RRR RRR RRR R-C



## D EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit beschrieben. Sie teilt sich in zwei Teile: Im ersten Teil werden die Untersuchungen der dem Tat-Protein nachgeahmten  $\beta$ -Peptide (in Kooperation mit Prof. Dr. D. SEEBACH, ETH Zürich) vorgestellt. Das Tat-Protein, welches aus dem HI Virus-1 stammt, und seine Peptidomimetika haben die Fähigkeit sehr effizient in Zellen einzudringen. Diese Fähigkeit ist in der Pharmazie und Medizin von großem Interesse, da es auch bedeutet die Blut-Hirn-Schranke effizient zu durchqueren und in Zukunft auch Arzneimittel schneller an die benötigten Stellen zu liefern. In dieser Arbeit wird die Untersuchung des  $\beta$ -Arginins auf ein Zellsystem gezeigt.

Im zweiten Teil wird die Methode der bildgebenden Diffusionsmikroskopie (*Abk.*: DIM) vorgestellt. Diese Methode verbindet zwei in der Bioanalytik verwendete Methoden. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*Abk.*: FCS), eine Methode zur Untersuchung von Dynamiken, wird mit Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie, einer statischen Bildgäbe, kombiniert um bildgebend die Dynamik in heterogenen Medien, wie Zellen, darzustellen.

### D.1 UNTERSUCHUNG DER $\beta$ -PEPTIDE AN ZELLEN

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Arzneimittel auf Peptid- und DNA-Basis für Therapien vorgeschlagen. Diese Arzneimittel haben nur eine eingeschränkte Möglichkeit die Zellmembran zu durchqueren, was sie daran hindert intrazelluläre Ziele zu erreichen. Einige Ansätze die Membran zu durchqueren sind Mikroinjektion, Elektroporation, virale Transportsysteme, Liposomen, Einschlüsse in Polymeren oder Rezeptor vermittelte Endozytose. Diese Methoden haben nur einen eingeschränkten Erfolg oder sind zytotoxisch.<sup>79</sup>

Die Entdeckung der Zelleindringenden Proteine (*engl.*: cell-penetrating peptides, *Abk.*: CPP) und der Protein Transduktions Domäne (*engl.*: protein transduction domain, *Abk.*: PTD) fand in den letzten Jahrzehnten statt. Zwei Vertreter sind die Tat- und der Antennapedia-abgewandelten Peptide. Sie besitzen die Eigenschaft aus dem extrazellulären Medium in Zellen einzudringend und kovalent gebundene Fracht einzuschleusen.<sup>80</sup>

Diese Eigenschaft begeistert die Biologie und Medizin, da sie versprechen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und neurobiologische Therapien zu revolutionieren.<sup>81</sup>

Aufgrund der pharmazeutischen Relevanz der Tat-Proteine wurden schon viele Untersuchungen mit diesem Protein unternommen. Dabei stellte sich heraus, dass die

Aminosäuren Lysin und Arginin, die in dem Protein abwechselnd hintereinander vorkommen, die Aufnahme des Peptids in eukaryotische Zellen bewirken.

Durch Inkubation der Zellen mit poly-Argininen stellte man schon früh fest, dass das Peptid, in der Länge der Tat<sub>49-57</sub>-Sequenz, vollständig von den Zellen aufgenommen wurde. Neben wenigen Lokalisationen im Zytosol, mit homogener Verteilung, findet man das Peptid meist im Nukleus, und darin ausschließlich in den Nukleoli, den runden Kernkörperchen der Zelle.

Nach erfolgreichen Experimenten mit reinen  $\alpha$ -Argininen und den entsprechenden D-Aminosäuren stellte sich die Frage ob auch bei dem aus  $\beta$ -Aminosäuren gewonnen Peptids eine Aufnahme durch die Zelle beobachtet werden kann. Der Vorteil der  $\beta$ -Peptide ist ihre proteolytischen Resistenz, diese Moleküle können von den nativen Enzymen nicht abgebaut werden. Die Frage nach der Aufnahme der des  $\beta$ -Homologen Peptids und deren Abhängigkeit von Länge und Konzentration wurde mit den im Folgenden beschriebenen Experimenten angegangen.

### **D.1.1 Aufnahme in Abhängigkeit der Peptidlänge**

Zur Untersuchung standen vier poly- $\beta$ -Arginine unterschiedlicher Länge und ein Kontrollpeptid für die negative Kontrolle zur Verfügung. Zur Inkubation der Zellen mit den Peptiden wurde das in den Kammerdeckgläschen enthaltene Medium entfernt und die darin befindlichen adhärenente Zellen einmal mit 400  $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300  $\mu$ l einer Lösung bestehend aus einem Tag altem Nährmedium und Fluorescein markiertem Peptid in der entsprechenden Konzentration inkubiert. Die Aufnahme des Peptids von den Zellen erfolgte innerhalb weniger Minuten. Wie Fluoreszenzaufnahmen später in diesem Kapitel zeigen werden, konnten bereits nach einer Minute die meisten Peptide in den Zellen nachgewiesen werden.

Für das Experiment wurde die Aufnahme von  $\beta$ -Argininketten mit unterschiedlichen Längen von vier bis zehn Argininen in die Zelle beobachtet. Um das Peptid in der Zelle zu verfolgen wurde es mit einem Fluorophor markiert. Die von der Gruppe um Prof. Dr. D. SEEBACH (ETH Zürich) hergestellten Peptide trugen den Farbstoff Fluorescein. Zur Analytik wurde die bildgebende Fluoreszenzmikroskopie benutzt. Die Untersuchungen wurden zum einen an einem weitfeldangeregtem Epifluoreszenzmikroskop mit Quecksilberdampfampe zur Anregung und CCD-Kamera aufgenommen, zum anderen bestand noch die Möglichkeit ein Laserscanningmikroskop (Carl Zeiss GmbH, Deutschland) der Arbeitsgruppe von Prof.

Dr. J. SPATZ, zu benutzen. Mit diesen Mikroskopen bestand die Möglichkeit einen großen Bereich in der Probe zu beobachten. Ebenso ermöglichte die kurze Aufnahmezeit ein rasches Screening.

Folgende Peptide standen zur Verfügung:

- Fluorescein-( $\beta$ -Arg)<sub>4</sub> (siehe auch Abbildung 24)
- Fluorescein-( $\beta$ -Arg)<sub>6</sub>
- Fluorescein-( $\beta$ -Arg)<sub>8</sub>
- Fluorescein-( $\beta$ -Arg)<sub>10</sub>
- Fluorescein-( $\beta$ -Ala)-( $\beta$ -Arg)-( $\beta$ -Leu)-( $\beta$ -Phe)-( $\beta$ -Ala)-( $\beta$ -Ala)-( $\beta$ -Lys) als Negativkontrolle (siehe auch Abbildung 25)

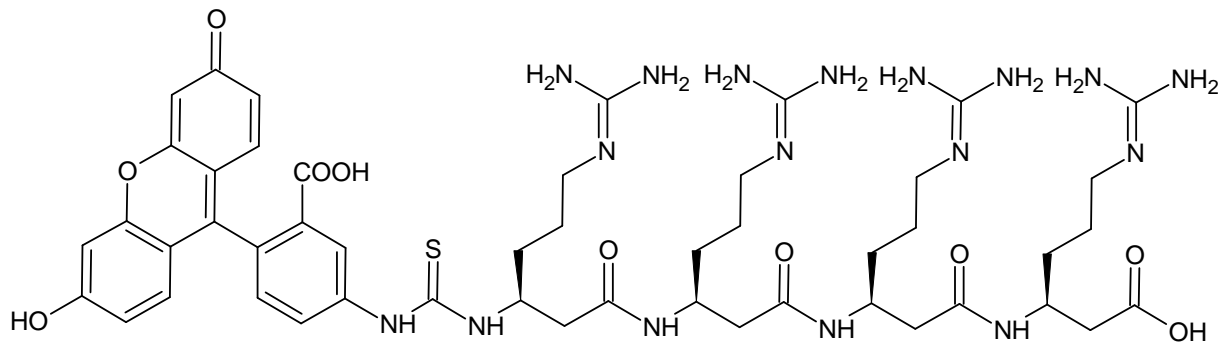


Abbildung 24: Fluorescein markiertes Tetramer.

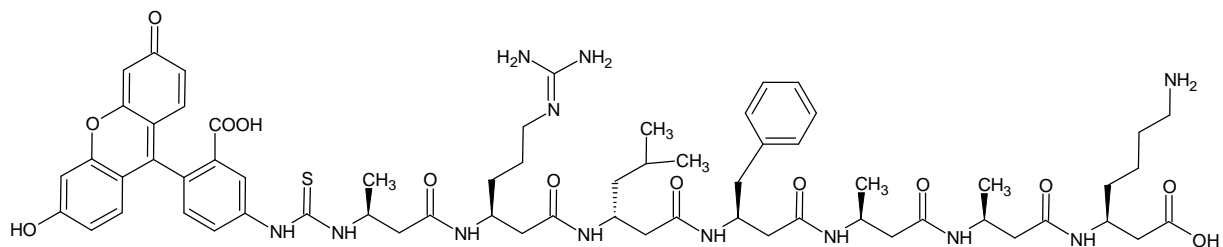
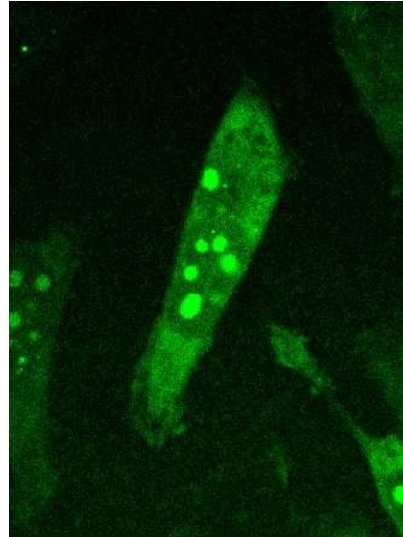


Abbildung 25: Fluorescein markiertes Heptapeptid. Dieses Peptid galt als Negativkontrolle für das Experiment.

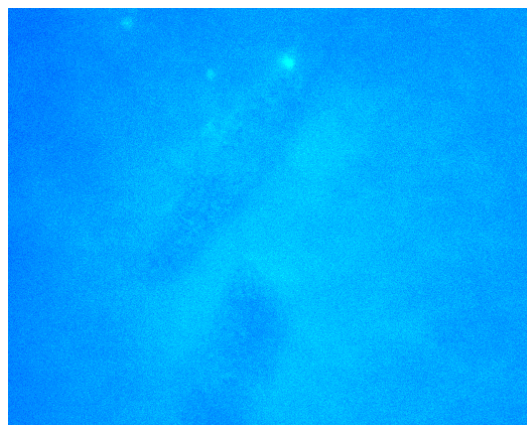
Abbildung 26 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa Zellen nach 15 minütiger Inkubation mit 15  $\mu$ M Fluorescein markierter Dekamerpeptidlösung. Während im Zytosol eine relativ schwache Fluoreszenzintensität beobachtet werden kann, deutet die starke lokal begrenzte Fluoreszenzintensität im Zellkern auf eine Anreicherung in den Nukleoli hin. Diese Beobachtungen decken sich mit dem in der Literatur bekannten Verhalten.<sup>59</sup>



**Abbildung 26:** Das Dekamer drang in alle Zellen ein. Hier nach Inkubation einer 15  $\mu\text{M}$  Peptidlösung nach 15 minütiger Inkubation auf lebende Zellen und zweimaligen Waschen mit PBS. Das Peptid befand sich im Zytosol, verstärkt jedoch in den Nukleoli wieder. Dieses Bild wurde mit einem konfokalen Laserscanningmikroskops mit einer Anregung bei 488 nm aufgenommen.

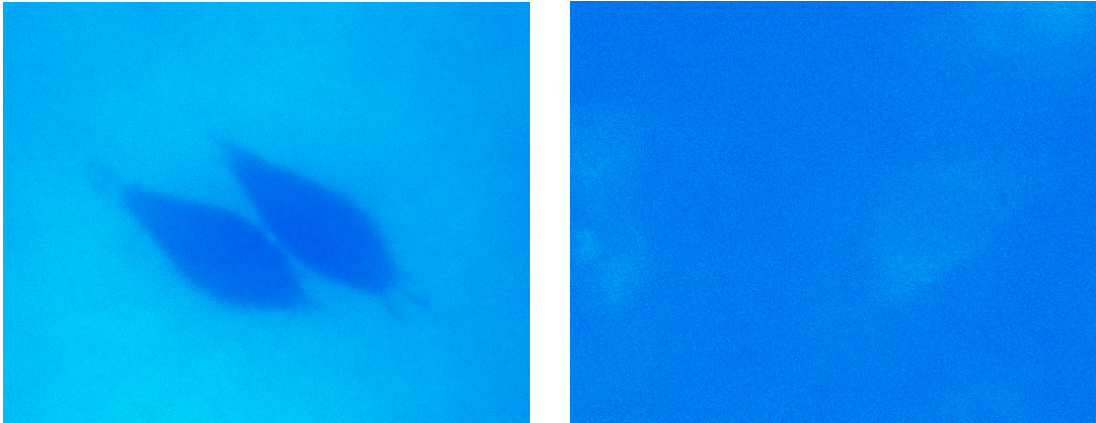
Das Oktamer zeigte unter gleichen Bedingungen, das gleiche Muster der Anreicherung. Das Peptid verteilte sich homogen im Zytosol; im ansonsten schwach leuchtenden Zellkern zeigen die Nukleoli eine starke Anreicherung des Peptids und somit eine starke Fluoreszenz haben. Jedoch wurden nicht alle Zellen angefärbt. Einige Zellen zeigten eine Aufnahme des Peptids, andere jedoch nicht.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Fluorescein markiertem Tetramers (*siehe* Abbildung 27) und des Hexamers zeigten keine Anreicherung in der Zelle und wurden somit nicht von der Zelle aufgenommen.



**Abbildung 27:** Lebende Zellen nach der Inkubation mit Fluorescein markiertem Tetramer. 15  $\mu\text{M}$ , nach 15 min Inkubation. Es ist keine Aufnahme des Peptids in die lebenden Zelle zu erkennen. Aufgenommen mit Weitfeldanregung und einer CCD-Kamera.

Die Negativkontrolle (*siehe* Abbildung 28 *links*) sowie die Zugabe von freiem Fluorescein (*rechts*) zeigten, wie erwartet keine Aufnahme in die Zelle. Selbst eine Agglomeration auf der Membran fand nicht statt. Ebenso zeigte die Inkubation mit Fluorescein keine Internalisierung in die Zelle. Lediglich die Negativkontrolle zeigte eine erhöhte Fluoreszenz durch auf der Glasoberfläche der Kammer durch adhäriertes Peptid.



**Abbildung 28:** Lebende Zellen nach der Inkubation mit Fluorescein markierten Negativkontrolle (*links*) und freies Fluorescein (*rechts*). 15  $\mu\text{M}$ , nach 15 min Inkubation. Es findet keine Aufnahme des Peptids in die lebende Zelle statt. Die erhöhte Hintergrundstrahlung im *linken* Bild resultiert aus der Wechselwirkung zwischen Peptid und Glasoberfläche. Aufgenommen mit Weitfeldanregung und einer CCD-Kamera.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Mindestlänge für die Aufnahme des  $\beta$ -Peptids existiert. Eine Mindestlänge von acht Aminosäuren war notwendig um von einigen Zellen aufgenommen zu werden. Für eine Aufnahme von allen Zellen ist eine Kettenlänge von zehn aufeinander folgenden Argininen erforderlich. Kürzere Argininketten, wie das Hexamer und kürzer, zeigten keine Aufnahme in die Zelle, ebenso wie das Kontrollpeptid und freies Fluorescein. Diese, bei den kurzen Peptiden, gering vorhandene positive Ladung scheint einen Einfluss auf die Internalisierung des Peptids zu nehmen. Die  $\beta$ -Peptide zeigten ein ähnliches Verhalten wie die  $\alpha$ -Peptide, wobei die  $\alpha$ -Peptide eine deutliche Aufnahmegrenze ab dem Hexamer festgestellt wurde.<sup>82</sup> Die in Tabelle 4 gezeigte Übersicht über die Messergebnisse sind hier Literaturwerten der  $\alpha$ -Peptide gegenübergestellt. Die Werte für die  $\alpha$ -Peptide wurden in Relation zu einem streptavidinierten Alexa Fluor 488 (SA488) mittels Durchflusszytometrie (*engl.*: fluorescence activated cell sorting, *Abk.*: FACS) bestimmt und zeigen das Vielfache des Anstiegs zu SA488 an.

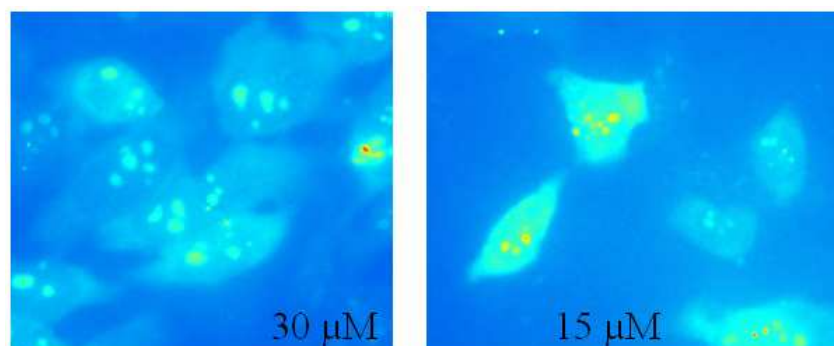
	Negativkontrolle	Tetramer	Hexamer	Oktamer	Dekamer
$\beta$ -Peptide	keine	keine	keine	einige	100%
$\alpha$ -Peptide	-	5-fach	44-fach	31-fach	33-fach

**Tabelle 4:** Überblick über die Aufnahme der  $\beta$ -Arginine von den Zellen in Abhängigkeit der Kettenlänge. Das Dekamer wurde von allen Zellen aufgenommen, wohingegen keine Zelle das Tetramer aufnahm bis in den Zellkern internalisierte. Die Vergleichswerte zu den  $\alpha$ -Peptiden sind aus Referenz 82. Hier wurde die Aufnahme des Peptides, gekoppelt an streptavidiniertes Alexa Fluor 488 (SA488), mittels FACS bestimmt. Die Werte geben die Verbesserung in der Aufnahme im Vergleich zu freiem SA488.

### D.1.2 Konzentrationsreihe

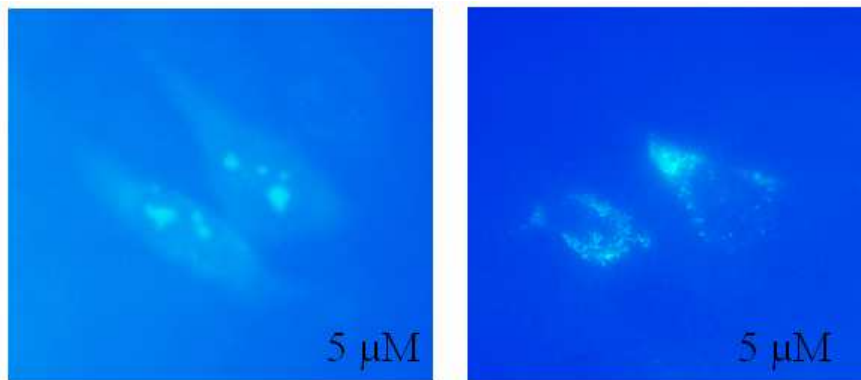
Ebenso interessant, wie die Länge der Kette an Argininen in einem Peptid, ist die Mindestkonzentration die benötigt wird, damit das Peptid von der Zelle aufgenommen wird. Wie schon aus der Literatur bekannt existiert eine Schwellenkonzentration der Peptidlösung.<sup>59</sup> Die Schwellenkonzentration stellt die Konzentration dar, die benötigt wird, ab der eine deutliche Markierung der Zellen mit dem zur Inkubation zur Verfügung gestelltem Peptid zu sehen ist. In den vorhergehenden Experimenten wurde bisher die Konzentration hoch gewählt (15  $\mu$ M), damit eine vollständige Markierung aller Zellen mit dem Dekamer gewährleistet wird.

Um die Schwellenkonzentration herauszufinden wurden die Zellen mit den üblichen Inkubationsbedingungen (37°C und 15 min) mit dem Dekamer in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Aufnahme des Peptids von einer Konzentration von mehr als 15  $\mu$ M (siehe Abbildung 29) zeigte die bisher beobachtete Lokalisation in den Nukleoli. Alle Zellen zeigten eine Aufnahme des Peptids auf, jedoch zeigten auch hier wieder vereinzelt Zellen eine stärkere Anreicherung Peptids.



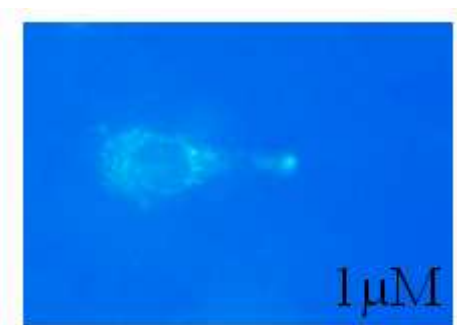
**Abbildung 29:** Inkubierte HeLa-Zellen mit Konzentrationen über 15  $\mu$ M des Fluorescein markierten Dekamers. Zu sehen ist eine deutliche Anreicherung der Peptide in den Nukleoli.

Eine Änderung der Lokalisationsmuster gegenüber erhöhten Konzentrationen trat zum Teil schon bei Inkubation mit  $5\ \mu\text{M}$  Dekamer auf. Abbildung 30 zeigt diese uneinheitliche Aufnahme des Peptids. In der Abbildung *rechts* ist im Gegensatz zur typischen Anfärbung der Nukleoli, eine Einfärbung der Membran zu sehen. Weder im Zytosol, noch im Zellkern konnte dabei Fluoreszenz festgestellt werden. Die Anreicherung auf der Zellmembran deutet auf eine Interaktion zwischen den Peptiden und der Membran hin, die jedoch aufgrund der zu niedrigen lokalen Konzentration nicht passiert werden kann. Bei  $5\ \mu\text{M}$  ist somit eine Grenze erreicht bei welcher man keine vollständige Aufnahme des Peptids in die Zellen mehr feststellen kann.



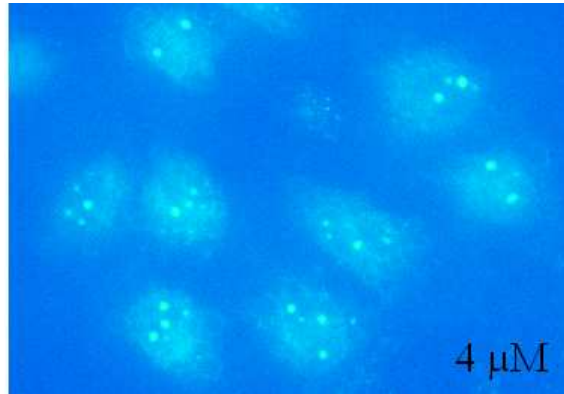
**Abbildung 30:** Verhalten der Zellen bei  $5\ \mu\text{M}$ . Einige Zellen zeigten das typische Muster der Aufnahme des Peptids (*links*) andere zeigten eine Anreicherung der Peptide an der Membran und somit keine Internalisierung in die Zelle (*rechts*).

Die Inkubation der Zellen mit  $1\ \mu\text{M}$  des Dekamers, zeigte keine Aufnahme des Peptids. Wieder ist eine Markierung der Zellmembran zu erkennen. Der Zellkern ist, wie in Abbildung 31 deutlich zu sehen, frei von Fluorescein. Die Mindestkonzentration, die für die Aufnahme des Peptids notwendig ist, wurde also unterschritten.



**Abbildung 31:** Zelle nach einer Inkubation des Dekamers mit einer Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$ . Das Peptid konnte nicht internalisiert werden und befindet sich hauptsächlich an der Zellmembran. Im Zellkern und vor allem in den Nukleoli konnte keine eindeutige Fluoreszenz gemessen werden.

Durch die Variation des Farbstoffes, von Fluorescein zu ATTO655, ein photostabilerer, organischer Farbstoff mit Emission im roten Wellenlängenbereich, konnten die Beobachtungen bestätigt werden. Die erforderliche Mindestkonzentration an markiertem Peptid lag bei  $4 \mu\text{M}$ . In Abbildung 32 ist das Lokalisationsmuster des Peptids in den Nukleoli der Zellen mit dem ATTO655 markiertem Dekamer zu sehen.



**Abbildung 32:** 15 minütige Inkubation mit  $4 \mu\text{M}$  ATTO655 an  $(\beta\text{-Arg})_{10}$ . Die Aufnahme zeigt eine Kolokalisation der Peptide in den Nukleoli.

Die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit des Aufnahmeprozesses der Peptide in die Zellen konnte hier gezeigt werden. Im Gegensatz zur quantitativen Aussage, wie man sie aus Durchflusszytometriemessungen erhält, wurde hier nur auf die Qualität der Aufnahme, also auf das Muster der Zellanfärbung geachtet.

Bei aus der Literatur bekannten Werten über die quantitative Aufnahme der aufnahmerlevanten Tat-Sequenz ( $\text{Tat}_{49-57}$ ) von Zellen wurde bei einer Konzentration ein sprunghafter Anstieg in der Aufnahme und gleichzeitig eine Sättigung bei  $1 \mu\text{M}$  festgestellt. Die Untersuchungen wurden mit GFP markiertem Peptid durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels FACS.<sup>83</sup>

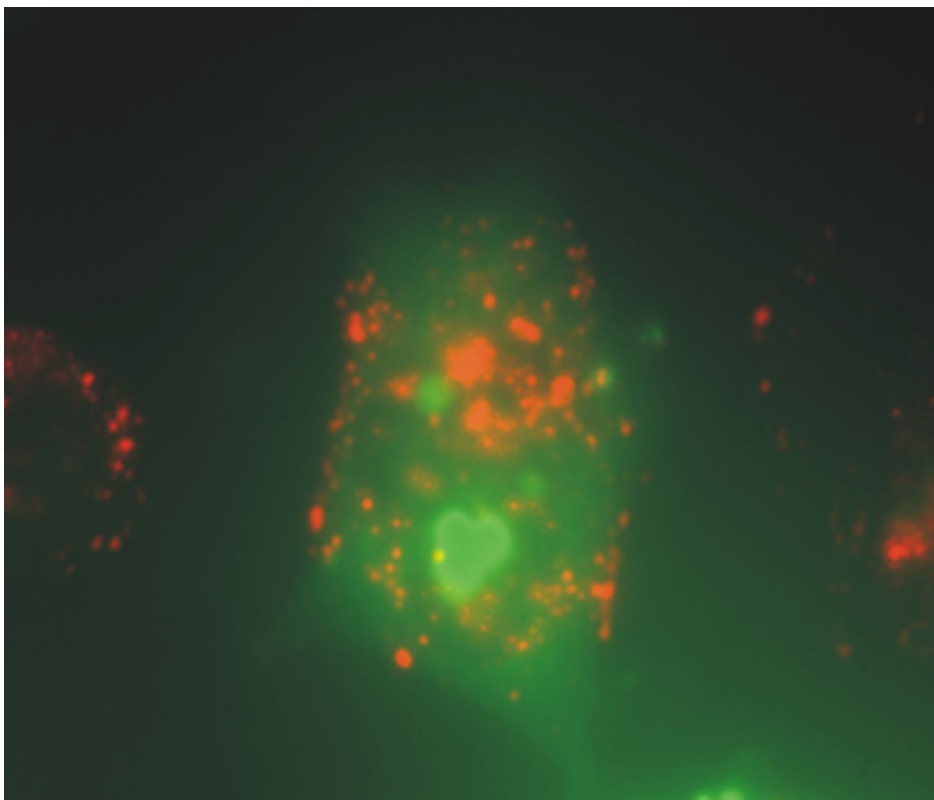
### D.1.3 Aufnahmewege des Arginins

Das folgende Experiment sollte eine mögliche Aufnahme der poly-Arginine über bevorzugte Kanäle in der Zellmembran eruieren. Mögliche Aufnahmewege der Peptide von der Zelle sind zum einen der aktive Transport durch Membranproteine und Endozytose, welcher schon von einigen Gruppen ausgeschlossen werden konnte. Eine weitere Möglichkeit ist ein passiver Transport, ähnlich zu dem schon vorgeschlagenen Prozess bei den Homeoproteinen.<sup>49</sup>

Anstelle des schnell photobleichenden Farbstoffs Fluorescein wurden in diesen Versuchen neue photostabilere Halbleiterkristalle verwendet. Die Halbleiterkristalle



ermöglichen es die Beobachtungszeit um ein Vielfaches zu erhöhen. Die kommerziell erhältlichen Nanokristalle sind mit einer streptavidinierten Oberfläche versehen um sie somit biokompatibel zu machen. Diese streptavidinierten Nanoteilchen (QuantumDots<sup>®</sup>, QDot Corp., USA) wurden mit biotinyliertem ( $\alpha$ -Arg)<sub>10</sub> versetzt, um eine möglichst sichere Aufnahme in die Zelle bis in den Zellkern zu gewährleisten. Für die Experimente wurden die QDot605 verwendet. Wie alle Halbleiterkristalle haben sie eine breite Absorptionsbande, jedoch eine durch ihre Größe definierte schmalbandige Emission. Die QDot605 emittieren bei 605 nm mit einer Halbwertsbreite von 10 nm. Aufgrund der hohen Affinität von Biotin zu Streptavidin bildete sich ein Nanoteilchen-Arginin-Konjugat welches von der Zelle aufgenommen werden konnte.



**Abbildung 33: Biofunktionalisierte Nanokristalle mit Biotin-( $\alpha$ -Arg)<sub>10</sub>. Gegenfärbung mit Fluorescein-( $\beta$ -Arg)<sub>10</sub>. Aufgenommen mit einer Weitfeldanregung einer Quecksilberdampfampe und einer hintergrundbeleuchteten emCCD-Kamera. Die Nanokristalle (*rot*) bleiben auf der Oberfläche hängen, während hingegen die Färbung durch das Fluorescein markierte Peptid (*grün*) die Nukleoli anfärbte. Bei einer Kolo-kalisation in den Nukleoli würde dies mit einer *gelben* Farbe dargestellt.**

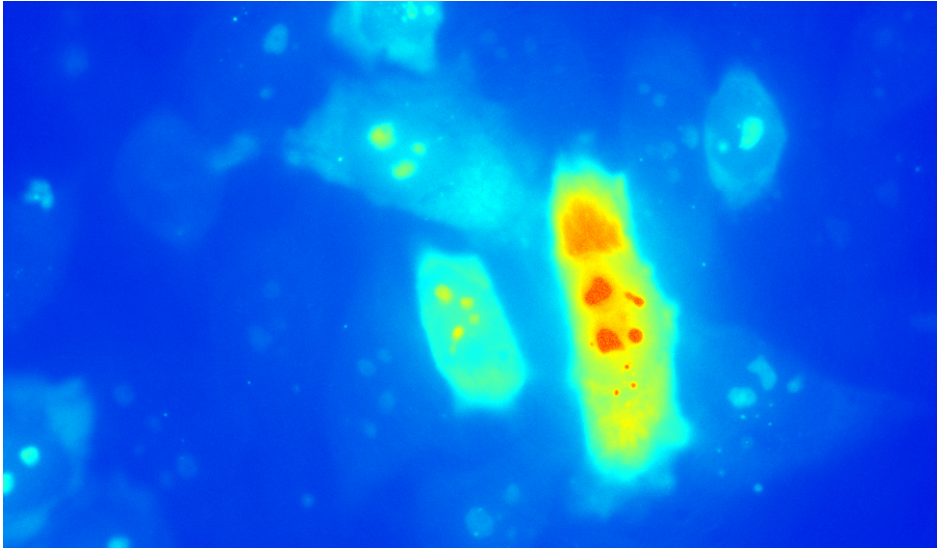
Beobachtet wurde dieses Experiment mit einer Weitfeldanregung durch eine Quecksilberdampfampe (UV-Spektrum, Anregungsfilter: HQ365/50, Emissionsfilter: HQ665/30) und einer angeschlossenen hintergrundbeleuchteten und elektronisch verstärkten emCCD-Kamera (*engl.*: electronic multiply charge coupled device; Cascade, Roperscientific

Inc., USA). Der experimentelle Aufbau ermöglichte, einzelne Nanoteilchen in Zellen sichtbar zu machen. Abbildung 33 zeigt die Falschfarben kodierte Darstellung von Nanoteilchen (*rot*) und Fluorescein markiertes Peptid (*grün*). Für die Aufnahme wurde zuerst die Fluoreszenz des Fluorescein markierten Peptids aufgenommen um einem vorzeitigen Photobleichen entgegen zu wirken. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Nanoteilchen, durch die Anregung im UV. Eine Kolokalisation (*gelb*) im Zellkern konnte nicht festgestellt werden, stattdessen blieben die Nanoteilchen auf der Membranoberfläche hängen, die der Beobachtung im vorangegangenen Abschnitt (*siehe* Abbildung 31) gleicht.

Die fehlende Kolokalisation, bzw. der fehlende Internalisierung der Nanoteilchen brachte keinen eindeutigen Aufschluss über die Aufnahmemechanismus. Die Nanoteilchen konnten nur punktuell auf der äußeren Zellmembran beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Arginine von der Zelle zwar erkannt, aber eine Aufnahme mit den deutlich größeren Nanoteilchen nicht möglich war (*siehe auch* Abbildung 20). Das punktuelle Auftreten der Fluoreszenz auf der Membran lässt vermuten, dass es bestimmte Regionen in der Zellmembran gibt, über die die Aufnahme des Peptids erfolgen könnte.

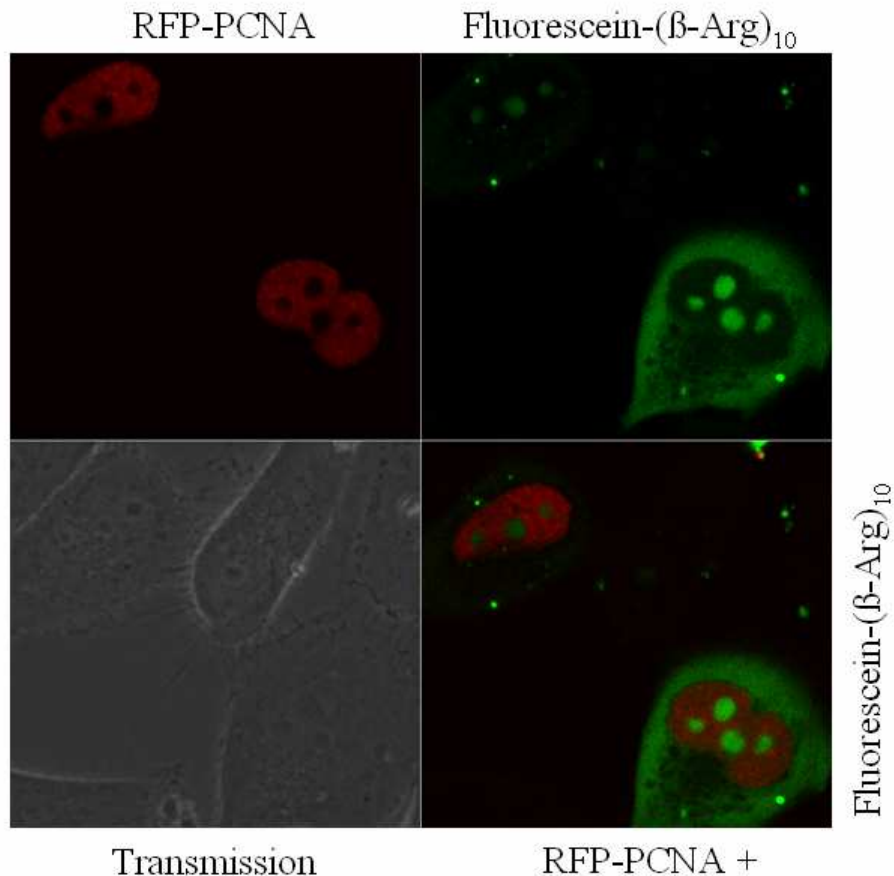
### **D.1.4 Untersuchung zur zellzyklusabhängigen Aufnahme**

Selten zeigten Bilder eine uneinheitliche Aufnahmecharakteristika wie in Abbildung 34 zu sehen. Eine durchschnittliche Aufnahme des Peptids mit einer markanten stärkeren Anreicherung in den Nukleoli, daneben jedoch eine Zelle, welche eine deutlich stärkere Aufnahme des Peptids aufweist. Deutlich zu erkennen ist eine symmetrische Verteilung der Nukleoli im Zellkern über die Zelle hinweg, welches ein Indiz für eine gerade den Teilungsprozess verlassende Zelle ist. Diese Beobachtung führt zu der Frage, ob die Aufnahme der Peptide vom Zellzyklus abhängt in der sich gerade die Zelle während der Inkubation befindet.



**Abbildung 34: Fluorescein markiertes Dekamer. 100%ige aber schwache Aufnahme des Peptids in die Zellen und selten auftretende starke Fluoreszenz. Die etwas deutlich auffallendere Zelle (von grün ins rote gehend) zeigt eine Symmetrie in der Zellfärbung. Dies deutet auf eine auf die Zellteilung verlassende Zelle hin.**

Für dieses Experiment, wurde in Kooperation mit der Gruppe um Dr. M.C. CARDOSO (MAX-DELLBRÜCK-Zentrum Berlin, MDC-Berlin), RFP-PCNA in Zellen exprimiert<sup>84</sup> und gleichzeitig die Aufnahme des Fluorescein markierten Peptids beobachtet. (Für eine ausführlichere Beschreibung des PCNA siehe auch C.8.2 auf Seite 51.) Die zwei Konstrukte aus Reporter, RFP, und Protagonist, PCNA, für die S-Phase und des Fluorescein markierten Peptids konnte mittels eines Laserscanningmikroskops (Carl Zeiss GmbH, Deutschland) mit zwei Laseranregungswellenlängen und spektral getrennter Detektion, untersucht werden.



**Abbildung 35: Zwei Zellen mit RFP-PCNA-Expression, welche beide sich in der S-Phase befinden. Deutlich zu erkennen ist eine unterschiedlich starke Anreicherung des Fluorescein markierten  $\beta$ -Peptids von den drei in Bild befindlichen, transfizierten Zellen.**

In Abbildung 35 sind drei transfizierte Zellen in der Transmission (*unten links*) zu erkennen von denen zwei jeweils RFP-PCNA und Fluorescein-( $\beta$ -Arg)<sub>10</sub> aufgenommen haben. Beide Zellen befinden sich in der S-Phase, welche an dem gesprenkelten Muster im RFP-Kanal (*oben links*) zu erkennen ist. Ebenfalls deutlich zu erkennen ist eine unterschiedliche Aufnahme des Arginins (*oben rechts*). Da zwischen der Inkubation und der Messung nur wenige Minuten vergangen sind und es somit unwahrscheinlich ist, dass die Zelle in ihrem Zellzyklus vorangeschritten ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine zellzyklusabhängige unterschiedliche Aufnahme und Anreicherung des Peptids eher nicht stattfindet.

## ***D.2 DIFFUSION IMAGING MICROSCOPY (DIM)***

Die Kombination von FCS mit der spektral- und zeitaufgelösten Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (*Abk.:* SFLIM) verbindet Dynamik und Statik in einer Aufnahme. Durch

die FCS wird dynamische Information der Probe erhältlich, die dem Betrachter die Geschwindigkeit der beobachtenden, fluoreszenten Reporter im untersuchenden Medium wiedergibt. Mit Hilfe der SFLIM ergibt sich die räumliche Auflösung der Probe mit der Option mehrere Moleküle gleichzeitig, unter zur Hilfenahme der Fluoreszenzlebensdauer und der spektralen Emissionscharakteristik, zu identifizieren. Die durch die Kombination von beiden Methoden erhaltenen Bilder geben eine räumlich aufgelöste Karte über die Diffusionsgeschwindigkeiten wider. Somit können Heterogenitäten der Diffusion in den Proben ortsaufgelöst bestimmt werden. Ähnliche Versuche wurden schon in Mikrokapillaren durchgeführt. Hierbei wurde das zweidimensionale Strömungsprofil in einer aktiv durchflossenen Mikrokapillare bestimmt.<sup>85</sup>

Andere Methoden, welche z.B. diffundierende Membranproteine in ihrer Diffusionszeit bestimmen, benötigen den Aufbau eines Laserscanningmikroskops. Hierbei werden Bilder von der Probe hintereinander aufgenommen und im Nachhinein miteinander korreliert. Das Ergebnis ist eine Korrelation über das gesamte Bild<sup>86</sup>, wobei die Information über das ganze Bild gemittelt und nicht ortsaufgelöst dargestellt wird.

Die bisherigen Korrelationen in der FCS werden hauptsächlich von Hardware-Korrelatorkarten übernommen, welche die Korrelation aus den direkt gemessenen Intensitätsschwankungen in einem Messbereich ab 400 ns berechnen. Eine nachträgliche Bearbeitung der Daten, z.B. zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer, ist bei diesen Hardwarekorrelatoren aufgrund des Verlusts der Rohdaten nicht möglich. Bei diesem hier vorgestellten Ansatz wurde die nachträgliche Softwarekorrelation gewählt. Nach der Aufnahme der Daten werden diese, ebenso die Korrelation, in einem Programm unterschiedlich ausgewertet.

### **D.2.1 Vergleich der Korrelationsmethoden**

Zur Korrelation stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die Analyse der Daten erfordert allerdings verschiedene Voraussetzungen, die von einer geeigneten Methode erfüllt werden müssen. Zum einen soll die Datenmenge, die zur Berechnung der Korrelation während des Rechenprozesses benötigt wird, in Grenzen gehalten werden, da riesige Datenmengen auch den Korrelationsprozess verlangsamen. Des Weiteren sollte die Methode nach der Berechnung nur wenige Datenpunkte enthalten, um das Anpassen der Modellfunktion über den Algorithmus möglichst zügig zu verarbeiten.

Zu den Vorbereitungen zur bildgebenden Diffusionsmikroskopie musste zunächst die Idee der Korrelation eruiert werden. Um zu prüfen, ob die Methode auch wirklich funktioniert, wurden zunächst einige Fluoreszenzintensitäten aufgenommen und jeweils nach den folgenden Verfahren ausgewertet:

- Fast-FOURIER-Transformation (Standardkorrelation) mit einer 30 s Fluoreszenzspur
- Mittelung einer über Fast-FOURIER-Transformation erzeugten Korrelation aus Segmenten mit einer Länge von 200 ms
- Mittelung von Korrelationen nach einer Segmentierung von 200 ms und einer Korrelation über „bin and correlate“

Der entscheidende Vorteil der „bin and correlate“-Methode ist die enorme Rechenzeit und Speicherplatz-Ersparnis durch die Verwendung des quasilogarithmischen Korrelierens. Eine Gegenüberstellung ist in Tabelle 5 gezeigt. Während bei der „bin and correlate“-Methode eine Korrelation mit 32 Datenpunkten erzeugt wird, erhält man bei der FFT-Korrelation eine um zwei Größenordnungen größere Datenmenge. Durch die Anpassung an die Modellfunktion potenziert sich die Rechenzeit mit der Anzahl der Datenpunkte und macht so die Anpassung für die FFT-Korrelation unrentabel.

<i>Methode</i>	<i>FFT</i>	<i>"bin and correlate"</i>
Datenpunkte	11110	32
Berechnen der Ausgleichsfunktion	>10min	<1s

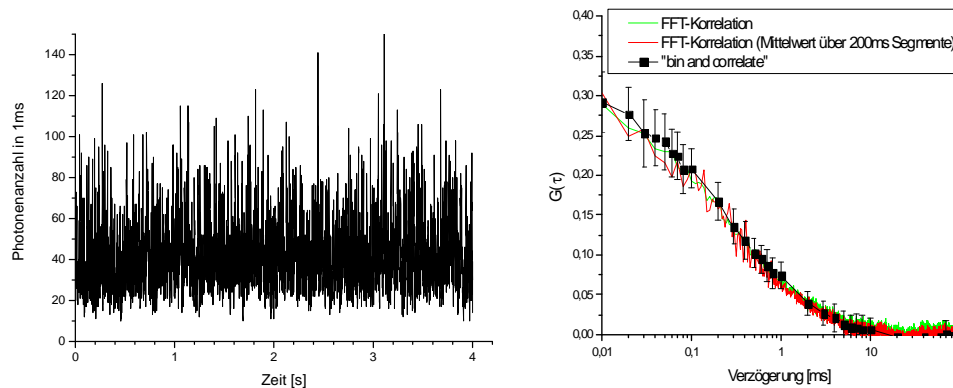
**Tabelle 5: Vergleich der Standard- mit der „bin and correlate“-Methode. Die Anzahl der der Datenpunkte unterscheiden sich in zwei Größenordnungen. Die Rechenzeit für die Anpassung an die Ausgleichsfunktion vervielfacht sich mit jedem Datenpunkt.**

Für die angestrebte Entwicklung der bildgebenden Diffusionsmikroskopie ist der Rechenaufwand nicht unerheblich, da in jedem einzelnen Bildpunkt eine Korrelation berechnet wird. Hier empfiehlt sich die „bin and correlate“-Methode, die diesen Aufwand minimiert.

Um zu überprüfen, ob die schnellere „bin and correlate“-Methode Abweichungen von der Standard-FFT-Methode zeigt, wurden drei Korrelationsfunktionen verglichen.

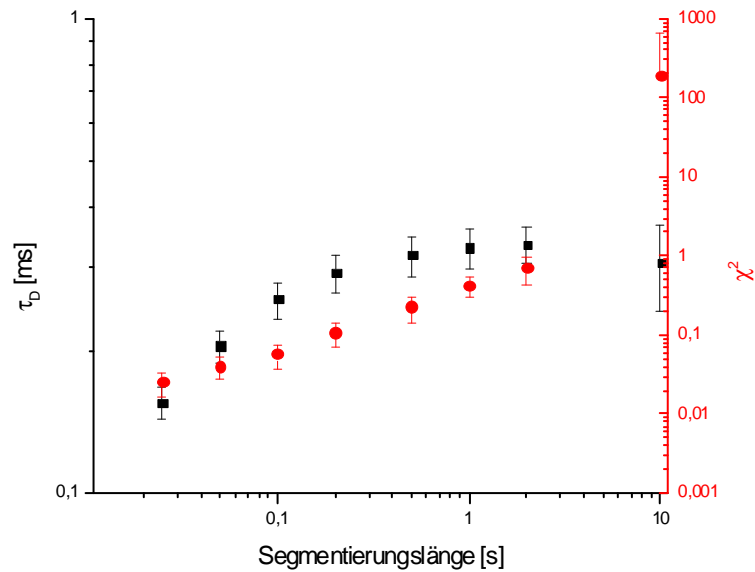
Die verschiedenen Autokorrelationsfunktionen für die Fluoreszenzfluktuationen (*siehe* Abbildung 36, *links*), welche aus der freien Diffusion eines markierten Oligonukleotids in Lösung resultierten, sind in Abbildung 36 *rechts* gegenübergestellt. Der direkte Vergleich zeigt, dass sowohl die Abweichungen der regulären Standardautokorrelation über die gesamte Fluoreszenzspur (*grün*) als auch die Abweichungen der segmentierten, regulären

Autokorrelation (*rot*) sich innerhalb des Fehlers der „bin and correlate“ Methode (*schwarz*) bewegen.



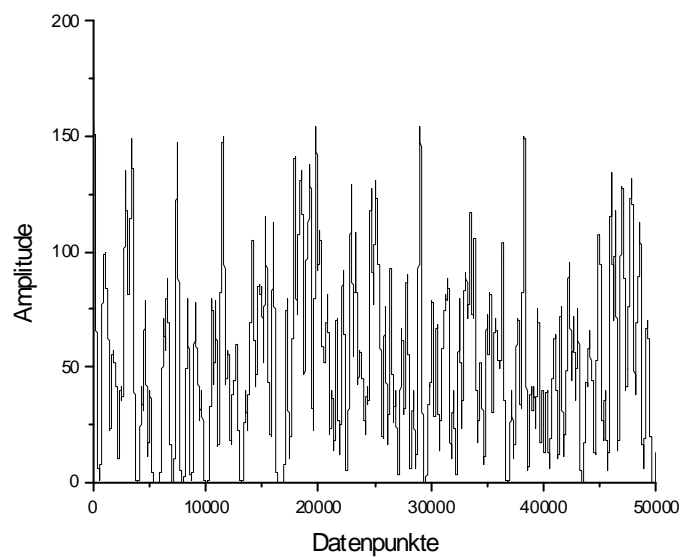
**Abbildung 36:** *Links:* Ausschnitt des Fluoreszenzsignals gegenüber der Zeit. Hier eine  $5 \cdot 10^{-9}$  M Tetramethylrhodamin-Lösung, gekoppelt an ein  $dT_{20}$ -Oligonukleotid, verdünnt in PBS. *Rechts:* Gegenüberstellung der Standardautokorrelationsmethode der gesamten Spur mit FFT (*grün*), und gemittelt aus der Segmentierung der Spur (*rot*) mit der Korrelation aus der „bin and correlate“-Methode (*schwarz*).

Bei genauerer Betrachtung verändert sich die Diffusionszeit, sowie die Güte der Anpassung, also das  $\chi^2$  (vgl. Formel 47) in Abhängigkeit von den Segmentierungslängen (siehe Abbildung 37, rote Datenpunkte). Die errechneten Diffusionszeiten (*schwarz*) der Korrelation sind nach der „bin and correlate“-Methode, mit drei 30 s langen Fluoreszenzspuren und in Abhängigkeit von der Segmentierungslänge, dargestellt. Mit der Standard-FFT-Methode mit Segmentierung konnte derselbe Kurvenverlauf wie mit der „bin and correlate“-Methode bestimmt werden. Innerhalb einer Segmentierungslänge blieb die errechnete Diffusionsgeschwindigkeit konstant, was in Abbildung 37 mit Hilfe der Fehlerbalken ausgedrückt wird. Der stetige Anstieg der Diffusionszeiten zu größeren Segmentierungslängen ist dabei nur ein Effekt der Segmentierung. Bei größeren Segmentierungszeiten, ab einer Segmentlänge von etwa 500 ns, näherte sich die Diffusionszeit einem Maximalwert und die Güte dem Wert Eins an. Der sprunghafte Anstieg des  $\chi^2$  bei einer Segmentierungslänge von 10 s, weist auf eine zu kleine Abschätzung des Fehlers der Korrelationskurve hin.



**Abbildung 37: Vergleich der ermittelten Diffusionszeit (*schwarz*) gegenüber der Segmentierungslänge und dessen  $\chi^2$  (*rot*). Hier: freier Farbstoff ATTO488 in reinem Wasser.**

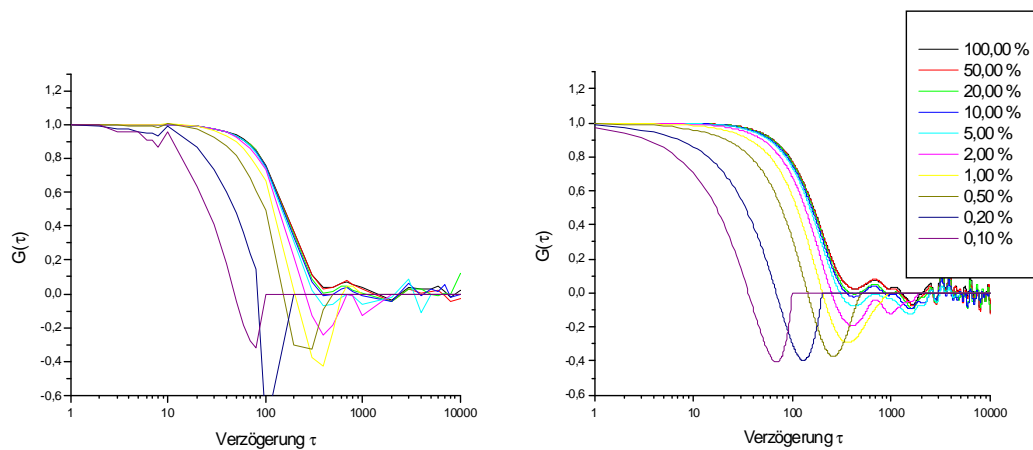
Durch die Simulation von FCS-Daten und Variation der Segmentierungslänge wurde der Fehler, der durch die Segmentierung erzeugt wurde, bestimmt. Hierzu wurde eine GAUSSkurve mit einem  $\sigma$  von 100 Datenpunkten erzeugt und der Ort zufällig in eine Spur einer Länge von 100'000 Datenpunkte eingefügt. Insgesamt wurden 500 GAUSSkurven willkürlich auf die Datenspur verteilt. In Abbildung 38 ist exemplarisch ein Teil der so erzeugten Kurve dargestellt.





**Abbildung 38: Ausschnitt aus den simulierten Daten. Für die Simulation wurde 500mal eine GAUSSkurve mit einer Breite von 100 Datenpunkten in einem Bereich von 100'000 Datenpunkten verteilt.**

Die Daten wurden sowohl mit der Standardkorrelationsmethode, also die FFT-Variante, und der „bin and correlate“-Methode korreliert und die Resultate anschließend verglichen, wobei die Halbwertsbreiten, unabhängig von der Korrelationsmethode, bei beiden Methoden sich nur gering unterscheiden. In Abbildung 39 sind die errechneten Korrelationen dargestellt. *Links* ist die Korrelationsfunktion der „bin and correlate“-Methode mit unterschiedlichen Segmentierungslängen dargestellt. Das *rechte* Diagramm in Abbildung 39 zeigt die linearen Korrelationsfunktionen mit Segmentierung. Beide Korrelationsfunktionen wurden anschließend auf den Wert Eins normiert, so dass die Verschiebung der Halbwertszeit sichtbar wird.

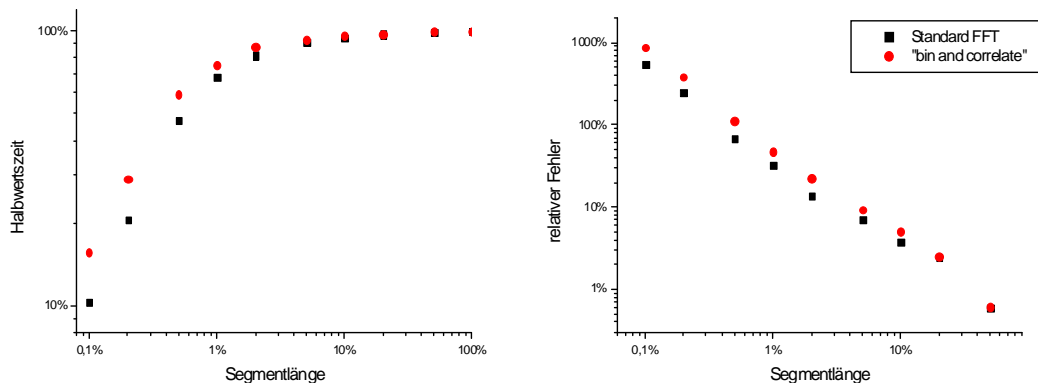


**Abbildung 39: Vergleich der beiden Korrelationsmethoden (*links*: „bin and correlate“, *rechts*: FFT-Korrelation beide Amplitudennormiert) mit jeweils gleicher Segmentierungslänge. Die Prozentangaben zeigen die Größe des Segments im Vergleich zur Gesamtlänge der Spur an.**

Die aus den Korrelationen in Abbildung 39 bestimmten Halbwertszeiten sind in Abbildung 40 in Abhängigkeit von der Segmentlänge dargestellt. Die Standard-FFT-Methode (*schwarz*) zeigt gegenüber der „bin and correlate“-Methode (*rot*) im *linken* Diagramm einen etwas leicht stärkeren Abfall der Halbwertszeit zu kleineren Segmentlängen hin. Hierbei zeigte die Simulation das selbe Verhalten zu kurzen Segmentierungslängen, wie die Diffusionszeiten aus dem Experiment (*siehe* Abbildung 37).

Im *rechten* Diagramm sind die relativen Fehler der Halbwertsbestimmung gegenüber der Segmentlänge aufgetragen, wobei der Halbwertszeit der Korrelation der gesamten Spur, also der Segmentlänge von 100%, den ‚richtigen‘ Halbwertszeiten entspricht. Bis zu einer

Segmentlänge von 5% der Gesamtpur erhält man in der Bestimmung der Halbwertszeit einen relativen Fehler von unter 10% mit beiden Methoden.



**Abbildung 40: Gegenüberstellung der Segmentlänge zur Halbwertszeit der Korrelationsfunktion. Zu sehen ist der schon in Abbildung 37 angedeutete stetige Abfall zu kleineren Segmentlängen hin, bzw. asymptotische Näherung an einen Grenzwert. Zusätzlich der berechnete relative Fehler. (rechts) Gezeigt sind hier die Standard-FFT-Methode (schwarz) und die „bin and correlate“-Methode (rot).**

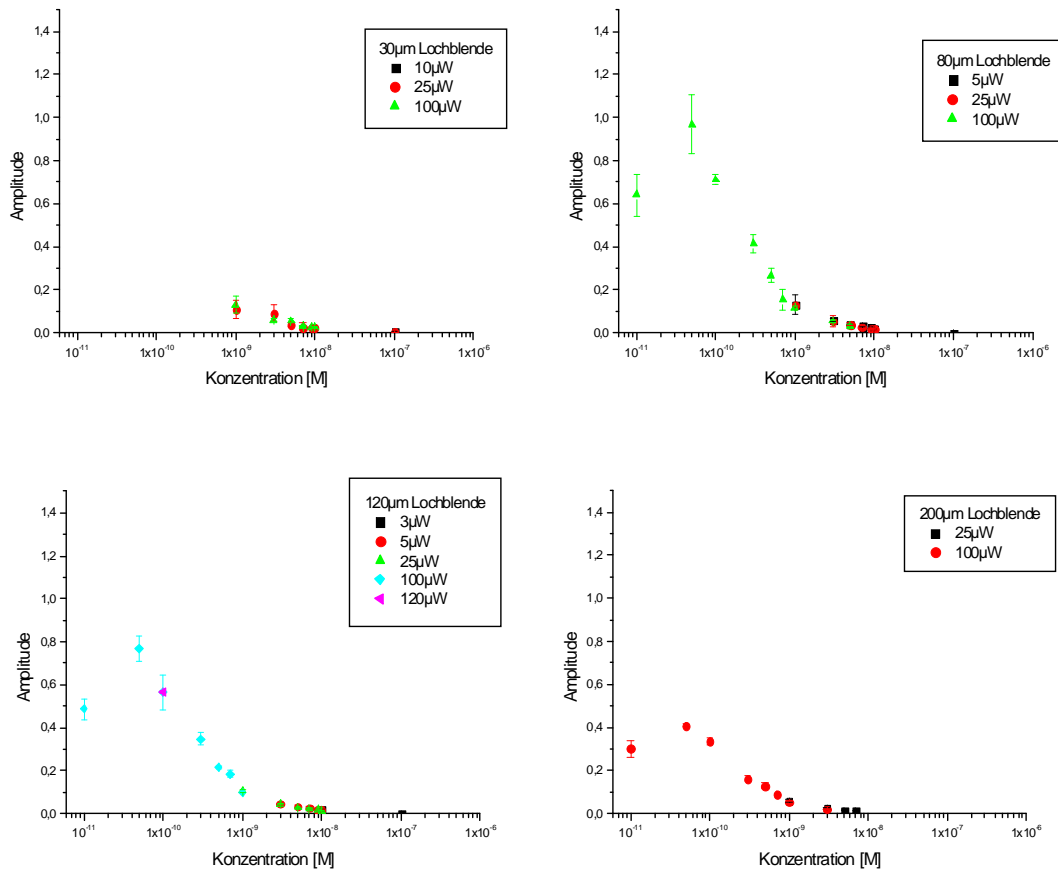
Durch diesen Effekt, der durch die Segmentierung auftritt, kann somit keine absolute Diffusionszeit angegeben werden. Da die Segmentlänge innerhalb einer Messung bzw. ganzer Messreihen jedoch konstant gehalten werden kann, sind vergleichende Messungen mit dieser Methode durchaus möglich.

Für die spätere Verwendung der „bin and correlate“-Methode wurde eine Segmentierungslänge, bzw. für das bildgebende Verfahren eine Aufnahmezeit von 100 ms pro Bildpunkt, angenommen.

## D.2.2 Voruntersuchungen Korrelation

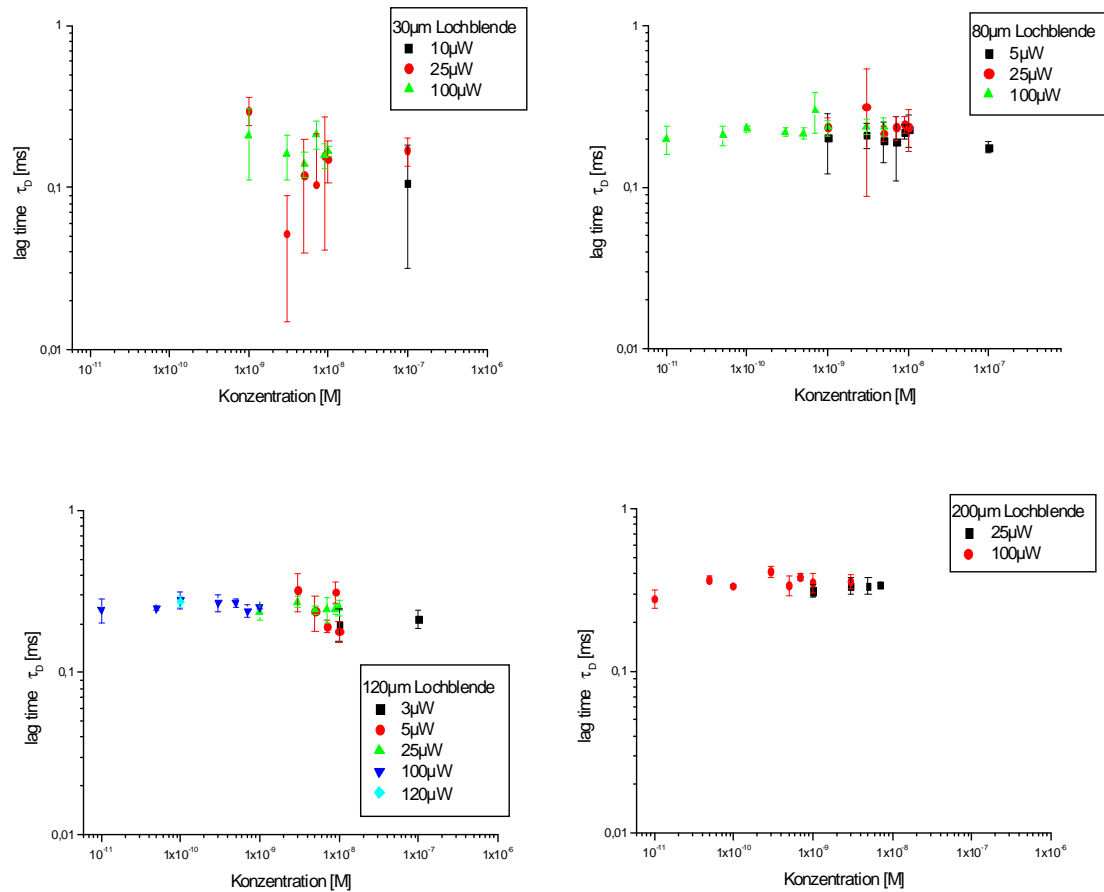
Bei den ersten Versuchen zur Bestimmung des handhabbaren Konzentrationsbereiches wurde ATTO488 als freier Farbstoff in Lösung vermessen. Für die Untersuchung wurde für jeden Datenpunkt drei 30 s Spuren aufgenommen, mittels der „bin and correlate“-Technik korreliert und anschließend analysiert. In der folgenden Abbildung 41 ist jeweils die Amplitude der errechneten Korrelationsfunktionen der drei Fluoreszenzspuren gegen die Konzentration aufgetragen. Die Diagramme unterscheiden sich in der Verwendung unterschiedlicher Lochblenden. Innerhalb eines Diagramms stellen die unterschiedlichen Farben, unterschiedliche Laserleistungen dar. Die Graphen zeigen, von hoher Konzentration kommend, einen Anstieg in der Amplitude, welcher dem Korrelationsmodell  $A \propto \frac{1}{\langle N \rangle}$  entspricht. (siehe Formel 32) Die Amplitude spiegelt auch die Größe der Fluoreszenz-

fluktuation um den Mittelwert dar. Nach Erreichen des Maximums fällt die Kurve zu noch niedrigeren Konzentrationen wieder ab.



**Abbildung 41: Amplitudendiagramme der Konzentrationsabhängigkeit mit 30, 80, 120 und 200 µm Lochblenden bei unterschiedlichen Anregungsleistungen und einer Segmentierung von 100 ms.**

Dieses Abfallen resultiert aus dem steigenden Hintergrundsignal. Aus den Graphen geht hervor, dass eine Konzentration von  $10^{-9}$  M bis  $5 \cdot 10^{-10}$  M am sinnvollsten ist. Die zusätzliche Unabhängigkeit der Amplitude von der Laserleistung ermöglicht es die Anregungsleistung bzw. die daraus resultierende Fluoreszenz, der Konzentration und der maximalen Belastbarkeit der empfindlichen Bauteile im System wie APDs, ohne Beeinflussung der Amplitude anzupassen.



**Abbildung 42: Errechnete Diffusionsgeschwindigkeiten aus den Korrelationsfunktionen der aufgenommenen Fluoreszenzspuren unterschiedlicher Konzentration. Die Graphen stellen jeweils unterschiedliche Lochblenden dar: 30, 80, 120 und 200  $\mu\text{m}$ . Die Farben repräsentieren jeweils eine Laserleistung in Kombination mit der verwendeten Lochblende.**

Die errechneten Diffusionszeiten sind in Abbildung 42 dargestellt. Die Graphen unterscheiden sich durch die unterschiedlichen Größen der Lochblenden, die jeweiligen Farben stellen die eingekoppelte Laserleistung dar. Die Diffusionszeiten sind kleineren Schwankungen der Diffusionszeiten bei unterschiedlichen Lochblendendurchmessern sind auf Ungenauigkeiten beim Einbau und der Justage der Lochblenden zurückzuführen, können aber vernachlässigt werden. Je größer allerdings die Lochblende wird, desto weniger Leistung darf in das Mikroskop eingekoppelt werden, da ansonsten der Streulichtanteil im System zu groß wird. Für die späteren DIM-Messungen wurde die 120  $\mu\text{m}$  Lochblende gewählt. Durch diese Größe konnte über den gesamten Konzentrations- und Laseranregungsbereich eine gute Korrelationen und auch gute Anpassungsergebnisse erhalten werden.

### D.2.3 Voruntersuchungen zu DIM

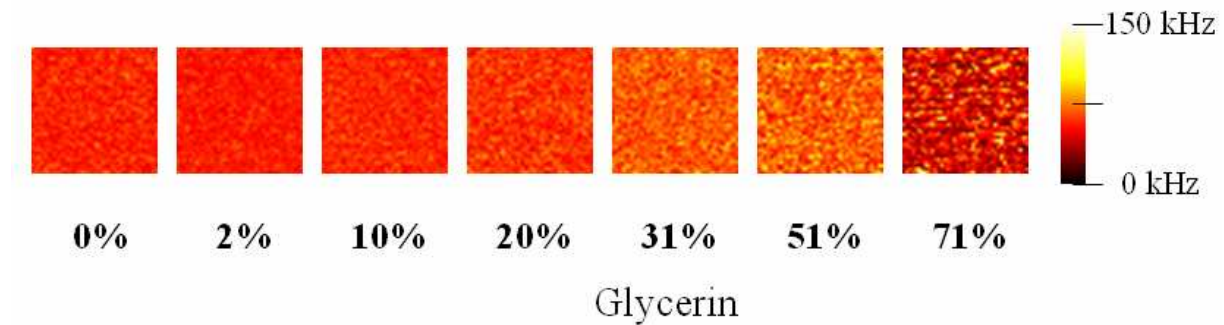
Mit der bildgebende Diffusionsmikroskopie in Verbindung mit einem konfokalen Objektscanningmikroskop mit können zwei Ansätze verfolgt werden. Zum einen ist es möglich bei langsam diffundierenden Objekten mehrmals mit der hohen Geschwindigkeit eines Laserscanningmikroskops über die Probe fahren und somit eine Korrelation über mehrere Bilder zu machen. Zum anderen hat man die Möglichkeit mit einem Objektscanningmikroskops und längerer Verweildauer pro Bildpunkt die schneller diffundieren Objekte in einem System besser zu verfolgen. Für die folgenden Experimente wurde das Objektscanningverfahren angewendet. Die Messungen wurden mit einem konfokalen Objektscanningmikroskop mit einem piezokontrolliertem Verfahrtsch betrieben. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines nichtpolarisierenden Strahlteilers auf beide APDs verteilt. Eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus ist in Kapitel C.1.1 gegeben. Zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Tetramethylrhodamin (TMR) wurde ein frequenzverdoppelter Nd:YAG (532 nm) Dauerstrichlaser verwendet.

Nach der Implementierung der Korrelation in die Bildverarbeitungssoftware erfolgten die ersten einfachen Experimente mit der bildgebenden Diffusionsmikroskopie. Hierbei wurde zunächst eine homogene wässrige Lösung mit einem TMR markierten-Oligonukleotid (dT<sub>20</sub>) abgetastet.

Bei gleich bleibender Farbstoffkonzentration wurde die Viskosität verändert, um sich ein Bild von der zu erwartenden Änderung des Kontrasts zu machen. Die Variation der Viskosität hat zur Folge, dass sich damit die Diffusionskonstante und somit auch die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle verändert. Die unterschiedlichen Glycerinkonzentrationen wurden durch Mischen eines Glycerin/PBS-Puffergemisches eingestellt und anschließend mit dem Farbstoff versetzt.

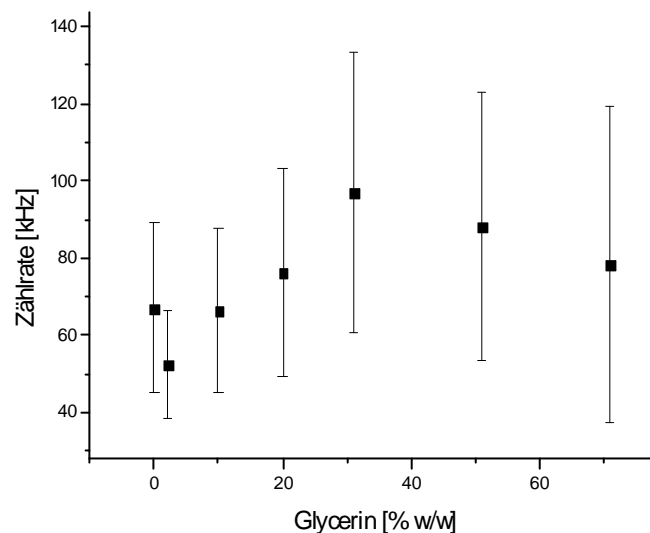
Die Resultate des Experiments sind in Abbildung 43 und Abbildung 45 dargestellt. In Abbildung 43 sind die Intensitäten der Messungen dargestellt. Die Lösung wurde mit folgenden Parametern abgetastet: Bildgröße 2x2  $\mu\text{m}^2$ , Auflösung 50 nm/Bildpunkt, Verweilzeit 100 ms/Bildpunkt. In den Bildern zeigt sich mit höherer Glycerinkonzentration ein stärker werdendes Rauschen der Fluoreszenzintensität. Hervorgerufen durch die verlangsamte Diffusion im Medium verbleiben die Moleküle länger im Beobachtungsvolumen und können somit mehr Fluoreszenz emittieren. Ebenso wird die Häufigkeit der Anzahl durch den Fokus diffundierenden Fluorophore geringer, was zur Folge hat, dass es in der Aufnahme zu Bildpunkten kommen kann in denen es weniger Fluoreszenzintensität gibt.

Anders gesagt, durch beibehalten der Konzentration kommt es im Mittel zu weniger Fluorophoren im Beobachtungsvolumen, also seltener registrierte Diffusionen, die jedoch aufgrund der längeren Verweildauer mehr Photonen emittieren. Da die Experimente in homogenen Lösungen durchgeführt wurden, sind die in den Bildern beobachteten Schwankungen ein Maß für die zu erwartende Genauigkeit der Methode.



**Abbildung 43: Intensitätsbilder einer TMR-dT<sub>20</sub> Farbstofflösung in unterschiedlichen Glycerin/PBS-Pufferlösungen.**

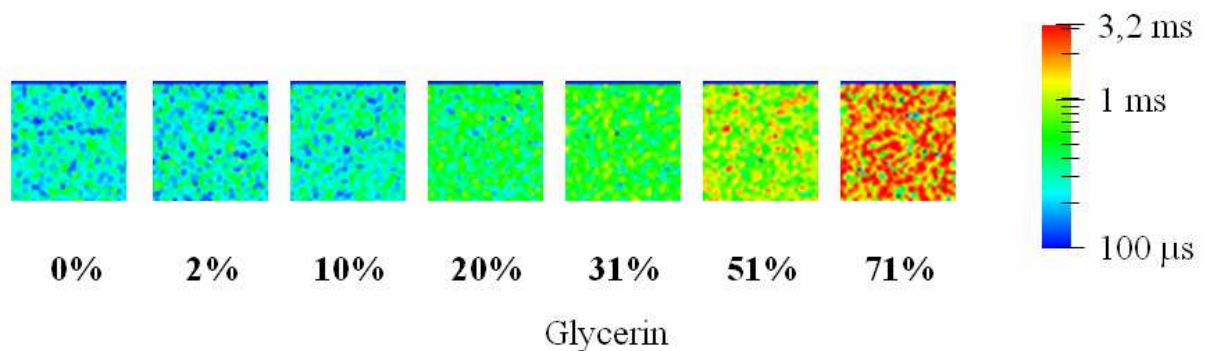
In Abbildung 44 ist die durchschnittliche Zählrate pro Bildpunkt, der in Abbildung 43 gezeigten Daten, gegen die Glycerinkonzentration aufgetragen. Während die durchschnittliche Zählrate um einen Wert von 80 kHz (Photonen pro Sekunde) schwankt, nimmt die Standardabweichung zu höheren Glycerinkonzentrationen zu. Dies drückt sich in den gezeigten Bildern durch das Rauschen in der Farbgebung aus.



**Abbildung 44: Vergleich der durchschnittlichen Zählrate in Abhängigkeit der Glycerinkonzentration. Mit zunehmender Glycerinkonzentration nimmt die Standardabweichung zu.**

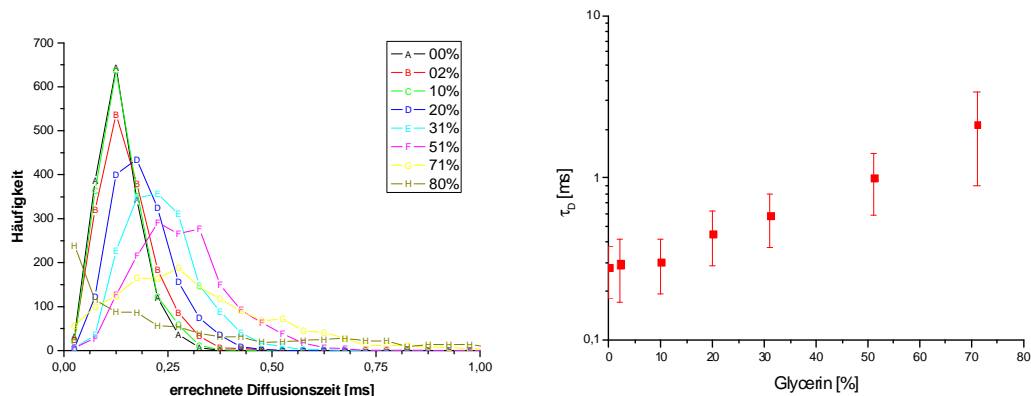
Die aus den Rohdaten der Bilder errechnete Korrelationsfunktion und anschließend bestimmte Diffusionsgeschwindigkeit ist in Abbildung 45 abgebildet. Die Diffusionszeiten

sind farbkodiert und logarithmisch aufgetragen. Deutlich ist bei steigender Glycerinkonzentration der Anstieg der Diffusionsgeschwindigkeit zu erkennen. Ebenso wie bei dem Intensitätsbild steigt das Rauschen, also die Streuung der Diffusionszeiten aus den Bildpunkten an. Vergleicht man das Intensitätsbild von einer Glycerinkonzentration von 71% mit dem berechneten Diffusionsbild, so lassen sich die Bereiche mit einer schnellen Diffusion mit den Bereichen geringer Intensität vergleichen. Wenige Farbstoffe emittieren weniger Photonen mit aus denen eine verrauschte Korrelation entsteht, die mit einer schlechten Güte an die Modellfunktion angepasst werden kann.



**Abbildung 45: Messung der Diffusionszeiten in Vergleich mit steigender Glycerinkonzentration (v/v).**

Die gemittelte Diffusionszeit über die Bildpunkte der jeweiligen Glycerinkonzentrationen mit den zugehörigen Fehlern ist in Abbildung 46 dargestellt. Wie auch schon aus den Bildern zu erkennen, steigt die Diffusionszeit mit der Glycerinkonzentration an, zusätzlich wird auch die Streubreite der ermittelten Diffusionszeiten größer, was wiederum auf eine Obergrenze in Bezug auf die Diffusionszeit bzw. die Viskosität hinweist. Ab einem Anteil von ca. 70% Glycerin, was etwa einer durchschnittlichen Diffusionszeit von 2 ms entspricht, sind keine verlässlichen Aussagen über Diffusionszeit mehr möglich. Aus den Diffusionszeiten lässt sich der Diffusionskoeffizient bestimmen und mit Hilfe der Viskosität (*dargestellt in* Abbildung 47) der hydrodynamische Radius. (*siehe* Formel 33 und Formel 34)



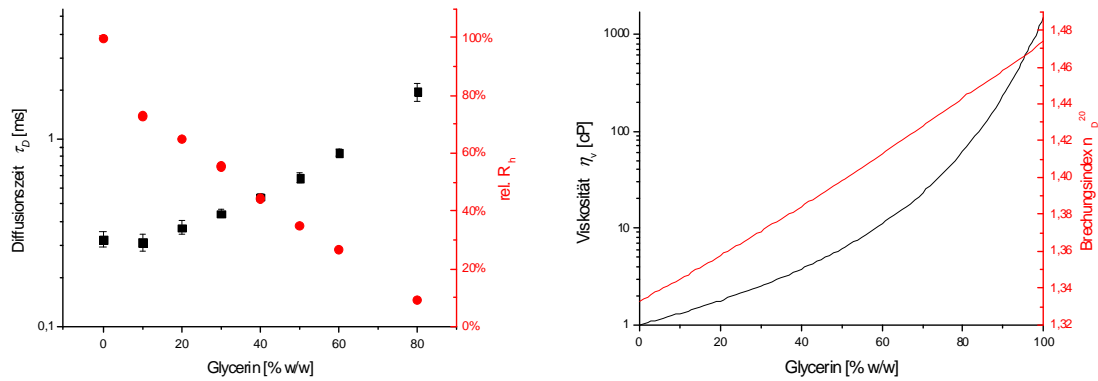
**Abbildung 46:** Graphische Darstellung der bestimmten, mittleren Diffusionszeit der Bilder gegen die Glycerinkonzentration.

Die aus den Experimenten gewonnenen Diffusionszeiten lassen sich zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius heranziehen. Dazu gilt folgende Formel:

$$\left. \begin{aligned} \tau_D &= \frac{r_0^2}{4D} \\ D &= \frac{kT}{6\pi \cdot \eta_v \cdot R_h} \end{aligned} \right\} R_h = \frac{2 \cdot kT \cdot \tau_D}{3\pi \cdot \eta_v \cdot r_0^2} \quad \text{Formel 46}$$

Die in Abbildung 47 links gezeigten Daten zeigen zum einen die Diffusionszeit (*schwarz*), bestimmt aus den Korrelationen der Bildpunkte, und den hydrodynamischen Radius (*rot*) an. Dieser ist relativ aufgetragen, d.h. normiert auf den Wert bei 0% Glycerin, und zeigt eine Abnahme des hydrodynamischen Radius bei höheren Glycerinkonzentrationen. Der Effekt der Erhöhung der Viskosität durch Glycerinzugabe, abgebildet in Abbildung 47 rechts (*schwarz*), trägt zu einer Erhöhung der Diffusionszeit bei. Zusätzlich zur Erhöhung der Viskosität<sup>87</sup> steigt die Apolarität des Mediums und führt so wahrscheinlich zu Konformationsänderungen des TMR-Oligonukleotid-Konstrukts, die den hydrodynamischen Radius beeinflussen. Von der optischen Seite her gesehen, steigt der Brechungsindex<sup>87</sup> der Lösung und es kommt zu ungewollten, nicht vermeidbaren, Abberationen, die die Optik verzerren.





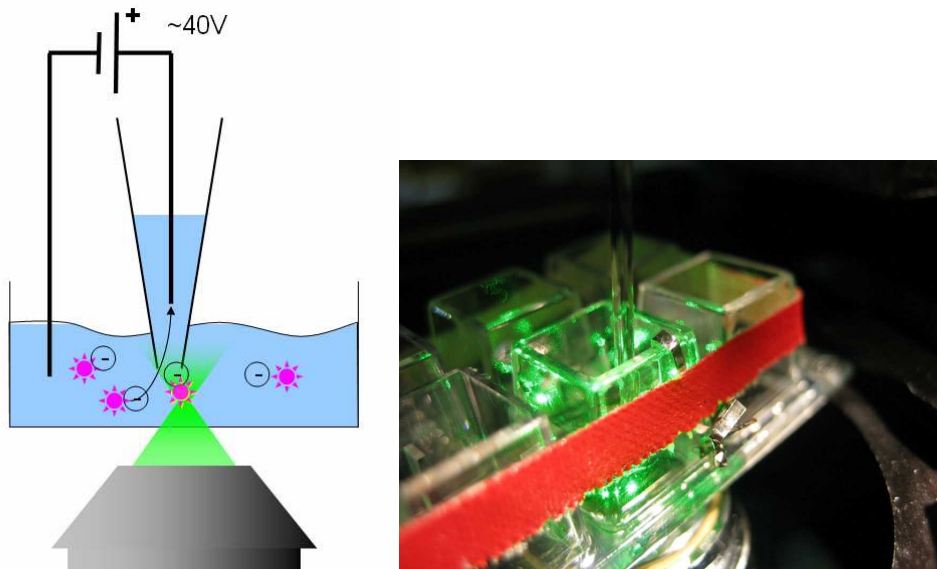
**Abbildung 47:** *Links:* Aufgetragen ist hier die Diffusionszeit (*schwarz*) und der, aus der Diffusionszeit bestimmte, relative hydrodynamische Radius (*rot*) gegen die Glycerinkonzentration. Der hydrodynamische Radius bei 0% Glycerin entspricht 100% und nimmt zu höheren Glycerinkonzentration ab. *Rechts:* Graphen über die Eigenschaften eines Glycerin/Wasser-Gemisches: Zum einen die Viskosität bei 20°C (*schwarz, die Werte sind logarithmisch aufgetragen*) und der Brechungsindex bei 20°C (*rot*). (siehe Referenz 87)

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Glycerinkonzentrationserhöhung und die damit einhergehende Erhöhung der Viskosität zur Erhöhung der Diffusionszeit führt, welche auch mit der Methode erkannt werden kann. Eine exakte Bestimmung der Diffusionskonstante ist jedoch nicht möglich, da selbst kleinste Veränderungen im Brechungsindex der Lösung den Diffusionskoeffizienten beeinflussen.<sup>88,89</sup> Durch Verwendung eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur und der Detektion der Fluoreszenz durch das selbe Objektiv, bekommt der Brechungsindex des Immersionsmediums eine nicht zu verachtende Bedeutung. Wie schon in der Literatur erwähnt soll für die exakte Bestimmung der Diffusionszeiten der Brechungsindex der Messlösung mit dem des Immersionsmediums übereinstimmen. Kleine Abweichung führen zu einer Abberation, welche das Zentrum der Anregung und der Detektion entlang der optischen Achse verschieben. Dies führt zu einer Vergrößerung des Detektionsvolumens und zu einem kleineren Diffusionskoeffizienten, und somit zu höheren Diffusionszeiten. Zu diesem Effekt konnte die Veränderung der Konformation des Farbstoff-Oligonukleotid-Konstrukts, welcher, wie schon beschrieben, einen Einfluss auf die Diffusionszeit hat.

## D.2.4 Das Mikrokapillarexperiment

Das Ziel dieses Experimentes war, es den Beweis anzutreten, dass die Idee der *Diffusion Imaging Microscopy* funktioniert. Hierzu wurde eine Mikrokapillare (Femtotip<sup>®</sup>, Eppendorf, Deutschland) in eine Halterung gespannt, die auf dem piezogesteuerten

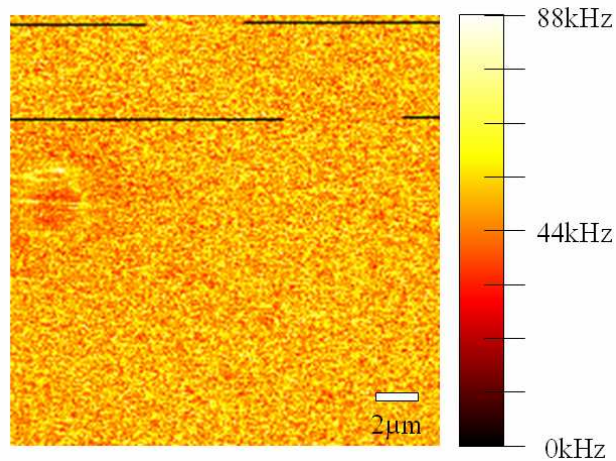
Objekttisch fixiert wurde und sich während des Experiments mitbewegt (*siehe* Abbildung 48). Die Mikrokapillare stand parallel zur optischen Achse und tauchte in eine Kammer eines Kammerdeckgläschen (LabTek<sup>®</sup>-Kammer, Nunc, Deutschland) welche mit einer Lösung von Tetramethylrhodamin markiertem Oligonukleotid gefüllt war. In die Mikrokapillare wurde eine Platinelektrode eingeführt und an ein Spannungsversorgungsgerät, als Anode, angeschlossen. Der Gegenpol, ebenfalls ein Platindraht, tauchte in die Lösung ein.



**Abbildung 48:** *Links:* Schematischer Aufbau des Vorexperiments mit der Mikrokapillare. Die Mikrokapillare befindet sich auf dem Verfahrtschiff und wird zusammen mit der Kammer über das Mikroskopobjektiv gefahren. *Rechts:* Ein Photo des Versuchsaufbaus. Am rechten Rand der Kammer ist die Gegenelektrode zu erkennen.

Nach dem Fokussieren des Laserstrahls (Nd:YAG, 532 nm) auf die Höhe der Öffnung der Mikrokapillare konnte mit der Messung begonnen werden. Durch Anlegen einer Spannung bewegen sich die Moleküle auf die Anode zu, das heißt in die Mikrokapillare hinein. Die so erzeugte gerichtete Bewegung der Farbstoffe soll sich in der Diffusionszeit um die Öffnung der Mikrokapillare, die im intakten Zustand einen Innendurchmesser von 500 nm und einem Außendurchmesser von 1,0  $\mu\text{m}$  hat, bemerkbar machen.

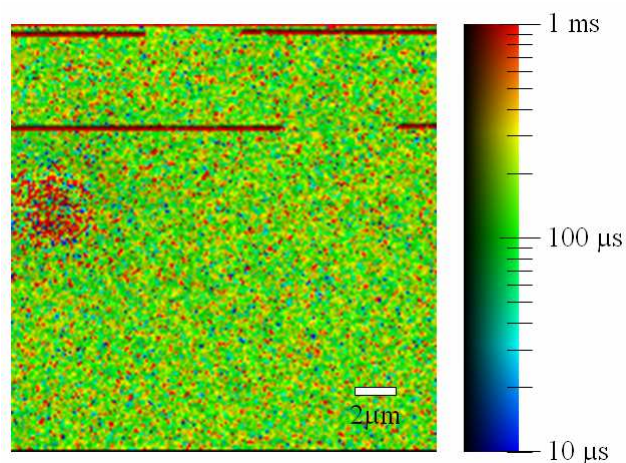
Für die Messungen wurden folgende Parameter gewählt: Auflösung 50 nm/Bildpunkt, Verweilzeit 25 ms/Bildpunkt. Die Größe des abgetasteten Bereiches betrug  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ . Abbildung 49 zeigt das Intensitätsbild einer in eine Lösung getauchte Mikrokapillare. Deutlich ist am linken Bildrand die (in der Spitze abgebrochene) Mikrokapillare zu erkennen.



**Abbildung 49: Fluoreszenzintensitätsbild einer in eine Lösung getauchten Mikrokapillare. Im linken Bildrand ist die Mikrokapillare zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität ist über das Bild hinweg homogen verteilt ( $50,1 \text{ kHz} \pm 8,9 \text{ kHz}$ ).**

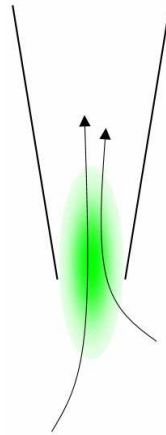
Die Intensität ist über das Bild hinweg homogen verteilt, nur um die Öffnung der Mikrokapillare ist sie möglicherweise aufgrund von Reflexionen leicht erhöht. Der Mittelwert der Intensität beträgt  $50,1 \text{ kHz}$  mit einer Standardabweichung von  $8,9 \text{ kHz}$ . Die schwarzen Streifen entstanden durch blockieren des Laserstrahls zur Höhenkontrolle des Fokus.

Nach Anwendung der Korrelation auf jeden Bildpunkt und entsprechender Zusammenfassung der Bildpunkte gemäß der oben erwähnten Glättung (siehe C.4.3 und Abbildung 14) wurde das in Abbildung 50 dargestellte Diffusionsbild erzeugt. Deutlich zu erkennen ist der Bereich in dem die Kapillare eintaucht. Sie zeigt eine erhöhte Diffusionszeit, wohingegen die Lösung außerhalb der Kapillare eine nahezu einheitliche Verteilung schnellerer Diffusionszeiten liefert.



**Abbildung 50: Errechnet Diffusionsbild. In der Gegend der Öffnung der Mikrokapillare ist eine Erhöhung der Diffusionszeit zu erkennen.**

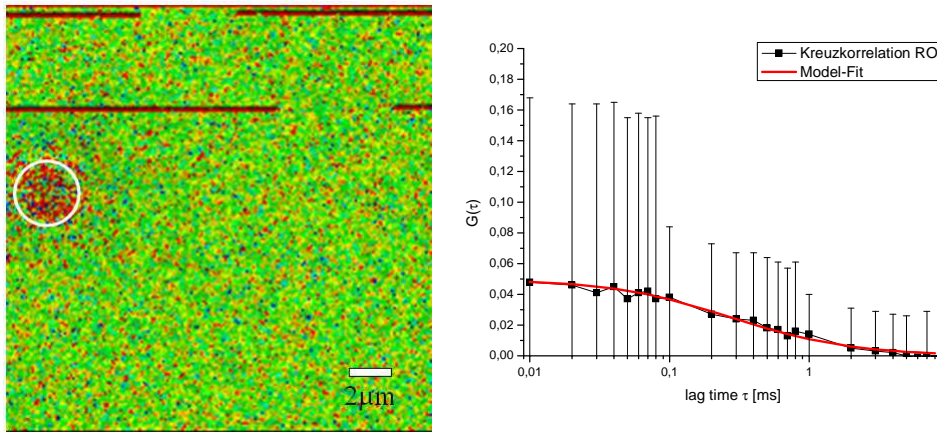
Die Erhöhung der Diffusionszeit um die Mikrokapillare ist vermutlich auf zwei Ursachen zurückzuführen: Zum einen ist das Anregungsprofil des Lasers in der konfokalen Mikroskopie entlang der optischen Achse gestreckt. Das Laserprofil hat einen in der optischen Achse gestrecktes dreidimensionales GAUSS-Profil, was einem Ellipsoiden entspricht.



**Abbildung 51:** Die gerichtete Diffusion entlang der optischen Achse vergrößert die errechnete Diffusionszeit. Grün dargestellt ist die ungefähr dreifach längere Ausdehnung des Laserfokus entlang der optischen Achse.

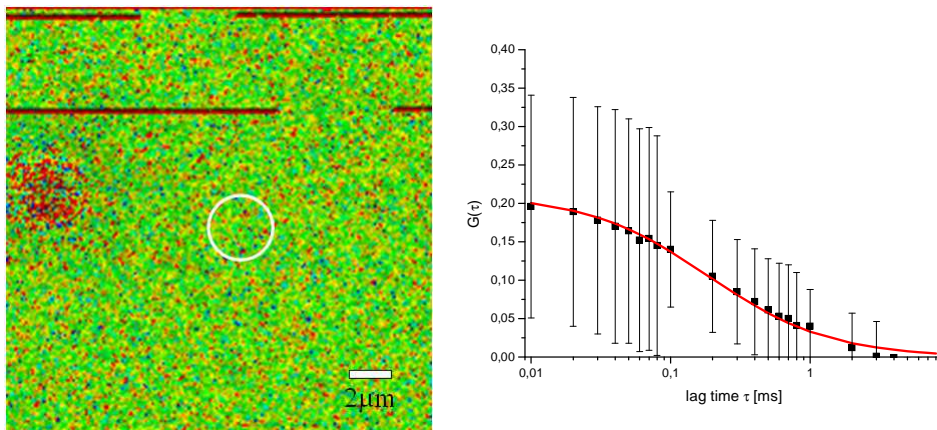
Abbildung 51 verdeutlicht noch einmal die Asymmetrie des Laserfokus und die durch ihn diffundierenden Moleküle. Da die Diffusion aufgrund des elektrischen Feldes entlang der optischen Achse bevorzugt wird, verlängert sich die Verweildauer der Farbstoffe im Detektionsvolumen und es kommt somit zu einer scheinbaren Verlängerung der Diffusionszeit. Zusätzlich zu der gerichteten Bewegung entlang der optischen Achse kommt der Effekt, dass der Puffer in der Mikrokapillare 20% Glycerin enthält. Hierdurch wird jedoch geringerer Einfluss auf die Diffusionszeit erwartet, wie in Abschnitt D.2.3 gezeigt.

In Abbildung 52 ist *links* der Bereich um die Öffnung markiert. Die dazugehörige über diesen Bereich gemittelte Korrelation ist im Diagramm *rechts* gezeigt. Die Anpassung an die Modelfunktion ergibt eine Diffusionszeit von 0,28 ms und einer Amplitude von 0,05.



**Abbildung 52:** Links der im Bild ausgewählte Bereich (*weißer Kreis*) um die Öffnung der Mikrokapillare. Rechts die über diesen Bereich gemittelte Korrelation mit Standardabweichung und dazugehöriger Modellfunktion (*rot*).

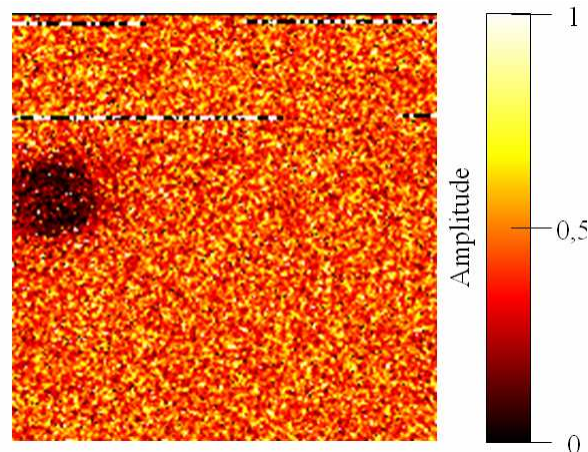
Im Gegensatz dazu liefert die Korrelation eines Bereichs gleicher Größe diesmal jedoch in der Lösung (*siehe* Abbildung 53) eine kürzere Diffusionszeit von etwa 0,18 ms und einer Amplitude von 0,21.



**Abbildung 53:** Links der ausgewählte Bereich (*weiß*) in der Lösung. Rechts die dazugehörige Korrelation mit Ausgleichsfunktion (*rot*).

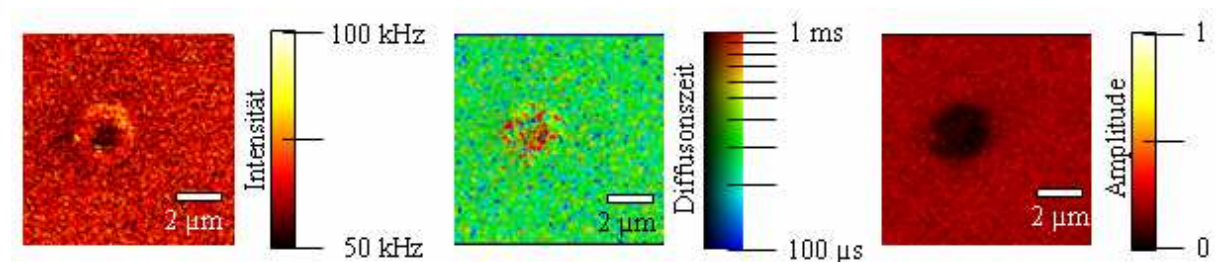
Die beiden erhaltenen Diffusionswerte um die Kapillaröffnung, sowie in der Lösung zeigen unterschiedliche Zeiten, bestimmt durch gut angepasste Ausgleichsfunktionen.

Das zugehörige Amplitudenbild (*siehe* Abbildung 54) zeigt ein Absinken der Amplitude im Bereich der Kapillare. Dies entspricht, gemäß der Beziehung der Amplitude zur Konzentration, bzw. der Teilchenzahl  $A \propto \frac{1}{\langle N \rangle}$  einer Konzentrationserhöhung. Eine Konzentrationserniedrigung kann aufgrund der Fluoreszenzintensität in diesem Bereich ausgeschlossen werden.



**Abbildung 54: Errechnetes Amplitudenbild. In der Gegend der Kapillaröffnung ist eine Absenkung in der Amplitude, also einen Anstieg in der Teilchenzahl zu erkennen.**

Abbildung 55 zeigt ein weiteres Bild einer Mikrokapillare. Im Inneren der Mikrokapillare ist eine deutliche Erhöhung der Diffusionszeit zu erkennen.



**Abbildung 55: Intensitätsbild (links), Diffusionsbild (mitte) und Amplitudenbild (rechts) einer Mikrokapillare. 10 x 10 µm, 100 nm/pixel, 100 ms/pixel.**

### D.2.5 DIM in Zellen

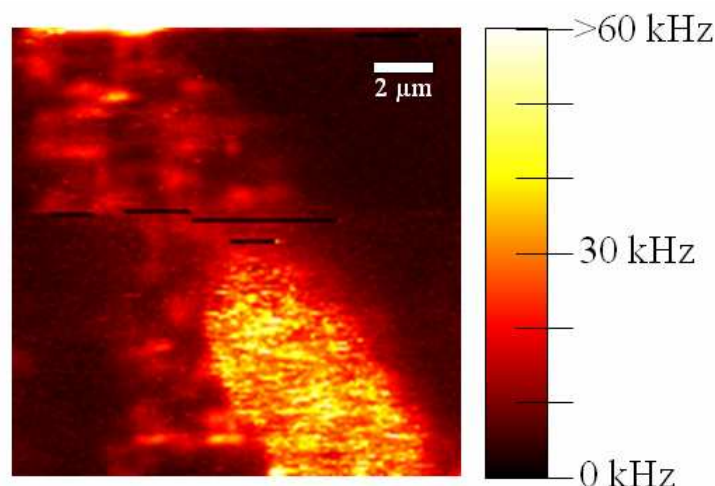
Die bisher vorgestellten Experimente zeigen, dass mit der entwickelten Methode der bildgebenden Diffusionsmikroskopie Änderungen in den Diffusionszeiten bildlich dargestellt werden können. Bisher konnten die Unterschiede in der Diffusionszeit aufgrund erhöhter Viskosität, bzw. unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld untersucht werden. Im Folgenden wird die bildgebende Diffusionsmikroskopie auf Zellen angewandt. Die Herausforderung der bildgebenden Diffusionsmikroskopie in der Zelle ist die Aufdeckung von Heterogenitäten in der Dynamik von Zellen z.B. hervorgerufen durch aktiven Transports entlang von Tubulin, oder durch verlangsamte Diffusion, z.B. durch Interaktion mit Proteinen oder Viskositätsunterschiede in Zellkompartimenten.

Für die Experimente in Zellen wurden in Kammerdeckgläschen kultivierte 3T3 Mausfibroblasten verwendet. 3T3 ist eine adhärent wachsende Zelllinie aus dem Organismus der Maus. Die Inkubation der Zellen erfolgte über 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit

$5 \cdot 10^{-9}$  M ATTO488-Oligonukleotid in Wachstumsmedium. Nach der Inkubation mit ca. 300  $\mu$ l Lösung wurde zweimal mit einer erwärmten PBS-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zugabe von Medium wurden die Zellen vor der Vermessung für weitere 30 min im Brutschrank belassen.

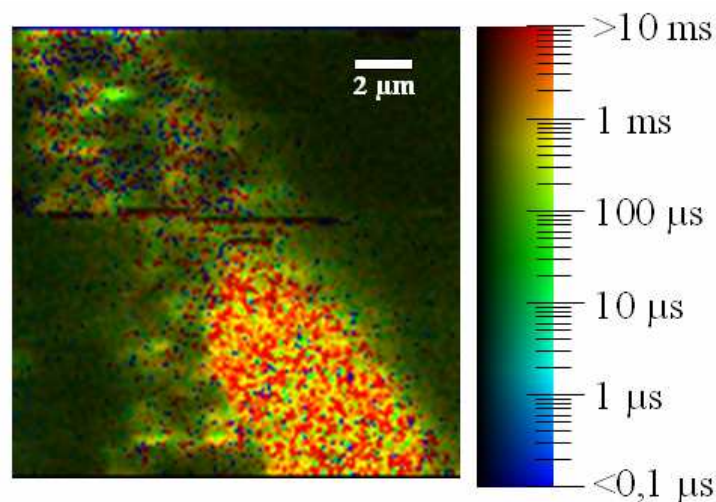
Eine Messung einer so behandelten Zelle ist in Abbildung 56 dargestellt. Für dieses Bild wurden 100 ms pro Bildpunkt aufgenommen, die Schrittweite zwischen den Bildpunkten beträgt 100 nm.

Auf dem Bild (*siehe* Abbildung 56) ist die Begrenzung der Zelle deutlich zu erkennen. Das Zytosol zeigt eine Autofluoreszenz von ca. 20 kHz, wohingegen der Zellkern eine Fluoreszenz von bis zu 50 kHz zeigt. Die Fluoreszenz des Zytosols ist räumlich lokalisiert und zeigt wenig Fluoreszenzfluktuation, was auf Autofluoreszenz schließen lässt. In den ersten Zeilen des Bildes lässt sich der Prozess der Photozerstörung erahnen, dort zeigt das Zytosol eine stärkere Fluoreszenz als in den folgenden Zeilen des Bildes. Der Zellkern hingegen zeigt Fluoreszenzfluktuationen im 100 ms-Bereich. Aufgrund des Zeilenweisen Abtastens treten auch gelegentlich Moleküle in den Fokus, die während einer Zeile sich kurzzeitig in einer Region aufhalten und eventuell sogar in der Abtastrichtung weiter diffundieren. Beim Abtasten der nächsten Zeile sind diese Moleküle aus der Region diffundieren. Dies führt zu dem im Bild zu sehenden Streifen. Außerhalb des Zellkerns, im Zytosol, ist nur ein wenig Autofluoreszenz zu sehen. Eine Fluoreszenz des Farbstoffs kann nicht beobachtet werden, da wahrscheinlich vorzeitiges Photobleichen außerhalb des Beobachtungsbereiches den Farbstoff für die Fluoreszenz unbrauchbar machte.



**Abbildung 56: Intensitätsbild eines 3T3 Mausfibroblasten. Innerhalb des Zellkerns, in dem die höchste Fluoreszenzintensität auftritt, zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensität ein stark verrauschtes Muster.**

In der Korrelationsauswertung in Abbildung 57 ist die Diffusionszeit kombiniert mit der Fluoreszenzintensität gezeigt. Je mehr Photonen in einem Bildpunkt zur Korrelation zur Verfügung standen, desto farbintensiver wird die Diffusionszeit dargestellt. Die Diffusionszeiten wurden mit der glättenden Methode dargestellt (*siehe* C.4.3). Die Fluoreszenzfluktuationen der Farbstoffmoleküle zeigen in jedem Bildpunkt mit ausreichender Intensität eine langsamere Diffusion des Oligonukleotidkonstrukts im Zellkern, als in freier Lösung. Aufgrund der höheren Viskosität welche durch Salze, Proteine, DNA und andere Stoffe im Zellkern resultiert, kommt es zu einer langsameren Diffusion und somit zu einer höheren Diffusionszeit, als in freier Lösung. Diese Heterogenität im Zellkern kann mehrere Ursachen haben. Z.B. kann diese durch Interaktion des Farbstoff-DNA-Konstrukts mit im Zellkern befindlichen Proteinen stattfinden. Möglich wären ebenso Wechselwirkungen mit den Chromosomen, RNA-Replikationszentren oder dergleichen.



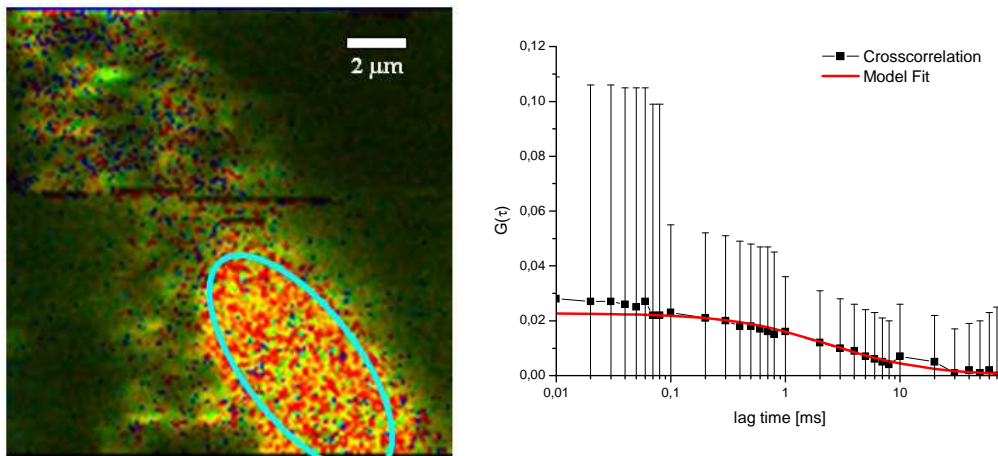
**Abbildung 57: Kombiniertes Intensitäts- und geglättetes Diffusionsbild. Je mehr Fluoreszenzphotonen in einem Bildpunkt zur Korrelation zur Verfügung standen, desto heller, bzw. Farbintensiver wird die Diffusionszeit dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der Zellkern, in der unteren rechten Bildhälfte.**

Die angegebenen Diffusionszeiten stellen hier nur relative Werte dar. Die Veränderungen der Diffusionszeiten sollte hier ebenfalls relativ gesehen werden.

In Abbildung 58 wurde aus dem Diffusionsbild ein Bereich genommen, über den eine Korrelation, Bildpunkt für Bildpunkt mit anschließender Aufsummierung erstellt wurde. Die gemittelte Kreuzkorrelation auf der rechten Seite zeigt eine Verlangsamung der Diffusion. Die Diffusionszeit liegt hier bei 2,7 ms. Aufgrund der starken Schwankungen der Diffusionszeiten, welche man an Hand der Falschfarbkodierung im Diffusionsbild erkennen kann, zeigt die gemittelte Korrelation auch einen großen Fehler. Die große Schwankungsbreite der Korrelationsfunktion rührt aus den einzelnen Korrelationen her. Nicht

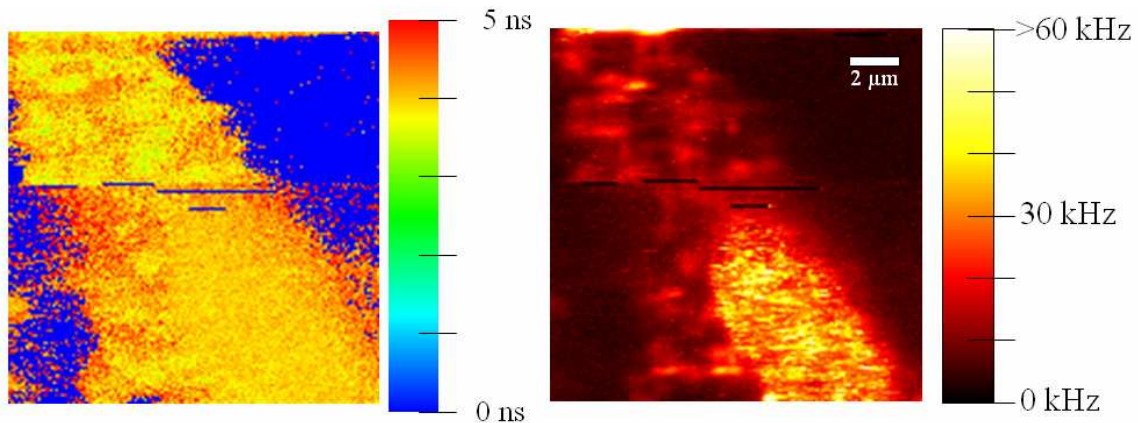


nur Schwankungen in der Diffusionszeit, sondern auch Schwankungen in der Amplitude, die in erster Näherung auch grob mit der Fluoreszenzintensität korrelieren, führen zu den großen Fehlerbalken der Korrelationsfunktion.



**Abbildung 58:** Links: Diffusionsbild mit der „region of interest“ (türkis). Rechts: die dazugehörige gemittelte Kreuzkorrelation, über den markierten Bereich, welche einer höheren Diffusionszeit entspricht, als dem freien Farbstoff-DNA-Konstrukt in Lösung. ( $A = 0,022$ ;  $\tau_D = 2,7$  ms)

Durch Verwendung gepulster Laseranregungsquellen konnte zusätzlich die Fluoreszenzlebensdauer aus den Mikrozeiten der einzelnen Photonen bestimmt werden. Bei geeigneter Auswahl des Farbstoffs könnte es gelingen, die Autofluoreszenz der Zelle von der des Fluoreszenzfarbstoffes zu diskriminieren. In Abbildung 59 ist das zu der Zelle zugehörige Fluoreszenzlebensdauerbild dargestellt.



**Abbildung 59:** Fluoreszenzlebensdauerbild (links) und Fluoreszenzintensitätsbild (rechts) der 3T3-Zelle. Nur Bildpunkte ab einer Anzahl von 500 Photonen wurden zur Lebensdaueranalyse herangezogen. Alle Bildpunkte mit weniger Photonen sind blau dargestellt.

Die Bildpunkte in Abbildung 59 zeigen die Fluoreszenzlebensdauer farbkodiert. Diejenigen Bildpunkte, die die Mindestanzahl von 500 Photonen nicht erreicht haben sind hier blau dargestellt. Innerhalb des Zellkerns wurde eine Fluoreszenzlebensdauer von ca.

3,8 ns bestimmt. In helleren Bereichen des Zytosols zeigt die Fluoreszenzlebensdaueranalyse einen Wert von ca. 3,0 ns an, die in dem Bild etwas grünlicher erscheinen. Der Literaturwert von freiem ATTO488 besagt eine Fluoreszenzlebensdauer von 3,2 ns voraus. Eine Diskriminierung anhand der Fluoreszenzlebensdauer scheint hier keine verlässliche Unterscheidung des Farbstoffs zur Autofluoreszenz zu ergeben.

Es konnte gezeigt werden, dass die bildgebende Diffusionsmikroskopie auf Zellsysteme funktioniert. Das Ziel der Entwicklung ist es jetzt diese Technik auf Systeme mit biologischer Fragestellung auszuweiten und Unterschiede in der Diffusion innerhalb zellulärer Strukturen zu erforschen.

---

## **E DISKUSSION UND AUSBLICK**

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt und ihre Einsetzbarkeit für Experimente untersucht. Das Ziel war die Beobachtung von Transportprozessen in Zellen mit den Methoden der Einzelmolekülspektroskopie.

Ein Schwerpunkt der Arbeit setzt sich mit dem gezielten Transport markierter Sonden auseinander. Insbesondere der Transport von den aus  $\beta$ -Arginin bestehenden Peptiden stand im Vordergrund. Zur Beobachtung der Transportwege der Peptide in den Zellen wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Methode entwickelt um Transportprozesse, sowie Interaktion in der Zelle räumlich aufzulösen. Die entwickelte Methode basiert auf der Messung der Diffusionszeiten fluoreszenter Sonden, welche zunächst in einem Modellsystem und schließlich in Zellen untersucht wurde.

### ***E.1 ZELLMEMBRANGÄNIGE PEPTIDE***

Die ersten Untersuchungen zur Aufnahme des Tat-Proteins in Zellen wurden bereits von FRANKEL und PABO 1988 gemacht. Die von ihnen synthetisierten Argininoligomere zeigten eine die gleiche und teilweise bessere Aufnahmeeffizienz in die Zellen als das Tat-Protein selbst, und legten daher die Vermutung nahe, dass es sich um PTD- bzw. NLS-Sequenzen handelt. Beim Austausch von  $\alpha$ -L-Arginin durch  $\alpha$ -D-Arginin, sowie der Verwendung des Retro-inversen des Tat-Proteins, konnte eine erhöhte Aufnahme in die Zellen beobachtet werden. Ein aktiver Transport, der für die Aufnahme der Zellen verantwortlich sein könnte, kann bisher ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Fluorescein markierten Peptiden auf die Zellen untersucht, welche aus den  $\beta$ -Homologen der Aminosäure Arginin synthetisiert wurden. Durch die Verwendung von Peptiden aus  $\beta$ -Aminosäuren kann ein enzymatischer Abbau durch die nativen Peptidasen unterbunden werden, was das Peptid intra- sowie extrazellulär langlebiger macht. Die Markierung der Peptide am C-Terminus mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein erlaubte die Beobachtung der Aufnahme des Peptids. Erste Untersuchungen aus dem Jahr 2002 zeigten erfolgreiche Aufnahme des Fluorescein markierten  $(\beta\text{-Lysin})_7$  und  $(\beta\text{-Arginin})_7$  in Zellen.<sup>59</sup> Ein Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Mindestlänge der  $\beta$ -Argininkette, welche zur Aufnahme in Zellen notwendig

ist. Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit vorhergehenden Arbeiten, dass zur Aufnahme der Peptide in die Zellen eine gewisse Schwellkonzentration benötigt wird.<sup>82</sup>

Zur Bestimmung der Mindestlänge an  $\beta$ -Argininen, die zu einem Internalisierungsprozess notwendig sind, standen vier verschiedene Kettenlängen des  $\beta$ -Peptids zur Verfügung, sowie eine Negativkontrolle. Die Versuche wurden zur Vergleichbarkeit der Experimente, mit den ersten Experimenten mit  $\beta$ -Peptiden, in HeLa-Zellen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass eine messbare Aufnahme der Peptide ab einer Kettenlänge von acht Aminosäuren, und dies innerhalb von 1-15 Minuten, stattfindet. Eine vollständige Markierung aller Zellen mit dem markierten Peptid erforderte jedoch eine Kettenlänge von mindestens zehn Argininen. Fluoreszenzbilder wurden sowohl mit einem Epifluoreszenzmikroskop mit Weitfeldanregung und einer CCD-Kamera, als auch mit einem Laserscanningmikroskop aufgenommen. Für eine Kettenlänge von zehn Argininen konnte eine deutliche Anreicherung der Peptide in den Nukleoli des Zellkerns beobachtet werden, während bei einer Kettenlänge aus acht  $\beta$ -Argininen lediglich ein Teil der Zellen diese Anreicherung zeigte.

Zur Bestimmung der Schwellkonzentration für die Aufnahme der Peptide Mindestkonzentration wurden verschiedene Zellen mit einer definierten Konzentration des Dekamers eines  $\beta$ -Arginins versetzt. In diesen Experimenten wurde eine Mindestkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  festgestellt werden. Das Ziel weiterer Experimente war den Aufnahmeprozess mit photostabileren Halbleiternanokristallen zu verfolgen. Durch Verwendung des biotinylierten Arginin-Dekamers zusammen mit Streptavidin modifizierter Halbleiternanokristalle ist eine Agglomeration an wenigen Stellen in der Zellmembran zu beobachten, wobei die Zellen keine Aufnahme des Halbleiternanokristalls zulassen. Eine möglicherweise zu geringe lokale Konzentration des Peptids an der Zellmembran kann der fehlende Auslöser sein. Zusätzlich können Peptidasen, die sich in der Umgebung der Zelle aufhalten, das hier verwendete  $\alpha$ -Peptid schon teilweise degradiert haben und somit das Peptid unter die notwendige Mindestkettenlänge abgebaut haben. Eine mögliche Interpretation, dass die Streptavidin modifizierten Halbleiternanokristalle aufgrund der Größe bis zu 20 nm nicht aufgenommen werden kann, konnten durch die aus der Literatur bekannte Aufnahme von 200 nm großen Liposomen mit Hilfe der Peptide entkräftet werden.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Aufnahme der Peptide von bestimmten Zellzyklen abhängt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde durch die Einführung eines RFP-PCNA-Konstrukts der Zellzyklus der Zelle beobachtet. Während der S-Phase der Zelle, in der das RFP-PCNA-Konstrukt bekannte Muster ausbildet, wurde ebenso eine unterschiedliche

Aufnahmegrade des Peptids beobachtet. Dies bedeutet, dass es keine spezielle Erhöhung der Anreicherung während einer Phase im Zellzyklus existiert. Eine erhöhte Aufnahme scheint demnach eher zufälliger Natur zu sein.

In diesen Untersuchungen galt es die  $\beta$ -Peptide, als mögliche Transporter fluoreszenter Sonden, in Zellen zu erforschen. Besonders galt das Interesse der Vergleichbarkeit zu den  $\alpha$ -Peptiden, sowie einer Untersuchung des Aufnahmeprozesses der Peptide in die Zelle. Mit einer Fluoreszenzmarkierung ausgestattet wurden die auf die Zellen einwirkenden Peptide mit Fluoreszenzmikroskopischen Techniken untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\beta$ -Peptide, ebenso wie ihre homologen  $\alpha$ -Peptide die Fähigkeit zur Aufnahme in Zellen besitzen und diese ebenso einer Längenabhängigkeit unterliegen. Ein bevorzugter Aufnahmeweg durch Rezeptormembranproteine konnte allerdings nicht gefunden werden, da vermutlich die lokale positive Ladung durch das Streptavidin teilweise abgeschirmt wurde. Ebenso konnte mit Hilfe einer Zellzyklus spezifischen Markierung keine bevorzugte Aufnahme der Peptide in die Zelle während einer bestimmten Phase beobachtet werden. Die enzymatische Stabilität der  $\beta$ -Peptide gegenüber Peptidasen macht sie zu einem Transporter der molekulare Fracht, z.B. von Plasmiden<sup>90</sup> oder von Makromolekülen<sup>91</sup>, in den Zellkern.

Der noch immer nicht aufgeklärte Aufnahmeprozess der Proteine ist ein noch immer ein ungelöstes Problem. Bisherige Untersuchungen konnten einige Mechanismen der Transduktion lediglich ausschließen. Für die zellsortenunspezifische<sup>92</sup> Aufnahme der Peptide kann ein aktiver Transportprozess, welcher durch Membran- oder Zelloberflächenrezeptoren induzierter wird, ausgeschlossen werden. Ein Indiz für die Unabhängigkeit von diesen Rezeptoren sind Arbeiten, welche zeigen konnten, dass D-Peptide ebenso wie das Retro-inverse des Tat-Peptids besser aufgenommen werden als das Tat-Peptid an sich. Daher wird vermutet, dass es aufgrund der amphiphilen Struktur der Peptide zu COULOMB-Wechselwirkungen mit der negativ geladenen Zellmembran kommt, womit es zu einer Permeabilisierung kommt. Durch eine höhere Anzahl Arginine im Peptid und die damit einhergehende höhere positive Ladung des Peptids wird die Wechselwirkung mit der Zellmembran verstärkt. Die Folge ist ein endozytoseähnlicher Aufnahmeprozess.<sup>93</sup> Endozytose selbst konnte jedoch durch Experimente bei 4°C und der Messung des ATP-Verbrauchs in einigen Fällen ausgeschlossen werden. Hierbei werden die Peptide aufgenommen, jedoch ist die Aufnahme bei weitem nicht so hoch wie bei Inkubationen bei 37°C. Dies deutet auf zwei gleichzeitige ablaufende, jedoch unterschiedliche Aufnahmeprozesse hin.

In dieser Arbeit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass es bei Peptiden bestehend aus  $\beta$ -Argininen eine Mindestlänge an Argininen geben muss, damit es zu einer Aufnahme in die Zelle kommen kann. Die Verwendung von Lysin an Stelle von Argininen, führt zu einer schlechteren Aufnahme. Lysine besitzen im Unterschied zu Argininen, keine Guanidgruppe, welche aufgrund ihrer Ladung eine bessere Wechselwirkung mit der Membran ausüben kann. Als Folge dieser Erkenntnisse wurden Dendrimere mit Guanidinsubstituenten versehen und mit Fluorescein markiert. Die substituierten Dendrimere wurden von Zellen aufgenommen.<sup>94</sup>

Das große Interesse an den  $\beta$ -Peptiden liegt in der Verwendung dieser in Zusammenhang mit Arzneimittel. Die Möglichkeit mit diesen Peptiden die Blut-Hirnschranke zu überwinden, ermöglicht die Entwicklung von neuen Strategien in der Therapie, in denen Medikamente schnell und direkt in eine Zelle gelangen und wirken. Erste Untersuchungen an Mäusen wurden gemacht. In diesen Experimenten markierte die, an das Tat-Peptid gekoppelte,  $\beta$ -Galactosidase die Effizienz der Aufnahme. Das Peptid konnte in den verschiedensten Organen, so auch im Gehirn der Maus, nachgewiesen werden. Dies eröffnet diesem Transporterprotein die Möglichkeit proteinogene Medikamente schnell und direkt in den Organismus zu transportieren, das wiederum ermöglicht neue Behandlungsmethoden.<sup>95</sup>

## ***E.2 DIFFUSION IMAGING MICROSCOPY***

Die in dieser Arbeit dargestellte Kombination von Fluoreszenzlebensdauer-mikroskopie (*Abk.*: FLIM) mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*Abk.*: FCS) vereint die Vorteile, der präzisen Ortsauflösung mit der Bestimmung der empfindlichen Bestimmung von Diffusionszeiten. Durch die Verwendung eines Raster-scanning-Mikroskops mit erhöhter Verweilzeit bei der punktwisen Abtastung der Probe wurde die erhaltene Fluoreszenzfluktuation innerhalb eines Bildpunktes korreliert. Erste Versuche, die veränderte Diffusion in der Nähe einer Öffnung einer Mikrokapillare zu messen, zeigten, dass die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt an ein Oligonukleotid durch ein angelegtes elektrisches Feld zur in der Mikrokapillare befindlichen Anode wanderten. Durch ein Abtasten in der Nähe der Öffnung der Kapillare konnte eine verlängerte Diffusionszeit beobachtet werden, die ein Resultat aus der Asymmetrie des Fokus in Richtung der optischen Achse und des angelegten Feldes ist.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Anwendung der Methode zur Untersuchung von Transportprozessen in lebenden Zellen. Die gewählte Methode erforderte eine Messdauer von 25-100 ms pro Bildpunkt um schnelle Diffusionen darstellen zu können. Eine längere Verweildauer der Moleküle, verursacht durch erhöhte Diffusion, können gegenüber den stationären Zuständen nicht aufgelöst werden. Aus diesem Grund entstehen bei der Messung große Datenmengen, um gute Korrelationen zu erzeugen. Die pro Bild erzeugten Rohdaten umfassen dabei in der Regel mehrere 100 MB, die jedoch mit dem Stand der heutigen modernen Computertechnik zu bewältigen sind. Die gezeigten Experimente zeigen, dass die entwickelte Methode zur Darstellung heterogener Diffusion geeignet ist. Für die Aufklärung von Transport- und Signalprozessen kann die Methode beitragen, da der hier verwendete Ansatz gezielt die schnellere Diffusion erfassen kann.

Durch die längere Verweildauer steigt auch die Wahrscheinlichkeit für das Photobleichen langsam diffundierender oder stationär gebundener Moleküle, bevor sie für die Messung relevante Messdaten produzieren konnten. Die verwendeten Sonden, also die Farbstoffe und Halbleiternanokristalle, zeichnen sich durch eine gewisse Photostabilität aus. Die in der Biologie häufig eingesetzten Fusionsproteine, z.B. GFP, besitzen eine geringe Photostabilität und eignen sich daher nicht optimal zur Verwendung in der bildgebenden Diffusionsmikroskopie. Der Vorteil des endogenen GFPs liegt in der direkten Kopplung, durch Expression, an den Protagonisten, z.B. ein Protein. Die ansonsten exogen stattfindende Kopplung des Fluoreszenzmarkers mit dem Protein stößt auf verschiedene andere Probleme, wie Denaturierungen oder Blockierung der Bindungstasche, so auch die Inkorporation in die Zelle. Helligkeit und Photostabilität des Fusionsproteins stehen den Vorteilen gegenüber. Während organische Fluorophore für hohe Quantenausbeuten und auf Hydrophilität entwickelt wurden, zeigen die Fusionsproteine ihre Nachteile. Durch geringere Photonenbeuten erhalten die Korrelationsfunktionen größere Ungenauigkeiten, die durch eine längere Messdauer zu korrigieren gilt. Zusätzlich wird die Diffusionseigenschaft des Protagonisten durch das GFP beeinflusst. Aufgrund ihrer höheren Masse in Relation zu organischen Fluoreszenzfarbstoffen verschieben sich die Diffusionszeiten zu höheren Zeiten.

In den Experimenten zur Diffusionsmikroskopie wurde in dieser Arbeit ausschließlich adhärente Zellen, 3T3 Fibroblasten, verwendet. Der Vorteil dieser Zellen liegt in der Präparation. Im Gegensatz zu nicht-adhären Zellen, halten sich die adhären Zellen während der Inkubation und anschließender Beobachtung an einem Platz auf und lassen sich so über eine längere Zeit hinweg verfolgen. Dies ist speziell für die Untersuchungen von

Fragestellungen, die die Diffusionsmikroskopie betreffen von Bedeutung und erwünschenswert.

Durch die Einführung der zellmembrangängigen Peptide besteht die Möglichkeit einen schnellen und zielgerichteten Transport von molekularer Fracht in den Zellkern zu bekommen. Nach den ersten Versuchen, bei der die molekulare Fracht ein Fluoreszenzfarbstoff war, könnten diese jetzt durch Pharmazeutika, Proteine oder Antigene ausgetauscht oder eingefügt werden um die Reaktion der Zellen zu beeinflussen und sie daraufhin zu untersuchen. Die zweite Möglichkeit ist diagnostische Sonden einzusetzen um interessante Stellen der Zelle zu untersuchen. Zu diesen könnten spezielle Gensequenzen der Zelle oder auch durch Umwelteinflüsse oder Krankheit verursachte Mutationen der DNA sein. Diese ließen sich durch Einsatz, z.B. durch Hairpin-Sonden<sup>96</sup> oder Molecular Beacons<sup>97</sup>, in einem Anstieg der Fluoreszenz detektieren. Gebunden an zelluläre Proteine ließe sich zusätzlich die Signal- und Transportkette erforschen.

Weitere zukünftige Experimente, die den Aufnahmemechanismus der Peptide klären, wären zur Optimierung von künstlichen Transportern von Interesse. Einhergehend damit ist die Untersuchung der nicht internalisierten Streptavidin modifizierten Halbleiternanokristalle, die bisher eine Limitierung der Aufnahme darstellen.

Die spezielle Anwendung der Methode der bildgebenden Diffusionsmikroskopie soll in Zukunft mehr Aufschluss von Signal- und Transportprozessen mit zentraler wissenschaftlicher Fragestellung werden. Mit gezielter Entwicklung transportprozessrelevanter Sonden können so deutliche Transportwege aufgezeigt werden. Der Einsatz der bildgebenden Diffusionsmikroskopie ist im Bereich der Pharmakologie, oder in der Diagnostik durchaus vorstellbar, in dem, z.B. Wege der Pharmazeutika in einer Zelle dargestellt werden können. Ebenso Untersuchung durch verändern der Zellart, chemische oder biologische Beeinflussung der Zelle von außerhalb und deren Reaktion darauf wären Anwendungen für diese Methode.

Einhergehend mit der Erforschung neuer Anwendungen, in den genannten Bereichen, ist die gezielte Weiterentwicklung der Methode, um schneller zu präziseren Daten zu kommen. Hierzu muss der Einsatz schneller, hochempfindlicher CCD-Kameras überdacht werden, deren Technologie sich in punkto Empfindlichkeit in den letzten Jahren schnell weiterentwickelt hat. Neue Techniken wie multifokale FCS könnte die Methode der DIM erweitern und präzisieren. Ebenso die Einführung der spektral getrennten Aufnahme der Daten und entsprechende Kreuzkorrelation der Daten, ließe sich das System verfeinern in Bezug auf die gemeinsame Diffusion zweier unterschiedlicher markierter Sonden.



---

## F ANHANG

### F.1 ABKÜRZUNGEN

ADC	Analog Digital Wandler ( <i>engl.</i> : analog to digital converter)
APD	Lawinen Photodiode ( <i>engl.</i> : Avalanche Photodiode)
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
CCD	ladungsgekoppelter Baustein ( <i>engl.</i> : charge coupled device)
CLSM	konfokale Rastermikroskopie ( <i>engl.</i> : confocal laser scanning microscopy)
CPP	Zellmembrangängige Peptide ( <i>engl.</i> : cell-penetrating peptides)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIM	Bildgebende Diffusion Mikroskopie ( <i>engl.</i> : Diffusion Imaging Microscopy)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EOM	elektrooptischer Modulator
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>engl.</i> : fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie <i>auch</i> Fötale Kälberserum ( <i>engl.</i> : fetal calf serum)
FFT	schnelle Fourier Transformation ( <i>engl.</i> : Fast Fourier Transformation)
FIFO	first-in first-out
FRAP	Fluoreszenzregeneration nach Photobleichen ( <i>engl.</i> : fluorescence recovery after photobleaching)
GFP	grünfluoreszierendes Protein ( <i>engl.</i> : green fluorescent protein)
HEGL	Hexaethylenglykol
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital ( <i>engl.</i> : highest-occupied molecular orbital)
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital ( <i>engl.</i> : lowest unoccupied molecular orbital)
M	molar ( $\text{mol/l}$ )
IC	interne Konversion ( <i>engl.</i> : internal conversion)
ISC	Interkombinations-Prozess ( <i>engl.</i> : intersystem crossing)
MCS	Multi-channel Scaler
NLS	Kernlokalisierungssequenz ( <i>engl.</i> : nuclear localization sequence)

OD	optische Dichte ( <i>engl.</i> : optical density)
PBS	Natriumphosphat-Puffer ( <i>engl.</i> : phosphate-buffer saline)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PTD	Protein Transduktions Domäne ( <i>engl.</i> : protein transduction domain)
RFP	rotfluoreszierendes Protein ( <i>engl.</i> : red fluorescent protein)
SFLIM	spektral aufgelöste Fluoreszenzlebensdauer mikroskopie ( <i>engl.</i> : spectrally-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy)
SPCM	Photonenzählwerk ( <i>engl.</i> : single photon counting module)
SMS	Einzelmolekülspektroskopie ( <i>engl.</i> : single molecule spectroscopy)
TCSPC	Zeitkorreliertes Zählen einzelner Photonen ( <i>engl.</i> : time-correlated single photon counting)
TIR-FM	Totalreflexions Fluoreszenz Mikroskopie ( <i>engl.</i> : total internal reflexion fluorescence microscopy)
TMR	Tetramethylrhodamin
TTL	Transistor-Transistor-Logik
VR	Schwingungsrelaxation ( <i>engl.</i> : vibrational relaxation)

## ***F.2 PUBLIKATIONEN***

### **F.2.1 Zeitschriften**

SEEBACH, D.; NAMOTO, K.; MAHAJAN, Y.R.; BINDSCHÄDLER, P.; SUSTMANN, R.; KIRSCH, M.; RYDER, N.S.; WEISS, M.; SAUER, M.; ROTH, C.; WERNER, S.; BEER, H.D.; MUNDING, C.; WALDE, P.; VOSER, M.; Chemical and Biological Investigations of  $\beta$ -Oligoarginines; *Chem. & Biodiv.*; **2004**, *1*, 65-97.

HEINLEIN, T.; BIEBRICHER, A.; SCHLÜTER, P.; ROTH, C.M.; HERTEN, D.P.; WOLFRUM, J.; HEILEMANN, M.; MÜLLER, C.; TINNEFELD, P.; SAUER, M.; High-Resolution Colocalization of Single Molecules within the Resolution Gap of Far-Field Microscopy; *ChemPhysChem.*; **2005**, *6*, 949-55.

ZIMMERMANN, F.; KOBAN, W.; ROTH, C.M.; HERTEN, D.P.; SCHULZ, C.; Fluorescence lifetimes of gas-phase toluene at elevated temperatures; *Chem. Phys. Lett.*, **2006**, accepted.

## **F.2.2 Tagungsberichte**

SIEGBERG, D.; ROTH, C.M.; HERTEN, D.P.; Single molecule fluorescence spectroscopy - Approaches towards quantitative investigations of structure and dynamics in living cells; *SPIE Proceedings*; **2006**, 6092, 609202.

## **F.2.3 Poster**

ROTH, C.M.; WOLFRUM, J.; HERTEN, D.P.; Diffusionsabbildung durch Kombination von SFLIM und FCS; *Bunsentagung*; **Mai 2005**.



---

## G LITERATUR

---

- <sup>1</sup> HIRSCHFELD, T.; Optical microscopic observation of single small molecules; *Appl. Opt.*; **1976**, *15*, 2565-6.
- <sup>2</sup> MOERNER, W.E; KADOR, L.; Optical Detection and spectroscopy of single molecules in a solid; *Phys. Rev. Lett.*, **1989**, *62*, 2535-8.
- <sup>3</sup> ORRIT, M.; BERNARD, J.; Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal; *Phys. Rev. Lett.*, **1990**, *14*, 1057-66.
- <sup>4</sup> SHERA, E.B., SEITZINGER, N.K.; DAVIS, L.M.; KELLER, R.A.; SOPER, S.A.; Detection of single fluorescent molecules; *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, *174*, 553-7.
- <sup>5</sup> EIGEN, M.; RIGLER, R.; Sorting Single Molecules: applications to diagnostics and evolutionary biotechnology; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 5740-7.
- <sup>6</sup> GOODWIN, P.M.; AMBROSE, W.P.; KELLER, R.A.; Single-Molecule Detection in Liquids by Laser-Induced Fluorescence; *Acc. Chem. Res.*, **1996**, *29*, 607-13.
- <sup>7</sup> YILDIZ, A.; FORKEY, J.N.; MCKINNEY, S.A.; HA, T.; GOLDMAN, Y.E.; SELVIN, P.R.; Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization; *Science*, **2003**, *300*, 2061-5.
- <sup>8</sup> YILDIZ, A.; TOMSHIGE, R.D.; VALE, R.D.; SELVIN, P.R.; Kinesin Walks Hand-Over-Hand; *Science*, **2004**, *303*, 676-8.
- <sup>9</sup> ISHII, Y.; YANAGIDA, T.; Single Molecule Detection in Life Science; *Single Mol.*, **2000**, *1*, 5-16.
- <sup>10</sup> GREEN, M.; LOEWENSTEIN, P.M.; Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat *trans*-activator protein; *Cell*, **1988**, *55*, 1179-88.
- <sup>11</sup> FRANKEL, A.D.; PABO, C.O.; Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus.; *Cell*, **1988**, *55*, 1189-93.
- <sup>12</sup> MANN, D.A., FRANKEL, A.D.; Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein; *EMBO J.*, **1991**, *10*, 1733-9.

- <sup>13</sup> VIVÈS, E.; BRODIN, P.; LEBLEU, B.; A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus.; *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 16010-7.
- <sup>14</sup> RICHARD, J.P.; MELIKOV, K.; VIVES, E.; RAMOS, C.; VERBEURE, B.; GAIT, M.J.; CHERNOMORDIK, L.V.; LEBLEU, B.; Cell-penetrating Peptides; *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 585-90.
- <sup>15</sup> TEMSAMANI, J.; VIDAL, P.; The use of cell-penetrating peptides for drug delivery; *Drug Discovery Today*, **2004**, 9, 1012-9.
- <sup>16</sup> WISEMAN, P.W.; PETERSEN, N.O.; Image Correlation Spectroscopy. II. Optimization for Ultrasensitive Detection of Preexisting Platelet-Derived Growth Factor- $\beta$  Receptor Oligomers on Intact Cells; *Biophys. J.*, **1999**, 76, 963-77.
- <sup>17</sup> RUAN, Q.; CHENG, M.A.; LEVI, M.; GRATTON, E.; MANTULIN, W.W.; Spatial-Temporal Studies of Membrane Dynamics: Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy (SFCS); *Biophys. J.*, **2004**, 87, 1260-7.
- <sup>18</sup> KURICHETI, K.K.; BUSCHMANN, V.; WESTON, K.D.; Application of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Velocity Imaging in Microfluidic Devices; *Appl. Spectrosc.*, **2004**, 58, 1180-6.
- <sup>19</sup> EINSTEIN, A.; Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt.; *Ann. D. Phys.*, **1905**, 17, 132-48.
- <sup>20</sup> TURRO, N.J.; *Modern molecular photochemistry*, 1ed.; The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.: Menlo Park, **1978**.
- <sup>21</sup> BREWSTER, D.; On the colours of natural bodies; *Trans Royal Soc. Edinburgh*, **1834**, 12, 538-45.
- <sup>22</sup> STOKES, G.G.; On the Change of Refrangibility of Light; *Phil. Trans. R. Soc. London A*, **1852**, 142, 463-562.
- <sup>23</sup> GOVINDJEE; Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll *a* fluorescence; *Aust. J. Plant. Physiol.*, **1995**, 22, 131-60.
- <sup>24</sup> DEMAS, J.N.; CROSBY, G.A.; The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields; *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991-1024.

- 
- <sup>25</sup> HU, C.; WHINNERY, J.R.; New thermo-optical measurement method and a comparison with other methods; *Appl. Opt.*, **1973**, *12*, 72-9.
- <sup>26</sup> BRANNON, J.H.; MAGDE, D.; Absolute Quantum Yield Determination by Thermal Blooming. Fluorescein; *J. Phys. Chem.*; **1978**, *82*, 705-9.
- <sup>27</sup> LAKOWICZ, J.R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, **1999**.
- <sup>28</sup> WEISS, S.; Fluorescence spectroscopy of single biomolecules; *Science*, **1999**, *283*, 1676-83.
- <sup>29</sup> MINSKY, M. *Microscopy Apparatus*; U.S. Patent #3013467.
- <sup>30</sup> RIGLER, R.; METS, Ü.; Diffusion of single molecules through a GAUSSIAN laser beam.; *SPIE Vol. 1921, laser spectroscopy of biomolecules*; **1992**, 239.
- <sup>31</sup> RIGLER, R.; METS, Ü.; WIDENGREN, J.; KASK, P.; Fluorescence Correlation Spectroscopy With High Count Rate and Low-Background – Analysis of Translational Diffusion; *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, **1993**, *22*, 169.
- <sup>32</sup> INOUÉ, S; Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In *Handbook of biological confocal microscopy*; 2 ed; J.B. PAWLEY, Ed; Plenum Press: New York, **1995**, 1.
- <sup>33</sup> WEBB, R.H.; DOREY, C.K.; The pixilated image. In *Handbook of biological confocal microscopy*; 2 ed; J.B. PAWLEY, Ed; Plenum Press: New York, **1995**, 55.
- <sup>34</sup> MAGDE, D.; ELSON, E.L.; WEBB, W.W.; Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System – Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy; *Phys. Rev. Lett.*, **1972**, *29*, 705-8.
- <sup>35</sup> RIGLER, R.; WIDENGREN, J.; Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In *Bioscience*; Ed.: KLINGE, B.; OWMAN, C.; 180-3.
- <sup>36</sup> RIGLER, R.; METS, Ü.; Diffusion of single molecules through a Gaussian laser beam; *SPIE*, **1993**, *1921*, 239-48.

- <sup>37</sup> WEBB, W.W.; Fluorescence Correlation Spectroscopy: Genesis, Evolution, Maturation and Prognosis; In *Fluorescence Correlation Spectroscopy*; RIGLER, R.; ELSON, E.S. (Eds.); Springer Verlag, **2001**, 308.
- <sup>38</sup> KOPPEL, D.E.; AXELROD, D.; SCHLESSINGER, J.; ELSON, E.L.; WEBB, W.W.; Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility; *Biophys. J.*, **1976**, *16*, 1315-29.
- <sup>39</sup> ELSON, E.L.; MAGDE, D.; Fluorescence correlation spectroscopy: II. An experimental realization; *Biopolymers*, **1974**, *13*, 29-61.
- <sup>40</sup> HAUPTS, U.; MAITI, S.; SCHWILLE, P.; WEBB, W.W.; Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 13273-8.
- <sup>41</sup> WIDENGREN, J.; SCHWILLE, P.; Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy; *Chem. Phys.*, **1999**, *250*, 171-86.
- <sup>42</sup> QIAN, H.; ELSON, E.L.; Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy; *Appl. Opt.*, **1991**, *30*, 1185-95.
- <sup>43</sup> SANDISON, D.R.; WEBB, W.W.; Background rejection and signal-to-noise optimization in confocal and alternative fluorescence microscopes; *Appl. Opt.*, **1994**, *33*, 603-15.
- <sup>44</sup> SCHWILLE, P. Cross-correlation analysis in FCS; In *Fluorescence Correlation Spectroscopy*; RIGLER, R.; ELSON, E.S. (Eds.); Springer Verlag, **2001**, 360.
- <sup>45</sup> OVERBECK, E.; SINN, C.; Silicon avalanche photodiodes as detectors for photon correlation experiments; *Rev. Sci. Instr.*, **1998**, *69*, 3315-23.
- <sup>46</sup> ZHAO, M.; JIN, L.; CHEN, B.; DING, Y.; MA, H.; CHEN, D.; Afterpulsing and its correction in fluorescence correlation spectroscopy experiments; *Appl. Opt.*, **2003**, *42*, 4031-6.
- <sup>47</sup> FRANKEL, A.D.; PABO, C.O.; Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus.; *Cell*, **1988**, *55*, 1189-93.



- 
- <sup>48</sup> LEROUX, I.; JOLIOT, A.H.; BLOCH-GALLEGO, E.; PROCHIANTZ, A.; VOLOVITCH, M.; Neurotrophic Activity of the Antennapedia Homeodomain Depends on Its Specific DNA-Binding Properties; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 9120-4.
- <sup>49</sup> PROCHIANTZ A.; Messenger Protein: homeoproteins, TAT and others; *Curr Opin. Cell Biol.*, **2000**, *12*, 400-6.
- <sup>50</sup> VIVÈS, E.; BRODIN, P.; LEBLEU, B.; A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus; *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 16010.
- <sup>51</sup> SUZUKI, T.; FUTAKI, S.; NIWA, M.; TANAKA, S.; UEDA, K. SUGUIRA, Y.; Possible Existence of Common Internalization Mechanisms among Arginine-rich Peptides; *J. Biol. Chem.*; **2002**, *277*, 2437-43.
- <sup>52</sup> FUTAKI, S.; SUZUKI, T.; OHASHI, W.; YAGAMI, T.; TANAKA, S.; UEDA, K.; SUGIURA, Y.; Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery; *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 5836-40.
- <sup>53</sup> WENDER, P.A.; MITCHELL, D.J.; PATTABIRAMAN, K.; PELKEY, E.T.; STEINMAN, L.; ROTHBARD, J.B.; The design, synthesis and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporter; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 13003-8.
- <sup>54</sup> SEEBACH, D.; OVERHAND, M.; KÜHNLE, F.N.M.; MARTINONI, B.; OBERER, L.; HOMMEL, U.; WIDMER, H.;  $\beta$ -Peptides: Synthesis by ARNDT-EISTERT Homologation with Concomitant Peptide Coupling. Structure Determination by NMR and CD Spectroscopy and by X-Ray Crystallography. Helical Secondary Structure of a  $\beta$ -Hexapeptide in Solution and its Stability towards Pepsin; *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*, 913-41.
- <sup>55</sup> HINTERMANN, T.; SEEBACH, D.; The Biological Stability of  $\beta$ -Peptides: No Interactions between  $\alpha$ - and  $\beta$ -Peptidic Structures?; *Chimia*; **1997**, *51*, 244-7.
- <sup>56</sup> SEEBACH, D.; ABELE, S.; SCHREIBER, J.V.; MARTINONI, B.; NUSSBAUM, A.K.; SCHILD, H.; SCHULZ, H.; HENNECKE, H.; WOESSNER, R.; BITSCH, F.; Biological and Pharmacokinetic Studies with  $\beta$ -Peptides; *Chimia.*, **1998**, *52*, 734-9
-

- <sup>57</sup> FRACKENPOHL, J.; ARVIDSSON, P.I.; SCHREIBER, J.V.; SEEBACH, D.; The Outstanding Biological Stability of  $\beta$ - and  $\gamma$ -Peptides toward Proteolytic Enzymes: An in Vitro Investigation with Fifteen Peptidases; *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 445-455.
- <sup>58</sup> GADEMANN, K.; ERNST, M.; HOYER, D.; SEEBACH, D.; Synthese und biologische Evaluation eines Cyclo- $\beta$ -tetrapeptids als Somatostatin-Analogon; *Angew. Chem.*, **1999**, *111*, 1302-4.
- <sup>59</sup> RUEPING, M.; MAHAJAN, Y.; SAUER, M.; SEEBACH, D.; Cellular Uptake Studies with  $\beta$ -Peptides; *ChemBioChem*, **2002**, *3*, 257-9.
- <sup>60</sup> TELLINGHUISEN, J.; WILKERSON JR., C.W.; Bias and Precision in the Estimation of Exponential Decay Parameters from Sparse Data; *Anal. Chem.*, **1993**, *65*, 1240-6.
- <sup>61</sup> SOPER, S.A.; LEGENDRE, B.L.; WILLIAMS JR., D.C.; Online Fluorescence Lifetime Determinations in Capillary Electrophoresis; *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 4358-65.
- <sup>62</sup> HERTEN, D.P.; Arbeiten von **2003**. DAQLinescan: Datenakquisition zum Bildgebenden Aufnehmen. DAQFIFO: Speziell für Lösungsmessungen, sowie Justagen.
- <sup>63</sup> HERTEN, D.P.; Dissertation, Heidelberg, **2000**.
- <sup>64</sup> WESTON, K.D.; DYCK, M.; TINNEFELD, P.; MÜLLER, C.; HERTEN, D.P.; SAUER, M.; Measuring the Number of Independent Emitters in Single-Molecule Fluorescence Images and Trajectories Using Coincident Photons; *Anal. Chem.*, **2002**, *74*, 5342-9.
- <sup>65</sup> COOLEY, J.W.; TUKEY, J.W.; An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series; *Math. Comput.*, **1965**, *19*, 297-301.
- <sup>66</sup> SAFFARIN, S.; ELSON, E.L.; Statistical Analysis of Fluorescence Correlation Spectroscopy: The Standard Deviation and Bias; *Biophys. J.*; **2003**, *84*, 2030-42.
- <sup>67</sup> WOHLAND, T.; RIGLER, R.; VOGEL, H.; The standard deviation in Fluorescence correlation spectroscopy; *Biophys. J.*, **2001**, *80*, 2987-99.

---

<sup>68</sup> SCHATZEL, K.; DREWEL, M.; STIMAC, S.; Photon Correlation Measurements at Large Lag Times: Improving Statistical Accuracy; *J. Mod. Opt.*, **1988**, *35*, 711-8.

<sup>69</sup> SONG, L.E.; HENNIK, E.J.; YOUNG, I.T.; TANKE, H.J.; Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy; *Biophys. J.*, **1995**, *68*, 2588-600.

<sup>70</sup> ALIVISATOS, A.P.; Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots; *Science*, **1996**, *271*, 933-7.

<sup>71</sup> LACOSTE, T.D.; MICHALET, X.; PINAUD, F.; CHEMLA, D.S.; ALIVISATOS, A.P.; WEISS, S.; Ultrahigh-resolution multicolour colocalization of single fluorescent probes; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 9461-6.

<sup>72</sup> MICHALET, X.; LACOSTE, T.D.; WEISS, S.; Ultrahigh-resolution colocalization of spectrally separable point-like fluorescent probes.; *Methods*, **2001**, *25*, 87-102.

<sup>73</sup> MICHALET, X.; PINAUD, F.F.; BENTOLILA, L.A.; TSAY, J.M.; DOOSE, S.; LI, J.J.; SUNDARESAN, G.; WU, A.M.; GAMBHIR, S.S.; WEISS, S.; Quantum Dots for Live Cell in Vivo Imaging and Diagnostics; *Science*, **2005**, *307*, 538-44.

<sup>74</sup> WELLER, H.; Kolloidale Halbleiter-Q-Teilchen: Chemie im Übergangsbereich zwischen Festkörper und Molekül; *Angew. Chem.*, **1993**, *105*, 43-55.

<sup>75</sup> MASTERS, J.R.; HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly; *Nature Rev.*, **2002**, *2*, 315.

<sup>76</sup> PAUNESKU, T.; MITTAL, S.; PROTIC, M.; ORYHON, J.; KOROLEV, S.V.; JOACHIMIAK, A.; WOLOSCHAK, G.E.; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome.; *Int. J. Radiat. Biol.*, **2001**, *77*, 1007-21.

<sup>77</sup> FUNK, J.O.; WAGA, S.; HARRY, J.B.; ESPLING, E.; STILLMAN, B.; GALLOWAY, D.A.; Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein; *Genes Dev.*, **1997**, *11*, 2090-100.

- <sup>78</sup> SAUER, M.; ARDEN-JACOB, J.; DREXHAGE, K.H.; MARX, N.J.; KARGER, A.E.; LIEBERWIRTH, U.; MÜLLER, R.; NEUMANN, M.; NORD, S.; PAULUS, A.; SCHULZ, A.; SEEGER, S.; ZANDER, C.; WOLFRUM, J.; On-line diode laser based time-resolved fluorescence detection of labeled oligonucleotides in capillary gel electrophoresis; *Biomed. Chromatogr.*, **1997**, *11*, 81-2.
- <sup>79</sup> TRÉHIN, R.; MERKLE, H.P.; Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery; *Eur. J. Biopharm.*, **2004**, *58*, 209-223.
- <sup>80</sup> VIVES, E.; Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "Is the Trojan horse too wild to go only to Troy?"; *J. Controlled Release*, **2005**, *109*, 77-85.
- <sup>81</sup> DIETZ, G.P.H.; BÄHR, M.; Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach; *Mol. Cell. Neurosci.*, **2004**, *27*, 85-131.
- <sup>82</sup> MAI, J.C.; SHEN, H.; WATKINS, S.C.; CHENG, T.; ROBBINS, P.D.; Efficiency of Protein Transduction Is Cell Type-dependent and Is Enhanced by Dextran Sulfate; *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 30208-18.
- <sup>83</sup> SILHOL, M.; TYAGI, M.; GIACCA, M.; LEBLEU, B.; VIVES, E.; Different mechanisms for cellular internalization of the HIV-1 Tat-derived cell penetrating peptide and recombinant proteins fused to Tat; *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 494-501.
- <sup>84</sup> EASWARAN, H.; LEONHARDT, H.; CARDOSO, M.C.; Cell Cycle Markers for Live Cell Analyses; *Cell Cycle*, **2005**, *4*, 453-5.
- <sup>85</sup> KURICHETI, K.K.; BUSCHMANN, V.; WESTON, K.D.; Application of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Velocity Imaging in Microfluidic Devices; *Appl. Spectrosc.*, **2004**, *58*, 1180-6.
- <sup>86</sup> KOLIN, D.L.; COSTANTINO, S.; WISEMAN, P.W.; Sampling Effects, Noise, and Photobleaching in Temporal Image Correlation Spectroscopy; *Biophys. J.*, **2006**, *90*, 628-39.
- <sup>87</sup> SHEELY, M.; Glycerol Viscosity Tables; *Ind. Eng. Chem.*, **1932**, *24*, 1060-4.

- 
- <sup>88</sup> ENDERLEIN, J.; GREGOR, I.; PATRA, D.; DERTINGER, T.; KAUPP, U.B.; Performance of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring Diffusion and Concentration; *ChemPhysChem*, **2005**, *6*, 2324-36.
- <sup>89</sup> ENDERLEIN, J.; GREGOR, I.; PATRA, D.; FITTER, J.; Art and Artefacts of Fluorescence Correlation Spectroscopy; *Curr. Pharm. Biotech.*, **2004**, *5*, 155-61.
- <sup>90</sup> RUDOLPH, C.; PLANK, C.; LAUSIER, J.; SCHILLINGER, U.; MÜLLER, R.H.; ROSENECKER, J.; Oligomers of the Arginine-rich Motif of the HIV-1 TAT Protein Are Capable of Transferring Plasmid DNA into Cells; *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 11411-8.
- <sup>91</sup> TORCHILIN, V.P.; RAMMOHAN, R.; WEISSIG, V.; LEVCHENKO, T.S.; TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 8786-91.
- <sup>92</sup> ZORKO, M.; LANGEL, Ü.; Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery; *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2005**, *57*, 529-45.
- <sup>93</sup> HENRY, C.M.; Breaching Barriers; *Chem. Eng. News*, **2003**, *81*, 35-43.
- <sup>94</sup> WENDER, P.A.; KREIDER, E.; PELKEY, E.T.; ROTHBARD, J.; VANDEUSEN, C.L.; Dendrimeric molecular transporters: synthesis and evaluation of tunable polyguanidino dendrimers that facilitate cellular uptake; *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4815-8.
- <sup>95</sup> SCHWARZE, S.R.; HO, A.; VOCERO-AKBANI, A.; DOWDY, S.F.; In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse; *Science*, **1999**, *285*, 1569-72.
- <sup>96</sup> KNEMEYER, J.P.; MARMÉ, N.; SAUER, M.; Probes for Detection of Specific DNA Sequences at the Single-Molecule Level; *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 3717-24.
- <sup>97</sup> NITIN, N.; SANTANGELO, P.J., KIM, G.; NIE, S.; BAO, G.; Peptide-linked molecular beacons for efficient delivery and rapid mRNA detection in living cells; *Nucleic Acid Res.*, **2004**, *32*, e58.



Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel durchgeführt habe.

Heidelberg, 11. Mai 2005

---

Christian M. Roth