

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

Diplom-Chemiker Daniel Wolfgang Sieberg

aus Hamburg

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2009

Hochspezifische Markierung des
Chemotaxisproteins CheY
in lebenden *E. coli* Bakterien
zur Untersuchung der Diffusion
mit Hilfe der
bildgebenden Diffusionsmikroskopie

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Prof. Dr. Roland Krämer

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will“

Galileo Galilei (1564 – 1642)

Kurzzusammenfassung

Eine Weiterentwicklung des SNAP-Tag Systems wurde erfolgreich eingesetzt, um das Chemotaxis Protein CheY in lebenden *E. coli* Bakterien hochspezifisch mit dem Farbstoff MR121 zu markieren. Unter Ausnutzung der Fluoreszenzlöschung des MR121 durch das Substrat Benzylguanin konnte die unspezifische Hintergrundfluoreszenz in lebenden Bakterien durch nicht gebundene Fluorophore um mehr als 90 % reduziert werden. Diese Reduktion ist ein sehr wichtiger Schritt im Hinblick auf die Anwendbarkeit hochspezialisierter fluoreszenzmikroskopischer Techniken und macht den SNAP-Tag zu einer sehr guten Alternative zu den fluoreszierenden Proteinen, deren mangelnde Photostabilität oftmals Einzelmolekülstudien entgegen steht. Unter Anwendung der bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM) war es möglich, die Diffusionszeit des CheY innerhalb lebender *E. coli* Bakterien zu bestimmen und Heterogenitäten in verschiedenen Bereichen in den Zellen zu auflösen. Mit der Chemotaxis, die die Bewegung der Bakterien steuert, konnte mit dieser Methode erstmals eine biologisch hochrelevante Fragestellung bearbeitet werden.

Zusätzliche Standard-FCS-Messungen in wässrigen Proteinlösungen in physiologischen Konzentrationsbereichen können zu einer Eichung der erhaltenen Diffusionszeiten dienen und somit die Interpretation von Messungen in biologischen Proben erleichtern.

Untersuchungen der spektroskopischen Eigenschaften von Quantum Dots zeigten, dass auch sie grundsätzlich dazu genutzt werden können, intelligente, fluoreszenzgelöschte Sonden zu entwickeln.

Abstract

A modification of the commercially available SNAP-Tag system was successfully applied to specifically label the chemotaxis protein CheY in living *E. coli* bacteria with the photostable organic fluorophore MR121. The exploitation of the fluorescence quenching of MR121 by the benzylguanine substrate leads to a significant decrease of unspecific background fluorescence by about 90 %. This reduction of background fluorescence strongly increases the applicability of the SNAP-Tag in sophisticated fluorescence microscopy techniques and makes it a powerful alternative to fluorescent proteins, which in general do not feature the needed spectroscopic properties for single molecule purposes. By using the diffusion imaging microscopy (DIFIM), it was possible to follow the diffusion of CheY and to resolve heterogeneities in different areas of the bacteria cells. These investigations on the bacterial chemotaxis were the first biologically relevant experiments that have been performed with the new DIFIM technique.

Standard-FCS measurements in highly concentrated aqueous protein solutions have been done for calibration and to increase the interpretability of acquired diffusion times in more complex biological systems.

Investigations on the spectroscopic properties of Quantum Dots showed that specific fluorescence quenching by thymidine might well open up an access to the design of intelligent probes.

Zusammenfassung

Seit der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie in den 1930er Jahren und der daran anschließenden Entwicklung stabiler organischer Fluorophore, hat sich für die naturwissenschaftliche Grundlagenforschung ein neues Feld geöffnet. Durch die selektive Markierung von Proteinen, Enzymen und Oligonukleotiden gelang es in der Folge, ein grundlegendes Verständnis für Aufgaben und Wechselwirkungen dieser biologisch wichtigen Substanzen zu erhalten. Im Jahr 2008 erhielten Roger Tsien, Osamu Shimomura und Martin Chalfie für die Untersuchung des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) und dem daraus resultierenden Zugang zur hochspezifischen und stöchiometrischen *in vivo* Markierung von Proteinen den Nobelpreis für Chemie.

Die Einführung hochsensitiver Methoden wie der konfokalen Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie in den 1970er und 1980er Jahren ermöglichte eine Charakterisierung der zu untersuchenden Proben mit einer bis dahin nicht für möglich gehaltenen Präzision. Dadurch, dass mit Hilfe der neuen Methoden bereits ein einzelnes Molekül detektiert werden kann, öffnet sich ein Zugang zur Untersuchung von Heterogenitäten und Intermediaten, die bei der Durchführung von Ensemble-Messungen, bei denen eine große Zahl von Molekülen gleichzeitig gemessen wird, nicht zugänglich sind. Bei Verwendung von stabilen und photophysikalisch gut untersuchten Fluorophoren leisten moderne fluoreszenzmikroskopische Methoden einen großen Beitrag dazu, biologische Prozesse sowohl *in vitro* als auch in lebenden Bakterien oder eukaryontischen Zellen qualitativ und quantitativ zu verstehen. Ein spektakuläres Beispiel aus den vergangenen Jahren stellt die Aufklärung des Mechanismus der Kraftübertragung in Muskelzellen durch die Beobachtung verschiedener Motorproteine wie Myosin dar.

Aktuell gibt es zwei wichtige Trends in der Entwicklung neuer mikroskopischer Methoden. Neben der Überwindung des von Abbe berechneten optischen Auflösungsvermögens mit Methoden wie STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (Photoactivated Localisation Microscopy), STED (Stimulated Emission Depletion) oder der 4π -Mikroskopie ist dies vor allem die Untersuchung von dynamischen Heterogenitäten in lebenden Zellen und Bakterien. Zur Erfassung von Dynamiken hat sich die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) als Methode der Wahl etabliert. Modernere Varianten, so z.B. CCD-Kamera gestützte Methoden wie die Familie der Image Correlation Spectroscopy Methoden oder die, auch in dieser Arbeit verwendetet, auf SFLIM beruhende bildgebende Diffusionsmikroskopie sind in der Lage, diese Heterogenitäten zusätzlich räumlich aufzulösen.

Neben neuen Mikroskopietechniken ist auch die Entwicklung neuartiger Fluoreszenzmarker und –sonden von großem Interesse. Seit ihrer Einführung in den Lebenswissenschaften entwickelten sich fluoreszierende Proteine wie das grün-fluoreszierende Protein (GFP) auf Grund ihrer Spezifität und der Möglichkeit zur stöchiometrischen Markierung zu den bevorzugten Fluoreszenzmarkern für *in vivo* Anwendungen. Zur Untersuchung mit der in Bezug auf die Photophysik der Fluorophore anspruchsvollen Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie sind sie allerdings auf Grund der sehr rasch auftretenden Photozerstörung nicht gut geeignet. Die Vorteile bei der Untersuchung einzelner Moleküle können nur genutzt werden, wenn möglichst hohe Photonenstatistiken durch stabile Fluoreszenzmarker erreicht werden. Neben hochselektiven, auf genetischer Kodierung beruhenden Markierungsmethoden, wie dem in dieser Arbeit verwendeten SNAP-Tag-System, die die hochselektive Anwendung stabiler organischer Fluorophore erlauben, sind in den letzten Jahren insbesondere fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle (Quantum Dots) als Fluoreszenzmarker in den Fokus der mikroskopisch arbeitenden Lebenswissenschaften gerückt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene neuartige Methoden auf ihre Eignung zur Untersuchung von biologisch relevanten Fragestellungen hin untersucht werden: (i) Die Untersuchung von fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen sollte zeigen, ob sich diese zur Anwendung in der hochsensitiven Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie eignen. (ii) Mit dem Einsatz der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sollte die Diffusionscharakteristik von verschiedenen Proteinen in einem künstlichen Zytoplasma bei physiologischen Proteinkonzentrationen untersucht werden. Diese hierbei gewonnenen Ergebnisse ermöglichen nicht nur den Vergleich mit DIFIM-Messungen in lebenden Zellen, sondern eröffnen auch einen Zugang zum Verständnis des Proteintransports durch den Kernporenkomplex, wenn es gelingt, vergleichende Messungen in ähnlichen Konzentrationen von Nukleoporinen durchzuführen. (iii) Mit Hilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie wurde die Diffusionszeit des Chemotaxis-Proteins CheY in lebenden *E. coli* Bakterienzellen verfolgt und visualisiert. Bei der Fluoreszenzmarkierung des CheY konnte zum ersten Mal die Anwendung einer neuartigen hintergrundreduzierten Markierungsmethode in einem lebenden System gezeigt werden.

Auf Grund ihrer außergewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften werden Quantum Dots bevorzugt eingesetzt, wenn es gilt, mit einer geringen Anzahl von Fluorophoren ein hohes Signal zu generieren, da eine Photozerstörung der Quantum Dots faktisch nicht möglich ist, sodass sehr lange Beobachtungszeiten möglich sind. Ihr größter Nachteil ist allerdings, dass bisher keine Methoden zur stöchiometrischen Markierung etabliert wurden, da auf Grund ihrer Größe sehr viele potenzielle Kopplungspositionen auf der Oberfläche vorhanden sind.

In dieser Arbeit sollte anhand eines etablierten Systems zur Kolokalisierung von spektral trennbaren Fluorophoren über eine doppelsträngige DNA als spektroskopisches Lineal untersucht werden, ob sich diese außergewöhnlichen Eigenschaften zu einzelmolekülspektroskopischen Studien ausnutzen lassen.

Nachdem bei diesen Experimenten zunächst keine positiven Ergebnisse erhalten wurden, zeigte eine anschließende umfangreiche Untersuchung ihrer spektroskopischen Eigenschaften, dass die Fluoreszenz der verwendeten Quantum Dots in starkem Maße durch verschiedene biologisch relevante Moleküle gelöscht wird. Neben den vier Nukleinbasen Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin zeigen auch verschiedene Aminosäuren wie Histidin und Tryptophan einen negativen Einfluss auf die beobachtbare Fluoreszenz. Zwar wurde für alle vier Nukleobasen eine signifikante Löschung beobachtet, allerdings zeigte sich für den Quantum Dot 705 eine spezifische Löschung durch die Base Thymin, die um 400 % stärker ist als bei den übrigen Basen. Diese spezifische Löschung des Quantum Dots 705 eröffnet möglicherweise einen Zugang zur Modellierung intelligenter SONDENSYSTEME, die diesen Effekt gezielt auszunutzen vermögen. Die spezifische Löschung des Farbstoffs MR 121 durch die Nukleobase Guanin führte z. B. zur Entwicklung der Smart Probes, einem, auf DNA-Hairpins basierenden, hochspezifischen Nachweissystem zur molekularen Diagnostik von einzelsträngiger DNA in der Arbeitsgruppe von Prof. Sauer.

Studien zur Aufklärung des Löschemechanismus zeigten, dass es sich bei der Löschung zumindest zu einem großen Anteil um statische Löschung durch Ausbildung eines nicht-fluoreszierenden Grundzustandskomplexes handelt. Auch Fluoreszenzlebensdauermessungen legten nahe, dass nur ein sehr geringer Anteil an dynamischer Löschung vorzuliegen scheint.

Zudem wurde in Messungen bei hohen Konzentrationen der entsprechenden Quencher-Substanzen ein starkes Abflachen des Stern-Volmer-Plots beobachtet, was möglicherweise als Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung zwischen der Oberfläche des Quantum Dots und den Fluoreszenzlöschern aufgefasst werden könnte. Weitere experimentelle Unterstützung für diese Theorie wurde durch Löschemexperimente auf Einzelmolekülniveau erhalten; so war es nicht möglich, durch mehrmaliges Waschen der gelöschten Quantum Dots, die ursprüngliche Fluoreszenz zurückzuerhalten, wie es bei einem dynamischen Mechanismus möglich sein sollte. Darüber hinaus konnte als Ursache für die Löschung eine Oxidation der Quantum Dots in Folge eines photoinduzierten Elektronentransfers isoliert werden. Unter Verwendung von Reduktionsmitteln wie β -Mercaptoethanol oder Trolox konnte die Fluoreszenzlöschung deutlich, im Fall von Trolox sogar um fast 95 %, reduziert werden. Es stellte sich ebenfalls heraus, dass in Anwesenheit von Trolox eine der störendsten Eigenschaften der Quantum Dots, das sogenannte *Blinking*, starke Fluktuationen der Fluoreszenzintensität,

vollständig unterdrückt werden konnte. Lässt sich die Anwendung von Trolox oder verwandten Substanzen in biologischen Untersuchungen etablieren, ist es möglich, experimentelle Unsicherheiten, die durch die Fluoreszenzlöschung und das *Blinking* verursacht werden, zu eliminieren und somit die außergewöhnlichen Fluoreszenzeigenschaften der Quantum Dots auch in komplexen Systemen auszunutzen.

Zur Untersuchung von Dynamiken wie Diffusionsprozessen mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) sind Quantum Dots allerdings nicht geeignet. Durch ihre sehr große molekulare Masse im Bereich von einigen Megadalton würde die Diffusion des zu untersuchenden Moleküls, die hauptsächlich von Gewicht und Größe desselben abhängig ist, extrem verlangsamt werden. Für in vitro FCS-Messungen sind somit kleine und leicht organische Fluorophore das Mittel der Wahl; ihre Masse liegt in der Regel nur bei wenigen Prozent der des zu untersuchenden Moleküls und hat somit keinen signifikanten Einfluss auf das Diffusionsverhalten.

Eines der Hauptanwendungsfelder der FCS ist neben der Erforschung von Bindungskinetiken auch die Untersuchung von Transportvorgängen in lebenden Systemen. Einer der wichtigsten, mechanistisch allerdings noch nicht vollständig verstandenen, Vorgänge ist der Transport durch den Kernporenkomplex in eukaryontischen Zellen. Der Transport durch den Kernporenkomplex ist die einzige Verbindung zwischen dem Zellkern einer eukaryontischen Zelle und dem umgebenden Zytoplasma.

Mechanistisch muss hierbei zwischen zwei Transportwegen unterschieden werden. Kleine molekulare Fracht mit molekularen Massen von weniger als 30 kDa durchqueren die Kernpore mittels freier Diffusion, während größere Moleküle nur aktiv transportiert werden, wenn sie eine kurze genetische Kodierung, die *Nuclear Localisation Sequence* (NLS), aufweisen. Diese Moleküle werden dann ohne Energieverbrauch mit einem mehrstufigen Mechanismus, dem RanGTP-Zyklus, durch den Porenkomplex befördert.

Ein zunächst geplanter biomimetischer struktureller Nachbau der Kernpore konnte nicht durchgeführt werden, da die Expression, Extraktion, Aufreinigung und Aufkonzentrierung von gut dreißig am Aufbau der Kernpore beteiligten Proteinen nicht möglich war. Diese im Verbund Nukleoporine genannten Proteine besitzen eine Domäne, die am ringförmigen Aufbau des Kernporenkomplexes beteiligt ist, und eine lange Abfolge des Aminosäuremotivs Phenylalanin-Glycin (*FG-Repeats*), die im Lumen der Kernporen ein dreidimensionales hydrophobes Netzwerk ausbilden, das nach heutigem Kenntnisstand als Permeabilitätsbarriere die freie Diffusion schwerer Moleküle (> 30 kDa) verhindert.

Anstelle dieses oberflächenbasierten Ansatzes sollte versucht werden, die Diffusion verschiedener fluoreszenzmarkierter Proteine in physiologisch relevanten Proteinkonzentrationen

nen zu verfolgen. Zunächst sollte aus Proteinen verschiedener Größen ein System modelliert werden, das Gesamtproteinkonzentrationen von 300 – 400 Gramm pro Liter enthält und somit das Zytoplasma eukaryontischer Zellen simulieren kann.

Begonnen wurde mit hohen Konzentrationen einzelner Proteine, allerdings zeigte sich schnell, dass dadurch spezifische Probleme auftreten. Kälberserumalbumin (BSA) zeigt z.B. ab einer Konzentration von 150 mg/ml einen sehr hohen Autofluoreszenzbeitrag, während Ovalbumin in ähnlichen Konzentrationen zu einer deutlichen Trübung der Lösung und einem starken Fluoreszenzhintergrund durch gestreutes Anregungslicht führt. Durch die Verwendung von Proteingemischen mit vier Komponenten (BSA, Ovo-Albumin, Pepsin und γ -Globulin) und die Wahl einer geeigneten Oberflächenpassivierungsmethode, um eine absorptive Anlagerung von Farbstoffen und Proteinen auf der Oberfläche zu vermeiden, wurde es geschafft, Messbedingungen mit physiologischen Proteinkonzentrationen zu finden. Sowohl bei der Diffusion des freien Farbstoffs ATTO 633, als auch von, mit diesem Farbstoff markierten Proteinen, wie Ovalbumin, BSA und Importin β , konnten reproduzierbare und konsistente Ergebnisse erhalten werden. Wie erwartet, war die Diffusionsgeschwindigkeit in diesem künstlichen Zytoplasma lediglich von Größe und Gewicht der verwendeten Proteine abhängig.

Die in diesem künstlichen Zytoplasma erhaltenen Werte sollen mit Ergebnissen verglichen werden, die in einem ebenfalls modellierten Kernporenlumen erhalten werden. Aktuell wird versucht, größere Mengen zweier Nukleoporine zu exprimieren. Besonders das Nukleoporin Nsp1 ist hierfür sehr interessant. Von diesem Protein ist bekannt, dass es durch eine Absenkung des pH-Wertes eine gelartige Konsistenz annimmt, die möglicherweise modellhaft für das dreidimensionale Netzwerk im Inneren der Kernpore ist. FCS-Experimente mit Proteinen verschiedener molekularen Massen unter- und oberhalb der 30 kDa-Grenze sollen Klarheit darüber bringen, ob die Bedingungen in den Kernporenkomplexen über diesen Ansatz angenähert werden können.

Während die punktuelle Untersuchung von Diffusionsvorgängen *in vitro* und *in vivo* mittlerweile eine Standardmethode geworden ist, ist die großflächige Untersuchung kompletter eukaryontischer oder prokaryontischer Zellen, die eine direkte Verknüpfung von Position, Fluoreszenzintensität und Dynamiken bietet, ein relativ neues Forschungsgebiet.

Mit Hilfe, der auf SFLIM basierenden, bildgebenden Diffusionmikroskopie (DIFIM) kann diese Aufgabe erfüllt werden. Zur Bestimmung der Diffusionszeiten werden alle Photonen innerhalb eines Bildpunktes zunächst autokorreliert anschließend wird eine Modellfunktion zur zweidimensionalen Diffusion angepasst. Bei der Wahl geeigneter Markierungstechniken für diese Anwendung müssen zwei zunächst gegenläufige Anforderungen erfüllt werden. Zum

Einen müssen sehr photostabile Fluorophore verwendet werden, da lange Messzeiten von bis zu 100 Millisekunden nötig sind, um eine hinreichend hohe Statistiken für die Auswertung zu erhalten. Zum Anderen ist ein sehr spezifisches und möglichst stöchiometrisches Verfahren für die *in vivo* Markierung nötig. Während bezüglich der Photostabilität eindeutig organische Farbstoffe zu bevorzugen sind, bieten endogene Fluorophore wie fluoreszierende Proteine die geforderte Stöchiometrie.

Eine Synthese aus den Vorteilen endogener und organischer Farbstoffe bieten verschiedene Fusion-Tags, die das Klonieren eines Fusionsproteins zwischen dem zu untersuchenden Molekül und einem für sie spezifischen Enzym erfordern. Zur *in vivo* Markierung wird dann ein farbstoffmarkiertes Substrat in die Zelle verbracht, welches nach Reaktion mit dem Enzym den Farbstoff kovalent und irreversibel auf das Fusionsprotein überträgt.

Der in dieser Arbeit genutzte SNAP-Tag verwendet als spezifisches Enzym die O⁶-Alkylguanosin-Alkyltransferase (hAGT), ein humanes DNA-Reparaturenzym, dessen physiologische Aufgabe das Entfernen von fremden Alkylgruppen von der DNA-Base Guanosin ist. Diese könnten ansonsten zu Mutationen im Erbgut führen. Das entsprechende Substrat ist Benzylguanin (BG). Wichtige Vorarbeiten in unserer Gruppe zeigten, dass Benzylguanin als Derivat des bekannten Fluoreszenzlöcher Guanin ebenfalls in der Lage ist, die Fluoreszenz einiger Farbstoffe sehr effizient zu löschen. *In vitro* Experimente zeigten, dass Substrate, die mit den rotfluoreszierenden Farbstoffen MR 121 und ATTO 655 markiert sind, erst nach der Reaktion mit der hAGT, die die Bindung zwischen dem BG und dem Fluorophor trennt, eine signifikante Fluoreszenz aufweisen. Vor der Reaktion mit der hAGT ist die Fluoreszenz der Farbstoffe infolge der räumlichen Nähe zum BG so stark gelöscht, dass diese zur nahezu hintergrundfreien *in vivo* Markierung verwendet werden können.

Die Anwendbarkeit dieser hintergrundreduzierten Markierungsmethode konnte in *E. coli* Bakterienzellen zum ersten Mal in einem lebenden System gezeigt werden. Angewendet wurde die Technik auf das Chemotaxis-Protein CheY, welches eine wichtige Funktion in der Informationsweiterleitung von den Rezeptoren zu den Flagellenmotoren einnimmt. Die Diffusion des markierten CheY innerhalb der Bakterienzellen wurde anschließend mit Hilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie untersucht. Zum ersten Mal konnte somit mit dieser neuartigen Methode eine relevante biologische Fragestellung untersucht und beantwortet werden.

Untersuchungen mit der bildgebenden Diffusionsmikroskopie in lebenden *E. coli* zeigten je nach Stärke der Induktion unterschiedliche Ergebnisse. Bei hoher Induktion, gleichbedeutend mit einer großen Anzahl an Kopien des zu untersuchenden Signalproteins, wurde eine nahezu homogene Verteilung der Diffusionszeit von etwa drei Millisekunden in den Bakterien beobachtet. Lediglich im umgebenden Periplasma wurde eine deutlich schnellere Diffusions-

zeit im Bereich von einigen hundert Mikrosekunden gemessen. Biologisch erklärbar wäre dieses Ergebnis durch eine deutliche Verlangsamung der Diffusion im Zellinneren durch die dort vorherrschende hohe Konzentration an Proteinen und DNA-Strängen, während das Periplasma im Außenbereich der Bakterien niedrigere Konzentrationen dieser Substanzen aufweist. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass ein hoher Anteil der erzeugten Proteine nicht aktiv an der Chemotaxis beteiligt ist und durch die hohe Anzahl der Kopien der gesamte Zellraum mit einer großen nahezu immobilen Fraktion gefüllt ist, sodass die Diffusion der vergleichsweise wenigen an der Chemotaxis beteiligten Signalproteine im hohen Gesamtsignal untergeht.

Bei deutlich niedrigeren Induktionsniveaus zeigt sich ein anderes Resultat. Hier wurden im Periplasma der Bakterienzellen langsamere Diffusionszeiten bestimmt als im Inneren der Zelle. Auch dieses Ergebnis lässt sich biologisch erklären. In seiner Eigenschaft als Chemotaxis-Protein ist das CheY für die Signalübertragung von den Rezeptorclustern zu den Flagellenmotoren verantwortlich. Diese Kompartimente sind beide direkt in der äußeren Membran der Bakterien verankert, so dass Wechselwirkungen mit diesen und anderen am Signaltransport beteiligten Proteinen in diesem Bereich zu einer deutlichen Verlangsamung der Diffusion führen, während die Diffusion im Zellinneren wechselwirkungsfreier ablaufen sollte.

Nicht möglich war es hingegen, erwartete Heterogenitäten an den Zellpolen im Bereich der Rezeptorcluster aufzulösen. Möglicherweise waren die Wechselwirkungen in diesen Bereichen zu langsam um mit DIFIM aufgelöst zu werden, oder es liegen intrinsische Probleme mit der sehr geringen Größe der Bakterien vor. Bei einer Größe von nur $2\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ und einem Zellvolumen von 10^{-15} Litern führen 100 Kopien des zu untersuchenden Moleküls zu einer 10^{-7} M Konzentration, die für Standard FCS-Messungen deutlich zu hoch ist; dort wird mit Konzentrationen unterhalb 10^{-9} M gearbeitet, ein Bereich, der einer Kopie pro Bakterienzelle entspricht.

Um Feinstrukturen innerhalb der *E. coli* auflösen zu können, muss auf Methoden zurückgegriffen werden, die in der Lage sind, die Abbeschen Auflösungskriterien zu überwinden. Bei Verwendung von speziellen Farbstoffen, mit denen STED oder STORM durchgeführt werden können, sollte es möglich sein, Abbildungen mit einer um einen Faktor 10 – 20 besseren Auflösung zu erhalten.

Summary

The development of fluorescence microscopy in the 1930s and the consecutive design of photostable organic fluorophores opened a new field for fundamental research in life sciences. By using selective techniques for fluorescent labeling of proteins, and oligonucleotides, a basic knowledge of their interactions and tasks could be acquired in the following decades. In the year 2008 Roger Tsien, Osamu Shimomura and Martin Chalfie have been awarded the Nobel Prize in chemistry for the discovery of the green fluorescent protein (GFP) and pioneering efforts to establish fluorescent proteins as a specific marker for fluorescence microscopy.

The introduction of highly sensitive methods like single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy in the 1990s offered new possibilities for the characterization of biological samples with unimagined accuracy. Most importantly, studying single molecules can unravel heterogeneities and subpopulations, which are typically hidden in ensemble experiments when a large number of molecules is measured simultaneously. Together with the use of stable organic fluorophores, spectroscopic methods highly contribute to the qualitative and quantitative understanding of biological processes *in vitro* and *in vivo*. One recent example is the observation of motor proteins like myosin, which lead to a mechanistic model on power transmission in muscle cells.

In recent years, the development of new spectroscopic methods split up into two important directions. One important trend is the development of nanoscopic methods, which overcome Abbe's optical diffraction limit by different means. Beside apparatus-supported sophisticated methods like STED (stimulated emission depletion) or 4PI microscopy especially stochastic approaches gain more and more popularity. Prominent examples, such as STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) and PALM (photo-activated localization microscopy), rely on the use of photo-switchable fluorophores. The second trend is the observation of dynamic heterogeneities in living systems such as eukaryotic and prokaryotic cells. Punctual investigation on dynamics can be done routinely with fluorescence correlation spectroscopy (FCS), whereas the combined acquisition of positions, fluorescence intensities and dynamics is a new and challenging field for spectroscopic researchers. Methods like the CCD-based family of image correlation spectroscopy (ICS) techniques or the diffusion imaging microscopy (DIFIM) offer the possibility to visualize diffusion processes in high-resolution confocal images.

Besides the development of novel spectroscopic techniques, there is an increased demand in new and specific fluorescent markers for fluorescence microscopy. Since their first application in biology in the 1980s, fluorescent proteins like GFP became a standard procedure for *in vivo* investigations due to their unrivaled specificity and stoichiometry, which is reasoned by the genetic coexpression with a protein of interest. However, for demanding spectroscopic methods, fast photobleaching and prominent intensity fluctuations limit their applicability. To take benefit of the investigation of single molecules photostable dyes that lead to high photon statistics are needed. In recent years, several hybrid-labeling approaches have been described, combining the advantages of endogenous labeling and the photostability of organic fluorophores. One of these approaches, the SNAP-Tag technology that exploits an enzymatic reaction of human O⁶-alkylguanosine-alkyltransferase (hAGT), was used in this thesis. Additionally, fluorescent semiconductor nanocrystals, so-called Quantum Dots, got into the scope of microscopic researchers as they feature excellent spectroscopic properties such as very high extinction coefficients and high molecular brightness.

During the experimental work of this thesis, several new methods were used and tested for their suitability to study relevant biological question: (i) a spectroscopic investigation on the fluorescence properties of Quantum Dots should answer the question, whether or not they are qualified for single-molecule spectroscopy; (ii) by using FCS, the diffusion characteristics of different proteins in physiologically relevant protein concentrations of 300 – 400 mg/ml were investigated. The obtained results in this artificial cytoplasm do not only allow a direct comparison between *in vitro* FCS- and DIFIM-measurements in living systems but also pave the way to understand transport processes through the nuclear pore complex. Therefore, additional experiments in an artificial nuclear pore lumen with high concentrations of nucleoporins are needed. The (iii) specific labeling of the chemotaxis-protein CheY and consecutive DIFIM-measurements in single *E. coli* visualized diffusion processes in a living organism. The background-reduced SNAP-Tag approach together with diffusion imaging microscopy could be applied for the first time to a living system.

Quantum Dots are preferably used in biological studies if a significant fluorescence signal has to be gained by a very limited number of fluorophores. Thanks to their special properties as semiconductor nanocrystals, they feature a very robust photostability and theoretically allow for infinite observation times. Furthermore, they are perfect tools for one-excitation multiplexing, as they can be excited at any given wavelength below their band gap. The biggest drawback of Quantum Dots is the fact that up to now no simple stoichiometric labeling procedure could be established, due to the distribution of coupling positions all over their surface. Starting with colocalization experiments of various Quantum Dots, it was the aim to study whether their excellent spectroscopic properties can also be used in sophisticated sin-

gle-molecule experiments. Substantial investigations of their spectroscopic properties showed that the fluorescence is significantly quenched in presence of numerous bio-relevant substances, like the nucleobases guanine, cytosine, thymine and adenine, as well as several amino acids such as tryptophan and histidine. Although the fluorescence quenching occurs in the presence of all nucleobases, the Quantum Dot 705 shows a specific quenching by thymine, which is 400% stronger than the quenching by the other bases. Specific quenching can always open an access to the development of intelligent probes. An example are Smart-Probes, a molecular diagnostic tool for the detection of specific DNA sequences, based on hairpin structured nucleic acid structures combined with the specific fluorescence quenching of fluorophores such as MR 121 by guanine.

Further investigations on the observed quenching phenomena proved that it is mostly caused by a static mechanism that involves the formation of a less fluorescent ground state complex between the Quantum Dot and the respective quencher molecules. Fluorescence lifetime analysis did not show a significant shortening upon addition of quenchers. Observations of the quenching at the single-molecule level showed that formation of a non-fluorescent ground state complex does not occur. The fluorescence quantum yield of single Quantum Dots is decreased upon addition, but does not disappear completely. At higher quencher concentrations, a saturation effect on the quenching efficiency was observed, another hint towards a direct surface interaction between the Quantum Dot and the quenching molecules. Measurements at different pH values yielded a nearly uniform strong correlation between Stern-Volmer-constant and the pH for all quenchers, indicating that changes in the electron density of organic quenchers lead to lower quenching efficiencies.

The most reasonable cause for the observed quenching is an oxidation of the excited Quantum Dots due to photo-induced electron transfer. By adding reducing agents like β -mercaptoethanol or Trolox, the quenching efficiencies could be decreased significantly, in the case of Trolox to nearly 95 %. Furthermore, one of the most interfering properties of Quantum Dots, the blinking, a significant stochastic fluctuation in fluorescence intensity caused by electron loss through an Auger process, was completely suppressed. If it was possible to introduce the application of Trolox or related substances into biological samples, this would be a great step towards avoiding experimental uncertainty and helping to use the excellent spectroscopic properties of these nanocrystals.

However, if the task is to observe dynamic processes like diffusion, Quantum Dots are not the first choice, as their enormous molecular weight and size would lead to artificially prolonged diffusion time which would interfere with the diffusion properties of the protein of interest. For FCS-experiments, small organic fluorophores are the labels of choice. Their molecu-

lar weight is in the range of a few percent of the proteins, and therefore do not influence the protein diffusion significantly.

Besides the *in vitro* investigation of protein or DNA binding kinetics, the main research field for FCS is the analysis of transport processes in living systems. One of the most important, partially still not understood, transport pathways is the exchange between the cytoplasm and the nucleus in eukaryotic cells. The only possible transit-routes are the nuclear pore complexes, which serve as channels between the nucleus and the cytoplasm. The transport mechanism strongly depends on the molecular cargo. Smaller molecules with molecular masses below 30 kDa just cross via free diffusion, whereas carrier-cargo complexes can only actively transport bigger molecules when a short genetic code, the nuclear localization sequence (NLS) is identified. The complete transportation cycle is energetically very efficient; only one equivalent of GTP is consumed for the disassembly of the carrier-cargo complex after shuttling.

The initially planned biomimetic construction of a nuclear pore complex could not be done, as the expression, extraction, purification and concentration of about 30 proteins that are engaged in this structure could not be accomplished. These proteins, altogether called nucleoporins, consist of two different domains; one is responsible for the spherical structure of the complex whereas long repetitions of the amino acid motif phenylalanine-glycine (FG-repeats) are involved in the assembly of a three-dimensional hydrophobic meshwork in the inner basket. This meshwork acts as a permeability barrier to avoid free diffusion of bigger molecules.

However, instead of a surface-based approach, the diffusion of different fluorescently labeled proteins should be followed in an artificial cytoplasm with physiological protein concentrations of about 300 – 400 mg/ml using fluorescence correlation spectroscopy. First experiments already showed that these concentrations could not be reached by using only one protein. While higher concentrations of bovine serum albumin contributed a high fluorescence background by autofluorescence, chicken egg albumin caused background by scattered excitation light. By designing mixtures of four proteins with different molecular weights (BSA, Ovalbumin, Pepsin and Globulin) and applying eligible surface modifications to avoid unspecific interactions with the glass surface, it was possible to find excellent experimental conditions at the required protein concentration. In about 10 different protein mixtures, the diffusion of the fluorophore ATTO 633 as well as fluorescently labeled proteins could be measured with reproducible and consistent results at final protein concentrations of more than 300 mg/ml.

Interestingly, the results suggest that it is not primarily the total concentrations of the protein mixtures, but also the molecular weight distribution of the proteins in the mixture that are re-

sponsible for the diffusion properties. Higher concentrations of the large globulins lead to an increase of the diffusion time by factors of 2 to 3, compared to mixtures with lower fractions of globulin. These results may become very interesting for the understanding of DIFIM data, which exhibit heterogeneous distributions of diffusion time inside the cytoplasm of eukaryotic cells. Slower diffusion times can be interpreted as areas where big proteins aggregate, whereas faster diffusion times indicate the presence of mostly small proteins.

To obtain a comparison the design of an artificial nuclear pore lumen is currently done, therefore two different nucleoporins, especially Nsp1 are expressed at large scales. Nsp1 is of great interest, as it is known to fade to a hydrogel-like texture at lower pH-values. Possibly this artificial hydrogel can be used as a model for the three-dimensional meshwork for FCS experiments. Comparative studies with different proteins below and above the 30 kDa limit will give enough data to evaluate whether or not this approach is promising.

For the observation of diffusion processes in living systems, a suitable labeling approach should additionally ensure a high specificity of endogenous fluorescent markers. In the past years, a variety of fusion-tag systems have been developed, combining photostable organic fluorophores with the advantages of endogenous labeling strategies. For the *in vivo* labeling of the chemotaxis protein CheY, the SNAP-Tag technique was applied in this work, an approach that genetically introduces the human DNA-housekeeping protein O⁶-alkylguanosine-alkyltransferase (hAGT) genetically into the plasmid of a protein of interest. Upon reaction with the fluorescently labeled substrate benzylguanine, the bond between the substrate and the dye is cleaved enzymatically, and the dye is covalently conjugated to the protein hAGT. Past research in our group showed that benzylguanine (BG), a molecule that contains the fluorescence quencher guanine, significantly quenches the fluorescence of several red-fluorescent dyes like MR 121 and ATTO 655. Upon bond cleavage between dye and BG, a significant increase in fluorescence intensity by a factor of 10 was observed.

The applicability of this novel background-reduced labeling approach in living bacteria could be proven for the first time in *E. coli*. It was used to label the chemotaxis protein CheY. The diffusion of CheY was then analyzed by using DIFIM as a first approach on a biologically relevant question.

The diffusion analysis showed results that strongly correlate with the number of copies of the fusion protein, which can be regulated by addition of IPTG. High concentrations of IPTG result in a high concentration of protein copies expressed. For these higher concentrations, a rather homogeneous distribution of the diffusion times in the inner part of the cell was found. Whereas the diffusion time in these regions was at about three milliseconds, diffusion in the periplasm was about a factor of 10 faster. A possible explanation is that proteins and DNA,

which slow down the diffusion, largely stay in the cell body while the periplasm is rather free of these substances. However, a high amount of CheY also raises the question, whether there is a major immobile fraction not taking part in chemotaxis but contributing most of the fluorescence intensity and therefore swamping the desired signal of the mobile fraction.

At significantly lower expression, an opposite distribution was acquired. The diffusion in the periplasm was considerably slower than in the inner parts. As the task of CheY is information transport from the receptor cluster to the flagella motor that are located at the outer membrane, a slower diffusion in this area due to interactions with receptors, effectors and other chemotaxis proteins seems much more reasonable.

Further heterogeneities in the bacteria, especially at the receptor clusters at the cell poles, could not be monitored. The optical resolution of a confocal microscope is too low to resolve fine structures in such small organisms. Another drawback for DIFIM in *E. coli* is the actual concentration of the fluorescent species. With a very small volume of only about $2 \cdot 10^{-15}$ liters, already a single copy leads to a 10^{-9} M concentration. Typical IPTG induction leads to more than a hundred copies, resulting in a 10^{-7} M fluorophore solution, which is beyond the limits for standard FCS-measurements.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Historische Entwicklung der Lebenswissenschaften	1
1.2 Entwicklung hochauflösender fluoreszenzmikroskopischer Methoden	3
1.3 Untersuchung der Diffusion des Chemotaxis-Proteins CheY in lebenden Bakterienzellen ...	7
1.4 Methoden zur in vivo Markierung lebender Zellen.....	9
1.4.1 Endogene Markierung mit fluoreszenten Proteinen	9
1.4.2 Organische Fluorophore.....	10
1.4.3 Fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle (Quantum Dots).....	12
1.4.4 Fusion-Tags.....	13
1.5 Diffusions-Messungen in biomimetischen Zytoplasmen.....	15
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	17
2.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	17
2.1.1 Absorption	17
2.1.2 Emission	21
2.1.3 Fluoreszenzquantenausbeute	24
2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer	25
2.1.5 Molekulare Wechselwirkungen und deren Einfluss auf die Fluoreszenz	27
2.2 Grundlagen der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie	35
2.2.1 Konfokale Mikroskopie	36
2.2.2 Konfokale Mikroskopie auf Einzelmolekülniveau	39
2.2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS).....	40
2.3 Quantum Dots	44
2.3.1 Struktur und Aufbau.....	44
2.3.2 Optische Eigenschaften.....	45
2.4 Der Kernporenkomplex.....	51
2.4.1 Aufbau und Größe	51

2.4.2 Transport durch die Kernpore	52
2.5 Escherichia coli	55
2.5.1 Struktur der Bakterien.....	56
2.5.2 Chemotaxis bei <i>E. coli</i>	57
2.6 In vivo Labelling von Proteinen	59
2.6.1 Fluoreszierende Proteine	59
2.6.2 Alternative Ansätze zur Markierung in lebenden Zellen	62
2.6.3 Der Snap-Tag	63
3. MATERIALIEN UND METHODEN	65
3.1 Chemikalien und Lösungsmittel	65
3.2 Fluoreszenzfarbstoffe, Quantum Dots und Snap-Tag-System	65
3.3 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an BG-Substrate und Proteine	65
3.4 Konzentrations- und Markierungsgradbestimmung.....	66
3.5 Kultivierung und in vivo Markierung der E. coli Bakterien	67
3.6 Oberflächenmodifikationen	67
3.6.1 Herstellung von APS-Oberflächen	67
3.6.2 Herstellung von BSA-Biotin Oberflächen	68
3.6.3 Herstellung von Poly-L-Lysin Oberflächen.....	68
3.6.4 Herstellung von PLL-g-Peg-Oberflächen	69
3.7 Das ROXS-System	70
3.7.1 Grundprinzip	70
3.7.2 Experimentelle Umsetzung	70
3.8 Standardgeräte	72
3.8.1 High performance liquid chromatography (HPLC)	72
3.8.2 Absorptionsspektrometer.....	72
3.8.3 Fluoreszenzspektrometer	73
3.8.4 Fluoreszenzlebensdauerbestimmung	73
3.9 Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie	76
3.9.1 Das Mikroskop	76
3.9.2 Wichtige Einzelkomponenten	78
3.9.3 Hardware-Korrelator-Karte ALV5000/E	82

3.10 Software	83
3.10.1 DAQLinescan (Datenaufnahme)	83
3.10.2 ANALinescan (Datenauswertung)	84
3.10.3 Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM)	85
4. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	89
4.1. Spektroskopische Untersuchung von fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots)	89
4.1.1 Kolokalisationsexperimente mit Quantum Dots.....	89
4.1.2 Löschung von Quantum Dots durch Nukleobasen und Aminosäuren	96
4.1.3 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung auf Einzelmolekülniveau	104
4.1.4 Stern-Volmer-Messungen unter Veränderung des pH-Wertes	107
4.1.5 Mechanistische Untersuchung zur Fluoreszenzlöschung	112
4.1.6 Untersuchungen unter Zugabe von Reduktionsmitteln	118
4.1.7 Messungen mit variablen Anregungswellenlängen	125
4.1.8 Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse	131
4.2 Mechanistische Untersuchungen der Diffusion durch den Kernporen-Komplex mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	135
4.2.1 Festlegung der Messbedingungen	136
4.2.2 Wahl eines geeigneten Fluorophors.....	137
4.2.3 Modellierung eines künstlichen Zytoplasmas.....	141
4.3 Untersuchungen der Diffusion des Signalproteins CheY mit Hilfe der bildgebenden Diffusionmikroskopie DIFIM	159
4.3.1 Auswahl der spezifischen Markierungsmethode und eines geeigneten Farbstoffs	161
4.3.2 Bestimmung der Mess- und Auswerteparameter für die bildgebende Diffusionsmikroskopie.	170
4.3.3 Messungen in lebenden Bakterienzellen.....	175
4.3.4 Diskussion der erhaltenen Ergebnisse	183
4.3.5 Diskussion möglicher Fehlerquellen.....	185
5. DISKUSSION UND AUSBLICK	189
5.1 Spektroskopische Untersuchung von fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen	189
5.2 Mechanistische Untersuchungen der Diffusion durch den Kernporen-Komplex mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)	196
5.3 Untersuchung der Diffusion des Signalproteins CheY mit Hilfe der bildgebenden Diffusionmikroskopie DIFIM	200

6. LITERATURVERZEICHNIS	205
7. ANHANG.....	217
Abkürzungen.....	217
Artikel.....	221
Vorträge.....	221
Poster.....	221

1. Einleitung

1.1 Historische Entwicklung der Lebenswissenschaften

Im letzten Jahrhundert wurden im Bereich der Lebenswissenschaften bemerkenswerte Fortschritte erreicht. Im späten 19. Jahrhundert legten die Arbeiten des Heidelberger Professors Albrecht Kossel den Grundstein für die Molekularbiologie; unter anderem entdeckte er die Aminosäure Histidin. 1910 wurden seine Pionierarbeiten mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt. Im Jahr 1919 gelang es Phoebus Levene, die Bestandteile der DNA, Base, Zucker und Phosphatreste zu identifizieren [Levene 1919], bereits im Jahr 1937 zeigten erste Untersuchungen von Röntgenbeugungsmustern, dass die DNA in einer repetitiven Form vorliegen muss [Astbury 1944]. Wenige Jahre später konnten James Watson und Francis Crick ebenfalls auf der Grundlage der Röntgenbeugung die Doppelhelixstruktur der DNA identifizieren [Watson 1953]. Weitere knapp 50 Jahre später konnte einer der großen Meilensteine, die komplette Entschlüsselung des menschlichen Genoms erreicht werden [Jasny 2001].

Die in der DNA codierten Erbinformationen werden in den kleinsten Untereinheiten jedes Organismus, den Zellen, über ein Abfolge von Schritten in Proteine überführt, die mit ihren jeweiligen hochspezialisierten Aufgaben die Zellfunktionen aufrecht erhalten. Der erste Schritt dieser Übertragung liegt in der Transkription der DNA in Messenger-RNA (mRNA), in der nachfolgen Translation werden in den Ribosomen die, in der mRNA codierten, Proteine erzeugt.

In den letzten Jahrzehnten gelang es, ein weitgehendes Verständnis für die wichtigsten Zellfunktionen aufzubauen. Grundlegende Mechanismen von Stoffwechselfvorgängen, Signalweiterleitung und weiteren wichtigen Vorgängen konnten in den letzten Jahren mitsamt den daran beteiligten Enzymen und Co-Faktoren konnten in den jüngst mit Hilfe moderner molekularbiologischer Verfahren aufgeklärt werden. Fortschritte in der Genetik erlauben es, selektiv die Expression einzelner Proteine zu unterdrücken (*Gen Knock-out*) und anschließend zu überprüfen, welchen Einfluss das Fehlen dieser Proteine auf die Lebensfähigkeit oder den Phänotyp des entsprechenden Organismus ausübt. Die Erkenntnisse, die aus diesen Studien gezogen werden, erlauben es nicht nur, die Regulationsprozesse in gesunden Zellen nachzuvollziehen, sondern ermöglichen es außerdem, Mechanismen zu isolieren, die zur Störung derselben in Folge einer Erkrankung führen. Von höchster Bedeutung in diesem Zusammenhang sind Arbeiten von Moore und de Clercq, denen es gelang die Virusaktivität des HI-Virus durch die effektive Blockierung der HIV1-Protease zu hemmen [Moore 2000, de Clercq 2007].

Die wichtigsten Reaktionskaskaden lassen sich in geeigneter Weise in biochemischen Pfaden (biochemical pathways) zusammenfassen. Abbildung 1.1 zeigt den metabolic pathway, der die Stoffwechselforgänge innerhalb lebender Zellen beschreibt.

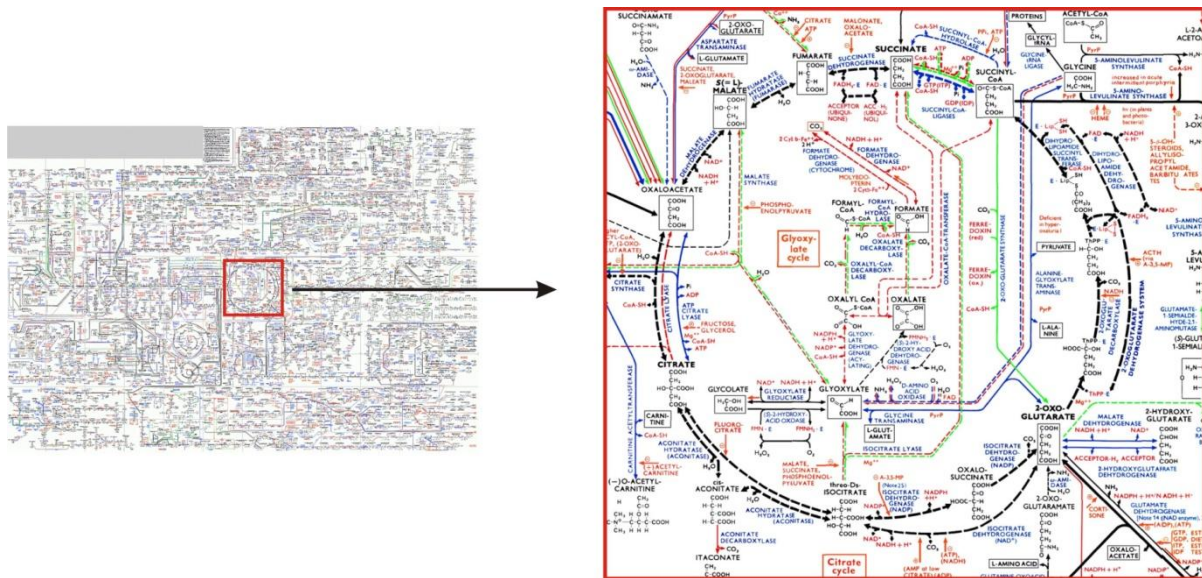


Abbildung 1.1: Der *metabolic pathway*: Eine scheinbar endlose Abfolge einzelner Reaktionsschritte unter Beteiligung tausender Proteine und Kofaktoren beim Stoffwechsel einer Zelle. Die Ausschnittsvergrößerung zeigt den Citrat-Zyklus, einen zentralen Kreislauf biochemischer Reaktionen im Stoffwechsel.

Der Großteil der beschriebenen Wechselwirkungen wurde bisher aber nur in *in vitro* Studien untersucht, wodurch viele Fragestellungen bezüglich der Funktionsweise der perfekt aufeinander abgestimmten einzelnen Reaktionszyklen innerhalb lebender Zellen und somit der Zellen selber vorerst unbeantwortet bleiben.

Der nächste Schritt muss darin liegen, diese auch auf zellulärer Ebene mit Hilfe geeigneter mikroskopischer Methoden zu untersuchen. Ein tiefgehendes Verständnis lässt sich nur in interdisziplinären Ansätzen erreichen. Neben den molekularbiologischen und genetischen Methoden sind auch synthetische und methodische Weiterentwicklungen aus verwandten Fachbereichen wie der Chemie, der Physik und neuerdings auch aus der Informatik von Nöten.

1.2 Entwicklung hochauflösender fluoreszenzmikroskopischer Methoden

Ein entscheidender Fortschritt in der zellulären Analytik wurde in den späten 1980er und frühen 1990er Jahren erreicht. Mit der Entwicklung der konfokalen Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie (SMS) öffneten sich neue Möglichkeiten, einen „Blick hinter die Kulissen“ biochemischer Abläufe auf molekularer Ebene zu erhalten [Moerner 1989, Orrit 1990, Shera 1990].

Durch den konfokalen Aufbau ermöglichten einzelmolekülfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit einer bis dahin ungekannten Präzision und Auflösung. Zahlreiche Modellvorstellungen konnten mit verschiedenen Methoden der SMS verfeinert werden. Neben der reinen Auflösungsverbesserung ermöglichten spezialisierte Verfahren wie der Förster-Energietransfer (FRET) die Auflösung von molekularen Wechselwirkungen im Bereich weniger Nanometer. Bei allen Fortschritten, die die konfokale Einzelmolekülspektroskopie erlaubte, ist auch sie in Bezug auf ihr optisches Auflösungsvermögen limitiert. Durch die Pionierarbeiten von Ernst Abbe auf diesem Gebiet ist bekannt, dass selbst bei der Verwendung perfekter optischer Bauteile, räumlich voneinander getrennte Strukturen nur dann getrennt voneinander abgebildet werden können, wenn bestimmte Mindestabstände zwischen ihnen liegen. Bei Verwendung eines Lasers mit einer Wellenlänge von 635 Nanometern liegt diese Mindestentfernung je nach verwendetem Objektivtyp zwischen 175 und 250 Nanometern in der lateralen Ebene und zwischen 600 und 900 Nanometern in axialer Richtung; Objekte, die näher zusammenliegen, bleiben in demselben Fluoreszenzspot verborgen.

Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurden in den letzten Jahren verschiedene nanoskopische Ansätze gefunden, die das optische Auflösungsvermögen um einen Faktor 10 – 20 zu verbessern vermögen.

Die ersten, apparativ sehr aufwändigen Ansätze wurden in den 1990er Jahren von Stefan Hell vorgestellt. Bei der 4-Pi Mikroskopie wird durch die Verwendung eines zweiten Mikroskopobjektivs die axiale Auflösung des Mikroskops auf etwa 100 Nanometer reduziert [Hell 1992]. Ebenfalls durch Stefan Hell wurde die STED-Mikroskopie (*eng. Stimulated emission depletion*) eingeführt [Wichmann 1994, Klar 2000]. Nach der Fluoreszenzanregung wird durch eine hochenergetische kreisförmige Einstrahlung eines zweiten Lasers (Donut-Puls) ein Großteil der angeregten Farbstoffmoleküle sofort depopuliert. Lediglich im Mittelpunkt des Donut-Pulses mit einem Durchmesser von ungefähr 20 – 30 Nanometern verbleiben angeregte Farbstoffmoleküle, deren Fluoreszenz detektiert werden kann. Dadurch lässt sich die laterale Auflösung auf etwa 20 – 30 Nanometer reduzieren.

Jüngst wurden weitere spektroskopische Methoden vorgestellt, die die optische Auflösung unter der Ausnutzung von schaltbaren Fluoreszenzfarbstoffen deutlich verbessern. Bei Verwendung entsprechender Farbstoffe wie ATTO 647N oder Cy5 lassen sich aus der Überlagerung sehr vieler Einzelbilder auf denen jeweils nur einer oder sehr wenige Farbstoffe fluoreszieren hochaufgelöste Aufnahmen zusammenfügen, deren laterale optische Auflösung ebenfalls im Bereich von 20-30 Nanometern liegt. Zu nennen sind hier PALM (*photo-activated localisation microscopy*), STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) oder deren Weiterentwicklung dSTORM (*direct stochastic optical reconstruction microscopy*) [Betzig 2006, Rust 2006, Heilemann 2008], die bei deutlich reduzierten Kosten dieselbe Leistungsfähigkeit aufweisen wie die apparativen Ansätze.

Neben der exakten Lokalisierung von biorelevanten Substanzen ist auch die Zusammensetzung molekularer Maschinen von großer Bedeutung. Oftmals bestehen molekulare Maschinen aus einer Vielzahl gleichartiger Bauteile, deren Anzahl mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmt werden kann. Zu nennen sind hier insbesondere „Number & Brightness“-Analysen, die die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie ausnutzen [Digman 2008] und die auf dem Photon Antibunching beruhende Koinzidenzanalyse [Weston 2002].

Ein weiteres aktuelles Thema bei der Entwicklung neuer fluoreszenzmikroskopischer Methoden ist die Verknüpfung der Aufnahme hochaufgelöster Intensitätsbilder mit der Visualisierung dynamischer Prozesse wie der Diffusion.

Zwar erlaubt die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie [Madge 1972] genaue Untersuchungen von Diffusionsprozessen oder chemischen Reaktionen auf verschiedensten Zeitskalen vom Submillisekundenbereich bis hin zu einigen Sekunden, aber in der Regel werden diese Informationen nur punktuell an diskreten Positionen innerhalb des zu erforschenden Systems gewonnen [Eigen 1994, Krichevsky 2002]. Die Anwendung der FCS auf die Untersuchung von GFP-markierten Proteinen konnte zwar in letzter Zeit erfolgreich eingesetzt werden [Haustein 2007], allerdings sind mit der langen Messdauer in lebenden Systemen auch photophysikalische Probleme wie Photobleaching nicht auszuschließen [Remington 2006]. Ein Ansatz zur Reduktion von Photozerstörung liegt in der scanning-FCS; hier wird das Beobachtungsvolumen wiederholt entlang einer definierten kreisförmigen Bahn bewegt, um das Ausbleichen der Fluorophore zu verhindern [Ries 2006].

Bildgebende Diffusionsanalysen basieren in aller Regel auf der Detektion mit CCD-Kameras. Durch diese Technik ist die Beobachtung von Dynamiken, infolge der limitierten Aufnahme-frequenz dieser Kameras, auf den Millisekundenbereich beschränkt.

Aus diesem Ansatz entwickelte sich zunächst die Image Correlations Spectroscopy (ICS), die bei langsamen Dynamiken hilfreich sein kann. Die hier zu Grunde liegende Hypothese ist, dass auf Grund der hohen Viskosität in Zellen Diffusionsvorgänge deutlich langsamer ablaufen als in *in vitro* Experimenten. 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 [Wiseman 1999]. Limitiert ist diese Methode durch die Wiederholrate der Bildaufnahme. Nur Diffusionsvorgänge, die langsamer verlaufen, können mit ICS erfasst werden. Aus dieser Grundidee entwickelte sich in schneller Folge eine ganze Familie verwandter spektroskopischer Methoden wie TICS (temporal ICS) [Wiseman 2000], Image Cross-Correlation Spectroscopy (ICCS) [Srivasta 1996], Spatio-temporal ICS (STICS) [Hebert 2005] und Particle ICS (PICS) [Kulkarni 2005]. All diese Methoden konnten erfolgreich in lebenden Systemen angewendet werden. Eine neuere Entwicklung ist die Raster ICS (RICS) [Brown 2007], die die Extraktion von Dynamiken und Konzentrationsgradienten aus hochauflösenden konfokalen Laserscanning-Aufnahmen erlaubt und somit eine sehr gute Synthese aus Auflösung und der Erfassung von Dynamiken darstellt.

Zur räumlichen Untersuchung von dynamischen Diffusionsprozessen in lebenden Zellen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein anderer Ansatz, die bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM), gewählt. Da alle für die Bestimmung von Diffusionszeiten benötigten Daten auch bei normalen SFLIM-Aufnahmen gewonnen werden, ist es möglich, durch eine signifikante Verlängerung der Messdauer auf 25 bis 100 ms pro Bildpunkt, einen Zugang zur Untersuchung dynamischer Prozesse zu erhalten. Hierzu werden die Photonen, die innerhalb eines Bildpunktes aufgenommen werden, korreliert, mit umgebenden Bildpunkten gemittelt. Anschließend wird eine Modellfunktion für zweidimensionale Diffusion an die Daten angepasst.

Durch die relativ kurzen Verweildauern pro Pixel ist es zwar nicht möglich, langsame Dynamiken zu verfolgen, hier sind die oben genannten ICS-Techniken überlegen, dafür wird durch diese Methode ein überlegener Zugang zu Untersuchungen im (Sub)-Millisekundenbereich geboten [Roth 2007]. Durch die Verwendung eines hochauflösenden konfokalen Mikroskops lassen sich Veränderungen der Diffusionszeit bis in die einzelnen Kompartimente einer Zelle hinein verfolgen.

Spezifisch markierte Transport- oder Signalproteine können somit in Einzelschrittmessungen in hoher Genauigkeit lokalisiert werden, während gleichzeitig auch eine qualitative Aussage über ihre Diffusion möglich ist. Neben der reinen Information über die Diffusionszeit lassen sich darüber hinaus aus der Amplitude der Korrelationsfunktion Aussagen über die lokalen Konzentrationen treffen. Wird zur Anregung ein gepulster Laser verwendet, steht mit der Fluoreszenzlebensdauer ein weiterer Parameter zur Verfügung, der eine Diskriminierung des

Fluoreszenzsignals von unspezifischer Autofluoreszenz der zu untersuchenden Probe erlaubt.

Nachdem erste Experimente mit farbstoffmarkierten Oligonukleotiden in eukaryontischen Zellen bereits die Anwendbarkeit und das Potenzial der Methode in lebenden Systemen belegten, sollte nun mit der bakteriellen Chemotaxis in *E. coli* eine biologisch hochrelevante Fragestellung untersucht werden.

1.3 Untersuchung der Diffusion des Chemotaxis-Proteins CheY in lebenden Bakterienzellen

Dynamische Bewegungen von Bakterienzellen wirken wie eine scheinbar chaotische Abfolge von geradliniger Schwimmbewegung, orientierungslosem Taumel und erneutem zielgerichtetem Schwimmen. Dieses scheinbar willkürliche Verhalten ist allerdings nicht chaotisch, sondern wird durch die Chemotaxis, eines der wichtigsten Signalweiterleitungsnetzwerke gezielt gesteuert.

Mit Hilfe der Chemotaxis ist es Bakterien, wie den in diesem Fall untersuchten *E. coli* möglich, aktiv auf ihre Umgebung zu reagieren und Gradienten sowohl von potenziellen Nahrungsquellen als auch von für sie giftigen Substanzen zu verfolgen bzw. zu meiden. Als zentrales Sinnesorgan besitzen *E. coli* Bakterien Rezeptorcluster an den Zellpolen, die aus vier verschiedenen Rezeptorproteinen aufgebaut sind, die wiederum hochsensitiv auf verschiedene Verbindungen reagieren. Eine schematische Darstellung der Chemotaxis zeigt Abbildung 1.2.

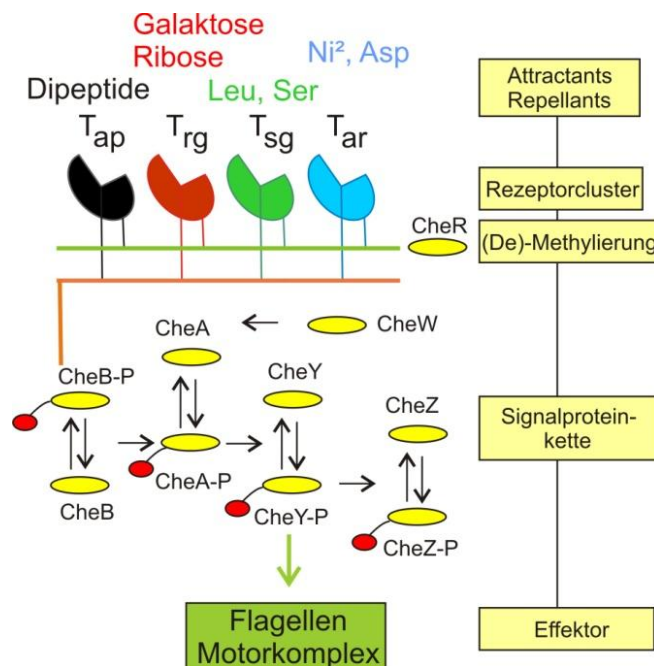


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Vorgänge der Chemotaxis in *E. coli* Bakterienzellen.

Detektieren die Rezeptoren Spuren von Nahrungsquellen oder Giften leiten sie diese Informationen an CheR, ein Signalprotein weiter. In einer Signalkaskade über weitere dephosphorylierte Signalproteine wird die Information an die Effektoren, die Flagellenmotoren, weitergeleitet. Je nachdem ob Lockstoffe oder Gifte entdeckt wurden, ändert sich der Phos-

phorylierungsgrad des am Ende der Signalkette stehenden CheY, dieser wiederum dient als Signal für die Drehrichtung der Flagellenmotoren. Die Anwesenheit von Lockstoffen, gleichbedeutend mit vorwiegend phosphoryliertem CheY, wird eine gleichmäßige Schwimmbewegung (*straight swim*) durch eine Bündelung der einzelnen Flagellen erreicht. In Anwesenheit von giftigen Substanzen hingegen sorgt eine gegenläufige Drehrichtung der Flagellen für ein zielloses Taumeln (*tumbling*) [Berg 2003].

Auf Grund der Zeitskalen, auf denen dynamische Prozesse im Rahmen der Chemotaxis auftreten [Schulmeister 2008] ist es möglich, diese mit Hilfe der eingangs vorgestellten bildgebenden Diffusionsmikroskopie (DIFIM) zu untersuchen. Zur Untersuchung wurde das Signalprotein CheY gewählt, da ihm, als letztem Glied der Signalkette, eine entscheidende Bedeutung für die Chemotaxis zufällt.

Da diese, wie die meisten fluoreszenzmikroskopischen Methoden, relativ hohe Ansprüche an die spektroskopischen Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzmarker stellen, war eine der Hauptaufgaben, das Signalprotein CheY hochspezifisch mit photostabilen Farbstoffen zu markieren.

1.4 Methoden zur *in vivo* Markierung lebender Zellen

Die hochspezifische und stöchiometrische Markierung von biologisch wichtigen Molekülen wie Nucleinsäuren oder Proteinen ist eine der herausforderndsten Aufgaben für analytisch arbeitende Forscher in der Biologie und den angrenzenden Wissenschaften Chemie und Physik.

Zwar stehen mittlerweile vier unterschiedliche Markierungsmethoden zur Verfügung, allerdings besitzen alle ihre spezifischen Vor- und Nachteile, die im Folgenden kurz diskutiert werden sollen.

1.4.1 Endogene Markierung mit fluoreszenten Proteinen

In den frühen 1960er Jahren entdeckte Osamu Shimomura das grünfluoreszierende Protein (GFP) in der Qualle *Aequorea victoria* [Shimomura 1961]. Die Abbildung 1.3 zeigt diese



Quallen; teilweise mit transgen eingefügten künstlichen fluoreszierenden Protein. Für ihre Pionierarbeiten in der Weiterentwicklung der fluoreszierenden Proteine, die sie zu einem enorm wichtigen Werkzeug in vielen Bereichen der Molekularbiologie machten, erhielten Shimomura, Roger Tsien und Martin Chalfie im Jahr 2008 den Nobelpreis für Chemie.

Abbildung 1.3: *Aequorea victoria*

auch die Entwicklung andersfarbiger Proteine wie den YFP-Mutanten *Citrine* und *Venus* [Griesbeck 2001, Nagai 2002] oder neuartiger DsRed-Varianten voran [Campbell 2001].

Nachdem fluoreszente Protein zunächst nur im grünen Spektralbereich zur Verfügung standen, schritt mit der breiten Anwendung fluoreszierender Protein auch die Entwicklung andersfarbiger Proteine wie den

Im Jahr 2004 präsentierte die Gruppe um Roger Tsien eine ganze Reihe fluoreszenter Proteine wie *mCherry*, *mTangerine* oder *dtTomato*, die mit verbesserten spektroskopischen Eigenschaften den gesamten Wellenlängenbereich von 460 – 580 Nanometern abdecken [Shaner 2004, 2008].

Der größte Vorteil der fluoreszierenden Proteine (FP) liegt in ihrer unvergleichbaren Spezifität. Dadurch, dass ihre genetische Information direkt mit der der zu untersuchenden Proteine

verknüpft wird, werden sie nur als Fusionsprotein exprimiert. Unspezifische Fluoreszenz aufgrund freier Farbstoffmoleküle ist somit intrinsisch ausgeschlossen.

Daneben werden sie direkt in den zu untersuchenden Zellen exprimiert. Gerade bei der Arbeit mit eukaryontischen Zellen ist das ein unschätzbare Vorteil. Alternative Markierungsmethoden erfordern oftmals sehr aufwändige Arbeitsschritte zum Einbringen der Fluoreszenzmarker in die Zellen. Zwar stehen dafür verschiedene chemische Transfektionsreagenzien wie Streptolysin-O oder Lipofectamin zur Verfügung, allerdings verursachen diese an den zu untersuchenden Zellen Beschädigungen an der Zellmembran; der dadurch verursachte Stress führt zu einer deutlichen Erhöhung der Zellautofluoreszenz. Das gilt ebenfalls für physikalische Transfektionsmethoden wie die Mikroinjektion oder Elektroporation.

Ungeklärt ist bis heute die Frage, inwieweit eine Markierung mit fluoreszenten Proteinen die eigentlichen Aufgaben der zu untersuchenden Proteine beeinflusst; immerhin liegen sowohl die Größe als auch die Molekulargewichte der fluoreszenten Proteine im Bereich der zu untersuchenden Proteine. Neben einer verzögerten oder ganz ausbleibenden Reifung als Fusionsproteine verlieren die Proteine teilweise auch ihre natürliche Funktionalität.

Der größte Nachteil liegt in ihren spektroskopischen Eigenschaften, die einem Einsatz in anspruchsvollen Studien an einzelnen Molekülen entgegenstehen. Insbesondere eine mangelhafte Stabilität gegenüber Photozerstörung steht ihrem Routineeinsatz für solche Anwendungen entgegen. Um die Vorteile aus der Untersuchung einzelner Moleküle ausnutzen zu können, werden hohe Statistiken benötigt, die nur durch lange Beobachtungszeiten erreicht werden können. Hier sind organische Fluorophore deutlich im Vorteil.

1.4.2 Organische Fluorophore

Für *in vitro*-assays ist der Einsatz von organischen Fluorophoren zu einer Standardmethode geworden. Meist ist es über einfache Kopplungsreaktionen möglich, Proteine oder DNA mit ihnen zu markieren. Da mittlerweile organische Fluorophore existieren, die den gesamten sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrum abdecken, bieten Techniken wie FRET (Förster resonant energy transfer) die Möglichkeit, Interaktionen zwischen mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Molekülen über eine Änderung des Fluoreszenzverhaltens zu verfolgen und somit Abstände und deren Änderungen im Nanometerbereich hochempfindlich zu bestimmen [z. B. Langer 2007, Schuler 2005].

Untersuchungen zur Fluoreszenzlöschung von Farbstoffen durch bestimmte Verbindungen

wie die Nukleinbase Guanin oder die Aminosäure Tryptophan bieten neuartige Untersuchungsmethoden, die die Fluoreszenzlöschung selektiv nutzen, um geringste Stoffmengen nachzuweisen. Ein Beispiel hierfür stellen die, in der Gruppe von Markus Sauer entwickelten Smart Probes dar. Kurze Oligonukleotide mit einer Stamm-Schlaufe-Struktur („Hairpin-DNAs“) und einem, in diesem Zustand durch Guanin gelöschten Farbstoff, zeigen nur dann eine signifikante Fluoreszenz, wenn sich die Hairpin-Struktur in Anwesenheit einer komplementären Gegensequenz öffnet und bieten somit einen hochspezifischen Zugang zu molekularer Diagnostik [u. a. Knemeyer 2000, Stöhr 2005]. Auf der Fluoreszenzlöschung durch die Aminosäure Tryptophan beruhen unter anderem mechanistische Studien zur Proteinfaltung [Neuweiler 2005].

Erst kürzlich wurde die Löschung von Tetramethyl-Rhodamin durch Cu^{2+} -Ionen dazu genutzt, Bindungskinetiken einzelner Kupferionen an Bipyridin-Komplexe zu untersuchen [Kiel 2007].

Daneben existiert eine Reihe von Farbstoffen, wie z. B. Cy5, deren Fluoreszenz selektiv durch Anregung mit Lasern verschiedener Wellenlängen geschaltet werden kann [Heilemann 2005] und die dadurch insbesondere für die eingangs erwähnten stochastischen Ansätze zur Überwindung der optischen Auflösungsgrenze interessant sind.

Für einige Farbstoffe, darunter ATTO 647N wurde kürzlich ein System aus Oxidations- und Reduktionsmittels vorgestellt (ROXS), dass durch Zurückdrängung von Triplettbildung und daraus resultierender Photozerstörung, deutlich verlängerte Beobachtungszeiten ermöglicht und die Gesamtfluoreszenzausbeute der Farbstoffe dramatisch erhöht [Vogelsang 2008] Davon profitieren auch anspruchsvolle Anwendungen, wie z. B. die Koinzidenzanalyse oder die bildgebende Diffusionsmikroskopie [Roth 2007], durch verbesserte Photonenstatistiken.

Allerdings haben organische Fluorophore auch einige intrinsische Nachteile, die ihrer Verwendung, insbesondere in *life-cell* und *in vitro* Anwendungen entgegenstehen.

Dadurch, dass ihre Kopplung an die zu untersuchenden Moleküle über aktive Kopplungsgruppen, NHS-Ester oder Maleimide, verläuft, kann eine Mehrfachmarkierung der Zielmoleküle nicht ausgeschlossen werden, wenn an ihnen mehrere potenzielle Kopplungspositionen vorhanden sind. Ebenso ist es kaum möglich, selektiv eine von mehreren möglichen Kopplungsstellen zu markieren; ein Problem, das insbesondere in quantitativen Studien auftritt. Bereits oben wurden die experimentellen Schwierigkeiten diskutiert, die auftreten, wenn farbstoffmarkierte Konjugate zur Messung in eukaryontische Zellen eingeschleust werden.

Zumindest dieser Punkt fällt bei der Arbeit mit Bakterien nicht ins Gewicht. Diese verfügen über andere Aufnahmemechanismen als eukaryontische Zellen und inkorporieren alle Fluorophore mit Ausnahme von Quantum Dots.

1.4.3 Fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle (Quantum Dots)

Neben organischen Fluorophoren haben sich in den letzten Jahren fluoreszente Halbleiternanokristalle, sogenannte Quantum Dots, zu einem Standard-Werkzeug in bildgebenden Verfahren entwickelt.

Aufgrund ihres Aufbaus aus einem metallischen Festkörper treten klassische Photozerstörungsmechanismen bei ihnen nicht auf, so dass theoretisch eine beliebig lange Beobachtungsdauer zu Verfügung steht [Alivisatos 2005]. Darüberhinaus verfügen sie über sehr hohe Extinktionskoeffizienten bis in den Bereich von $10.000.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. Da Quantum Dots aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften mit Licht jeder Wellenlänge unterhalb ihres Emissionsmaximums angeregt werden können, eignen sie sich zudem sehr gut für Kollokalisierungsexperimente mit nur einer Anregungsquelle. Daneben besitzen sie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten [Reiss 2002] und deutlich längere Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von deutlich über 25 ns [Elfrös 2000] und eine hohe molekulare Helligkeit. Diese Eigenschaften machen sie zu den Fluorophoren der Wahl, wenn es darum geht aus einer geringen Anzahl von Farbstoffen ein hohes Signal zu erzeugen [Xiao 2004, Tokumasu 2003]

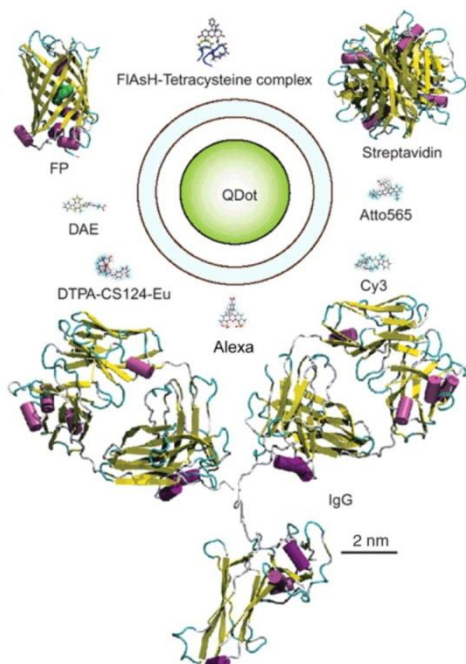


Abbildung 1.4: Die Größe eines Quantum Dots im Vergleich zu verschiedenen biorelevanten Verbindungen.

Bekannte Nachteile liegen in ihrer molekularen Masse, die im Bereich von 1 MDa liegt und ihrer Größe, die je nach Emissionswellenlänge zwischen 10 und 20 nm liegt. Eine vergleichende Darstellung der Größe bietet Abbildung 1.4 [Giepmans 2006].

Darüber hinaus wurden bisher keine Synthesewege vorgestellt, die eine stöchiometrische 1:1 Markierung mit den zu koppelnden Molekülen erlauben, da ihre gesamte Oberfläche mit potenziellen Kopplungsstellen überzogen ist. Weitere Nachteile liegen im sogenannten *Blinking*, einem stochastischen Schwanken der Fluoreszenzintensität, die dabei teilweise minutenlang auf Werte nahe null sinkt [Kuno 2002, Bawendi 2001] und teilweise sprunghaft auftretenden Verschiebungen der Emissionwellenlängen hin zu kürzeren Wellenlängen [van Sarck 2002].

Obwohl die Zellgiftigkeit von Quantum Dots noch nicht abschließend geklärt ist, für Quantum Dots der früheren Generationen wurden Zellschäden durch freigesetzte Cadmium- und Selenionen nachgewiesen [Dubertret 2002, Derfus 2004], wurden sie in den letzten Jahren

auch erfolgreich in lebenden Tieren eingesetzt. Eine der bekanntesten Aufnahmen, die bis-



Abbildung 1.5: Multiplexing verschiedener Tumorarten mit Quantum Dots unterschiedlicher Farben in einer Maus.

her veröffentlicht wurden (Abbildung 1.5), zeigt die Markierung mehrerer Tumore in einer Maus. Ziel dieser Arbeit war es, eine sehr selektive Wirkstofffreisetzung zu erreichen, indem ein Koppelungsprodukt aus Quantum Dot, spezifischem Antikörper und Wirkstoff in dem Körper injiziert wird. Nur durch eine starke Anregung des QD von außen kann der Wirkstoff dann genau dort freigesetzt werden, wo er benötigt wird. [Kim 2003].

Auch für Quantum Dots gilt, dass sie nicht einfach in eukaryontische Zellen einzuschleusen sind. Allerdings wurden Protokolle veröffentlicht, mit denen Quantum Dots unter Verwendung von β -Argininen inkorporiert werden konnten. Für Bakterien hingegen sind keine Möglichkeiten zur Einschleusung von Quantum Dots bekannt.

1.4.4 Fusion-Tags

In letzter Zeit wurden verschiedene Labellingsysteme vorgestellt, die die Vorteile kleiner organischer Farbstoffe mit ihren sehr guten photophysikalischen Eigenschaften mit der sehr hohen Spezifität der fluoreszierenden Proteine verbinden. Systeme wie z.B. die kommerziell erhältlichen Halo-Tags (Promega) oder Snap-Tags (Covalys) erfordern zwei verschiedene Arbeitsschritte zur hochspezifischen Fluoreszenzmarkierung. Zunächst muss ein Fusionsprotein aus dem Zielprotein und einem für das System spezifischen Enzym (z. B. eine Halogenase oder die O⁶-Alkylguanosin-Alkyltransferase kloniert und exprimiert werden [Keppler 2003, 2004]. Unter Zugabe eines spezifischen farbstoffmarkierten Substrats und Ausnutzung der jeweiligen hochsensitiven Enzymfunktionen wird *in situ* eine stabile kovalente Bindung zwischen dem Fusionsprotein und dem gewählten Fluorophor geknüpft. Die Abbildung 1.6 erläutert die Funktionsweise des in dieser Arbeit für die spezifische *in vivo*-Markierung von *E. coli* Bakterienzellen verwendeten Snap-Tag Systems.

Unter Ausnutzung der Fluoreszenzlöschung durch das Substrat Benzylguanin, kann durch die Wahl geeigneter Farbstoffe zudem eine deutliche Reduktion unspezifischer Hintergrundfluoreszenz erreicht werden [Stöhr 2008, Stöhr 2009].

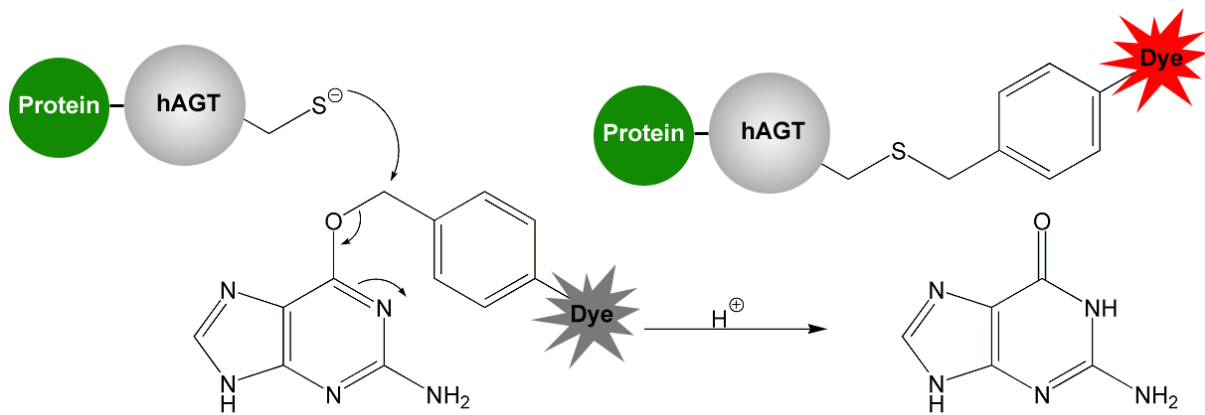


Abbildung 1.6: Kovalente Markierung eines hAGT-Fusionsproteins mit einem O⁶-Benzylguanin-Farbstoffsubstrat. Nach der Reaktion kann der durch das Benzylguanin gelöschte Farbstoff MR 121 wieder fluoreszieren

Auf der Basis der obigen Diskussion fiel die Wahl eines geeigneten Markierungssystems für die Untersuchung der Chemotaxis auf das Snap-Tag System. Da die gewählte spektroskopische Methode, die bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM), relativ lange Messzeiten und hohe Photonenstatistiken erfordert, war die Verwendung der zu empfindlichen fluoreszenten Proteine von Beginn an ausgeschlossen. Aus den oben geschilderten Gründen war der Einsatz von Quantum Dots oder die direkte Anfärbung mit organischen Farbstoffen ebenfalls nicht möglich. Der Einsatz des Snap-Tag Systems in Kombination mit fluoreszenzgelöschten BG-Substraten hingegen bietet genau die Eigenschaften, die zur Untersuchung nötig sind: die sehr hohe Spezifität endogener Markierung gepaart mit der Photostabilität organischer Fluorophore.

1.5 Diffusions-Messungen in biomimetischen Zytoplasmen

Der Transport von molekularer Fracht zwischen dem Zellkern und dem umgebenden Zytoplasma durch den Kernporenkomplex ist der wichtigste Transportprozess in eukaryontischen Zellen. In der Kernmembran jeder Zelle befinden sich ungefähr 2000 Kernporen, durch die jeweils bis zu 1000 Proteine pro Sekunde in beide Richtungen diffundieren können. Neben dem schnellen Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern dient die Kernpore zusätzlich als Barriere, die die freie Diffusion größerer Moleküle in den Zellkern verhindert, und hat somit eine Schutzfunktion für die im Zellkern befindliche Erbinformation.

Am Aufbau eines Kernporenkomplexes sind ungefähr 30 verschiedene Proteine beteiligt, die im Verbund als Nukleoporine bezeichnet werden. Während ein Teil der Nukleoporine direkt

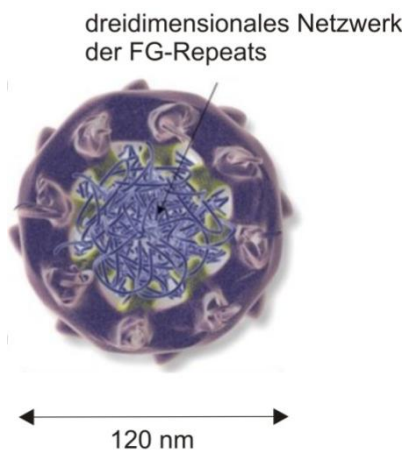


Abbildung 1.7: Draufsicht auf einen Kernporenkomplex. Gut zu erkennen ist das dreidimensionale Netzwerk der FG-Repeat.

am Aufbau der ringförmigen Struktur der Kernpore beteiligt ist, liegt ungefähr die Hälfte der Nukleoporine in nahezu ungefalteter Form vor und füllt das Innere der Kernpore (Lumen) aus. Da die ungefalteten Proteine lange Wiederholungen des Aminosäuremotivs Phenylalanin-Glycin (FG) besitzen, werden sie FG-Nukleoporine, oder kurz FG-Repeats, genannt. Die Funktion des dreidimensionalen hydrophoben Netzwerks aus den FG-Repeats ist bis heute noch nicht genau aufgeklärt. Unstrittig ist allerdings, dass es eine Permeabilitätsbarriere ausbildet, die die freie Diffusion schwererer Moleküle durch den Komplex effizient unterbindet. Abbildung 1.7 zeigt die schematische Ansicht der Kernpore von oben.

Das Durchqueren der Kernpore ist für kleinere Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 30 kDa durch Diffusion möglich. Für größere Moleküle hingegen ist die passive Diffusion nicht möglich oder stark behindert. Weisen sie eine kurze Aminosäuresequenz, die Kernlokalisierungssequenz (NLS) auf, werden sie in mit Hilfe von Transportproteinen, wie der Familie der Importine, als Transportkomplex durch die Kernpore befördert.

Mechanistisch ist der Transportzyklus bereits weitestgehend verstanden und wird mittels des Ran-GTP Zyklus in geeigneter Form beschrieben. Ein Transportzyklus besteht aus vier verschiedenen Schritten; der Bildung eines Cargo-Carrier-Komplexes aus der Fracht und einem Importrezeptor, der Passage durch die Kernpore, dem Zerfall des Transportkomplexes auf der Kernseite und dem Recycling der Importine, die durch spezielle Exportproteine in einem

Komplex ins Zytoplasma zurückbefördert werden. Der einzige Schritt bei dem Energie verbraucht wird, ist die Freisetzung der Importine aus dem Exportkomplex im Zytoplasma.

Experimentell sollte durch die biomimetische Modellierung eines Zytoplasmas und eines Kernporenlumens versucht werden, die Diffusionsgeschwindigkeit verschiedener Proteine mit molekularen Massen ober- und unterhalb der 30 kDa-Grenzen zu messen, um zu untersuchen, ob sich das komplexe Diffusionsverhalten in der Kernpore *in vitro* nachvollziehen lässt. Zur Herstellung eines künstlichen Zytoplasmas mit einer physiologischen Gesamtproteinkonzentration von 300-400 mg/ml mussten verschiedene Parameter optimiert werden, um unter diesen schwierigen experimentellen Bedingungen vertrauenswürdige Ergebnisse zu erhalten. Neben der Einführung geeigneter Oberflächenpassivierungsmethoden umfasste die experimentelle Arbeit auch die Herstellung und Charakterisierung von Gemischen aus vier unterschiedlichen Proteinen.

Um Vergleichsmessungen in biomimetischen Kernporenlumen durchführen zu können, müssen große Mengen (bis zu 20 mg) verschiedener Nukleoporene zunächst in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt und aufkonzentriert werden; ein sehr aufwändiges Verfahren, da bei normalen Ansätzen lediglich Mengen im Bereich von weniger als einem Milligramm gewonnen werden können. Da *E. coli* ein bereits in sehr vielen Bereichen komplett untersuchter Organismus ist, bietet er zur Gewinnung von Proteinen unter dem molekularen Schrankengewicht von 100 kDa den besten Zugang. Durch einfache Einschleusung von Plasmiden, schnelles exponentielles Wachstum der Population und einfache Methoden zur Abtrennung und Aufreinigung der erzeugten Proteine ist *E. coli* in der heutigen molekularen Biologie ein sehr wichtiges Routinewerkzeug zur Herstellung kleinerer bis mittlerer Proteinnengen geworden. Proteine mit Molekulargewichten von mehr als 100 kDa hingegen werden in *E. coli* nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten. Für deren Gewinnung in größeren Maßstäben muss deshalb auf deutlich komplexere Methoden wie z. B. die Expression in Insektenzellen zurückgegriffen werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Die Beobachtung der Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Atomen und Molekülen ermöglicht es, wichtige Informationen über deren Aufbau zu erlangen. Bei der Betrachtung der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit einem Atom werden Informationen über die energetischen Verhältnisse der Elektronenhülle erhalten, während bei der Untersuchung der Wechselwirkungen mit Molekülen weitere Parameter wie der Abstand zwischen den Atomen im Molekül und die zwischen ihnen herrschenden Kräfte hinzukommen.

2.1.1 Absorption

Wird ein Photon der Wellenlänge λ von einem Atom oder Molekül absorbiert, so wird ein Elektron aus seinem Singulettzustand S_0 unter Aufnahme der Energie ΔE in den energetisch höheren Singulettzustand S_1 angeregt. In seiner Frequenzbedingung für die Absorption fand Nils Bohr einen Zusammenhang zwischen der Frequenz ν des eingestrahlten Photons und der Energiedifferenz

$$\Delta E = h \cdot \nu = S_1 - S_0$$

Wobei h dem Planckschen Wirkungsquantum entspricht. Nur wenn diese Beziehung erfüllt ist, kann eine Absorption des Photons durch das Atom oder Molekül stattfinden. Trifft elektromagnetische Strahlung mit der Frequenz ν auf ein Molekül im Grundzustand 0, das durch die Wellenfunktion ψ_0 beschrieben wird, tritt diese in Wechselwirkung mit dem Molekül. Nach der Absorption eines Photons befindet sich das Molekül nicht länger in seinem Grundzustand 0, sondern in einem energetisch höheren angeregten Zustand 1, der mit der Wellenfunktion ψ_1 beschrieben wird. Daher gilt für die Übergangsenergie ΔE

$$\Delta E = E_1(\psi_1) - E_0(\psi_0) = \Delta E_{\text{el}} + \Delta E_{\text{vib}} + \Delta E_{\text{rot}}$$

Da die elektronische Anregung eines Moleküls deutlich höhere Energien erfordert als eine Anregung in höhere Schwingungs- (ΔE_{vib}) oder Rotationsniveaus (ΔE_{rot}), werden diese bei der Absorption elektromagnetischer Strahlung ebenfalls angeregt. Dadurch erklärt sich der

Übergang von den Linienspektren einzelner Atome hin zu Absorptionsbanden, wie sie hauptsächlich bei größeren Molekülen auftreten, da bei diesen eine Vielzahl von möglichen Übergängen energetisch sehr dicht beieinanderliegt.

Die Energiedifferenz zwischen zwei elektronischen Zuständen ist normalerweise so groß, dass die nötige Anregungsenergie, im Gegensatz zu der für Schwingungs- oder Rotationsanregung, thermisch nicht aufgebracht werden kann. So beträgt die Energielücke zwischen den Zuständen S_0 und S_1 beispielsweise für die Klasse der Rhodaminfarbstoffe ungefähr 2,2 eV (212,3 kJ/Mol). Nach dem Boltzmann'schen Verteilungssatz liegt das Verhältnis von Molekülen im angeregtem Zustand zu solchen im Grundzustand bei Raumtemperatur bei etwa 10^{-37} . Elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge im Bereich von 400 – 800 nm hingegen besitzt eine Energie von 1,5 – 3 eV und ist damit in der Lage, elektronische Anregungen hervorzurufen.

Eine Möglichkeit, die Übergangswahrscheinlichkeit eines Elektrons aus seinem Grundzustand in den ersten angeregten Zustand zu quantifizieren, bietet die dimensionslose Oszillatorstärke f . Klassisch betrachtet repräsentiert sie den Anteil aller Elektronen, die diesen Übergang vollziehen. Die quantenmechanische Betrachtungsweise der Oszillatorstärke f_{01} für einen Übergang aus dem Grundzustand in den ersten angeregten Zustand lautet

$$f_{01} = \text{const.} \cdot \Delta E \cdot |\overrightarrow{\mu_{01}}|^2$$

Wobei ΔE die Energiedifferenz zwischen den energetischen Zuständen und μ_{01} das Übergangsdipolmoment beschreibt. Das Übergangsdipolmoment ist definiert als

$$\overrightarrow{\mu_{01}} = \int \varphi_0 \cdot \mu \cdot \varphi_1 dx dy dz$$

Die Oszillatorstärke, und somit auch die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang, ist somit direkt proportional zum Übergangsdipolmoment. Falls das Übergangsdipolmoment 0 ist, ist der betreffende Übergang verboten und es findet keine Absorption statt. Experimentell zugänglich ist die Oszillatorstärke über den integralen Absorptionskoeffizienten, den folgende Formel beschreibt

$$A = \int \varepsilon_\nu d\nu$$

Hierbei ist ε_ν der molare Absorptionskoeffizient bei der Frequenz ν . Falls der Absorptionskoeffizient einer isolierten Bande, die nicht mit anderen überlappt, bestimmt werden soll, kann er, als die Fläche unter der Absorptionsbande, näherungsweise als das Produkt des Extinktionskoeffizienten ε_ν und der Halbwertsbreite $\Delta\nu_{1/2}$ abgeschätzt werden.

Die Oszillatorstärke lässt sich dann mit Hilfe des ermittelten Absorptionskoeffizienten nach folgender Gleichung berechnen

$$f = \frac{4m_e c \varepsilon_0}{N_A e^2} \cdot A$$

Mit: m_e = Masse des Elektron, c = Lichtgeschwindigkeit, N_A = Avogadro-Zahl, ε_0 = elektrische Feldkonstante und e = Elementarladung.

Für erlaubte Übergänge bei Farbstoffmolekülen liegt die Oszillatorstärke in der Regel in der Größenordnung von 1.

Die Intensität eines Lichtstrahls nimmt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz auf seinem Weg durch die Probe exponentiell ab

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Hierbei ist A die Absorption, I_0 und I die Intensität vor und nach dem Durchlaufen der Probe, ε der molare Extinktionskoeffizient, c die Konzentration der Probe und d die durchstrahlte Schichtdicke. Der Extinktionskoeffizient ist ein Maß für die Absorption eines Stoffes bei einer bestimmten Anregungswellenlänge. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann er leicht berechnet werden, wenn drei Restriktionen eingehalten werden: Es gilt nur für monochromatisches Licht, es gilt nur für verdünnte Lösungen ($c < 10^{-2}$ M) und es setzt voraus, dass in der Lösung nur eine absorbierende Spezies vorliegt.

Theoretisch errechnete Werte ergeben eine Übergangszeit von ca. 10^{-15} s für die Absorption elektromagnetischer Strahlung. Da diese Zeitspanne sehr kurz ist, kann hier die Born-Oppenheimer Näherung angenommen werden. Sie besagt, dass eine elektronische Anregung so schnell stattfindet, dass die Atomkerne nicht durch eine Veränderung ihrer Position innerhalb des Moleküls reagieren können, da deren Masse um ein Vielfaches höher ist als die der Elektronen. Da während einer elektronischen Anregung die Elektronendichte innerhalb eines Moleküls verschoben wird, befindet sich das Molekül nach der Anregung in einer Lage außerhalb des Gleichgewichts, so dass das Molekülgerüst in Schwingung gerät. Da sich also das Kerngerüst während der Absorption nicht verändert, spricht man hierbei von einem vertikalen Übergang, da dieser im Potentialdiagramm senkrecht verläuft (vgl. Abb. 2.1 Condon [1928]).

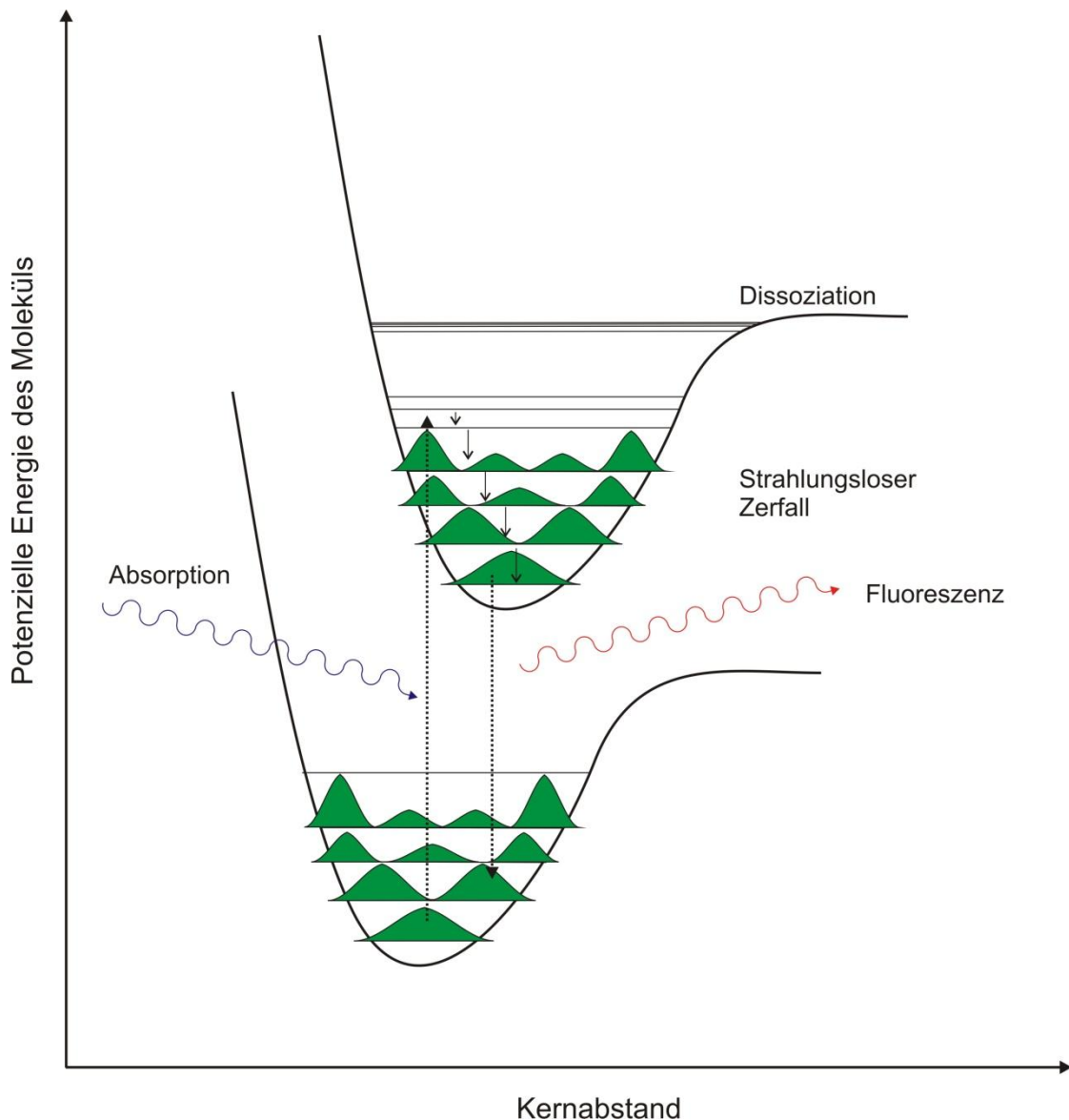


Abbildung 2.1: Das Franck-Condon-Prinzip: Mechanismus der Fluoreszenz.

Das Franck-Condon-Prinzip besagt, dass das Elektron aus dem Bereich seiner höchsten Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Gleichgewichtslage des Kerngerüsts angeregt wird. Ebenso muss der Übergang in einen Bereich mit einer hohen Aufenthaltswahrscheinlichkeit erfolgen. Da jedoch das Potenzialdiagramm des angeregten Zustands gegenüber dem des Grundzustands leicht verschoben ist, kann der Übergang nur in angeregte Vibrationszustände erfolgen. Nach diesem Übergang relaxiert das Elektron innerhalb von ca. 10^{-12} s in den niedrigsten Schwingungszustand des ersten elektronisch angeregten Zustands. Aus diesem heraus kommt es dann zum spontanen Übergang in den schwingungsangeregten elektronischen Grundzustand unter Abgabe eines Photons. Da durch die Schwingungsrelaxationen Energie in Wärme umgewandelt wird, hat dieses Fluoreszenzphoton immer eine längere Wellenlänge als das ursprünglich absorbierte Photon.

2.1.2 Emission

Bei der spontanen Emission von Photonen aus einem angeregten Zustand wird zwischen zwei unterschiedlichen Mechanismen unterschieden: Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Die verschiedenen strahlenden und strahlungslosen Relaxationswege werden in einem Jablonski-Diagramm (Abb. 2.2) zusammengefasst. Es illustriert alle Vorgänge, die zwischen erfolgter Absorption bis zur Rückkehr in den Grundzustand des Moleküls ablaufen können.

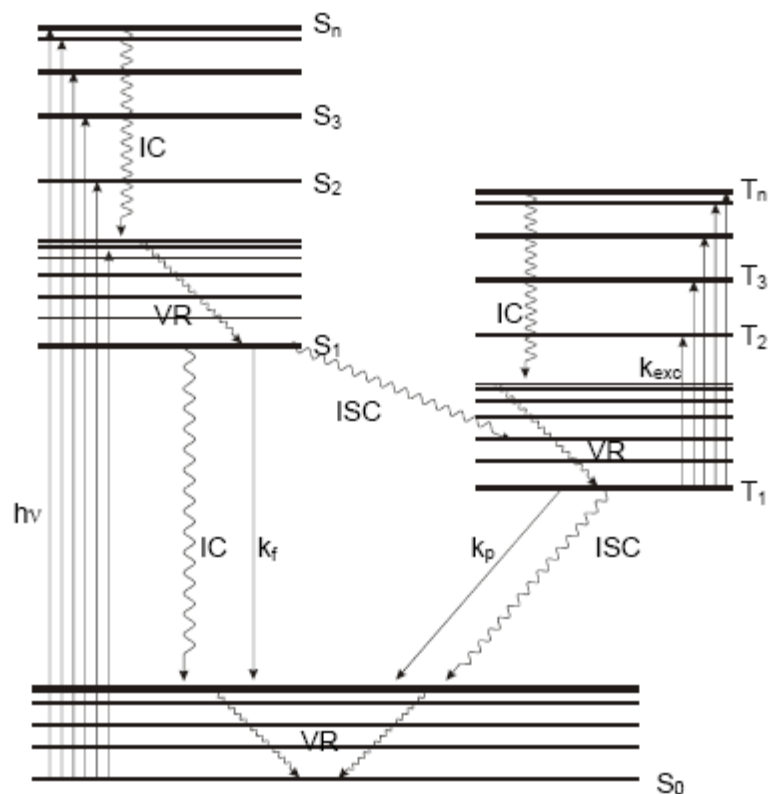


Abbildung 2.2: Energieniveau-Schema eines organischen Fluorophors (Jablonski-Diagramm) IC = Internal Conversion, VR = Vibrational relaxation, ISC = Intersystem Crossing.

Nur unmittelbar nach der Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge befindet sich das Farbstoffmolekül in höheren Schwingungsniveaus eines angeregten Singulettzustands. In der Regel handelt es sich hierbei um den S_1 -Zustand, allerdings sind auch höhere Zustände wie S_2 , S_3 und S_4 möglich. Da die Anregung sehr schnell innerhalb von 10^{-15} s vonstatten geht, ändert sich der Spin währenddessen nicht (Spinverbot). Triplettzustände mit ungepaarten Elektronenspins können also zunächst nicht erreicht werden. Werden mögliche chemische Reaktionen außer Acht gelassen, ergeben sich sieben photophysikalische Mechanismen, die zur Depopulation des angeregten Zustands führen können.

Übergang	Beschreibung	Rate	Zeit [s]
$S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	Fluoreszenz	k_F	10^{-9}
$S_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$	Strahlungslose Relaxation, Lösung	k_{IC}	$10^{-6}-10^{-7}$
$T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$	Phosphoreszenz	k_P	$10^{-3}-100$
$T_1 \rightarrow S_0 + \text{Wärme}$	Strahlungslose Relaxation, Lösung	k_{ISC}	$10^{-3}-100$
$S_n \rightarrow S_1$	Strahlungslose Relaxation	k_{IC}	$10^{-14}-10^{-10}$
$S_1 \rightarrow T_1$	Intersystem Crossing	k_{ISC}	$10^{-10}-10^{-8}$
$S_1 \rightarrow S_1$	Schwingungs-Relaxation	k_{VR}	$10^{-12}-10^{-10}$

Tabelle 2.1: Mögliche Relaxationsprozesse eines angeregten Farbstoffmoleküls.

Elektronen, die sich in höheren angeregten Niveaus befinden (S_2 , S_3 , S_n), gelangen in Lösungen schnell und strahlungslos zurück in den S_1 -Zustand (Kashas Regel). Die Elektronen, die sich in höheren Schwingungsniveaus des S_1 -Zustandes befinden, relaxieren im Subpikosekundenbereich in die Boltzmann-Verteilung der Schwingungszustände des elektronischen Grundzustands [Kascha 1952]. Hierbei wird die überschüssige Energie durch Stöße mit Nachbaratomen abgebaut.

Aus dem Schwingungsgrundzustand ergeben sich nun verschiedene Möglichkeiten, in den S_0 -Zustand zurückzukehren: Entweder unter Aussendung eines Photons (Fluoreszenz) oder durch strahlungslose Desaktivierung (Internal conversion). Eine weitere Möglichkeit liegt in einem Übergang in den Triplettzustand T_1 . Aus diesem Triplettzustand kann nun ebenfalls strahlende (Phosphoreszenz) und strahlungslose Desaktivierung stattfinden. Während die Fluoreszenzlebensdauer im Nanosekundenbereich liegt, ist die der Phosphoreszenz bedeutend länger (10^{-3} - 100 s), da der Übergang aus dem Triplett- in den Singulettzustand spinverboten ist, und damit sehr viel langsamer abläuft. Im Gegensatz zur Fluoreszenz kann die Phosphoreszenz nur in Festkörpern beobachtet werden, in Lösung dominiert hier die strahlungslose Desaktivierung. Fluoreszenz findet also nur statt, wenn ein Elektron aus dem Schwingungsgrundzustand eines elektronisch angeregten Zustand S_1 in einen höheren Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands S_0 übergeht. Nach der Kasha Regel erfolgt dies normalerweise aus dem Schwingungsgrundzustand des S_1 Niveaus in das Grundniveau S_0 , da strahlungslose Desaktivierungsprozesse höher angeregter Zustände deutlich schneller ablaufen.

Die Anregung in höhere Schwingungsniveaus verläuft, wie bereits erwähnt, nach dem Franck-Condon-Prinzip, ohne dass es zu einer Änderung des Kerngerüsts kommt. Falls sich die Geometrien des Grundzustandes und die des angeregten Zustands nicht zu deutlich unterscheiden, verhalten sich das Absorptions- und das Emissionsspektrum einer Substanz einander wie Bild und Spiegelbild. Allerdings ist das Emissionsspektrum hierbei bathochrom, d. h. zu längeren Wellenlängen hin verschoben (vgl. Abbildung 2.3 Stokes Shift) [Stokes 1852].

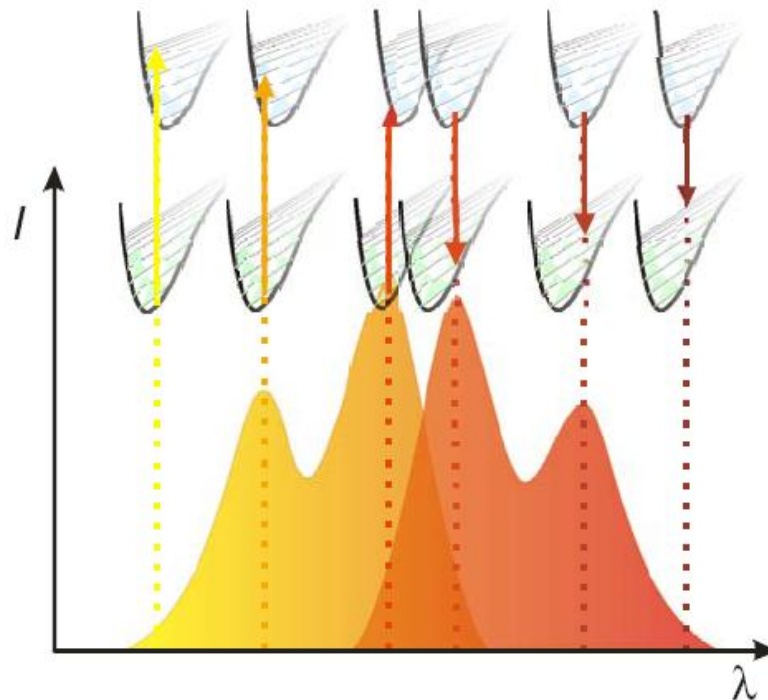


Abbildung 2.3: Stokes Shift. Das emittierte Fluoreszenzlicht hat auf Grund von Schwingungsrelaxationen eine niedrigere Energie als das absorbierte.

Diese bathochrome Verschiebung erklärt sich durch den Energieverlust in Folge der Schwingungsrelaxation im elektronisch angeregten S_1 Zustand.

Das Auftreten von Fluoreszenz wird durch folgende Faktoren begünstigt:

1. Starre Struktur des Moleküls, so dass keine strahlungslosen Desaktivierungen auftreten können.
2. Eine geringe Spin-Bahn-Kopplung verhindert das Intersystem Crossing, deshalb sollten Farbstoffe in der Regel keine schweren Atome besitzen.
3. Funktionelle Gruppen mit starken Elektronendonator bzw. -akzeptoreigenschaften, dadurch erfolgt die Anregung des Moleküls hauptsächlich über *charge-transfer*.

2.1.3 Fluoreszenzquantenausbeute

Die Fluoreszenzquantenausbeute eines Farbstoffs hängt von seiner Emissionsrate und der Anzahl der strahlungslosen Übergänge vom untersten Schwingungsniveau S_1 in den Grundzustand S_0 ab. Da Schwingungsrelaxationen im angeregten Niveau in der Regel um den Faktor 1000 schneller ablaufen als die Fluoreszenzemission, läuft diese bei den meisten Fluorophoren aus dem Schwingungsgrundzustand ab.

Zwar besagt die Born-Oppenheimer-Näherung, dass ein Molekül nur unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons aus dem angeregten Zustand in den elektronischen Grundzustand zurückkehren kann, allerdings treten auch verschiedene strahlungslose Relaxationswege auf, so dass ein Fluorophor in der Regel mehr Photonen absorbiert als es emittiert. Je höher die strukturelle Komplexität der Farbstoffmoleküle wird, desto häufiger treten diese strahlungslosen Desaktivierungen auf. Die theoretische Erklärung dieser Vorgänge führt zu sehr komplexen Gleichungssystemen, die die Abhängigkeit elektronischer Wellenfunktionen von den Differentialoperatoren der Kernbewegung berücksichtigen müssen. Allerdings war es bislang auf Grund ihrer Komplexität nicht möglich, eine Lösung zu finden.

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_{fl} gibt das Verhältnis der von einem Molekül emittierten Photonen zu den von ihm absorbierten an

$$\Phi_{fl} = \frac{N_{em}}{N_{abs}}$$

Sie lässt sich ebenfalls über die Geschwindigkeitskonstanten aller Desaktivierungsprozesse beschreiben:

$$\Phi_{fl} = \frac{k_f}{\sum k_i}$$

mit k_f = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und $\sum k_i$ = Summe der Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Desaktivierungen. Da ein Molekül nicht mehr Photonen abgeben kann, als es absorbiert hat, liegt die Fluoreszenzquantenausbeute niemals über eins [Demas 1971].

2.1.4 Fluoreszenzlebensdauer

Die Fluoreszenzlebensdauer τ ist definiert als die mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand verweilt, bevor es in den Grundzustand zurückfällt. Während die Fluoreszenzlebensdauer für organische Fluorophore in der Regel im Bereich von unter 10 ns liegt, weisen anorganische Fluorophore wie Quantum Dots Lebensdauern bis in den Mikrosekundenbereich auf.

Da es sich bei der Fluoreszenzlebensdauer um ein nicht exaktes quantenmechanisches Problem handelt, kann diese nicht direkt gemessen, sondern nur aus einer statistischen Auswertung von Ensemblemessungen abgeleitet werden.

Die Berechnung einer theoretischen Lebensdauer ist nach der folgenden Gleichung aus den Geschwindigkeitskonstanten aller strahlenden und strahlungslosen Desaktivierungsprozesse möglich:

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{IC} + k_{ISC}}$$

In der Praxis lässt sich die Fluoreszenzlebensdauer aus der Fluoreszenzabklingkurve berechnen. Da die genaue Definition besagt, dass sich zur Zeit τ 1/e der angeregten Moleküle wieder im elektronischen Grundzustand befinden. Damit fällt auch die Fluoreszenzintensität in der Zeit τ nach einem Anregungspuls auf 1/e ab.

Als natürliche Lebensdauer τ_n ist die Lebensdauer definiert, die nur durch Fluoreszenz in Abwesenheit strahlungsloser Desaktivierung zustande kommt.

$$\tau_n = \frac{1}{k_f}$$

Die Geschwindigkeit der strahlenden Relaxation lässt sich näherungsweise aus der Strickler-Berg-Beziehung [Strickler 1962] berechnen:

$$k_f = 2,88 \cdot 10^{-9} v_0^{-2} n^2 \frac{g_g}{g_e} \int \epsilon dv$$

Hierin ist n der Brechungsindex des Medium, v_0 die Wellenzahl des Absorptionsmaximums, ϵ der Extinktionskoeffizient und g_g und g_e sind die Entartungen des Grundzustands und des angeregten Zustands.

Die natürliche Lebensdauer lässt sich auch aus der Fluoreszenzquantenausbeute berechnen:

$$\tau_n = \frac{\tau}{\phi}$$

Allerdings ist die beobachtete Fluoreszenzlebensdauer im Experiment immer deutlich kürzer, da je nach verwendetem Fluorophor der Anteil der strahlungslosen Desaktivierungen relativ hoch werden kann.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer ist die Berechnung über die Abnahme der Konzentration der angeregten Farbstoffmoleküle $[F_0^*]$ mit der Zeit:

$$\frac{d[F(t)^*]}{dt} = -(k_f + k_{IC} + k_{ISC})[F(t)^*]$$

k_{IC} und k_{ISC} sind hier die Geschwindigkeitskonstanten der strahlungslosen Desaktivierungsmechanismen, k_f die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz.

Wird diese Gleichung unter Beachtung der Geschwindigkeit aller Desaktivierungsprozesse zwischen 0 und t integriert, ergibt sich

$$[F(t)^*] = [F^*] e^{-t/\tau}$$

Unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass die beobachtete Fluoreszenzintensität zur Zeit t $F_{(t)}$ proportional zur Konzentration an angeregten Farbstoffmolekülen $I_{(t)}$ ist, wird folgender Zusammenhang erhalten:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Daraus ergibt sich, dass die Fluoreszenzlebensdauer der Zeitspanne entspricht, in der die beobachtbare Fluoreszenzintensität auf 1/e ihres Ausgangswertes zurückgegangen ist. Diese Annahme ist allerdings nur gültig, sofern es sich um eine unimolekulare Desaktivierung handelt. In der Praxis hingegen tritt dies nur als ein Sonderfall auf, der fast nur bei freien Farbstoffmolekülen zu beobachten ist. Normalerweise führen Interaktionen zwischen dem Farbstoffmolekül und den Biomolekülen, an die sie gekoppelt wurden, oder Veränderungen im lokalen Nahfeld des Farbstoffs, zum Beispiel eine veränderte Polarität oder Viskosität, zu einem multiexponentiellen Verlauf. Zum Anpassen solcher Abklingkurven muss also eine Summe aus mehreren Exponentialfunktionen gewählt werden:

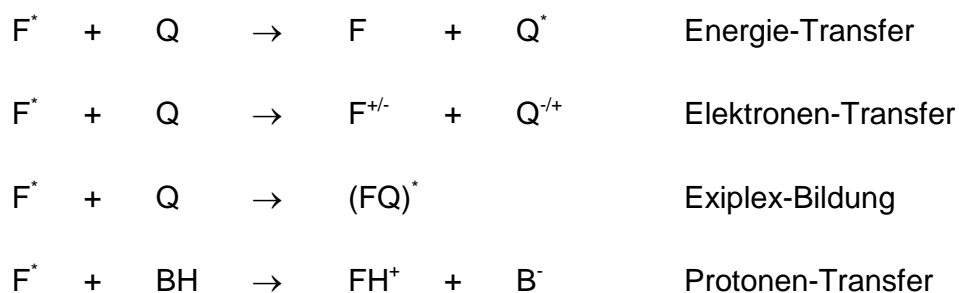
$$I(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i}; \sum_i a_i = 1$$

Wobei a_i die Amplitude der Komponente i und τ_i die entsprechende Fluoreszenzlebensdauer darstellt.

Allerdings müssen nach dieser Gleichung ermittelte multiexponentielle Lebensdauern nicht immer unbedingt eine echte physikalische Aussage haben, vielmehr sind sie das Ergebnis einer bestmöglichen mathematischen Anpassung an den experimentell erhaltenen Fluoreszenzabfall. Unter der Annahme, dass alle Lebenszeiten erfasst wurden, ist $\sum A_i \cdot \tau_i$ proportional zur Fluoreszenzintensität.

2.1.5 Molekulare Wechselwirkungen und deren Einfluss auf die Fluoreszenz

Während der Verweildauer τ , in der sich das Farbstoffmolekül im Mittel im elektronisch angeregten Zustand S_1 befindet, können Wechselwirkungen mit in unmittelbarer räumlicher Nähe befindlichen Löschmolekülen (sog. *Quencher*) zu einer signifikanten Verminderung der Fluoreszenzintensität führen. Neben einer unmittelbaren Nähe des Farbstoffs und des Löschmoleküls kann die Löschung der Fluoreszenzintensität auch über ein energieleitendes System stattfinden. Ausgelöst werden die Löschprozesse über Protonen-, Elektronen- oder Energieübertragung, wobei zumeist eine Kombination aus diesen verschiedenen Mechanismen auftritt.



Der Energietransfer verläuft über einen Dipol-Dipol-Mechanismus, bei dem die Anregungsenergie vom Farbstoffmolekül strahlungslos auf einen geeigneten Quencher übertragen wird. Damit der Energietransfer funktioniert, muss das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffmoleküls mit dem Absorptionsspektrum des Löschmoleküls überlappen [Förster 1948, Stryer 1978].

Der photoinduzierte Elektronentransfer beruht auf Redoxreaktionen, die im angeregten Zustand durch Änderung der Spannungspotenziale möglich werden. Es ist weder ein Stoßkontakt zwischen Fluorophor und Löschmolekül notwendig, noch wird Energie durch eine chemische Reaktion ausgetauscht. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird ausschließlich durch die Redoxpotenziale, den Abstand und die Lage der Reaktanden zueinander bestimmt.

Die Exiplex-Bildung („*excited complex*“) ist ein Spezialfall des Elektronentransfers. Im angeregten Zustand wird unter Übergabe eines Elektrons aus Fluorophor und Löschmolekül eine Molekülverbindung gebildet, die ausschließlich im angeregten Zustand stabil ist und nach Abgabe der Energie wieder zerfällt.

Sind im Fluorophor azide Protonen oder basische Gruppen vorhanden, so besteht die Möglichkeit eines Protonen-Transfers. Die treibende Kraft für diese Säure-Base-Reaktion sind drastische Änderungen der pK_a - beziehungsweise pK_b -Werte des Fluorophors bei Anregung in den S_1 -Singulettzustand.

2.1.5.1 Statische und dynamische Fluoreszenzlöschung

In Anwesenheit eines Löschmoleküls können die Fluoreszenzlebensdauer und -intensität eines Farbstoffs erheblich beeinflusst werden. Anhand des elektronischen Zustands des Fluorophors unterscheidet man hierbei zwischen dynamischer und statischer Löschung.

Grundvoraussetzung für das Auftreten von dynamischer Löschung ist die Bildung eines kurzlebigen Komplexes zwischen dem Fluorophor im angeregtem Zustand und einem Löschmolekül. Der eigentliche Energieübertragungsschritt findet dann über einen der oben erwähnten Mechanismen auf.

Nach der Energieübertragung gehen beide Moleküle wieder in ihren Grundzustand über, mit der Folge, dass neben einer Verringerung der Fluoreszenzintensität auch eine (deutliche) Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer auftritt.

Eine theoretische Anpassung an ein solches Verhalten bietet die Stern-Volmer-Gleichung für dynamische Löschvorgänge

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_Q \cdot \tau_0 \cdot Q = 1 + K_D[Q]$$

Mit I_0 / I : Fluoreszenzintensität in Abwesenheit / Anwesenheit von Löschmolekülen $[Q]$; Konzentration der Löschmoleküle k_Q : bimolekularer Geschwindigkeitskoeffizient der Löschung

τ_0 (τ): Lebensdauer des Fluorophors in Abwesenheit (Anwesenheit) von Löschmolekülen.

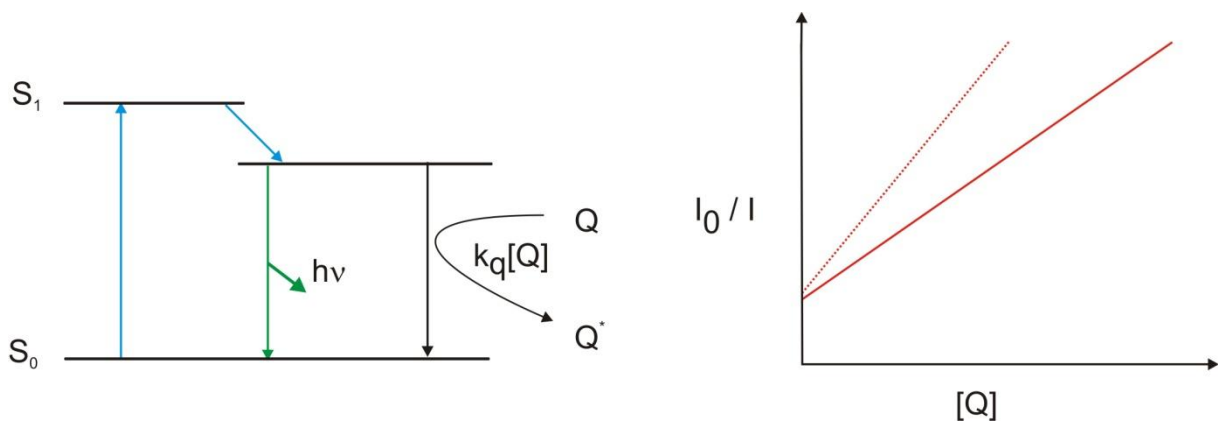


Abbildung 2.4: Reaktionsschema der dynamischen Fluoreszenzlöschung (links) und schematische Darstellung eines entsprechenden Stern-Volmer-Plots. Die gestrichelte Linie deutet das Verhalten bei höherer Temperatur an.

Aus dem aus experimentellen Daten gewonnenen Stern-Volmer-Plot (rechte Seite von Abbildung 2.4) kann durch eine lineare Anpassung der ersten fünf bis zehn Messwerte direkt die Stern-Volmer-Konstante $k_q(Q)$ gewonnen werden, die ein direktes Maß für die Stärke der Fluoreszenzlöschung darstellt. Für den Fall, dass eine rein dynamische Löschung vorliegt, entspricht der Verlauf der Kurve für das Verhältnis der Lebenszeiten τ_0/τ exakt dem Verlauf für die Fluoreszenzintensitäten I_0/I . Wird das Experiment bei anderen Temperaturen wiederholt, so zeigt sich, dass die dynamische Fluoreszenzlöschung temperaturabhängig verläuft. Bei höheren Temperaturen besitzen alle Teilchen in Lösung eine höhere Brown'sche Molekularbewegung und die Wahrscheinlichkeit von Zusammenstößen zwischen Löschmolekülen und Farbstoffen im angeregten Zustand nimmt zu, so dass es zu einer höheren Löschrates und somit zu einer größeren dynamischen Stern-Volmer-Konstanten kommt.

Im Gegensatz zur dynamischen Löschung ist es für die statische Löschung notwendig, dass sich Farbstoff und Löschmolekül bereits im Grundzustand zu einem nicht oder nur sehr schwach fluoreszierenden Komplex vereinigen. Dadurch tritt nur eine Verringerung der Fluoreszenzintensität, nicht aber eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer auf, so dass man mittels Lebensdauer-Messungen relativ leicht zwischen beiden Löschmechanismen unterscheiden kann.

Auch die statische Stern-Volmer-Konstante kann experimentell relativ einfach bestimmt werden. Hierzu trägt man den Koeffizienten F_0/F gegen die Konzentration des Löschmittels auf. In der Regel ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen, so dass die Löschkonstante als Steigung der Gerade abgelesen werden kann (vgl. hierzu Abb. 2.5).

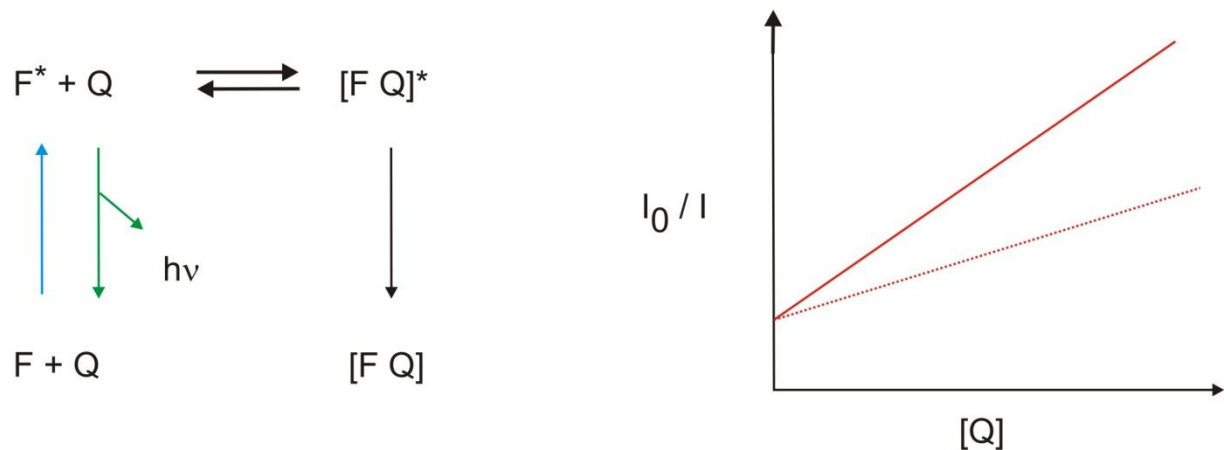


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des statischen Löschmechanismus (links) und Stern-Volmer-Plot mit angedeutetem Verhalten bei erhöhter Temperatur (gestrichelte Linie).

Die Konzentration des Komplexes aus beiden Molekülen lässt sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes leicht bestimmen:

$$k_s = \frac{[F - Q]}{[F][Q]}$$

Wird die Fluoreszenz des komplexierten Farbstoffes vernachlässigt, so ergibt sich die Fluoreszenzintensität in guter Näherung einzig durch nicht komplexiertes Chromophor. Durch Einsetzen dieser Gleichung erhält man dann dieselbe Stern-Volmer-Gleichung wie für die dynamische Fluoreszenzlöschung.

$$[F]_0 = [F] + [F - Q]$$

$$k_s = \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]}$$

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S [Q]$$

Im Gegensatz zur dynamischen Löschung, deren Stärke mit steigenden Temperaturen zunimmt, sinkt die der dynamischen Löschung stark ab, da bei höheren Temperaturen das Gleichgewicht zwischen dem nicht-fluoreszierenden Komplex und den „Einzelkomponenten“ Farbstoff und Quencher auf Grund der höheren Entropie auf die Seite der Edukte verschoben wird.

Somit stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, zwischen statischer und dynamischer Löschung zu entscheiden. Neben der Änderung der Fluoreszenzlebensdauer, die sich nur durch das Vorhandensein von dynamischer Löschung erklären lässt, kann ein Aussage über

die Ursache der Fluoreszenzlöschung auch durch Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen getroffen werden.

In der Praxis ist es allerdings relativ häufig, dass ein Fluorophor sowohl dynamisch als auch statische gelöscht wird. Erkennbar ist dies auch am resultierenden Stern-Volmer-Plot, der bei höheren Löschmolekülkonzentrationen von seinem zunächst linearen Verlauf nach oben hin abknickt.

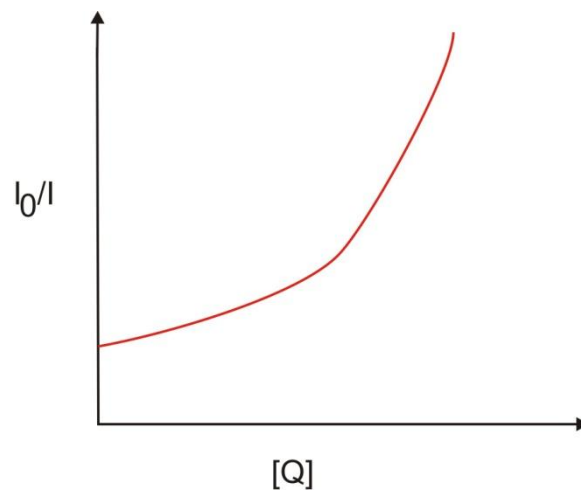


Abbildung 2.6: Verlauf eines Stern-Volmer-Plots bei kombinierter dynamischer und statischer Löschung

In diesem Fall gilt eine modifizierte Stern-Volmer-Gleichung, die bezüglich der Löscherkonzentration $[Q]$ zweiter Ordnung ist.

$$\frac{I_0}{I} = (1 + k_Q \cdot \tau_0 \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) = \frac{\tau_0}{\tau} \cdot (1 + K_S \cdot [Q])$$

2.1.5.2 Photoinduzierter Elektronentransfer

Infolge der Absorption von Licht und der dadurch verursachten Veränderung der Elektronendichteverteilung ändern sich die Redox Eigenschaften von Farbstoffmolekülen.

Während der Absorption geht ein Elektron aus dem HOMO (Highest occupied molecular orbital) in das LUMO (Lowest unoccupied molecular orbital) über. Im HOMO entsteht somit ein Elektronenloch, während im LUMO nun ein Elektron vorhanden ist, das um den Energiebetrag des Übergangs $E_{0,0}$ reicher ist. Dadurch kann ein angeregtes Molekül um diesen Energiebetrag leichter oxidiert oder reduziert werden. Diese Übergangsenergie entspricht dem Übergang aus dem S_0 in den S_1 Zustand und zwar jeweils aus dem niedrigsten Schwingungszustand $v_0=0$ und $v_1=0$. Dieser Energiebetrag kann aus den aus den Mittelwerten der Absorptions- und Emissionsbanden berechnet werden [Marcus 1956, Grabowski 1976]. Die folgende Abbildung 2.6 erläutert die möglichen Oxidations- und Reduktionsreaktionen im elektronischen Grundzustand S_0 und dem ersten angeregten Zustand S_1 .

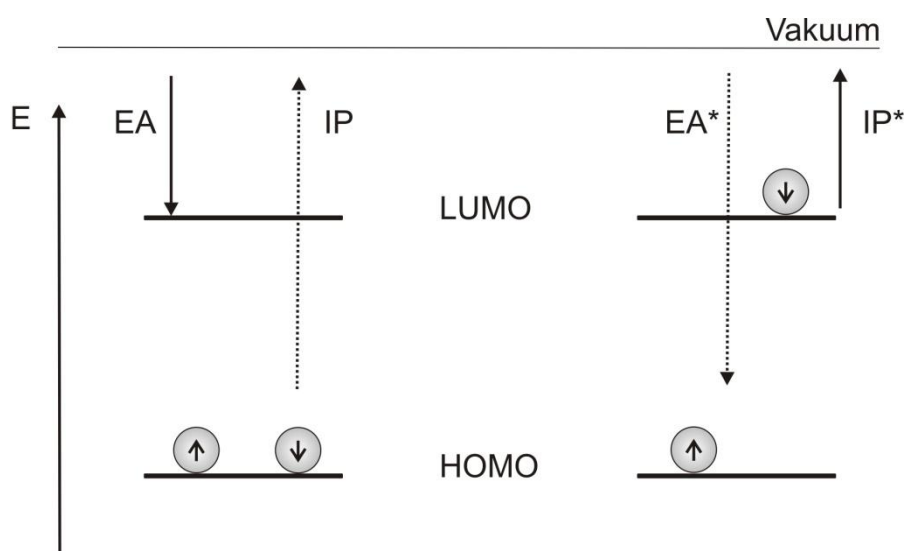


Abbildung 2.7: Übersicht über die Oxidations- und Reduktionsmöglichkeiten eines Moleküls im Grundzustand S_0 und im angeregten Zustand S_1 .

Wenn ein Elektron aus einem Molekülorbital entfernt wird, muss dafür die Ionisierungsenergie IP aufgebracht werden. Diese Energie ist abhängig von der energetischen Lage des Elektrons in seinem Molekül; stammt das Elektron aus einem bindenden Molekülorbital, in diesem Fall dem HOMO, so ist dieser Energiebetrag größer, als wenn ein Elektron aus einem nichtbindenden Molekülorbital, hier das LUMO, entfernt wird. Dann ist die Ionisierungsenergie IP^* um den Betrag geringer, der bereits durch die Absorption eines Photons aufgenommen wurde. Die Energie, die während der Aufnahme eines zusätzlichen Elektrons frei wird, heißt Elektronenaffinität (EA). Im Grundzustand des Moleküls kann ein zusätzliches

Elektron nur in ein nichtbindendes Molekülorbital, das LUMO, erfolgen. Da in Folge dessen die Bindungsordnung des Moleküls und damit auch dessen Stabilität abnimmt, ist der Energiegewinn hierdurch im Grundzustand sehr gering. Im angeregten Zustand hingegen kann ein zusätzliches Elektron in das HOMO aufgenommen werden, wodurch die Bindungsordnung und die Stabilität des Moleküls zunehmen. Deshalb ist die Elektronenaffinität in angeregten Molekülen drastisch erhöht.

In Abhängigkeit von seiner elektronischen Konfiguration kann ein Farbstoffmolekül also von einem Elektronenakzeptor oxidiert oder von einem Elektronendonator reduziert werden. Ungleich wahrscheinlicher werden solche Redoxvorgänge im angeregten Zustand, da sowohl Oxidationen als auch Reduktionen um den Energiebetrag des Übergangs zwischen beiden Zuständen erleichtert werden.

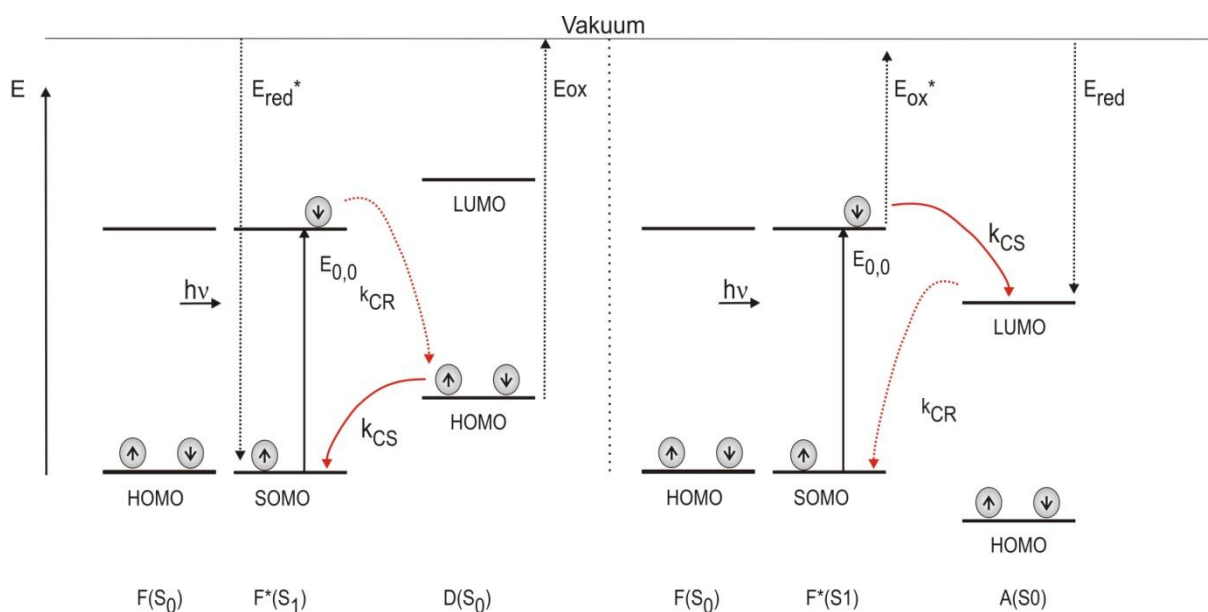


Abbildung 2.8: Vereinfachtes Energieschema für den photoinduzierten Elektronentransfer zwischen einem angeregten Fluorophor F^* und einem Donor D bzw. Akzeptor A .

Für den Elektronentransfer gibt es zwei mögliche Reaktionsabläufe. Er kann sowohl intramolekular (*through-bond*) oder intermolekular (*through-space*) ablaufen. In der Praxis ist der *through-space* Elektronentransfer deutlich häufiger anzutreffen.

Ob eine Elektronentransferreaktion abläuft, hängt von der Standardreaktionsenthalpie ΔG° ab. Für einen bimolekularen Elektronentransfer berechnet sich diese nach:

$$\Delta G^\circ = IP_D - EA_A$$

IP_D ist hierin die Ionisierungsenergie des Elektronendonors und EA_A die Elektronenaffinität des Akzeptors.

Da sich durch die Absorption von Licht im Fluorophor die Ionisierungsenergie und die Elektronenaffinität ändern, gilt dann

$$IP_{D^*} = IP_D - \Delta E_{0,0} \text{ und } EA_{A^*} = EA_A + \Delta E_{0,0}$$

Damit ergibt sich für die Standardreaktionsenthalpie des Elektronenüberganges

$$\Delta G^\circ = IP_D - EA_A - \Delta E_{0,0}$$

Die oben eingeführten Größen der Ionisierungsenergie und der Elektronenaffinität lassen sich allerdings nicht auf Feststoffe oder Lösungen derselben anwenden, da sie nur für die Gasphase definiert sind. Für die interessierenden Lösungen von Feststoffen müssen sie durch die elektrochemischen Größen des Oxidations- und Reduktionspotenzials (E_{ox} und E_{red}) ersetzt werden. Eine weitere Abweichung von der Gasphase sind vorhandene attraktive Wechselwirkungen zwischen den im Verlauf der Reaktion entstehenden Radikalanionen und -kationen. Als Korrekturfaktor wird deshalb ein Coulombterm $\Delta G^\circ_{\text{Coul}}$ eingeführt, der diese Wechselwirkungen beachtet.

$$\Delta G^\circ_{\text{Coul}} = - \frac{e^2}{\epsilon_s \cdot R_C}$$

Mit ϵ_s , der statischen Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und R_C , dem Abstand der Zentren der Radikationen.

Nach der Rehm-Weller-Gleichung [Rehm 1969, Weller 1982] ergibt sich somit für die Standardreaktionsenthalpie.

$$\Delta G^\circ = E_{\text{Ox}} - E_{\text{Red}} - \Delta E_{0,0} + \Delta G^\circ_{\text{Coul}}$$

Die Rehm-Weller-Gleichung ist allerdings in dieser Form nur dann gültig, wenn die Reaktion in demselben Lösungsmittel durchgeführt wird, in dem auch die Redoxpotenziale der Reaktanden gemessen wurden. Wird die Reaktion in einem anderen Lösungsmittel durchgeführt, so muss zusätzlich die Solvatationsenthalpie $\Delta G^\circ_{\text{sol}}$ des Radikationenpaares berücksichtigt werden. Diese kann mit Hilfe der Bornschen Gleichung aus den effektiven Radikationenradien des Kations und des Anions berechnet werden [Overing 1987].

2.2 Grundlagen der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie

Unser chemisches Verständnis beruht auf dem ergodischen Theorem, d. h. der Annahme, dass der Durchschnitt eines Ensembles dem durchschnittlichen Verhalten eines einzelnen Moleküls über einen langen Zeitraum hinweg entspricht. Allerdings lassen sich durch Messungen des Ensembles keine Informationen über die Form der Verteilungskurve, die zeitliche Fluktuation und die einzelnen Reaktionsschritte erhalten. Es ist nicht ersichtlich, ob alle beobachteten Moleküle die gleichen Eigenschaften zeigen, also über eine statische Heterogenität verfügen und ob ihre Eigenschaften im verfolgten Zeitraum konstant sind, also dynamisch heterogen [Herten 2003].

Pionierarbeiten auf diesem Gebiet aus den frühen 1960er Jahren fanden zunächst wenig Beachtung. Erst gegen Ende der 1980er Jahre nach fortschreitender Entwicklung moderner optischer Methoden gelang es zwei Gruppen unabhängig voneinander, einzelne Moleküle in einer festen Matrix und bei tiefen Temperaturen nachzuweisen [Moerner 1989, Orrit 1990]. Seitdem entwickelte sich die optische Einzelmolekülspektroskopie zu einer sehr variantenreichen Methode [Herten 2008], die Anwendungen in Biologie [Weiss 1999], Chemie [Kiel 2007] und Medizin [Rigler 1994] gefunden hat. So lässt sich zum Beispiel mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie die Diffusion farbstoffmarkierter Proteine verfolgen, mit FRET-Messungen, die den Energietransfer zwischen zwei passenden Fluorophoren ausnutzen, lassen sich Interaktionen zwischen Proteinen als Funktion ihres Abstandes zueinander untersuchen.

Neben der konfokalen Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Methoden etabliert, die die Lokalisierung und Wechselwirkungen einzelner Moleküle auflösen können. Während einige Methoden wie z. B. die 4π -Mikroskopie [Hell 1994] oder die STED-Technik (Stimulated-emission-depletion)[Wichmann 1994] mit hohem experimentellen Aufwand in der Lage sind, die optische Auflösung eines konfokalen Mikroskops deutlich zu verbessern, gehen moderne stochastische Ansätze einen anderen Weg.

Bei PALM (Photoactivated localisation microscopy) und STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) werden spezielle Farbstoffe verwendet, die durch einen sehr kurzen Laserblitz angeregt werden [Betzig 2006, Rust 2006]. Da durch jeden Lichtblitz immer nur sehr wenige Moleküle angeregt werden, überlappen deren Punktabbildungsfunktionen in aller Regel nicht, so dass eine viel genauere Lokalisation möglich ist. Durch die Addition einer Vielzahl von einzelnen Aufnahmen entsteht eine Abbildung der Probe mit einer Auflö-

sung von bis zu wenigen Nanometern. Momentan ist dies der Auflösungsrekord für optische Mikroskopiemethoden.

2.2.1 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde bereits im Jahre 1957 von Marvin Minsky entwickelt und patentiert [Minsky 1957]. Allerdings sollte es über 30 Jahre dauern, bis Rudolf Rigler sie im Jahr 1992 erstmals dazu benutzte, einzelne Moleküle nachzuweisen [Rigler 1992]. Seit dieser Zeit ist das konfokale Prinzip die mit Abstand wichtigste und am meisten genutzte Technik zur Untersuchung einzelner Moleküle.

Bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts beschäftigte sich Ernst Abbe mit der Theorie der Lichtmikroskopie und zeigte die Grenzen eines Lichtmikroskops auf, das durch den Brechungsindex der Probe und die Eigenschaften der Objektivlinsen in seinem Auflösungsvermögen limitiert ist. Selbst unter Einsatz der besten optischen Elemente ohne sphärische und chromatische Aberrationen lässt sich keine perfekte Abbildung der Probe erreichen. In einem beugungsbegrenzten Bild erscheint eine Punktlichtquelle als eine leuchtende Scheibe mit in konzentrischen Kreisen abnehmender Intensität. In Anlehnung an den britischen Astronomen George B. Airy wird diese Scheibe als Airy Disc bezeichnet. Dieses Beugungsmuster, ein Ergebnis der Wellennatur des Lichts, ist ein Spezialfall der Fraunhofer Beugung. Laut Abbé lässt sich die Qualität eines Bildes aus der Anzahl der Beugungsringe im Verhältnis zum Brechungsindex und der numerischen Apertur des Mikroskopobjektivs bestimmen. Der Radius r_{Airy} , des ersten dunklen Rings der Airy Disc lässt sich aus der Wellenlänge λ des verwendeten Lichts und der numerischen Apertur des Objektiv NA berechnen.

$$r_{\text{Airy}} = 0,61 \cdot \frac{\lambda_0}{NA}$$

Liegen zwei gleich helle Punkte in einem kleinen Abstand d in der Objektebene voneinander entfernt, so liegen ihre Beugungsbilder nebeneinander in der Bildebene. Diese beiden Punkte sind dann aufgelöst, wenn deren Abstand d größer ist als der Radius der Airy Disc (Rayleigh Kriterium).

Diese theoretische laterale Auflösung lässt sich unter der Verwendung perfekter optischer Bauteile und unter der Annahme einer zweidimensionalen Probe erreichen. Im Experiment hingegen wird der Kontrast des fluoreszierenden Objekts sowohl durch Streulicht als auch durch Fluoreszenz aus Bereichen außerhalb der fokalen Ebene reduziert, da auch dieses

Licht vom Mikroskopobjektiv gesammelt und detektiert wird. Objekte, die nicht unendlich schmal sind, sondern eine dreidimensionale Struktur aufweisen, haben somit eine Tiefenschärfe, die höher ist als die maximale axiale Auflösung.

Im Gegensatz zu einem normalen Lichtmikroskop ist das konfokale Mikroskop in der Lage, dieses Licht auszublenden und verbessert dadurch die axiale Auflösung (Abbildung 2.9).

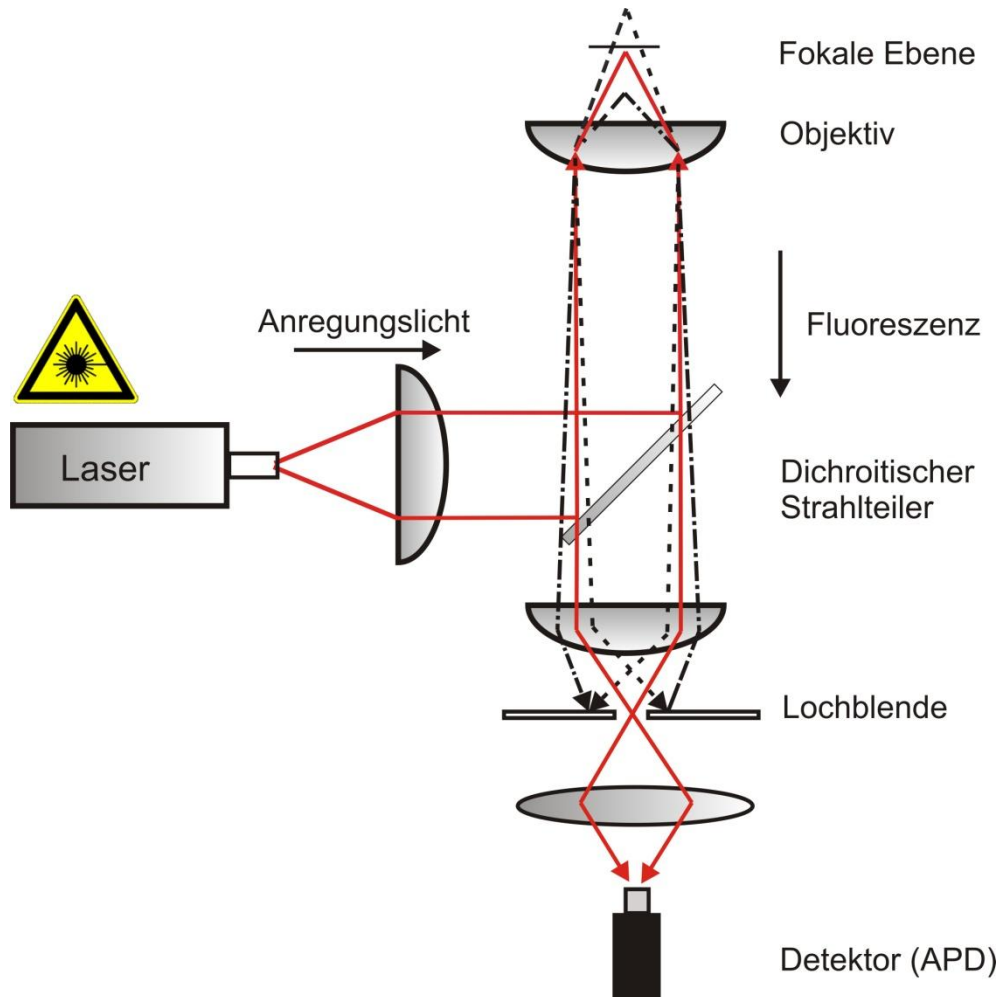


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des konfokalen Prinzips. Licht, welches nicht aus der konfokalen Ebene stammt, wird durch die Lochblende nahezu komplett abgeschnitten.

Wie Abbildung 2.9 illustriert, wird nur solches Licht detektiert, das direkt aus der fokalen Ebene stammt. Für einen verschwindend kleinen Beobachtungsbereich verbessert sich die laterale Auflösung dadurch um den Faktor 1,41 [Inoué 1995].

Daraus resultieren folgende maximale Auflösungen [Webb 1995]

$$r_{lateral} = \frac{\lambda \cdot 0,8}{2 \cdot NA} \quad \text{und} \quad r_{axial} = \frac{1,4 \cdot \lambda}{NA^2}$$

In der Praxis bedeutet dies, dass punktförmige Lichtquellen unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs mit einer numerischen Apertur von 1,45 und bei Anregung mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm Objekte aufgelöst werden können, wenn der Abstand zwischen ihnen lateral mindestens 175 nm und axial mindestens 425 nm beträgt. Wird hingegen ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer NA von 1,2 verwendet, dann steigen die Mindestabstände auf 231 nm und 617 nm.

Der Begriff „konfokal“ selbst ist definiert als „den selben Fokus haben“. In der Mikroskopie bedeutet dies, dass das Bild entweder denselben Fokus hat wie das Objekt oder der Fokus bezieht sich auf den Fokus im Objekt.

Abschließend sollen nochmals die Vorteile der konfokalen Mikroskopie gegenüber der normalen Lichtmikroskopie zusammengefasst werden.

1. Störendes Licht, welches nicht direkt aus der fokalen Ebene stammt, wird mit Hilfe der Lochblende ausgeblendet und gelangt somit nicht zu den Detektoren. Dadurch erlangt das abgebildete Objekt eine geringere Tiefenschärfe.
2. Durch die geringe Ausdehnung des ausgeleuchteten Bereichs wird störendes Streulicht größtenteils eliminiert.
3. Die Folge von Defokussierung hat nicht mehr den Verlust der Tiefenschärfe zur Folge, vielmehr erlaubt es die Betrachtung einer anderen Bildebene. Durch Defokussierung in kleinen Schritten werden punktförmige Lichtquellen zunächst immer dunkler, bis sie schließlich nicht mehr erkennbar sind. Umgekehrt tauchen Objekte aus einer anderen fokalen Ebene zunächst relativ dunkel auf.
4. Aus 3 folgt unmittelbar, dass durch das Abfahren einer zweidimensionalen (x,y)-Ebene, eine Verschiebung in der z-Ebene und erneutes Abrastern der x,y-Ebene ein echtes dreidimensionales Bild erhalten wird.

2.2.2 Konfokale Mikroskopie auf Einzelmolekülniveau

Bereits 1976 hatte die Gruppe um Thomas Hirschfeld Erfolg bei dem Versuch, einzelne Antikörper, die mit ca. 80 bis 100 Farbstoffmolekülen markiert waren, zu detektieren [Hirschfeld 1976]. Den nächsten Schritt vollbrachte dann die Gruppe um Richard Keller, die in der Lage war, einzelne Farbstoffmoleküle bei Raumtemperatur und in Lösung nachzuweisen [Shera 1990]. Allerdings fiel bereits bei diesen Pionierarbeiten auf, dass elastische Rayleigh-Streuung und unelastische Raman-Streuung die Messungen erheblich störten, da ihr Beitrag zum detektierten Signal ganz erheblich war. Somit wurde erkannt, dass nicht die Empfindlichkeit der Technik zur Detektion einzelner Moleküle ein Problem darstellte, sondern vielmehr geeignete Wege zur Rauschunterdrückung gefunden werden mussten, damit die Messtechnik in der Lage war, echte Einzelmolekülempfindlichkeit zu erzeugen.

Um dieses Ziel zu erreichen, setzte Rudolf Rigler 1992 den bereits 35 Jahre zuvor entwickelten konfokalen Aufbau ein, um einzelne frei diffundierende Farbstoffmoleküle zu untersuchen [Rigler 1992]. Mit Hilfe des beugungsbegrenzten Anregungsvolumens ist es möglich, nur in einem sehr kleinen Bereich und mit hoher Laserintensität Farbstoffmoleküle anzuregen. Der zusätzliche Einsatz einer Lochblende und geeigneter optischer Bandpass-Filter, die nur Licht eines gewissen Wellenlängenbereiches passieren lassen, ermöglichte die zielgerichtete Abtrennung aller störenden Lichtstrahlen und somit die nahezu ausschließliche Detektion der gewünschten Fluoreszenz.

Das durch den konfokalen Aufbau erreichte Detektionsvolumen beträgt nur noch ca. 10^{-15} Liter (1 Femtoliter), in dem sich ungefähr 10^{11} Lösungsmittelmoleküle aufhalten. Durch die geringe Zahl der Lösungsmittelmoleküle ist deren Signalbeitrag durch Raman-Streuung gegenüber der Fluoreszenz nahezu vernachlässigbar. Durch den Einsatz schmalbandiger optischer Filter lässt sich zudem die Fluoreszenz von elastisch gestreutem Anregungslicht isolieren.

Da es bei der Einzelmolekülspektroskopie darum geht, möglichst einzelne Moleküle zu detektieren, sollte die durchschnittliche Konzentration an Farbstoffmolekülen somit unterhalb von 10^{-11} Mol pro Liter liegen.

2.2.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Im Gegensatz zu den meisten anderen hochsensitiven und hochauflösenden Mikroskopiemethoden, steht bei der FCS nicht das absolute Intensitätssignal im Mittelpunkt des Interesses. Vielmehr beruht das Konzept der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) auf spontan auftretenden Fluktuationen der Intensität, die dadurch verursacht werden, dass ein kleines System für einen Moment von seinem thermischen Gleichgewicht abweicht. Im Prinzip können alle Parameter mit der FCS bestimmt werden, die für solche Fluktuationen verantwortlich zeichnen können: Die lokale Konzentration des Fluorophors, Diffusionskoeffizienten [Eelson 1974] oder charakteristische Geschwindigkeitskonstanten von intra- oder intermolekularen chemischen Reaktionen [Haupts 1998, Widengren 1999].

Von den Anfängen im Jahre 1972, als Madge und Webb mit Hilfe der FCS die Dynamik der Denaturierung von DNS untersuchten, bis in die heutige Zeit hat sich die FCS stetig weiterentwickelt und ist mittlerweile zu einer absoluten Standardmethode in der biologischen Analytik geworden.

Allerdings wurde in den letzten Jahren auch gezeigt, dass die FCS sehr empfindlich gegenüber experimentellen Abweichungen sein kann. So zeigte die Gruppe um Jörg Enderlein, dass sowohl bereits sehr geringe Schwankungen in der Dicke der verwendeten Objektträger als auch minimale Änderungen im Brechungsindex der Proben gravierende Änderungen in der gemessenen Diffusionszeit hervorrufen können [Enderlein 2004]. Um diesen und weiteren experimentellen Problemen entgegenzuwirken, wurden Verbesserungen der Technik wie z.B. die 2-Fokus-FCS und die Fluoreszenzlebensdauer FCS (FLCS) vorgeschlagen [Dertinger 2007, Gregor 2007]

2.2.3.1 Das Messprinzip

Um ein so kleines Detektionsvolumen zu erzeugen, dass sich zu jedem Zeitpunkt nur eine geringe Anzahl an fluoreszierenden Spezies in diesem aufhält, kann man sich des oben beschriebenen konfokalen Aufbaus bedienen. Dadurch erhält man einen Laserfokus mit sehr definierten Ausmaßen, deren Kenntnis von großer Bedeutung für die Auswertung von FCS-Daten sein kann, und die durch die Auflösungsgrenzen des konfokalen Mikroskops gegeben sind. Abbildung 2.10 zeigt diese Situation schematisch. Während der Messung sollte dafür Sorge getragen werden, dass die Konzentration der fluoreszierenden Spezies möglichst niedrig bleibt.

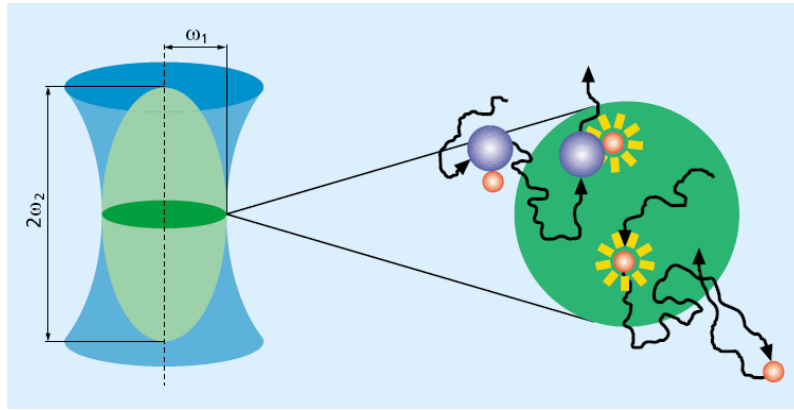


Abbildung 2.10: Darstellung des Laserfokus und des Messprinzips der FCS.

Der Strukturparameter S , der aus dem Verhältnis der Radien der lateralen und axialen Ausdehnung des Laserfokus berechnet wird, ist wichtig für die Auswertung von dreidimensionalen Diffusionsvorgängen.

$$S = \frac{\omega_1}{\omega_2}$$

2.2.3.2 Theoretische Grundlagen

Die Anzahl der durchschnittlich im Detektionsvolumen zu jedem Zeitpunkt vorhandenen Fluorophore folgt einer Poisson-Verteilung und kann mit der folgenden Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N\rangle)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = 1/\sqrt{\langle N\rangle}$$

Da die relativen Fluktuationen mit steigender Teilchenzahl N im Detektionsvolumen abnehmen, ist es wichtig, die Anzahl der Farbstoffe im Detektionsvolumen zu begrenzen. Liegt die Anzahl zu hoch, dann sind die beobachteten Fluktuationen zu gering, ist die Teilchenzahl zu niedrig, dann sind längere Zeiträume ohne Signal zu erwarten. Als geeigneter Bereich für die FCS gilt eine Konzentration von 10^{-10} bis 10^{-6} Mol pro Liter.

Wenn das Detektionsvolumen konstant angeregt wird, zeigt die gemessene Fluoreszenzintensität $F(t)$ zeitliche Schwankungen:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$$

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \cdot \int_0^T F(t) \cdot dt$$

Die zeitlichen Schwankungen der Fluoreszenzintensität lassen sich mit einer normierten Autokorrelationsfunktion $G(t)$ beschreiben, die die zeitlich gemittelte Selbst-Ähnlichkeit eines Signals zu den Zeiten t und $t + \tau$ darstellt.

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

Mit der Annahme eines beugungsbegrenzten Detektionsvolumens beschreibt die Autokorrelationsfunktion die Wahrscheinlichkeit, ein bereits zum Zeitpunkt t detektiertes Molekül zum Zeitpunkt $t + \tau$ erneut zu detektieren. Dementsprechend entspricht $G(t)$ einer Verteilung der Aufenthaltsdauern einzelner Moleküle im Anregungsvolumen. Nach verschiedenen Annahmen und mathematischen Umformungen, auf die in diesem Rahmen nicht eingegangen werden soll, erhält man folgende Autokorrelationsfunktion zur Beschreibung einer freien dreidimensionalen Diffusion:

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_d}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_1}{\omega_2}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

Neben dem reinen Diffusionsterm beobachtet man in der experimentellen Praxis häufig noch eine zweite Kinetik auf kürzeren Zeitskalen. Verursacht wird diese schnellere Kinetik durch den Übergang von angeregten Farbstoffmolekülen in den Triplettzustand. Da Übergänge aus dem Triplettzustand zurück in den Grundzustand quantenmechanisch spinverboten sind, dauern diese verhältnismäßig lange. In dieser Zeit emittiert ein Molekül keine Photonen und führt dadurch zu Abweichungen der Autokorrelationsfunktion vom erwarteten Verlauf.

Um diesem Verhalten Rechnung zu tragen, kann die Funktion $G(t)$ mit einem weiteren Faktor zur Beschreibung des Triplettverhaltens erweitert werden [Palmer 1987, Widengren 1998]:

$$G(t)_{total} = X(t)_{Triplett} \cdot G(t)_{Diffusion}$$

Durch Einsetzen des Triplettterms:

$$X(t)_{Triplett} = 1 - T + T \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{triplett}}}$$

in die Autokorrelationsfunktion $G(T)$ ergibt sich mit:

$$G(t) = \left(1 - T + T \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{triplett}}}\right) \cdot \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_d}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_1}{\omega_2}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

eine universelle Autokorrelationsfunktion, die in der Lage ist, den Verlauf der Kurve exakt zu beschreiben.

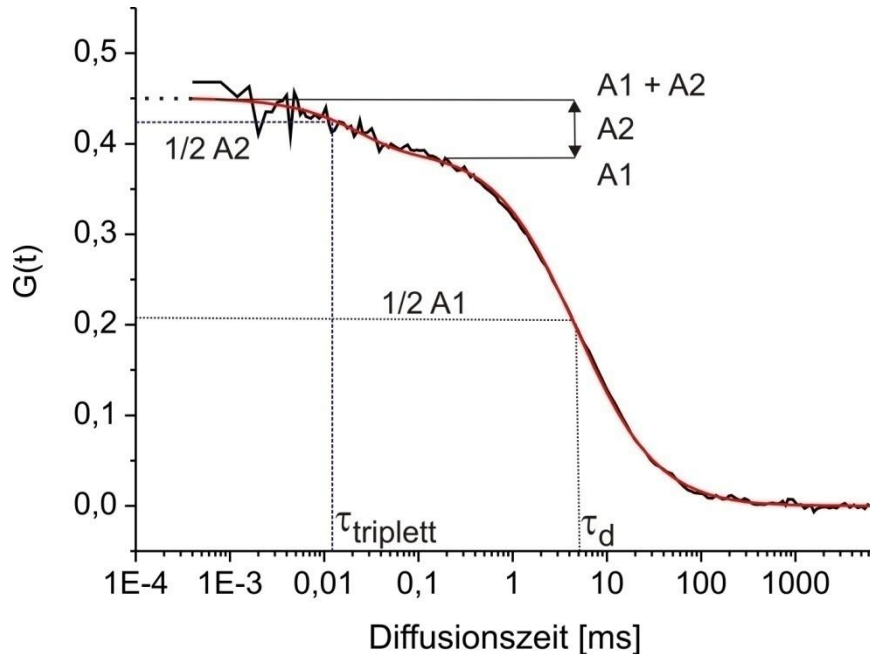


Abbildung 2.11: Darstellung einer Autokorrelationskurve mit Bestimmung der maßgeblichen Parameter.

Abbildung 2.11 zeigt eine typische Autokorrelationskurve, an ihr lässt sich exemplarisch erklären, wie die verschiedenen Parameter bestimmt werden können. Entscheidend sind die Gesamtamplitude ($A1+A2$), sowie die Amplitude des Diffusionsterms ($A1$). Diese lassen sich jeweils durch Interpolation der sich abflachenden Kurve erhalten. An der Stelle, an der die jeweilige Amplitude auf die Hälfte ihres Ausgangswertes zurückgegangen ist, lässt sich durch Lotfällung auf die Ordinate die Zeitskala der jeweiligen Kinetik ablesen. In diesem Fall resultieren aus der Kurvenanpassung eine Triplettzeit von ca. 0,015 ms und eine Diffusionszeit von ca. 4,5 ms.

Mit Hilfe der FCS lassen sich somit also folgende Parameter bestimmen:

1. Die Amplitude der Korrelationsfunktion ist ein inverses Maß für die Konzentration der fluoreszierenden Spezies. Eine hohe Amplitude bedeutet also eine geringe Konzentration, während niedrige Amplituden eine hohe Fluorophorkonzentration anzeigen.
2. Die Diffusionszeit, die der durchschnittlichen Zeit entspricht, die sich ein Molekül im Anregungsvolumen aufhält.
3. Und darüber hinaus Kinetiken auf anderen Zeitskalen. Diese können sowohl sehr kurz sein (Triplett, Photophysik), als sich auch auf deutlich längeren Zeitskalen abspielen und z. B. durch chemische Reaktionen oder Strukturveränderungen hervorgerufen werden.

2.3 Quantum Dots

Seit ihrer Entdeckung vor mehr als 20 Jahren gelten nanokristalline Halbleiter, so genannte Quantum Dots, als hoffnungsvolle Werkzeuge für wissenschaftliche Aufgabenstellungen in vielen verschiedenen Arbeitsgebieten. Einen weiteren Schub erhielt die Forschung an und mit ihnen in der zweiten Hälfte der 1990er Jahre, als verschiedene Firmen anfangen, Quantum Dots kommerziell herzustellen.

2.3.1 Struktur und Aufbau

Kommerziell erhältliche Quantum Dots sind aus vier verschiedenen Schichten aufgebaut (Vgl. Abb. 2.12).

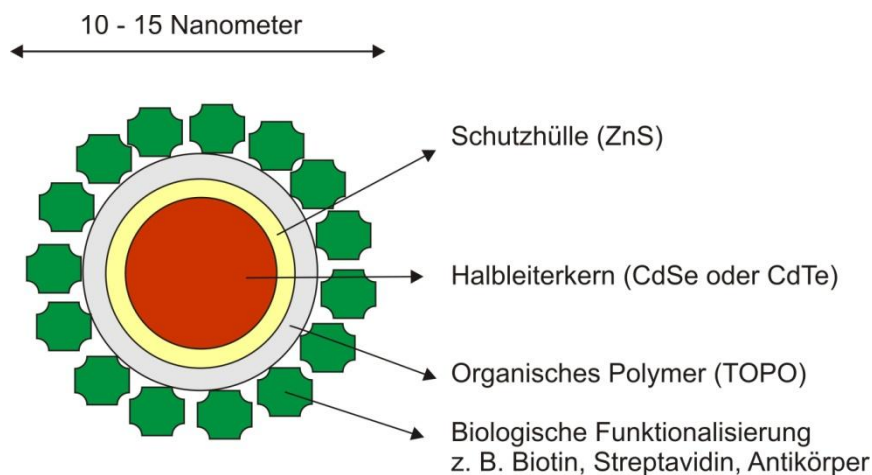


Abbildung 2.12: Schematischer Aufbau eines Quantum Dots.

Das Kernstück, das auch für die fluoreszierenden Eigenschaften der Nanokristalle verantwortlich zeichnet, besteht aus einem Halbleitermaterial, typischerweise CdS, CdSe oder CdTe. Der Halbleiterkern ist umgeben von einer dünnen Schale aus einem Material, das eine ähnliche Kristallstruktur aufweist wie der fluoreszierende Halbleiterkern. In der Regel wird deshalb Zinksulfid (ZnS) verwendet, das zusätzlich den Vorteil hat, optisch absolut transparent zu sein, so dass sowohl Absorption als auch Emission von Licht ungehindert stattfinden können. Die abschirmende Schicht, die zusätzlich auch den empfindlichen Halbleiterkern gegen Wechselwirkung mit seiner Umgebung schützt und in der Regel nur einige wenige Atomlagen dick ist, wird mit einem organischen Polymer überzogen, das es ermöglicht, die Quantum Dots anschließend für biologische Anwendungen zu modifizieren. Dieser relativ komplexe Aufbau führt dazu, dass Quantum Dots im Vergleich zu organischen Fluorophoren

etwa zehnmal größer sind und durch die hohe Anzahl schwere Metallionen mit einem Gewicht von mehr als 1 MDa auch mehr als tausend Mal schwerer sind. Dies zeigt Abbildung 2.13.

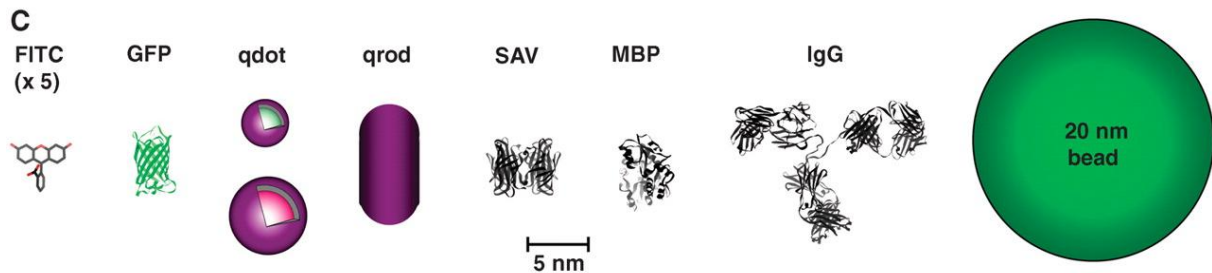


Abbildung 2.13: Größenvergleich einiger Farbstoffe und Biomoleküle z. B. organische Farbstoff (FITC), fluoreszierende Proteine (GFP) oder Antikörpern (IgG). Die Größenverhältnisse zeigen, dass Quantum Dots oftmals größer und schwerer sind, als die zu untersuchenden Moleküle [Michalet 2005].

Gerade diese Größe und das Gewicht machen den Einsatz von Quantum Dots in biologischen Fragestellungen relativ schwierig, da noch nicht abschließend geklärt ist, ob und wie stark mit ihnen markierte Proteine oder Antikörper in ihren natürlichen Aufgaben behindert werden. Ein weiteres Hindernis liegt momentan in noch fehlenden stöchiometrischen Markierungsstrategien. Dadurch, dass die gesamte Oberfläche des Quantum Dots mit potenziellen Bindungsstellen überzogen ist, ist eine zuverlässige Reaktionskontrolle noch nicht möglich.

2.3.2 Optische Eigenschaften

Die optischen Eigenschaften von Quantum Dots werden mit Recht als einzigartig bezeichnet. Im Gegensatz zu organischen Fluorophoren findet hier die Absorption nicht nur mit Wellenlängen statt, die die Bohr'sche Frequenzbedingung erfüllen. Da Quantum Dots nicht über Molekülorbitale mit genau definierten Energieniveaus verfügen, sondern als kleine metallische Festkörper über Bindungsbänder, die aus einem Kontinuum von einzelnen Zuständen mit ähnlichen Energien bestehen.

2.3.2.1 Mechanismen der Lichtabsorption und Emission

Für Quantum Dots gilt also das Prinzip der metallischen Bindung. In diesem Bindungsmodell wird zwischen Isolatoren, Leitern und Halbleitern unterschieden. Diese verschiedenen Typen von Metallen unterscheiden sich lediglich in der energetischen Lage ihrer Elektronenbänder.

Normalerweise befinden sich alle freien Elektronen des Kristalls, jedes Atom steuert eines dazu bei, im energieärmeren Valenzband, das die Bindung zwischen den einzelnen Atomen ermöglicht. Neben dem Valenzband besitzen Metalle auch das energetisch höhere Leitungsband, in das einzelne Elektronen photochemisch oder thermisch angeregt werden können. Bei Isolatoren ist die Energielücke zwischen den beiden Bändern so groß, dass sie nicht überwunden werden kann, während bei den sogenannten Leitern das Valenzband mit dem Leitungsband überlappt und somit (fast) keine Energie für einen Übergang erforderlich ist. Bei den eher seltenen Halbleitern ist zwar eine Energielücke vorhanden, allerdings ist diese noch gering genug, um einen Übergang einzelner Elektronen zu erlauben.

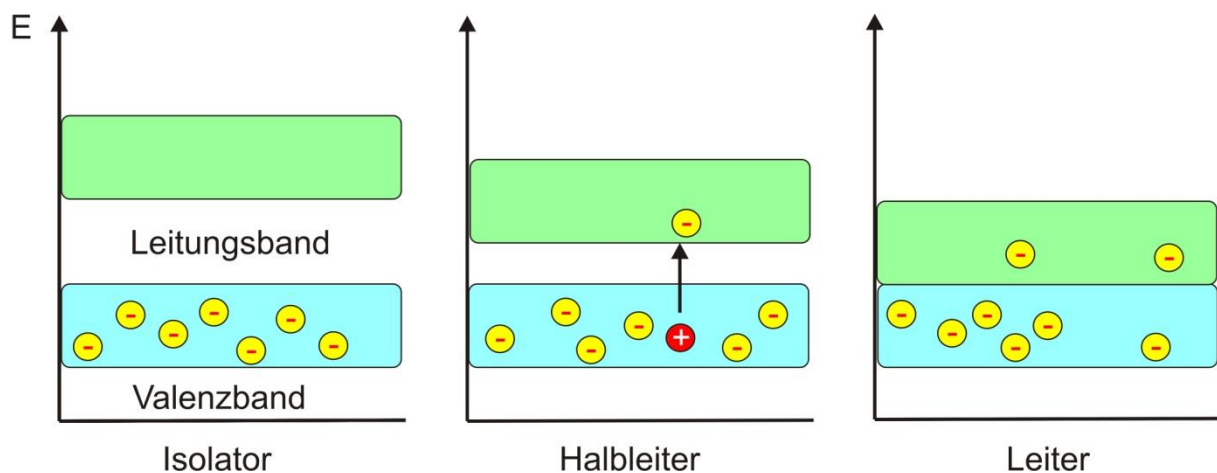


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des Bindungsmodells metallischer Festkörper. Zwar sind Quantum Dots sehr kleine nur aus wenigen tausend Atomen bestehende Festkörper, allerdings lässt sich das Konzept der metallischen Bindung zu ihrer Beschreibung nutzen.

Durch Lichtabsorption wird ein selenid-gebundenes Elektron auf eines der Cadmium-Atome übertragen. Dadurch wird im Inneren des Halbleiterkerns ein Elektron-Loch-Paar gebildet. Zum theoretischen Verständnis dieses Elektron-Loch-Paares kann man auf dieselben Prinzipien zurückgreifen, mit denen das Wasserstoffatom, ebenfalls eine Wechselwirkung zwischen einer positiven und einer negativen Ladung, beschrieben werden kann. Somit gilt auch der bevorzugte Abstand für ein solches Elektron-Loch-Paar (Exciton), der vom Wasserstoffatom her als Bohr'scher Radius bekannt ist.

Da aber die Halbleiterkerne der Quantum Dots als Ganzes kleiner sind als die entsprechenden Bohr'schen Radien für die verwendeten Materialien, werden die Elektron-Loch-Paare in einen Abstand zueinander gezwungen, der deutlich kleiner ist als eigentlich nötig. Neben der Energie, die gebraucht wird, um die Anregung zu initiieren, wird in einem Quantum Dot somit ein noch größerer Energiebetrag gebraucht, um die Elektron-Loch-Paare auf den geringen Abstand zu zwingen. Je kleiner ein Quantum Dot ist, desto größer ist die Differenz zum „erwünschten“ Bohr'schen Radius und desto höher ist die Energie, die zur Anregung aufgebracht werden muss.

Mit anderen Worten, je kleiner der Quantum Dot ist, desto kurzwelligeres Licht muss zur Anregung verwendet werden, und entsprechend kurzwelliger ist folglich auch das Licht, welches bei der Rückkehr in den Grundzustand emittiert wird. Die Folge daraus ist, dass Licht jedweder Wellenlänge zur Anregung verwendet werden kann, solange es energiereicher ist als die Energielücke. Dadurch ist es also möglich, durch geringfügige Änderungen der Kerngröße, gewünschte Emissionswellenlängen recht genau einzustellen.

Da zudem unterschiedliche Halbleitermaterialien unterschiedliche Bohr'sche Radien besitzen, lässt sich durch eine geringe Variation des verwendeten Materials der erreichbare Spektralbereich zusätzlich erweitern. Momentan kommerziell erhältliche Quantum Dots arbeiten mit drei unterschiedlichen Materialien. Cadmiumsulfid wird für den Bereich des nahen UV bis ca. 500 nm eingesetzt, der Bereich bis ca. 650 nm wird mit Cadmiumselenid abgedeckt und bis ca. 900 nm kann Cadmiumtellurid verwendet werden. Abbildung 2.15 zeigt Quantum Dots verschiedener Größen und Materialien, die den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums abdecken. Daneben wurden in den letzten Jahren Quantum Dots entwickelt, deren Emissionswellenlängen weit im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums liegen.



Abbildung 2.15: Abhängigkeit der Emission von der Größe des Halbleiterkerns, mit zunehmender Größe verschiebt sich die Emission zu längeren Wellenlängen.

Wie bereits oben erwähnt, lassen sich Quantum Dots mit Licht beliebiger Wellenlänge anregen, solange es die nötige Mindestenergie zur Überwindung der Energielücke zwischen Valenz- und Leitungsband besitzt. Diese Mindestenergie entspricht im Großen und Ganzen der Energie des Emissionsmaximums. Je höher die Energie des absorbierten Photons ist, desto höher ist die Anzahl der möglichen Übergänge zwischen den beiden Kontinuen, so dass die Extinktionskoeffizienten zu kurzen Wellenlängen hin stark ansteigen. Vgl. hierzu Abbildung 2.15, die ein Absorptions- und Emissionsspektrum eines Quantum Dot 605 zeigt.

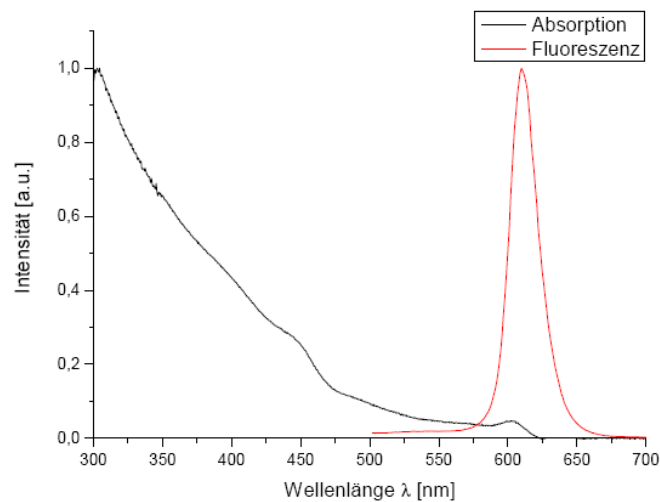


Abbildung 2.16: Absorption und Emission des Quantum Dots 605

Die obige Abbildung verdeutlicht dies anhand des Absorptions- und Emissionsspektrums eines Quantum Dots. Während die Emission eine, im Vergleich zu organischen Fluorophoren, sehr schmale Bande aufweist, steigt die Absorptionskurve zu kürzeren Wellenlängen hin kontinuierlich an. Kommerzielle Quantum Dots besitzen bei Wellenlängen um 300 nm einen Extinktionskoeffizienten von bis zu $10.000.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ungefähr das 100fache von organischen Fluorophoren an ihrem Absorptionsmaximum.

Gegenüber organischen Farbstoffen haben Quantum Dots also folgende Vorteile:

1. Sie verfügen über sehr hohe Extinktionskoeffizienten und lassen sich bei jeder Wellenlänge anregen, die unterhalb ihrer Emission liegt. Das macht sie zu sehr geeigneten Werkzeugen für das Arbeiten mit mehreren Farben bei nur einer Anregungswellenlänge.
2. Die Emissionsspektren sind relativ schmalbandig, das bedeutet, dass bei geeigneter Filterwahl Farbstoffe gewählt werden können, die spektral nahe beieinander liegen, ohne dass es zu störendem *Cross-Talk* auf den Detektionskanälen kommt.
3. Auf Grund ihres Aufbaus tritt keine Form der Photozerstörung auf.

Allerdings weisen auch Quantum Dots negative photophysikalische Eigenschaften auf. So tritt, insbesondere bei höheren Anregungsleistungen, das sogenannte *Blinking* auf [Kuno 2000, Kuno 2001]. Während dieses *Blinkings*, das durch Auger-Prozesse hervorgerufen wird, emittieren Quantum Dots auf kurzen bis mittleren Zeitskalen keinerlei Fluoreszenz.

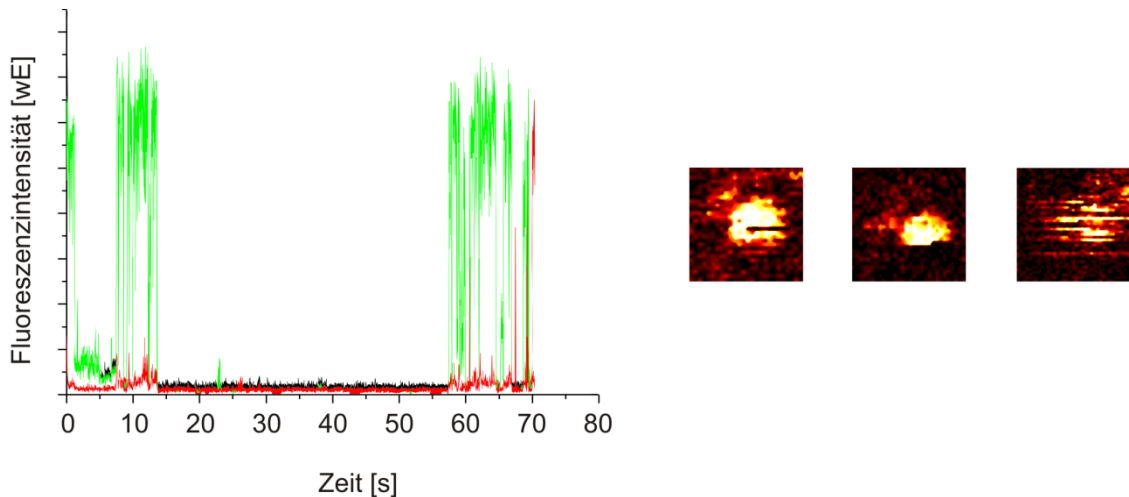


Abbildung 2.17: *Blinking* eines Quantum Dot 655: links eine Fluoreszenzintensitätsspur, rechts drei konfokale Aufnahmen mit unterschiedlich stark ausgeprägtem *Blinking*.

Abbildung 2.17 zeigt dieses Verhalten anhand einer Fluoreszenzintensitätsspur (links) und drei konfokaler Aufnahmen (rechts).

Der Auger-Effekt wurde zuerst von Lise Meitner entdeckt und beschrieben [Meitner 1922]. Es handelt sich dabei um einen strahlungslosen Übergang eines Elektrons in der Elektronenhülle eines Atomkerns und steht in Konkurrenz zur Röntgenemission bei der Auffüllung einer Elektronenlücke in einem stärker gebundenen Atomorbital (vgl. Abbildung 2.18)

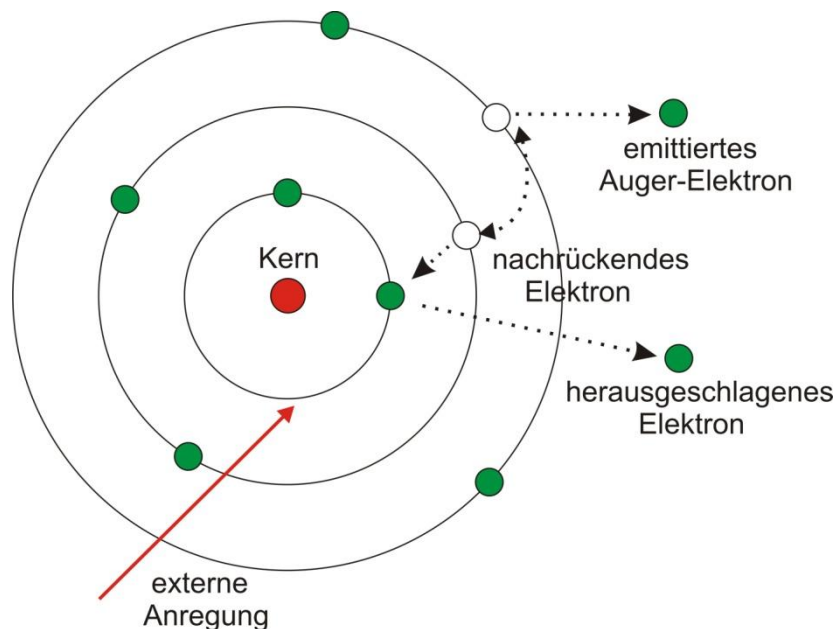


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung eines Auger-Prozesses. Nach externer Anregung wird ein kernnahes Elektron aus einem energiereichen Atomorbital herausgeschlagen. Diese Lücke wird aus einem energieärmeren Orbital aufgefüllt. Da hierbei eine Überschussenergie frei wird, kann ein noch energieärmeres Elektron aus einer äußeren Schale emittiert werden.

Ein Auger-Prozess besteht aus einer Abfolge von Schritten. Durch energiereiche äußere Anregung wird ein stark gebundenes Elektron aus einer kernnahen Schale herausgeschlagen. Dieses Ladungsungleichgewicht wird sofort durch das Nachrücken eines weiter vom Kern entfernten Elektrons auf das kernnahe Orbital kompensiert. Bei diesem Nachrücken tritt eine Überschussenergie auf, die auf zwei unterschiedliche Wege abgebaut werden kann. Die erste Möglichkeit ist die Aussendung energiereicher elektromagnetischer Strahlung (Röntgenemission). Bei der zweiten Möglichkeit handelt es sich um den Energieübertrag auf ein kernfernes Elektron, das daraufhin das Molekül verlässt (Aussendung eines Auger-Elektrons) [Auger 1925].

2.4 Der Kernporenkomplex

Die Kernpore ist ein großer Proteinkomplex in der Kernmembran eukaryontischer Zellen. Jede Zellmembran ist von ungefähr 2000 dieser Komplexe perforiert, die die Aufgabe haben, wasserlösliche Moleküle aus dem Zytoplasma durch die Kernmembran in den Zellkern zu transportieren.

2.4.1 Aufbau und Größe

Der Kernporenkomplex ist aus ungefähr 30 unterschiedlichen Proteinen aufgebaut, die im Verbund Nukleoporine genannt werden [Feldherr 2001], und hat einen äußeren Durchmesser von ungefähr 120 nm, während die Öffnung, durch die der Transport verläuft, lediglich einen Innendurchmesser von 10-15 nm aufweist. Die Gesamtmasse des Kernporenkomplexes beträgt etwa 120 MDa.

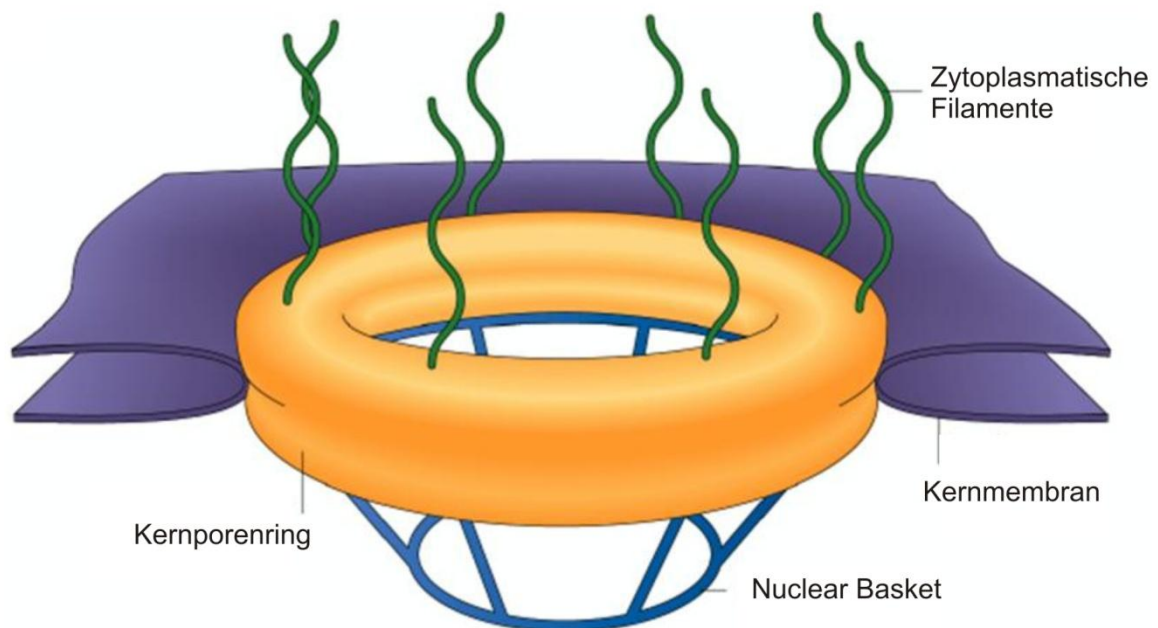


Abbildung 2.19: Schematischer Aufbau eines Kernporenkomplexes.

Die vertikale Ausdehnung der Kernporen wird auf etwa 200 nm geschätzt, und entspricht der Strecke, die von Proteinen und anderen Molekülen zurückgelegt werden muss, um in den Zellkern zu gelangen.

Die meisten der am Aufbau der Kernpore beteiligten Proteine weisen an ihren Enden langkettige Wiederholungen der Aminosäuresequenz Phenylalanin – Glycin (FG) auf. Diese FG-*Repeats* bilden im Inneren der Kernpore ein dreidimensionales Netzwerk, dessen Eigenschaften denen eines Hydrogels gleichen [Frey 2006] und deren Aufgabe es ist, eine Permeabilitätsbarriere zu errichten, die ein Durchqueren der Kernpore durch unerwünschte Substanzen verhindert [Macara 2001, Rout 2000, Ribbeck 2001/2002].

2.4.2 Transport durch die Kernpore

Es ist bekannt, dass kleinere Moleküle mit einer Masse von weniger als 30 kDa die Kernpore größtenteils schnell und mittels freier Diffusion durchqueren. Größere Moleküle hingegen diffundieren entweder nur sehr langsam durch die Kernpore oder werden sogar völlig an einer Passage gehindert, solange sie nicht an Kern-Transportrezeptoren (NTR englisch= nuclear transport receptors) gebunden sind [Pemberton 2001]. Nur durch Wechselwirkung der Transportrezeptoren mit den FG-Wiederholungen im Inneren der Kernpore ist es möglich, die Permeabilitätsbarriere zu überwinden.

Größere Moleküle sind zur Passage der Kernpore also auf die Anwesenheit von Transportproteinen, den β -*Karypherinen*, angewiesen. Allerdings werden sie nur dann transportiert, wenn sie eine kurze genetische Kodierung, die Nuclear Localization Sequence, eine Art genetische Zugangsberechtigung, besitzen. Die Familie der β -*Karypherine* unterteilt sich in zwei verschiedene Untergruppen, in die Importrezeptoren (Importine) und die Exportrezeptoren (Exportine).

Der Mechanismus des Transports von Proteinen durch die Kernpore lässt sich in geeigneter Weise in vier unterschiedliche Abschnitte gliedern und mit dem Ran-GTP-Zyklus [Künzler 2001] beschreiben. Es ist bekannt, dass der Ran-GTP-Zyklus, sofern er unter Vollast läuft, in der Lage ist, bis zu 1000 Transportvorgänge pro Minute in einer einzigen Kernpore zu vollziehen [Ribbeck 2001, Hardeland 2006].

Eine sehr schematische Darstellung des RAN-GTP-Zyklus bietet Abbildung 2.20. Die einzelnen Schritte dieses erstaunlich energieeffizienten Transportzyklus sollen in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt werden.

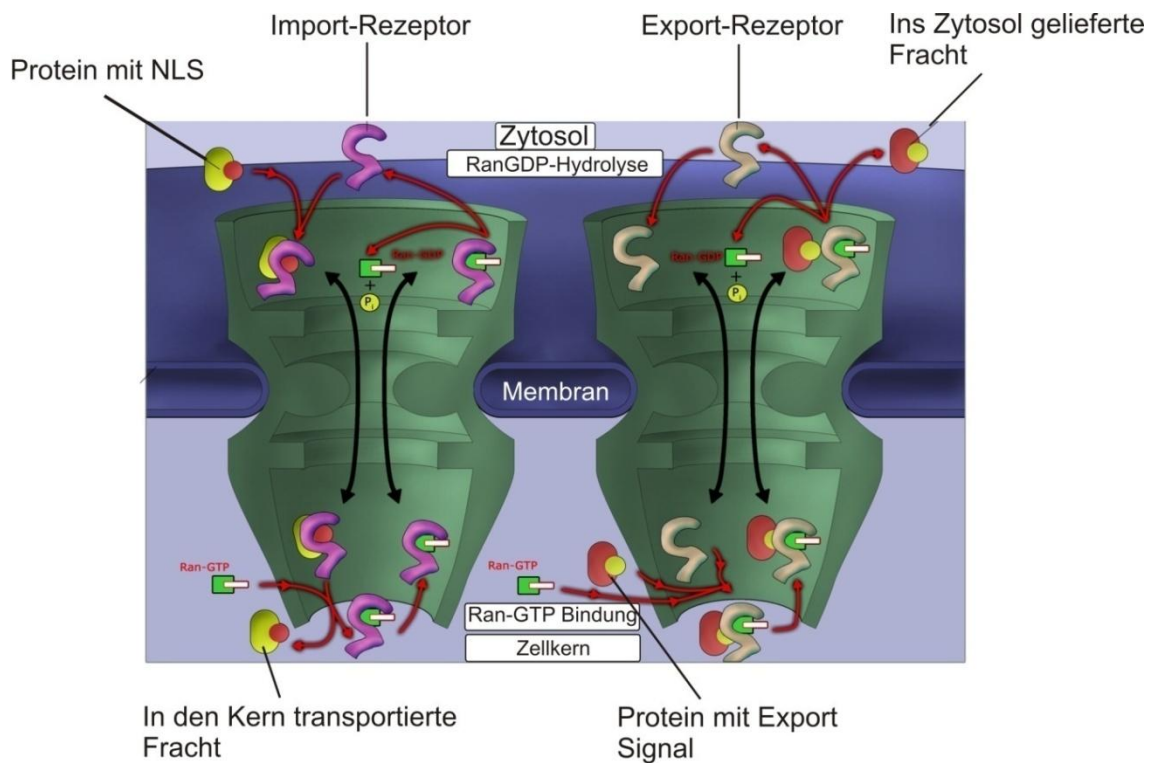


Abbildung 2.20: Der RanGTP-Zyklus. Schematische Darstellung der vier Schritte des Frachttransport vom Zytosol in den Zellkern (Angepasste Graphik von: www.Wikipedia.org/wiki/nuclearPore).

Aufbau des Transportkomplexes

Auf der zytosolischen Seite des Kernporenkomplexes kann sich ein Transportkomplex zwischen dem Frachtmolekül und verschiedenen Transportproteinen ausbilden. Grundbedingung dafür ist, dass das Frachtmolekül eine spezifische Aminosäuresequenz, die sogenannte NLS (englisch: Nuclear localisation sequence), aufweist. Diese dient gewissermaßen als Zugangsberechtigung in den Kern. Der entstehende Transportkomplex wird aus der Fracht und den beiden Importrezeptoren Importin α und Importin β ausgebildet [Kobe 1999].

Transport des Komplexes durch den Porenkomplex

Der genaue Mechanismus des Transports ist bis heute noch nicht genau aufgeklärt. Einzelmolekülstudien deuten an, dass die gebildeten Fracht-Transporter-Komplexe bidirektional und mit schnellen Zufallsbewegungen durch die Pore gelangen [Yang 2004]. Vor einigen Jahren erst wurde entdeckt, dass die Fracht-Transporter-Komplexe sogar schneller durch die Kernpore diffundieren können als freie Importine, was auf das Vorhandensein verschiedener Transportwege schließen lassen könnte [Kubitschek 2005].

Unstrittig ist allerdings, dass den Phenylalanin-Glycin-Abschnitten der Nukleopurine eine entscheidende Bedeutung zuzukommen scheint. Wie bereits oben erwähnt, bilden sie eine Art Schranke, die den freien Stoffaustausch zwischen Zytosol und Kern verhindert.

Für den eigentlichen Transport hingegen gibt es wieder verschiedene Interpretationsansätze. Die erste Theorie besagt, dass die Translation des Transportkomplexes durch ein Springen desselben von einem FG-Wiederholungsabschnitt zum nächsten zustande komme, ähnlich einem Gleiten über „ölige Spaghetti“ [Macara 2001]. Die andere Theorie geht davon aus, dass die FG-Nukleopurine eine selektive Phase ausbilden, in der nur die Transportmoleküle löslich seien [Ribbeck 2001].

Auflösung der Transportkomplexe auf der Kernseite

Nach dem erfolgreichen Durchqueren der Kernpore wird der Transportkomplex im Zellkern aufgelöst. Hierzu bindet zunächst Ran-GTP an die Importin β -Domäne des Transportkomplexes, dadurch wird das Importin α/β -Konglomerat gespalten [Yang 2006]. Zur Freisetzung des Frachtmoleküls im Zellkern erfordert es die Interaktion mit zwei weiteren Nukleopurinen, bevor aus der Sicht des zu transportierenden Moleküls der Zyklus abgeschlossen ist.

Recycling der Transportproteine

Nach der Dissoziation des Importkomplexes bilden sich zwei Exportkomplexe, die die beiden Importine α und β in das Zytosol zurücktransportieren. Diese Komplexe werden dort unter Ran-GTP-Hydrolyse gespalten und stehen somit für einen erneuten Zyklus bereit. Dieser Schritt der Regeneration der Importproteine ist im Übrigen der einzige im gesamten Transportzyklus, bei dem Energie verbraucht wird [Matsuura 2004].

2.5 *Escherichia coli*

Escherichia coli, kurz *E. coli*, ist die bekannteste Art der Gattung *Escherichia* der Familie der Enterobakterien (griechisch: Enteron: der Darm). Entdeckt und grundlegend charakterisiert wurde diese Gattung bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts von dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich. 1919 wurde die gesamte Gattung zu seinen Ehren nach ihm benannt. Mittlerweile gehört *E. coli* zu den am besten untersuchten Organismen überhaupt. *E. coli* ist ein weitverbreiteter Saprophyt im unteren Dünndarm und Dickdarm des Menschen und vieler Warmblüter und ist somit ein wichtiger Bestandteil einer physiologischen Darmflora, wobei die Bakterien normalerweise in perfekter Symbiose mit ihren Wirten leben. Auf der einen Seite unterstützen sie den Wirt bei der Verdauung, fördern die Immunfunktionen und produzieren das für den Wirt wichtige Vitamin K, auf der anderen Seite versorgt dieser sie, wenn auch unbewusst, mit wichtigen Nährstoffen. Normalerweise finden sich bereits in den ersten 48 Stunden nach der Geburt bereits die ersten *E. coli* Kolonien in den Verdauungstrakten neugeborener Babys [Todar 2007]. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme des Bakteriums zeigt Abbildung 2.21.

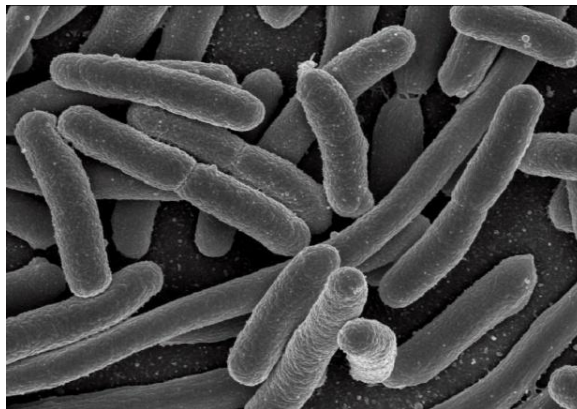


Abbildung 2.21: Elektronenmikroskopische Darstellung von *E. Coli* [NIH, USA].

E. coli gehört zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen und besitzt die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch „gemischte Säuregärung“ zu gewinnen. Es dient als Indikator für fäkale Verunreinigungen, zum Beispiel von Wasser.

Neben einer Vielzahl von harmlosen Escherichien existieren auch einige Arten mit pathologischer Bedeutung, von denen unterschiedliche Gefährdungspotenziale ausgehen. Zu erwähnen sind hier insbesondere die enteroinvasive (EIEC), die enterohämorrhagische (EHEC), die enteropathogene (EPEC) und die enterotoxische *E. coli* (ETEC).

E. coli ist ein genetisch und molekularbiologisch sehr gut untersuchter Organismus. Das Genom besteht mit einer Gesamtgröße von 4,6 Mega-Basenpaaren aus über 4000 Genen. Außerdem können auch Plasmide, zumeist ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle, mit einer Länge von 2 – 200 kb Länge in der Zelle vorkommen. Diese Plasmide können neben Informationen für die Bildung von Bakterientoxinen auch die Gene für die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen tragen.

E. coli und verwandte Bakterien besitzen die Fähigkeit, DNS über Konjugation, Transduktion oder Transformation auszutauschen und sind somit in der Lage, durch diesen Gentransfer mittels Mikroevolution sofort auf geänderte Lebensbedingungen zu reagieren.

2.5.1 Struktur der Bakterien

Eine *E. coli* Zelle hat ungefähr eine Länge von zwei μm und einen Durchmesser von bis zu einem Mikrometer. Daraus ergibt sich ein Zellvolumen von ca. $2 \mu\text{m}^3$ oder ungefähr 2 Femtolitern [Kubitschek 1990]. Als gramnegatives Bakterium verfügt *E. coli* über eine Zellhülle. Diese besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran, die von einem Kompartiment, dem Periplasma, getrennt sind. Auf Grund der physikalischen Eigenschaften ist die äußere Membran eine selektive Barriere, um den Eintritt verschiedenster toxischer Stoffe zu verhindern, was *E. coli* die Fähigkeit verleiht, unter den verschiedensten Umweltbedingungen zu überleben. An ihrer gesamten Oberfläche besitzen *E. coli* sogenannte Pili, kurze haarförmige, in der äußeren Membran verankerte Strukturen, die den Bakterien die Möglichkeit geben, sich an anderen Bakterien oder sonstigen Oberflächen festzuheften. *E. coli* sind außerdem peritrich begeißelt, was bedeutet, dass ihre Oberfläche gleichmäßig mit Flagellen (Geißeln) belegt ist [Darnton 2007] (vgl. Abbildung 2.22).

Die Flagellen erlauben es dem Bakterium, sich in seinem wässrigen Lebensraum zielgerichtet fortzubewegen. Bakterielle Flagellen sind dünne, helicale und starre Stäbchen mit einem Durchmesser von 10 - 20 nm und einer Länge von bis zu einigen hundert Mikrometern. Die Bewegung der Flagellen wird durch molekulare Maschinen, die Flagellenmotorkomplexe, gesteuert. Über eine Abfolge von Signalproteinen werden die Drehrichtung der Flagellen und somit auch die Art der Fortbewegung der Bakterien gesteuert. Dieser, Chemotaxis genannte, Vorgang wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

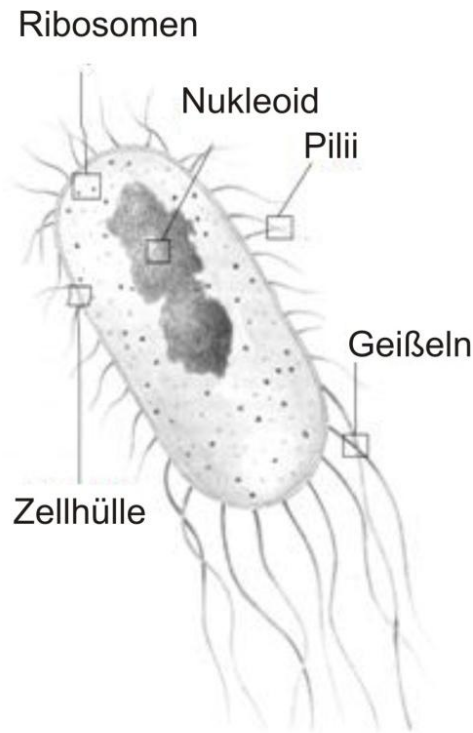


Abbildung 2.22 Schematische Darstellung der Struktur von *E. coli* [Lehninger 2001]

2.5.2 Chemotaxis bei *E. coli*

Chemotaxis bedeutet im Allgemeinen die zielgerichtete Zellbewegung von Phagozyten entlang eines Gradienten aus chemotaktischen Substanzen. Das Chemotaxis-Netzwerk ist eines der am besten verstandenen Signaltransduktionssysteme. Die Zelle ist durch diesen Signalweg in der Lage, auf temporäre Gradienten in ihrer chemischen Umgebung zu reagieren, indem sie sich in Richtung anziehender Stoffe (Zucker und verschiedene Aminosäuren) bewegt oder sich von abstoßenden Stoffen entfernt. Die Chemotaxis ist ein Musterbeispiel des Zweikomponenten-Regulationssystems [Stock 2000]. Im Chemotaxis-System assoziiert die Histidinkinase, CheA, mit einer bestimmten Klasse von Transmembranproteinen, den Chemorezeptoren [Boukhvalova 2002, Falke 2001]. Bei *E. coli* wurden fünf verschiedene Chemotaxisproteine (MCPs) entdeckt. Die wichtigsten Rezeptoren, so etwa die für Aspartat (T_{ar}) oder Serin (T_{sr}) sind jeweils in mehreren tausend Kopien pro Zelle vorhanden, während von anderen Rezeptoren, die z. B. spezifisch für Dipeptide (T_{ap}) oder Galaktose (T_{rg}) sind, nur einige hundert Kopien vorhanden sind [Li 2004]. Diese Chemorezeptoren liegen als Dimere vor, mit einer C-terminalen zytoplasmatischen und einer N-terminalen periplasmatischen Domäne [Morgan 1993].

Die Chemorezeptoren bilden zusammen mit CheA und einem Kopplungsprotein, CheW, große Rezeptor-Signal-Komplexe (Cluster), an die wiederum andere, an der Signalkaskade der Chemotaxis beteiligte, Proteine, z. B. CheY, binden können [Sourjik 2000]. Diese aus mehreren tausend Molekülen bestehenden Cluster sind hauptsächlich an den Zellpolen lokalisiert, können aber in speziellen Fällen auch lateral verschoben auftreten [Thiem 2007]. Nach der Bindung einer Chemikalie an einen der Rezeptoren, kommt es zu einer Änderung der Konformation, wodurch im Zusammenspiel mit dem Kopplungsprotein CheW eine Änderung der Autophosphorylierung des CheA ausgelöst wird. Lockstoffe vermindern die Autophosphorylierungsrate, während diese Geschwindigkeit in Gegenwart von abstoßenden Stoffen beschleunigt wird. Phosphoryliertes CheA führt zu einer Phosphorylierung von CheY, einem Responseregulator, der direkt mit dem Flagellarmotor interagiert. Eine hohe Konzentration an phosphoryliertem CheY bewirkt eine Rotation der Geißel im Uhrzeigersinn und initiiert das charakteristische Taumeln, die Reaktion des Bakteriums auf abstoßende Substanzen. Ist hingegen wenig phosphoryliertes CheY zugegen, eine Folge der Anwesenheit von Lockstoffen, dreht sich der Flagellarmotor weiter gegen den Uhrzeigersinn und die Zelle schwimmt weiter geradeaus [Welch 1993]. Eine schematische Darstellung der Vorgänge bei der Chemotaxis zeigt die nebenstehende Abbildung 2.23.

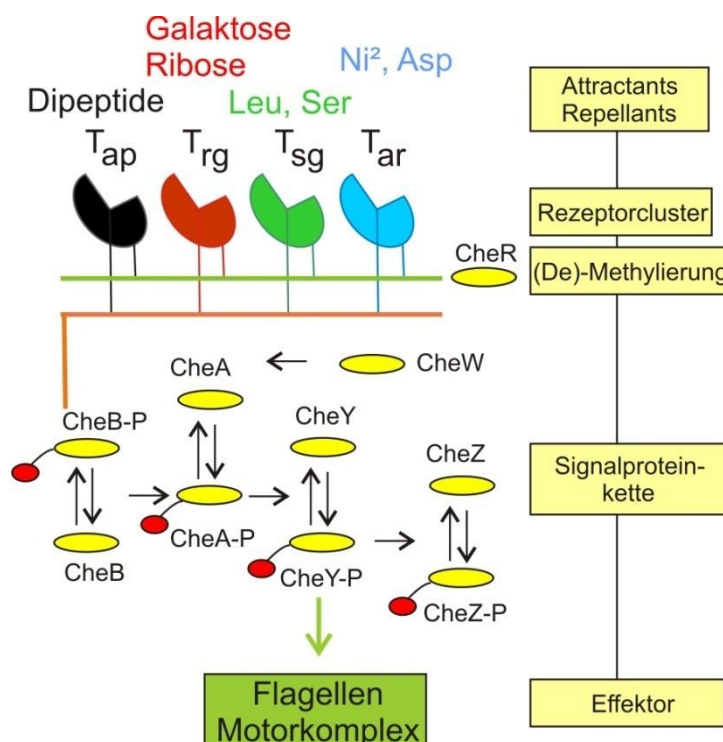


Abbildung 2.23: Schematische Darstellung der komplexen Abläufe der Chemotaxis in *E. coli*.

2.6 *In vivo* Labelling von Proteinen

Der gängigste Zugang zur *in vivo* Markierung ist die Verwendung von fluoreszenten Sonden, die entweder chemisch oder biochemisch an das interessierende Protein gekoppelt werden [Chamberlain 2000, Miyawaki 2003]. Mit Hilfe der Beobachtung der Fluoreszenz eröffnet sich dann die Möglichkeit, die Lokalisierung des entsprechenden Proteins oder dessen Interaktionen mit anderen Proteinen zu untersuchen.

2.6.1 Fluoreszierende Proteine

Seit die Gruppe von Roger Tsien das rekombinante grün fluoreszierenden Proteins (GFP, Green fluorescent Protein), welches bereits in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt wurde [Shimomura 1962], erstmals zur Fluoreszenzmarkierung verwendete, hat sich die Verwendung fluoreszierender Proteine in den letzten Jahren beständig weiterentwickelt und ist zu einer Standardmethode in der biologischen und biochemischen Forschung geworden [Tsien 1998]. Für die Entdeckung, Charakterisierung und Klonierung des grün fluoreszierenden Proteins wurden Shimomura und Tsien 2008 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Durch die Fusionierung ihrer genetischen Codierung mit der des zu untersuchenden Proteins bietet sich ein Zugang zu nicht-invasiver Markierung von Proteinen in lebenden Zellen, wodurch Genexpression und Proteintransport beobachtet werden können. Zusätzlich bietet die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen einen direkten Angriffspunkt auf die Konzentration des Fluorophors in der Zelle durch dosierten Einsatz der entsprechenden Expressionsvermittler wie Arabinose oder IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid). Weiterhin bietet das Klonen und Transfizieren von fluoreszierenden Proteinen einen Zugang zu Proteinen, die bisher nicht isoliert werden konnte, wie z. B. Proteinen zellulärer Untereinheiten [Lippincott-Schwarz 1999, 2003]

Die folgende Abbildung 2.23 zeigt neben der mittels Röntgenbeugung bestimmten Kristallstruktur des GFPs auch einen Überblick über aktuell erhältliche fluoreszierende Proteine und deren Emissionswellenlängen

[Bildquelle für beide Aufnahmen: <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>].

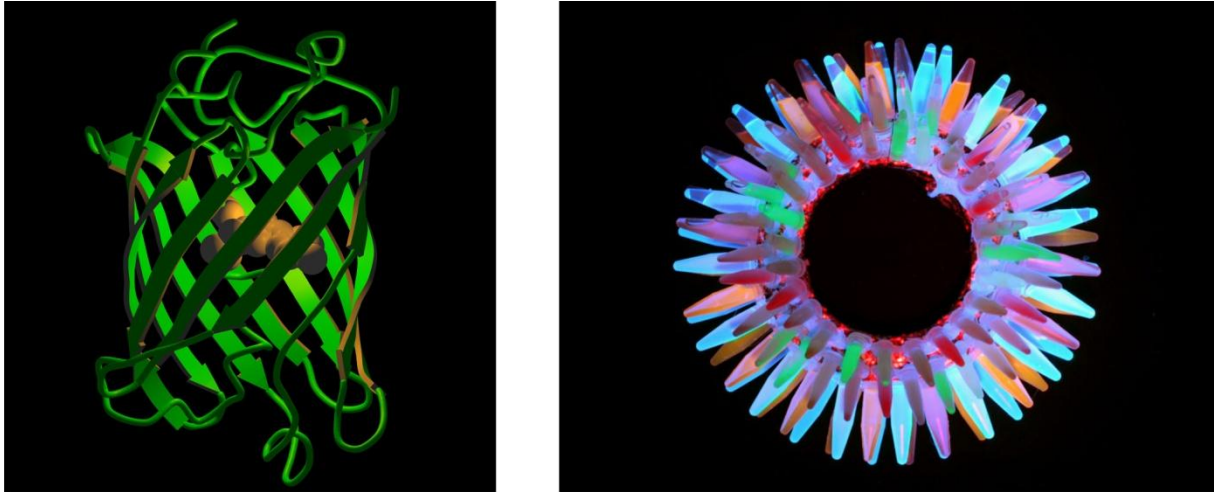


Abbildung 2.24: Struktur von GFP (links) und aktuell erhältliche fluoreszierende Proteine (rechts).

Anfängliche Schwächen der fluoreszierenden Proteine, wie z. B. die niedrigen Quantenausbeuten, pH-Sensitivität und schlechte photophysikalische Eigenschaften, konnten im Laufe der Zeit durch eine Fülle von neu entwickelten Mutanten überwunden werden [Zhang 2002]. Nachdem zunächst hauptsächlich Wellenlängen im grünen Spektralbereich durch fluoreszierende Proteine abgedeckt war, schritt in letzter Zeit vor allem auch die Entwicklung von andersfarbigen Proteinen wie den beiden YFP-Mutanten *Citrine* und *Venus* [Griesbeck 2001, Nagai 2002] wie auch neuer DsRed-Varianten [Campell 2001] voran. Bereits im Jahr 2004 präsentierte die Gruppe um Roger Tsien eine ganze Reihe fluoreszenter Proteine, wie *mCherry* oder *tdTomato*, die mit guten bis sehr guten Eigenschaften den gesamten Wellenlängenbereich zwischen 460 und 580 nm abdecken [Shaner 2004, 2008].

Neueste Entwicklungen auf diesem Gebiet sind sogenannte fluoreszierende *Timer-Proteine*, die die Wellenlänge ihrer Fluoreszenz im Laufe ihrer Reifung innerhalb von 14 Stunden von grün nach rot verschieben, die durch ihren zeitlichen Farbwechsel neue Wege bieten, die Proteinexpression über lange Zeiträume zu verfolgen [Tershkik 2000]. Andere Proteine, wie das Korallenprotein Dronpa, lassen sich sogar durch gezielte Anregung ein- und ausschalten [Ando 2004].

Der größte Vorteil bei der Arbeit mit fluoreszierenden Proteinen liegt in der sehr direkten Arbeitsweise. Durch Kolorierung mit dem Zielprotein kann auf arbeitsintensive Extraktion des zu untersuchenden Proteins, deren *in vitro* Anfärbung und ihre Rückführung in die Zelle, z. B. durch Mikroinjektion, vermieden werden, wodurch gleichzeitig eine unnötige Belastung der zu untersuchenden Zellen ausbleibt.

Allerdings hat die Verwendung von fluoreszenten Proteinen auch deutliche Nachteile. So kann es vorkommen, dass Fusionsproteine später oder gar nicht reifen und somit die eigentliche Funktion des Zielproteins nicht ausüben können.

Die Hauptursache hierbei ist in der Regel die Größe des fluoreszierenden Proteins, die oftmals die des zu markierenden Proteins übersteigt. GFP beispielsweise weist mit einer Sequenzlänge von 230 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 27 kDa auf [Tsien 1998]. Oftmals treten auch Probleme während der Expression der Fusionsproteine auf.

Neuartige Ansätze verbinden die Vorteile der genetischen Kodierung mit denen von gut charakterisierten organischen Fluorophoren. In diesen Systemen werden Fusionsproteine mit bestimmten Enzymen erstellt, die unter Verwendung spezifischer Substrate eine kovalente und hoch-stöchiometrische Markierung des zu untersuchenden Proteins ermöglichen.

2.6.2 Alternative Ansätze zur Markierung in lebenden Zellen

In den letzten Jahren wurden einige Verfahren entwickelt, die die Vorteile der genetisch-kodierten Proteine mit denen der deutlich kleineren und photostabileren organischen Fluoreszenzfarbstoffe verbinden. In der Regel wird bei diesen Techniken eine genetisch kodierte Sequenz an das zu untersuchende Protein fusioniert und danach mit einem spezifischen Substrat angefärbt. Eine dieser Methoden ist der Tetracystein Biarsenical-Tags, die in der Gruppe von Roger Tsien entwickelt wurden [Gaietta 2002]. Hierbei wird ein sehr kurzes Peptid mit einer Masse von lediglich knapp 1000 Da an das Protein fusioniert und dann mit einem von drei verfügbaren Tags (ChoxHash λ_{em} 480 nm, Flash λ_{em} 528 nm und ReAsh λ_{em} 608 nm) zur Reaktion gebracht. Nachteile dieser Methode sind mögliche unspezifische Markierungen von endogenen, cysteinhaltigen Proteinen und die Tatsache, dass arsenhaltige Verbindungen für Zellen generell toxisch sind [Stroffekova 2001].

Der Halo-Tag, ein kommerzielles Produkt der Firma Promega, weist hingegen eine deutlich höhere Sensitivität auf. Hier wird eine Halogenase C- oder N-terminal an das Zielprotein fusioniert. Das Substrat stellen in diesem Fall halogenierte Farbstoffe dar. Die eigentliche Markierung geschieht mittels einer nucleophilen Substitution am Farbstoffmolekül. Dabei wird das Halogenatom entfernt und eine stabile kovalente Bindung zu der Dehalogenase und somit auch zum zu untersuchenden Protein hergestellt. Abbildung 2.25 zeigt die Bindung des Farbstoffs an die Halogenase.

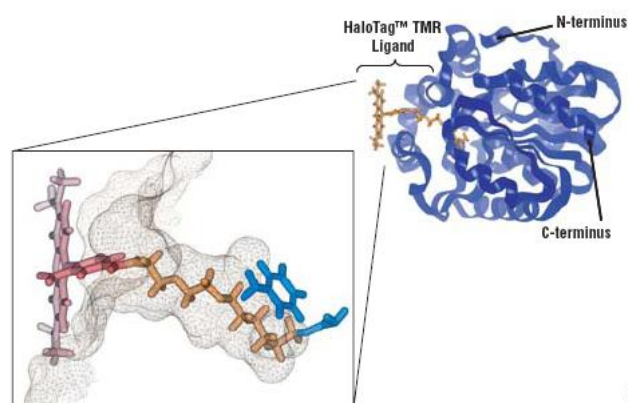


Abbildung 2.25: Markierung der Dehalogenase mit einem Farbstoff.

Der in dieser Arbeit zur Markierung von Chemotaxis-Proteinen in *E. coli* verwendete Snap-Tag-Ansatz wird im Folgenden näher erläutert.

2.6.3 Der Snap-Tag

Der Snap-Tag-Ansatz ist ein kommerziell erhältliches System (Covalys, CH), das ähnlich funktioniert wie der eingangs erwähnte Halo-Tag. Auch er vereinigt die Vorteile der Expression genetischer Fusionsproteine mit denen künstlicher Farbstoffe [Damoiseaux 2001].

Die spezifische Markierung mit Hilfe des Snap-Tags beruht auf der hervorragenden Spezifität des verwendeten Fusionsproteins, eines humanen DNS-Reparaturproteins, und dessen ungewöhnlichen Mechanismus. Die humane O⁶-Alkylguanin DNS Alkyltransferase (hAGT) führt einen irreversiblen Transfer einer Alkylgruppe aus einem O⁶-Alkylguanin-Substrat auf eines ihrer Cysteine durch (siehe Abbildung 2.26).

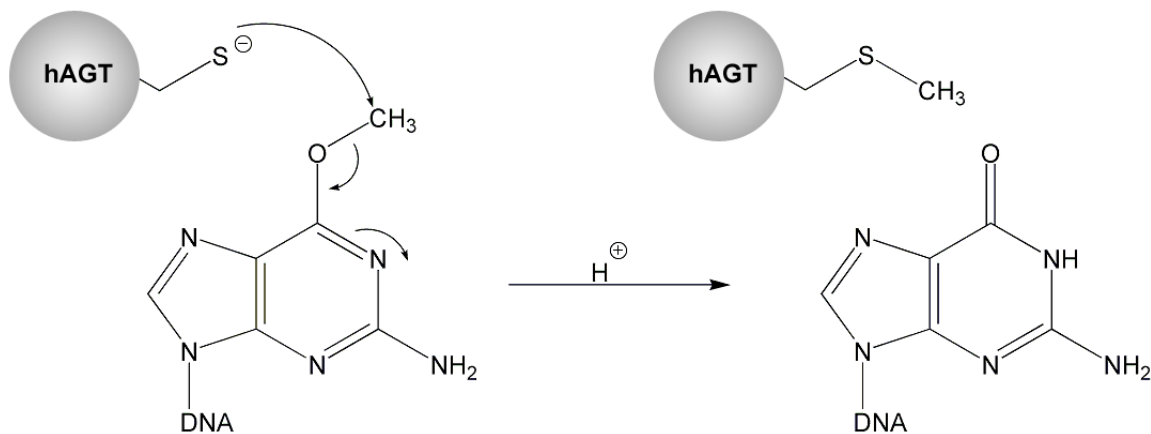


Abbildung 2.26: DNA-Reparaturmechanismus der hAGT.

Da die Spezifität der hAGT bezüglich ihrer Substrate nicht allzu hoch ist, reagiert sie auch mit dem artifiziellen O⁶-Benzylguanin (BG), das eine analoge funktionelle Gruppe aufweist. Die hAGT-Markierung in lebenden Zellen beruht auf zellpermeablen BG-Farbstoff-Substraten, welche an der *para*-Position des Benzolringes mit einem Farbstoffmolekül substituiert sind (vgl. hierzu Abbildung 2.26). Neben einer Markierung mit Farbstoffen können auch Biomoleküle wie Biotin oder andere Proteine auf das Fusionsprotein übertragen werden [Keppler 2004]. Während der Reaktion, die in lebenden Zellen ungefähr zwei bis drei Stunden erfordert, ist das Fusionsprotein kovalent mit einem Farbstoff markiert und nicht abreagiertes Substrat kann in mehreren Waschschrinen entfernt werden. Diese Waschschrine sind allerdings sehr zeitaufwändig und können in der Regel ungebundene Fluorophore nicht komplett aus der Zelle entfernen und verursachen möglicherweise zusätzlichen Stress in den zu untersuchenden Zellen.

Kürzlich wurde gezeigt, dass sich diese Waschschrte verhindern lassen, wenn im BG-Substrat durch Benzylguanin gelöschte Farbstoffe verwendet werden [Stöhr 2008]. Mit der Verwendung von fluoreszenzgelöschten Substraten wird die Hintergrundfluoreszenz bei gleichbleibender Fluoreszenzintensität der Markierung so stark erniedrigt, dass keinerlei Waschschrte mehr ausgeführt werden müssen. Nach der Reaktion des Substrats mit der hAGT wird das fluoreszenzlöschende Benzylguanin entfernt, und die Fluoreszenz des Farbstoffs wird völlig wiederhergestellt.

Die untenstehende Abbildung 2.27 verdeutlicht dies schematisch [Stöhr 2009]

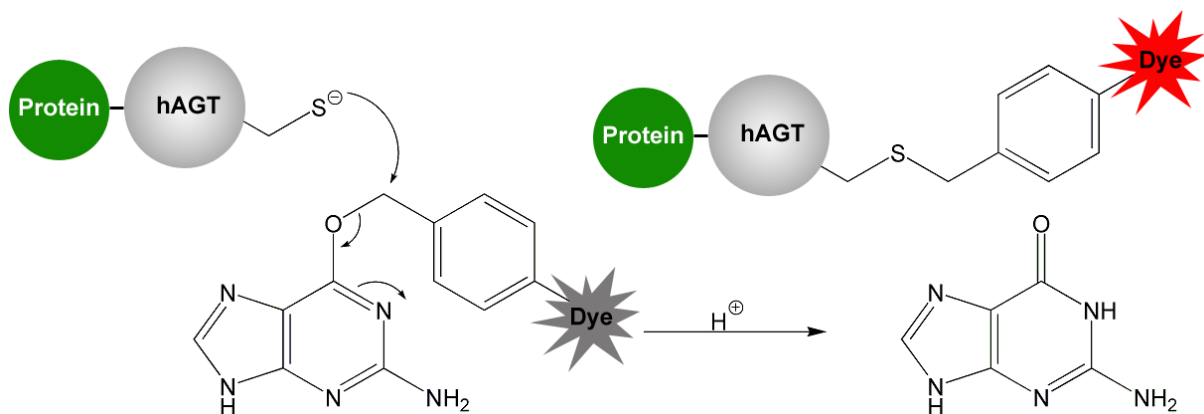


Abbildung 2.27: Durch die Verwendung fluoreszenzgelöschter Substrate tritt nur nach Reaktion mit der hAGT eine signifikante Fluoreszenz auf.

Neben der Möglichkeit, fluoreszenzgelöschte Substrate einzusetzen, bietet der Snap-Tag mit einer recht geringen Größe von 182 Aminosäuren und einem Gewicht von nur 21 kDa noch weitere Vorteile gegenüber vergleichbar funktionierenden Systemen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden alle verwendeten Chemikalien bei der Firma Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH (München, Deutschland) bezogen und verwendet, wie sie erhalten wurden. Lösungsmittel verschiedener Produzenten wurden im Zentrallager des Theoretikums in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Sämtliche wässrigen Lösungen und Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser mit weniger als 5 ppb Fremdstoffen angesetzt.

3.2 Fluoreszenzfarbstoffe, Quantum Dots und Snap-Tag-System

Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe ATTO 620, ATTO 633, ATTO 647 N und ATTO 655 wurden von der Firma ATTO-TEC GmbH (Siegen, Deutschland) als Maleimide oder NHS-Ester bezogen. Der Farbstoff MR 121 wurde freundlicherweise von Prof. K.H. Drexhage (Universität-Gesamthochschule, Siegen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Farbstoff Cy 5 wurde bei der Firma GE Healthcare (München, Deutschland) gekauft.

Die verwendeten Quantum Dots wurden bei der Firma Invitrogen Deutschland GmbH (Karlsruhe, Deutschland) erworben.

Das Snap-Tag-Substrat BG-NH₂ wurde von der Firma Covalys (Widerswil, Schweiz) geliefert.

3.3 Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an BG-Substrate und Proteine

Um freie Aminogruppen an Proteinen zu koppeln, wurden Farbstoffe mit einer, durch N-Hydroxy-Succinimidyl (NHS) aktivierten Carboxylgruppe eingesetzt. Die Farbstoffe wurden bereits aktiviert beim Hersteller bestellt. In Abbildung 3.1 ist die Reaktion der Kopplung an freie Aminogruppen schematisch dargestellt.

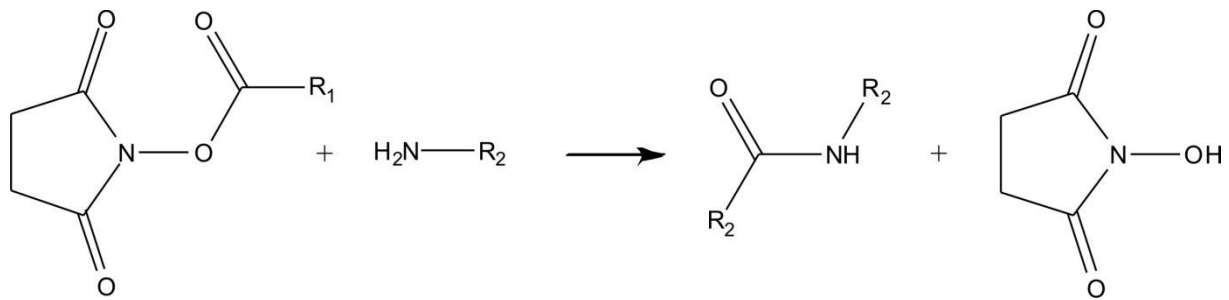


Abbildung 3.1: Reaktionsmechanismus der Kopplung von NHS-Estern an freie Aminogruppen.

Der Farbstoff (R₁), der als reaktive Gruppe einen NHS-Ester trägt, reagiert mit dem Protein oder BG-Substrat (R₂). Als Reaktionsprodukt entstehen ein farbstoffmarkiertes Protein und ein N-Succinimid. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist eine nukleophile Substitution durch das freie Elektronenpaar des Stickstoffs am Carboxyl-Kohlenstoffatom des NHS-Esters (S_N2_t-Reaktion).

Am effektivsten verläuft diese Reaktion bei leicht basischem pH-Wert, deshalb wurde die Reaktion in einem 200mM Carbonatpuffer mit einem pH-Wert von 8,5 durchgeführt. Zur Markierung der Proteine wurde ein 2,5-facher Überschuss des aktivierten Farbstoffs verwendet. Die Reaktionszeit betrug in der Regel vier Stunden. BG-Substrate wurden mittels einer Reversed-Phase HPLC-Säule aufgereinigt, markierte Proteine wurden mithilfe von NAP-Säulen purifiziert.

3.4 Konzentrations- und Markierungsgradbestimmung

Nach der Aufreinigung der Produkte wurden die Konzentrationen jeweils über die Absorption des Farbstoffs nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bestimmt.

Wichtiger als die Konzentration ist bei der Markierung von Proteinen die Bestimmung des Markierungsgrades, das heißt die Kenntnis über die durchschnittliche Anzahl von Farbstoffmolekülen pro Protein. Anders als bei BG-Substraten oder Oligonukleotiden steht bei Proteinen eine Vielzahl von potenziellen Kopplungspositionen zur Verfügung. Hierzu wird zunächst die Konzentration des Farbstoffes bestimmt. Darüber hinaus wird die Konzentration des Proteins benötigt. Der Extinktionskoeffizient (bei 280 nm) des jeweiligen Proteins lässt sich in verschiedenen Proteindatenbanken im Internet über seine Aminosäuresequenz des berechnen. Er ergibt sich in guter Näherung aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Aminosäuren. Bei der Konzentrationsbestimmung für das Protein muss noch berücksichtigt werden, dass alle Farbstoffe bei 280 nm ebenfalls eine Absorption aufweisen. Ent-

sprechend muss die Konzentration um diesen Anteil des Fluorophors korrigiert werden. Durch ein ins Verhältnissetzen der beiden ermittelten Konzentrationen lässt sich somit der durchschnittliche Markierungsgrad bestimmen, wobei immer mit überhaupt nicht oder mehrfach markierten Proteinen gerechnet werden muss.

3.5 Kultivierung und in vivo Markierung der E. coli Bakterien

Zur Aufzucht der Bakterien (HCB33, mit Expressionsvektor CheY-SNAP26b) wurde eine geringe Menge aus dem Glycerin-Stock zunächst über Nacht in 20 ml LB-Medium (Lysogeny Broth-Medium) mit 0,1% Ampicillin bei 37°C und unter Schütteln mit 150 U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Milliliter dieser Übernachtskultur erneut in 20 ml LB-Medium aufgenommen und mit Ampicillin und unterschiedlichen Konzentrationen des Expressionsregulators Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG 0 – 10 μM) bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 34°C unter Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Bakterien mit Tethering-Puffer wurden diese für zwei Stunden mit 1 μM Benzylguanin-MR121 Substrat in LB-Medium zur Anfärbung der Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Tethering-Puffer zum Entfernen nicht gebundenen Snap-Substrats wurden die Bakterien auf einer Poly-L-Lysin Oberfläche immobilisiert und zur Messung vorbereitet.

3.6 Oberflächenmodifikationen

3.6.1 Herstellung von APS-Oberflächen

APS-Oberflächen (APS = Amino-Propylsilan) wurden in dieser Arbeit verwendet, um Oligonukleotide über elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Silizium-Ionen auf der Oberflächenmodifikation und dem negativ geladenen Phosphatrückgrad der Oligonukleotide zu immobilisieren.

Zur Herstellung dieser Oberflächen wurden dünne Glasscheiben (Cover-slides) zunächst für eine Minute in einer stark verdünnten Flusssäurelösung (0,5 % in Wasser) von potenziellen Verunreinigungen befreit. Danach wurden die Oberflächen im Stickstoffstrom getrocknet und für fünf Minuten in einer 2,5%-igen methanolischen APS-Lösung. Nach mehrmaligem Wa-

schen mit doppelt gereinigtem Wasser und erneutem Trocknen im Stickstoffstrom wurde die Sauberkeit vor der Probenpräparation durch eine schnelle konfokale Aufnahme überprüft.

3.6.2 Herstellung von BSA-Biotin Oberflächen

BSA-Biotin-Oberflächen wurden verwendet, um die streptavidinummantelten Quantum Dots über die extrem starke Streptavidin-Biotin-Affinität zu immobilisieren. Nach der Reinigung der hierfür verwendeten Mehrkammer-Messoberflächen (LabTeks, Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland) mithilfe einer stark verdünnten Flusssäurelösung, wiederholtem Waschen mit ddH₂O und Trocknen im Stickstoffstrom, wurden die einzelnen Kammern mit einer Lösung aus BSA und 2,5% biotinylierten BSA inkubiert [Groll 2004]. Nach ca. zwei Stunden wurde die Lösung aus den einzelnen Kammern entfernt und mehrfach mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde ohne zwischenzeitliches Trocknen die Probe appliziert. Eine schematische Darstellung der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung zeigt Abbildung 3.2.

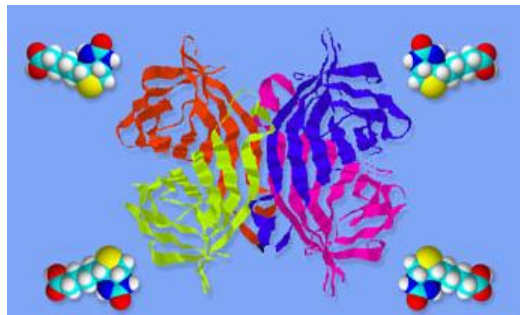


Abbildung 3.2: Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin.

3.6.3 Herstellung von Poly-L-Lysin Oberflächen

Poly-L-Lysin Oberflächen wurden im Verlauf dieser Arbeit dazu verwendet, farbstoffmarkierte *E. coli* Bakterienzellen zu immobilisieren. Hierfür wurden ebenfalls Mehrkammer-Messoberflächen verwendet, die bereits mit einer vorgefertigten biomodifizierten Oberfläche gekauft wurden (Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland). Eine vorgefertigte Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mM, Sigma-Aldrich) wurde in einer Verdünnung von 1:10 für ungefähr 10 Minuten auf der Oberfläche inkubiert. Danach wurde die Oberfläche mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei 50°C für eine Stunde getrocknet. Auf diese Weise vorbereitete Oberflächen wurden im Verlauf von 48 Stunden nach der Herstellung verwendet, längere Lagerzeiten sind nicht zu empfehlen.

3.6.4 Herstellung von PLL-g-Peg-Oberflächen

Mit diesem Poly-L-Lysin Poly-Ethylen-Glykol Kopolymer beschichtete Oberflächen wurden für FCS-Messungen mit hydrophoben Farbstoffen und hohen Proteinkonzentrationen verwendet, um eine Adsorption der verwendeten Reagenzien auf unbehandelten Glasoberflächen zu unterdrücken. Zur Herstellung dieser Oberflächen wurden die verwendeten LabTeks zunächst mit dem stark basischen Tensid Dextran (1:5 in Wasser verdünnt) für ca. 30 Minuten inkubiert. Dadurch sollten zum Einen mögliche Verunreinigungen entfernt und zum Anderen die Glasoberfläche durch Ausbildung von OH⁻-Ionen aktiviert werden. Danach wurde mit einer PLL-g-PEG-Lösung (0,1 mg/ml) für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert und mehrfach gewaschen und anschließend getrocknet. Abbildung 3.3 zeigt das Immobilisierungsprinzip schematisch.

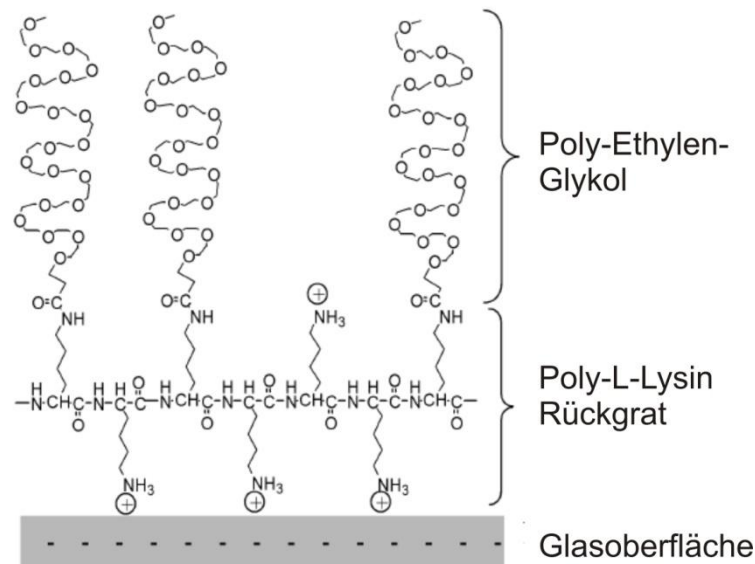


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung einer PLL-g-PEG-Oberfläche [Selhuber 2006].

Die Kopplung des Kopolymers erfolgt elektrostatisch über die positiv geladenen protonierten freien Aminofunktionen des Poly-L-Lysins auf die negativ geladene Glasoberfläche. Eine Anlagerung der Proteine auf die Oberfläche wird durch zwei Faktoren durch die nach oben stehenden Poly-Ethylen-Glykol Ketten erreicht. Zum einen ist es für Proteine sterisch kaum möglich, bis zur Oberfläche vorzudringen und zum anderen bestehen abstoßende Effekte zwischen den stark hydrophilen PEG-Fragmenten und den wässrigen „Hüllen“ der Proteine [Heuberger 2005]. Die Dicke dieser Oberflächenmodifikationsschicht beträgt 8,2 nm [Pasche 2005] und ist somit dünn genug, um davon unbeeinflusste Messungen zu erlauben.

3.7 Das ROXS-System

3.7.1 Grundprinzip

Das erst kürzlich vorgestellte ROXS-System [Vogelsang 2008] wurde eingesetzt, um ein tieferes mechanistisches Verständnis für die Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots zu erlangen. Das zu Grunde liegende Prinzip verdeutlicht Abbildung 3.4.

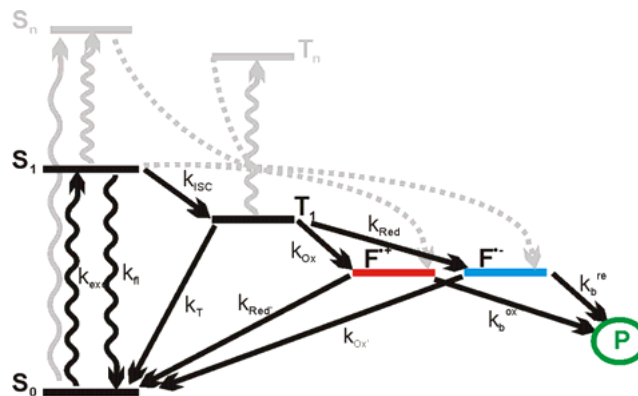


Abbildung 3.4: Funktionsweise des ROXS-Systems [Vogelsang 2008].

Nach der Anregung eines Farbstoffes gibt es verschiedene Relaxationswege (vgl. hierzu Abschnitt 2.2). Hauptursächlich für unerwünschte photophysikalische Effekte ist der Übergang des Fluorophors aus dem angeregten Singulettzustand S_1 in den Triplettzustand T_1 via Intersystem Crossing. Da Übergänge aus dem Triplettzustand in den Grundzustand des Fluorophors spinverboten sind, verweilen Farbstoffe im Allgemeinen relativ lange im Triplettzustand. In Anwesenheit des ROXS-Systems werden Fluorophore im Triplettzustand entweder durch Oxidation (Methylviologen) oder Reduktion (Ascorbinsäure oder Trolox) in die entsprechenden Radikationen F^+ oder F^- überführt, die sehr schnell durch weitere Oxidation oder Reduktion in den Grundzustand relaxieren. Die schnelle Depopulation aller angeregten Zustände wird zudem die Photozerstörung (Bleaching) der Farbstoffe deutlich reduziert.

3.7.2 Experimentelle Umsetzung

Neben dem System aus Methylviologen und Trolox zur Oxidation/Reduktion der Farbstoffe wird ein Sauerstoffabfangsystem aus Katalase, Glucose-Oxidase, TCEP und Glucose eingesetzt. Um eine höhere Stabilität des pH-Werts zu erreichen, wurde statt normalen PBS-

Puffers ein 5fach konzentrierter verwendet, da die beiden Enzyme das Maximum ihrer Aktivität im Bereich zwischen pH 6 und pH 7,5 aufweisen. Daneben wurde der verwendete Puffer durch Einleiten von Helium für etwa vier Stunden entgast, um in der wässrigen Pufferlösung gelösten Sauerstoff zu entfernen. Während der Herstellung der Gemische für die verschiedenen Experimente wurde stets unter Sauerstoffabschluss gearbeitet. Hierzu wurden alle verwendeten Gefäße bis zur Versiegelung der Probe unter einem konstanten CO₂-Strom gehalten und die vorgelösten Substanzen unter CO₂ gelagert. Nach dem Befüllen der Messkammer wurde diese sofort mit Parafilm (Pechiney Plastics Packaging Company, Chicago, USA) luftdicht verschlossen und zur Messung verbracht.

Die verwendeten Konzentrationen der einzelnen Komponenten pro Reaktionsäquivalent von 800 µl Lösung zeigt Tabelle 3.1:

Substanz	Eingesetzte Stoffmenge	Konzentration im ROXS-System
Methylviologen	0,24 mg	1 mM
Trolox	0,4 mg	2 mM
TCEP	0,24 mg	1 mM
Katalase	8 µl	8000 units
Glucose-Oxidase	8 µl	80 units
Glucose	40 mg	0,22 M
Glycerin	100 µl	
Entgaster 5x PBS-Puffer	670 µl	

Zum Einstellen der optimalen Reaktionsparameter für den jeweils verwendeten Farbstoff kann das Verhältnis aus Methylviologen und Trolox auf die jeweiligen Reduktios- bzw. Oxidationspotenziale der Farbstoffe angepasst werden.

3.8 Standardgeräte

3.8.1 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die Aufreinigung der farbstoffgekoppelten BG-Substrate erfolgt über HPLC-Anlage der Firma Agilent Deutschland GmbH (Waldbrunn, Deutschland, 1100 Serie), die zur analytischen Aufreinigung von Stoffmengen bis zu 5 nmol geeignet ist. Zur Auftrennung wurde eine Reversed-Phase Chromatographie-Säule der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Länge von 25,0 cm und einem Innendurchmesser von 4,6 mm und Octadecylsilan-Hypersil C18 Packung (Korngröße 5 μm , Porengröße 120 \AA) verwendet.

Für die Aufreinigung der Produkte wurde ein linearer Gradient verwendet.

Zeit	Fluss	Eluent
0 min	1 ml/min	100% Laufmittel A
30 min	1 ml/min	100% Laufmittel B

Tabelle 3.2: Laufmittelzusammensetzung des verwendeten HPLC-Programms

Als Laufmittel A wurden für hydrophobe Produkte 0,1 M Lösungen von Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA, pH 7,4) in Wasser verwendet. Als Laufmittel B kam eine 0,1 M Lösung von TEAA in einem Gemisch von 25% Wasser und 75% Acetonitril zum Einsatz.

Die Messung der Absorption während der Aufreinigung erfolgte sowohl bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum des Benzylguanins, als auch beim Absorptionsmaximum des jeweiligen Farbstoffes. Die Fluoreszenzanregung zur Messung der Emission erfolgte zwischen fünf und zehn Nanometern unterhalb des jeweiligen Absorptionsmaximums, um eine Überlagerung des Anregungslichts mit der am Emissionsmaximum detektierten Fluoreszenz zu vermeiden.

3.8.2 Absorptionsspektrometer

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 500 Spektrometer der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland) aufgenommen. Die Messung erfolgte in SuprasilTM-Quarzglas-

Halbmikroküvetten der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland). Die Konzentration sollte eine Konzentration von 10^{-6} M nicht übersteigen, um die Linearität des Signals, die durch das Lambert-Beersche Gesetz gegeben ist, zu gewährleisten.

3.8.3 Fluoreszenzspektrometer

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer (Varian), das zusätzlich mit einem Cary Temperatur Controller (Varian) ausgestattet ist, durchgeführt. Mithilfe der Temperaturkontrolle über das angeschlossene Peltierelement ist es möglich, die Temperatur im Probenhalter während der Messung genau festzulegen. Dies ermöglichte die Beobachtung temperaturabhängiger Phänomene.

Zur Messung wurden SuprasilTM-Quarzglas-Halbmikroküvetten der Firma Hellma verwendet. Um intermolekulare Wechselwirkungen und Reabsorptionsprozesse zu vermeiden, wurden nur Konzentrationen $< 10^{-6}$ M vermessen.

3.8.4 Fluoreszenzlebensdauerbestimmung

Fluoreszenzlebensdauern wurden mit der Methode des zeitkorrelierten Zählens einzelner Photonen (TCSPC, vergleiche hierzu Abschnitt 3.8.2) an einem Fluoreszenzlebensdauer-spektrometer Fluotime 100 Compact (PicoQuant, Berlin, Deutschland) gemessen.

In diesem Gerät erfolgt die Fluoreszenzanregung mittels LEDs (engl. Light Emitting Diode) verschiedener Wellenlängen. Es standen LEDs mit den Wellenlängen 280 nm, 370 nm, 450 nm, 500 nm und 600 nm zur Verfügung, die mit einem Pulstreiber PDL-800B mit variablen Wiederholraten von 2,5 – 40 MHz betrieben werden können. Die Intensität kann stufenlos bis auf etwa $10\mu\text{W}$ geregelt werden. Als Detektor dient ein ungekühlter PMT (engl. Photo Multiplier Tube). Im Gegensatz zum verwendeten Fluoreszenzspektrometer verfügt das Fluotime 100 nicht über eine Temperaturkontrolle, sodass Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen nicht durchgeführt werden konnten.

In dieser Arbeit wurde die Methode des zeitkorrelierten Einzelphotonenzählens (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) angewendet, um die Fluoreszenzlebenszeiten der Quantum Dots zu bestimmen.

Diese Methode beruht auf der Messung der Zeit zwischen der Anregung der Probe mit einem δ -Puls, die typischerweise innerhalb von 10^{-15} s erfolgt, und der Fluoreszenzantwort des ersten detektierten Photons, welches in der Regel innerhalb von wenigen Nanosekunden nach der Anregung eintrifft. Als δ -Puls bezeichnet man dabei einen idealisierten infinitesimal kurzen Laserpuls. Da experimentell erreichbare Laserpulse allerdings eine Pulsbreite von ungefähr 200 ps aufweisen, gilt diese Annahme nur, wenn die zu messende Lebensdauer signifikant länger ist. Ist diese Annahme für den zu untersuchenden Farbstoff zulässig, so lässt sich die Fluoreszenzlebensdauer durch eine einfache monoexponentielle Modellanpassung an die erhaltene Messkurve bestimmen.

Durch wiederholte Bestimmung ergibt sich eine Statistik, die jedoch erst dann eine Aussagekraft über die Verweildauer des Moleküls im angeregten Zustand enthält, wenn die Detektionswahrscheinlichkeit für ein Fluoreszenzphoton pro Anregungszyklus klein ist. Konzentration und Anregungsleistung sollten so eingestellt sein, dass nur bei jedem zwanzigsten Puls ein Fluoreszenzphoton gemessen wird [O'Connor 1984]. Bei zu großer Anregungsintensität trifft mehr als ein Photon pro Puls auf den Detektor. Das erste auftreffende Photon bestimmt die Lebenszeit, die bei vielen Ereignissen dadurch systematisch zu kürzeren Zeiten verschoben wird („*Pile-Up-Effekt*“) [Lakowicz 1999]. Durch zu hohe Farbstoffkonzentrationen können infolge von Reabsorptions- und Reemissionsprozessen auch zu hohe Fluoreszenzlebensdauern bestimmt werden [Hammond 1979]. Um beide Effekte zu unterdrücken, wurde deshalb immer mit Konzentrationen $< 10^{-6}$ M gearbeitet.

Da die Pulshalbwertsbreite der in dieser Arbeit benutzten LEDs mit etwa 500 ps keine idealisierten δ -Pulse erzeugen, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Moleküle in der Probe nicht immer zum gleichen Zeitpunkt angeregt werden. Deshalb lässt sich die Fluoreszenzkinetik nicht einfach aus der gemessenen Fluoreszenzabklingkurve bestimmen. Um die tatsächliche Fluoreszenzlebensdauer zu erhalten, muss die Abklingkurve entfaltet werden (Abbildung 3.5). Hierfür wird die Form des Laserpulses in einem separaten Experiment mithilfe einer Streulösung, die keine Eigenfluoreszenz zeigt, bestimmt (Gerätefunktion). Innerhalb dieser Messung werden gleichzeitig auch alle Geräteeigenschaften ermittelt. Die eigentliche Fluoreszenzantwort $F(t)$ ist also mit dem zeitlichen Profil der Anregungslichtquelle $L(t)$ gefaltet und ergibt so die gemessene Fluoreszenzabklingkurve $R(t)$:

$$R(t) = \int_0^t L(t^*) \cdot F(t - t^*) dt^*$$

Um die wahre Fluoreszenzkurve zu erhalten, werden die Parameter τ_i (Fluoreszenzlebensdauer-Komponente) und α_i (Anteil dieser Komponente an der Gesamtlebensdauer) abge-

schätzt. Durch die Berechnung des Faltungsintegrals $R_c(t)$ für die vorgegebenen Parameter und den Vergleich des

Ergebnisses mit der gemessenen Abklingkurve $R(t)$ können die Parameter variiert und das entsprechende Faltungsintegral erneut berechnet werden. Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Vorgangs wird die geringste Abweichung erreicht.

$$R_c(t) = \int_0^t L(t^*) \cdot \left[\sum_1^i \alpha_i e^{-(t-t^*)/\tau_i} \right] dt^*$$

Zur Bestimmung der besten Ausgleichskurve ist es üblich, die Chi-Quadrat-Methode (χ^2) zu verwenden, die auf der Methode der kleinsten quadratischen Abweichungen basiert, zusätzlich aber noch den Messfehler und die Anzahl der Freiheitsgrade in Betracht zieht.

$$\chi^2 = \sum_1^i \varpi_i [R_i(t) - R_c(t^*)]^2 \text{ mit dem Wichtungsfaktor } \varpi_i = \frac{1}{R_i(t)}$$

Gute Modellanpassungen erreichen χ^2 -Werte in der Größenordnung von 0,9 – 1,2.

Abbildung 3.5 zeigt modellhaft die Überlagerung einer roten LED (PLS-600, PicoQuant) mit der gemessenen Fluoreszenzabklingkurve des Farbstoffs Cy5.

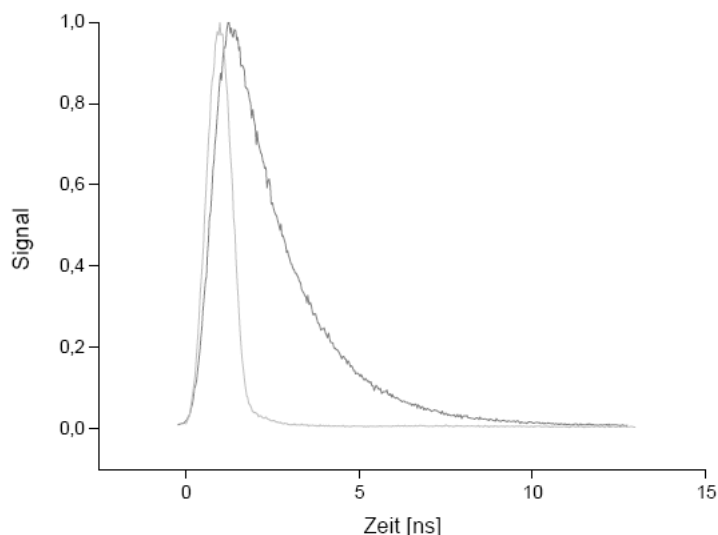


Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung einer Überlagerung der Instrumentenfunktion und der gemessenen Fluoreszenzabklingkurve des Farbstoffs Cy5.

Die oben beschriebene Auswertung wurde automatisch mit der vom Hersteller gelieferten Auswertesoftware FluoFit 4.2 (PicoQuant) durchgeführt.

Bei der Messung von Fluoreszenzlebensdauern muss darauf geachtet werden, dass die Wiederholrate des Lasers so gewählt wird, dass die Zeitspanne zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anregungspulsen deutlich länger ist, als die zu messende Fluoreszenzlebensdauer. Für organische Fluorophore mit Lebensdauern im Bereich von wenigen Nanosekunden wurde deswegen eine Wiederholrate von 40 MHz gewählt, während zur Bestimmung der Lebensdauer von Quantum Dots (50-150 ns) mit 2,5 MHz gearbeitet wurde.

3.9 Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie

3.9.1 Das Mikroskop

In diesem Abschnitt sollen die zur Aufnahme von konfokalen Bildern nötigen Komponenten und Aufbauten vorgestellt werden. Einen typischen experimentellen Aufbau zeigt Abbildung 3.6.

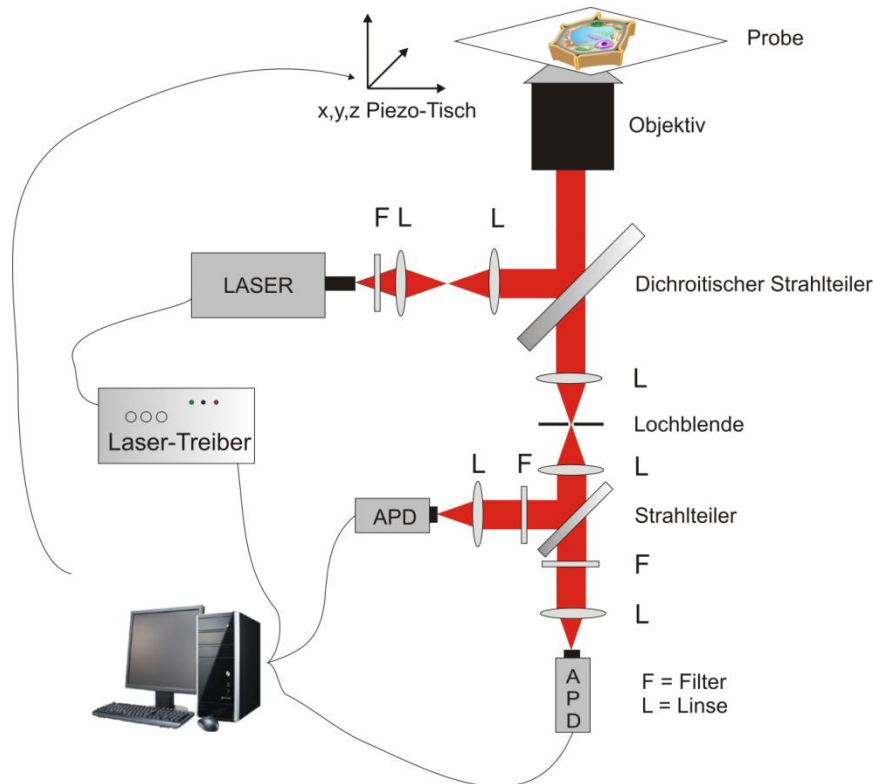


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung eines Aufbaus zur Aufnahme konfokaler Bilder.

Zur Fluoreszenzanregung dient in jedem Fall eine monochromatische Laserlichtquelle. In dieser Arbeit wurde mit einem gepulsten Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635 nm und einer maximalen Anregungsleistung von 2 mW gearbeitet (PicoQuant GmbH, Berlin, Deutschland). Das Laserlicht wird zunächst mittels eines schmalbandigen Anregungsfilters (HQ 635/10), AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland) aufgereinigt, um störende Nebenlinien des Lasers zu eliminieren. Danach erfolgt eine Aufweitung und Parallelisierung des Laserstrahls mithilfe mehrerer aufeinander abgestimmter Linsen. Über Spiegel wird der Laser danach in das Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland) eingekoppelt. Über einen dichroitischen Strahlteiler wird das Anregungslicht rückwärtig in das Mikroskopobjektiv eingestrahlt und auf die Probe fokussiert. Je nach Anwendung wurden zwei unterschiedliche Objektive verwendet. Zur Aufnahme konfokaler Bilder wurde ein Ölimmersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur gewählt (sPlan-Apo, NA 1,45, Olympus, Tokio, Japan), während zur Aufnahme von FCS-Messungen zur Vermeidung zusätzlicher Brechungsindexwechsel ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet wurde (Plan-Apo, NA 1,20, Olympus, Tokio, Japan). Das aus der Probe erhaltene Fluoreszenzlicht wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und durch den dichroitischen Strahlteiler von gestreutem Anregungslicht getrennt. Durch eine Sammellinse wird das Fluoreszenzlicht fokussiert und anschließend auf eine Lochblende (typischerweise 50 – 120 μm Durchmesser) abgebildet, um Licht aus anderen als der fokalen Ebene auszublenden. Nach der Kollimierung durch eine weitere Sammellinse trifft das Fluoreszenzlicht auf einen weiteren Strahlteiler, durch den es sowohl spektral, bei Verwendung eines Dichroits, oder gleichmäßig, bei Verwendung eines nicht-polarisierenden kubischen Strahlteilers, auf die beiden Detektoren verteilt wird. Unmittelbar vor den Lawinen-Photodioden (eng. Avalanche photo diodes, APDs) wird die Fluoreszenz mit Hilfe von achromatischen Linsen mit einer kurzen Brennweite ($f = 20 \text{ mm}$) direkt auf die aktive Fläche der APDs fokussiert. Die detektierten Photonen werden mit einer TCSPC-Karte (SPC-630 oder SPC-134, Becker&Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) im FIFO-Modus (eng. First-in First-out) verarbeitet und gespeichert. Um die Messung von Fluoreszenzlebensdauern zu ermöglichen, wurde die TCSPC-Karte zusätzlich mit dem Lasertreiber synchronisiert.

Zusätzlich war das Mikroskop mit einer Quecksilberdampf-Lampe (HBO 50 Short Arc Lamp, Osram, München, Deutschland) erweitert, um Durchlicht- und Fluoreszenzbilder der farbstoffmarkierten Zellen aufzuzeichnen. Die Aufnahme erfolgte mithilfe einer sogenannten back-illuminated EMCCD-Kamera (iXonEM, Andor, Belfast, Nordirland) und der mitgelieferten Software AndorSolis.

3.9.2 Wichtige Einzelkomponenten

Anregungslichtquellen

Zur Fluoreszenzanregung wurde hauptsächlich eine gepulste Laserdiode mit einer Wellenlänge von 635 nm verwendet, die mithilfe der Pulstreiber PDL-800B und PDL-808 „Sepia“ (PicoQuant, Berlin, Deutschland) betrieben wurde. Diese Lasertreiber erlauben die Auswahl von Wiederholraten zwischen 5 und 80 MHz und können darüber hinaus durch eine externe Pulsquelle betrieben werden. Die Anregungsleistung kann damit stufenlos auf bis zu maximal 2 mW geregelt werden. Bei 80 MHz hat diese Laserdiode eine leistungsabhängige Halbwertsbreite von 300 ps.

Neben dieser Diode standen zur Anregung weitere gepulste Diodenlaser mit 470 und 375 nm zur Verfügung. Abbildung 3.7 zeigt die zur Isolierung des Fluoreszenzlichts roter Farbstoffe verwendeten Filter und Strahlteiler.

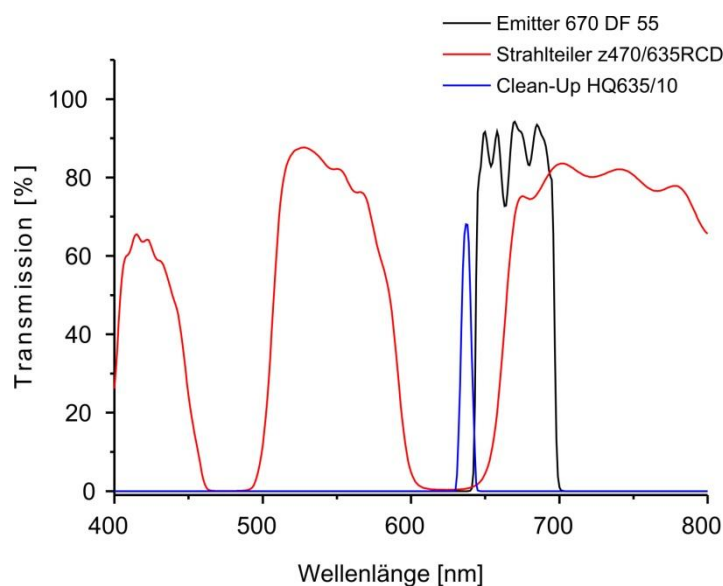


Abbildung 3.7: Zur Detektion der Fluoreszenz roter Farbstoffe verwendete Filter und Strahlteiler.

Um störende Nebenlinien der zur Anregung verwendeten Laserdiode zu entfernen wurde zunächst ein sehr schmalbandiger Clean-Up-Filter (HQ 635/10) verwendet. Über den Strahlteiler z470/635RDC wird das Anregungslicht in das Mikroskop reflektiert, während das Fluoreszenzlicht den Strahlteiler passieren kann. Vor den Detektoren kommt ein schmalbandiger Emissionsfilter zum Einsatz (HQ 670/55), der nur Licht mit einer Wellenlänge von 650 bis 700 Nanometern passieren lässt.

Detektoren

Die Detektion der Fluoreszenzphotonen erfolgte über zwei hochempfindliche Lawinen-Photodioden SPCM-AQR-14 der Firma Perkin Elmer (Massachusetts, USA). Die detektierten Photonen werden durch die Halbleiterdetektoren, deren aktive Flächen einen Durchmesser von ca. 180 μm aufweisen, direkt in Elektronen erster Generation umgewandelt. Durch diese initial entstandenen Elektronen werden weitere Elektronen angeregt, sodass am Ende eine Elektronenlawine detektiert wird, deren Signal proportional zur Lichtintensität ist. APDs zeichnen sich im Vergleich zu anderen Detektoren wie PMTs (Photo multiplier tubes) durch eine sehr hohe Empfindlichkeit aus. Im relevanten spektralen Bereich zwischen 500 und 850 nm liegt die Detektionswahrscheinlichkeit bei bis zu 65% (Abbildung 3.7). Zusätzlich zeichnen sie sich durch eine sehr niedrige Dunkelzählrate (künstliche, elektronische Signale) von weniger als 100 Hz aus. Daneben verfügen sie über sehr niedrige Totzeiten. Unter Totzeit versteht man die Zeit, in der, nach einer Photonendetektion, kein Signal wahrgenommen wird. Sie liegt für APDs im Bereich von ca. 100 ns, was theoretisch die Erfassung von Signalen bis zu einer Frequenz von 10 MHz erlauben sollte. Auf Grund von Nichtlinearitätseffekten der Totzeit bei hohen Signalen sind allerdings nur Signalfrequenzen von ca. 500 kHz realistisch.

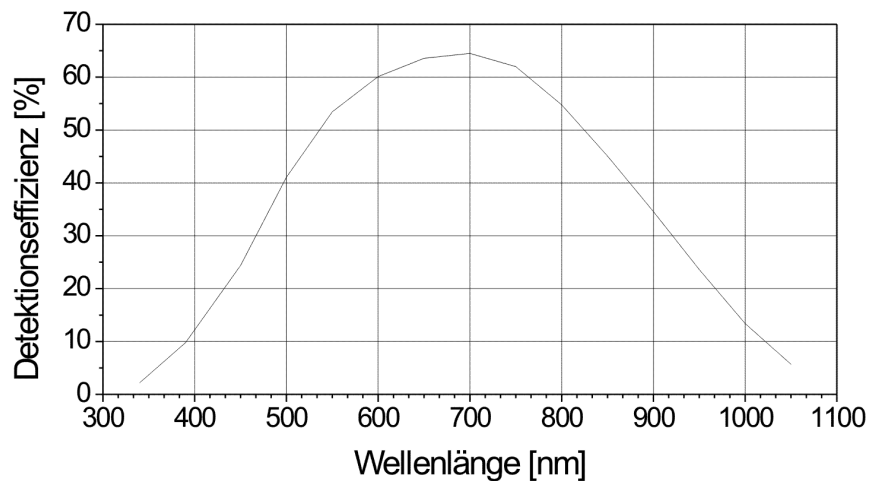


Abbildung 3.7: Detektionseffizienz einer APD des Typs AQR-14 in Abhängigkeit der Wellenlänge der zu detektierenden Photonen. Bildquelle:

http://www.lasercomponents.de/de/fileadmin/user_upload/home/Datasheets/pe/spcmaqr.pdf

Der Probenstisch

Als Probenstisch wurde ein dreidimensionaler geschlossener Piezo-Scanner P561.3CL (Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zusammen mit einem Dreikanal-Verstärker E-503.00 (PI) und einer kapazitiven Sensor-Kontrolleinheit E509.C3A (PI) verwendet. Der damit zu scannende Bereich betrug $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, der über einen linearen Spannungsanstieg von $1\ \text{V} / \mu\text{m}$ kontrolliert werden kann. Der Probenstisch wurde mittels einer PCI-6713-Karte zusammen mit der entsprechenden Software (LabView 7.0, National Instruments, USA) gesteuert und erlaubt somit, die Tischbewegung mit der Datenerfassung der Detektoren zu synchronisieren.

Zeitkorreliertes Zählen einzelner Photonen

Das zeitkorrelierte Zählen einzelner Photonen, TCSPC (eng. Time-Correlated Single Photon counting), ist eine empfindliche Methode zur Erfassung geringster Photonenintensitäten. Hierfür wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche TCSPC-Karten (SPC-630 und SPC-134, Becker&Hickl GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Im Fall gepulster Anregung wird jedes Photon mit insgesamt drei Informationen verarbeitet und gespeichert, sofern die Messkarte mit dem Lasertreiber synchronisiert ist. Da nicht nach jedem Anregungspuls des Lasers wirklich Photonen detektiert werden, arbeiteten diese Karten im inversen Modus, das heißt, dass das Signal zur Datenspeicherung nicht durch den Anregungspuls sondern durch ein detektiertes Photon gegeben wird. Insbesondere bei hohen Wiederholraten sinkt die Anzahl der notwendigen Operationen dadurch von bis zu 80 Millionen Vorgängen auf einige zehntausend pro Sekunde. Ein von der APD detektiertes Photon wird durch die Messkarte zunächst mit ihrer Makrozeit versehen, wobei es sich hierbei um die absolute Zeit seit Beginn der Messung handelt. Durch die Detektion des Photons wird durch die Messkarte zusätzlich ein Spannungssignal gestartet, das durch das nächste Signal des Lasertreibers, das die Zeit des Laserpulses repräsentiert, gestoppt. Diese Spannung wird mithilfe eines Analog-Digital-Wandlers (ADC, Analog to Digital Converter) in die Mikrozeit umgewandelt, die mit dem Zeitfenster des Zeit-Amplituden-Wandlers (TAC, Time-to-Amplitude Converter) verbunden ist. Somit entspricht die Mikrozeit der relativen Zeit der Detektion nach dem Anregungsplus. Die Größe des TAC-Fensters entspricht der Zeit zwischen zwei Anregungspulsen. Innerhalb des TAC-Fensters werden die detektierten Photonen, entsprechend ihrer jeweiligen Ankunftszeiten nach dem Laserpuls, in bis zu 4096 gleich breite Kanäle aufgeteilt (*Binning*). Da die erhaltenen Mikrozeiten über den gesamten Verlauf der Messung histogrammiert werden, lässt sich daraus aus der Entfaltung des exponentiellen Verlaufs von der Halbwertsbreite des La-

serpulses die Fluoreszenzlebensdauer bestimmen. Der inverse TCSPC-Modus wird durch die Abbildung 3.8 erläutert.

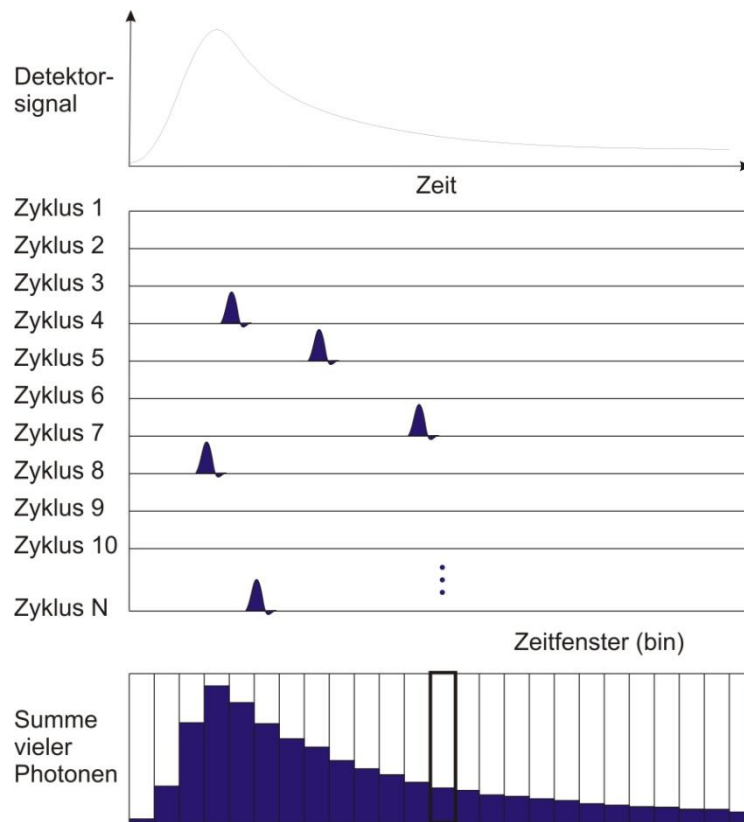


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des inversen TCSPC-Prinzips. Nur die Daten von Zyklen, in denen auch ein Photon detektiert wurde, werden verarbeitet. Die erhaltenen Mikrozeiten werden in einem Diagramm histogrammiert.

Nach jedem detektierten Photon muss dieses zunächst mit all seinen Parametern verarbeitet und gespeichert werden, bevor die Messkarte in der Lage ist, ein weiteres ankommendes Photon zu verarbeiten. Man spricht hierbei von der Totzeit, die bei modernen TCSPC-Karten, wie bei der verwendeten SPC-134, im Bereich von ca. 50 ns liegt. Sie liegt somit im Bereich der Totzeit der verwendeten APDs, sodass kein zusätzlicher Verlust an Information eintritt. Neben der Makro- und der Mikrozeit ist der spektrale Kanal (also die ursprünglich detektierende APD) der dritte Parameter, der gespeichert wird. Bei der SPC-134, die aus vier unabhängigen Messkarten besteht, wird für jede Messkarte eine eigene Datei angelegt, während dies bei älteren Einkanalkarten wie der SPC-630 nur über ein zusätzliches Modul, einen Router, bewerkstelligt werden kann. Da der Router eine Totzeit von ca. 500 ns nach der Detektion eines Photons aufweist, sinken die maximal möglichen Signalintensitäten in diesem Fall ungefähr um den Faktor zehn.

3.9.3 Hardware-Korrelator-Karte ALV5000/E

Die Fluoreszenz-Korrelations-Messungen wurden mit einer ALV5000/E-Karte von der ALV-Laser Vertriebs GmbH (Langen, Deutschland) aufgenommen und mit der mitgelieferten Software korreliert (Version 1.4.9). Die Karte ermöglicht es, zwei Kanäle mit theoretischen maximalen Zählraten von 125 MHz aufzunehmen und über Autokorrelation oder Kreuzkorrelation zu analysieren.

Zur Datenakquisition wurden typischerweise drei unmittelbar aufeinander folgende Messungen mit einer Messdauer von jeweils bis zu 5 Minuten durchgeführt, um glatte und wenig verrauschte Daten zu erhalten. Diese unabhängigen Messungen wurden bereits während der Datenaufnahme durch die Software der Korrelatorkarte gemittelt. Die erhaltenen Daten konnten als ASCII-Dateien abgespeichert werden und mithilfe des Analyseprogramms Origin in der Version 7.5 ausgewertet werden. Zur Modellanpassung der erhaltenen Kurven wurde folgende Formel verwendet (vgl. hierzu Abschnitt 2.2.4)

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_d}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_1}{\omega_2}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

Mithilfe dieser Formel wurden die erhaltenen Messdaten an ein Modell dreidimensionaler Diffusion unter Berücksichtigung einer schnellen Triplettkinetik angepasst. Auch bei dieser Anpassung wurde die bereits oben erwähnte Chi-Quadrat-Methode (χ^2) zur Abschätzung der Qualität der Anpassung verwendet.

3.10 Software

Neben den bereits in den vorhergehenden Abschnitten erwähnten kommerziell erhältlichen Programmen wurden weitere, in der Arbeitsgruppe entwickelte Programme verwendet. Die im Folgenden beschriebenen in LabView 7.1 entwickelten Programme wurden mehrheitlich von Dr. Dirk-Peter Herten und Dr. Christian Roth entwickelt, notwendige Anpassungen auf modernere Hardware-Komponenten wurden von Haisen Ta vorgenommen. Die folgende Tabelle fasst die verwendeten, kommerziell erhältlichen Programme zusammen.

Software	Hersteller
Origin 7.5 und 8.0	Microcal, Northhampton, USA.
Andor-Solis	Andor, Belfast, Nordirland.
FluoFit 4.2	PicoQuant, Berlin, Deutschland
Image J 1.4	NIH, USA
LabView 7.1	National Instruments, Austin, Texas, USA

3.10.1 DAQLinescan (Datenaufnahme)

Das Programm DAQLinescan wurde sowohl zur Aufnahme von Fluoreszenzintensitätsbildern als auch zu Messungen von Fluoreszenzintensitätsspuren (über das Programmmodul DAQ-Fifo) verwendet.

Das Programm ermöglicht es, alle im vorherigen Abschnitt vorgestellten elektronischen Bauteile unter einer einzigen Bedienoberfläche zu verwenden und sorgt für die Synchronisierung der xyz-Verschiebeeinheit mit der TCSPC-Karte.

Je nach verwendetem Tisch erfolgt das Abrastern der Oberfläche entweder in diskreten Schritten (Piezo-Tisch, Physikalische Instrumente) oder in einer konstanten Bewegung (Queensgate Instruments, Torquay, Vereinigtes Königreich). In beiden Fällen wird der Impuls hierfür durch die Software durch eine Spannungsänderung gegeben, die dann in den entsprechenden Steuermodulen der Verschiebeeinheiten verarbeitet wird.

In der Messsoftware selber kann die räumliche Bildauflösung eingestellt werden. Zwar ist die tatsächliche räumliche Auflösung in lateraler Ebene für ein konfokales Fluoreszenzmikroskop durch das Abbé-Kriterium festgelegt. Trotzdem ist es zweckdienlich, während der Messung

deutlich kleinere Schritte pro Pixel einzustellen. Zur Aufnahme konfokaler Bilder werden normalerweise Schrittweiten von 50 – 100 nm pro Pixel gewählt, da auf diesem Wege detailliertere Abbildungen erhalten werden. Eine *E. Coli* Bakterienzelle wird dadurch mit einer Größe von 1 x 2 µm mit 20 x 40 Pixeln dargestellt. Bei einer Anpassung der Schrittweite an die optische Auflösung würden Abbildungen mit ungefähr 3 x 6 Bildpunkten erhalten werden, deren Interpretation sehr schwierig wäre.

Ein weiterer regulierbarer Parameter ist die zeitliche Verweildauer pro Bildpunkt. Für die Aufnahme von konfokalen Fluoreszenzintensitätsbildern wird diese zumeist auf 2 ms pro Bildpunkt eingestellt, was einen guten Kompromiss zwischen Messdauer und Bildqualität darstellt. Kürzere Integrationszeiten führen zu deutlich verrauschten Aufnahmen, während längere Integrationszeiten zwar „glattere“ Abbildungen erzeugen, diesen Vorteil allerdings nur mit dem Preis deutlich erhöhter Messzeiten erreichen. Sollen die gemachten Aufnahmen später mit dem Verfahren der bildgebenden Fluoreszenz-Korrelation-Mikroskopie (DIFIM, vgl. Abschnitt 3.10.3) ausgewertet werden, dann müssen deutlich erhöhte Integrationszeiten gewählt werden. Je nachdem auf welcher Zeitskala die Diffusion verfolgt werden soll, muss mindestens die zehnfache Verweilzeit pro Bildpunkt gewählt werden.

3.10.2 ANALinescan (Datenauswertung)

Zur Auswertung der, mit dem Programm DAQLinescan erhaltenen, Daten wurden diese in das Analyseprogramm ANALinescan eingelesen. Dabei ist es möglich, sowohl die spektrale Verteilung bei Verwendung eines dichroitischen Strahlteilers (F_2 -Wert) als auch die Fluoreszenzlebensdauer für jeden einzelnen Bildpunkt zu bestimmen und in eigenen Bildern auszugeben. Der F_2 -Wert berechnet sich aus dem Verhältnis des Fluoreszenzsignals auf der kurzwelligeren APD zu der Gesamtfluoreszenzintensität auf beiden Kanälen:

$$F_2 = \frac{I_2}{I_1 + I_1}$$

Die Fluoreszenzlebensdauer wird in sehr guter Näherung mit einem monoexponentiellen *Maximum Likelihood Estimator* bestimmt.

Auf eine wichtige Erweiterung dieses Programms, die bildgebende Diffusionsmikroskopie, soll im folgenden Absatz gesondert eingegangen werden.

3.10.3 Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM)

Da sich der Begriff des Bildpunktes, oder Pixel, in der Mikroskopie sich hauptsächlich auf Messungen mit CCD-Chips bezieht, soll dieser im Zusammenhang mit der Auswerterroutine der DIFIM-Technik kurz definiert werden. Im Gegensatz zu kameragestützter Detektion, wo die Größe eines Bildpunktes durch die Art des verwendeten CCD-Chips vorgegeben ist, ist die Größe eines Bildpunktes bei der Datenakquise mit Hilfe von APDs oder PMTs abhängig von den, in der Messsoftware eingestellten Parametern. Die Größe eines Bildpunktes ist gegeben durch die Schrittweite der Piezo-Verschiebeeinheit, mit der die Probe über dem Laserfokus verfahren wird. Wird z. B. entlang einer Achse von 10 μm gerastert und eine Schrittweite von 50 nm eingehalten, so besteht die Bildzeile aus 200 einzelnen Bildpunkten. Im Prinzip entspricht jeder einzelne Bildpunkt einer (sehr kurzen) Fluoreszenzintensitätsspur, deren Länge ebenfalls über die Messsoftware gesteuert werden kann. Typische zeitliche Verweildauern liegen im Bereich von 2 ms pro Bildpunkt für die Aufnahme bis hin zu über 100 ms für die Aufnahme von DIFIM-Aufnahmen.

Die Methode der bildgebenden Diffusionsmikroskopie wurde von Dr. Christian Roth und Dr. Dirk-Peter Herten entwickelt und in die Auswertesoftware ANALinescan integriert [Roth 2006, 2007]. Mit ihr ist es möglich, die verschiedenen Techniken der bildgebenden konfokalen Mikroskopie (SFLIM) und der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie miteinander zu verbinden und somit Heterogenitäten in der Diffusionsgeschwindigkeit in lebenden Zellen oder Bakterien orts aufgelöst wiederzugeben. Eine typische Apparatur zur Aufnahme von DIFIM-Messungen zeigt Abbildung 3.6, das hierbei zu Grunde liegende konfokale Prinzip zeigt Abbildung 2.9.

Um Daten dieser besonderen Form der Auswertung zukommen zu lassen, ist es nötig, während der Messung bereits einige Parameter zu beachten. Zum einen lassen sich DIFIM-Messungen nur an Probenstischen durchführen, die die Strecke innerhalb einer Bildzeile in diskreten Schritten zurücklegen. Bei Verwendung eines Tisches, der sich kontinuierlich bewegt, würde diese Bewegung zu Artefakten in der Bestimmung von Diffusionskonstanten führen, da die intrinsische Bewegung der Probe mit der zu untersuchenden Diffusion überlagert. Da sich die interessierenden Diffusionszeiten in lebenden Systemen in der Regel zwischen 0,1 und 10 Millisekunden befinden, bedeutet dies auch, dass die Messdauer pro Pixel mindestens 25 ms oder besser noch 100 ms betragen sollte, damit diese Zeiten überhaupt in der Korrelationsfunktion beobachtet werden können. Somit ergeben sich relativ lange Messzeiten zur Aufnahme eines DIFIM-Bildes. Diese liegen zwischen acht Minuten zur Messung

einer *E.-Coli*-Bakterienzelle und mehr als einer Stunde, wenn eine komplette eukaryontische Zelle untersucht werden soll.

Abbildung 3.9 zeigt die Auswerterroutine der bildgebenden Diffusionsmikroskopie schematisch.

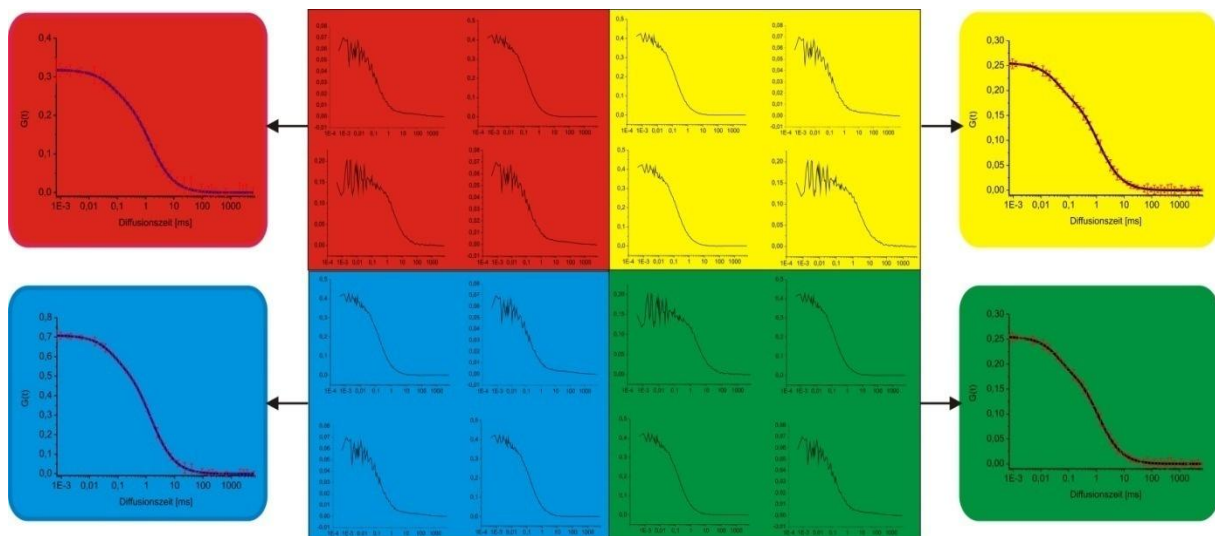


Abbildung 3.9: Schematisch Darstellung der DIFIM-Auswertungsmethode: Für jeden Bildpunkt wird zunächst die Fluoreszenzintensitätsspur bestimmt und anschließend einer Autokorrelation unterworfen. Da, auf Grund der recht kurzen Messdauern pro Bildpunkt, nur sehr niedrige Photonstatistiken zur Verfügung stehen, werden die Autokorrelationen von vier benachbarten Bildpunkten zusammengefasst und nur an die resultierende durchschnittliche Autokorrelationskurve wird eine Modellfunktion zur zweidimensionalen Diffusion angepasst.

Zunächst wird aus jedem einzelnen Bildpunkt die Fluoreszenzintensitätsspur extrahiert und einer autokorreliert. Vier Autokorrelationen benachbarter Bildpunkte werden zusammengefasst, um eine ausreichende Photonstatistik zu erhalten und anschließend eine Modellfunktion der zweidimensionalen Diffusion an die experimentellen Daten angepasst. Das zweidimensionale Modell wurde gewählt, da die Anpassung deutlich schneller und weniger fehleranfälliger ist als für komplexere Modelle, die eine freie dreidimensionale Diffusion und einen Triplett-Term beinhalten. Außerdem zeigten vergleichende Auswertungen, dass die Unterschiede in den erhaltenen Diffusionszeiten nur relativ gering sind [Herten 2008b].

Für Messungen, in denen nur mittlere Fluoreszenzintensitäten auftreten, ist die Zusammenfassung benachbarter Bildpunkte für die Auswertung unumgänglich, da, insbesondere bei längeren Lag-times, zu niedrige Photonstatistiken keine sinnvollen Modellanpassungen ermöglichen. Allerdings geht mit dieser Prozedur ein großer Auflösungsverlust einher, da die

Bilder der Diffusionszeit und der Amplitude lediglich 25 % der Bildpunkte des konfokalen Originalbildes aufweisen. Treten hohe Fluoreszenzintensitäten auf kann auf die Zusammenfassung verzichtet werden und die Auswertung verläuft, wie in Abbildung 3.10 schematisch gezeigt.

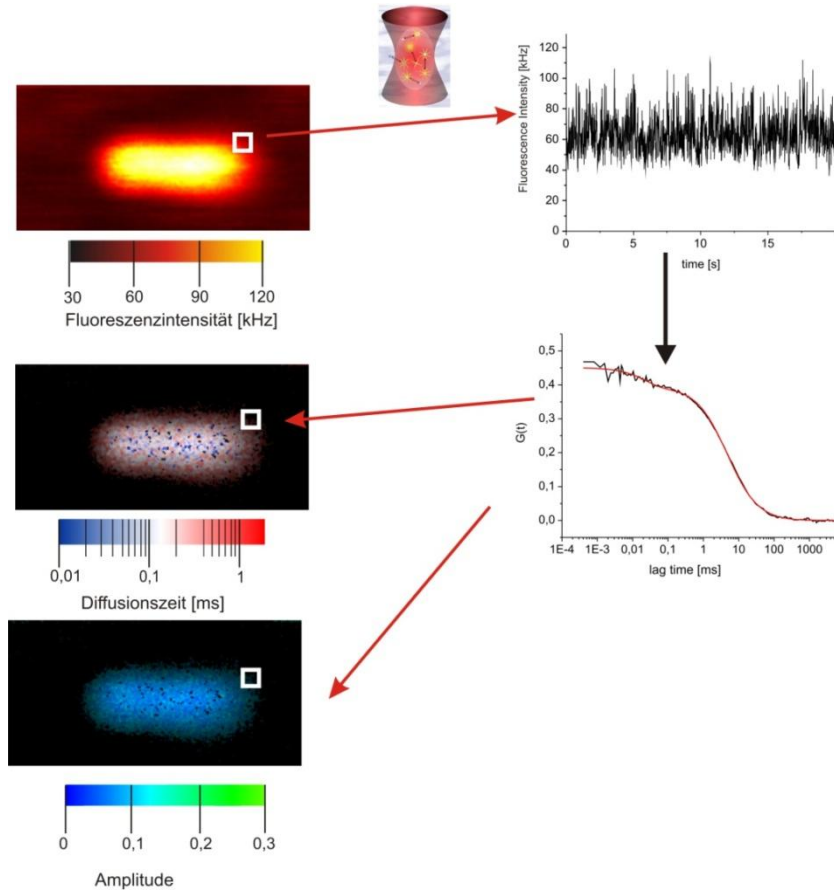


Abbildung 3.10: Schematischer Ablauf einer DIFIM-Auswerterroutine. Zunächst werden die einzelnen Photonen jedes Bildpunktes extrahiert und zu einer Fluoreszenzintensitätspur zusammengefasst. Danach erfolgen die Autokorrelation und die Modellanpassung. Aus den dort erhaltenen Parametern Diffusionszeit und Amplitude der Aufbau eines künstlichen Bildes, das jeweils nur diese Informationen enthält.

In diesem Fall wird jeder Bildpunkt des Fluoreszenzintensitätsbildes 1:1 in einem Bildpunkt des Diffusionszeit- und Amplitudenbildes umgewandelt.

4. Experimente und Ergebnisse

4.1. Spektroskopische Untersuchung von fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots)

Bevor in diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit umfangreiche Experimente zur Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften von Quantum Dots vorgestellt und diskutiert werden sollen, werden zur Einleitung dieses Themas kurz einige Experimente vorgestellt, die den Anlass für die folgende Charakterisierung lieferten. Spektral trennbare Quantum Dots sollten zur Abstandbestimmung mit Hilfe einer doppelsträngigen DNA verwendet werden. Dank ihrer Länge von exakt 3,4 Nanometern pro 10 Basenpaaren ist doppelsträngige DNA ideal als mikroskopisches Lineal geeignet, mit dem Methoden zur Abstandsmessungen für den Bereich von 5 – 20 nm etabliert und geeicht werden können.

4.1.1 Kolokalisationsexperimente mit Quantum Dots

In der Arbeitsgruppe von Prof. Sauer wurde ein Verfahren entwickelt, das es ermöglicht, Abstände zwischen fluoreszenten Markern zu bestimmen, die im Bereich der optischen Auflösungsgrenze liegen [Müller 2003]. Abstände im Bereich von unter zehn Nanometern lassen sich heutzutage relativ einfach mit Hilfe von *single-pair* FRET-Messungen bestimmen, da der Energietransfer zwischen einem Donor- und einem Akzeptorfarbstoff sehr stark abstandsabhängig ist ($1/r^6$). Somit lässt sich über die gemessene FRET-Effizienz der Abstand zwischen beiden Fluorophoren mit sehr großer Genauigkeit bestimmen [Lacoste 2000].

Die Auflösung konfokaler Mikroskope hingegen ist nach Abbe abhängig von der Wellenlänge der Anregung und der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs. Selbst unter Verwendung perfekter optischer Bauteile ohne sphärische oder chromatische Aberrationen ergibt sich dadurch bei Anregung mit einer 635 nm Laserdiode ein maximales laterales Auflösungsvermögen von 240 nm, axial können zwei unabhängige Punktlichtquellen erst ab einem Abstand von 420 nm aufgelöst werden.

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte dabei erreicht, diese Auflösungslücke zu schließen. So wurden zum Beispiel die 4PI-Spektroskopie [Hell 1995] und die STED-

Mikroskopie entwickelt [Wichmann 1994, Klar 2000], mit deren Hilfe eine deutlich schmalere Punktabbildungsfunktion erhalten werden kann, was niedrigere Auflösungsgrenzen ermöglicht. Moderne stochastische Methoden wie STORM und PALM sind ebenfalls in der Lage, hoch aufgelöste Aufnahmen zu erzeugen. Dabei spielen allerdings die Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe eine große Rolle. Durch diese spektroskopischen Methoden war es möglich, die laterale optische Auflösung auf etwa 30 Nanometer zu verbessern.

Nachdem die eingangs erwähnte Kolokalisationsmethode mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen etabliert worden war [Heinlein 2004], sollte versucht werden, diese durch die Verwendung von Quantum Dots weiter zu verbessern. Da zur Auswertung hohe Photonenzustatistiken benötigt werden, bietet sich die Verwendung von Quantum Dots auf Grund ihrer außergewöhnlichen spektroskopischen Eigenschaften an. Insbesondere ihre hohen Extinktionskoeffizienten und die nahezu unbegrenzten Beobachtungszeiten durch ihre intrinsische Photostabilität sind hier besonders nützlich.

Da es der, der Methode zu Grunde liegende, Algorithmus verlangt, dass die verwendeten Fluorophore sowohl über ihre Fluoreszenzlebensdauer als auch ihre spektrale Verteilung auf die Detektionskanäle eindeutig voneinander diskriminierbar sind, wurden die Quantum Dots zunächst diesbezüglich charakterisiert. Die Auswertung von jeweils ca. 200 Einzelmolekülfluoreszenzspuren zweier unterschiedlicher Quantum Dots, zeigte, dass diese prinzipiell sehr gut geeignet sein sollten (Vgl. Abbildung 4.1.1).

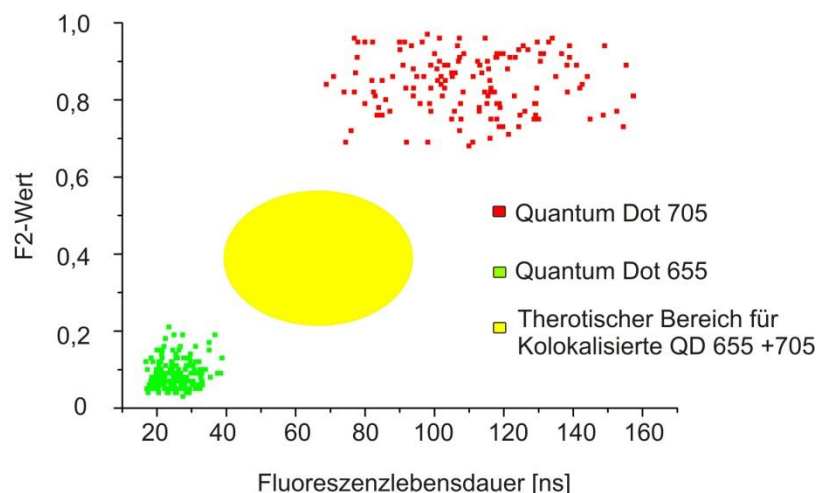


Abbildung 4.1.1: Charakterisierung der verwendeten Quantum Dots. Sowohl über die Fluoreszenzlebensdauer als auch die spektrale Verteilung (F2-Wert) ist eine Diskriminierung gut möglich.

Zwar ist die Verteilung, insbesondere für Cadmiumtellurid Quantum Dots 705, relativ breit, trotzdem liegen die beiden Population soweit auseinander, dass sie eindeutig voneinander zu trennen sind. Kolokalisierte Quantum Dots, deren Lage in diesem Diagramm ungefähr in dem gelben Bereich erwartet wird, lassen sich eindeutig von den einzelnen Quantum Dots unterscheiden. Die Kolokalisation sollte zunächst mit einem definierten System durchgeführt werden. Als Modell wurde ein 70 Basen lange Doppelstrang-DNA gewählt, die jeweils am 5'-Ende mit einem der beiden Quantum Dots markiert werden sollte. Um das Problem der stöchiometrischen Markierung von Quantum Dots zu umgehen, wurde ein relativ komplexer Markierungsmechanismus mit mehreren Reaktionsschritten gewählt, die jeweils theoretische Ausbeuten von bis zu 90 % in Bezug auf das eingesetzte Oligonukleotid erreichen. Das führt zu Gesamtausbeuten von 40 – 60 % und erlaubt theoretisch eine Einfachmarkierung der Quantum Dots (vgl. Abbildung 4.1.2).

Hierzu wurde ein Oligonukleotid, welches sowohl mit Biotin als auch mit einem Aminolinker funktionalisiert war, zunächst mit dem bifunktionellen Crosslinker SMCC umgesetzt. Die Reaktion erfolgt hierbei zwischen der Aminofunktion am Oligonukleotid und dem NHS-Ester des Crosslinkers. Nach einer Aufreinigung über Massenausschlusschromatographie wurde das Kopplungsprodukt mit einer speziellen Peptidsequenz, einem Hexa-Histidin-Tag zur Reaktion gebracht. In diesem Schritt reagierte die Maleimidfunktion des Crosslinkers mit der SH-Gruppe eines Cysteins im Peptid. Danach wurden die entsprechenden Quantum Dots in überstöchiometrischen Mengen hinzugegeben, um Mehrfachmarkierungen zu vermeiden.

Danach wurde das Kopplungsprodukt über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die beiden Einzelstränge wurden dann hybridisiert und sofort zur Messung vorbereitet.

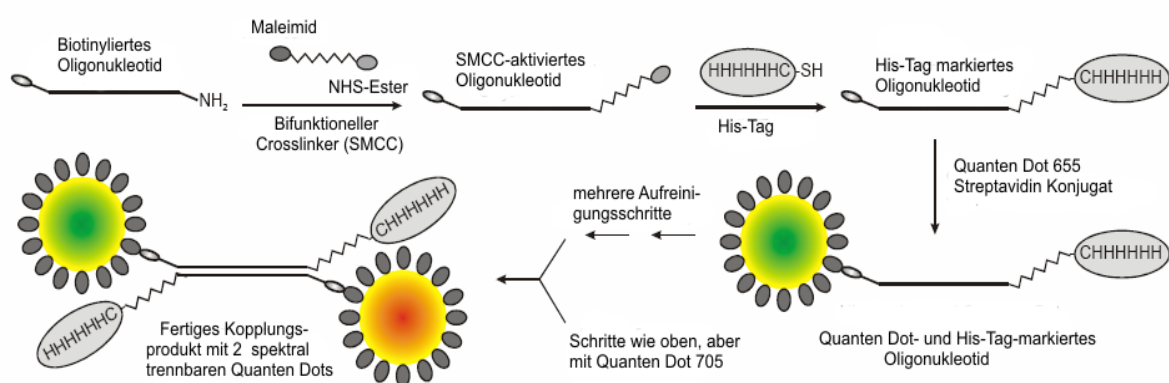


Abbildung 4.1.2: Reaktionsschema der Kopplungsschritte.

Bei den anschließenden mikroskopischen Messungen stellte sich dann allerdings heraus, dass die Quantum Dots nach dieser Kopplungsprozedur, nur noch sehr niedrige Signalintensitäten, zumindest im Vergleich zur den Aufnahmen ungekoppelter Quantum Dots, aufwie-

sen. In der Abbildung 4.1.3 ist auf der linken Seite die Fluoreszenzintensitätsaufnahme freier Quantum Dots gezeigt, während rechts die Kopplungsprodukte dargestellt sind.

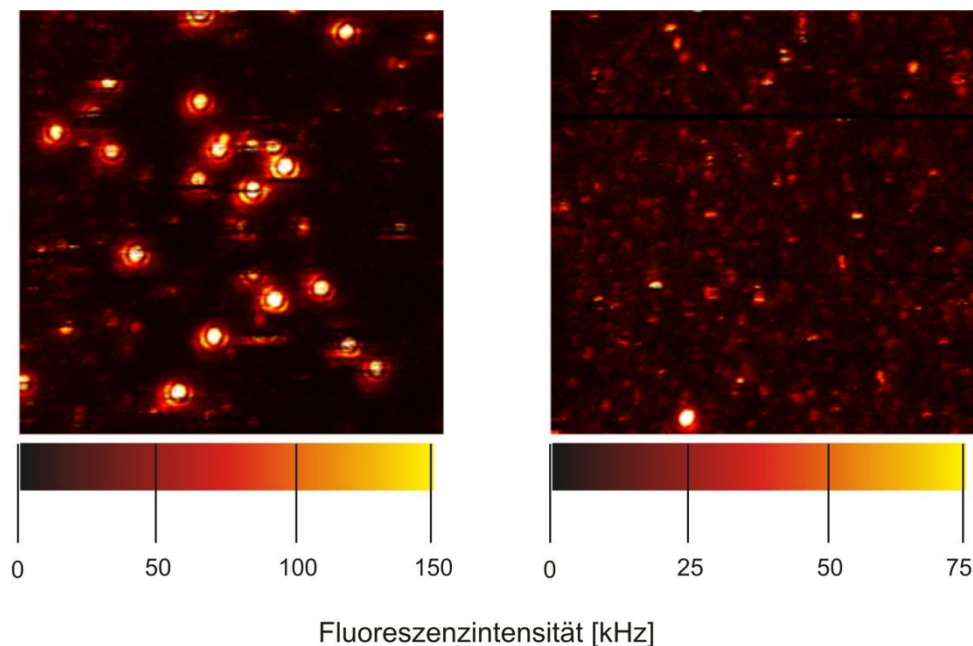


Abbildung 4.1.3: Konfokale Aufnahmen un behandelter Quantum Dots (links) und gekoppelter Quantum Dots (rechts). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität um mehr als 50 % abgenommen hat. Beide Aufnahmen $10 \times 10 \mu\text{m}$, Anregung 635 nm @ $15 \mu\text{W}$.

Neben der deutlich niedrigeren Fluoreszenzintensität, zeigt sich, dass die allermeisten Quantum Dots lediglich kurzzeitig fluoreszieren (erkennbar durch das sehr „fleckige“ Aussehen der fluoreszenten Spots).

Um die vielschrittige Kopplungsreaktion als Ursache diese unbefriedigenden Ergebnisse ausschließen zu können, wurden zahlreiche Variationen der Parameter fast aller Reaktionsschritte durchgeführt, um sichergehen zu können, dass das Problem nicht in der Kopplungsreaktion selber zu suchen ist. Dabei konnten weder eine Umkehrung der Reaktionsreihenfolge des Crosslinkers, noch der Umstieg auf Einschrittreaktion, der sofortigen Umsetzung der Zwischenprodukte ohne langwierige Aufreinigungsschritte, einen positiven Effekt auf die erhaltenen Ergebnisse aufweisen. Da auch eine behinderte Hybridisierung der DNA-Stränge durch die Anwesenheit der sehr voluminösen Quantum Dots nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden auch die Bedingungen der DNA-Einzelstranghybridisierung variiert. Allerdings brachten weder eine Änderung der Hybridisierungstemperatur in mehreren Schritten zwischen Raumtemperatur und einer Maximaltemperatur noch eine Verlängerung der Hybridisierungszeit auf bis zu 15 Stunden einen signifikanten Vorteil.

Zwar wurden vereinzelte Spots aufgefunden, die nur durch Kolo kalisation beider Quantum Dots entstanden sein können, allerdings lag deren Anteil bei weit unter einem Prozent aller

untersuchten Spots. Ein Beispiel dafür zeigt Abbildung 4.1.4.

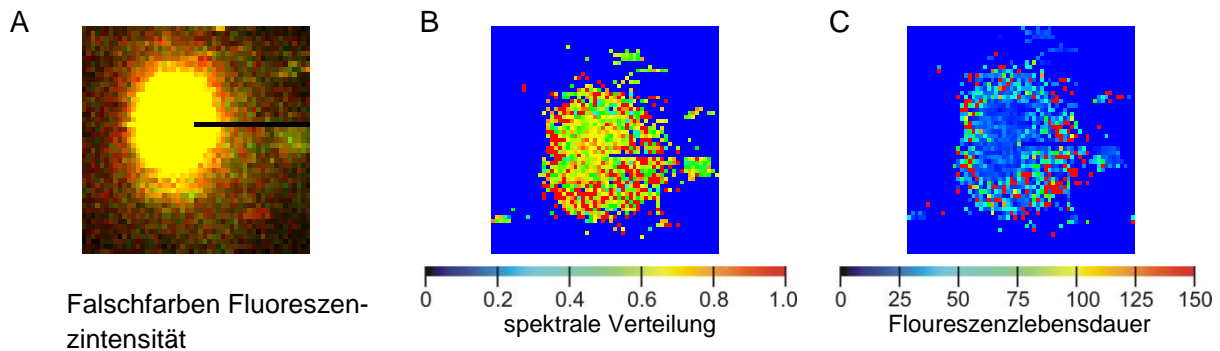


Abbildung 4.1.4: Falschfarbenbild der Fluoreszenzintensität (A), Darstellung der spektralen Verteilung auf den Detektionskanälen (B) und der Fluoreszenzlebensdauer (C).

Aus dem Falschfarbenbild (A) lässt sich erkennen, dass in diesem fluoreszierenden Bereich beide Quantum Dots vorhanden sein müssen. Die Kodierung der einzelnen Detektionskanäle ist grün und rot, d. h. lediglich eine relativ gleichmäßige Verteilung des Signals auf beiden Kanälen kann demnach zu einem gelben Spot führen. Deutlich zeigt dies auch die Darstellung der spektralen Verteilung (B), die zwischen den erwarteten Resultaten für einzelne Quantum Dots liegt. Auch das Fluoreszenzlebensdauerbild (C) zeigt sowohl das Vorhandensein einer kurzen ($\sim 25\text{-}50\text{ ns}$) als auch einer langen Fluoreszenzlebensdauerkomponente an ($125\text{ - }150\text{ ns}$). Vergleiche Hierzu auch Abbildung 4.1.1.

Insgesamt musste festgestellt werden, dass die Kolokalisation von Quantum Dots auf dem angestrebten Weg nicht möglich ist, da unter den Messbedingungen eine starke Beeinträchtigung der Fluoreszenz der Quantum Dots auftritt. Erst die Durchführung eines Stern-Volmer-Experiments (vgl. Abbildung 4.1.5) mit dem Quantum Dot 655 und dem Monophosphat der Nukleo-Base Cytosin ergab einen ersten Hinweis auf die Ursache und leitete damit den folgenden Abschnitt, „die Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften von Quantum Dots“ ein. Erstmals wurde eine Vielzahl relevanter Verbindungen auf ihren Einfluss auf die Quantum Dots Fluoreszenz hin untersucht, eine mögliche Modellvorstellung zum Mechanismus der Fluoreszenzlöschung abgeleitet und eine Methode gefunden, das beobachtete Quenching weitestgehend zu unterdrücken.

Abbildung 4.1.5 zeigt den Verlauf der Emissionsspektren des Quantum Dot 655 bei steigenden Konzentrationen des Fluoreszenzlöschers dCMP; mit jeder Steigerung der Konzentration sinkt die beobachtete Fluoreszenzintensität kontinuierlich ab.

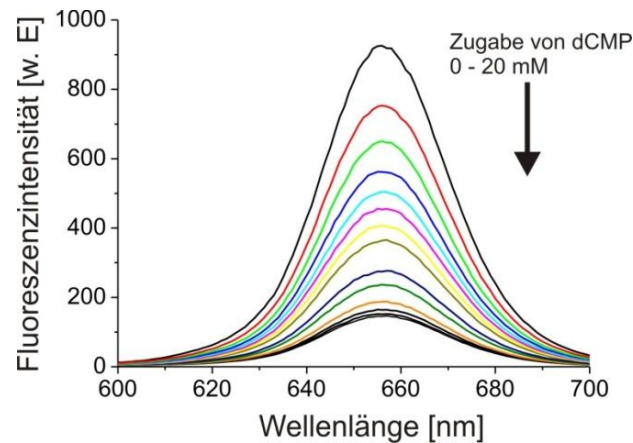


Abbildung 4.1.5: Stern-Volmer-Experiment des Quantum Dot 655 mit dem Monophosphat der Nukleo-Base Cytosin. Bei Zugabe der Base kommt es zu einem signifikanten Abfall der Fluoreszenzintensität.

Die Löschung der Fluoreszenz organischer Farbstoffe durch verschiedene stickstoffhaltige Löschmoleküle ist in der Literatur hinreichend bekannt. Insbesondere die Monophosphate der 4 Nukleobasen Adenin, Guanosin, Cytosin und Thymin sind hierzu in den letzten Jahren ausführlich in ihrer Wirkung auf Farbstoffe mit Cumaringrundgerüst charakterisiert worden [Seidel 1995]. Für die Löschung von konventionellen Farbstoffen wird eine Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von den jeweiligen Redoxpotenzialen sowohl der Löschmoleküle als auch der Farbstoffe postuliert. C. Seidel berichtet über die Zunahme der Oxidationspotenziale in wässriger Lösung ($\text{pH } 7$) von dGMP ($1,29 \text{ V}$) über dAMP ($1,39 \text{ V}$) und TMP ($1,49 \text{ V}$) nach dCMP ($1,64 \text{ V}$) [Seidel 1992, Sauer 1995]. Die Fluoreszenzlöschung findet über einen Elektronentransfer-Mechanismus statt, weshalb die Zunahme der Redoxpotenziale mit einer Abnahme der Fluoreszenzlöschung einhergehen sollte. Neben den Monophosphaten der Nukleobasen wurden auch Tryptophan und weitere Aminosäuren auf ihr Lösungsverhalten untersucht [Vaiana 2003].

Für Quantum Dots hingegen besteht diesbezüglich noch Klärungsbedarf. Bekannte Phänomene beschreiben eine effektive Fluoreszenzlöschung in Verbindung mit kleinen Metallclustern aus Gold- [Nikoobakht 2002, Goueroui 2004], Silber- und Kupfer-Ionen. In den letzten Jahren wurden außerdem verschiedene Sonden entwickelt, die eine direkte Beziehung zwischen der Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots und der Konzentration von Schwermetallionen wie Gold [Zhang 2008], Quecksilber [Xia 2008] oder Silber [Liang 2004] zeigen.

Auch für verschiedene wichtige organische Substanzen konnten in den letzten Jahren Sensorsysteme über die Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots etabliert werden, so wurde zum Beispiel ein Sensor-System für Cyanide in wässriger Lösung entwickelt, das durch Abfangen löschender Schwermetallionen zu einem Fluoreszenzanstieg der Fluoreszenz führt [Touceda-Varela 2008]

Allerdings lassen diese Ergebnisse noch keine allgemeinen Interpretationen zu, da insbesondere bei der Verwendung von Goldclustern z. T. sehr widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden. So wurde z. B. von einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenzintensität von einzelnen Quantum Dots berichtet, die auf Gold-Kolloiden abgelegt wurden. Als Grund hierfür wurde ein stärkeres lokales Magnetfeld angeführt, dass durch die Gold-Atome verursacht wird. Andere Autoren wiederum verweisen auf deutliche Unterschiede, die durch die Form und Größe der Cluster gegeben sind [Nikoobakht 2002].

Löschphänomene mit stickstoffhaltigen Verbindungen wurden bisher nur in wenigen Fällen untersucht. Besonders interessant erscheinen hierbei die Ergebnisse von Sharma *et al.*, die Untersuchungen mit p-Phenylendiamin (PPD) und n-Butylamin (nBA) durchgeführt haben. Im Fall von PPD wurde ein sehr starkes Löschverhalten beobachtet, während nBA in geringen Konzentrationen zu einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenz führt [Sharma 2003]. Argumentiert wurde hier mit den unterschiedlichen Redoxpotenzialen der beiden Amine (PPD > 0,26 V; nBa > 1,9 V jeweils gegen NWE), die es dem PPD erlauben, freie Ladungsträger (Löcher) des photoangeregten Quantum Dot abzufangen, während nBA dazu nicht in der Lage ist.

Die Fluoreszenzerhöhung durch nBA wurde dadurch erklärt, dass es im Stande ist, die Oberfläche des Quantum Dot zu passivieren und somit die strahlungslosen Relaxationswege unterdrückt. Aktuelle Veröffentlichungen zeigten, dass die Fluoreszenzlöschung zumindest teilweise von der Dicke des organischen Polymers TOPO abhängig ist, das den Halbleiterkern umgibt [Heafey 2007].

Einen anderen, sehr interessanten Effekt beschreibt die Gruppe von Thomas Nann. Hier wurde eine Verschiebung der Quantum Dot Fluoreszenz zu kürzeren Wellenlängen beobachtet, nachdem die Nanokristalle mit bestimmten Geweben von *Arabidopsis thaliana* hybridisiert wurden. Allerdings konnte die Ursache dieses Phänomens bisher noch nicht abschließend geklärt werden [Riegler 2008].

Schwierigkeiten bei der Einordnung und der Vergleichbarkeit der bisherigen Ergebnisse ergeben sich aus der Tatsache, dass die meisten Autoren mit selbst hergestellten Quantum Dots experimentiert haben. Außerdem wurde bis heute keine umfassende Studie vorgelegt, die den Einfluß von grundlegenden Biomolekülen, wie Aminosäuren oder Nukleo-Basen untersucht.

4.1.2 Löschung von Quantum Dots durch Nukleobasen und Aminosäuren

Um zunächst ein grundlegendes Verständnis der Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots zu erhalten, wurde eine Reihe von Stern-Volmer-Experimenten durchgeführt.

Da die Monophosphate der vier Nukleo-Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin die häufigsten Fluoreszenzlöscher sind, wurden diese experimentell untersucht. Hierzu wurde eine Lösung von Quantum Dots in einer Konzentration von 10^{-7} M in PBS-Puffer vorgelegt, und die jeweiligen Löschmoleküle in kleinen Konzentrationschritten hinzugefügt. Um eine Verfälschung der resultierenden Ergebnisse zu vermeiden, wurde die gemessene Fluoreszenzintensität um den jeweiligen Verdünnungsfaktor, bedingt aus der Zugabe der Löschmoleküllösung verursacht wurde, korrigiert. Zur Auswertung solcher Messungen, wird der Quotient aus der Fluoreszenzintensität bei einer bestimmten Konzentration F und der Ausgangsintensität F_0 gegen die Konzentration des Löschmoleküls aufgetragen. Ein typisches Ergebnis eines solchen Experiments bei 40°C ist in Abbildung 4.1.6 gezeigt. Zunächst fällt die Fluoreszenzintensität annähernd linear mit der Zugabe von dCMP, dem Monophosphat der Nukleobase Cytosin, ab. Bei höheren Konzentration des Löschmoleküls hingegen ist eine sehr starke positive Abweichung zu erkennen; die Löschung wird verstärkt. Als mögliche Ursache dieser Abweichung kann davon ausgegangen werden, dass sowohl dynamische als auch statische Fluoreszenzlöschung auftreten.

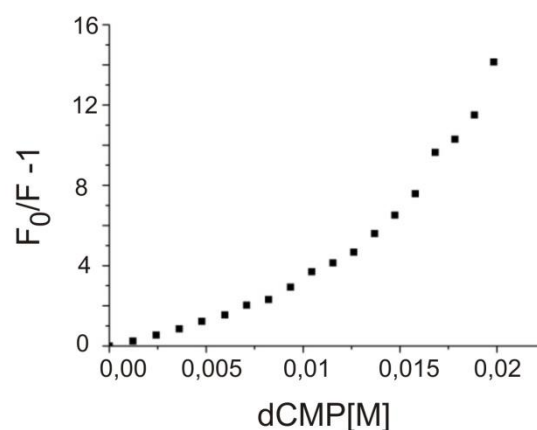


Abbildung. 4.1.6: Verlauf eines Stern-Volmer-Plots. Quantum Dot 655 und dCMP bei 40°C . Der zunächst lineare Kurvenverlauf weicht für höhere Konzentrationen beträchtlich ab, ein Indikator für kombinierte dynamische und statische Fluoreszenzlöschung.

Zur Bestimmung der Stern-Volmer-Konstante wird hingegen nur der initiale Abschnitt der Kurven verwendet und mit Hilfe einer linearen Kurvenanpassung direkt als Steigung der Geraden bestimmt. Zur Vereinfachung wurde hier von dem Basismodell einer rein statischen Fluoreszenzlöschung ausgegangen. Experimentell wurden hingegen vielfach Abweichungen

von dieser vereinfachenden Modellannahme gefunden. Die untenstehende Abbildung 4.1.7 zeigt die linearen Anpassungen für die beiden verwendeten Quantum Dots 655 und 705 für die Stern-Volmer-Experimente mit den vier Monophosphaten.

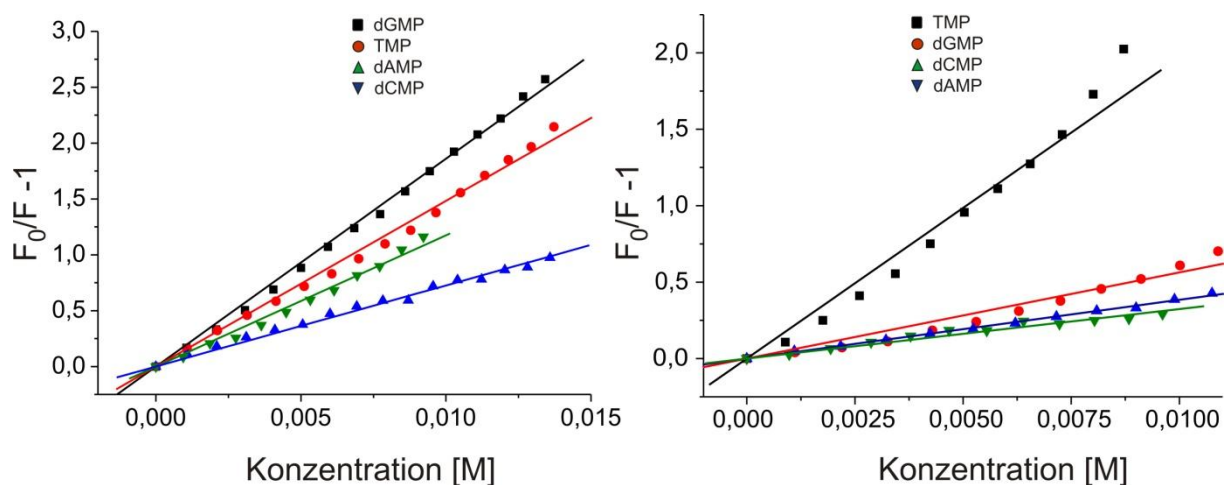


Abbildung 4.1.7: Verlauf der linearen Abschnitte der gemessenen Stern-Volmer-Plots. Für den Fall des Quantum Dots 655 (links) sind die erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten in einem vergleichbaren Bereich, während der Quantum Dot 705 (rechts) am besten durch TMP gelöscht wird.

Die erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten werden in der Tabelle 4.1.1 zusammengefasst. Die angegebenen Fehler beziehen sich auf die Fehlerabschätzung der linearen Anpassung.

Löschmolekül	Quantum Dot 655 K_{SV} [Mol^{-1}]	Quantum Dot 705 K_{SV} [Mol^{-1}]
dGMP	186,5 +/- 4	56,4 +/- 2,5
dCMP	115 +/- 2,15	38,5 +/- 0,5
dAMP	72,0 +/- 1,4	34,5 +/- 1,4
TMP	148,5 +/- 1,7	209,5 +/- 2,9

Tabelle 4.1.1 Übersicht der durch lineare Anpassung erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten.

Diese Zusammenstellung der erhaltenen Werte zeigt, dass die verwendeten Quantum Dots von allen vier Nucleobasen in ihrer Fluoreszenz beeinflusst werden. Allerdings ergeben sich bei einem Vergleich deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzlöschung. Während für den Quantum Dot 655 lediglich dAMP mit einer Stern-Volmer-Konstante von 72 Mol^{-1} eine signifikant schwächere Löschung aufweist als die drei anderen Substanzen dGMP, dCMP und TMP, deren Auswirkungen um 70 – 150 % höher liegen, zeigt der Quantum Dot 705 ein sehr spezifisches Löscherhalten durch die Nucleobase Thymin. Mit einer Stern-Volmer-Konstante von $209,5 \text{ Mol}^{-1}$ liegt deren Löscherffizienz um 300 – 700 % über denen der übrigen Monophosphate.

Ein gängiger Mechanismus zur Fluoreszenzlöschung beschreibt Photoelektronentransferreaktion als Ursache; dieser zeigt eine starke Abhängigkeit von den entsprechenden Oxidations- und Reduktionspotenzialen der Fluorophore. Da bei den beiden Quantum Dots unterschiedliche Halbleitermaterialien zum Einsatz kommen, waren auch deutliche Unterschiede bei der Fluoreszenzlöschung erwartet worden. Während beim Quantum Dot 655 Cadmiumselenid (CdSe) als fluoreszentes Halbleitermaterial eingesetzt wird, besteht der fluoreszierende Kern des Quantum Dot 705 aus dem ähnlichen Material Cadmiumtellurid (CdTe). Da mit dem Wechsel des Materials auch eine Veränderung der elektrochemischen Eigenschaften, insbesondere des Reduktions- und des Oxidationspotenzials, einhergeht, ist auch ein veränderter Einfluß von potenziellen Fluoreszenzlöschern die Folge.

Gerade für Experimente in lebenden Zellen, die vollständig mit DNA- und RNA-Strängen gefüllt sind, stellen diese einführenden Experimente die Anwendbarkeit von Quantum Dots zumindest in Zweifel. Zwar geht das Fluoreszenzsignal der Quantum Dots nicht komplett verloren, obwohl die Fluoreszenz partiell auf ein sehr niedriges Niveau zurückgeht und dadurch zu experimentellen Unsicherheiten führen kann. Da, neben den Nukleinsäuren, vor allem hohe Konzentrationen an Proteinen in lebenden Systemen anzufinden sind, wurde im nächsten Schritt der Einfluss einer Vielzahl von natürlichen Aminosäuren auf die Fluoreszenzemission der Nanokristalle untersucht.

Aminosäure	Quantum Dot 655 $K_{SV} [\text{Mol}^{-1}]$	Quantum Dot 705 $K_{SV} [\text{Mol}^{-1}]$
L-Alanin	Kein sichtbarer Effekt	Kein sichtbarer Effekt
L-Arginin	Kein sichtbarer Effekt	Kein sichtbarer Effekt
L-Asparagin	Kein sichtbarer Effekt	140 +/- 2
L-Glutamin	Kein sichtbarer Effekt	39,0 +/- 0,5
Glycin	Kein sichtbarer Effekt	Kein sichtbarer Effekt
L-Histidin	Kein sichtbarer Effekt	37,5 +/- 1,5
L-Leucin	Kein sichtbarer Effekt	Kein sichtbarer Effekt
L-Methionin	Kein sichtbarer Effekt	39,0 +/- 2,0
L-Prolin	Kein sichtbarer Effekt	32,5
L-Serin	Kein sichtbarer Effekt	25 +/- 1,5
L-Threonin	Kein sichtbarer Effekt	24,8 +/- 0,7
L-Tryptophan	46,5	60,5 +/- 3,5

Tabelle 4.1.2: Erhaltene Stern-Volmer-Konstanten unter Annahme eines rein statischen Löschemechanismus bei Löschemperimenten mit verschiedenen Aminosäuren.

Ähnlich wie bei den anfangs erwähnten Experimenten mit wurde auch hier eine 10^{-7} M Lösung der Quantum Dots in PBS vorgelegt, die jeweiligen Aminosäuren wurden in millimolaren Konzentrationen schrittweise hinzugefügt. Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Experimenten mit den Monophosphaten der Nukleobasen, wurden hier etliche Aminosäuren gefunden, die keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Fluoreszenzemission aufweisen. Die entsprechenden Aminosäuren sind in der Tabelle mit dem Eintrag „kein sichtbarer Effekt“ markiert. Als Grenze für diesen Eintrag wurde eine Stern-Volmer-Konstante von weniger als 5 Mol^{-1} gewählt.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich am besten diskutieren, wenn die verwendeten Aminosäuren so weit wie möglich kategorisiert werden. In Lehrbüchern der Organischen Chemie wird zwischen verschiedenen Gruppen ähnlicher Aminosäuren unterschieden. Da in der Literatur widersprüchliche Informationen vorliegen, wurden hier Informationen aus „Beyer Walter 23. Auflage“ verwendet. Für den Quantum Dot 655 ist lediglich festzustellen, dass eine signifikante Löschung nur durch die aromatische Aminosäure L-Tryptophan gefunden wurde. Da aber gleichzeitig der Quantum Dot 705 durch eine ganze Reihe aliphatischer Aminosäuren gelöscht wurde, muss von unterschiedlichen Löschemechanismen für aliphatische und aromatische Substanzen ausgegangen werden. Für den Quantum Dot 705 hingegen werden die erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten im Folgenden mit bestimmten strukturellen Parametern und den pKs-Werten der entsprechenden Aminosäuren in Relation gesetzt.

1. Die Gruppe der aliphatischen Aminosäuren: Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die hier verwendeten Aminosäuren Glycin, L-Alanin und L-Leucin. Diese Aminosäuren tragen an ihrem chiralen Kohlenstoffatom lediglich kleine aliphatische Substituenten (Glycin ein Wasserstoffatom, L-Alanin eine Methylgruppe und L-Leucin eine tert.-Butyl-Gruppe). Die entsprechenden Strukturen dieser Aminosäuren sind in Abbildung 4.1.8 gezeigt. Diese Substituenten haben allesamt keinen großen Einfluss auf die Elektronendichte am zentralen Kohlenstoffatom und somit können die entsprechenden Aminosäuren nahezu als normale organische Amine bezeichnet werden und dementsprechend wurde auch kein großer Einfluss auf die Fluoreszenzemission der Quantum Dots erwartet. Experimentell wurde diese Vermutung belegt, die erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten lagen für alle drei Aminosäuren dieser Gruppe unter 1 Mol^{-1} . Die pKs-Werte der entsprechenden Aminogruppen am C1-Atom liegen zwischen 9,75 und 9,87.

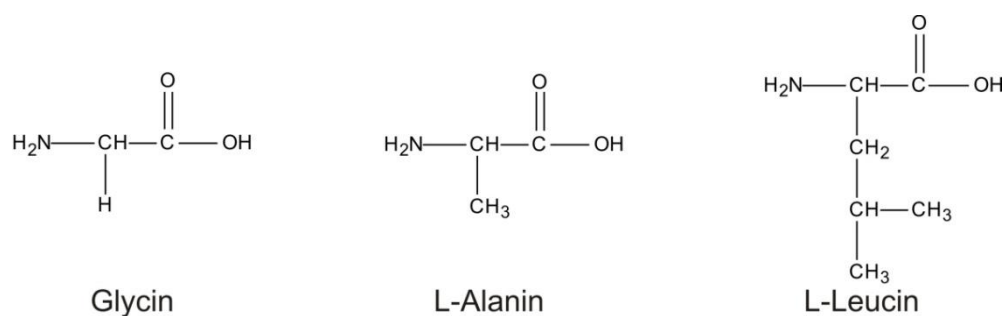


Abbildung 4.1.8: Strukturen der Aminosäuren Glycin, L-Alanin und L-Leucin

2. Die Gruppe der Hydroxy-Aminosäuren. Die Gruppe umfasst die Aminosäuren L-Serin und L-Threonin. Beide Aminosäuren tragen jeweils am zweiten Kohlenstoffatom eine Hydroxyfunktion, wodurch die Elektronendichte am chiralen Kohlenstoffatom leicht erhöht wird. Dadurch wird auch die Elektronendichte am Stickstoffatom erhöht, was zu einer Erhöhung der Nukleophilie führt. Da L-Threonin eine zusätzliche Methylgruppe trägt ist dieser Effekt hier größer als beim L-Serin. Die erhaltenen Ergebnisse für diese beiden Aminosäuren zeigen, dass eine höhere Nukleophilie zumindest für den Quantum Dot 705 zu einer höheren Löscheffizienz führten. Während L-Serin keine signifikante Löschung hervorruft, verursacht L-Threonin eine zwar schwache aber dennoch signifikante Löschung mit einer Stern-Volmer-Konstante von 25 Mol^{-1} . Die entsprechenden pKs-Werte liegen hier bei 9,21 für L-Serin und 9,18 für L-Threonin.

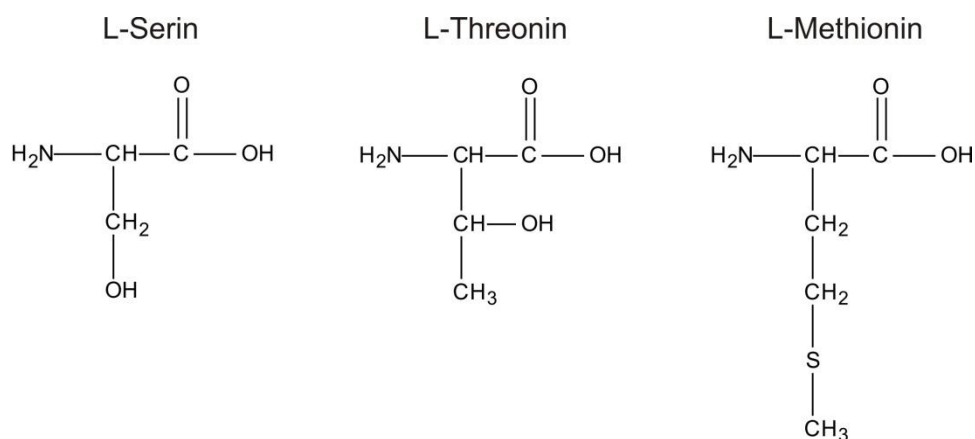


Abbildung 4.1.9: Strukturen der Aminosäuren L-Serin, L-Threonin und L-Methionin.

3. Die Gruppe der Mercapto-Aminosäuren: Aus dieser Gruppe wurde ausschließlich L-Methionin verwendet, dessen Struktur in Abbildung 4.1.9 gezeigt ist. Das ebenfalls schwefelhaltige L-Cystein hingegen konnte nicht verwendet werden, da es in wässriger Lösung zur Dimer-Bildung neigt.

Die Argumentation für die Hydroxy-Aminosäuren kann hier ebenfalls angewendet werden. Ähnlich wie im Fall der Hydroxy-Funktion erhöht die Mercapto-Funktion die

Elektronendichte und somit die Nukleophilie. Auf Grund seiner Lage im Periodensystem ist dieser Effekt im Fall des Schwefels größer als bei Sauerstoff, so dass die höhere Löschung (39 Mol^{-1} im Vergleich zu 24 Mol^{-1} für Threonin) durch die erhöhte Nukleophilie erklärt werden kann. Der pKs-Wert des Methionins liegt bei 9,21.

4. Aminosäuren mit zusätzlichen Stickstoff-Funktionen: Zu den verwendeten Aminosäuren gehören das Imid L-Arginin und die beiden Amide L-Asparagin und L-Glutamin. Die Strukturen dieser Substanzen zeigt Abbildung 4.1.10. L-Arginin ist eine sehr basische Aminosäure (pKs-Wert der freien NH_2 -Gruppe liegt bei 13,2). Dadurch liegt es in der Lösung größtenteils protoniert vor, und somit ist die Stickstofffunktion auch nicht so ausgeprägt nukleophil, wie die anderer Aminosäuren. Erwartungsgemäß konnte deshalb auch keine Fluoreszenzlöschung beobachtet werden. Die beiden Amide hingegen haben durch mesomere Effekte, die durch die Amid-Funktion verursacht werden, relativ elektronenreiche Amino-Funktionen mit relativ hoher Nukleophilie. Die entsprechenden pKs-Werte liegen bei 8,80 für Asparagin und 9,13 bei Glutamin. Dadurch lassen sich auch die auffälligen Unterschiede in der Löscheffizienz erklären. Glutamin hat einen ähnlichen pKs-Wert wie die bereits diskutierten Aminosäuren L-Threonin (9,10) und L-Methionin (9,17) und auch die Fluoreszenzlöschung liegt mit 39 Mol^{-1} in einem vergleichbaren Bereich. L-Asparagin hingegen, das einen wesentlich niedrigeren pKs-Wert aufweist, verursacht eine deutlich stärkere Fluoreszenzlöschung mit einer Konstante von 140 Mol^{-1} .

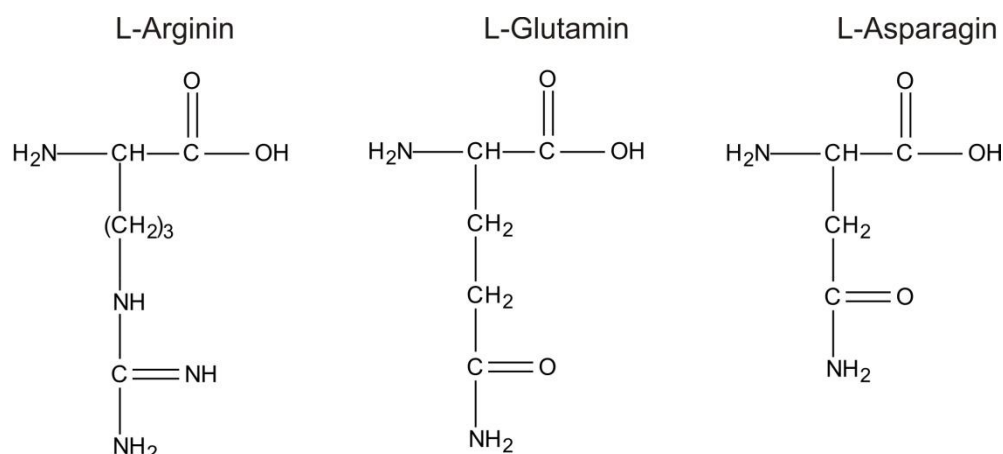


Abbildung 4.1.10: Strukturen der Aminosäuren L-Arginin, L-Glutamin und L-Asparagin.

5. Aminosäure mit heterocyclischen Ringen als Substituenten: Zu dieser Gruppe gehören auch die in den Experimenten verwendeten Aminosäuren L-Prolin, L-Tryptophan und L-Histidin. Die entsprechenden Strukturen zeigt Abbildung 4.1.11. Mit einem pKs-Wert von 10,64 ist nach den bisherigen Ergebnissen nicht mit einer starken Löschung

der Fluoreszenzemission durch L-Prolin zu rechnen. Die erhaltenen Messergebnisse bestätigten diese Hypothese. Auf Grund der bereits festgestellten Korrelation zwischen pKs-Wert und Löscheffizienz sollte sich L-Histidin (pKs 9,13) ähnlich wie L-Threonin (pKs 9,10) und L-Glutamin (pKs 9,13) verhalten. Dies konnte experimentell bestätigt werden.

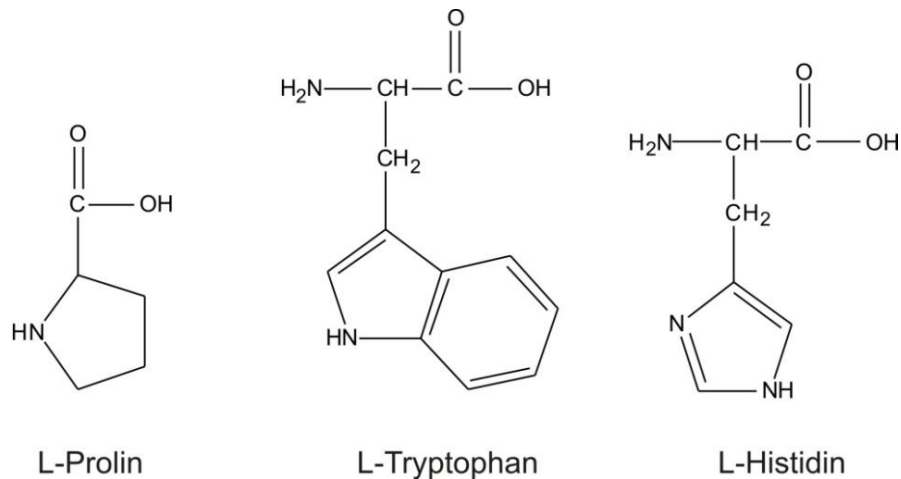


Abbildung 4.1.11: Strukturen der Aminosäuren L-Prolin, L-Tryptophan und L-Histidin.

Die Stern-Volmer-Konstante von $37,5 \text{ Mol}^{-1}$ liegt ausgesprochen gut im Rahmen der Erwartungen (Glutamin und Threonin weisen jeweils eine Konstante von 39 Mol^{-1} auf). Etwas anders stellt sich hier die Situation für L-Tryptophan dar. Der pKs-Wert dieser Aminosäure liegt bei 9,44 und damit in einem ähnlichen Bereich wie der von L-Serin. Dementsprechend wurde eigentlich nur eine schwache Fluoreszenzlöschung erwartet. Im Experiment hingegen wurde mit 60 Mol^{-1} eine effiziente Löschung ermittelt. Eine mögliche Erklärung dieses Effekts liegt in der Interaktion des aromatischen π -Systems des Tryptophan mit dem Elektron-Loch-Paar des angeregten Quantum Dots.

Eine zusammenfassende Interpretation der erhaltenen Daten lässt mehrere interessante Schlussfolgerungen zu. Der Quantum Dot 655 wird, außer durch L-Tryptophan, von keiner der verwendeten Aminosäuren in seiner Fluoreszenz beeinflusst. Im Vergleich zum Quantum Dot 705, der durch eine Vielzahl von Aminosäuren gelöscht wird, lässt sich dieser Befund nur durch die unterschiedlichen Halbleitermaterialien im fluoreszenten Kern erklären.

Für den Quantum Dot 705 konnte ein enger Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzlöschung und den pKs-Werten der Aminofunktionen gefunden werden. Lediglich die Stern-Volmer-Konstante der aromatischen Aminosäure Tryptophan war deutlich stärker, als auf Grund des pKs-Wertes erwartet wurde. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4.1.12 dargestellt.

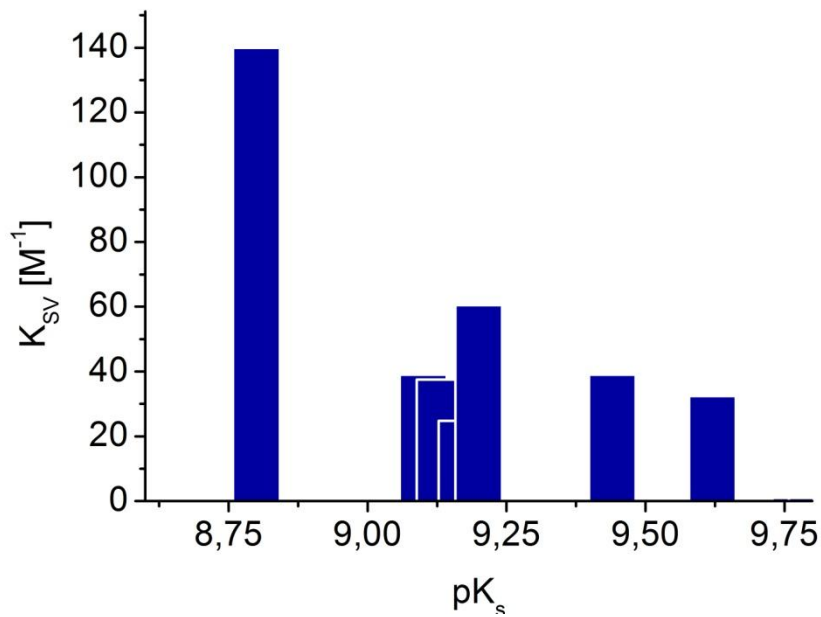


Abbildung 4.1.12: Zusammenhang zwischen pK_s -Wert und Stern-Volmer Konstante K_{sv} .

Außerdem lässt sich aus der Sonderrolle des L-Tryptophan bei beiden Quantum Dots ablesen, dass nicht nur der pK_s -Wert der Aminosäuren einen Einfluss auf die Fluoreszenzemission zu haben scheint. Werden die pK_s -Werte mit denen der Nucleobasen verglichen, so wird erneut deutlich, dass für aromatische Verbindungen ein anderer Löschmechanismus vorliegen muss. Zudem besitzen alle vier Nucleobasen einen pK_s -Wert zwischen 9,4 und 9,5 [Römpf 2006], ein Bereich, bei dem die Löschung durch die Aminosäuren bereits relativ schwach ist.

4.1.3 Untersuchung der Fluoreszenzlöschung auf Einzelmolekülniveau

Abschließend wurden Löschexperimente durchgeführt, bei denen auf Einzelmolekülniveau untersucht werden sollten, ob sich die beobachtete Löschung durch Entfernen der entsprechenden Löscher rückgängig machen lässt. Durchgeführt wurden diese Experimente in Lab-tekts, in denen die Quantum Dots über die starke Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung auf der Oberfläche verankert wurden. In die überstehende Lösung wurde dann in mehreren Schritten die Löschesubstanz bis zu einer Gesamtkonzentration von ca. $6 \cdot 10^{-3}$ Mol/l zugegeben.

Abbildung 4.1.13 zeigt die gemessenen konfokalen Aufnahmen für die Löschung des Quantum Dot 655 durch den starken Löscher dGMP.

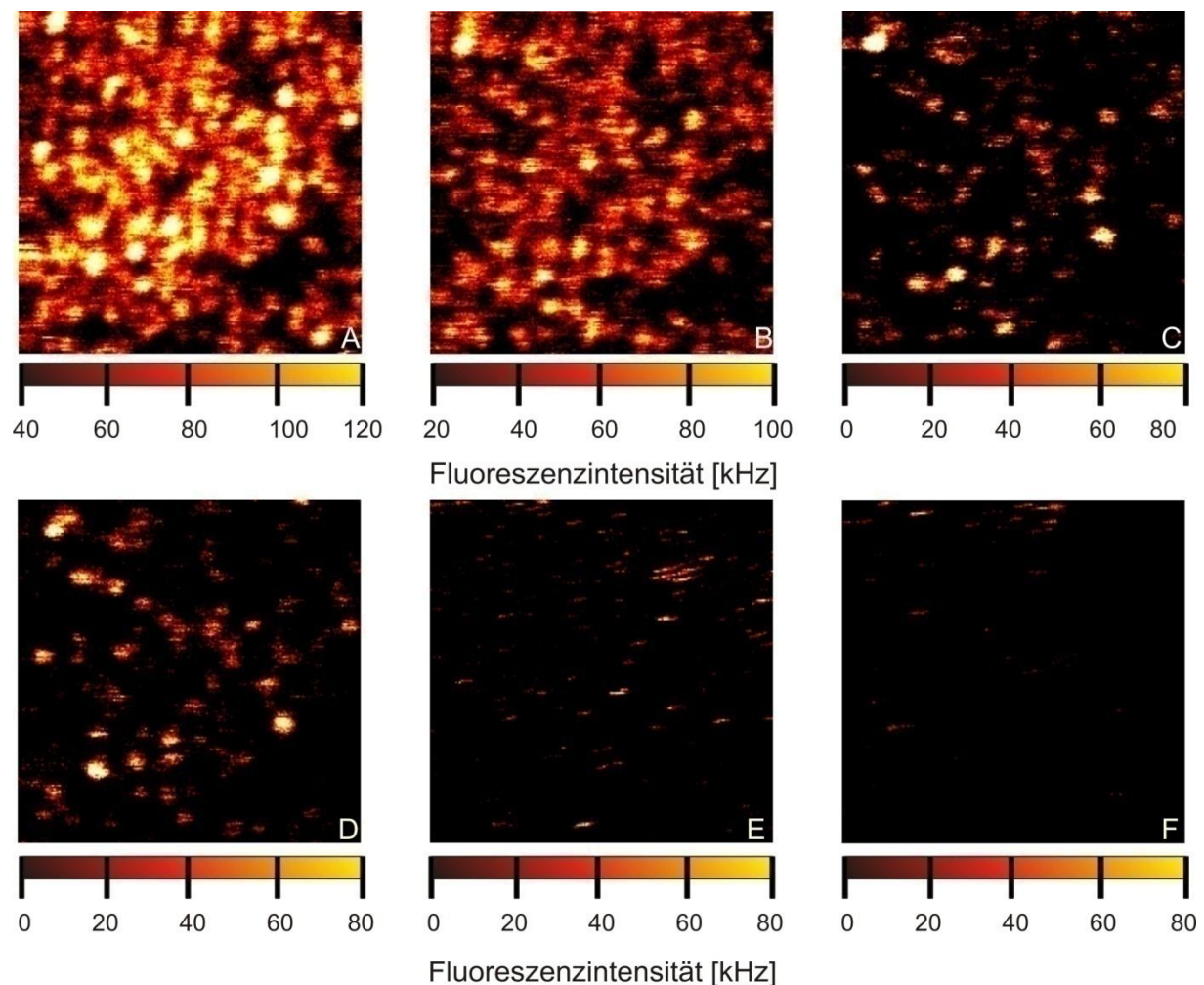


Abbildung 4.1.13: Konfokale Aufnahmen der Löschung von Quantum Dot 655 durch dGMP. Bild A stellt die Abbildung der ungelöschten Quantum Dots dar. Die Konzentration des dGMP wurde von B zu E in Schritten von ca. $1,5 \mu\text{M}$ erhöht. Abbildung F wurde nach mehrmaligem Austausch der über den Quantum Dots befindlichen Lösung durchgeführt. Für alle Bilder gilt: Größe $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$, Auflösung 100 Nanometer und 2 Millisekunden Messzeit pro Pixel, Anregung bei 635 nm, 10 MHz und ca. $20 \mu\text{W}$.

Die Bilder von A bis E zunächst den konfokalen Aufnahmen, von Quantum Dots nach Zugabe steigender Mengen an dGMP. Bild A zeigt die Oberflächenbelegung und Fluoreszenzintensität der unbeeinflussten Quantum Dots in Abwesenheit des dGMP. Auf den folgenden Bildern B, C, D und E wurde jeweils eine geringe Menge dGMP hinzugegeben. Die resultierenden Konzentrationen liegen zwischen ca. 1,5 μM (B) und ca. 6 μM (E). Nach der Zugabe wurde jeweils für eine gute Durchmischung in der Messkammer gesorgt und danach derselbe Bereich der Oberfläche erneut abgerastert. Bereits bei der ersten Zugabe wurde ein offensichtlicher Abfall der Fluoreszenzintensität beobachtet, der sich mit zunehmender Konzentration des dGMP weiter verstärkte. Um die Anschaulichkeit der Aufnahmen zu erhöhen wurde zweimal der Schwellenwert für die Intensitätsanzeige herabgesetzt, sodass dieser von 120 kHz für Bild A über 100 kHz (B) auf 80 kHz für die folgenden Aufnahmen reduziert wurde. Nach der viermaligen Erhöhung der dGMP-Konzentration wurde dann die überstehende Lösung in der Messkammer abgezogen und diese mehrfach mit PBS-Puffer ausgewaschen, um das dGMP möglichst vollständig zu entfernen. Danach wurde eine abschließende Messung durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die ursprüngliche Fluoreszenzintensität nach dem Entfernen des dGMP regeneriert hatte. Die entsprechende Teilabbildung F zeigt allerdings, dass dies eindeutig nicht der Fall war. Zwar konnte nach dem wiederholten Waschen der Probe nicht derselbe Oberflächenbereich gemessen werden, aber schon vor Beginn der Messreihe wurde eine relativ homogene Oberflächenverteilung der Quantum Dots über die gesamte Messkammer sichergestellt.

Die Beobachtung, dass sich die Fluoreszenz nach dem Entfernen des Fluoreszenzlösers nicht regenerierte, deutet eine direkte Wechselwirkung zwischen den löschenden Molekülen und der Oberfläche des Quantum Dots an, die ursächlich für die beobachtete Verringerung der Fluoreszenz sein könnte. Eine rein dynamische Fluoreszenzlöschung zumindest kann an dieser Stelle bereits ausgeschlossen werden, da durch die wiederholten Waschschriffe die Konzentration des dGMP soweit reduziert wurde, dass die Löschung bedeutend schwächer hätte ausfallen müssen. Dass die Fluoreszenz der Quantum Dots nach dem Austausch der Lösung überhaupt nicht zugenommen hatte, lässt sich somit nur durch eine kovalente Bindung oder elektrostatische Wechselwirkung mit dem Quantum Dot erklären.

Zum Vergleich wurde dasselbe Experiment auch mit dem erheblich schlechteren Fluoreszenzlöser Tryptophan durchgeführt. In Ensemble-Messungen zeigt sich, dass Tryptophan nur ungefähr 25 % der Löscheffizienz des dGMP aufweist. Die Ergebnisse dieser Messreihe zeigt Abbildung 4.1.14. Wie erwartet war der Abfall in der Fluoreszenzintensität bei diesen Experimenten deutlich geringer als für den Fall des dGMP. Selbst in der letzten Messung wurde kaum ein Absinken der Fluoreszenzintensität beobachtet, so dass in diesem Fall auf die Waschschriffe verzichtet wurde.

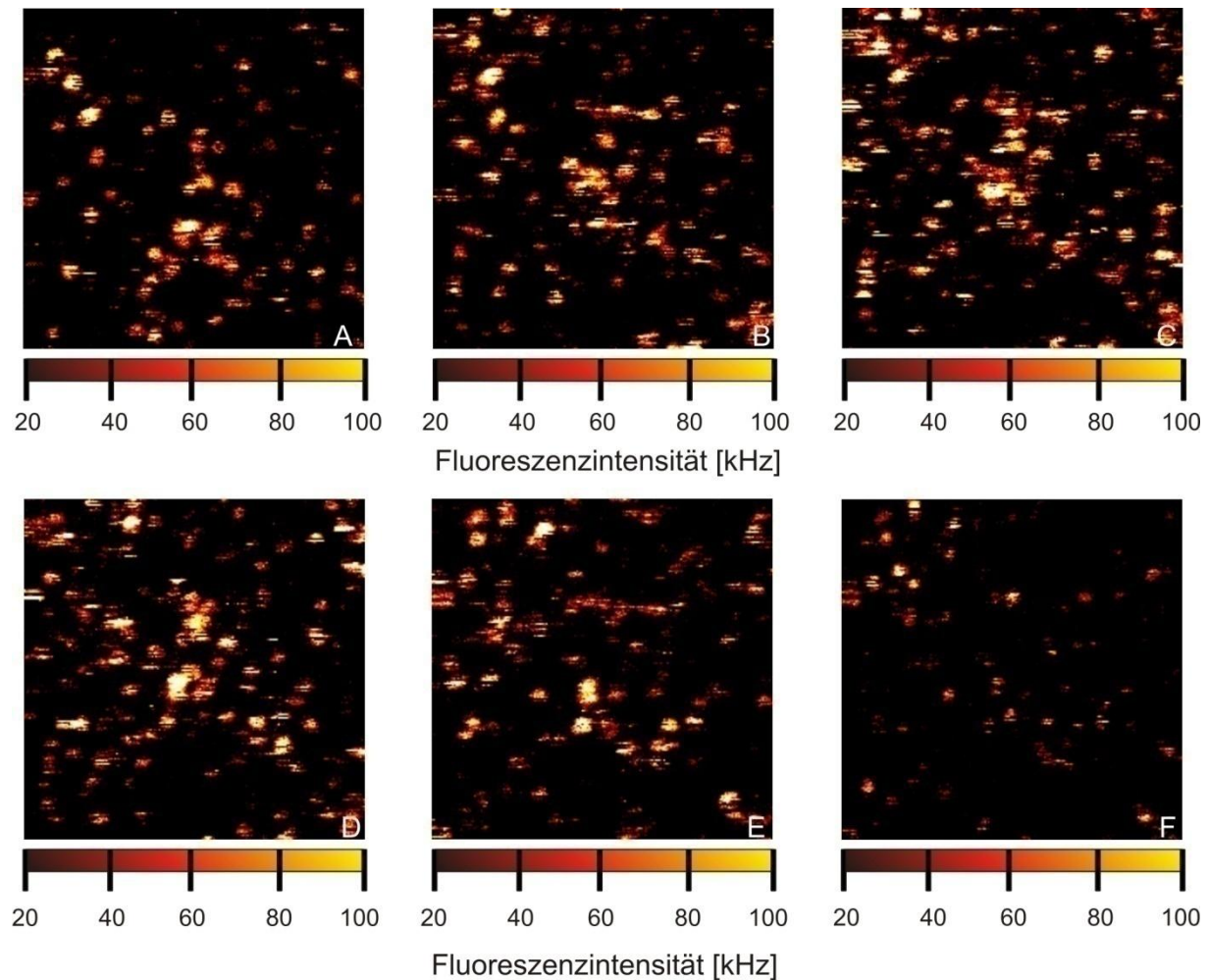


Abbildung 4.1.14: Konfokale Aufnahmen der Löschung von Quantum Dot 655 durch Tryptophan. Die Konzentration des Tryptophans wurde von B zu F in Schritten von ca. 1,5 μM erhöht. Bild A stellt die Abbildung der ungelöschten Quantum Dots dar. Für alle Bilder gilt: Größe 10 μm x 10 μm , Auflösung 100 Nanometer und 2 Millisekunden pro Pixel, Anregung bei 635 nm, 10 MHz und ca. 20 μW . Dargestellt ist jeweils die Fluoreszenzintensität in kHz.

Bei gleicher Versuchsdurchführung wie in dem zuvor beschriebenen Experiment mit dGMP konnte eine merklich schwächere Fluoreszenzlöschung bei Verwendung von Tryptophan gefunden. Durch eine Analyse der einzelnen fluoreszenten Spots konnte außerdem abgeleitet werden, dass die mechanistische Vorstellung eines nichtfluoreszierenden Grundzustandskomplexes in diesem Fall nicht richtig sein kann. Vielmehr scheint ein schrittweiser Mechanismus vorzuliegen, bei dem die einzelnen Quantum Dots kontinuierlich weniger stark fluoreszieren:



Wobei die Quantenausbeuten der jeweiligen Grundzustandskomplexe mit größer werdender Anzahl von Löschmolekülen immer weiter abnehmen.

4.1.4 Stern-Volmer-Messungen unter Veränderung des pH-Wertes

Eine tiefere Analyse der erhaltenen Stern-Volmer-Plots zeigt, dass oftmals bei höheren Löscherkonzentrationen sehr starke Abweichungen von einem linearen Verlauf der Kurve auftraten. Während der Messungen kam es in vielen Fällen offensichtlich zu einer Art von Sättigung, dies führte zu einem asymptotischen Verlauf der Messwerte. Einen beispielhaften Kurvenverlauf zeigt Abbildung 4.1.15

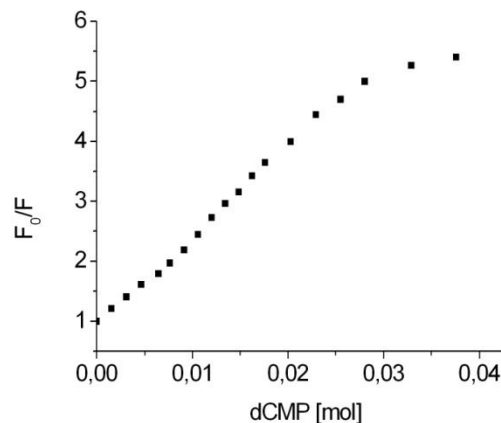


Abbildung 4.1.15: Übergang eines Stern-Volmer-Plots in den Sättigungsbereich bei höheren Quencherkonzentrationen. Als Beispiel dient hier der Verlauf der Paarung Quantum Dot 655 und dCMP bei Standardbedingungen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Sättigungsverhalten liegt in einer direkten Oberflächen-Wechselwirkung zwischen dem Quantum Dot und den verwendeten Löschern. Vorstellbar wäre beispielsweise eine Lewisäure – Lewisbase Wechselwirkung zwischen Fluoreszenzlöschler und der Oberfläche des Quantum Dots. Im Gegensatz zum Säure-Begriff nach Brønstedt definiert sich eine Lewisäure nicht durch die Freisetzung von Protonen in wässriger Lösung sondern durch seine Fähigkeit freie Elektronenpaare aufzunehmen. Dementsprechend muss eine Lewisäure elektrophile Eigenschaften besitzen. Eine Lewisbase hingegen zeichnet sich dadurch aus, dass sie über freie Elektronenpaare verfügt und somit nukleophil ist.

Eine Möglichkeit diese vermutete Interaktion experimentell zu erfassen sollte die Durchführung von Stern-Volmer-Experimenten bei unterschiedlichen pH-Werten durchzuführen. Zwar sollte der Lewisäurecharakter des Zinksulfid als Oberflächenmaterials des Quantum Dot dadurch nicht oder nur wenig beeinflusst werden, allerdings sollte ein deutlicher Effekt auf den Lewisbasencharakter der als Fluoreszenzlöschler verwendeten stickstoffhaltigen Verbindungen auftreten, da dieser vom Protonierungsgrad des Stickstoffatoms abhängt.

Zunächst wurden Experimente durchgeführt, bei denen jeweils die spezifisch stärksten Fluoreszenzlöcher für die beiden Quantum Dots 655 und 705 bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 6 und pH 9 durchgeführt wurden. Die entsprechenden Stern-Volmer-Plots für die Experimente für QD 655 mit dGMP und QD 705 mit dGMP zeigt Abbildung 4.1.15.

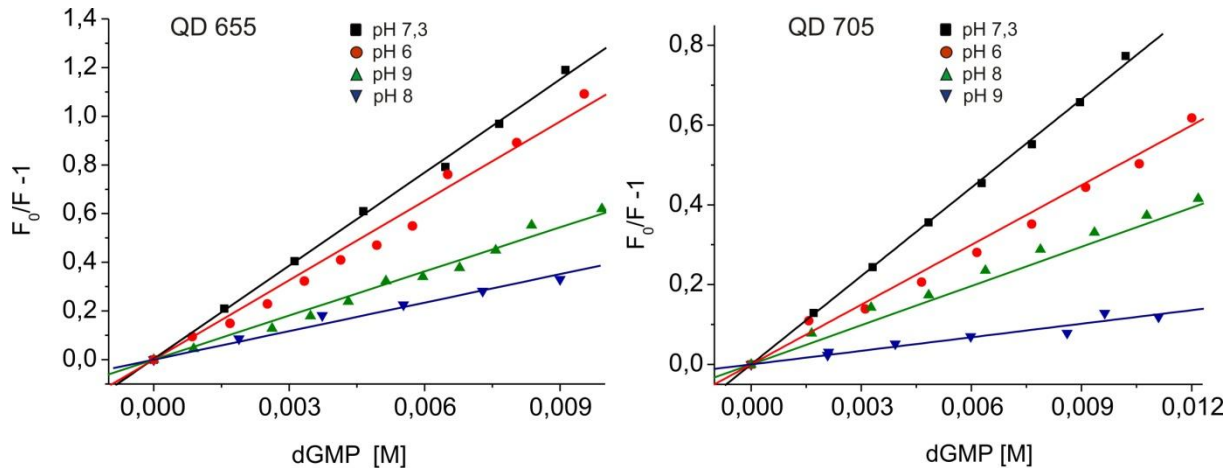


Abbildung 4.1.15: Erhaltene Stern-Volmer-Plots für QD 655 mit dGMP (links) und den QD 705 mit TMP (rechts). Es werden jeweils nur die initialen, linearen Bereiche der Kurven angezeigt.

Aus den entsprechenden Messungen geht hervor, dass die jeweils stärkste Löschung bei einem nahezu neutralen pH-Wert von 7,3 erreicht wird, insbesondere für den Fall des Quantum Dot 705 sind die gemessenen Unterschiede zu den anderen pH-Werten sehr groß. Tabelle 4.1.3 gibt einen Überblick über die in diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse. Nachdem ein Einfluss des pH-Wertes gefunden wurde, wurden entsprechende Experimente mit allen Quantum Dot – Monophosphat Kombinationen durchgeführt.

pH-Wert	Quantum Dot 655 $K_{Sv} [Mol^{-1}]$	Quantum Dot 705 $K_{Sv} [Mol^{-1}]$
dAMP		
pH 6,0	46	34
pH 7,3	72	49
pH 8,0	49,5	39
pH 9,0	42,5	22
dCMP		
pH 6,0	108	67
pH 7,3	127	81
pH 8,0	39	16
pH 9,0	60	56

pH-Wert	Quantum Dot 655 K_{SV} [Mol ⁻¹]	Quantum Dot 705 K_{SV} [Mol ⁻¹]
dGMP		
pH 6,0	68,3	49,9
pH 7,3	182,5	73,8
pH 8,0	32,2	32,7
pH 9,0	9,0	11,5
TMP		
pH 6,0	38,5	20,7
pH 7,3	148,5	209
pH 8,0	146	70
pH 9,0	75	22,5
Tryptophan		
pH 6,0	46	30
pH 7,3	46,5	60,5
pH 8,0	19,5	37
pH 9,0	17,5	35

Tabelle 4.1.3: Erhaltene Stern-Volmer-Konstanten bei Experimenten mit verschiedenen Löschern bei pH-Werten zwischen sechs und neun.

Vor der Bewertung der Ergebnisse muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die hier präsentierten Werte mit einer anderen Produktionscharge der verwendeten Quantum Dots erhalten wurden. Um keine Irritationen zu erzeugen, wurden in den wenigen Fällen, in denen sich größere Abweichungen - durch unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen Produktionschargen - ergeben haben, die Werte bei pH 7,3 durch aktuelle Messergebnisse ersetzt. In keinem dieser Fälle hat sich durch das Ersetzen dieser Werte die Reihenfolge der Löscheffizienz innerhalb einer Serie verändert.

Aus der Tabelle lässt sich ablesen, dass die Fluoreszenzlöschung bei einem pH-Wert von 7,3 immer mit Abstand am stärksten ist. Lediglich in einem Experimente, bei Verwendung des QD 655 mit TMP konnte bei pH 8 eine ähnlich starke Löschung beobachtet werden. Zwar ist der absolute Betrag, um den die bei anderen pH-Werten ermittelten Stern-Volmer-Konstanten abweichen von Messung zu Messung unterschiedlich. Allerdings ist die Reihenfolge der Stärke der Fluoreszenzlöschung bei den beiden unterschiedlichen Quantum Dots jeweils identisch. Abbildung 4.1.17 zeigt die die normierten Stern-Volmer-Konstanten, die für die verschiedenen Fluoreszenzlöcher bei unterschiedlichen pH-Werten erhalten wurden.

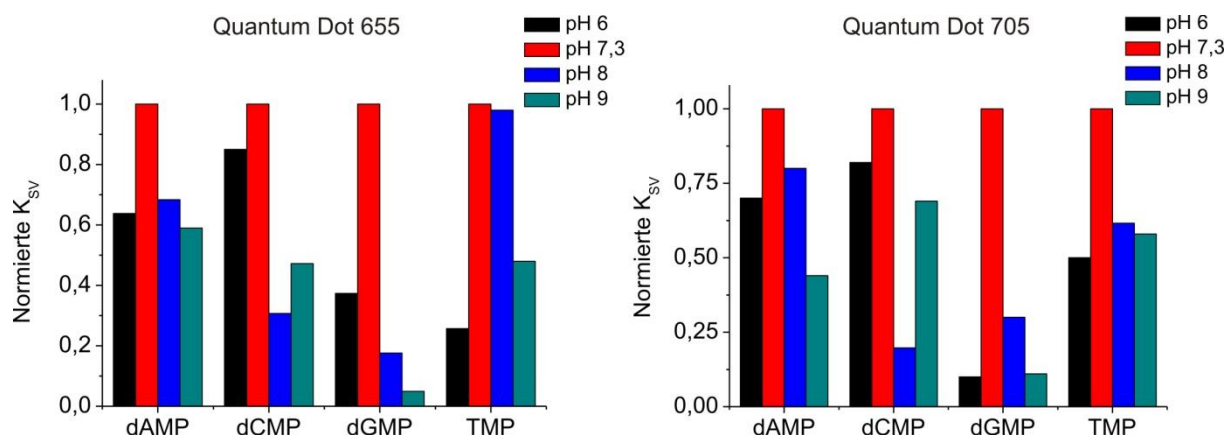


Abbildung 4.1.17: Normierte Stern-Volmer-Konstanten der vier Nucleobasen bei unterschiedlichen pH-Werten.

Trotz der sehr großen Unterschiede in den absoluten Werten bei den beiden Quantum Dots zeigen sich nach Normierung der erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten sehr deutliche Parallelen. Durch diese starken Parallelen kann fast sicher ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Veränderungen in der Löscheffizienz durch Veränderungen am Quantum Dot selber ausgelöst werden. Für die unterschiedlichen Halbleitermaterialien wären sonst unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Einfluss des pH-Wertes sich ausschließlich auf die Löschesubstanzen auswirkt.

Offensichtlich hat sich, wie eingangs erwähnt, durch die Variation des pH-Wertes die Lewisbasenstärke der verwendeten Löschesubstanzen verändert. Nach Pearsons Konzept der „harten und weichen Säuren und Basen“ sind Wechselwirkungen zwischen Lewis Säuren und Lewisbasen dann am stärksten, wenn Säure und Base entweder beide „hart“ oder „weich“ sind. Für die Verbindung aus einer harten Säure und einer harten Base ist eher ein ionischer Charakter zu erwarten, während die Bindung zweier „schwacher“ Partner eher kovalent sein sollte. In diesem Konzept sind sowohl die Metallionen aus der Oberflächenschale der Quantum Dots als auch die Stickstofffunktionen der Monophosphate und des Tryptophans eher weiche Säuren bzw. Basen. Somit ist einer eher kovalenten Wechselwirkung zwischen Quantum Dot und den entsprechenden stickstoffhaltigen Verbindungen zu rechnen. Durch die Variation des pH-Wertes ändert sich der schwache Säurecharakter der Zink-Ionen nicht, während eine Veränderung der Protonierung am Stickstoffatom durchaus zu einer Verschiebung des Basencharakters dieser Verbindungen führen kann. Diese wiederum kann nun zu einer Änderung des Bindungscharakters zwischen Quantum Dot und Löscher führen, da nach dem Pearson-Konzept nur Verbindungen zwischen starken Säuren und Basen oder schwachen Säuren und Basen stabil sind. Mischverbindungen hingegen gelten als nicht besonders stabil. Durch eine Verringerung der Stabilität der Bindung zwischen Quantum Dot und Löschemolekül lässt sich nun auch die Minderung der Löscheffizienz bei niedrigeren oder

höheren pH-Werten erklären. Zu dieser Hypothese passt die experimentelle Feststellung, dass die Löschung schwächer wird, je weiter der gewählte pH-Wert vom optimalen pH 7,3 entfernt ist. Weiterführende Experimente mit noch höheren bzw. niedrigeren pH-Werten konnten leider nicht durchgeführt werden, da die für diesen Bereich verwendeten Pufferlösungen, Essigsäure-Acetat Puffer für pH 5 und Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffer für pH 10, einen negativen Effekt auf die Fluoreszenz der Quantum Dots aufwiesen.

4.1.5 Mechanistische Untersuchung zur Fluoreszenzlöschung

Wie bereits in der theoretischen Einführung dieser Arbeit erwähnt, wird zwischen zwei unterschiedlichen Arten der Fluoreszenzlöschung unterschieden.

Das erste Modell ist die dynamische oder auch Stoßlöschung. Die Fluoreszenzlöschung kommt hierbei durch den Zusammenstoß eines angeregten Fluorophors mit einem Löschmolekül zu Stande. Die mittlere Zeit bevor ein Zusammenstoß stattfindet ist konzentrationsabhängig, je höher die Konzentration ist, desto niedriger ist diese Zeit. Direkt messbar ist dieses Phänomen über die Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer. Höhere Temperaturen führen durch schnellere Molekularbewegung zu einer Verkürzung der stoßfreien Zeit und somit zu einer weiteren Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer.

Das zweite Modell ist die statische Fluoreszenzlöschung. Die Erniedrigung der Fluoreszenz wird hierbei durch die Ausbildung eines nicht fluoreszierenden Grundzustandkomplexes verursacht. Es wird ein gewisser Anteil an Fluorophor gebunden, während die nicht komplexierten Farbstoffe unbeeinflusst fluoreszieren. Mit steigender Konzentration der Löschmoleküle sinkt der Anteil der nicht komplexierten Farbstoffe und somit die beobachtbare Fluoreszenzintensität – die Fluoreszenzlebensdauer bleibt allerdings konstant. Bei einer Erhöhung der Temperatur geht die statische Löschung zurück, da der Grundzustand entropisch benachteiligt ist. Dieses Modell geht davon aus, dass ein Grundzustandskomplex vollständig und ohne eine Restfluoreszenz gelöscht wird. Beobachtungen bei der Löschung einzelner Quantum Dots mit Hilfe konfokaler Mikroskopie zeigten allerdings, dass dieses Modell bei Halbleiterkristallen in dieser Form nicht gültig ist.

Zur Unterscheidung zwischen beiden Mechanismen sind also zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze möglich: Zum Einen die TCSPC-gestützte Fluoreszenzlebensdauermessung und zum Anderen die Untersuchung des Verhaltens bei Variation der Temperatur.

Den direkteren Zugang zur Unterscheidung der beiden Mechanismen bietet die Fluoreszenzlebensdaueranalyse, weshalb diese zuerst durchgeführt wurde.

Das experimentelle Vorgehen entspricht der Durchführung normaler Stern-Volmer-Experimente. Es wird eine Konzentration des zu untersuchenden Farbstoffes vorgelegt, in diesem Fall 10^{-7} M, und danach in kleinen Schritten eine definierte Konzentration des Löschmoleküls zugegeben. Die Auswertung erfolgt in dem auf der Abszisse die Löscherkonzentration und auf der Ordinate der Quotient aus der Lebensdauer τ_i bei der Konzentration i und der Lebensdauer τ_0 des freien, ungelöschten Fluorophors aufgetragen.

Auf Grund der sehr langen Fluoreszenzlebensdauern der verwendeten Quantum Dots, musste die Laserwiederholrate mit einem externen Trigger auf 1 MHz festgelegt werden. Höhere Wiederholraten führten dazu, dass die Fluoreszenzabklingkurve der Quantum Dots nicht mehr in das TAC-Fenster zwischen zwei Anregungspulsen passt. Bei Erfolgen des nächsten Anregungspulses sind somit noch nicht alle im vorigen Puls angeregten Quantum Dots in den Grundzustand zurückgekehrt und verursachen somit eine Überlagerung mit der nächsten Abklingkurve. Die folgende Abbildung 4.1.18 zeigt den Verlauf von zwei dynamischen Stern-Volmer-Messungen. Gezeigt sind die dynamischen Stern-Volmer-Plots des Quantum Dot 655 mit den Monophosphaten dGMP und dAMP.

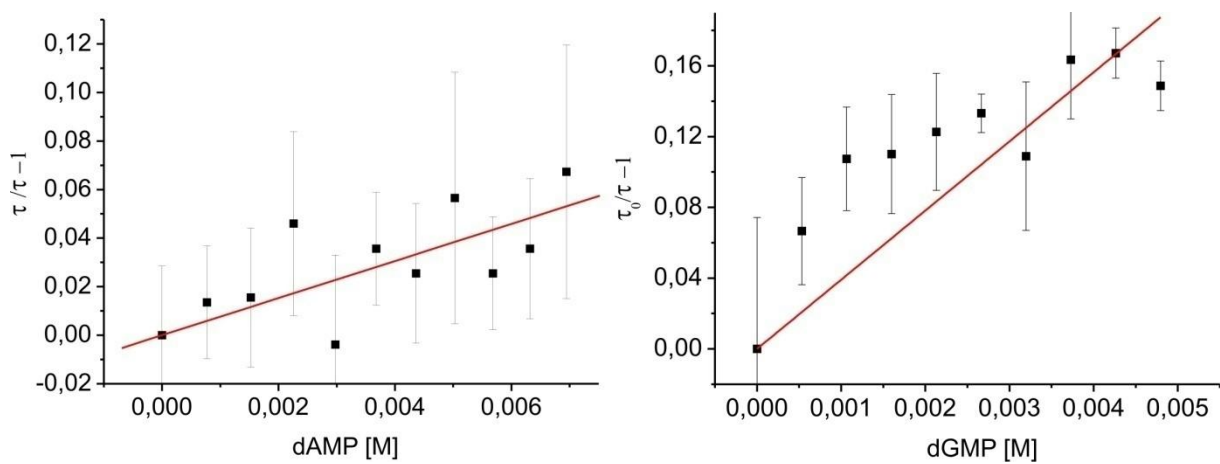


Abbildung 4.1.18: Dynamische Stern-Volmer-Plots für QD 655 mit dAMP (links) und dGMP (recht). Die Fehlerbalken wurden durch Mittelwert- und Standardabweichungsbestimmung aus mehreren angepassten Fluoreszenzlebensdauerkurven bestimmt.

Die beiden Graphen zeigen sowohl ein Beispiel, bei dem nur ein sehr geringer dynamischer Beitrag zur Fluoreszenzlöschung besteht (dAMP) als auch ein Beispiel, bei dem zumindest ein signifikanter Anteil an dynamischer Löschung vorhanden ist. Eine andere mögliche Interpretation ist, dass weniger stark fluoreszierende Grundzustandskomplexe entstehen, deren Restfluoreszenz eine deutlich verkürzte Fluoreszenzlebensdauer aufweist. Die relativ großen Fehlerbalken ergeben sich aus jeweils drei biexponentiell angepassten Fluoreszenzlebensdauerkurven und der Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung. In beiden Messungen wurde die Lebensdauer des freien Quantum Dots 655 mit 36,5 Nanosekunden bestimmt, so dass sich für das Experiment mit Adenin einer Verkürzung der Lebensdauer um 2 Nanosekunden und für dGMP eine Verkürzung um 6 Nanosekunden ergibt. Insbesondere diese Verkürzung um sechs Nanosekunden ist zwar eine signifikante Größe, allerdings ergibt sich durch lineare Anpassung der ersten Werte des Stern-Volmer-Plots lediglich eine dynamische Löschkonstante von $K_D=40 \text{ Mol}^{-1}$. Der Vergleich mit der über die Fluoreszenzintensität bestimmten statischen Löschkonstante $K_S=186,5 \text{ Mol}^{-1}$ zeigt, dass die Löschung hauptsächlich durch eine hohe statische Komponente verursacht wird.

Für den Fall einer rein dynamischen Löschung gilt $K_D=K_S$. Noch deutlicher wird dieser Unterschied für den Fall des dAMP. Während die über die Intensität bestimmte Konstante bei 72 Mol^{-1} liegt, wurde die dynamische Konstante aus dem obigen Diagramm zu $K_D=5 \text{ Mol}^{-1}$ bestimmt.

Die erhaltenen Konstanten aus der Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauerverkürzung sind in Tabelle 4.1.4 zusammengefasst. Aus dieser wird deutlich, dass in fast allen Fällen eine nahezu rein statische Fluoreszenzlöschung vorzuliegen scheint.

Löschmolekül	Quantum Dot 655 $K_{SV} [\text{Mol}^{-1}]$	Quantum Dot 705 $K_{SV} [\text{Mol}^{-1}]$
dAMP	6,5 +/- 2	13,3 +/- 1,5
dCMP	6,9 +/- 1,5	Keine signifikante Veränderung der Lebensdauer
dGMP	40 +/- 4	10,2 +/- 1,2
TMP	4,0 +/- 1	3,7 +/- 1,4
Tryptophan	Keine signifikante Veränderung der Lebensdauer	Keine signifikante Veränderung der Lebensdauer

Tabelle 4.1.4 Dynamische Stern-Volmer-Konstanten der durchgeführten Experimenten.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass mit Ausnahme des schon erwähnten Sonderfalls des Quantum Dot 655 mit dGMP in keinem der anderen untersuchten Fälle, zumindest bei Raumtemperatur, ein signifikanter Anteil an dynamischer Löschung vorliegt.

Wie bereits eingangs erwähnt, ist auch das unterschiedliche Verhalten bei Temperaturänderung ein Indikator zur Unterscheidung zwischen den beiden Löschmechanismen.

Da eine Temperierung der Probelösungen im verwendeten Fluoreszenzlebensdauerspektrometer nicht möglich ist, konnte ein entsprechendes Experiment nur im Fluoreszenzemissionsspektrometer ausgeführt werden, ein Vergleich der Intensitätsmessungen mit der Veränderung der Fluoreszenzlebensdauer war leider nicht möglich.

Die entsprechenden Experimente wurden zunächst mit dem Quantum Dot 655 und dem Monophosphat dCMP durchgeführt. Experimentell wurde hier vorgegangen wie bereits oben beschrieben, die Temperatur wurde über die Messsoftware eingestellt und über eine an das Spektrometer angeschlossene Temperiereinheit geregelt. Die Stern-Volmer-Experimente wurden dann in Temperaturschritten von 5°C durchgeführt. Die erhaltenen Geraden werden in Abbildung 4.1.19 dargestellt, die durch lineare Anpassung erzielten Stern-Volmer-Konstanten in Tabelle 4.1.5. Der Verlauf der einzelnen Messungen zeigt einen zunächst überraschenden Verlauf.

Obwohl nur eine geringe Veränderung in der Fluoreszenzlebensdauer beobachtet wurde, steigt die Löscheffizienz mit steigender Temperatur deutlich nicht linear an.

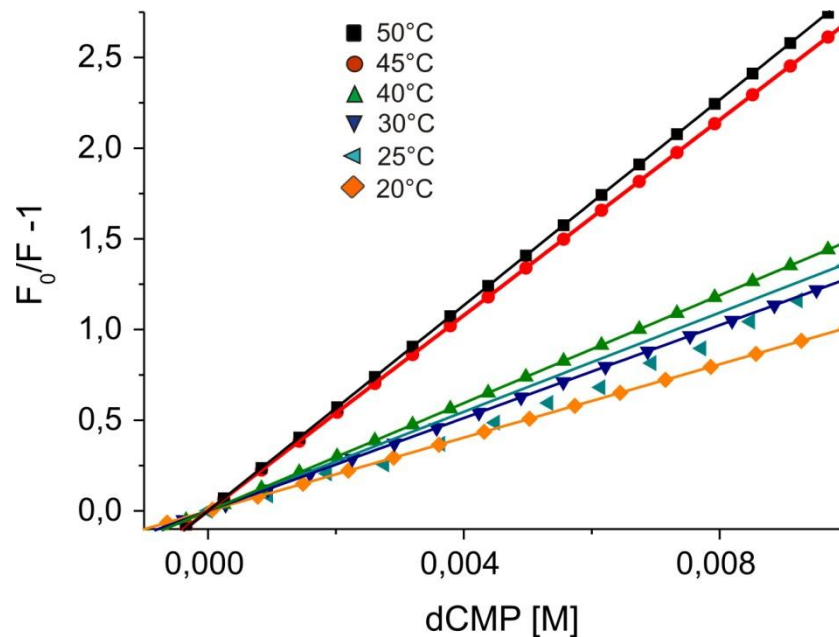


Abbildung 4.1.19: Stern-Volmer-Plots bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 20°C und 50°C.

Temperatur [°C]	Stern-Volmer-Konstante [Mol ⁻¹]
20	101 +/- 1,5
25	128 +/- 2
30	136,5 +/- 1,9
40	148,9 +/- 2,1
45	259,8 +/- 3,6
50	283,5 +/- 1

Tabelle 4.1.5: Stern-Volmer-Konstanten bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt sind die Stern-Volmer-Konstanten, die mit QD 655 und dGMP erhalten wurden.

Dieser Anstieg ist ein eindeutiger Indikator dafür, dass zumindest bei höheren Temperaturen ein signifikanter Anteil dynamischer Löschung aufzutreten scheint. Insbesondere das Absinken der Stern-Volmer-Konstante bei Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur deutet an, dass auch bei niedrigeren Temperaturen kein ausschließlich statischer Mechanismus vorliegen kann. Wäre dies der Fall, würde mit einem Ansteigen der Löschung bei niedrigerer Temperatur gerechnet werden.

Zur weiterführenden Analyse der Temperaturdaten wurde untersucht, ob sich der Anstieg der Fluoreszenzlöschung mit Hilfe kinetischer Modelle beschreiben lässt. Für die Untersuchung temperaturabhängiger Kinetiken dient die Arrhenius-Gleichung:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_A}{RT} \quad \text{oder umgeformt} \quad k = A e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

Dabei ist A der präexponentiellen Faktor, E_A die Aktivierungsenergie der Reaktion und R die universelle Gaskonstante.

Für viele Reaktionen wird ein linearer Zusammenhang zwischen $\ln k$ und $1/T$ gefunden. Ist das der Fall, dann lassen sich die Arrhenius-Parameter A und E_A durch eine lineare Anpassung der Messdaten ermitteln. Durch Multiplikation der Steigung mit der universellen Gaskonstante R wird die Aktivierungsenergie bestimmt, der extrapolierte y-Achsenabschnitt für den Wert $1/T = 0$ ergibt den präexponentiellen Faktor A. Die folgende Abbildung 4.1.20 zeigt den entsprechenden Graphen für die oben beschriebenen Messungen.

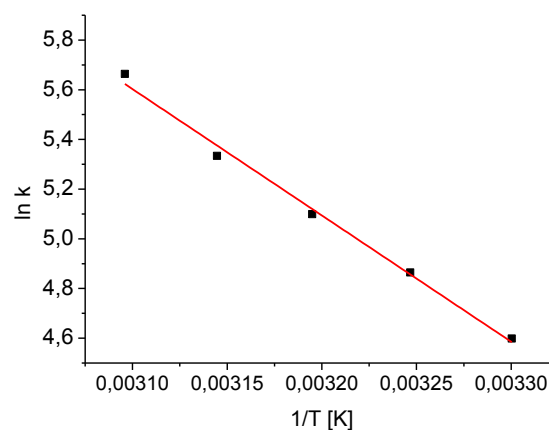


Abbildung 4.1.20: Arrhenius-Auftragung der erhaltenen temperaturabhängigen Stern-Volmer-Konstanten für den QD 655 mit dGMP.

Der erhaltene Graph zeigt ein nahezu perfekt lineares Verhalten, so dass eine Beschreibung der Reaktionskinetik mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung möglich ist. Die lineare Anpassung der Messwerte ergab einen y-Abschnitt von 21,36 und eine Steigung von -5085 jeweils mit einem Fehler von unter 3 %. Daraus ergeben sich die Arrhenius-Parameter dieser Reaktion zu:

$$A = e^{21,36} = 1,89 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1}$$

$$E_A = 5085 \text{ K} \cdot 8,3145 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} = 42 \text{ kJ/mol}$$

Zusätzlich lässt sich über die Beziehung:

$$-RT \ln k = \Delta^0 G$$

Die freie Aktivierungsenthalpie $\Delta^0 G$ der Reaktion berechnen. In diesem Fall ergibt sie sich zu

$$\Delta^0 G = - 15,2 \text{ kJ/mol}$$

Vergleichende Messungen wurden mit der Kombination QD655 und TMP durchgeführt. Auch hier resultiert in der Arrhenius-Auftragung ein sehr streng linearer Zusammenhang, den Abbildung 4.1.21 darstellt.

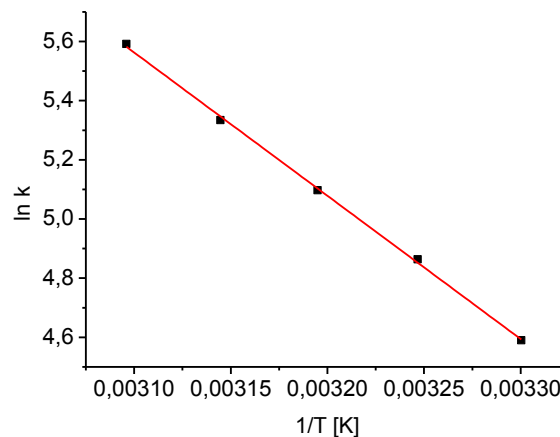


Abbildung 4.1.21: Arrhenius-Auftragung für die Kombination QD655 + TMP.

Aus den durch lineare Anpassung der Messwerte erhaltenen Werten für die Steigung und den Achsenabschnitt wurden auch in diesem Fall die Arrhenius-Parameter berechnet. Sie ergeben sich zu:

$$A = 8,58 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1}$$

$$E_A = 40, \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta^0 G = - 15,0 \text{ kJ/mol}$$

Aus der Tatsache, dass die Arrhenius-Darstellung einem streng linearen Verlauf folgt lässt sich ableiten, dass auch bei höheren Temperaturen keine weiteren Reaktionswege zur Löschung der Fluoreszenz der Quantum Dots beitragen. Für den Fall zusätzlicher strahlungsloser Desaktivierungswege würde ein nicht linearer Verlauf der Arrheniusauftragung erwartet werden, da unterschiedliche Kinetiken mit unterschiedlichen Arrhenius-Parametern auftreten sollten.

4.1.6 Untersuchungen unter Zugabe von Reduktionsmitteln

Neben der Unterscheidung zwischen dynamischer und statischer Löschung, ist es experimentell auch möglich zu überprüfen, ob die Fluoreszenz der Quantum Dots durch Oxidation in Folge eines photoinduzierten Elektronentransfers gelöscht wird. In der Literatur ist bekannt, dass das bei Quantum Dots oftmals beobachtete Flackern der Fluoreszenzintensität (englisch *Blinking*) durch eine Oxidation des Quantum Dots durch Auger-Prozesse hervorgerufen wird [Kuno 2001]. In den letzten Jahren wurde allerdings herausgefunden, dass sich dieses *Blinking* durch die Beimischung von kurzen organischen Thiolen fast vollständig unterdrückt lässt. Der zu Grunde liegende Mechanismus liegt in einer Reduktion des, durch den Auger-Prozess oxidierten, Quantum Dots durch das Thiol. Belegt werden konnte dieser Befund durch den Nachweis, dass das verwendete Thiol, in der Regel β -Mercaptoethanol, im Laufe der Zeit verbraucht wird [Hohng 2003]. Dieser Effekt wurde nun dafür genutzt, um zu überprüfen, ob die Fluoreszenzlöschung bei Quantum Dots auf eine Oxidation des Halbleiterkristalls durch die Löschesubstanzen zurückzuführen ist. Für den Fall, dass wirklich eine Oxidation via PET ursächlich ist, sollte durch Zugabe von β -Mercaptoethanol eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzlöschung erreicht werden. Zur experimentellen Realisierung dieser Theorie wurden Stern-Volmer-Experimente in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von β -Mercaptoethanol durchgeführt. Hierfür wurden Konzentrationen zwischen 5 und 60 μM gewählt. Außer der Anwesenheit des Thiols wurde exakt nach der oben beschriebenen Routine vorgegangen. Die bei verschiedenen Thiol-Konzentrationen erhaltenen Stern-Volmer-Plots und die daraus resultierenden Stern-Volmer-Konstanten zeigen Abbildung 4.1.22 für den Quantum 655 mit dGMP als Löscher.

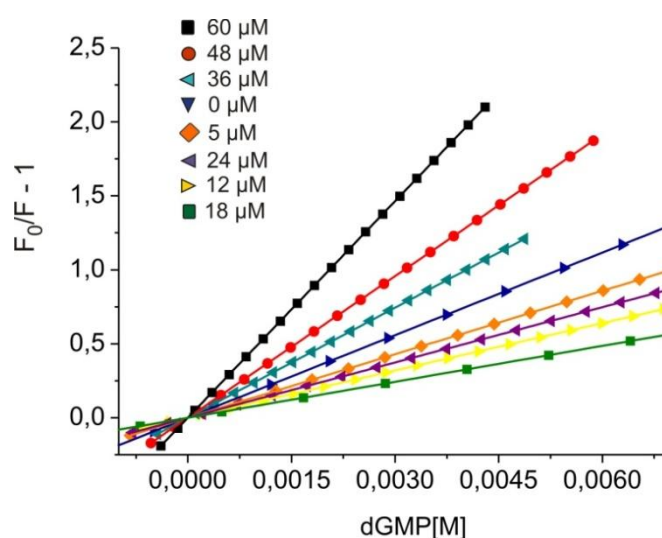


Abbildung 4.1.22: Stern-Volmer-Plots in Anwesenheit verschiedener BME-Konzentrationen. Für das System QD 655 und dGMP. Dargestellt sind die entsprechenden linearen Anpassungen.

Bereits auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass die Zugabe von β -Mercaptoethanol einen gravierenden Einfluß auf die gemessene Fluoreszenzlöschung ausübt. Eine genauere Analyse soll auf der Basis der, durch Anpassung der anfänglichen linearen Abschnitte der Stern-Volmer-Plots erhaltenen, Löschkonstanten durchgeführt werden. Diese sind in Tabelle 4.1.6 wiedergegeben.

β -Mercaptoethanol [μM]	Stern-Volmer-Konstante [Mol^{-1}]
0	186,5
6	142,5
12	106,6
18	80,1
24	124
36	248,1
48	319,2
60	488,8

Tabelle 4.1.6: Stern-Volmer-Konstanten in Abhängigkeit der BME-Konzentration von Quantum Dot 655 mit dGMP.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen zwei sehr interessante Tendenzen auf, die in Abbildung 4.1.23 veranschaulicht werden.

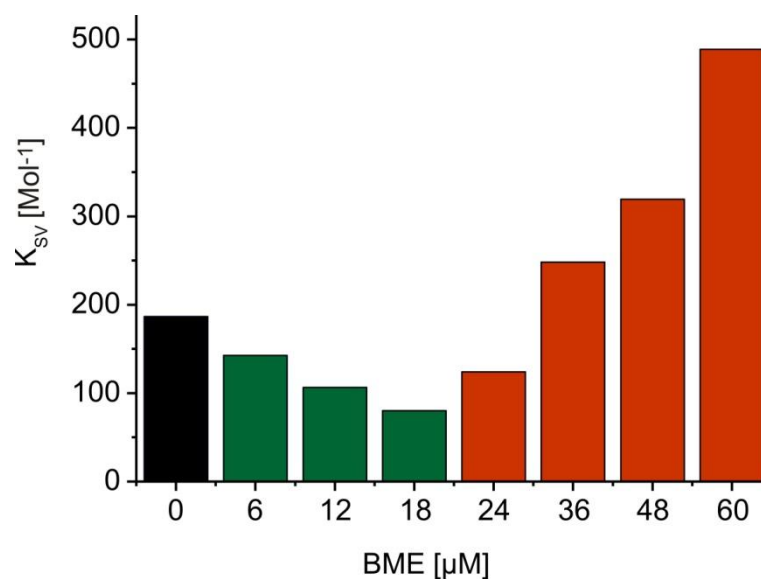


Abbildung 4.1.23: Stern-Volmer-Konstante für das System QD 655/dGMP aufgetragen gegen die BME-Konzentration

In Anwesenheit von geringen Konzentrationen des β -Mercaptoethanols erfolgt zunächst eine signifikante Verminderung der Löschung. Sie sinkt von 186 Mol^{-1} in Abwesenheit von BME zunächst auf $142,5 \text{ Mol}^{-1}$ bei einer Konzentration von $6 \mu\text{M}$ und auf bis zu 80 Mol^{-1} bei einer Konzentration von $18 \mu\text{M}$. Dieser Teil der Messreihe lässt nur den Schluss zu, dass die Löschung durch eine Oxidation des Quantum Dots in Folge eines photoinduzierten Elektronentransfers vom Quantum Dot zum dGMP verursacht wird.

Auf der anderen Seite wurde allerdings beobachtet, dass die auftretende Löschung bei höheren Konzentrationen deutlich ansteigt. Die einzige mögliche Erklärung für den Befund ist, dass das β -Mercaptoethanol in höheren Konzentrationen ein Disulfid bildet. Dieses Verhalten ist von anderen Thiolen, insbesondere von der Aminosäure L-Cystein, die zu L-Cystin dime-riert, bekannt. Als Disulfid fungiert BME nicht mehr als Reduktionsmittel sondern vielmehr als Oxidationsmittel. Durch die vielen freien Elektronenpaare an den verbrückenden Schwefel-Atomen ist es darüberhinaus ausgesprochen nukleophil. Zusätzlich gelten Schwefel-Atome als weiche Lewis-Basen, die nach der oben vorgestellten Hypothese eine stabile kovalente Bindung zum Halbleiterkristall ausbilden können.

Daneben ist bekannt, dass BME in höheren Konzentrationen dazu neigt, Radikalkationen auszubilden. Da Radikale eine sehr hohe Reaktivität und Elektronenaffinität aufweisen, sollten diese in der Lage sein, die in den angeregten Quantum Dots freien Elektronen abzufangen und somit zu einer Oxidation desselben zu sorgen [Hohng 2004].

Erst kürzlich wurde ein neuartiges System vorgestellt, das es ermöglicht, die durchschnittliche Anzahl der beobachteten Photonen pro Farbstoffmolekül dramatisch zu erhöhen [Vogel-sang 2008]. Das sogenannte ROXS-System verwendet ein ausgewogenes System aus einem Oxidationsmittel (Methylviologen) und einem Reduktionsmittel (Trolox oder Ascorbin-säure). In Anwesenheit dieser Reagenzien wird insbesondere der nicht-fluoreszente Triplett-zustand schnell und effizient durch photoinduzierten Elektronentransfer depopuliert. Dieses System funktioniert allerdings nur, wenn in der Lösung kein Sauerstoff vorhanden ist. In Folge dieser Limitierung konnten entsprechende Experimente auf Grund fehlender Schutzgas-einrichtungen nicht im Ensemble sondern nur mit auf biotinylierten Oberflächen immobilisier-ten Quantum Dots, die sich luftdicht versiegeln lassen, durchgeführt werden. Da keinerlei Erfahrungen mit diesem System und Quantum Dots vorlagen wurde zunächst eine schnelle Messmethode gewählt, da konfokale Aufnahmen möglicherweise zu langsam sind, um den Effekt des Systems erfassen zu können. Hierfür fiel die Wahl auf die Anregung mit einem Weitfeld Mikroskop. Ähnlich wie in den oben erwähnten Experimenten zur Reversibilität der Fluoreszenzlöschung wurden zunächst Aufnahmen der Oberfläche mit steigenden Konzen-trationen an Löschemolekülen gemessen.

Die folgende Abbildung 4.1.24 zeigt eine Oberfläche mit Quantum Dot 655 mit steigenden Konzentrationen an dGMP.

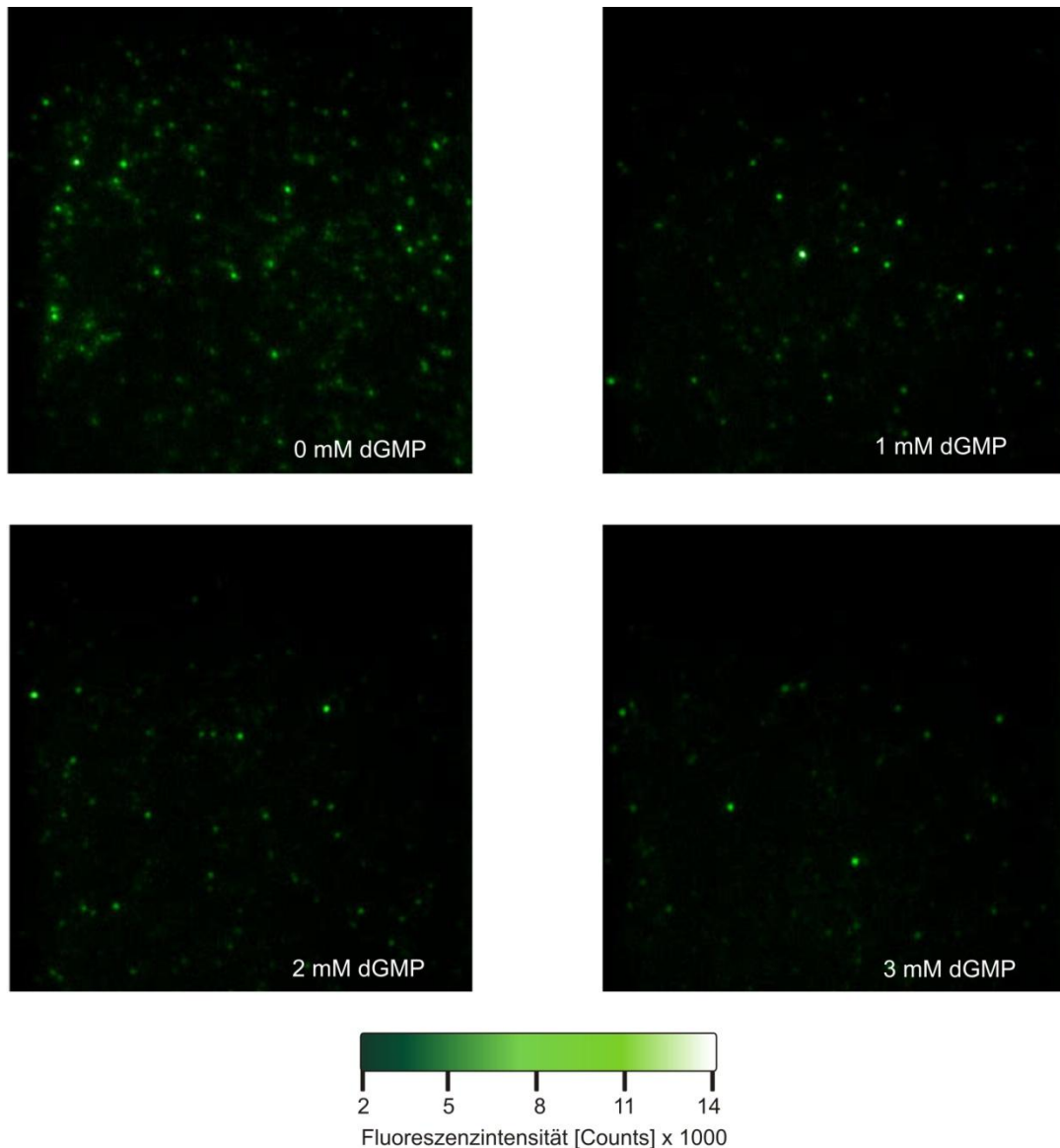


Abbildung 4.1.24: Widefield-Aufnahmen des Quantum Dot 655 mit steigenden Konzentrationen an dGMP (A = 0 μ M, B = 1 μ M, C = 2 μ M, D = 3 μ M). Die Anregung erfolgte mit einem Nd:Yag-Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm, zur Detektion diente eine hochspezifische EMCCD-Kamera.

Abbildung 4.1.24 zeigt einen Ausschnitt aus einer Weitfeld Aufnahme, die Anregung wurde mit einem Nd:YAG Laser mit einer Wellenlänge von 532 Nanometern und einer Leistung von etwa 5 mW durchgeführt. Wie erwartet, zeigte sich, dass die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der gefundenen fluoreszenten Spots mit zunehmender dGMP-Konzentration abnahm. Wird anstelle von normalem Standard Puffer (PBS) das in seiner Zusammensetzung sehr komplexe ROXS-System benutzt, so ist nicht nur der Einfluss der Fluoreszenzlöschung verdrängt.

Abbildung 4.1.25 zeigt eine Aufnahme einer Oberfläche mit Quantum Dots 655 und einer 5 μM Lösung des starken Fluoreszenzlöschers dGMP. Erwartet wurde, dass die Fluoreszenzintensität sich ungefähr im Bereich der ungelöschten Quantum Dots befinden sollte.

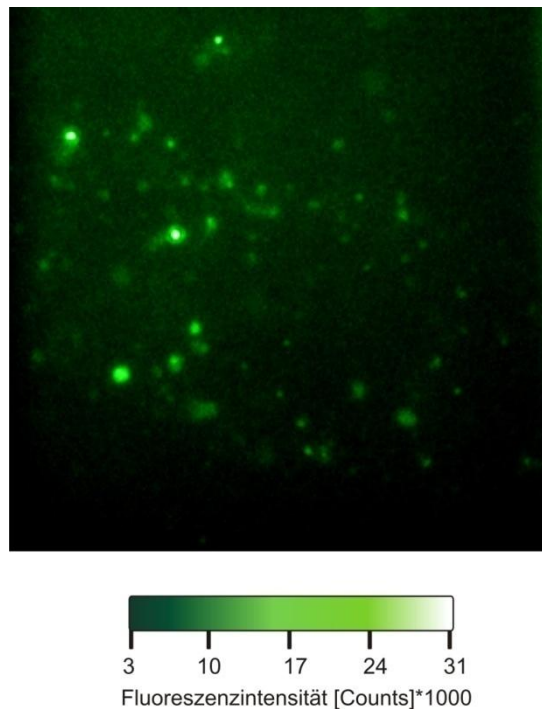


Abbildung 4.1.25: Aufnahme einer Quantum Dot 655 Oberfläche unter Einsatz des ROXS-Puffersystems in Anwesenheit von 5 μM dGMP. Die Anregung erfolgte mit einem Nd:Yag-Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm, zur Detektion diente eine hochspezifische EMCCD-Kamera.

Experimentell wurde allerdings ein Anstieg der Fluoreszenz um einen Faktor 3 ermittelt; dieses auf den ersten Blick erstaunliche Ergebnis lässt sich aber anhand zweier Graphen deutlich erklären. Abbildung 4.1.26 zeigt die Fluoreszenzintensitätshistogramme zweier ausgewählter Quantum Dots. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität eines mit Trolox behandelten Quantum Dots auf einem konstanten sehr hohen Niveau verweilt. Dieser Eindruck ergab sich bereits bei einem ersten Blick auf die aufgenommenen Filme. Im Gegensatz dazu zeigten die Quantum Dots ohne Trolox im überstehenden Puffer ein sehr ausgeprägtes *Blinking*. Somit scheint das ROXS-System nicht nur in der Lage ist, ein Absinken der Fluoreszenzintensität durch Quenching zu verhindern, sondern darüber hinaus auch noch ein sehr effektives Mittel zu Unterdrückung des Blinking darstellt.

Allerdings ist es fraglich, ob dieses System auch in biologischen Proben angewendet werden kann. Zum einen ist es in lebenden Proben nicht möglich, Sauerstoff komplett auszuschließen und zum anderen ist insbesondere Methylviologen zytotoxisch.

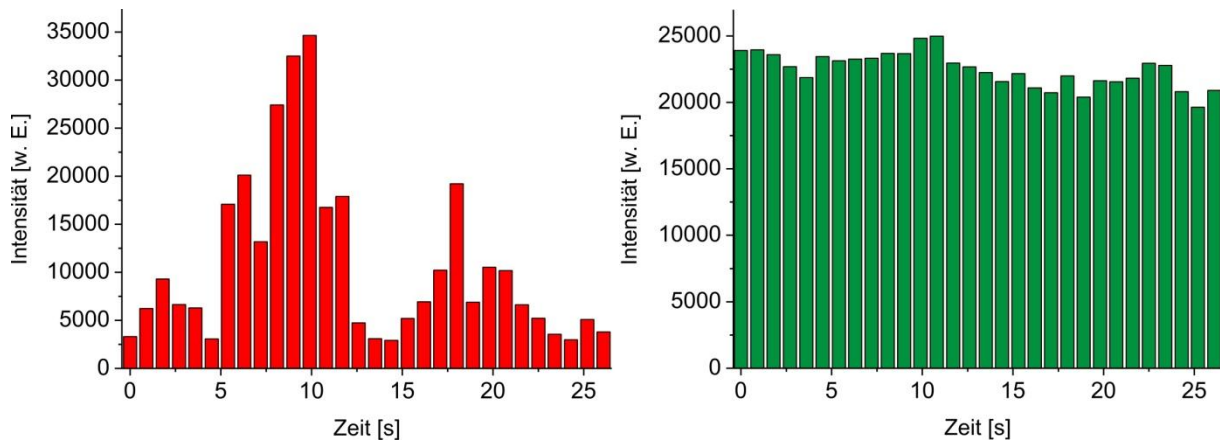


Abbildung 4.1.26: Fluoreszenzintensitätshistogramme zweier Quantum Dots. Das linke Diagramm zeigt die Spur eines Quantum Dots in Abwesenheit des ROXS-Systems, während dessen Effekt auf die Quantum Dot Fluoreszenz im rechten Histogramm dargestellt ist.

Ein Löschexperiment mit einem Ensemble von Quantum Dots konnte wegen der Voraussetzung eines Sauerstoffausschlusses nicht mit dem kompletten ROXS-System durchgeführt werden, da bei jeder Zugabe von Löschsubstanzen für eine gute Vermischung der Lösung gesorgt werden muss. Da Trolox allerdings auch in Abwesenheit der anderen Komponenten als Reduktionsmittel eingesetzt werden konnte, wurde dem in den Löschexperimenten verwendeten PBS-Puffer 0,2 mM Trolox zugesetzt. Der erhaltene Stern-Volmer-Plot für ein Experiment mit dem QD 655 und seinem stärksten Fluoreszenzlöcher dGMP ist in Abbildung 4.1.27 dargestellt.

Die Stern-Volmer-Konstante für die Löschung durch dGMP wurde mit $14,6 \text{ Mol}^{-1}$ bestimmt. Im Vergleich zu einer Konstante von 186 Mol^{-1} die in reinem PBS-Puffer gemessen wurde, bedeutet dies, dass es unter Verwendung von Trolox gelungen ist, die beobachtete Fluoreszenzlöschung um ungefähr 95 % zu unterdrücken.

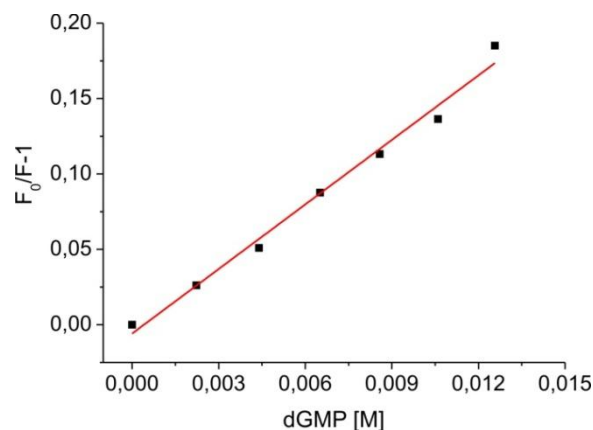


Abbildung 4.1.27: Linearer Bereich des Stern-Volmer-Plots von Quantum Dot 655 und dGMP in Anwesenheit von 0,2 mM Trolox.

In analogen Experimenten mit dem Quantum Dot 705 konnte ein solcher Effekt allerdings zunächst nicht beobachtet werden. Wie schon in den oben beschriebenen Oberflächenexperimenten mit dem ROXS-System konnte auch die Zugabe von 0,2 mM Trolox in dem verwendeten Puffer die Fluoreszenzlöschung nicht signifikant reduzieren. Über die Gründe kann hier allerdings nur spekuliert werden, da die elektrochemischen Potenziale der Quantum Dots nicht bekannt sind. Diese Potenziale können zwar im Prinzip mittels cyclovoltametrischer Messungen leicht bestimmt werden, allerdings sind dafür hohe Konzentrationen notwendig. Auf Grund des hohen Preises der verwendeten Quantum Dots war es auch nicht möglich, die benötigten Mengen zu beschaffen.

4.1.7 Messungen mit variablen Anregungswellenlängen

Im Gegensatz zu organischen Farbstoffen besitzen Quantum Dots ein Absorptionsspektrum, das zu kürzeren Wellenlängen hin immer höhere Absorptionen aufweist. Betrachtet man das in Abbildung 4.1.28 gezeigte Anregungsspektrum eines Quantum Dots, ist diese Besonderheit deutlich zu erkennen.

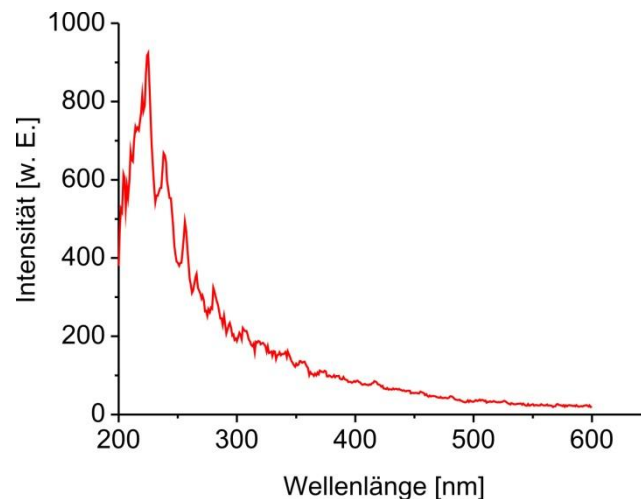


Abbildung 4.1.28: Anregungsspektrum des Quantum Dot 655, Detektion bei 655 nm.

Bei niedrigeren Wellenlängen angeregt, ist die bei 655 Nanometern gemessene Fluoreszenzintensität um ein Vielfaches höher als bei einer Anregung in der Nähe des Emissionsmaximums. Während die höchste gemessene Intensität bei einer Anregung bei 225 Nanometern bei 920 liegt, liegt diese für eine Anregung bei 600 Nanometern mit 20 um den Faktor 46 niedriger.

Um ein tiefergehendes Verständnis für die Mechanismen der Fluoreszenzlöschung der Quantum Dots zu erhalten, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Anregungswellenlänge variiert wurde. Wie bei allen vergleichenden Messungen wurden die experimentellen Bedingungen bei allen Teilmessungen lediglich in dem zu untersuchenden Parameter variiert. Um einen zusätzlichen Effekt durch geringere Quantum Dots Konzentrationen bei geringeren Anregungswellenlängen zu vermeiden wurde stattdessen die Detektorspannung der Photonenvervielfacherröhren im Fluoreszenzspektrometer verändert. Da es sich hierbei um eine rein elektronische Verstärkung des gemessenen Signals handelt, ist ein Einfluss auf die Ergebnisse der durchgeführten Messungen nicht zu erwarten. Die Experimente wurden mit den für die jeweiligen Quantum Dots stärksten Fluoreszenzlöschern durchgeführt. Somit ergaben sich erneut die Paare QD 655 und dGMP respektive QD 705 und TMP.

Die linearen Anpassungen der erhaltenen Stern-Volmer-Plots zeigt die folgende Abbildung 4.1.29.

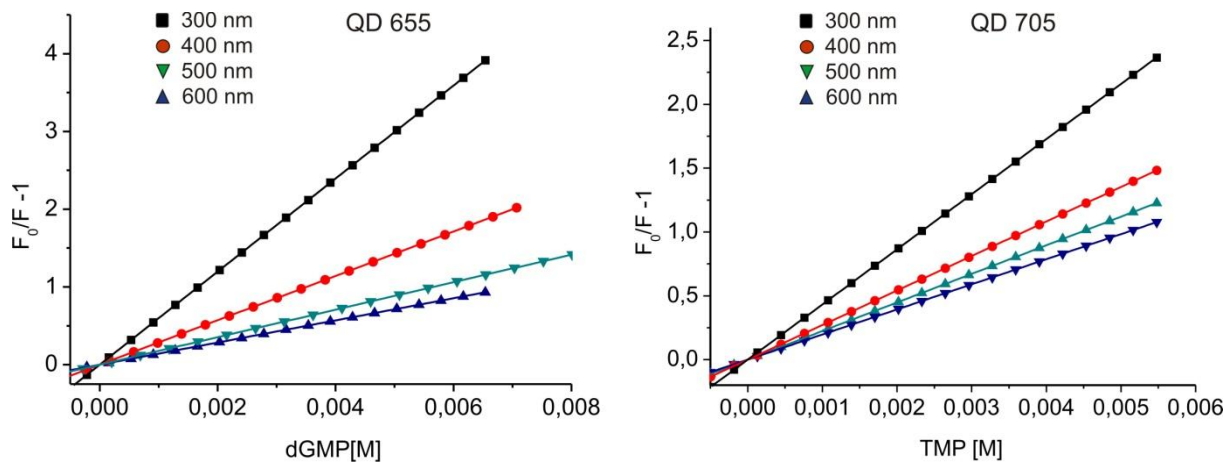


Abbildung 4.1.29: Stern-Volmer-Plots, die bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen erhalten wurden. Links QD 655 mit dGMP, rechts QD 705 mit TMP.

Es ist offensichtlich, dass die Stern-Volmer-Konstanten eine deutliche Abhängigkeit von der jeweiligen Anregungswellenlänge aufweisen. Die erhaltenen Konstanten werden in Tabelle 4.1.7 aufgelistet.

Wellenlänge	QD 655 dGMP $K_{SV} [\text{Mol}^{-1}]$	QD 705 TMP $K_{SV} [\text{Mol}^{-1}]$
600	142,4	196,5
500	176,7	224,5
400	288,5	279,7
300	591,5	431,9

Tabelle 4.1.7: Erhaltene Stern-Volmer-Konstanten bei verschiedenen Anregungswellenlängen.

Zwar ist in diesen Messungen ein deutlicher Trend zu erkennen, allerdings lässt sich dieser nicht einfach erklären. Die wahrscheinlichste Ursache dürfte darin liegen, dass die Extinktionskoeffizienten der Quantum Dots zu kürzeren Wellenlängen hin deutlich zunehmen. Die bei niedrigen Wellenlängen erzeugten Excitonen verfügen über eine deutlich höhere Energie, so dass möglicherweise aufzubringende Aktivierungsenergien für den photoinduzierten Elektronentransfer leichter erreicht werden. Um ein umfangreicheres Bild der Wellenlängenabhängigkeit zu erhalten, wurden deshalb in einem nächsten Schritt Anregungsspektren aufgenommen, während die Konzentration der Löschersubstanzen erhöht wurde. Durch eine schrittweise Erhöhung der Löscherkonzentration können somit dessen Auswirkungen auf das gesamte Anregungsspektrum in nur einer Messreihe untersucht werden. Erneut wurde

hier mit den bereits bekannten Paarungen mit den jeweils höchsten Löscheffizienzen gearbeitet. Abbildung 4.1.30 zeigt die erhaltenen Diagramme für die Quantum Dots 655 (links mit dGMP) und 705 (rechts mit TMP).

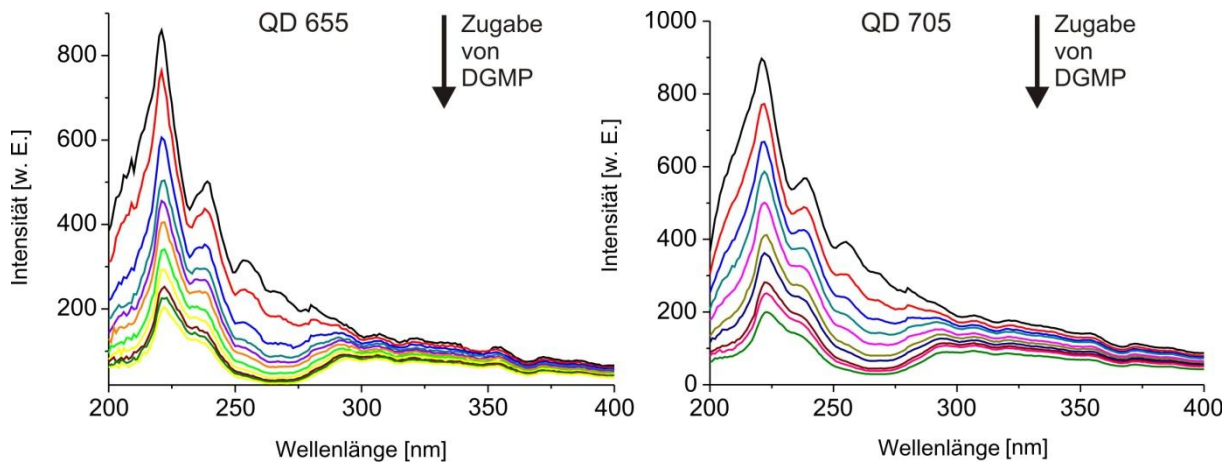


Abbildung 4.1.30: Anregungsspektren der Quantum Dots 655 (links) und 755 (rechts) bei steigenden Konzentrationen der jeweils besten Fluoreszenzlöcher.

Bereits auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzlöschung nicht streng linear mit kürzeren Wellenlängen zunimmt. In beiden Fällen fällt auf, dass insbesondere der Bereich zwischen 200 und 300 Nanometern relativ starke Unterschiede aufweist und dass sich die Fluoreszenzintensität bei Anregung bei 200 und 275 Nanometern nach den ersten beiden Zugaben bereits auf ca. 50 % des Ausgangswertes zurückgegangen ist, während am Maximum bei 225 Nanometern lediglich ein Intensitätsverlust von ca. 25 % zu beobachten ist. Wie bereits die eingangs beschriebenen punktuellen Messungen bei 300 und 400 Nanometern gezeigt haben, ist der Einfluss in diesem Wellenlängenbereich zwar sehr signifikant, aber nicht mit den sehr starken Effekten im noch kurzwelligeren Bereich zu vergleichen. Zu einer tiefergehenden Analyse wurde das Stern-Volmer-Verhältnis ($F_0/F - 1$) für jede gemessene Wellenlänge berechnet und aufgetragen. Da bereits für den oben angezeigten Bereich eine analytisch kaum erfassbare Datenmenge von 400 Datensätzen resultierte, wurde der Datenbereich manuell reduziert und nur Datensätze mit einem Abstand von jeweils 5 Nanometern wurden linear angepasst. Es wurden jeweils nur die linearen Abschnitte zu fitten, dennoch sind die absoluten Fehler bei diesen Bestimmungen signifikant größer als die bei anderen linearen Anpassungen erhaltenen. Der Grund hierfür liegt darin, dass die beobachteten Abweichungen vom linearen Modell, insbesondere bei den kürzeren Wellenlängen, deutlich stärker sind und in der Regel durch eine positive Abweichung vom linearen Verlauf auffallen. Die aus diesen linearen Anpassungen erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten sind in Abbildung 4.1.31 dargestellt.

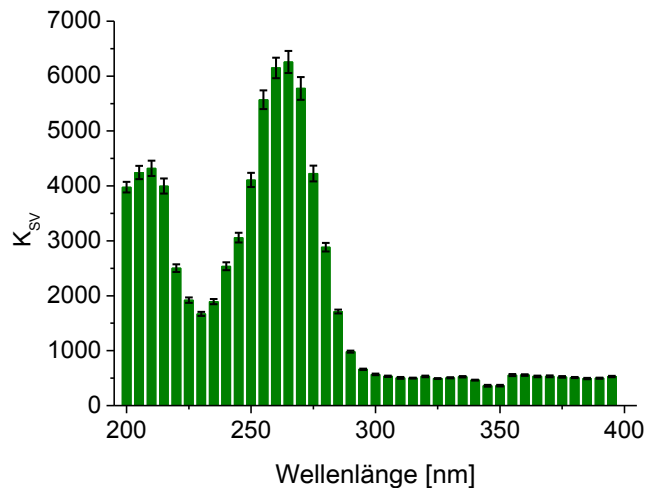


Abbildung 4.1.31: Wellenlängenabhängige Stern-Volmer-Konstanten für den Quantum Dot 655 mit dGMP.

Es fallen sofort die sehr hohen Stern-Volmer-Konstanten im Bereich zwischen 200 und 225 Nanometern sowie zwischen 250 und 300 Nanometern auf. Zwar liegen in diesem Bereich auch die Absorptionsmaxima der Monophosphate, die somit einen Großteil des Anregungslichts abfangen könnten, allerdings konnten Kontrollexperimente belegen, dass deren Einfluss auf das Anregungsspektrum der Quantum Dots auf Grund der sehr viel höheren Extinktionskoeffizienten der Quantum Dots im Bereich von 200 – 300 Nanometern (ca. ein Faktor von 1500-2000) gering sein sollte. Als Kontrolle wurde das oben dargestellte Experiment invertiert durchgeführt. Hierfür wurde eine relativ hohe Konzentration des Löschers, in diesem ca. 10 mM dGMP, vorgelegt, und danach die Konzentration der fluoreszierenden Halbleiterkristalle erhöht. Dieses Experiment wird von Abbildung 4.1.32 gezeigt.

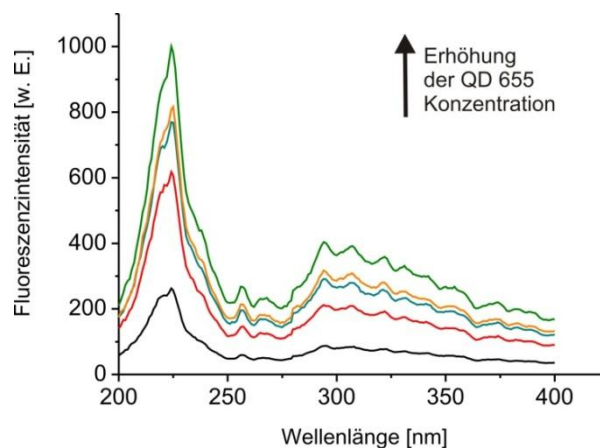


Abbildung 4.1.32: Anregungsspektren bei schrittweiser Erhöhung der Quantum Dot Konzentration. Deutlich zu erkennen ist, dass die typische Struktur sich langsam herausbildet.

Anhand dieser Abbildung kann man erkennen, dass selbst höhere Konzentrationen an

Löschsubstanzen als die in den obigen Experimenten verwendeten, nicht in der Lage sind, die das Erscheinen der Feinstruktur des Anregungsspektrums zu unterdrücken. Am Ende des Experiments war die Konzentration der Quantum Dots ungefähr doppelt so hoch wie in den „invers“ durchgeführten früheren Experimenten. Interessant ist hier insbesondere das Auftauchen zweier lokaler Maxima zwischen 250 und 275 Nanometern, das bei der schrittweisen Erhöhung der dGMP-Konzentration (Abbildung 4.1.30) bereits nach sehr geringen Zugabemengen seine Struktur verlor.

Insbesondere in diesem Bereich zwischen 200 und 300 Nanometern fällt es schwer, eine einfache Erklärung für das beobachtete Löschverhalten zu finden. Möglicherweise ist die Löschung hier besonders stark, da die Energie der im Quantum Dot entstehenden Excitonen ziemlich genau der Energielücke zwischen dem HOMO und dem LUMO in den aromatischen π -Systemen der entsprechenden Löschersubstanzen entspricht, und somit ein photoinduzierter Elektronentransfer zwischen Quantum Dot und Löscher besonders effizient ablaufen kann. Um eine weitere Aufklärung des zu Grunde liegenden Mechanismus zu erhalten, wurden Absorptionmessungen mit zunehmenden Konzentrationen von dGMP durchgeführt. Um die steigende Absorption durch die Zugabe von dGMP zu unterdrücken wurde mit einer Referenzprobe gearbeitet, in der die Konzentration des dGMP jeweils genau so groß war, wie in der eigentlichen Messküvette. Die erhaltenen Absorptionskurven werden in Abbildung 4.1.33 veranschaulicht.

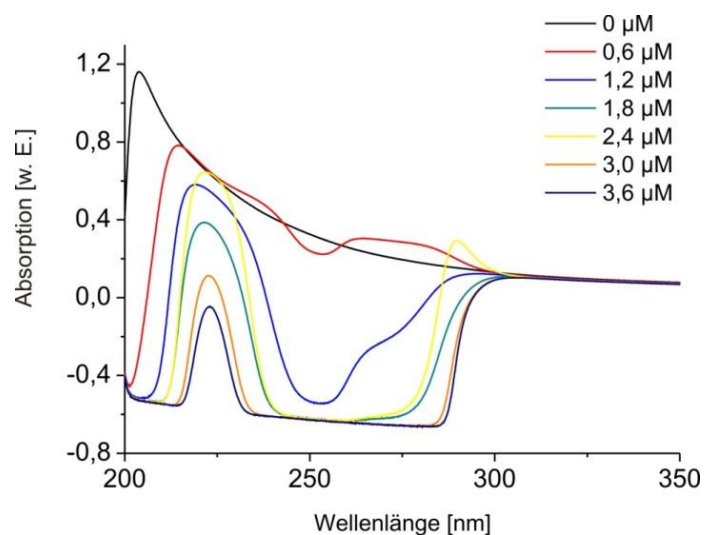


Abbildung 4.1.33: Absorptionsspektren in Abhängigkeit der dGMP-Konzentration. Die negative Absorption gegenüber der gleichen dGMP-Konzentration im Referenzstrahlengang lässt sich nur durch eine Wechselwirkung zwischen dGMP und dem verwendeten Quantum Dot 655 erklären.

Die gemessene Absorption in der Küvette ist negativ. Eine mögliche Erklärung liegt darin,

dass die Absorption des dGMP in der Probe niedriger ist, als die Absorption des dGMP in der Referenz. Da aber in beiden Küvetten dieselbe Menge an dGMP vorhanden war, muss eine Form der Wechselwirkung zwischen dem Quantum Dot und dem dGMP vorliegen, die dazu führt, dass sich die Absorptionsspektren sowohl des Quantum Dots als auch des dGMP erheblich ändern, ein weiterer experimenteller Hinweis auf das Vorhandensein eines nicht oder nur gering fluoreszierenden Grundzustandskomplexes. Somit bilden die gezeigten Anregungs- und Absorptionsspektren einen weiteren experimentellen Beleg gegen einen dynamischen Löschemechanismus.

Um die bereits eingangs erwähnte Theorie eines unterschiedlichen Fluoreszenzlöschungsmechanismus für nicht aromatische Substanzen zu testen wurden analoge Experimente mit der Aminosäure Asparagin durchgeführt. Diese hatte sich in den einführenden Experimenten als die am stärksten löschende Aminosäure für den Quantum Dot 705 herausgestellt. Auch hier wurde eine 10^{-7} M Lösung des Quantum Dots in PBS vorgelegt, definierte Stoffmengen der Aminosäure wurden schrittweise hinzugefügt. Abbildung 4.2.33 zeigt die erhaltenen Anregungsspektren und die wellenlängenabhängigen Stern-Volmer-Konstanten.

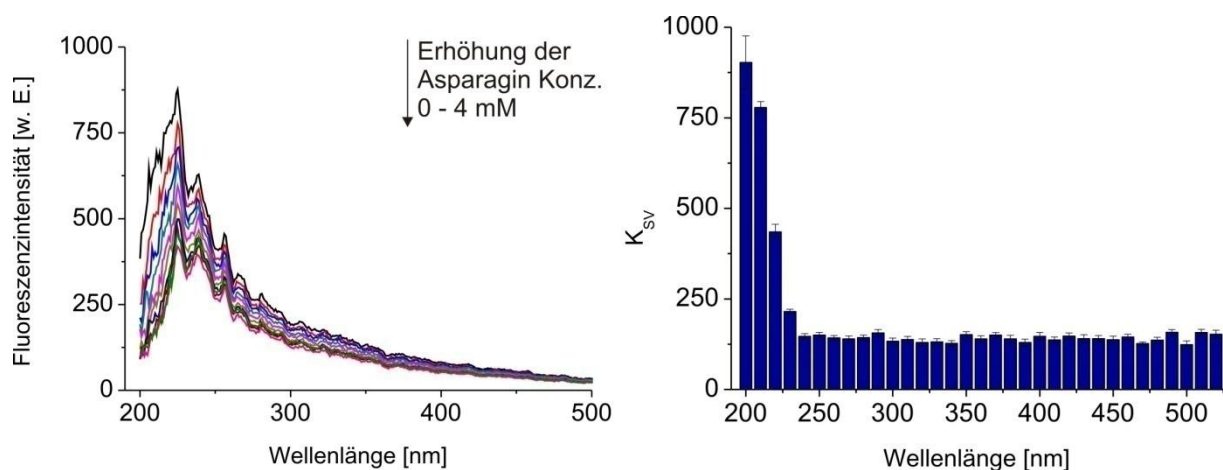


Abbildung 4.1.33: Anregungsspektren des QD 705 bei ansteigenden Asparagin-Konzentrationen und die wellenlängenabhängigen Stern-Volmer-Konstanten.

Im Vergleich zu den Abbildungen 4.1.30 und 4.1.31 fallen sofort deutliche Unterschiede auf. Es bilden sich keine charakteristischen Minima in den entsprechenden Anregungsspektren und darüber hinaus ist die ermittelte Stern-Volmer-Konstante fast über den gesamten untersuchten Bereich innerhalb der Fehlergrenzen konstant. Lediglich bei sehr kurzen Wellenlängen bis 230 Nanometer fallen deutlich Abweichungen auf. Somit ist der experimentelle Beweis unterschiedlicher Löschemechanismen für aliphatische bzw. aromatische Verbindungen gelungen.

4.1.8 Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse

Ausgehend von der phänomenologischen Beobachtung der Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots, wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, die den zu Grunde liegenden Mechanismus aufklären sollten. Bereits aus dem Verlauf der erhaltenen Stern-Volmer-Plots ließ sich auf Grund des beobachteten Sättigungsverhaltens darauf schließen, dass möglicherweise eine direkte Interaktion zwischen den Quantum Dots-Oberflächen und den verschiedenen Fluoreszenzlöschern auftreten muss. Dieser Befund ließ sich im Verlauf dieser Arbeit bestätigen. Als Wechselwirkungsmechanismus konnte nur eine Lewis-Säure - Lewis-Base Wechselwirkung infrage kommen. Hierbei wirken die Oberfläche des Quantum Dot als Lewis-Säure (respektive die Zink-Ionen aus der Schale) und die Aminofunktionen der verschiedenen untersuchten Löscher als Lewis-Basen. Es konnte gezeigt werden, dass die Löscheffizienz verschiedener Aminosäuren stark mit ihren jeweiligen pKs-Werten korreliert. Der pKs-Wert ist hier als ein Maß für die Elektronendichte an den Stickstoffatomen zu betrachten. Je höher die Elektronendichte, desto niedriger der entsprechende pKs-Wert und desto ausgeprägter ist die Nukleophilie der entsprechenden Substanz.

Eine weitere Stütze erfährt diese Hypothese durch Beobachtungen, die Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten ergaben. Es wurde gezeigt, dass eine sehr effiziente Löschung nur bei pH 7,3 erreicht werden konnte. Bei pH 6, 8 und 9 wurden im Vergleich nur recht schwache Löscheffizienzen erhalten. Offensichtlich hat der veränderte Protonierungsgrad der entsprechenden Aminofunktionen einen deutlichen Einfluss auf die Lewis-Säure-Base Wechselwirkungen.

Bei Versuchen, die zeigen sollten, ob es sich um einen reversiblen oder irreversiblen Prozess handelt, wurde gezeigt, dass es nicht möglich ist, einmal gelöschte Quantum Dots zu reaktivieren. Trotz mehrfachen Austauschs des überstehenden Puffers mit den gelösten Löschmolekülen, war es nicht möglich, die Ausgangsfluoreszenz wieder herzustellen. Ein weiterer Hinweis auf eine direkte Oberflächenwechselwirkung zwischen Quantum Dot und Löschmolekül. Daraus lässt sich ein möglicher Mechanismus auf Basis der Theorie der statischen Fluoreszenzlöschung ableiten. Zwar setzt diese die Bildung nichtfluoreszierender Grundzustandskomplexes voraus die nicht beobachtet wurden. Wahrscheinlich hingegen die Ausbildung von Grundzustandskomplexen nach folgender Gleichung:



In Anwesenheit einer hohen Anzahl von fluoreszenzlöschenden Molekülen können sich auf Grund der Größe der Oberfläche der Quantum Dots Komplexe verschiedenster Zusammensetzung ausbilden.

Neben der Koordination eines Moleküls sollte auch die Bindung mehrerer Fluoreszenzlöcher auftreten. Mit steigender Zahl der gebundenen Fluoreszenzlöcher sinkt die Quantenausbeute der jeweiligen Komplexe immer weiter ab, wodurch sich wiederum die verminderte Fluoreszenzintensität einzelner Quantum Dots bei steigenden Konzentrationen der jeweiligen Löcher erklären lassen.

Läge eine rein dynamische Fluoreszenzlöschung vor, so sollte nach mehrfachem Austausch des überstehenden Mediums und damit verbundenem fast vollständigem Entfernen der Fluoreszenzlöcher ein deutlicher Anstieg der Intensität beobachtet werden. Ob allerdings eine direkte kovalente Bindung ausgebildet wird, oder ob die Löschmoleküle in dem dichten Netzwerk der, auf der Oberfläche angebrachten, Streptavidin-Moleküle hängen bleiben, lässt sich nicht abschließend klären.

Experimente mit dem starken Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol konnten belegen, dass die Fluoreszenzlöschung auf eine Oxidation via photoinduziertem Elektronentransfer zurückzuführen ist. BME wird mit Erfolg eingesetzt, um das Flackern der Fluoreszenzintensität bei Quantum Dots zu unterdrücken. Von diesem ist bekannt, dass es durch Oxidation in Folge von Auger-Prozessen hervorgerufen wird. Für den Fall einer Oxidation des Quantum Dots durch einen photoinduzierten Elektronentransfers wurde also erwartet, dass die Löschung der Quantum Dots zumindest durch die Anwesenheit des BME reduziert werden kann. In der Tat konnte für Konzentrationen bis zu 15 μ M BME eine deutliche Reduktion der beobachteten Löschung erreicht werden. Die Stern-Volmer-Konstante konnte dadurch um mehr als 60 % gesenkt werden.

Ein weiterer experimenteller Hinweis darauf wurde in Experimenten mit dem ROXS-System, einem System aus Oxidations- und Reduktionsmitteln, gefunden. Untersuchungen an einem Weitfeld-Mikroskop zeigten, dass in Anwesenheit dieses Systems nicht nur das Quenching des Quantum Dot 655 durch dGMP vollständig unterdrückt wird, sondern die beobachtete Fluoreszenzintensität sogar noch beträchtlich ansteigt. Durch eine Untersuchung der Intensitätshistogramme konnte der Grund für dieses unerwartete Verhalten in einer vollständigen Unterdrückung des *Blinking* gefunden werden. Auf Grund der Sauerstoffempfindlichkeit dieses Systems konnten damit keine Küvettenexperimente durchgeführt werden. Stattdessen wurde Trolox als Reduktionsmittel in den wässrigen PBS-Puffer hinzugefügt und sein Effekt gesondert untersucht. Auch hier zeigten sich sehr positive Auswirkungen; die Stern-Volmer-Konstante verminderte sich unter diesen Bedingungen um nahezu 95 % in einen kaum mehr signifikanten Bereich. Aus bisher unbekanntem Gründen, wirkt sich das System nicht auf das Verhalten des Quantum Dot 705 aus. Es ist jedoch denkbar, dass dieses Verhalten mit den elektrochemischen Potenzialen der Quantum Dots zusammenhängt.

Da diese allerdings nicht bekannt sind, bleibt diese Vermutung zunächst reine Spekulation. Experimente, die den Einfluss der gewählten Anregungswellenlänge auf die beobachtete Fluoreszenzlöschung klären sollten, zeigten eindeutig, dass energiereichere Anregungen mit Licht kürzerer Wellenlängen zu einer Erhöhung der Löscheffizienz führten. Die minimale Energie, die zur Anregung der Quantum Dots verwendet werden kann, liegt im Bereich des Emissionsmaximums. Da Quantum Dots allerdings, anders als organische Fluorophore, nicht über ein schmalbandiges Absorptionsspektrum sondern über ein Anregungskontinuum verfügen, führt Anregung mit energiereicherem Licht zu Excitonen (Elektron-Loch-Paaren) höherer Energie. Die Theorie des photoinduzierten Elektronentransfers besagt, dass dessen Reaktionsgeschwindigkeit stark von der Energie, der beteiligten „Orbitale“ abhängt. Zwar verfügen Quantum Dots nicht über Orbitale sondern über sogenannte Bänder, dennoch scheint es gerechtfertigt hier zur Vereinfachung auf dieses Konzept zurückzugreifen. Ein höher energetisches Exciton entspricht somit einem energetisch höher gelegenen LUMOs eines organischen Fluorophors. Je energiereicher das Exciton ist, desto schneller sollte der Photoelektronentransfer ablaufen und somit im Vergleich zur Fluoreszenz „konkurrenzfähiger“ werden. Absorptionmessungen zeigten deutlich an, dass zwischen den Löschmolekülen und den verwendeten Quantum Dots ein Grundzustandskomplex ausgebildet wird, der sowohl die Absorption des Quantum Dots als auch die des verwendeten dGMP beeinflusst.

Bei der Unterscheidung zwischen dynamischer und statischer Löschung wurden hingegen widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Zwar zeigten Fluoreszenzlebensdauermessungen, dass während der Fluoreszenzlöschung nur in einem einzigen Fall eine signifikante Verkürzung aufgetreten ist, und somit fast ausschließlich statische Löschung auftreten sollte. Andererseits zeigten Stern-Volmer-Experimente, die bei erhöhten Temperaturen durchgeführt wurden, eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenzlöschung, die nur bei einem dynamischen Mechanismus erwartet werden kann. Möglich erscheint, dass der photoinduzierte Elektronentransfer auf einer so schnellen Zeitskala abläuft, dass eine so kurze Lebensdauer resultiert, dass diese unter den zur Bestimmung der Lebensdauer von Quantum Dots nötigen experimentellen Parametern nicht erfasst werden.

Eine Anpassung der erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten an eine Arrhenius-Kinetik zeigte durch einen streng linearen Verlauf zumindest eindeutig, dass bei höheren Temperaturen keine weiteren strahlungslosen Desaktivierungspfade mit anderen Kinetiken entstehen.

4.2 Mechanistische Untersuchungen der Diffusion durch den Kernporen-Komplex mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

In diesem Teil der Arbeit sollte versucht werden, geeignete Messbedingungen zu finden, um Fluoreszenzkorrelationsmessungen unter physiologischen Bedingungen in künstlich modellierten zytoplasma- und kernporenähnlichen Messmedien durchzuführen. Die Untersuchung der Diffusionsvorgänge in einem biomimetischen dreidimensionalen Nachbau des Kernporenkomplexes ist auf Grund der hohen dafür benötigten Mengen an ungefähr 30 verschiedenen Nukleoporinen nicht möglich gewesen.

Stattdessen wurden die entsprechenden Messungen in Lösung durchgeführt. Um unter physiologisch relevanten Bedingungen, d. h. bei Proteinkonzentrationen im Bereich von ungefähr 400 mg/ml durchführen zu können, mussten folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden:

1. Wahl eines geeigneten Farbstoffs, dessen photophysikalische Eigenschaften (Photozerstörung, Triplettscharakteristik) zur Untersuchung von Diffusionsvorgängen bei schwierigen experimentellen Bedingungen geeignet sind.
2. Modellierung eines künstlichen Zytoplasmas: Um einen Vergleich zwischen Diffusion in zytosolischen Medien und den Bedingungen im Kernporenkomplex zu erreichen, musste ein wasserlösliches Proteingemisch entwickelt werden, welches Proteinkonzentrationen von 300 bis 400 Gramm pro Liter erlaubt und dabei eine optische Transparenz behält, die FCS-Messungen unter diesen Bedingungen erlaubt.
3. Modifikation von Glasoberflächen, um Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche und den Proteinen oder dem zu untersuchenden Farbstoff weitestgehend zu vermeiden.
4. Herstellung von verschiedenen Nukleoporinen durch Proteinextraktion in *E. coli*, Aufreinigung auf Aufkonzentrierung. Daraus sollte der Aufbau eines biomimetischen Kernporenlumens mit hochkonzentrierten *FG-Repeats* erfolgen, anschließende FCS-Messungen in diesen Medien sollten einen Vergleich zu Messungen in dem vorher modellierten artifiziellen Zytoplasma ermöglichen.

4.2.1 Festlegung der Messbedingungen

Die im Folgenden beschriebenen Fluoreszenzkorrelations-Messungen wurden alle mit einem Wasserimmersionsobjektiv (60x, NA 1.2, Olympus) durchgeführt. Zwar führt die Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs im Gegensatz zu Ölimmersionsoberaktiven zu einer leichten Verschlechterung des für die FCS wichtigen Signal zu Hintergrund Verhältnisses, allerdings wird dieser Nachteil dadurch aufgewogen, dass bei Verwendung von wässrigen Proben, ein zusätzlicher Brechungsindexunterschied vermieden werden kann. Es ist bekannt, dass die FCS relativ empfindlich gegenüber Brechungsindexwechseln reagiert und bereits kleinere Abweichungen im Brechungsindex zu starken Schwankungen der gemessenen Diffusionszeiten führen können [Enderlein 2005]. Somit ist die Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs bei Messungen in wässrigen Lösungen zu bevorzugen.

Sofern nicht ausdrücklich anders erwähnt, wurden Farbstoffkonzentrationen im Bereich von 10^{-10} M verwendet. Diese Konzentration wurde gewählt, da sie niedrig genug ist, um sicher zu gehen, dass im zeitlichen Mittel nicht mehr als 1 Molekül im fokalen Volumen vorhanden ist, und auf der anderen Seite hoch genug ist, dass es keine längeren Zeiten gibt, in denen keine Fluoreszenz beobachtet wird.

Die Messungen selber wurden mit einer gepulsten roten Laserdiode mit 635 nm bei einer Leistung von 150 μ W und einer Repetitionsrate von 40 MHz durchgeführt. Es wurden jeweils drei bis zehn Messungen à 30 Sekunden durchgeführt, die erhaltenen Korrelationskurven wurden mittels einer Hardware-Korrelatorkarte gemittelt und in Origin 7.5 ausgewertet. Parallel mit der Software ANALinescan aufgenommene Fluoreszenzintensitätsspuren wurden mittels des Programms DatascreenerBTL ausgelesen und korreliert.

Die erhaltenen Korrelationsfunktionen wurden mit dem folgenden Modell für eine freie dreidimensionale Diffusion unter Berücksichtigung eines Triplett-Terms angenähert.

$$G(\tau) = (1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}}) \cdot \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_d}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{\omega_1}{\omega_2}\right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}}$$

Zusätzliche Informationen zur Methode der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie finden sich in Abschnitt 2.2, die detaillierte Funktionsweise der verwendeten Software findet sich in Abschnitt 3.9.

4.2.2 Wahl eines geeigneten Fluorophors

Bei der Wahl eines geeigneten Farbstoffes zur Untersuchung der Diffusion in zytosolischen Medien wurde zunächst eine ganze Reihe rot-fluoreszierender Farbstoffe untersucht, die mit einer 635 nm Laserdiode angeregt werden konnten. Neben den ATTO-TEC Farbstoffen ATTO 620, ATTO 633, ATTO 635, ATTO 647-N und ATTO 655 wurden CY 5 und der kommerziell nicht erhältliche Farbstoff MR 121 auf ihre Eignung für FCS-Experimente hin untersucht. Von besonderem Interesse waren hierbei die Photophysik der Farbstoffe und insbesondere ihre Triplettscharakteristik, die sich durch mehr oder weniger stark ausgeprägte Schwankungen in der Korrelationsfunktion auf der Mikrosekunden-Skala zeigt. Abbildung 4.2.1 zeigt beispielhaft die Korrelationskurven von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen.

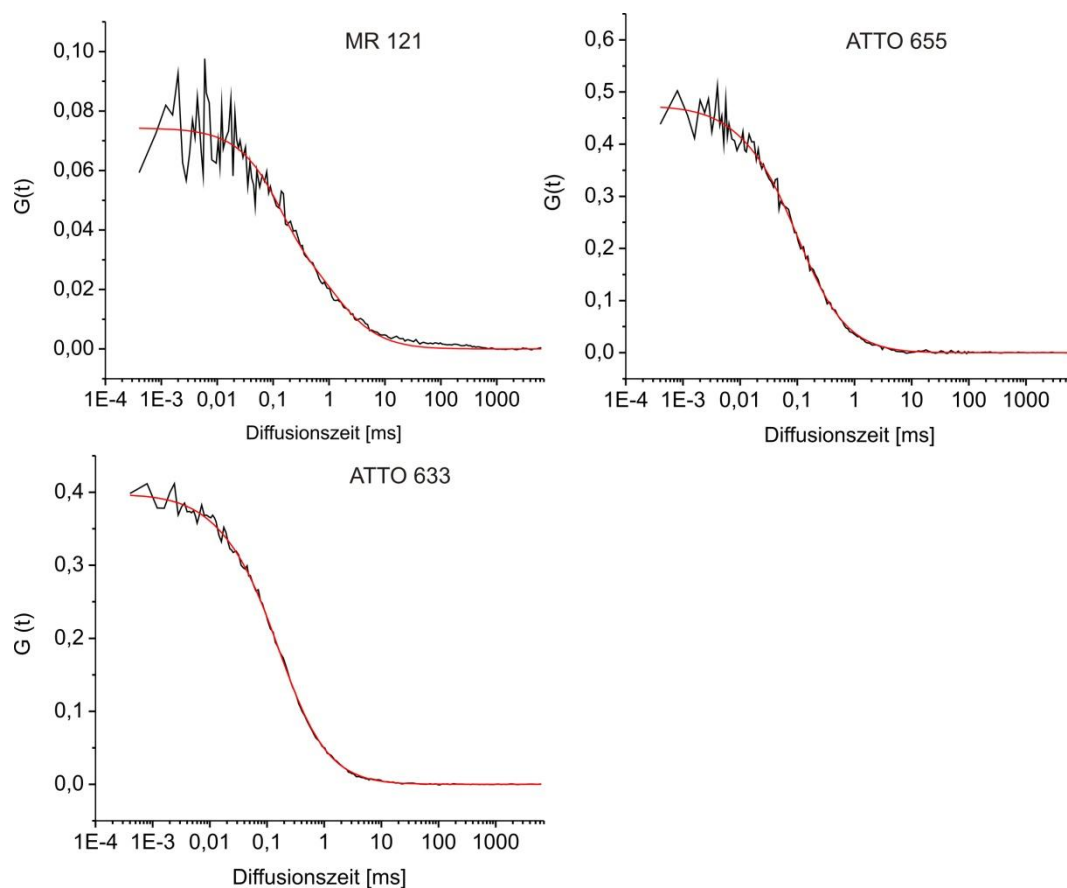


Abbildung 4.2.1: Fluoreszenzkorrelationskurven von drei unterschiedlichen Farbstoffen: MR 121 (oben links, ATTO 655 oben rechts und ATTO 633 unten). Gezeigt ist jeweils die gemittelte Autokorrelationsfunktion von 5 Messungen à 30 Sekunden sowie die angepasste Modellfunktion.

Es ist zu erkennen, dass sich die Triplettscharakteristik der einzelnen Farbstoffe deutlich voneinander unterscheidet. Dieses Verhalten wurde auch erwartet, da die drei Farbstoffe zu unterschiedlichen Farbstoffklassen gehören. Insbesondere der Farbstoff MR 121 zeigt hier einen besonders auffälligen Triplettsanteil, der die Auswertung von Korrelationskurven in

komplexeren Messungen deutlich erschweren kann. ATTO 655 und ATTO 633 scheinen deshalb deutlich besser geeignet zu sein. Neben der reinen Photophysik wurde auch darauf geachtet, dass die Fluoreszenz des verwendeten Farbstoffs möglichst nicht durch Tryptophan gelöscht wird, da dieser in späteren Experimenten als Aktivester an verschiedene Proteine gekoppelt werden sollte. Für die Farbstoffe MR 121 und ATTO 655 ist eine Löschung der Fluoreszenz durch Tryptophan allerdings literaturbekannt [Sauer 1995].

Aus diesen Überlegungen fiel die Wahl auf den Farbstoff ATTO 633, um diese Wahl zu bekräftigen wurden weitere grundlegende Experimenten durchgeführt, die die Eignung endgültig feststellen sollten. In einem ersten Schritt wurde untersucht, inwieweit sich die gemessene Diffusionszeit mit der Polarität des Lösungsmittels ändert, da bei späteren Messungen mit hohen Proteinkonzentrationen eine deutliche Veränderung der Polarität der Lösung erwartet wurde. Als Test-System wurde hierfür eine Mischung aus Wasser und Ethanol gewählt, bei der der Anteil des Ethanols kontinuierlich von 0 auf 90 Volumen-% gesteigert wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen zeigt Abbildung 4.2.2.

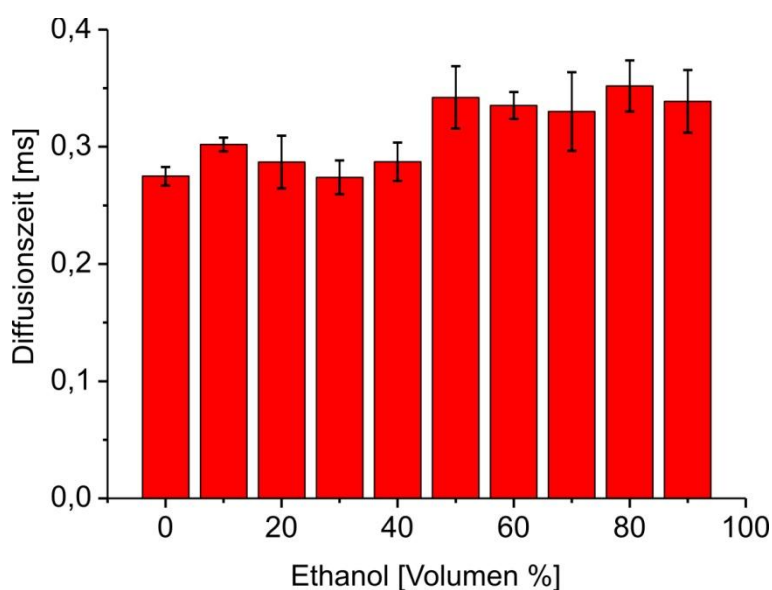


Abbildung 4.2.2: Gemessene Diffusionszeiten in Abhängigkeit des Ethanol-Anteils eines Wasser-Ethanol Gemischs.

Zwar zeigt sich bei dieser Messung ein leichter Trend hin zu längeren Diffusionszeiten bei höheren Ethanol-Konzentrationen, allerdings liegt dieser knapp oberhalb der experimentellen Fehlergrenzen, so dass dieser Effekt für ATTO 633 vernachlässigt werden kann. Zudem zeigten frühere Studien in unserer Arbeitsgruppe, dass sowohl spezifische als auch allgemeine Lösungsmittelleffekte nur einen sehr geringen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des gewählten Farbstoffs ATTO 633 ausüben [Stöhr 2008]. Die Untersuchungen zeigten weder eine deutliche Verschiebung des Emissionsmaximums, noch wurde ein starker An-

stieg oder Abfall der Fluoreszenzintensität durch veränderte Polarität oder Viskosität des Lösungsmittels festgestellt.

Es wurde bereits eingangs erwähnt, dass auch der Brechungsindex des Immersionsmedium und der zu untersuchenden Probe einen Einfluss auf die gemessenen Diffusionszeiten aufweisen kann. Dieses Phänomen konnte ebenfalls mit dem obigen Wasser-Ethanol Experiment evaluiert werden. Tabelle 4.2.1 zeigt die Brechungsindizes und Diffusionszeiten, die für die jeweiligen Wasser-Ethanol Mischungen gemessen wurden.

Ethanol [Vol%]	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Brechungs- Index	1,333	1,34	1,347	1,354	1,358	1,362	1,364	1,365	1,366	1,366
Diffusionszeit [ms]	0,275	0,30	0,287	0,274	0,287	0,342	0,335	0,333	0,351	0,339

Tabelle 4.2.1: Übersicht über den Zusammenhang von Ethanol-Anteil, Brechungsindex und Diffusionszeit. Sowohl die Polarität des Lösungsmittelgemisches als auch der Brechungsindex übt nur einen geringen Einfluß auf die gemessene Diffusionszeit des gewählten freien Farbstoffs ATO 633 aus

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, ist auch der Einfluss der Brechungsindizes, zumindest für den Bereich, den die Wasser-Ethanol Mischungen abgedeckt haben, nicht allzu groß. Als weiteres Eich- und Kontrollexperiment wurden Messungen in Glycerin-Wasser Mischungen durchgeführt. Für dieses System ist eine sehr starke Vergrößerung der Viskosität weitgehend unabhängig von einem Wechsel des Brechungsindex (vgl. hierzu Abbildung 4.2.3)

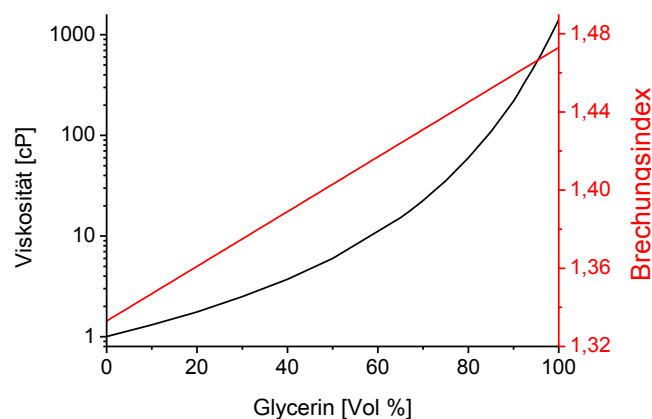


Abbildung 4.2.3: Abhängigkeit von Viskosität und Brechungsindex von Mischungsverhältnis.

Bei höheren Glycerin-Konzentrationen steigt die Viskosität der Lösung stark an, ein Effekt, der auch für die späteren Experimente bei steigenden Proteinkonzentrationen erwartet wurde. Die erhaltenen Resultate sollten somit dabei helfen, den Verlauf der Diffusionszeiten in Lösungen mit hohen Proteinkonzentrationen zu interpretieren. Die entsprechenden Experimente stellt Abbildung 4.2.4 dar.

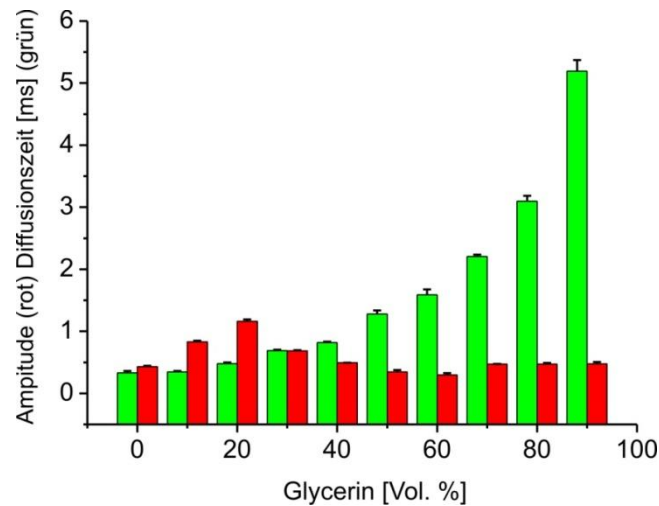


Abbildung 4.2.4: Verlauf der Diffusionszeit (grün) und der Korrelationsamplitude (rot) in Abhängigkeit des prozentuellen Anteils von Glycerin.

Neben dem Hauptparameter, der Diffusionszeit, zeigt das Diagramm auch die Amplitude der Korrelationsfunktion. Während die Diffusionszeit, wie durchaus erwartet, mit steigendem Glycerin Anteil stark zunimmt, zeigte sich, dass die Amplitude über den Verlauf der Messung nahezu konstant bleibt. Dadurch, dass eine stark veränderte Viskosität keinerlei Veränderung der Amplitude verursacht, kann davon ausgegangen werden, dass diese auch keinen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffes aufweisen. Allgemeine Lösungsmittelfekte konnten für den Farbstoff ATTO 633 in diesen Experimenten nicht gefunden werden.

4.2.3 Modellierung eines künstlichen Zytoplasmas

Um einen Vergleich zwischen freier Diffusion im Zytoplasma und der Kernpore treffen zu können, war es zunächst nötig, Messbedingungen zu finden, die denen im Zytoplasma möglichst ähnlich sind. Es ist bekannt, dass die Proteinkonzentrationen im Bereich von ungefähr 400 mg/ml liegen, und sich diese Gesamtmenge auf mehrere tausend Proteine verteilt, die mehr als 10% des Zellvolumens einnehmen [Minton 2003].

Auf Grund der hohen Komplexität des Zytoplasmas, war eine exakte Nachbildung von Beginn an nicht möglich. Stattdessen sollte versucht werden, FCS-Messungen in steigenden Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA), einem Protein mit einer molekularen Masse von 66,4 kDa durchzuführen. BSA wurde anfangs gewählt, da es ein Protein ist, das sich in relativ hohen Konzentration in Wasser lösen lässt (~ 400 mg/ml). Allerdings stellte sich heraus, dass das BSA, sofern es in höheren Konzentrationen ab ungefähr 150 mg/ml vorliegt, einen hohen Rauschen durch Eigenfluoreszenz erzeugt, das Fluoreszenzkorrelations-Messungen sehr erschwert. Zur Verdeutlichung zeigt die Abbildung 4.2.5 drei Fluoreszenzintensitätsspuren, die bei BSA-Konzentrationen von 0, 60 und 145 mg/ml aufgenommen wurden.

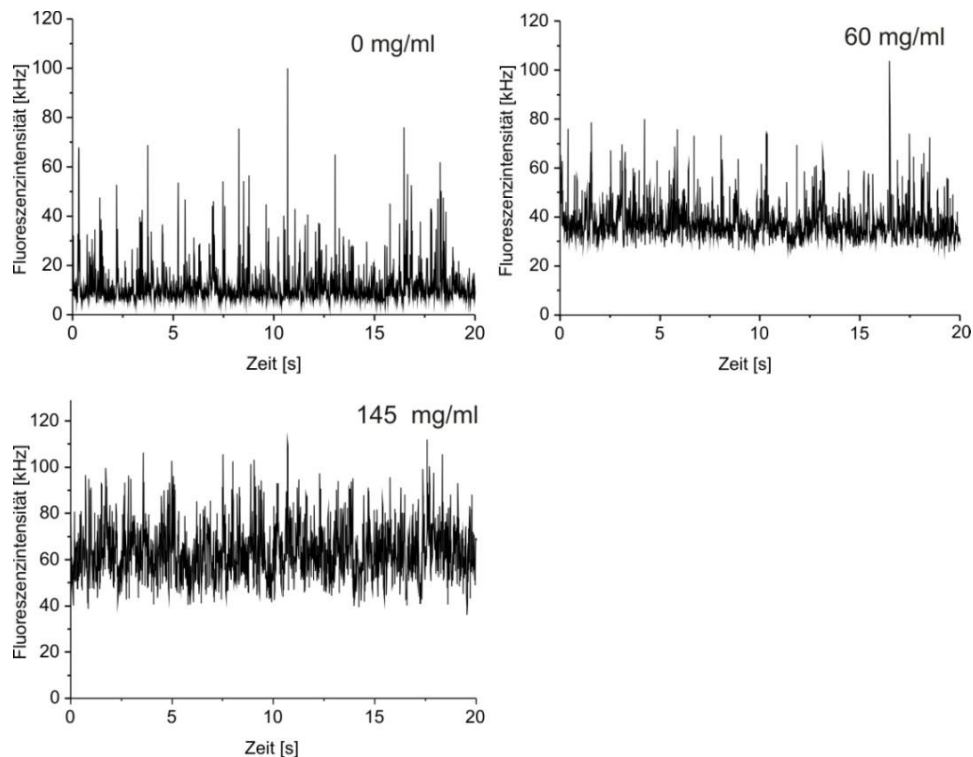


Abbildung 4.2.5: Fluoreszenzintensitätsspuren des Farbstoffs ATTO 633 bei unterschiedlichen BSA-Konzentrationen in wässrigem PBS-Puffer.

Es ist zu erkennen, dass das für die Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie wichtige Signal zu Rausch – Verhältnis bei höheren BSA-Konzentrationen merklich schlechter wird. Zeigt die Messung in reinen Wasser noch ein Signal zu Rausch Verhältnis von bis zu zehn (Signale bis 100 kHz und konstanter Hintergrund bei < 10 kHz) sinkt dieses auf Werte unter 2 bei höheren BSA-Konzentrationen mit einem konstanten Hintergrund von ca. 70 kHz. In Abbildung 4.2.6 wurden die erhaltenen Photonenzahlen pro zehn Millisekunden histogrammiert. Zur besseren Übersichtlichkeit wird die Häufigkeit logarithmisch dargestellt.

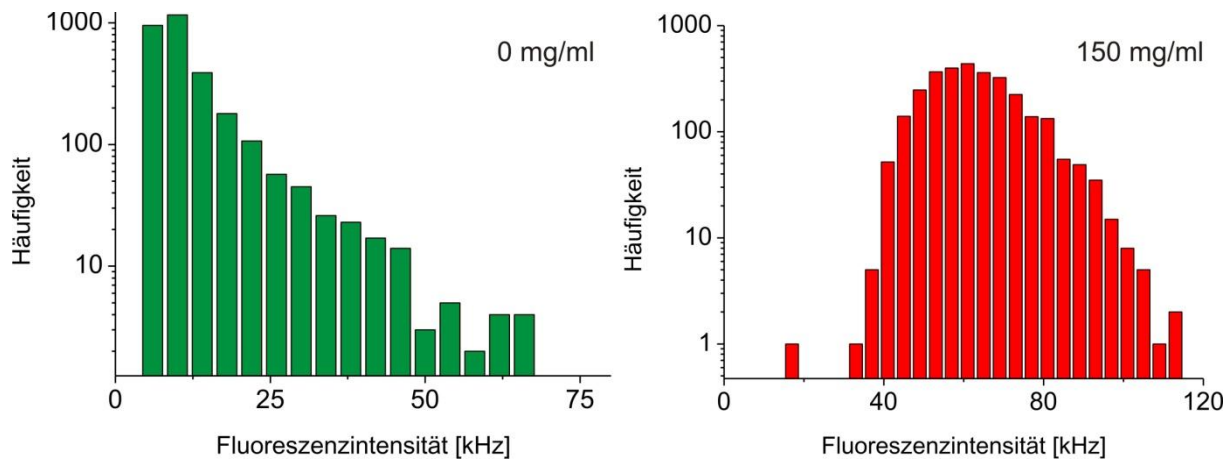


Abbildung 4.2.6: Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität. Durch die Zugabe von 150 mg/ml BSA in die Probelösung erhöht sich der Hintergrund um ein Vielfaches.

Es ist offensichtlich, dass der Schwerpunkt der Verteilung sich deutlich hin zu höheren Intensitäten verschiebt. Da die Konzentration des Farbstoffs konstant bleibt, geht die Erhöhung auf die Autofluoreszenz des BSA zurück. Die Auswirkungen dieses Abfalls im Signal zu Hintergrund Verhältnis auf die resultierenden Korrelationsfunktionen illustriert Abbildung 4.2.7.

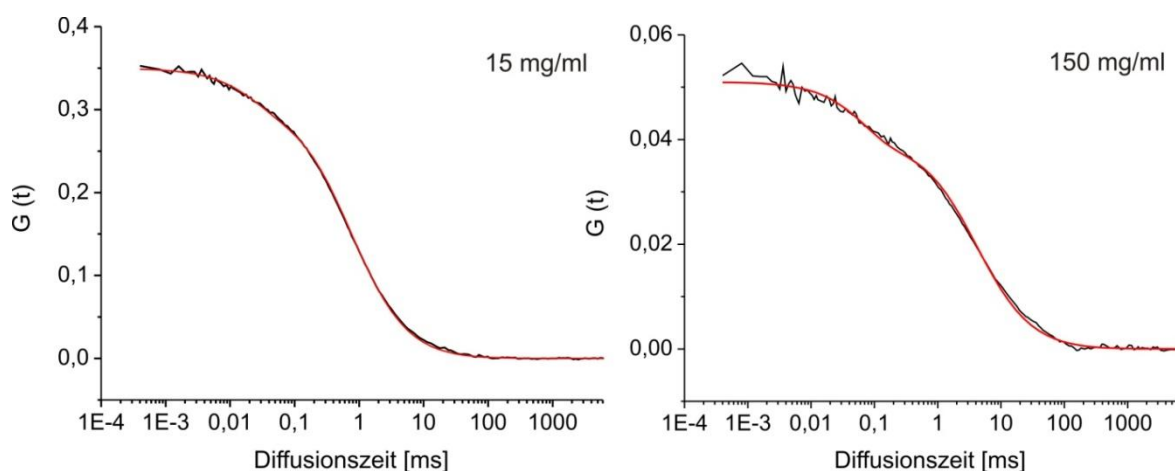


Abbildung 4.2.7: Darstellung von typischen Korrelationskurven bei niedrigen und hohen BSA-Konzentrationen. Abgebildet sind jeweils die gemittelten Korrelationsfunktionen aus fünf Messungen à 30 Sekunden und die angepassten Modellfunktionen.

Neben einem starken Absinken der Amplitude, die ein reziprokes Maß für die Konzentration der fluoreszierenden Spezies darstellt, verursacht durch die starke Hintergrundfluoreszenz des BSA, zeigen sich auch deutliche Abweichungen der Korrelationskurve von der Modellfunktion. Dadurch ergaben sich große Unsicherheiten bei der Bestimmung der Diffusionszeiten. Auch die Anpassung an komplexere Modellfunktionen unter Berücksichtigung anomaler Diffusion führte nicht zu in sich konsistenten Resultaten.

In ersten Experimenten wurden Fluoreszenzkorrelations-Messungen zur Bestimmung der Diffusionszeit des freien Farbstoffs ATTO 633 in steigenden Konzentrationen von Kälberserum-Albumin (BSA) in wässrigem PBS-Puffer durchgeführt. Ähnlich wie bei den eingangs gezeigten Messungen in steigenden Volumenanteilen von Glycerin steigt die Viskosität der Proteinlösung insbesondere bei höheren Konzentrationen stark an, so dass auch ein starker Anstieg in der Diffusionszeit erwartet wurde. Abbildung 4.2.8 zeigt die bei diesen Experimenten erhaltenen Ergebnisse. Auf Grund der erwähnten experimentellen Schwierigkeiten konnte dieser Verlauf allerdings nicht gefunden werden.

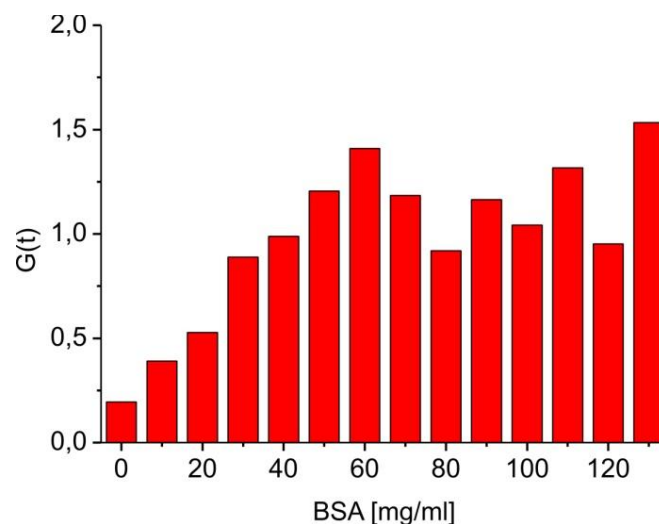


Abbildung 4.2.8: Diffusionszeit in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Ab einer Konzentration von 70mg/ml sind deutliche Abweichungen vom erwarteten Verlauf zu erkennen.

Deutlich ist zu erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 60 mg/ml ein linearer Anstieg der Diffusionszeit mit steigender Proteinkonzentration beobachtet werden kann. Bei höheren Konzentrationen allerdings ist diese Tendenz infolge störender experimenteller Schwierigkeiten nicht mehr zu beobachten. Mit dem schlechter werdenden Signal zu Hintergrund Verhältnis und den damit einhergehenden stärkeren Abweichungen der Korrelationsfunktionen vom gewählten Modell wurde die Bestimmung der Diffusionszeiten sehr ungenau. Somit wurde gezeigt, dass es nicht möglich ist, zellähnliche Proteinkonzentrationen nur unter Verwendung von BSA herzustellen.

Ein weiteres Problem war die starke Wechselwirkung zwischen der verwendeten Glasoberfläche, und den Proteinen bzw. dem Farbstoff ATTO 633. Abbildung 4.2.9 zeigt exemplarisch den zeitlichen Verlauf der gemessenen Diffusionszeit derselben Probe mit ATTO 633 als Fluorophor in einer Lösung mit einer BSA-Konzentration von 120mg/ml.

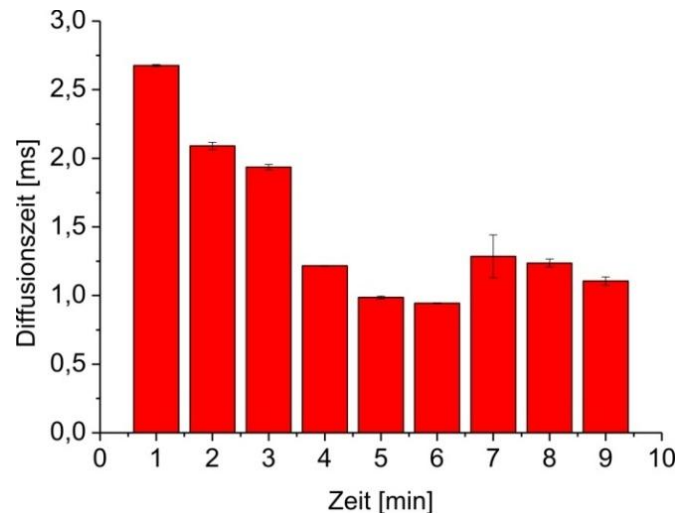


Abbildung 4.2.9: Gemessene Diffusionszeit (ATTO 633 in 120 mg/ml BSA in PBS) in Abhängigkeit der Zeit nach Fertigstellung der Probe. Die einzelnen Messzeiten betragen jeweils 30 Sekunden ohne Mittellung verschiedener Korrelationskurven.

Das in Abbildung 4.2.9 vorgestellte Experiment zeigt, dass die Diffusionszeit bereits nach wenigen Minuten um fast 60% abgenommen hat. Dieser Befund ist nur dadurch zu erklären, dass sich große Teile der in Lösung befindlichen Proteine relativ schnell adsorptiv auf der Oberfläche anlagern. Auch die Zugabe von Tensiden, z. B. Tween 20, konnte diesen Effekt zunächst nicht befriedigend unterdrücken. Um dennoch geeignete Messbedingungen schaffen zu können, wurden deshalb im Folgenden verschiedene Methoden zur Oberflächenpassivierung ausprobiert.

Die erste Methode, deren Eignung überprüft wurde, war die Oberflächenbeschichtung mit einem Poly-Ethylenglycol Polymer, das mit seinem hydrophoben Ketten eine Anlagerung der hydratisierten Proteine verhindern sollte. In der Tat zeigte diese Behandlung der Oberfläche zumindest eine deutliche Verbesserung der Messsituation. Zeigte sich bei völlig unbehandelten Oberflächen noch eine sehr starke Tendenz hin zu viel kürzeren Diffusionszeiten, so wurden mit Hilfe des Poly-Ethylenglykols bei Diffusionsmessungen des freien Farbstoffs ATTO 633 in 90 mg/ml BSA nur noch bedeutend schwächere Schwankungen innerhalb einer Messreihe beobachtet (vgl. Abbildung 4.2.10).

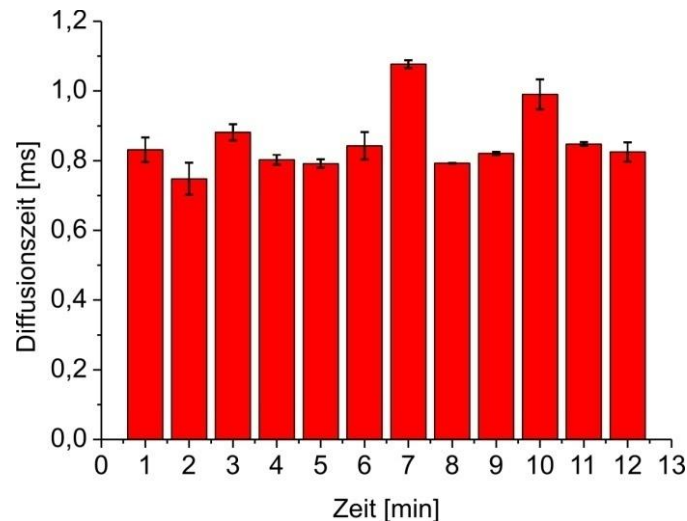


Abbildung 4.2.10: Die Verwendung von PEG-beschichteten Oberflächen zeigt eine deutliche Verbesserung der Konsistenz der erhaltenen Diffusionszeiten. Die einzelnen Messzeiten betragen jeweils 30 Sekunden ohne Mittellung verschiedener Korrelationskurven. Dargestellt sind die Mittelwerte und Fehler zweier unabhängiger Messungen. Gemessen wurde die Diffusion von ATTO 633 in 90 mg/ml BSA in PBS.

Diese Konstanz der erhaltenen Diffusionszeiten zeigt, dass die gewählte Oberflächenpassivierungsmethode Wechselwirkungen zwar nicht völlig verhindern aber dennoch sehr stark reduzieren kann.

Nachdem dieser experimentelle Unsicherheitsfaktor überwunden war, waren Messungen bei Konzentrationen bis in den Bereich von 150 bis 200 mg/ml möglich. Neben der Untersuchung der Diffusion des freien Farbstoffs wurden zusätzliche Experimenten mit farbstoffmarkierten Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden nach der Kopplung und anschließender Aufreinigung der jeweiligen Proteine über NAP-Säulen zunächst die Markierungsgrade über das Verhältnis der Absorptionen der Proteine und des Farbstoffs bestimmt. Sie lagen mit 0,49 (Farbstoffmoleküle pro Protein) für BSA und 0,39 für Ovo-Albumin jeweils in einem geeigneten Bereich. Zu hohe Markierungsgrade können durch Mehrfachmarkierung einzelner Proteine zu sehr hohen Fluoreszenzbursts führen, deren Photonenzahlen die Statistik der Korrelation dominieren obwohl nur wenige solcher Ereignisse pro Messung auftreten.

In den Messungen wurden jeweils $5 \cdot 10^{-10}$ M Lösungen verwendet, wobei sich diese Angabe auf die Konzentration des Farbstoffs bezieht. Abbildung 4.2.11 zeigt Diffusionsmessungen, von ATTO 633 und dem damit markierten Proteinen BSA und Ovo-Albumin in steigenden Konzentrationen von BSA durchgeführt worden sind.

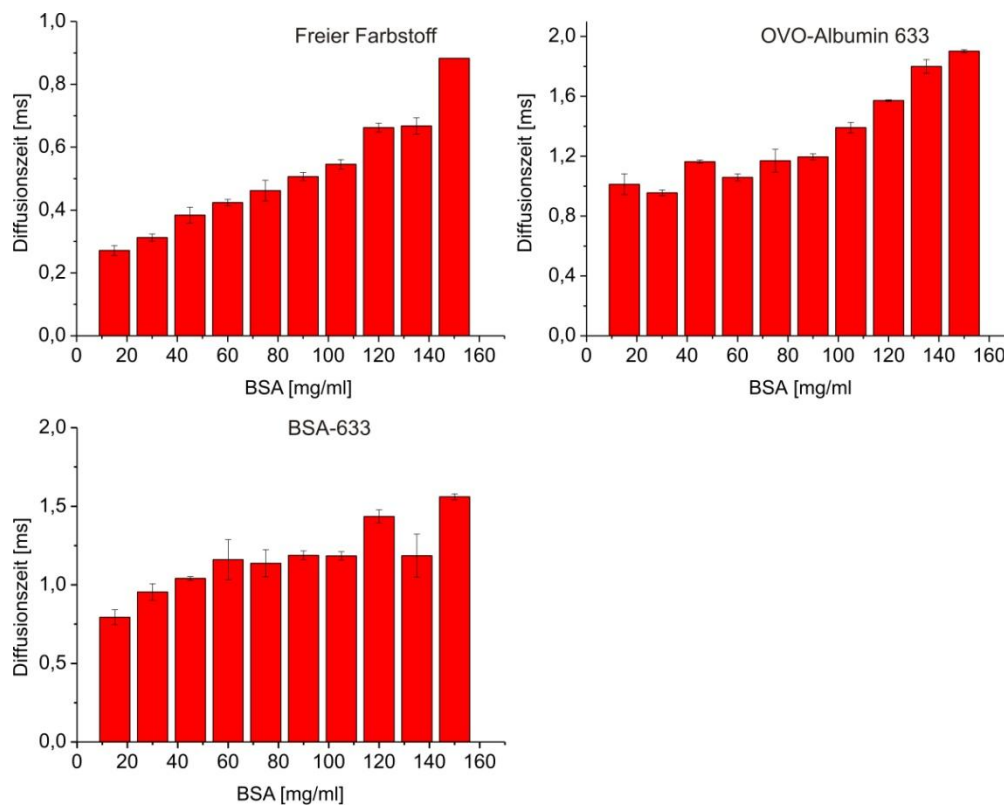


Abbildung 4.2.11: Verlauf der gemessenen Diffusionszeiten steigenden BSA-Konzentrationen für freien Farbstoff und farbstoffmarkiertes OVO-Albumin und BSA. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Messungen.

Es ist zu erkennen, dass sich bei Verwendung einer Oberflächenpassivierung eine erhöhte Konsistenz der einzelnen Messungen zueinander (vgl. hierzu Abbildung 4.2.8) ergibt. Der nahezu lineare Anstieg der Diffusionszeiten entspricht, sowohl für den freien Farbstoff als auch für die farbstoffmarkierten Proteine, den Erwartungen. Höhere Proteinkonzentrationen führen zu einer höheren Viskosität der Lösung und verlangsamen somit die freie Diffusion. Auffällig ist, dass BSA trotz einer deutlich höheren Molmasse (67 kDa gegenüber 47 kDa bei OVO-Albumin) eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit aufweist. Höchstwahrscheinlich liegt dies daran, dass es zwischen dem markiertem BSA und dem Medium zu geringeren Wechselwirkungen kommt als beim ebenfalls verwendeten OVO-Albumin. Mögliche Ursachen hierfür können in unspezifischen Wechselwirkungen zwischen OVO-Albumin und BSA oder in einer Selbstaggregation des OVO-Albumins liegen.

Um das immer noch vorhandene Problem einer starken Hintergrundfluoreszenz zu überwinden, wurde zunächst ein weiteres Protein, OVO-Albumin, auf seine Eignung hin untersucht, Messungen in hohen Konzentrationsbereichen durchzuführen. Deshalb wurden zunächst die oben vorgestellten Experimente unter Verwendung von wässrigen OVO-Albumin Lösungen als Messmedium reproduziert. Da die hier erlangten Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit denen für BSA-Lösungen waren, wurden binäre Mischungen aus den beiden Proteinen

als Medium gewählt, wobei auf OVO-Albumin und BSA jeweils die Hälfte der Gesamtmenge entfiel. Abbildung 4.2.12 zeigt die erhaltenen Resultate für die in diesem Medium durchgeführten Experimente. Neben dem bereits zuvor vermessenen farbstoffmarkierten OVO-Albumin wurde auch die Diffusion des Transportrezeptors Importin- β untersucht. Um experimentelle Fehler durch zu hohe oder zu niedrige Markierungsgrade auszuschließen wurden diese sowohl für Importin als auch für BSA bestimmt. Sie betragen 0,49 (BSA) und 0,65 (Importin) und liegen somit in einem Bereich, der ungestörte Messungen erlauben sollte.

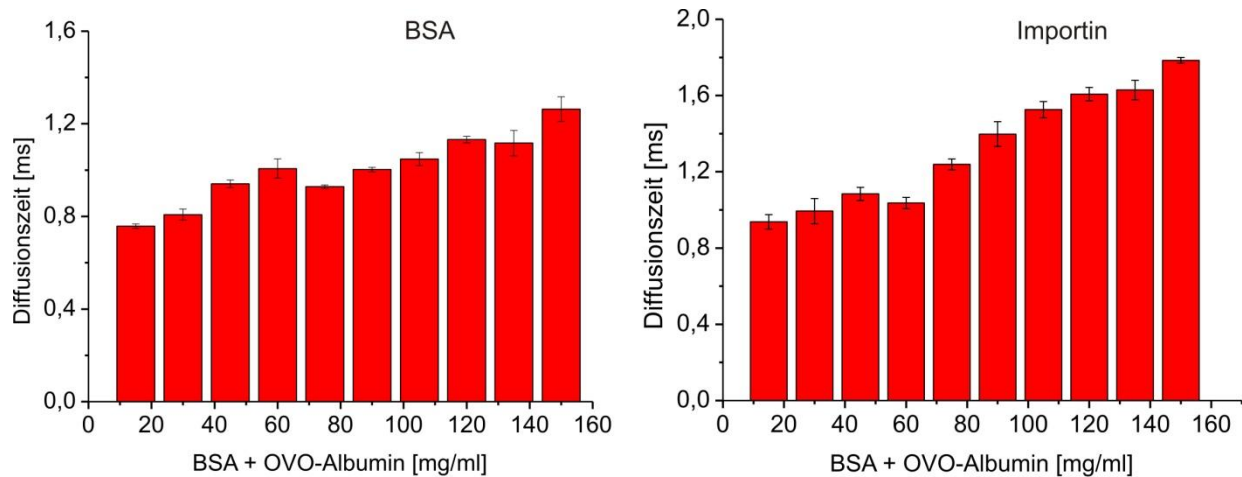


Abbildung 4.2.12: Gemessene Diffusionszeiten für die farbstoffmarkierten Protein BSA und Importin- β . Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Messungen. Das Verhältnis zwischen BSA und OVO-Albumin lag bei 1:1.

Insgesamt zeigt sich auch hier ein linearer Verlauf der Diffusionszeiten, es ist von Vorteil, dass durch die geringere Konzentration des BSA eine reduzierte Hintergrundfluoreszenz auftritt. Auffällig ist, dass die Diffusionszeit von BSA in diesem binären Gemisch deutlich kürzer ist als bei Verwendung nur eines Proteins. Möglicherweise lässt sich dieses Verhalten durch die unterschiedlichen hydrodynamischen Radien der beiden Proteine erklären. Zusätzlich scheinen reine BSA-Lösungen in gleichen Konzentrationsbereichen eine höhere Viskosität zu besitzen und somit langsamere Diffusion zu verursachen als das in diesen Experimenten verwendete 50:50 Gemisch (bezogen auf das Gewicht). Wie erwartet zeigte der Importrezeptor Importin β , der ein Molgewicht von annähernd 100 kDa aufweist, eine deutlich langsamere Diffusion als das um 30 % leichtere BSA.

Trotz der, durch die Oberflächenpassivierung, deutlich verbesserten Messbedingungen war es allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich, in physiologisch relevante Konzentrationsbereiche zu gelangen. Deshalb wurde im Folgenden insbesondere an zwei Parametern gearbeitet: Bessere Methoden zur Oberflächenpassivierung und die Herstellung von Proteinmischungen aus mehr als zwei unterschiedlichen Proteinen, um die spezifischen Nachteile einzelner Proteine bei hohen Konzentrationen abzuwenden.

Der erste Parameter konnte, wie Abbildung 4.2.13 zeigt, durch Verwendung eines Poly-L-Lysin Poly-Ethylenglykol Kopolymers weiter optimiert werden.

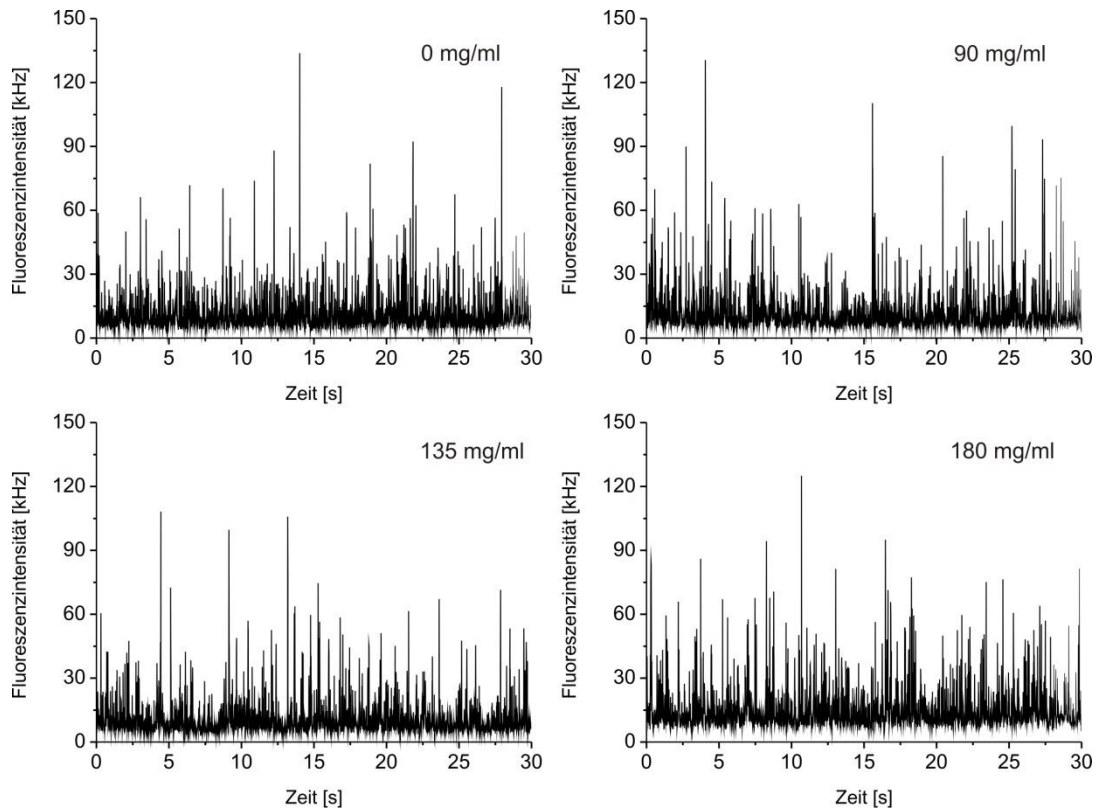


Abbildung 4.2.13: Fluoreszenzintensitätsspektren des Farbstoffs ATTO 633 bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Als Messmedium wurde ein Gemisch aus vier unterschiedlichen Proteinen (vgl. Mischung 4 aus Tabelle 4.2.2) verwendet.

In der Abbildung ist sehr gut zu erkennen, dass die Hintergrundfluoreszenz auf einen sehr niedrigen Wert zurückgegangen ist. Neben der weiteren Reduktion der Autofluoreszenz des BSA durch die Erweiterung des Messmediums auf insgesamt vier Proteine (BSA, OVO-Albumin, Pepsin und γ -Globulin) ist dieses positive Ergebnis darauf zurückzuführen, dass das verwendete Kopolymer zusätzlich einen signifikanten Fluoreszenzbeitrag durch unspezifisch auf der Oberfläche absorbiertes BSA und Farbstoffmoleküle verhindert. Bei gleich bleibenden maximalen Signalintensitäten über 100 kHz erhöht sich der Fluoreszenzhintergrund nur um ungefähr einen Faktor 2. Für sehr niedrige Proteinkonzentrationen liegt dieser deutlich unter 10 kHz und steigt bei 180 mg/ml auf 15 kHz an. Damit ergeben sich Signal zu Hintergrund Verhältnisse zwischen 15 und 8, die beide in einem für die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sehr gutem Bereich liegen. Auch für dieses Experiment zeigt Abbildung 4.2.14 die histogrammierten Fluoreszenzintensitäten zweier ausgewählter Proteinkonzentrationen; links ist eine Messung in reinem Puffer, rechts eine bei einer Gesamtproteinkonzentration von 150 mg/ml.

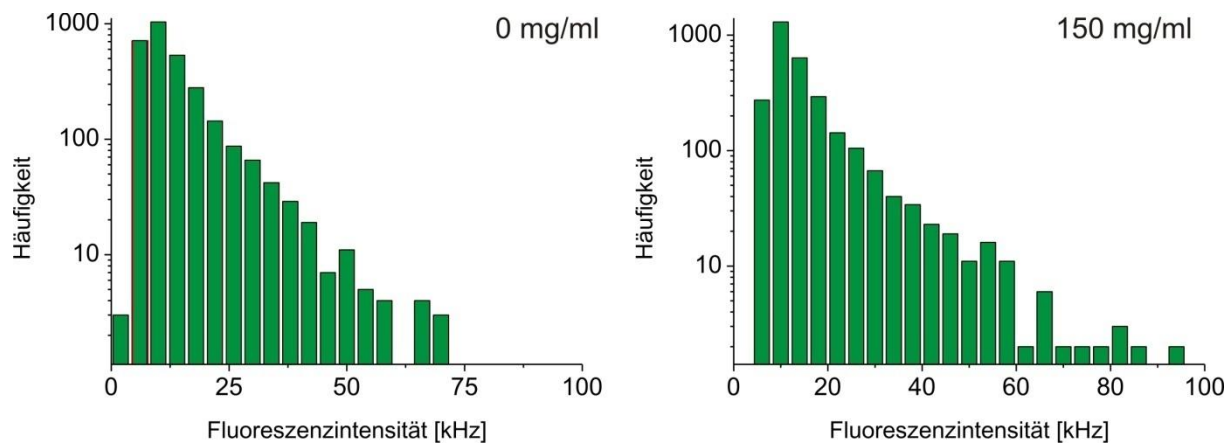


Abbildung 4.2.14: Histogrammierte Fluoreszenzintensitäten. Die Häufigkeiten sind logarithmisch aufgetragen.

Die beiden Histogramme zeigen auf, dass sich, unter Verwendung einer PLL-g-PEG beschichteten Oberfläche und von Proteingemischen aus mehreren Komponenten, lediglich sehr geringe Verschiebungen in den Diagrammen ergeben.

Um zu überprüfen, ob diese Passivierung auch über längere Zeiträume funktioniert, wurden mehrere Messungen über einen Zeitraum von drei Stunden durchgeführt. Abbildung 4.2.15 zeigt sowohl die bestimmten Diffusionszeiten als auch die Korrelationsfunktionen für eine Messung mit einer Gesamtkonzentration von 333 mg/ml (entsprechend der Mischung 3 aus der folgenden Tabelle 4.2.2) verschiedener Proteine. Als fluoreszierende Spezies wurde der Aktivester des Farbstoffs ATTO 633 verwendet.

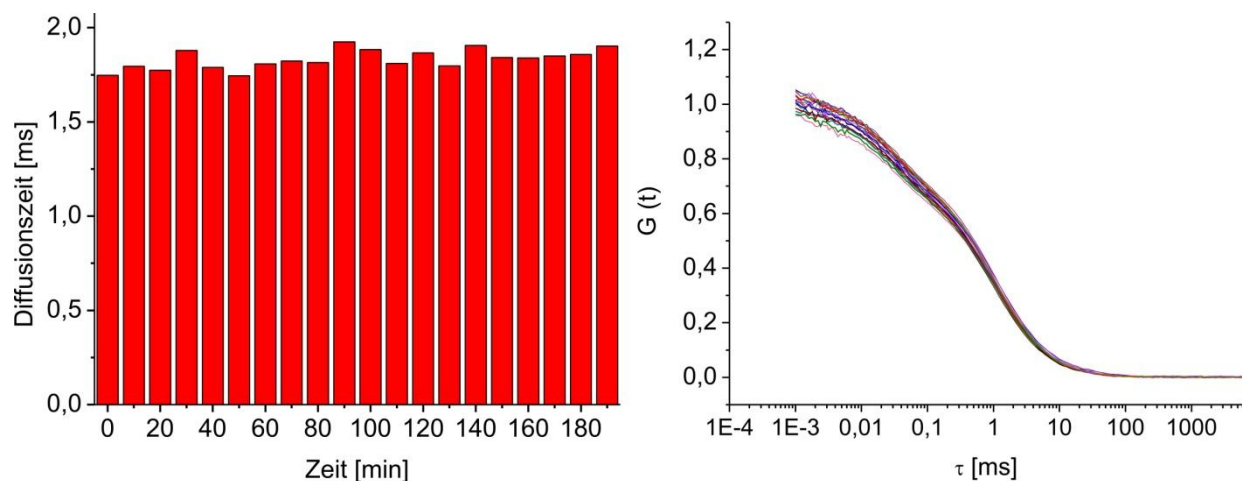


Abbildung 4.2.15: Abhängigkeit der Diffusionszeit vom Messzeitpunkt und Darstellung der zu den verschiedenen Zeiten erhaltenen Korrelationsfunktionen. Jeder Datenpunkt wurde durch Mittelwertbestimmung von drei Messungen à 30 Sekunden erhalten. Als Medium wurde eine Proteinemischung mit einer Gesamtkonzentration von 333 mg/ml verwendet. Vgl. hierzu Mischung 3 aus Tabelle 4.2.2.

Wird zunächst das linke Diagramm mit den erhaltenen Diffusionszeiten in Abhängigkeit von der Zeit seit Probenpräparation betrachtet, so wird deutlich, dass zwischen der kürzesten und der längsten Diffusionszeit lediglich eine Abweichung von 150 Mikrosekunden, bzw. unter 10 % auftritt; ein sehr guter Fortschritt gegenüber den ursprünglichen Messbedingungen (vgl. hierzu Abbildung 4.2.7). Diese Abweichung von 10 % liegt allerdings auch nur minimal über der Fehlerbehaftung der Modellanpassungen. Darüberhinaus zeigen auch die entsprechenden Korrelationskurven im rechten Teil der Abbildung 4.2.15 ein sehr einheitliches Verhalten, große Schwankungen sind auch in der Amplitude nicht beobachtet worden. Somit zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass mit PLL-g-PEG beschichtete Oberflächen auch über einen längeren Zeitpunkt in der Lage sind, adsorptive Wechselwirkungen zwischen der Probe und der Glasoberfläche zu verhindern.

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurden alle im Folgenden vorgestellten Messungen auf mit diesem Kopolymer behandelten Glasoberflächen durchgeführt.

Um die intrinsischen Probleme einzelner Proteine, die starke Autofluoreszenz des BSA und die durch das Ovo-Albumin verursachte Streuung des Anregungslichtes, bei Verwendung hoher Konzentrationen zu umgehen, wurden im Folgenden Mischungen aus bis zu vier unterschiedlichen Proteinen angesetzt. Neben den bereits erwähnten Proteinen BSA und Ovo-Albumin, kamen hierbei Pepsin (36 kDa) und eine Mischung aus verschiedenen γ -Globulinen mit molekularen Massen um 150 kDa zum Einsatz. Beide Proteine besitzen eine gute Wasserlöslichkeit (ca. 300 mg/ml) und ihre Größen erweitern den bisher vorhandenen Bereich, der bisher im Puffer gelösten Proteinmassen in beide Richtungen. Das Pepsin musste allerdings vor der Messung irreversibel inaktiviert werden, da es als Verdauungsenzym (Peptidase) ansonsten die anderen Proteine degenerieren würde. Hierzu wurde der pH-Wert der Lösung höher als pH 5 eingestellt.

Zur Herstellung der komplexeren Gemische wurden zunächst stark konzentrierte Lösungen der einzelnen Proteine angesetzt (BSA 400 mg/ml, OVO-Albumin 400 mg/ml, Pepsin 200 mg/ml und Globulin 200 mg/ml) und dann durch Vermischung dieser Grundlösungen in verschiedenen Verhältnissen die jeweiligen Messmedien mit einem Gesamtvolumen von 300 μ l erzeugt. Jede Mischung wurde in Vorexperimenten zunächst auf Eigenfluoreszenz und sonstige unerwartete Effekte untersucht. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere Mischungen mit einem hohen Anteil von Pepsin durch eine hohe Hintergrundfluoreszenz auffielen, während hohe Konzentrationen an Globulin zu einer deutlichen Verlängerung der Diffusionszeit führten.

Einen Überblick über die angesetzten Messmedien zeigt Tabelle 4.2.2

Mischung	BSA 400mg/ml [μ l]	OVO 400mg/ml [μ l]	Globulin 200mg/ml [μ l]	Pepsin 200mg/ml [μ l]	Gesamtproteinkon- zentration [mg/ml]
1	100	50	50	100	300
2	50	100	50	100	300
3	100	100	50	50	333
4	50	50	100	100	266
5	50	100	100	50	300
6	100	50	100	50	300
7	0	100	100	100	266
8	150	150	0	0	400
9	0	150	150	0	300

Tabelle 4.2.2: Überblick über die hergestellten und vermessenen Proteinmischungen.

Auffällig bei diesen Experimenten war, in welchem Maße die erhaltenen Ergebnisse von den verwendeten Mischungsverhältnissen abhängig waren. Obwohl die Unterschiede in den Zusammensetzungen nicht sehr groß waren, zeigten sich in den durchgeführten Diffusionsexperimenten teilweise komplett unterschiedliche Eigenschaften der jeweiligen Lösungen. Zur Diskussion der erhaltenen Ergebnisse soll das Diffusionsverhalten der verschiedenen Mischungen zunächst kategorisiert werden. Es muss unterschieden werden zwischen Mischungen, die ein annähernd lineares oder lineares Verhalten zeigen, solchen die einen eher exponentiellen Verlauf aufweisen und zwei Mischungen, die einen unsystematischen Verlauf verursachen. Abbildung 4.2.16 zeigt die jeweiligen Verläufe der beiden Mischungen 5 und 6.

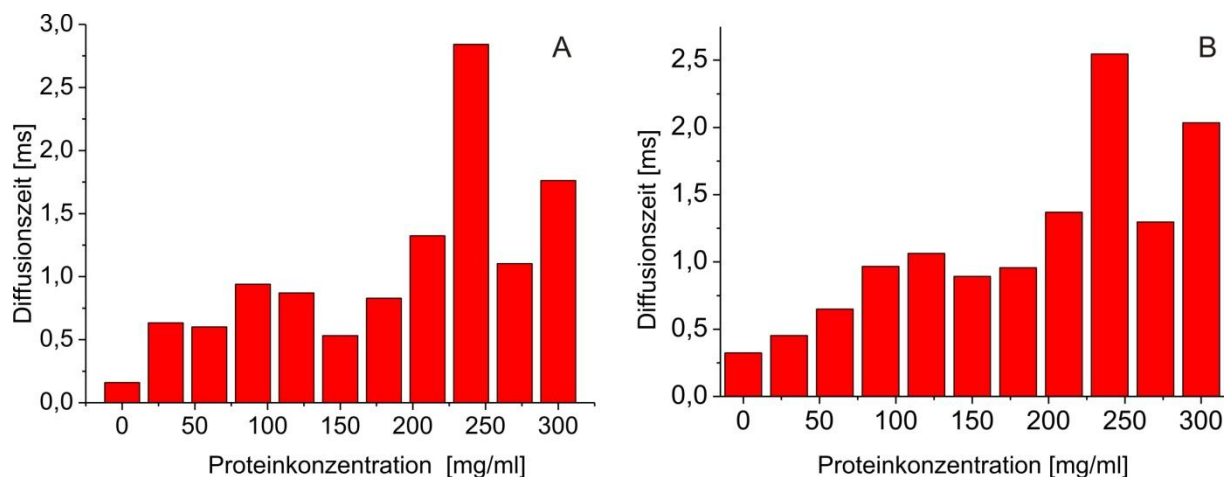


Abbildung 4.2.16: Verlauf der Diffusionszeiten des freien Farbstoffs ATTO 633 in den Proteinmischungen 5 und 6. Beide zeigen einen ähnlichen, aber unerwartet chaotischen Verlauf.

Auffällig ist die große Ähnlichkeit der beiden Diagramme. Teilabbildung A zeigt die Proteinmischung 5, während Abbildung B der Proteinmischung 6 entspricht. Beide Mischungen haben jeweils dieselben Anteile an Pepsin und Globulin, der Unterschied zwischen beiden liegt lediglich in dem Verhältnis aus BSA und Ovo-Albumin. Mischung 5 enthält insgesamt 133 mg/ml des schweren BSA und 66 mg/ml Ovo-Albumin, bei Mischung 6 ist dieses Verhältnis umgekehrt, sodass Ähnlichkeiten zwischen den Experimenten durchaus erwartet wurden.

Neben diesen chaotischen Verläufen wurde auch vier Mischungen vermessen, die einen linearen oder nahezu linearen Verlauf gezeigt haben. Hierbei handelt es sich um die Mischungen 2,3,4 und 8, die in Abbildung 4.2.17 dargestellt werden.

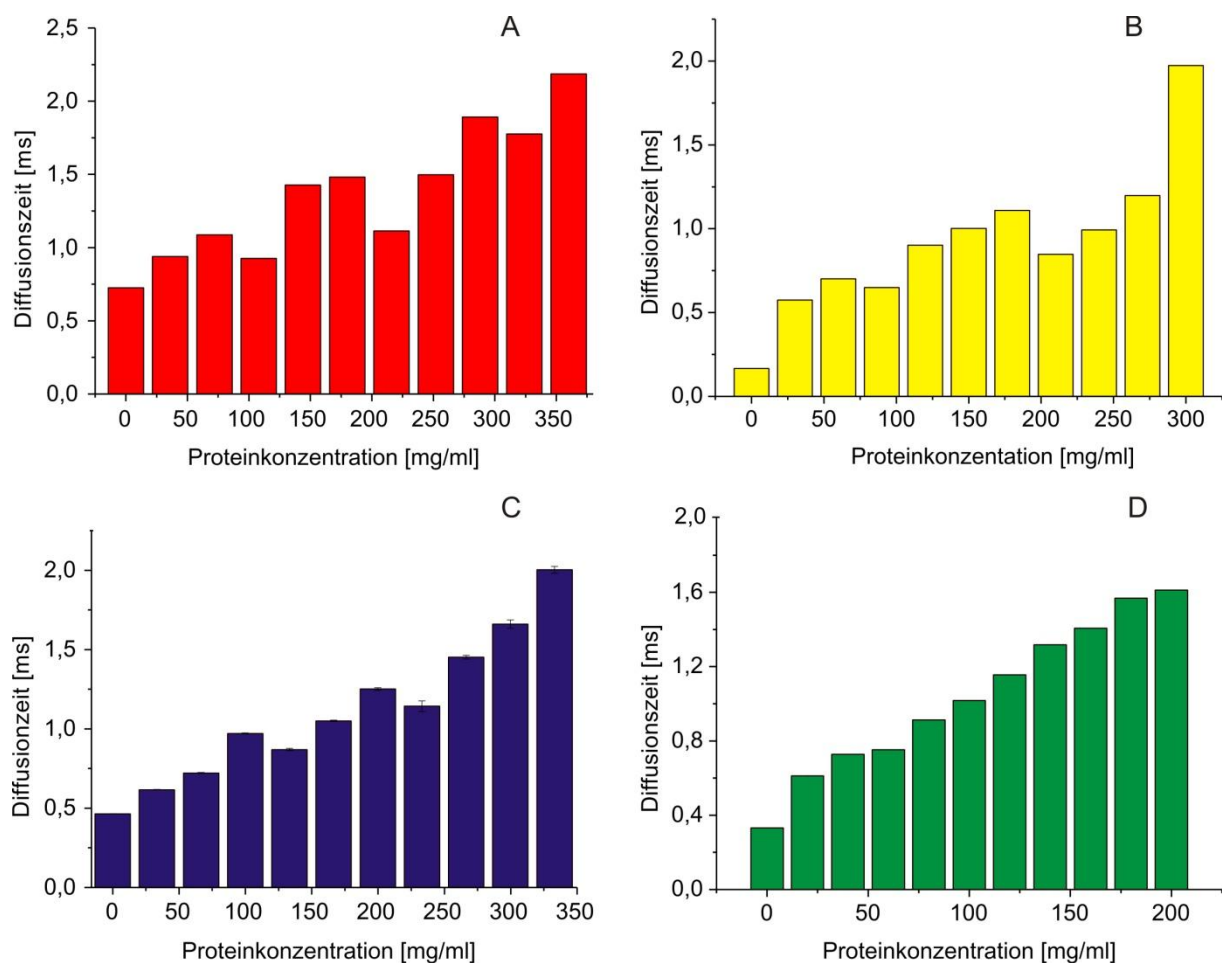


Abbildung 4.2.17: Verlauf der Diffusionszeiten für die Proteinmischungen 8 (A), 3 (B), 2 (C) und 4 (D). In allen Fällen wurde ATTO 633 als Fluorophor verwendet.

Alle dieser Messungen zeigen ein zumindest größtenteils lineares Verhalten. Insgesamt ist sehr gut zu erkennen, dass die Ergebnisse glatter werden, wenn die Anzahl der verwendeten Proteine erhöht wird. Teilabbildung A zeigt eine binäre Mischung aus BSA und Ovo-Albumin. Wie bereits eingangs diskutiert, führen beide Proteine zu spezifischen experimentellen Problemen; diese Tatsache wird durch den Verlauf widerspiegelt.

Ein zunehmender Anteil von Autofluoreszenz und gestreutem Anregungslicht führt zu Schwierigkeiten bei der Modellanpassung, wodurch die teilweise erheblichen Abweichungen von einem linearen Verlauf erklärt werden können. Eine deutliche Reduzierung der Anteile von BSA und Ovo-Albumin durch Zugabe von insgesamt 20 % an Pepsin und Globulin (Mischung 3) zeigen sich bereits etwas geringere Abweichung (Teilabbildung B), allerdings wird die Diffusion dadurch auch etwas schneller. Wird der Anteil von BSA und Ovo-Albumin weiter reduziert auf 66 % (Mischung 2), zeigt sich der Verlauf aus Teilabbildung C erhalten. Die Abweichungen konnten erneut reduziert werden. Abbildung D zeigt abschließend das Verhalten von Mischung 4, die zu je 25 % aus den vier Proteinen modelliert wurde. Auch diese Messung führt den beobachteten Trend fort, durch die sehr ausgewogene Verteilung der Proteine wurde eine sehr glatte und streng lineare Abhängigkeit der Diffusionszeit von der Konzentration erhalten. Allerdings lag die erreichte Gesamtkonzentration mit lediglich 266 mg/ml noch unterhalb der geforderten physiologischen Bedingungen.

Eine interessante Beobachtung wurde bei der Vermessung von Mischung 9 gemacht. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten wurde hier ein starker Anstieg für hohe Konzentrationsbereiche gefunden. Illustriert wird dieses Verhalten mit Hilfe von Abbildung 4.2.18.

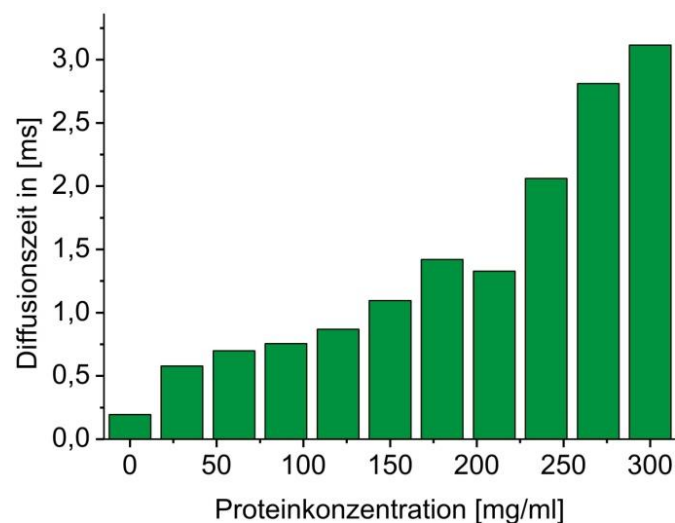


Abbildung 4.2.18: Verlauf der Diffusionszeit des Farbstoffs ATTO 633 in Mischung 9.

Spätere Experimente zeigten, dass der sehr starke Anstieg bei höheren Konzentrationen auf den relativ hohen Anteil der γ -Globuline zurückzuführen ist.

Zwei der angesetzten Mischungen, 1 und 7, konnten hingegen nicht wie geplant gemessen werden, da Kontrollmessungen bei hohen Konzentrationen schon im Vorfeld zeigten, dass sehr starke Hintergrundfluoreszenz auftreten, die auf die hohen Anteile von BSA und Pepsin zurückzuführen sind.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass insbesondere höhere Konzentrationen an Pepsin und BSA zu deutlich schlechteren Messbedingungen führten, hohe Konzentrationen von OVO-Albumin machten hingegen deutlich weniger Probleme, während größere Anteile der schweren γ -Globuline deutlich niedrigere Diffusionsgeschwindigkeiten verursachten. Gerade dieser Befund hat eine sehr große Relevanz nicht nur für die Untersuchung von künstlichen Modellsystemen sondern ist möglicherweise auch für die Interpretation von FCS-Messungen in lebenden Zellen hilfreich. Es stellte sich heraus, dass die resultierende Diffusionszeit in erster Linie nicht durch die Gesamtkonzentration an Proteinen bestimmt wird, vielmehr scheint die Größenverteilung der Proteine einen sehr großen Einfluss auszuüben. Ein Vergleich der Diffusionszeiten bei gleichen Konzentrationen zeigt, dass alle anderen Messungen bei einer Konzentration von 300 mg/ml eine deutlich niedrigere Diffusionszeit aufweisen; diese liegt in allen Fällen bei ungefähr zwei Millisekunden, nur bei der letzten vorgestellten Messung mit dem hohen Anteil an Globulin wurde eine Diffusionszeit von knapp über drei Millisekunden gemessen. Es ist also nicht möglich, über die Diffusionszeit Aussagen über die Gesamtkonzentrationen zu treffen; ebenso kann aus einer bekannten Proteinkonzentration, zumindest ohne ungefähre Kenntnis der Größenverteilung, keine solide Abschätzung der zu erwartenden Diffusionszeit abgegeben werden.

Zusätzlich musste festgestellt werden, dass bereits geringe Unterschiede in den modellierten Mischungen zu einem stark abweichenden Verhalten führen. Zwar konnten durch gezielte Variationen der Zusammensetzung Zusammenhänge gefunden werden, so z.B. die gezielte Herstellung eines Proteingemischs mit einem nahezu perfekt linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Diffusionszeit, andererseits konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, warum die beiden Mischungen 5 und 6, deren Zusammensetzungen sich nicht allzu deutlich von den anderen unterscheiden, einen komplett anderen Verlauf mit lokalen Maxima und Minima zeigen.

Aus diesen Erkenntnissen heraus wurde schließlich ein System modelliert, welches die spezifischen Nachteile einzelner Proteine berücksichtigt und trotzdem mit einer Gesamtproteinkonzentration von 377 mg/ml Messungen in einem physiologisch relevanten Konzentrationsbereich ermöglicht. Dieses wurde erreicht, indem eine Lösung angesetzt wurde, die jeweils 133 mg/ml OVO-Albumin und BSA sowie 111 mg/ml γ -Globuline enthält. Auf Grund der hohen Konzentration der Globuline musste hierbei von Anfang an mit sehr langsamer Diffusion gerechnet werden. Mit diesem Medium wurden sowohl Diffusionsexperimente mit freiem Farbstoff als auch solche mit farbstoffmarkiertem OVO-Albumin und BSA durchgeführt. Die erhaltenen Resultate stellt Abbildung 4.2.19 dar.

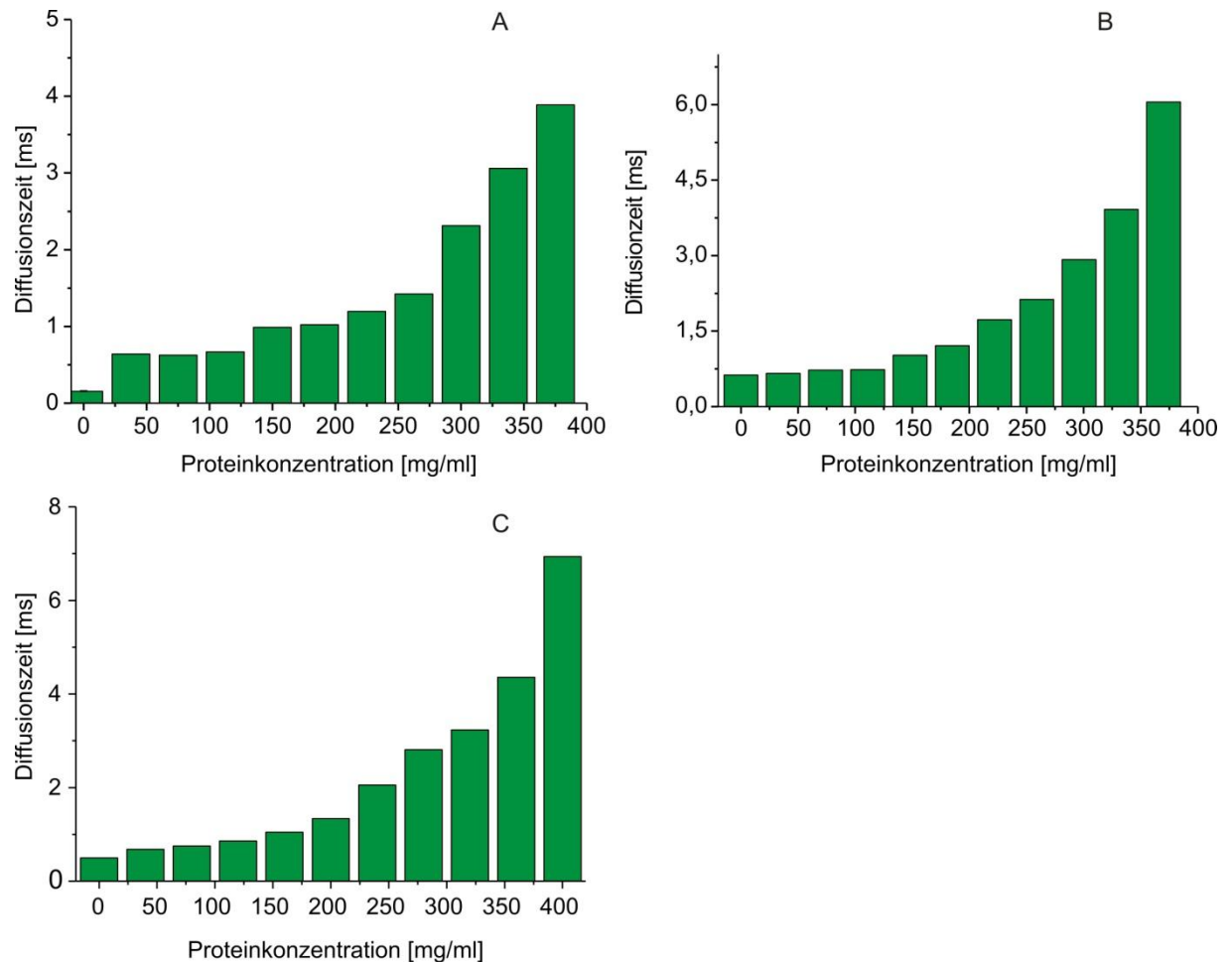


Abbildung 4.2.19: Verlauf der Diffusionszeiten von freiem Farbstoff (A), farbstoffmarkiertem OVO-Albumin (B) und farbstoffmarkiertem BSA (C). Die Diffusionszeiten wurden jeweils durch Mittelung aus drei Einzelmessungen bestimmt.

Deutlich zu erkennen ist der exponentielle Anstieg der Diffusionszeiten bei steigenden Konzentrationen ähnlich wie bei der oben erwähnten diskutierten Mischung 9. Im Vergleich zu anderen Messungen wurde deutlich, dass insbesondere der hohe Anteil an γ -Globulinen hierfür verantwortlich sein musste. Um diese These empirisch zu belegen, wurden abschließend verschiedene binäre Mischungen mit hohen Konzentrationen hergestellt. Durch Variation des Anteils der einzelnen Proteine wurde so versucht, den Einfluss der einzelnen Komponenten auf die Diffusionsgeschwindigkeit zu bestimmen.

Zum einen wurde eine Mischung aus BSA und OVO-Albumin verwendet. Begonnen wurde die Messung trotz relativ schlechter Messbedingungen bei einer Konzentration von 300 mg/ml BSA. Nach mehreren Schritten, in denen jeweils der Anteil des OVO-Albumins gesteigert wurde, erfolgte die letzte Messung bei 300 mg/ml OVO-Albumin. Ebenso wurde vorgegangen bei einem vergleichenden Experiment mit OVO-Albumin und γ -Globulinen. Die entsprechenden Ergebnisse dieser Messungen werden in Abbildung 4.2.20 präsentiert.

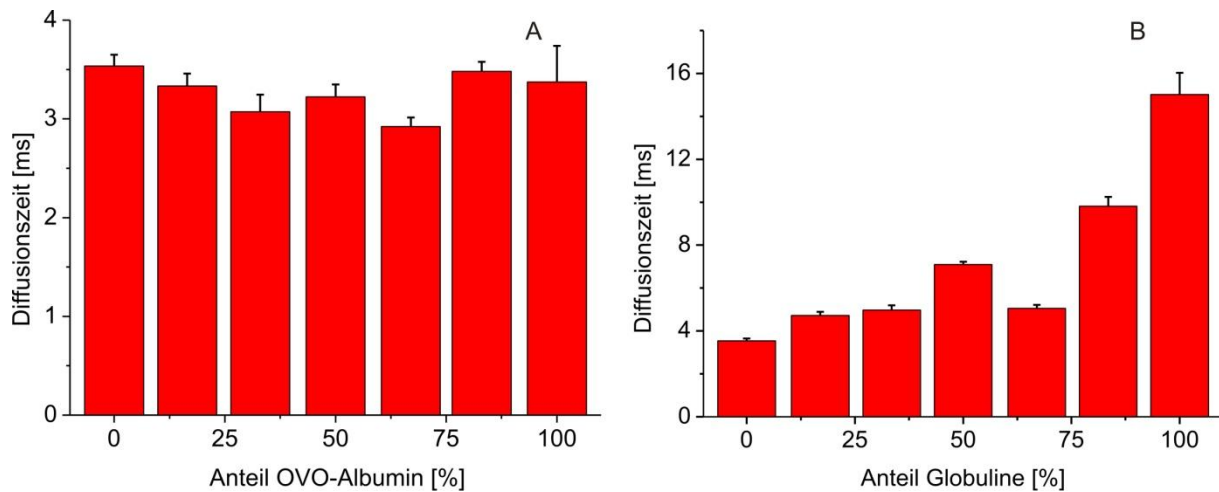


Abbildung 4.2.20: Verlauf der Diffusionszeit in binären Mischungen unter Variation des jeweiligen Konzentrationsverhältnisses der beiden verwendeten Proteine. Als fluoreszierende Spezies wurde in beiden Fällen farbstoffmarkiertes Ovo-Albumin verwendet.

Teilabbildung 4.2.20 A zeigt den Verlauf bei einem Übergang von 100 % BSA hin zu 100 % Ovo-Albumin. Für diesen Fall ist zu erkennen, dass sich durch die Veränderung der Zusammensetzung keine großen Veränderungen ergeben. Es sieht aus, als ob bei ausgeglichenen Konzentrationsverhältnissen ein Minimum in der Diffusionszeit durchlaufen wird, ein Befund der zu den eingangs Ergebnissen in binären Mischungen passt. Insgesamt ist die Diffusionszeit aber eindeutig durch die Proteinkonzentration bestimmt. Ein ganz anderes Bild zeigt Abbildung 4.2.20 B. Dargestellt ist der Gradient von 100 % Ovo-Albumin hin zu 100 % Globulinen; mit der Erhöhung des Anteils der γ -Globuline steigt die Diffusionsgeschwindigkeit sehr stark an. Beträgt sie in Abwesenheit der Globuline nur ca. 3,5 Millisekunden, steigt sie bei 100 % Globulin auf ungefähr 15 Millisekunden. In diesem Fall ist die Diffusionszeit eindeutig nur durch die Art der verwendeten Proteine bestimmt; die schweren und großen Globuline führen zu extrem langsamer Diffusion.

Mit diesen Ergebnissen ist es nun möglich, FCS-Messungen in physiologisch relevanten Proteinkonzentrationsbereichen durchzuführen. Über eine Variation des Anteils schwerer Proteine ist es möglich, die Diffusionszeit deutlich zu verlängern. Möglicherweise ist damit ein Zugang dazu geschaffen, über die Messung von Diffusionszeiten in lebenden Zellen z.B. mit der in unserer Gruppe entwickelten bildgebenden Diffusionsmikroskopie, eine Art Inventur vorzunehmen und die Verteilung größerer Proteine aufzulösen.

Experimente, die eine Verkürzung der Diffusionszeit über einen gesteigerten Anteil des eher kleinen und leichten Proteins Pepsin untersuchen sollten, scheiterten leider an einem sehr starken Fluoreszenzhintergrund. Möglicherweise ist durch den gezielten Einsatz kleiner und kompakter Proteine auch eine gezielte Verkürzung der Diffusionszeit erreichbar sein sollte.

Insgesamt zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass die Modellierung eines künstlichen Zytoplasmas eine sehr interessante aber auch zeitaufwändige Aufgabe ist. Zwar ist es möglich, durch geeignete Wahl verschiedener Proteine physiologisch relevante Konzentrationen zu erreichen, allerdings zeigt die starke Abhängigkeit der Diffusionszeiten von den exakten Mischungsverhältnissen auch, dass für biomimetische Ansätze möglicherweise eine höhere Anzahl von Proteinen verwendet werden muss, um das Verhalten eines echten Zytoplasmas, welches aus mehreren tausend unterschiedlichen Proteinen besteht, nachzuempfinden. Somit bleibt in Zukunft die gezielte Erweiterung der Proteinmischungen eine wichtige Aufgabe.

Die geplanten Vergleichsmessungen in biomimetischen Kernporenlumen hingegen konnten zunächst auf Grund der großen nötigen Menge an Nukleoporinen noch nicht durchgeführt werden. Erste, sehr zeitaufwändige Versuche zur Proteinexpression, -extraktion, aufreinigung und –aufkonzentrierung aus *E. coli* führten nur zu Ausbeuten im Bereich von wenigen hundert Mikrogramm; bei einem minimalen Probenvolumen von ca. 150 μM werden allerdings mindestens 10 – 20 Milligramm Substanz benötigt, um eventuelle Effekte untersuchen zu können. Momentan laufende Expressionsdurchgänge in sehr großen Ansätzen von 10 Litern oder mehr sollten es allerdings ermöglichen, zeitnah zumindest einige wenige Messungen durchzuführen.

Ein anderer Ansatz zum Durchführen der vergleichenden FCS-Messungen wäre eine drastische Verringerung des Messvolumens, so dass deutlich geringere Substanzmengen benötigt werden. FCS-Messungen in Nanokavitäten mit einem Durchmesser im Mikrometerbereich könnten hier eine mögliche Lösung darstellen.

4.3 Untersuchungen der Diffusion des Signalproteins CheY mit Hilfe der bildgebenden Diffusionmikroskopie DIFIM.

Mit der bildgebenden Diffusionmikroskopie (DIFIM) wurde in unserer Gruppe durch Dr. Christian Roth eine neue Technik entwickelt, mit deren Hilfe es möglich ist, Heterogenitäten der Diffusionszeit über größere Flächen, wie z. B. Zellen, zu untersuchen. Zwar gibt es auf diesem Forschungsbereich schon andere experimentelle Umsetzungen, so z. B. die Familie der ICS-Verfahren (Image correlation spectroscopy), allerdings basieren diese in der Regel auf einer CCD-gestützten Detektion. Diese CCD-Kameras bieten einen sehr guten Zugang zur großflächigen Fluoreszenzdetektion, allerdings ist damit ein deutlicher Verlust an zeitlicher und räumlicher Auflösung verbunden. Typische Bildwiederholraten von modernen CCD-Kameras liegen im Bereich von unter 1 kHz. Somit lassen sich mit diesen Methoden keine Dynamiken auf schnelleren Zeitskalen auflösen. Durch ihre Methodik bieten sie jedoch einen sehr guten Zugriff auf Diffusionsvorgänge und Dynamiken auf relativ langsamen Zeitskalen. Auf Grund der sehr niedrigen Wahrscheinlichkeiten, Korrelationen auf langen Zeitskalen zu finden, müssten hierfür bei Standard-FCS-Messungen sehr lange Messdauern gewählt werden, die zu rascher Photozerstörung führen würden.

Der in unserer Gruppe gewählte Ansatz basiert auf SFLIM (Spectrally resolved Fluorescence lifetime imaging microscopy), einer Methode, die alle notwendigen Parameter zum Aufstellen einer Korrelationsfunktion erfasst und gleichzeitig hochaufgelöste konfokale Bilder liefert. Um jedoch Dynamiken verfolgen zu können, sollte die zeitliche Verweildauer pro Bildpunkt ungefähr einen Faktor 10 länger sein, als die erwartete Zeitskala, auf der die zu beobachtenden Vorgänge erwartet werden. Diese Grundbedingung erfordert zeitliche Auflösungen im Bereich von 25 – 100 Millisekunden pro Bildpunkt und somit, je nach zu untersuchender Probe, Gesamtmessdauern im Bereich von wenigen Minuten bis hin zu Stunden.

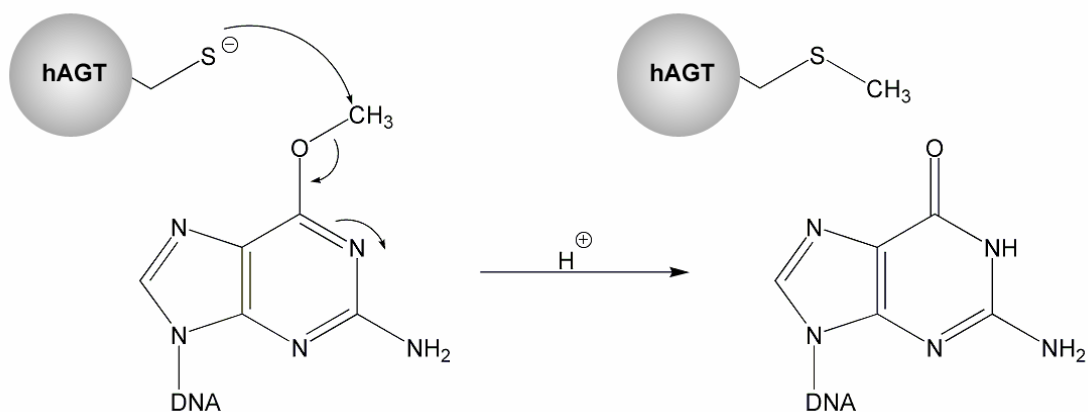
Erste Anwendungen von DIFIM in eukaryontischen Zellen verliefen zwar durchaus positiv, allerdings wurde zunächst keine relevante biologische Fragestellung untersucht. Vielmehr ging es hierbei zunächst um eine Verifizierung des Messprinzips [Roth 2007]. Deshalb sollte nun in einem nächsten Schritt ein biologisch relevantes Problem erforscht werden. Die Wahl hierfür fiel aus mehreren Gründen auf ein an der Chemotaxis in *E. coli* beteiligtes Signalprotein, CheY. Durch die Verwendung von Bakterien anstelle von eukaryontischen Zellen lassen sich drei große experimentelle Unsicherheiten eliminieren.

1. Eine deutlich reduzierte Messzeit: Auf Grund der geringen Größe der verwendeten Bakterienzellen ($2\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) kann eine gesamte *E. coli* Zelle in wenigen Minuten vermessen werden. Bei einer typischen räumlichen Auflösung von 50 Nanometer pro Pixel und 100 Millisekunden Verweilzeit benötigt eine Messung etwa 4 Minuten. Zur Aufnahme des Zellkern einer eukaryontischen Zelle (z. B. NIH 3T3 Mausfibroblasten) mit etwa $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ (also einer 50 Mal größeren Fläche) hingegen ergäbe sich bei gleicher Auflösung eine theoretische Messdauer von 200 Minuten. Zwar können durch Reduktion von räumlicher Auflösung und Verweilzeit Messdauern im Bereich von 30 Minuten erreicht werden, allerdings sind diese Zeiten deutlich zu lang, da Bewegungen der gemessenen Zelle oder deutliche Einschränkungen auf Grund von Photozerstörung auftreten können.
2. Die Einschleusung von geeigneten Fluoreszenzmarkern in das zu untersuchende System. Es ist bekannt, dass das Einbringen von fluoreszierenden Spezies in eukaryontische Zellen nicht immer einfach ist. Insbesondere rotfluoreszierende Farbstoffkonjugate, die auf Grund der deutlich geringeren Autofluoreszenz im länger welligen Bereich, von großem Interesse für die Anwendung sind, lassen sich auf Grund ihrer strukturellen Eigenschaften fast nicht verwenden. Zur Verfügung stehende chemische und physikalische Methoden zur Transfektion verursachen z. T. irreversible Schäden und tragen somit noch mehr zu experimentellen Unsicherheiten bei. Prinzipiell ließe sich dieses Problem zwar durch den Einsatz von fluoreszierenden Proteinen überwinden, allerdings weisen diese in der Regel nicht die nötige Photostabilität auf, die anspruchsvolle Mikroskopietechniken erfordern. Neuartige fluoreszierende Proteine, so z. B. *mCherry*, scheinen ersten Untersuchungen in unserer Gruppe zu Folge eine hinreichend gute Photophysik zu besitzen sind aber noch nicht umfassend charakterisiert. Bakterien besitzen Aufnahmemechanismen, die es erlauben, fast alle Fluorophore zu applizieren. Die einzige Ausnahme stellen nach heutigem Kenntnisstand Quantum Dots dar. Umfangreiche Studien in unserer Gruppe zeigten, dass Standardfluorophore wie die ATTO-TEC- oder Alexa-Farbstoffe ausnahmslos zur Markierung von *E. coli* geeignet sind.
3. Waschen der Zellen zum Entfernen überschüssiger Farbstoffkonjugate: Im Gegensatz zu Säugerzellen lässt sich überschüssiger Farbstoff in Bakterien durch mehrfaches Abzentrifugieren der Zellen größtenteils entfernen. In eukaryontischen Zellen hingegen sind solche Manipulationen nicht möglich, so dass lediglich Inkubation mit markerfreiem Medium als Möglichkeit zur Verfügung steht.

Aus diesen Gründen wurde als biologisches Ziel die spezifische Markierung von CheY und die Messung von dessen Diffusionszeiten ausgewählt.

4.3.1 Auswahl der spezifischen Markierungsmethode und eines geeigneten Farbstoffs

Da Vorexperimente gezeigt hatten, dass in der Arbeitsgruppe von Victor Sourjik vorhandene *E. coli* Klone mit CheY-GFP-Fusionsproteinen auf Grund der schlechten Photostabilität des grünfluoreszierenden Protein nicht zum Einsatz kommen können, wurde ein alternativer Ansatz zur stöchiometrischen und spezifischen Markierung der Signalproteine gewählt. Es wurde das kommerziell erhältliche Snap-Tag-System verwendet (vgl. Abschnitt 2.6). Da es wie die fluoreszierenden Proteine genetisch kodiert ist, erreicht es eine ebenso hohe Spezifität wie diese und ermöglicht darüber hinaus die Verwendung gut charakterisierter organischer Fluorophore mit der gewünschten Photostabilität. Das System nutzt die hochspezifische Enzymaktivität der O⁶-Alkylguanin-Alkytransferase (hAGT), einem humanen DNA-Reparatur Protein, dessen Aufgabe es ist, den „fremden“ Alkylrest von einem chemisch veränderten Guanin irreversibel auf eines seiner Cysteine zu übertragen. Diese Funktion bleibt auch bei Derivaten des Guanins wie Benzylguanin erhalten. Ist an dem entsprechenden Alkylrest ein Fluorophor gebunden, so wird dieses kovalent an die hAGT gebunden [Johnsson 2002]. Abbildung 4.3.1 illustriert die Funktionsweise der hAGT



4.3.1 Schematische Ablauf der Methylgruppenübertragung von einem O⁶-alkylierten Guanin auf das humane Reparaturenzym hAGT. Mechanistisch handelt es sich hierbei um eine nukleophile Substitutionsreaktion (S_N2)

Die zur Markierung notwendigen *E. coli* Klone wurden von Tanja Ehrhard in Zusammenarbeit mit der Gruppe Dr. Victor Sourjik (ZMBH, Uni Heidelberg) erstellt. Neben einem CheY-Snap-Fusionsprotein wurde auch ein Fusionsprotein mit einem Rezeptorprotein (T_{ar}) hergestellt, um die Spezifität in Bakterien zu überprüfen.

Anders als das Signalprotein, das in der ganzen Zelle verteilt sein sollte, ist bei den Rezeptoren eine Lokalisation an den Polen der Bakterienzelle zu erwarten. Abbildung 4.3.2 zeigt die Fluoreszenzintensitätsverteilungen in den Bakterienzellen für markiertes CheY und markiertes T_{ar} . Zur Durchführung der Messung wurden die Bakterienzellen auf einer Poly-L-Lysin Oberfläche immobilisiert, die Expression der jeweiligen Fusionsproteine wurde mit 3 μ M IPTG durchgeführt.

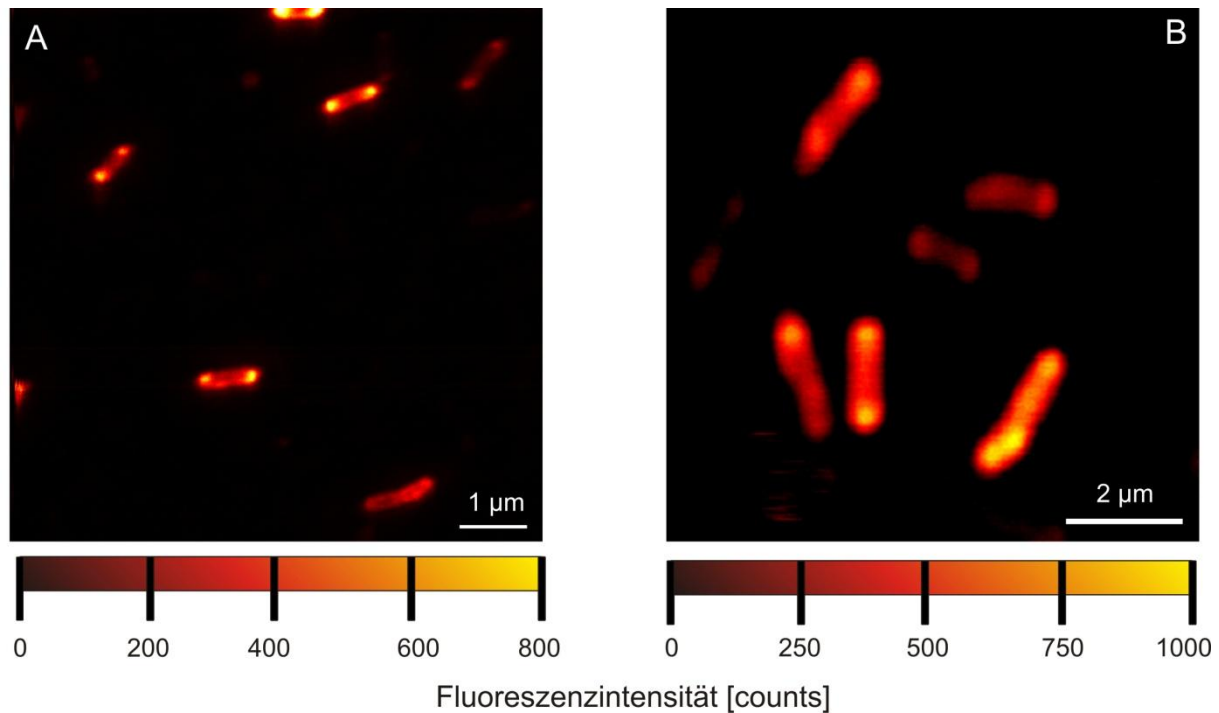


Abbildung 4.3.2: Konfokale Aufnahmen von *E. Coli* Bakterienzellen. (A) Markierung von T_{ar} -Rezeptorclustern. Bilddaten: 15 x 15 μ m, Auflösung 100 nm pro Pixel, Verweilzeit 4 ms pro Bildpunkt, Anregung 635 nm mit einer Leistung von ca. 5 μ W. (B) Markierung des CheY-Signalproteins. Bilddaten (10 x 10 μ m, Auflösung 50 nm pro Bildpunkt, Verweilzeit 4 ms pro Pixel, Anregung 635 nm mit einer Leistung von ca. 5 μ W. Verwendet wurde jeweils ein Ölimmersionsobjektiv. Als Farbstoff wurde MR 121 eingesetzt.

In beiden Fällen wurde mit dem BG-Substrat BG-MR 121 angefärbt. Aufgenommen wurden die Bilder unter Verwendung eines 100x Ölimmersionsobjektives, da dieses durch seine höhere numerische Apertur (1,45 gegenüber 1,2 für Wasser) eine wesentlich bessere laterale Auflösung aufweist. Bei später folgenden DIFIM Aufnahmen wurde allerdings ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet, da dieses sich für FCS-Messungen deutlich besser eignet (vgl. Abschnitt 2.2.4 und 4.2.2). Im Falle des lokalisierten T_{ar} -Rezeptorproteins (Abbild 4.3.2 A) ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz an den Polen um ein Vielfaches stärker ist als in den übrigen Bereichen der Zellen, insbesondere in der Zellmitte, der maximalen Distanz von den an den Polen verankerten Rezeptorclustern, ist die Fluoreszenzintensität sehr viel niedriger. Etwas weniger stark ausgeprägt ist die Lokalisierung der Fluoreszenz im Fall des Signalproteins CheY (Abbildung 4.3.2 B).

Da dieses Protein im Verlauf der Chemotaxis (vgl. Abschnitt 2.5.2) für die Signalübermittlung von den lokalisierten Rezeptorclustern hin zu den über die gesamte Zelle verteilten Flagellenmotoren verantwortlich zeichnet, wurde eine solche Verteilung allerdings auch erwartet. Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Snap-Tag Ansatz in lebenden *E. coli* Bakterienzellen zur spezifischen Markierung eingesetzt werden kann.

Neben der Spezifität der Markierung spielt auch die Möglichkeit, nicht gebundenen Farbstoff aus den Bakterienzellen zu entfernen, eine wichtige Rolle bei der Entscheidung für oder gegen die Verwendung eines Labellingsystems. Insbesondere bei eukaryontischen Zellen ist dies in der Regel nicht besonders leicht zu realisieren. Für Bakterien hingegen ist dieser Vorgang, ebenso wie das Einbringen des Farbstoffs, deutlich einfacher, allerdings ist auch hier nicht ohne Weiteres möglich, überschüssigen Farbstoff komplett zu entfernen.

Aus diesem Grund wurden verschiedene rot-fluoreszierende Farbstoffe als BG-Substrate synthetisiert und auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Neben einigen Farbstoffen, die durch Guanin und dessen Derivat Benzylguanin gelöscht werden, so z.B. MR 121, ATTO 655 und ATTO 680, wurden auch verschiedene ungelöschte Farbstoffe wie Cy 5, ATTO 633 und ATTO 647-N getestet. Studien zeigten, dass unter Verwendung von fluoreszenzgelöschten BG-Substraten die Fluoreszenzlöschung teilweise so effizient abläuft, dass Fluoreszenzanstiege um einen Faktor 10 – 20 erreicht werden, sobald das Benzylguanin durch Reaktion mit der hAGT vom Fluorophor separiert wird [Stöhr 2008].

Dieses System wurde zunächst auf seine Anwendbarkeit in lebenden Systemen hin untersucht. Zur Überprüfung, ob sich nicht gebundene BG-Substrate aus den Bakterien entfernen lassen, wurden zwei verschiedene *E. coli* Klone angefärbt. Diese Klone wurden dankenswerterweise von Dipl.-Biol. Sonja Schulmeister aus der Gruppe von Victor Sourjik zur Verfügung gestellt. In einem dieser Klone wurde die hAGT exprimiert, der andere diente lediglich als Negativkontrolle ohne hAGT Expressierung. Um möglichst eindeutige Resultate zu erhalten, wurden mit Hilfe des Expressionsmoderators IPTG relativ hohe Proteinkonzentrationen induziert (30-40 μ M IPTG). Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe, zur Detektion wurde eine hochempfindliche CCD-Kamera verwendet. Gegenüber konfokalen Messungen bietet dieses System den Vorteil, in kurzer Zeit eine große Menge an qualitativen Ergebnissen zu erzeugen.

Abbildung 4.3.3 zeigt zunächst die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten für die Anfärbung mit dem nicht fluoreszenzgelöschten Substrat BG-647 N.

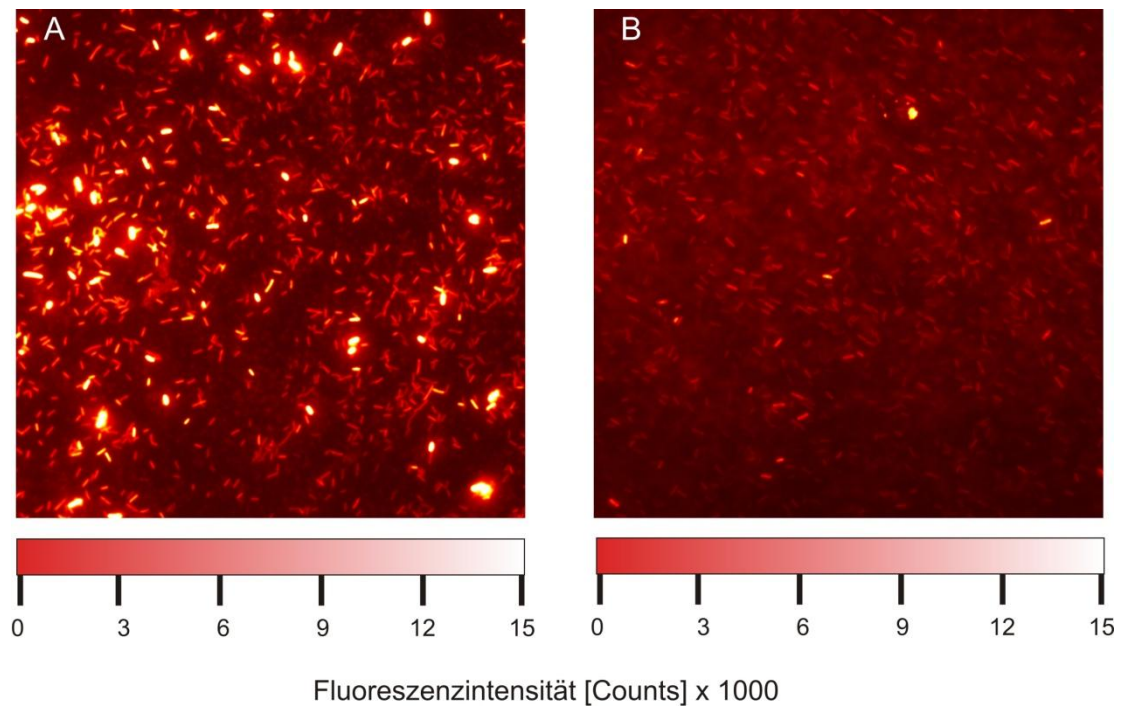


Abbildung 4.3.3: Fluoreszierende *E. coli* Bakterienzellen. (A) Klon mit hAGT Expression (B) Negativkontrolle, keine hAGT anwesend. Sichtbar ist die unspezifische Markierung in der Negativkontrolle.

Deutlich ist zu erkennen, dass die markierten *E. coli* teilweise sehr hohe Fluoreszenzintensitäten aufweisen. Insbesondere im Vergleich mit den parallel aufgenommenen Durchlichtbildern (nicht gezeigt) wurde festgestellt, dass das Substrat BG-ATTO 647N nahezu 100 % aller Bakterien angefärbt hat. Dazu wurde die höchste durchschnittliche Fluoreszenzintensität aller verwendeten Farbstoffsubstrate gemessen. Allerdings zeigt der Vergleich mit der Negativkontrolle (Abbildung 4.3.3 B), dass auch diese eine starke Fluoreszenz aufweist. Zwar ist diese im Durchschnitt um einen Faktor zwei bis drei niedriger als bei der Positivprobe, aber dennoch ist der Farbstoff nicht zur spezifischen Markierung geeignet. Ähnliche Resultate wurden auch für die anderen nicht gelöschten Farbstoffe erhalten. In allen Fällen zeigt sich eine unspezifische Markierung und dadurch eine nur etwas niedrigere Fluoreszenz in der Negativkontrolle. Allerdings wurde die hohe Effizienz der Anfärbung nur für ATTO 647N festgestellt. Andere Fluorophore wie ATTO 633 oder Cy 5 erzielten Markierungsquoten um 50 % und auch deutlich niedrigere mittlere Fluoreszenzintensitäten. Detailliertere Angaben zu weiteren durchgeführten Untersuchungen finden sich in der Dissertation von Dr. Katharina Stöhr [Stöhr 2008].

Offensichtlich ist es nicht möglich, überschüssige BG-Substrate durch einfache Waschschriffe aus den Bakterienzellen zu entfernen, so dass ein signifikanter und störender unspezifischer Fluoreszenzhintergrund unvermeidbar scheint.

Somit bieten ungelöschte BG-Substrate keinen Zugang zur Untersuchung von Diffusionszeiten von Signalproteinen, da neben der gesuchten Diffusion der Proteine auch die wahrscheinlich deutlich schnellere Diffusion des freien BG-Substrats gemessen werden würde.

Deshalb richtete sich der Fokus der Untersuchungen im Folgenden auf fluoreszenzgelöschte Substrate, die keinen Fluoreszenzhintergrund verursachen sollten. Abbildung 4.3.4 zeigt die, unter Verwendung des fluoreszenzgelöschten Farbstoffkonjugats BG-MR121, durchgeführten Messungen.

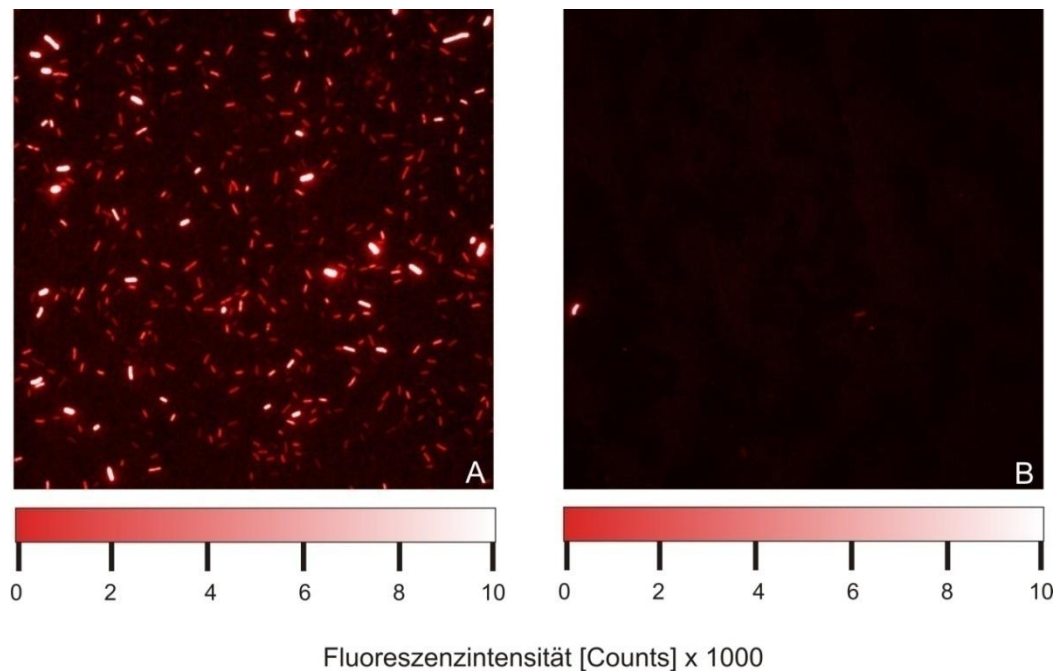


Abbildung 4.3.4: Abbildung 4.3.3: Fluoreszierende *E. Coli* Bakterienzellen. (A) Klon mit hAGT Expression (B) Negativkontrolle, keine hAGT anwesend. Sehr gut zu erkennen ist, dass die Negativkontrolle nahezu keine unspezifische Hintergrundfluoreszenz aufweist. Fluoreszenzgelöschte BG-Substrate funktionieren also auch in lebenden Systemen.

Die fluoreszenzgelöschten BG-Substrate konnten mit diesen Experimenten erfolgreich eingesetzt werden. Zwar zeigte das BG-Substrat BG-MR 121 eine weitaus niedrigere Markierungseffizienz als mit ATTO 647N, erreichte mit einer Anfärbung von ca. 60 % aller Bakterienzellen allerdings immer noch gute Werte. Auch die im Vergleich mit ATTO 674N um etwa 30 % niedrigere mittlere Fluoreszenzintensität der *E. coli* steht einer Verwendung der fluoreszenzgelöschten Sonden nicht entgegen. Deshalb wurde in späteren Experimenten ausschließlich auf das Substrat BG-MR 121 zur *in vivo* Fluoreszenzmarkierung zurückgegriffen.

Nach der Auswahl des geeigneten Substrats mussten noch zwei weitere Parameter untersucht werden. Der eine Punkt war die Untersuchung der vermutlich zweistufigen Kinetik der Anfärbung. Der erste Schritt in dem Mechanismus ist die Aufnahme des BG-Substrats durch die Bakterienzelle. In einem zweiten Schritt erfolgt dann die Reaktion zwischen der, an das

Zielprotein fusionierten, hAGT und dem BG-Substrat. Da erst an diesem Punkt eine deutlich Erhöhung der Fluoreszenz in den Bakterienzelle zu erwarten ist, sollte es nicht möglich sein, die beiden zu Grunde liegenden Kinetiken voneinander zu trennen, sofern fluoreszenzgelöschte Sonden mit sehr niedrigen Quantenausbeuten verwendet werden. Die Verwendung von nichtgelöschten Substraten hingegen ist nicht möglich, da diese auch im Medium zu einer starken Erhöhung des Fluoreszenzhintergrundes führen würden. Als experimenteller Ansatz zur Erfassung der Gesamtkinetik wurde erneut mit einer CCD-Kamera gearbeitet. Zunächst wurden die auf einer Poly-L-Lysin Oberfläche abgelegten *E. coli* Bakterienzellen im Durchlicht fokussiert. Die Proteinexpression lag bei 10 μM IPTG. Danach wurde auf Fluoreszenzanregung über eine mit geeigneten Filtern ausgestattete Quecksilberlampe umgeschaltet und BG-Substrat bis zu einer Gesamtkonzentration von ca. $5 \cdot 10^{-8}$ M in der überstehenden Lösung hinzugefügt. Im Kinetik-Modus der Ansteuersoftware wurde dann innerhalb von 20 Minuten eine Serie von 200 Bildern aufgenommen. Die folgende Abbildung 4.3.5 zeigt exemplarisch sechs der erhaltenen Aufnahmen jeweils im Abstand von vier Minuten.

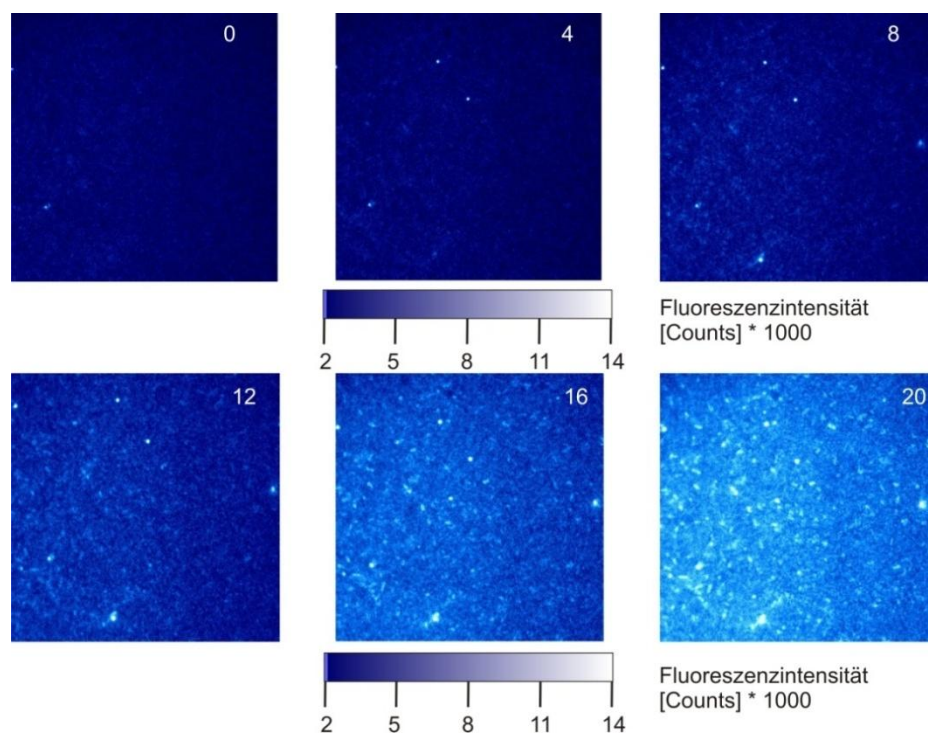


Abbildung 4.3.5: Fluoreszenzintensitätsbilder von einzelnen, farbstoffmarkierten *E. coli* Bakterienzellen. Die Expression von hAGT wurde mit 10 μM IPTG induziert. Die erste Aufnahme wurde ca. 30 Sekunden nach Zugabe des BG-Substrats durchgeführt, die letzte wurde nach 20 Minuten aufgenommen. Die ansteigende Fluoreszenz im Überstand kann durch nicht an die PLL-Oberfläche gebundene *E. coli* Bakterien erklärt werden.

Es ist sehr gut zu erkennen, dass einzelne *E. coli* – Zellen bereits nach wenigen Minuten eine sichtbare Fluoreszenz aufweisen. Die große Mehrzahl der Bakterien ist allerdings erst nach etwa 8 – 10 Minuten deutlich vom Hintergrund zu diskriminieren. Der parallel ansteigende Fluoreszenzhintergrund im Überstand lässt sich durch nicht auf der Poly-L-Lysin

Oberfläche fixierte Bakterienzellen erklären. Je nach Oberflächenpräparation beträgt der Anteil der ungebundenen Bakterien zwischen 10 und 15 %. Wird während der Messung nicht die Oberfläche sondern die überstehende Lösung fokussiert, so können fluoreszenzmarkierte *E. coli* beim „Durchschwimmen“ des Bildausschnitts beobachtet werden. Zusätzlich kann eine Ablagerung von freien Farbstoffkonjugaten auf der Glasoberfläche nicht ausgeschlossen werden. Indem in der Auswertesoftware der CCD-Kamera sogenannte ROIs (Region of interest) selektiert werden, lässt sich die Fluoreszenzintensität dieser Region in jedem einzelnen Bild visualisieren. Um eine Sättigung des Detektors zu vermeiden wurden hierfür *E. coli* Bakterien verwendet, bei denen eine deutlich geringere Induktion der hAGT Expression vorgenommen wurde (2 μM IPTG). Das Prinzip und die entsprechenden Fluoreszenzintensitätsdiagramme werden in Abbildung 4.3.6 dargestellt.

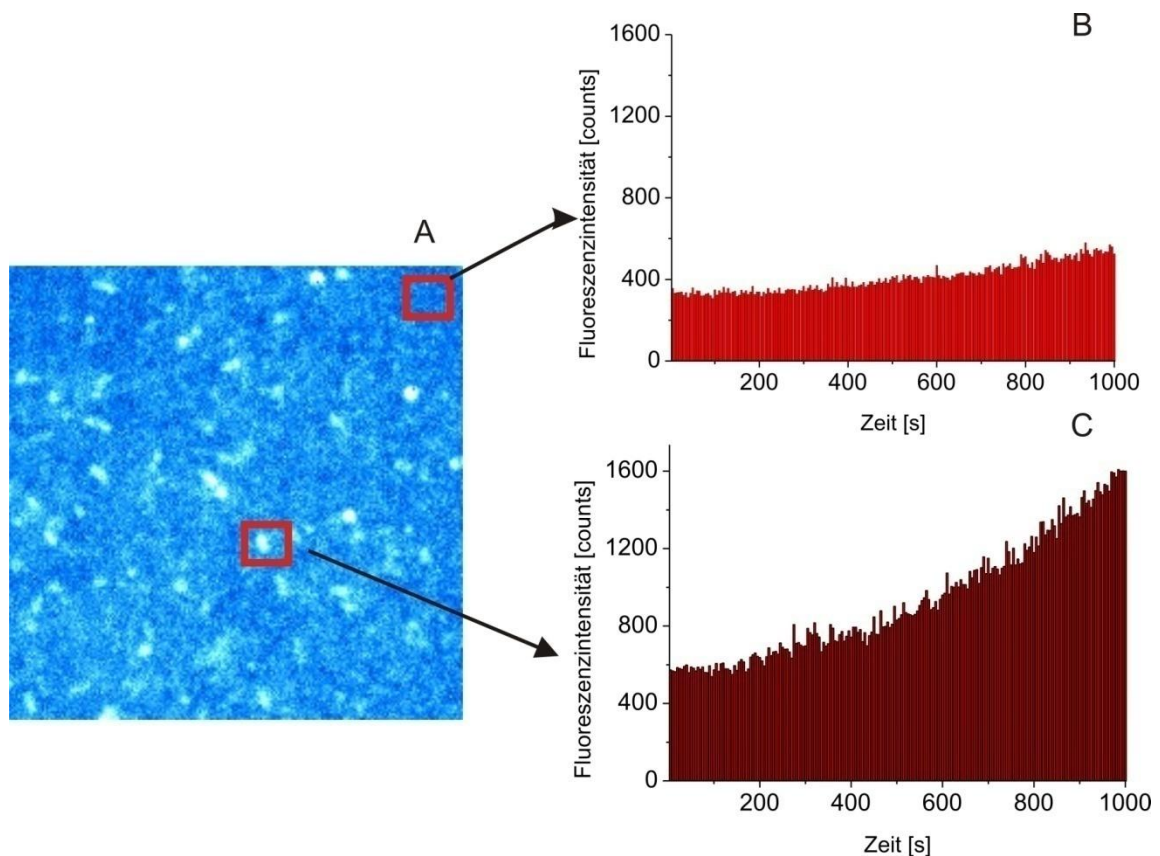


Abbildung 4.3.6: Schematische Darstellung einer Bereichsanalyse. Der interessierende Bereich (ROI) wird markiert, und die entsprechenden Intensitäten für jeden Bildpunkt histogrammiert dargestellt. Deutlich zu erkennen ist der Unterschied zwischen der ROI im Fluoreszenzhintergrund (B) und einer markierten Bakterienzelle (C). Die unsystematischen Schwankungen in der Intensität lassen sich durch Leistungsschwankungen der verwendeten Quecksilberlampe und eine nicht optimale z-Stabilität des Mikroskops erklären.

Auch durch diese Untersuchungen konnte die Selektivität bewiesen werden. Während die Fluoreszenzintensität im Hintergrund im Verlauf der Messung nur um ca. 50 % ansteigt, ist in der Bakterienzelle ein Anstieg um fast 300 % zu beobachten (vgl. hierzu die Intensitätshis-

togramme B und C in Abbildung 4.3.6). Der lineare Anstieg des Fluoreszenzhintergrunds (B) ist sehr einfach durch eine absorptive Wechselwirkung des im Überschuss zugegebenen BG-Substrats mit der Glasoberfläche zu erklären. Da ein fluoreszenzgelöschtes Substrat verwendet wurde, steigt die unspezifische Fluoreszenz nur relativ schwach an. Das Histogramm C zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensität in einer Bakterienzelle. Zunächst ähnelt der Verlauf dem des Hintergrunds, erst nach etwa 6-7 Minuten zeigt sich ein deutlich stärkerer Fluoreszenzanstieg.

Als zu Grunde liegende Kinetik wurde ein Mechanismus aus zwei Schritten erwartet. Der erste Schritt wäre hierbei die Aufnahme der BG-Substrate durch die Bakterien und erst im zweiten Schritt erfolgt die Reaktion des BG-Substrats mit dem hAGT-Fusionsprotein. Erst in Folge dieses Schrittes sollte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden können. Beide Abschnitte können in Abbildung 4.3.6 C beobachtet werden, zunächst erhöht sich die Fluoreszenzintensität in den ersten 400 Sekunden nur in einem sehr geringen Maße. Nach dieser Phase der Anreicherung der BG-Substrate in den Bakterien hingegen erfolgt ein deutlicher beschleunigter Anstieg der Fluoreszenzintensität, die anzeigt, dass die Reaktion zwischen hAGT und BG-Substrat zunehmend den Verlauf dominiert. Experimentell war es allerdings nicht möglich, ein Sättigungsverhalten im Anstieg der Fluoreszenzintensität auffindig zu machen. Analysen der Kinetiken zwischen der hAGT und verschiedenen BG-Substraten in *in vitro* Ensemble-Experimenten ergaben hingegen Reaktionszeiten von bis zu fünf Stunden bis die Reaktion vollständig abgeschlossen war [Stöhr 2008]; ein Zeitraum, der mit den experimentellen Rahmenbedingungen für die *in vivo* Experimente nicht erreicht werden konnte. Neben einer fehlenden z-Stabilität des Mikroskops über mehrere Stunden ist auch eine Verzerrung der Kinetiken durch eine Überlagerung mit Photozerstörung durch die lange Exposition der Farbstoffe zu erwarten.

Die gewonnenen Ergebnisse, zusammen mit den Vorarbeiten mit *in vitro* Experimenten deuten an, dass der erste Schritt, die Aufnahme, wesentlich schneller abläuft als die Reaktion zwischen dem BG-Substrat und der hAGT. Eine mögliche Modellvorstellung beinhaltet somit einen diffusionskontrollierten ersten Schritt, gefolgt von einer bimolekularen Reaktion. Auf Grund der unterschiedlichen Zeitskalen der beiden Reaktionsschritte könnte die Vereinfachung möglich sein, den ersten Schritt als ein vorgelagertes Gleichgewicht zu betrachten.

Der letzte zu untersuchende Faktor war die Wahl einer geeigneten Konzentration des Expressionsinduktionsreagenz IPTG. Deswegen wurden *E. coli* Bakterienzellen mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen zwischen 0 μM und 30 μM bis zu einer optischen Dichte von 0,45 bei 600 nm inkubiert und anschließend auf einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica SP5) untersucht.

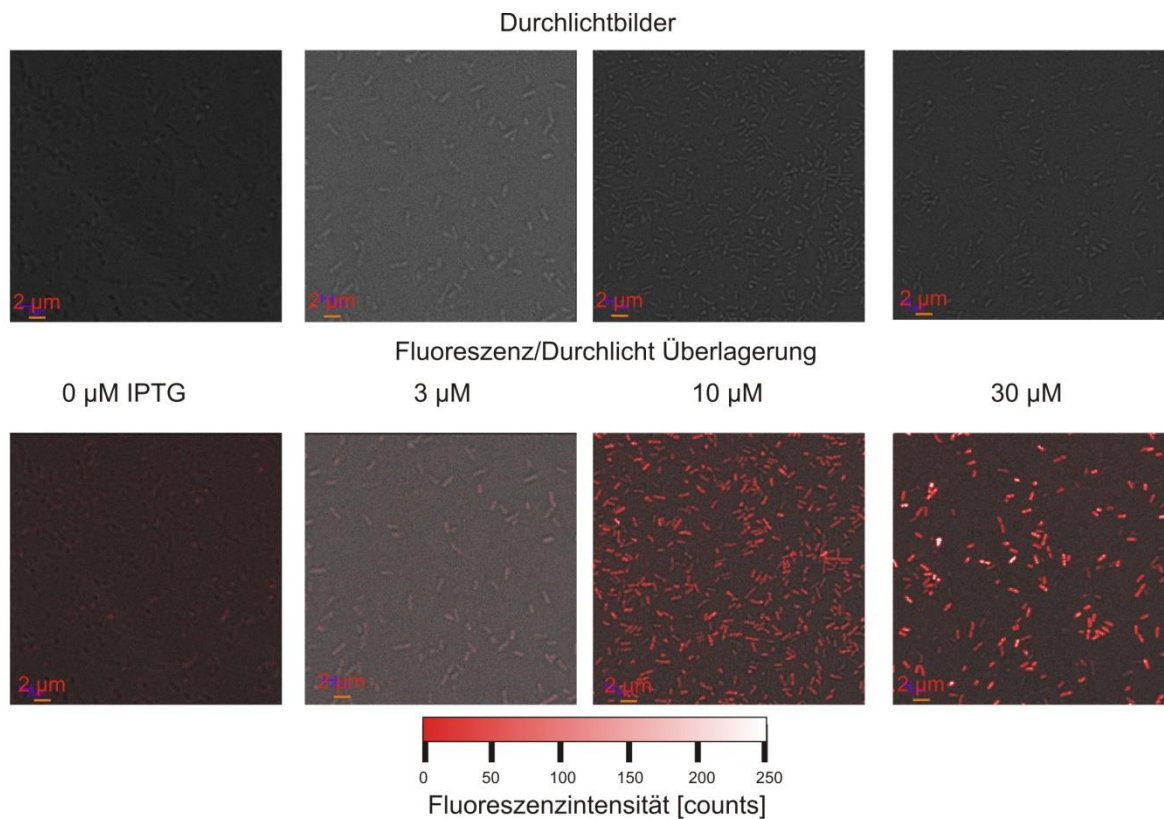


Abbildung 4.3.7: Durchlichtbilder und Überlagerungen aus Fluoreszenz- und Durchlichtbildern von Bakterien mit unterschiedlich hohen IPTG-Induktionsniveaus.

Bereits ohne eine IPTG-Induktion ist in Abbildung 4.3.7 eine geringe Fluoreszenzintensität zu beobachten, richtig deutlich wird diese allerdings erst ab einer 3 μM Induktion. Da sich herausstellte, dass ab einer 10 μM Induktion bereits sehr hohe Fluoreszenzintensitäten vorherrschen. Für die anschließenden DIFIM-Messungen wurden deshalb zunächst maximale Induktionsniveaus von 5 μM IPTG gewählt.

4.3.2 Bestimmung der Mess- und Auswerteparameter für die bildgebende Diffusionsmikroskopie.

Da es sich bei DIFIM noch um eine sehr neue Technik handelt, wurden zunächst einige einfache Experimente durchgeführt, um ein Herantasten an die optimalen Messbedingungen zu erreichen. Als grundlegendes einfaches Experiment wurde die Verfolgung der Diffusion von freien Farbstoffmolekülen in Lösung bei steigenden Glycerin-Anteilen durchgeführt. Mit Hilfe dieses Experimentes sollte es auch möglich sein, die erhaltenen Ergebnisse zu evaluieren, da im Verlauf dieser Messungen sowohl relativ schnelle Diffusion auftritt (bei wenig Glycerin) als auch sehr langsame Diffusion für höhere Glycerin Konzentrationen. Die folgende Abbildung 4.3.8 zeigt die durch Korrelation und Modellanpassung der gemessenen Daten erzeugten Diffusionszeitbilder. Beobachtet wurde die Diffusionszeit einer $5 \cdot 10^{-11}$ M Lösung des Farbstoffs MR 121, gemessen wurde mit einer räumlichen Auflösung von 50 nm pro Bildpunkt und einer zeitlichen Verweildauer von 100 ms pro Bildpunkt. Zur Auswertung wurden jeweils vier Bildpunkte zusammengefasst.

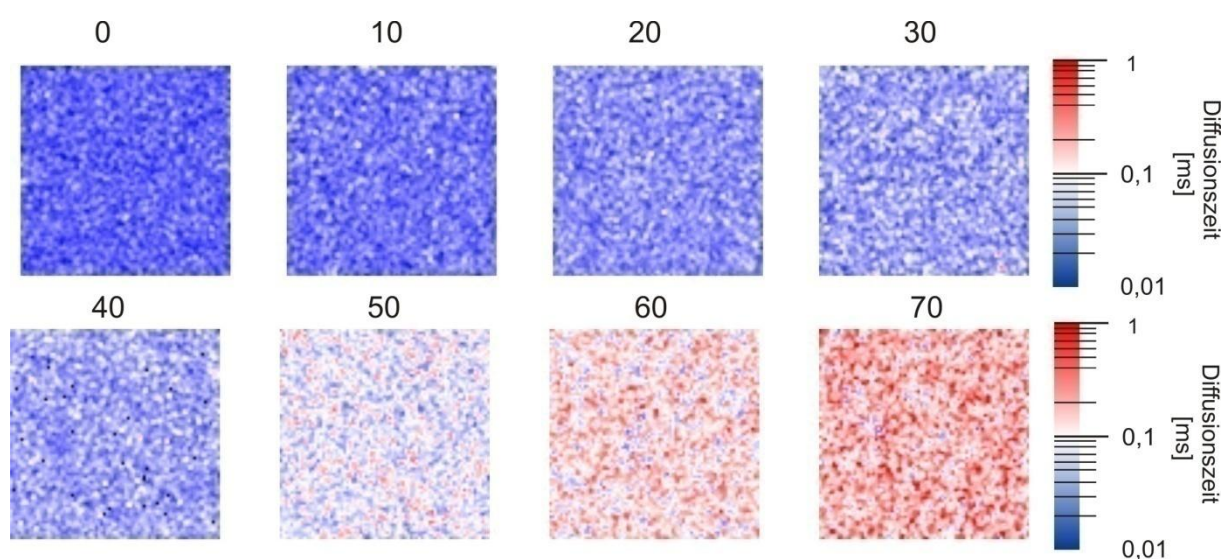


Abbildung 4.3.7: DIFIM-Aufnahmen einer Lösung des Farbstoffs MR121 in steigenden Glycerin-Konzentrationen. Alle Bilder $4 \times 4 \mu\text{m}$, 50 nm/pixel, 100 ms/pixel, 150 μW @635 nm Anregung.

Deutlich zu erkennen ist, dass die ermittelte Diffusionszeit für höhere Glycerin-Anteile ansteigt. Dieses Ergebnis wurde, wie oben beschrieben, in dieser Form auch erwartet. Da sich die Viskosität der Glycerin-Wasser-Gemische erst ab einem Anteil von etwa 50 % Glycerin signifikant erhöht, werden auch erst ab diesem Wert deutlich steigende Diffusionszeiten beobachtet. Wie die Bilder wiedergeben, bereits andeuten, werden keine diskreten Diffusionszeiten erhalten, sondern es zeigt sich eine eher diffuse Verteilung.

Die dargestellten Diagramme wurden direkt aus den Daten erstellt, die von der Auswertesoftware ANALinescan exportiert wurden.

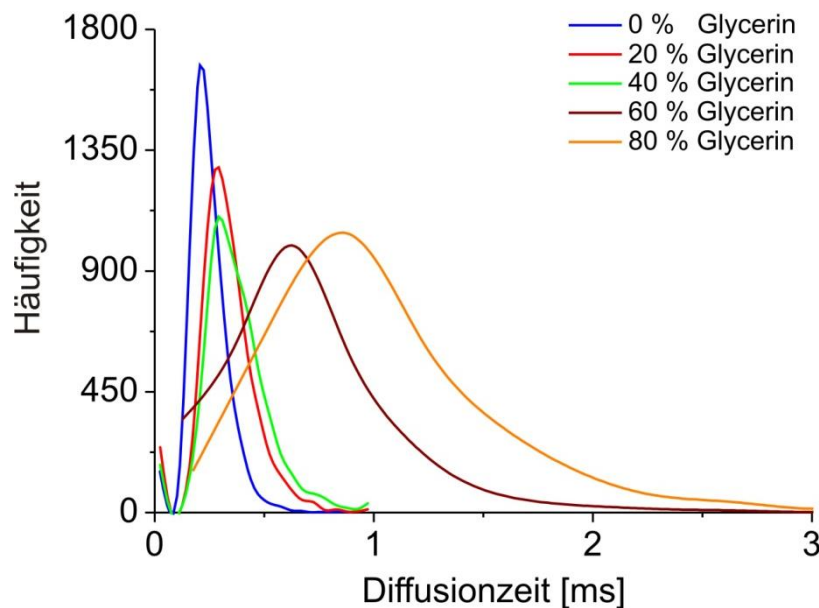


Abbildung 4.3.9: Histogrammierte Diffusionszeiten für verschiedene Glycerin-Konzentrationen. Während der Messung wurde eine Verweilzeit von 100 ms pro Bildpunkt gewählt, in der Auswertung wurden jeweils vier Bildpunkte zusammengefasst, korreliert und an eine Modellfunktion für zweidimensionale Diffusion angepasst. Als Grenzen des anzupassenden Bereichs wurden 0,001 ms als untere und 10 ms als obere gewählt.

Mit steigenden Glycerin-Anteilen ist ganz deutlich ein Trend hin zu längeren Diffusionszeiten zu erkennen. Neben der Verschiebung ist auch eine starke Verbreiterung der Verteilung aufgetreten.

Dieselbe Messreihe wurde zwei weitere Male mit veränderten Mess- und Auswerteroutinen durchgeführt, um zu überprüfen, ob und wie die erhaltenen Ergebnisse systematisch mit veränderten Parametern zusammenhängen. Neben der oben dargestellten Messung mit 100 ms Zeitauflösung und Mittelung von vier Bildpunkten wurden diese Daten auch ohne Mittelung ausgewertet. Daneben wurde parallel eine Messung durchgeführt, bei der die zeitliche Auflösung auf 25 ms reduziert wurde. Zur Auswertung dieser Messreihe wurde im Auswerteprogramm der anzupassende Bereich verkleinert. Statt einer oberen Fitgrenze von 10 ms (für 100 ms Verweilzeit pro Bildpunkt) wurde diese auf 2,5 ms Sekunden reduziert. Ein Diagramm, das die verschiedenen Diffusionszeiten wiedergibt, die durch Kurvenanpassungen erhalten wurden, ist in Abbildung 4.3.10 dargestellt. Generell wurde festgestellt, dass die erhaltenen Daten deutlich „verrauschter“ sind. Die Häufigkeitsverteilungen der bestimmten Diffusionszeiten hat sich sowohl für die 25 Millisekunden-Messung als auch bei Verzicht auf die Mittelung mehrerer Bildpunkte deutlich verbreitert.

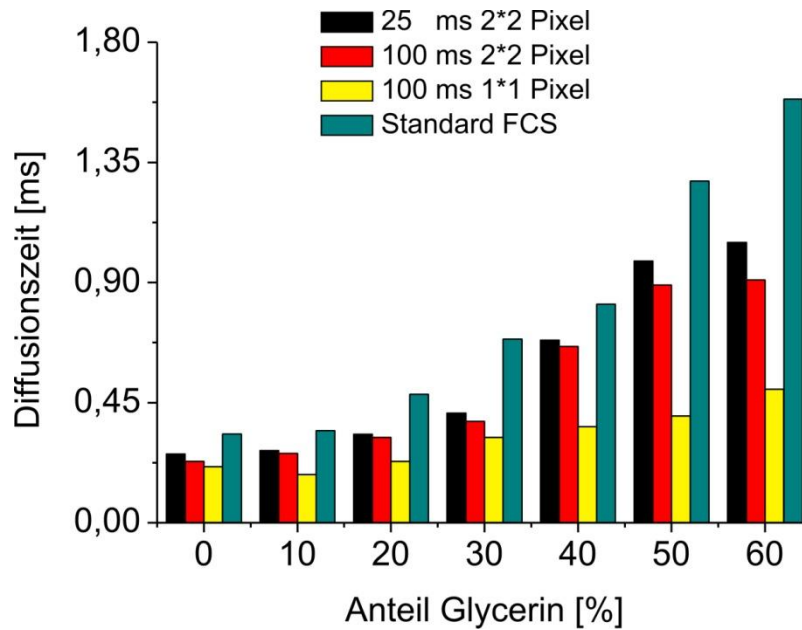


Abbildung 4.3.10: Vergleich der Diffusionszeiten die mit unterschiedlichen Mess- und Auswerteparameter erhalten wurden. Deutlich zu erkennen ist, dass bei Auswertung ohne Mittelung signifikant kürzere Diffusionszeiten resultieren.

Die Abbildung zeigt in allen Fällen den erwarteten Anstieg der Diffusionszeit bei höheren Glycerin-Anteilen. Allerdings fällt auch deutlich auf, dass die Ergebnisse für eine Auswertung ohne Mittelung von vier benachbarten Bildpunkten nicht mit denen durch Mittelung erhaltenen Daten konsistent sind. Auffällig ist allerdings, dass die durch DIFIM bestimmten absoluten Diffusionszeiten, insbesondere bei höheren Glycerin-Anteilen, deutlich unter denen liegen, die mit der Standard-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie erhalten wurden. Hierin liegt eine intrinsische Schwäche innerhalb der DIFIM-Methode. Durch die im Vergleich zur Standard-FCS sehr kurzen Integrationszeiten sinkt die Wahrscheinlichkeit, gute Photonenstatistiken für längere Lag-Times zu erhalten und somit erfolgt eine systematische Verkürzung der bestimmten Diffusionszeiten. Allerdings liegt die Abweichung zwischen Standard-FCS relativ konstant bei einem Faktor zwischen 1,3 und 1,6, so dass gegebenenfalls eine Korrektur der erhaltenen Werte möglich ist, ohne einen großen Fehler einzuführen. Zwar sind die Ergebnisse für Messungen mit einer Integrationszeit von 25 Millisekunden etwas näher an der Standard-FCS, allerdings wurde im Folgenden immer mit Integrationszeiten von 50 oder 100 Millisekunden gearbeitet. Insbesondere für die erwarteten deutlich längeren Diffusionszeiten in den Bakterien sind hohe Photonenstatistiken besonders wichtig. Zudem sollte die obere zeitliche Grenze für die Modellanpassung bei maximal 10 % der Messdauer liegen, sodass längere Diffusionszeiten nur bei längeren Integrationszeiten beobachtet werden können. Zusätzlich wurde in allen Experimenten eine Zusammenfassung von vier benachbarten Bildpunkten zur Auswertung vorgenommen, da ohne diese Zusammenfassung ein weiteres Problem aufgetreten ist; in vielen Fällen traten nach der Modellanpassung der Korrelationsfunktion eine Vielzahl von schwarzen Bildpunkten auf.

Da diese besonders häufig in Bildbereichen mit eher geringen Intensitäten auftreten, sollte im Folgenden die Ursache untersucht werden. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 4.3.11 zunächst das Fluoreszenzintensitätsbild, das Diffusionszeitbild und dazu eine Darstellung des χ^2 -Wertes als Parameter zur Beurteilung der Qualität der Modellanpassung. In beiden Fällen wurde dieselbe Messung mit einer Integrationszeit von 100 Millisekunden ausgewertet, die Bilder A, B und C wurden durch Zusammenfassung von benachbarten Bildpunkten erhalten, die Bilder D, E und F in der unteren Zeile ohne diese Zusammenfassung.

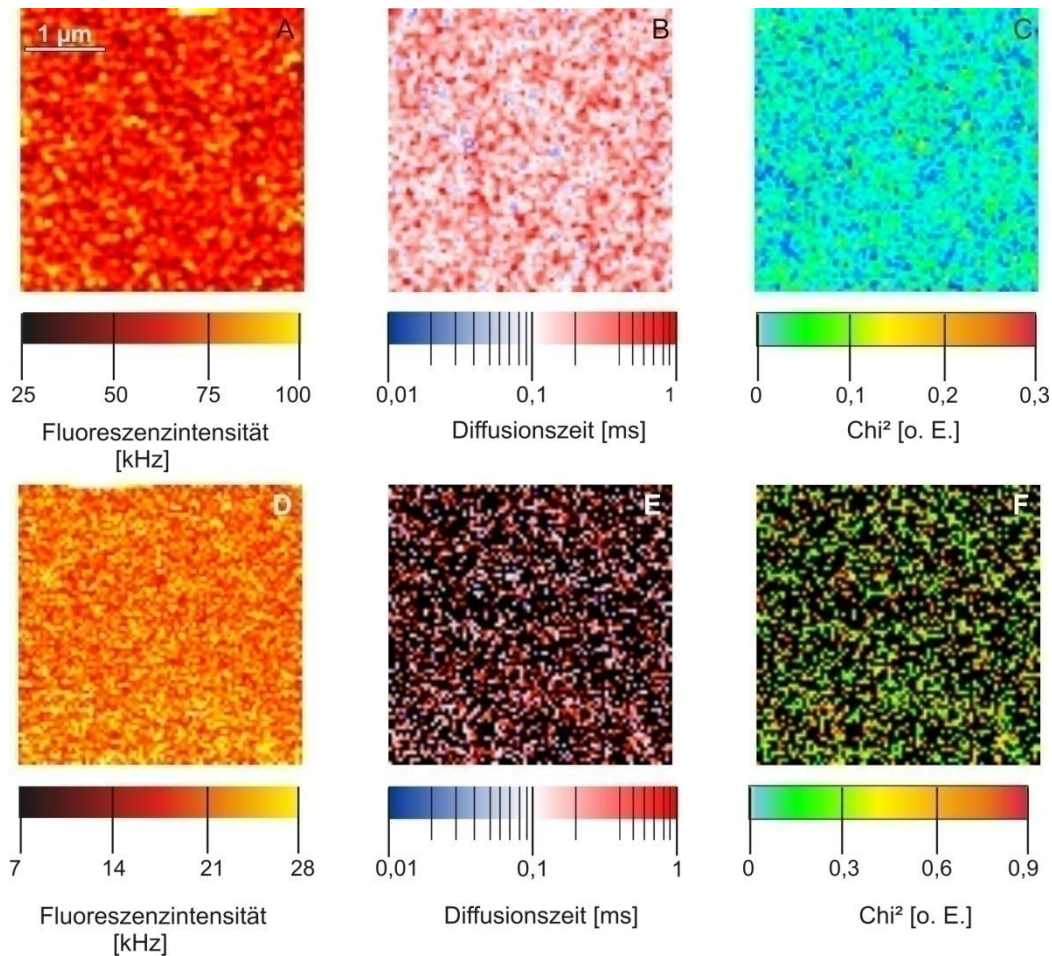


Abbildung 4.3.11: Fluoreszenzintensitätsbild (D), Diffusionszeitbild (E) und χ^2 -Bild (F) bei einer Messung mit 70 % Glycerin in der Lösung. Der χ^2 -Wert stellt einen Parameter für die Güte der verwendeten Modellanpassung dar. Je kleiner der Wert, desto besser der Fit. Auswertung mit Zusammenfassung benachbarter Bildpunkte (A, B, C) und ohne Zusammenfassung (D, E, F).

Wird zunächst die obere Reihe betrachtet, so ist zu erkennen, dass sowohl die Diffusionszeit (Abbildung B) als auch der χ^2 -Wert eine recht homogene Verteilung aufweisen, wobei der χ^2 -Wert mit einem durchschnittlichen Wert zwischen 0 und 0,1 eine sehr gute Modellanpassung signalisiert. Im Gegensatz dazu zeigt die untere Reihe das eingangs erwähnte Problem in ziemlich extremer Ausprägung. Neben einem deutlich höheren χ^2 -Wert, dieser liegt hier im Durchschnitt bei 0,6 oder höher, finden sich sehr viele schwarze Bildpunkte.

Ein schwarzer Bildpunkt bedeutet in diesem Fall, dass die Modellanpassung keine sinnvollen Werte gefunden hat. Bei der Erstellung der einzelnen Bilder werden für alle Parameter geeignete Grenzwerte festgelegt. Nur, wenn sich die erhaltenen Werte innerhalb dieser Grenzen befinden, erfolgt eine reguläre Farbkodierung in den entsprechenden Skalierungen. Bildpunkte hingegen, bei denen einer der Parameter außerhalb der festgelegten Grenzwerte liegt, erscheinen in allen Abbildungen schwarz.

In diesem Fall führte eine weitergehende Analyse der Modellanpassungen dazu, dass für die Diffusionszeit Werte deutlich unterhalb von 10^{-3} Millisekunden gefunden worden sind. Der Grund dafür ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. Neben einer zu geringen Statistik durch geringe Signalintensitäten scheinen auch zu hohe Signalintensitäten zu ähnlichen Symptomen zu führen.

Um diese Probleme in der Auswertung zu umgehen, wurde bei Messungen in lebenden Bakterienzellen stets eine Zusammenfassung benachbarter Bildpunkte durchgeführt.

4.3.3 Messungen in lebenden Bakterienzellen

Zur Untersuchung der Diffusionsgeschwindigkeit des Signalproteins CheY wurde in den verwendeten Bakterienzellen zunächst eine 5 μM IPTG-Induktion gewählt. Zur Verwendung kam ein Wasserimmersionsobjektiv (60x, NA 1,2). In der folgenden Abbildung 4.3.12 ist eine Oberflächenaufnahme mit einer großen Anzahl an Bakterien gezeigt. Durch den direkten Vergleich zwischen *E. coli* und Hintergrund lässt sich der erhaltene Kontrast zwischen Probe und Fluoreszenzhintergrund durch unspezifische Absorption überschüssigen Farbstoffs an die Oberfläche am besten darstellen.

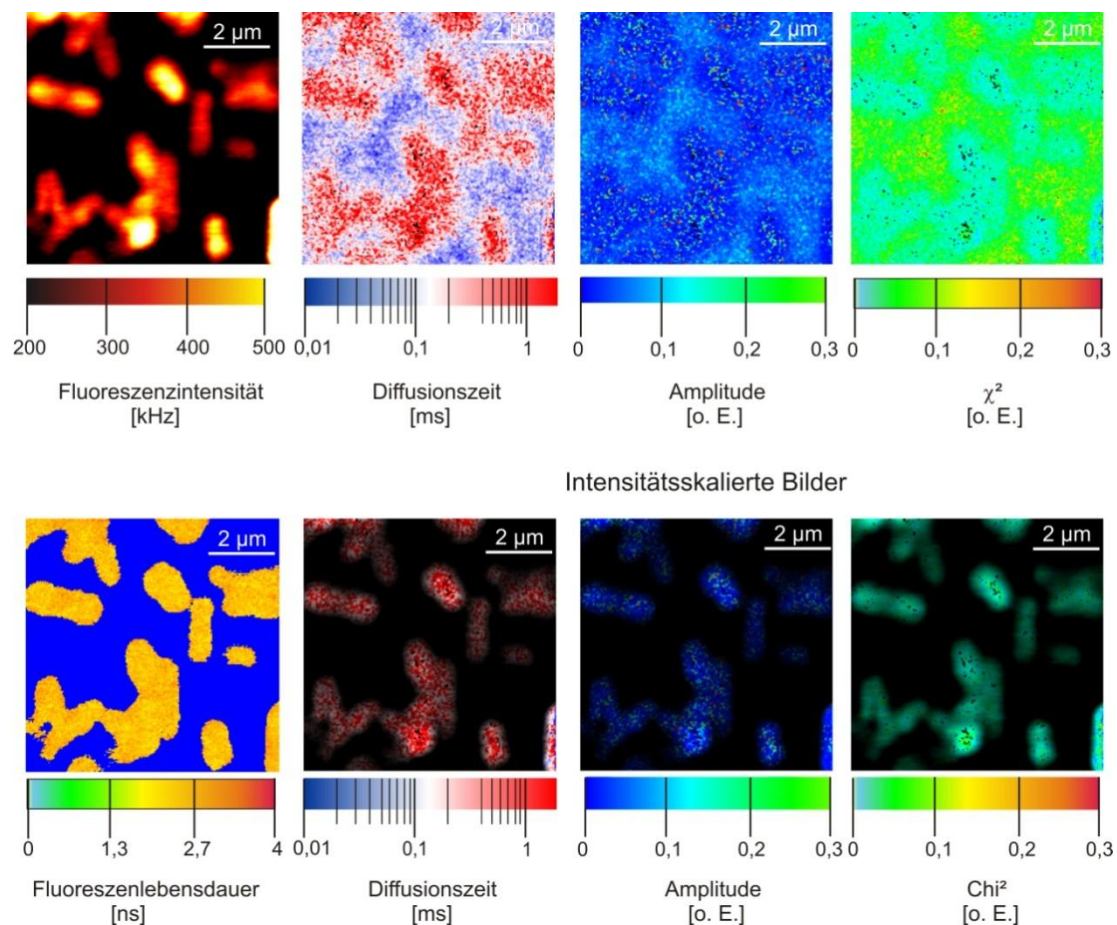


Abbildung 4.3.12: DIFIM-Messung einer Oberfläche mit fixierten Bakterienzellen. Induktion 5 μM IPTG. Die obere Bilderreihe zeigt die erhaltenen Bilder für Diffusionszeit, Amplitude und χ^2 -Wert. In der unteren Zeile wurden Bereiche mit niedrigen Fluoreszenzintensitäten ausgeblendet, so dass die Bakterien hervorgehoben werden. Zur Messung wurde ein Bereich von 10 μm x 10 μm untersucht. Auflösung 75 nm und 50 ms pro Bildpunkt. Angeregt wurde mit einer 635 nm Laserdiode bei 20 MHz und einer Leistung von ca. 25 μW . Zur Auswertung wurden jeweils 4 benachbarte Bildpunkte zusammengefasst.

Die Abbildung zeigt die erhaltenen Bilder für die Fluoreszenzlebensdauer, die Diffusionszeit, Amplitude, χ^2 -Wert und die Fluoreszenzlebensdauer. Aufgenommen wurde ein Bereich von 12 μm x 12 μm mit einer zeitlichen Auflösung von 50 ms. In allen Bildern ist ein guter

Kontrast zwischen den Bakterienzellen und dem Hintergrund erkennbar. Die ermittelte Fluoreszenzintensität lag in den Bakterienzellen bei bis zu 500 kHz, während in der Umgebung Werte unterhalb von 60 kHz gemessen wurden. Dasselbe gilt auch für die Amplitude und den χ^2 -Wert. Wie erwartet, fällt für Bereiche mit hoher Intensität die Amplitude deutlich niedriger als in Bereichen mit weniger Intensität. Sie liegt für die *E. coli* in einem Bereich von 0,05 und repräsentiert damit eine hohe Teilchenzahl im Laserfokus, eine durchschnittliche Amplitude von 0,1 außerhalb der *E. coli* zeigt aber, dass auch dort eine erhöhte Farbstoffdichte auf Grund von unspezifischer Absorption auf der Oberfläche auftritt. Ebenfalls wie erwartet ist die Güte der Modellanpassung, repräsentiert durch den χ^2 -Wert, in Bereichen hoher Signale deutlich niedriger, da mehr Signal zu einer besseren Statistik führt. Das Diffusionsbild zeigt an, dass die mittlere Diffusionszeit innerhalb der Bakterien zwischen einer und drei Millisekunden liegt, während außerhalb eine deutlich schnellere Diffusion im Bereich um 0,1 Millisekunden vorherrscht.

Da in dieser großflächigen Aufnahme keine Heterogenitäten innerhalb der Bakterienzellen festgestellt werden kann, wurden im Folgenden mehrere einzelne Bakterienzellen in deutlich höheren räumlichen Auflösungen untersucht. Ein typisches Ergebnis einer solchen Messung ist ein Abbildung 4.3.13 dargestellt.

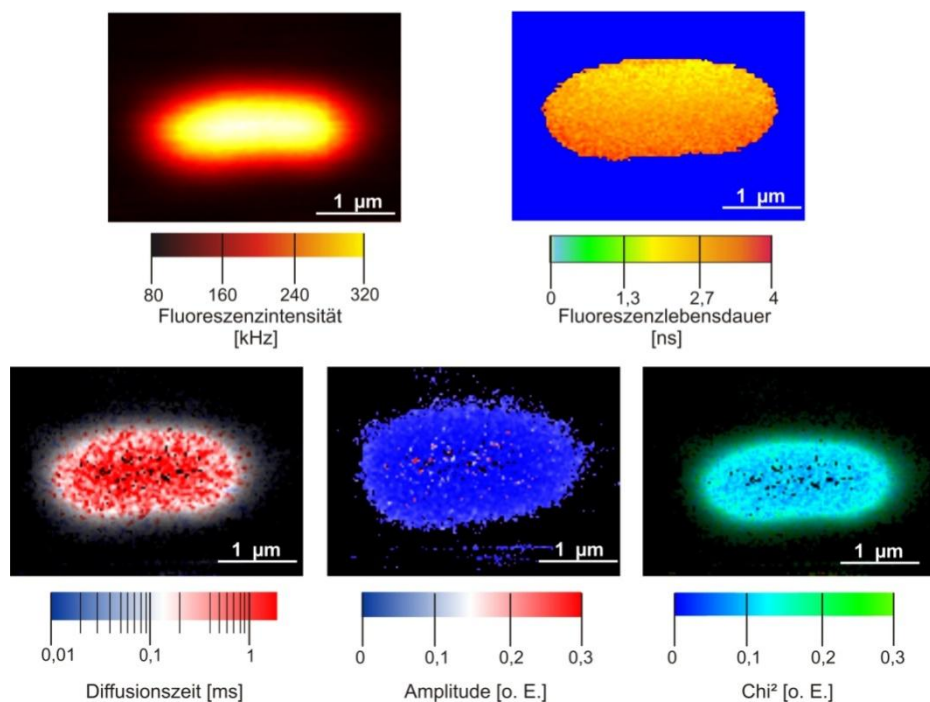


Abbildung 4.3.13: Messung einer einzelnen *E. coli* Bakterienzelle. Ausschnitt aus einem Bild mit einer Größe von $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$. Auf Grund des sehr geringen Fluoreszenzhintergrunds außerhalb der Zelle werden nur die intensitätsgewichteten Bilder angezeigt. Mess- und Auswertebedingungen wie bei Abbildung 4.3.11, allerdings mit einer räumlichen Auflösung von 40 nm pro Bildpunkt. Bei der Auswertung wurden 2×2 Bildpunkte zusammengefasst.

Insgesamt bestätigt die mit hoher Auflösung gemessene Bakterienzelle die Trends, die in Abbildung 4.3.12 gefunden wurden. Es wurde eine über den gesamten Zellraum konstante Fluoreszenzintensität gefunden, obwohl das markierte Signalprotein CheY auf Grund seiner Funktion hauptsächlich an den Zellpolen lokalisiert sein sollte. Eine unspezifische Anfärbung innerhalb der Zelle konnte allerdings durch die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer mit Hilfe eines monoexponentiellen *Maximum Likelihood Estimators* (MLE) ausgeschlossen werden. Es wurde eine homogene Verteilung der Fluoreszenzlebensdauer mit einem Wert zwischen 2,5 und 3 Nanosekunden gefunden. Diese entspricht in sehr guter Näherung der erwarteten Lebensdauer von 2,8 Nanosekunden, die im Ensemble in einem Fluoreszenzlebensdauerspektrometer gemessen wurden. Nicht gebundener und somit fluoreszenzgelöschter Farbstoff sollte eine Lebensdauer im Bereich von 1,5 bis 1,8 Nanosekunden besitzen und damit in der entsprechenden Abbildung eher grünlich-gelb farbkodiert sein. Somit kann die homogene Verteilung nur mit einer Überexpression des Signalproteins erklärt werden, es wurden so viele Kopien des CheY exprimiert, dass es sich in der gesamten Bakterienzelle verteilte.

Des Weiteren konnte auch bei dieser Messung zunächst keinerlei Heterogenität in der Diffusionszeit des Signalproteins festgestellt werden. Innerhalb der Zelle ist die Diffusionszeit sehr homogen im Bereich von zwei bis drei Millisekunden, lediglich in den „Außenbereichen“ dem Periplasma ist eine deutlich schnellere Diffusion zu beobachten. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt daran, dass im Periplasma weder größere Zellkompartimente, noch DNA oder größere Mengen von Proteinen vorliegen, und somit eine Diffusion deutlich weniger behindert wäre. Eine weitere mögliche Erklärung liegt in einem experimentellen Artefakt. Befindet sich der Laserfokus während des Abrasterns der Probe am äußersten Rand der Zelle, so wird nur in einem relativ kleinen Bereich Fluoreszenz detektiert. Daraus resultiert ein wesentlich kleineres effektives Volumen, was wiederum die Anzeige einer schnelleren Diffusion zur Folge hat.

Da als mögliche Ursache zunächst vermutet wurde, dass eine zu hohe Induktion und somit eine daraus resultierende zu hohe Anzahl an Proteinkopien, vorhandene Heterogenitäten überlagert, wurde in folgenden Experimenten die Induktion schrittweise gesenkt. Bestätigt wurde diese Vermutung dadurch, dass bei einer noch höheren IPTG-Induktion überhaupt keine Heterogenitäten und auch keine schnellere Diffusion im Periplasma gezeigt werden konnten. Für geringfügig gesenkte Induktionsniveaus von 4 μM bzw. 3 μM IPTG konnten zunächst keine signifikanten Änderungen in den Ergebnissen gefunden werden. Erst ab einer Absenkung auf eine 2,5 μM Induktion konnten leichte Heterogenitäten entdeckt werden (vgl. Abbildung 4.3.14).

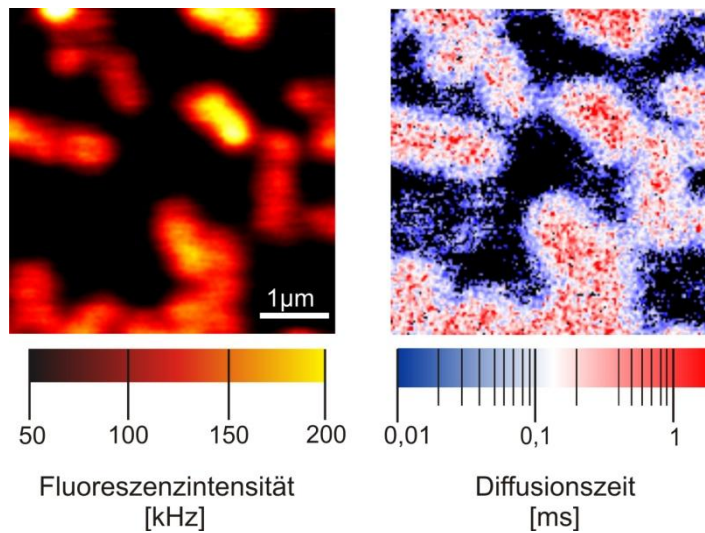


Abbildung 4.3.14: Verteilung der Diffusionszeit bei einer Induktion von 2,5 μM IPTG. Konfokale Aufnahme mit einer Größe von 7 x 7 μm, räumliche Auflösung 50 nm pro Bildpunkt, 50 ms zeitliche Verweildauer. Anregung bei 635 nm mit ca. 25 μW. Auswertung wie oben beschrieben.

In der Folge wurden daraufhin die Induktionsniveaus weiter reduziert. Abbildung 4.3.15 zeigt die erhaltenen Bilder für ein Induktionsniveau von 1,5 μM IPTG.

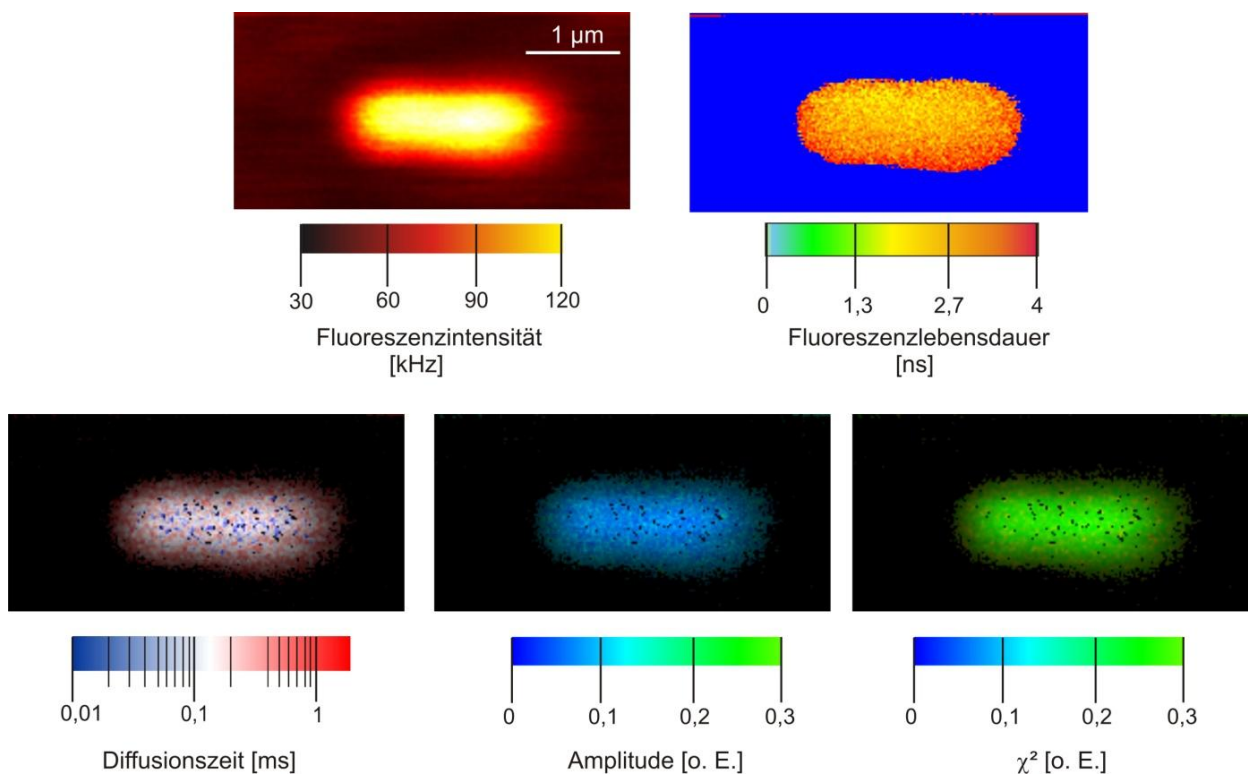


Abbildung 4.3.15: DIFIM-Messung bei einer IPTG-Induktion von 1,5 μM. Zu erkennen ist eine Reduktion der Fluoreszenzintensität um 50 % bei gleichbleibenden Aufnahmeparametern. Der angezeigte Bildbereich ist ein Ausschnitt aus einem Bild von 5 x 5 μm. Die Bakterien sind gut vom Hintergrund zu diskriminieren.

Die Abbildung 4.3.15 zeigt einige Tendenzen auf, die den vorhergegangenen Bildern zu widersprechen scheinen. Insgesamt hat die gemessene Fluoreszenzintensität im Vergleich zu höheren Proteinexpressionen wie erwartet um mehr als 75 % abgenommen. Lagen die maximalen Fluoreszenzintensitäten für eine 5 μM Induktion zunächst bei über 500 kHz, sank sie zunächst auf ca. 320 kHz, bei einer 2,5 μM Induktion waren nur noch Signale bis etwa 200 kHz vorhanden, während bei lediglich 1,5 μM Induktion nur noch bis zu 120 kHz erreicht wurden. Im Gegensatz dazu hat sich der Fluoreszenzhintergrund nicht verändert, die unspezifische Fluoreszenz bleibt mehr oder weniger konstant bei etwa 60 kHz. Trotzdem war noch ein guter Kontrast zwischen Bakterien und unspezifischer Fluoreszenz auf der Oberfläche zu erkennen.

Da aus den signifikant niedrigeren Photonenstatistiken auch eine schlechtere Statistik resultiert, zeigt sich ebenfalls erwartungsgemäß eine leichte Erhöhung des χ^2 -Wertes auf durchschnittlich 0,3. Dazu steigt die Amplitude innerhalb des *E. coli* leicht an, ebenfalls ein logische Folge der geringeren Konzentration des farbstoffmarkierten Proteins. Wie bereits bei allen anderen Bildern, zeigt die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer im Bereich zwischen 2,5 und 3 Nanosekunden auch hier eindeutig, dass keine überschüssigen Farbstoffmoleküle in der Bakterienzelle verblieben sind. Besonders interessant ist hier außerdem die Verteilung der Diffusionszeiten. Diese sind insgesamt merklich heterogener als bei höheren Proteinkonzentrationen und zeigen in diesem Fall eine eher langsame Diffusion in den Außenbereichen der Zelle an, während im Zellinneren eine eher schnelle Diffusion im Bereich von einigen hundert Mikrosekunden gefunden wurde.

Vermutlich entspricht diese Verteilung eher den realen Bedingungen in den *E. coli*, da die Signalübertragung von den Rezeptorclustern hin zu den Flagellenmotoren erfolgt. Beide Komplexe sind jeweils in der äußeren Membran verankert dadurch sollte hier eigentlich auch eine verlangsamte Diffusion beobachtet werden, da zur Informationsweiterleitung Interaktionen mit verschiedenen anderen Proteinen stattfinden müssen. Im Zellinneren hingegen sind Interaktionen eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass die Signalproteine sich hier auf den Rückweg zu den Rezeptorclustern machen, um einen neuen Zyklus zu starten.

Um zu überprüfen, ob dieses Verhalten sich bei noch weiterer Reduzierung der Induktion fortsetzt, wurde in einem letzten Schritt völlig auf die Induktion mit IPTG verzichtet, da auch ohne Induktion eine geringe Anzahl von Kopien in den Bakterienzellen hergestellt wird. Abbildung 4.3.16 zeigt ein typisches Ergebnis.

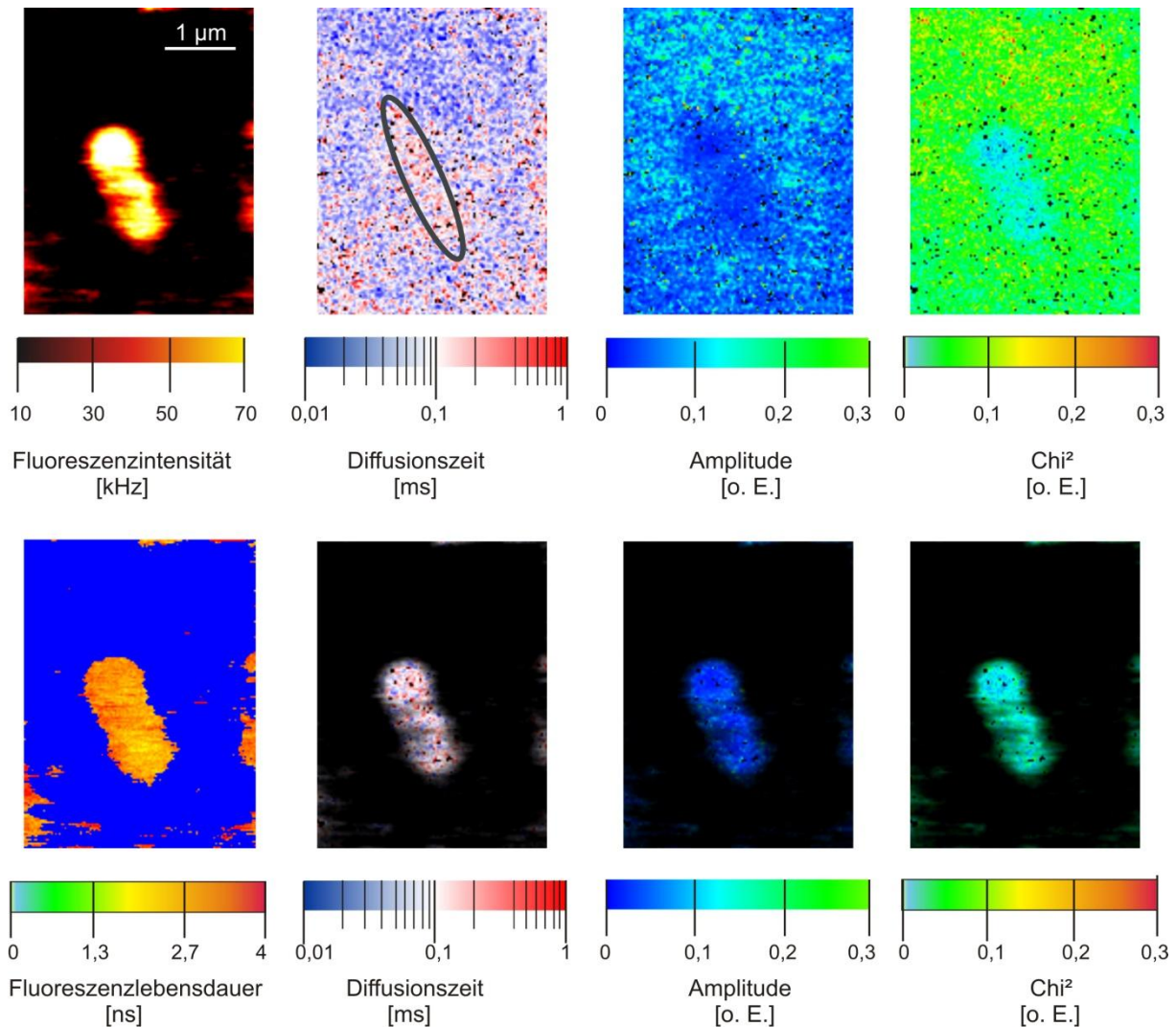


Abbildung 4.3.16: Erhaltene DIFIM-Resultate für 0 μM Induktion. Auf Grund der sehr niedrigen Signalintensität wurde die Messdauer auf 200 ms pro Bildpunkt erhöht. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem 6 μm x 6 μm großen Bild. Außer der verlängerten Verweildauer pro Bildpunkt wurden alle anderen experimentellen Parameter wie bei den vorherigen Abbildungen gewählt.

Auf Grund der sehr niedrigen Photonenzahlen sind die erhaltenen Ergebnisse ohne Induktion nur sehr schwer zu interpretieren. Zwar zeigt sich bei der Amplitude und dem χ^2 -Wert ein weitgehendes Absetzen des *E. coli* gegenüber dem Hintergrund, allerdings ist dieser Kontrast für den wichtigsten Parameter, die Diffusionszeit, nicht mehr vorhanden. Ohne eine Intensitätsgewichtung ist es nicht mehr möglich, die Lage des *E. coli* im Bild zu erkennen. Zusätzlich wirkt die erhaltene Verteilung der Diffusionszeiten eher stochastisch. Dementsprechend ist es auch sehr schwierig, eine biologische Erklärung für die Beobachtungen zu finden. Wahrscheinlicher ist es, dass die gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Bereich von 70 kHz, einfach viel zu gering waren, um sinnvolle Ergebnisse zu erhalten.

Bei allen hier vorgestellten Messungen wurde unter Verwendung eines Wasserimmersionsobjektivs keine spezifische Lokalisierung des CheY Signalproteins gefunden, obwohl dessen

Anreicherung im Bereich der Rezeptorclustern an den Zellpolen erwartet wird. Deshalb wurden zusätzlich Experimente mit einem Ölimmersionsobjektiv durchgeführt. Zwar wird durch die Präzision der Diffusionszeitbestimmung durch die Einführung des zusätzlichen Brechungsindexwechsels etwas schlechter, dafür wird durch die erhöhte numerische Apertur des Öobjektiv eine signifikant bessere optische Auflösung erreicht. Da einführende Messungen zeigten, dass mit DIFIM bestimmte Diffusionszeit etwa ein Drittel unterhalb der Standard-FCS Ergebnisse liegen, erscheint der Fehler durch den zusätzlichen Brechungsindexwechsel eher sekundär. Dadurch verbessert sich die laterale optische Auflösung bei einer Anregungswellenlänge von 635 nm von 221 nm (Wasser) auf 175 nm (Öl).

Mit Hilfe des Ölimmersionsobjektivs war es möglich, die erwartete Lokalisierung abzubilden. Abbildung 4.3.17 zeigt eines der erhaltenen Fluoreszenzintensitätsbilder bei einer Standard SFLIM-Messung mit einer Verweilzeit von 4 ms pro Bildpunkt.

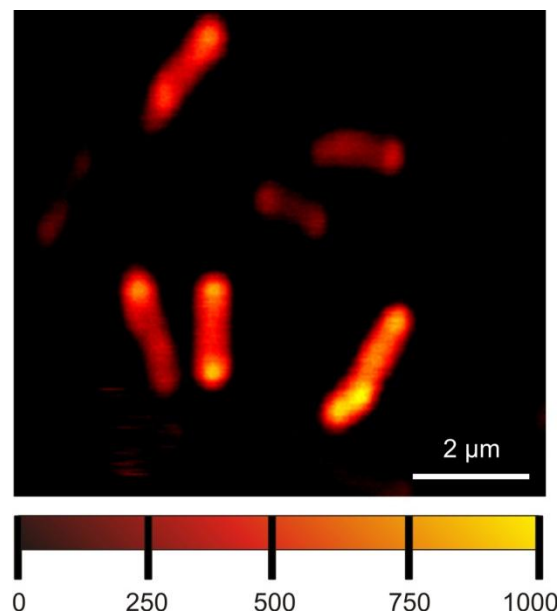


Abbildung 4.3.17: Markierung des CheY-Signalproteins. Bilddaten: (10 µm x 10 µm, Auflösung 50 nm pro Bildpunkt, Verweilzeit 4 ms pro Pixel, Anregung 635 nm mit einer Leistung von ca. 25 µW bei einer Repetitionsrate von 20 MHz.

Erkennbar ist, dass die Fluoreszenzintensität an den Polen der *E. coli* Bakterienzelle etwa um einen Faktor zwei bis drei höher ist als in der Mitte der Zelle.

Im Anschluss sollten nun einige DIFIM-Messungen durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob und wie sich die verbesserte optische Auflösung auf das Aufspüren von Heterogenitäten innerhalb der einzelnen Zellen auswirkt. Beispielhaft werden die hierbei erhaltenen Ergebnisse in Abbildung 4.3.18 dargestellt.

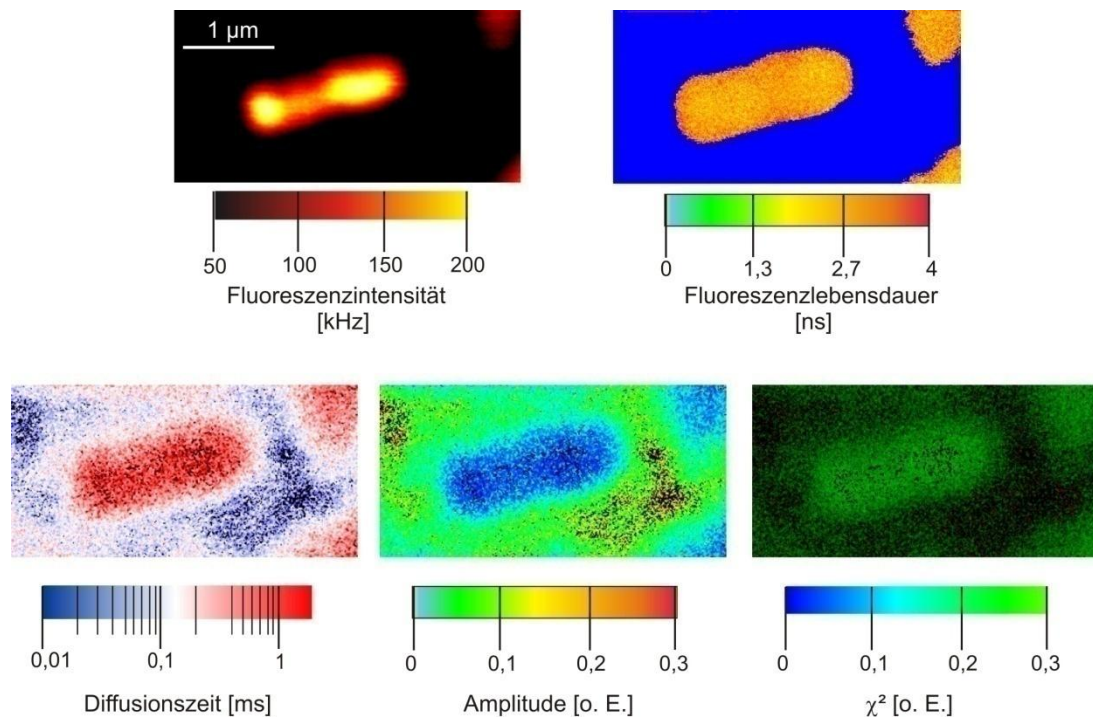


Abbildung 4.3.18: DIFIM-Messung und Auswertung durchgeführt mit einem 100-fach Ölimmersionsobjektiv. Gut zu erkennen ist die Lokalisierung der Fluoreszenz in der Nähe der Zellpole. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einer Aufnahme mit der Größe $6\ \mu\text{m} \times 6\ \mu\text{m}$. Die restlichen Parameter wurden im Vergleich zu obigen Abbildungen konstant gehalten. Zur Auswertung wurden jeweils 2×2 Bildpunkte zusammengefasst.

Für diese Messungen wurde eine $2,5\ \mu\text{M}$ Induktion gewählt, um eine Vergleichbarkeit mit den oben erwähnten Resultaten zu erhalten. Auffällig ist der teilweise viel höhere Kontrast insbesondere bei Diffusionszeit und Amplitude. Insgesamt konnte aber auch durch die Verwendung eines Ölimmersionsobjektives keine merkliche Verbesserung in der Auflösung von Heterogenitäten gefunden werden.

Zusammenfassend muss also festgestellt werden, dass innerhalb der einzelnen Bakterienzellen keine eindeutigen Heterogenitäten aufgelöst werden konnten. Zwar wurden bei unterschiedlichen Induktionsniveaus verschiedene Verteilungen für die Diffusionszeit gefunden, die unterschiedliche biologische Interpretationen erlauben, allerdings beziehen sich die Heterogenitäten nur auf die Diskrepanz zwischen dem Zellinneren bzw. dem umgebenden Periplasma. Feinere Heterogenitäten, so wie z. B. im Bereich der Rezeptorclustern an den Polen, konnten hingegen nicht beobachtet werden.

4.3.4 Diskussion der erhaltenen Ergebnisse

Die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Experimente zeigten, dass mit DIFIM im Inneren der *E. coli* Bakterienzellen keine Feinstrukturen aufgelöst werden konnten. Abhängig vom verwendeten Induktionsniveau wurde jeweils eine sehr homogene Verteilung im Zellinneren und im umgebenden Periplasma gefunden. Werden diese Aufnahmen mit in eukaryontischen Zellen gemessenen Daten verglichen, so fällt auf, dass dort deutliche Heterogenitäten vorgefunden werden. Abbildung 4.3.19 zeigt das Diffusionsbild einer NIH 3T3 Mausfibroblastenzelle [Roth 2007].

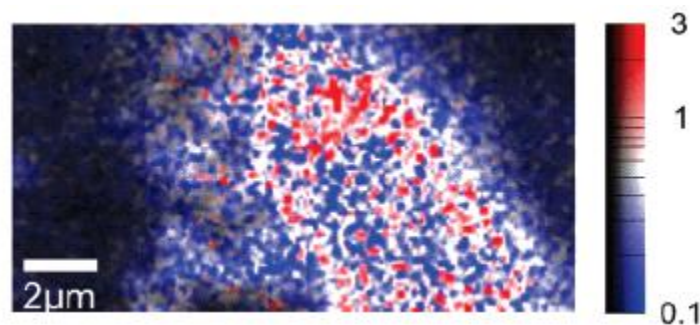
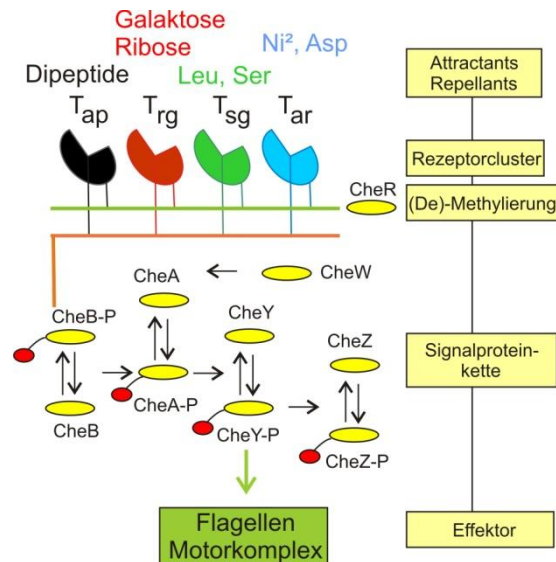


Abbildung 4.3.19: Verteilung der Diffusionszeiten in NIH 3T3 Mausfibroblasten, als fluoreszierende Spezies wurden mit ATTO 488 markierte Poly-T Oligonukleotide verwendet, die an Poly-A Abschnitte von Messenger-RNA hybridisieren können [Roth 2007].

Durch die Verwendung eines ATTO 488 markierten Poly-T Oligonukleotids, welches an die Poly-A Abschnitte von Messenger-RNA hybridisieren kann, gelang es, deutliche Unterschiede zu beobachten. Gebundene Oligonukleotide zeigten eine sehr langsame Diffusionszeit im Bereich von drei Millisekunden, während freie Oligonukleotide signifikant kürzere Diffusionszeiten aufweisen.

Werden die beiden gefundenen gegenläufigen Trends in den durchgeführten Experimenten in *E. coli* noch einmal reflektiert, insbesondere die Entwicklungen bei niedrigeren Induktionsniveaus und damit niedrigeren Konzentrationen des Signalproteins, so ist festzustellen, dass wahrscheinlich die Ergebnisse bei letzteren biologisch relevant sind. Bei zu hohen Konzentrationen ist davon auszugehen, dass der große Überschuss des Proteins sich homogen in der gesamten Bakterienzelle verteilt. An der Signalübertragung wird vermutlich nur ein kleiner Anteil beteiligt sein, während der Großteil ungerichtet und funktionslos durch das Bakterium treibt und damit möglicherweise die Diffusion der am Signaltransport beteiligten Proteine überstrahlt. Bei niedrigeren Induktionsniveaus sinkt der Anteil der überschüssigen Signalproteine, so dass wahrscheinlich die Ergebnisse bei niedrigeren Proteinkonzentrationen zuverlässiger sind.

Bei nochmaliger Betrachtung der untersuchten Vorgänge sind Heterogenitäten insbesondere im Bereich der Rezeptorcluster und der Flagellenmotoren zu erwarten. In diesen Bereich ist eine Interaktion des CheY von Nöten, um für eine effiziente Signaltransduktion zu sorgen. In einem Geflecht aus verschiedenen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen wird hier die Drehrichtung der Flagellen reguliert. Abbildung 4.3.20 verdeutlicht diese Wechselwirkungen schematisch.



4.3.20: Schematischer Ablauf der Chemotaxis. In einer komplexen Kaskade spezifischer Wechselwirkungen werden Informationen von den Rezeptoren zu den Effektoren (Flagellenmotoren) übermittelt.

Weiterführende Informationen zu den genauen Abläufen der Chemotaxis finden sich in Kapitel 2.5.3.

Somit ist durchaus eine Verlangsamung der Diffusion in den Außenbereichen der Bakterien zu erwarten, da die maßgeblichen Interaktionen an den Rezeptorclustern und den Flagellenmotoren alle in der Nähe der äußeren Membran stattfinden. Weitere Heterogenitäten, insbesondere direkt an den Rezeptorclustern, konnten hingegen nicht aufgelöst werden.

4.3.5 Diskussion möglicher Fehlerquellen

Zur Erklärung der Tatsache, dass in *E. coli* keine Heterogenitäten aufgelöst werden konnten lassen sich fünf unterschiedliche Ansätze finden:

1. Konzentration der fluoreszierenden Spezies
2. Optische Auflösung des verwendeten Mikroskops
3. Intrinsische Schwächen innerhalb der Auswerteroutine
4. Fehler der Methode
5. Optische Abweichungen, insbesondere an Grenzflächen

Ein sicherlich nicht zu unterschätzender Faktor ist die Konzentration des farbstoffmarkierten CheY. Auf Grund der sehr geringen Größe der Bakterienzellen von $2\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ resultiert ein sehr geringes Volumen von nicht mehr als 10^{-15} Liter. Dieses geringe Volumen bedeutet, dass bereits eine Kopie eines Proteins einer nanomolaren Konzentration entspricht. Bereits ohne Induktion der Proteinexpression werden aber etwa 50-100 Kopien pro Bakterienzelle erzeugt. Auf das Volumen des *E. coli* gerechnet entspricht dies bereits einer ca. $0,1\ \mu\text{M}$ Konzentration. Allerdings war es trotz oder gerade wegen dieser relativ hohen Konzentration nicht möglich, einen Kontrast zwischen Hintergrund und der Bakterienzellen zu ermitteln. Bei einer Induktion der Expression wurden entsprechend höhere Konzentrationen erreicht.

Im Vergleich dazu ist der Konzentrationsbereich in dem normalerweise Standard-FCS Messungen durchgeführt werden erheblich niedriger. Als ideal gilt hier der (sub)-nanomolare Konzentrationsbereich.

Wird die optische Auflösung, die durch die Wellenlänge des verwendeten Lasers und durch die numerische Apertur des verwendeten Immersionsobjektivs bestimmt wird, berechnet, so ergibt sich für einen konfokalen Aufbau eine maximale laterale Auflösung von 221 nm bei der Verwendung eines Wasserobjektivs bzw. von ca. 175 nm für ein Öbobjektiv. Nur Objekte, deren Abstand zueinander größer ist, können somit voneinander getrennt abgebildet werden. Im Verhältnis zur sehr geringen Größe der Bakterien ist es somit praktisch fast unmöglich, die unterschiedlichen Bereiche unabhängig voneinander zu untersuchen.

Ein besonderes Augenmerk muss allerdings auf die zur Messung und Auswertung gewählten Parameter gelegt werden. Zu diesem Zweck zeigt die folgende Abbildung 4.3.21 zwei unterschiedliche Messungen derselben Bakterienzelle. Zusätzlich wurden beide Messungen mit unterschiedlichen Parametern ausgewertet.

Neben der im Wesentlichen durchgeführten Auswertung unter Zusammenfassung benachbarter Bildpunkte wurden beider Bilder auch ohne Zusammenfassung ausgewertet.

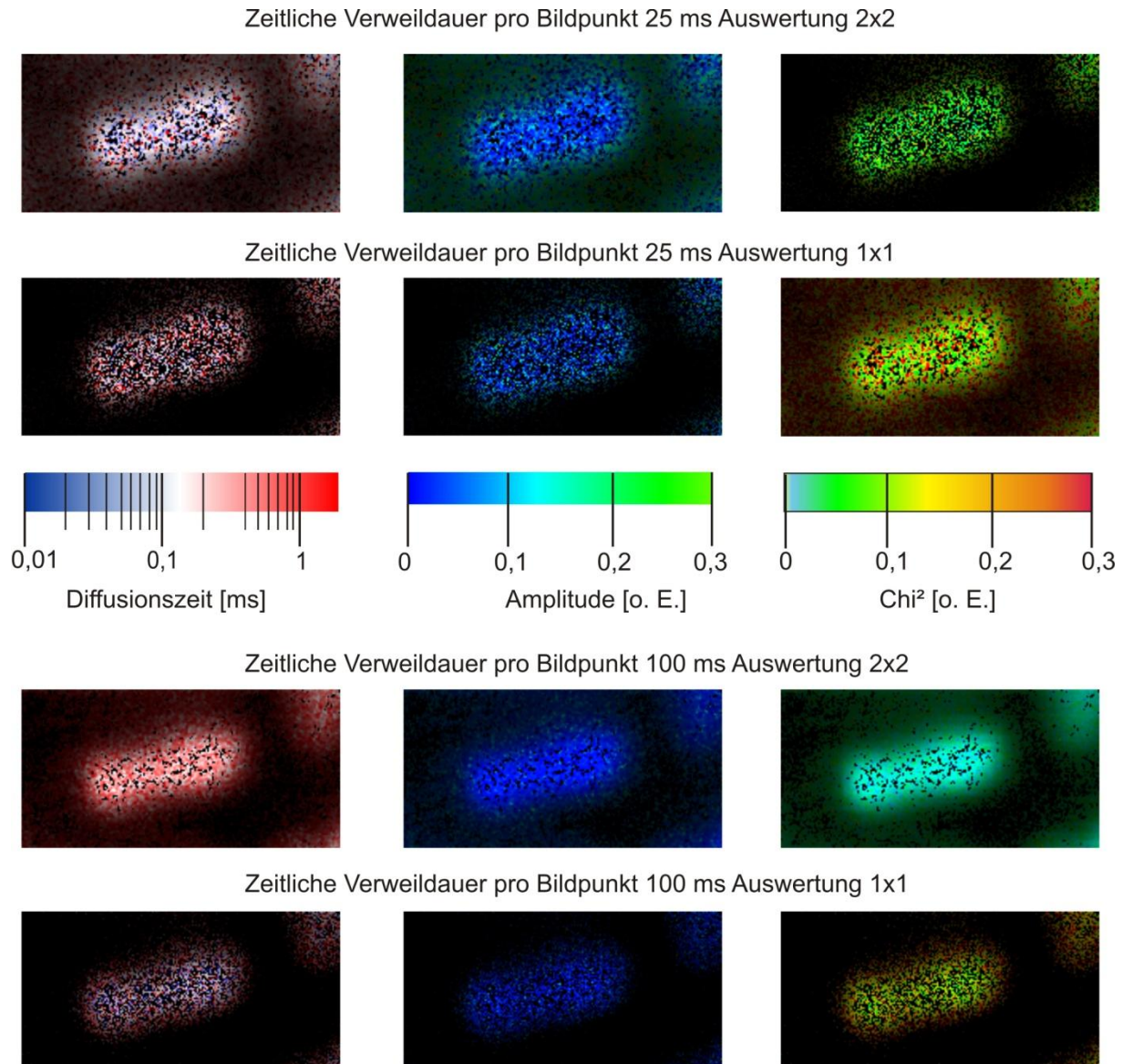


Abbildung 4.3.21: DIFIM-Messung und Auswertung desselben E. Coli mit 25 Millisekunden und 100 Millisekunden sowie unterschiedlicher Auswerteroutinen. Sichtbar sind die Unterschiede zwischen zusammenfassender Auswertung (Zeile 1 und 3) sowie Auswertung ohne Zusammenfassung (Zeile 2 und 4). Durch die Mittelung geht Feinauflösung verloren, ohne Zusammenfassung mehrerer Bildpunkte erhöht sich die Anzahl fehlgelaufener Modellanpassungen, erkennbar an einer Vielzahl schwarzer Pixel.

Die obenstehende Abbildung stellt das „Dilemma“ bei der Erstellung von Diffusionsbildern exemplarisch dar. Sowohl bei einer Messdauer von 25 Millisekunden als auch bei 100 Millisekunden geht bei der Zusammenfassung von benachbarten Bildpunkten Feinauflösung verloren. Offensichtlich gehen auf diesem Wege örtlich begrenzte Informationen verloren. Wird hingegen auf eine Zusammenfassung verzichtet, so resultiert zwar eine weniger „glatte“ Verteilung der Diffusionszeit, allerdings wird das mit einer wesentlichen Verschlechterung der

Modellanpassungen erreicht, was durch eine signifikante Erhöhung der jeweiligen χ^2 -Werte angezeigt wird. Zusätzlich steigt die Anzahl der schwarzen Bildpunkte vermehrt an. Dieses Verhalten zeigt an, dass die Modellanpassungen oftmals Werte erreichen, die physikalisch sinnlos sind und deswegen von der Auswertesoftware ausgeblendet werden. Tiefergehende Analysen der Auswertung erbrachten, dass in der Regel weniger sinnvolle Werte für die Diffusionszeit gefunden wurden

Ungeachtet dessen lässt sich aus den obigen Bildern auch eine mögliche Problemlösung ableiten. Der Vergleich zwischen der zweiten und der vierten Zeile deutet an, dass mit länger werdenden Messzeiten, und damit besser werdender Photonenstatistik, die Anzahl der fehl-gelaufenen Fits deutlich abnimmt. Bei einer weiteren Erhöhung der Verweildauer pro Bildpunkt sollte es somit möglich sein, völlig auf eine Mittelung benachbarter Bildpunkte zu verzichten und somit feinere Heterogenitäten auflösen zu können.

Möglicherweise lassen sich durch eine veränderte Auswerteroutine zur Bestimmung der Diffusionszeiten größere Genauigkeiten, insbesondere bei niedrigen Intensitäten, erreichen. Dazu sollte die Modellanpassung durch eine Abschätzung der Korrelationsverhältnisse vor und hinter einem manuell gesetzten Grenzwert ersetzt werden. Zwar erhält man auf diesem Wege keine weiteren Parameter wie die Amplitude der Korrelationsfunktion, dafür dürfte der Zeitaufwand für die Auswertung drastisch reduzieren.

Eine letzte Fehlerquelle betrifft Grenzflächenartefakte an der Außenseite der Bakterienzellen. Je nach Position des Laserfokus befindet sich nur ein Teil desselben im Bakterium, während größtenteils die Oberfläche getroffen wird. Dadurch verringert sich das effektive Volumen, in dem die Diffusion stattfindet auf einen Bruchteil und eine verkürzte Diffusionszeit ist die Folge.

5. Diskussion und Ausblick

Experimentell gliedert sich die vorliegende Arbeit in drei unterschiedliche Themengebiete: Neben der spektroskopischen Untersuchung von fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen, so genannten Quantum Dots, wurde ein neuartiger Ansatz, der Snap-Tag zur spezifischen Markierung *in vivo* eingesetzt.

Einen weiteren Forschungsschwerpunkt stellte die Untersuchung von Diffusionsvorgängen dar. Hierzu wurde sowohl die klassische Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zur Untersuchung der Diffusion von farbstoffmarkierten Proteinen durch künstlich modellierte Zytoplasmen als auch eine, in unserer Gruppe entwickelte neuartige spektroskopische Methode, die bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM), verwendet. Im Gegensatz zu Standard-FCS-Messungen wird bei DIFIM eine räumliche Auflösung der Diffusionszeiten über die gesamte untersuchte Probe erhalten, sodass räumliche Informationen, Fluoreszenzintensitäten und eine Analyse der Diffusion zeitgleich in einer Einzschrittmessung erhalten werden.

Diese Methode stellt, wie die meisten fluoreszenzmikroskopischen Verfahren, hohe Ansprüche an die spektroskopischen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore. Insbesondere die Photostabilität und eine hohe molekulare Helligkeit sind hierfür von Nöten. Deshalb sollten fluoreszierende Halbleiternanokristalle, sogenannte Quantum Dots, mit außergewöhnlich hohen Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeute auf die Möglichkeit hin untersucht werden, sie in einzelmolekülspektroskopischen Studien einzusetzen.

5.1 Spektroskopische Untersuchung von fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen

Seitdem Quantum Dots von mehreren Herstellern kommerziell angeboten werden, ist ihre Anwendung in den Lebenswissenschaften Chemie, Biologie und in der forschenden Medizin zu einer interessanten Alternative zu organischen Fluorophoren geworden. Insbesondere ihre spektroskopischen Eigenschaften, hohe Extinktionskoeffizienten bis in den Bereich von mehreren Millionen und sehr schmalbandige Emissionsspektren und vor allem die sehr hohe Robustheit gegen Photozerstörung könnten sie in Zukunft zu den Fluorophoren der Wahl werden lassen. Die hohe Photostabilität ist ihrem besonderen Aufbau geschuldet, im Gegensatz zu organischen Farbstoffen besitzen sie keine diskreten Molekülorbitale, sondern besitzen als metallische Cluster eine Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband.

Diese sind inert gegenüber Bindungsbrüchen, die klassischerweise zur Photozerstörung organischer Farbstoffe führen; somit erlauben Quantum Dots theoretisch unbegrenzte Beobachtungszeiten.

Ein kommerziell erhältlicher rotfluoreszierender Quantum Dots ist kugelförmig aus mehreren tausend Schwermetallatomen (in der Regel Cadmiumsulfid, -selenid und -tellurid) aufgebaut.

Auf diesem besonderen Aufbau beruht auch eine weitere Besonderheit der Nanokristalle; ihre Emissionswellenlänge ist lediglich vom verwendete Halbleitermaterial und der Größe des fluoreszierenden Kerns abhängig. Aus ihrem Aufbau resultiert allerdings auch die größte Schwachstelle der Quantum Dots, die ihrem routinemäßigen Einsatz in der Forschung noch entgegensteht. Durch die große Anzahl der am Aufbau beteiligten Atome liegen die Molekulargewichte, je nach Größe, bei mehreren Megadalton, die Größe liegt im Bereich von 10-15 Nanometern. Dadurch sind die Fluoreszenzmarker in der Regel deutlich schwerer und haben meist mindestens dieselbe Größe wie die mit ihnen zu untersuchenden Biomoleküle. Stöchiometrische Markierungsmethoden konnten bisher ebenfalls noch nicht etabliert werden, da die möglichen Bindungsstellen gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche der Quantum Dots verteilt sind. Ein möglicher Ansatz zur stöchiometrischen Markierung wurde zu Beginn dieser Arbeit evaluiert. Abbildung 5.1.1 zeigt den geplanten Syntheseweg zur Kollokalisierung von spektral trennbaren Quantum Dots über eine doppelsträngige DNA als spektroskopisches Lineal.

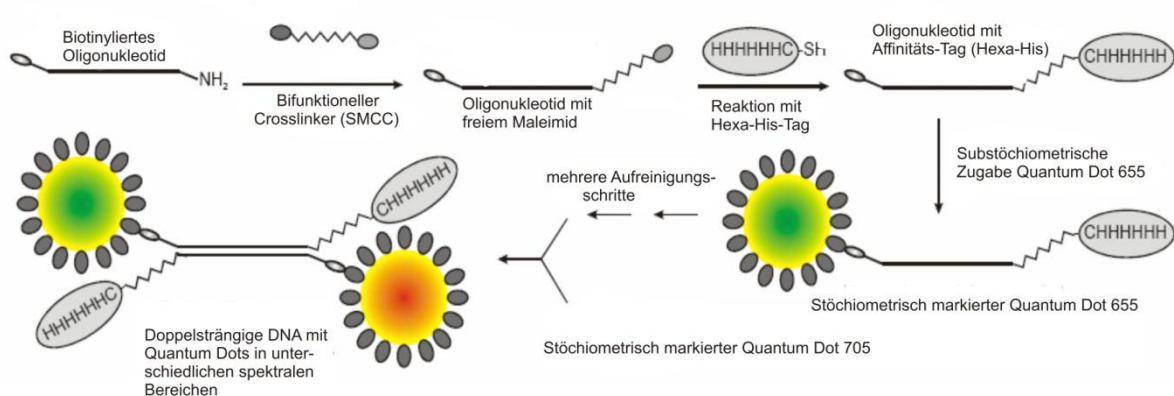


Abbildung 5.1.1: Geplanter Syntheseweg zur stöchiometrischen Markierung von Quantum Dots.

Bei einzelmolekülfluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der auf diesem Syntheseweg erzeugten Konjugate trat ein sehr starker Abfall der Fluoreszenzintensität der Quantum Dots festgestellt wurde, so dass sich nicht abschließend beurteilen lässt, ob der eingeschlagene Weg erfolgreich war. Anschließende umfassende Untersuchungen zur Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots durch biorelevante Substanzen wie Aminosäuren oder die Nucleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin zeigten, dass manche Biomoleküle die Fluoreszenz

reszenz der Quantum Dots signifikant löschen. Exemplarisch zeigt Abbildung 5.1.2 den Einfluss des Monophosphats der DNA-Base Cytosin bei steigenden Konzentrationen auf die beobachtete Fluoreszenz der Quantum Dots.

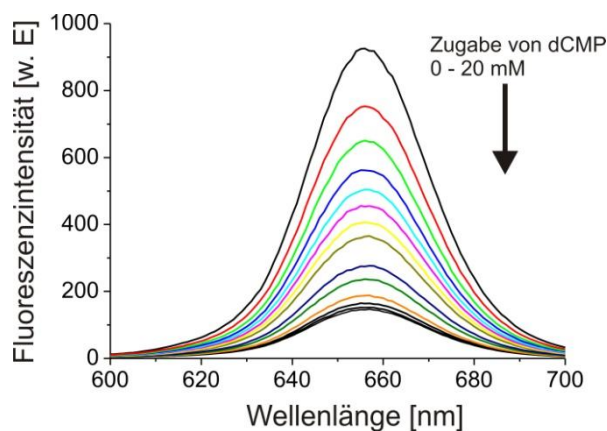


Abbildung 5.1.2: Kontinuierlicher Rückgang der Fluoreszenz des Quantum Dots 655 bei Zugabe von dCMP, dem Monophosphat der Nukleobase Cytosin.

Nach diesen ersten Experimenten wurden, in dieser Form erstmalig, umfangreiche Studien über die Fluoreszenzlöschung der Quantum Dots mit einer Vielzahl von biologisch relevanten Verbindungen wie den vier Nukleobasen und verschiedensten Aminosäuren durchgeführt.

Bei der Durchführung von Lösch-Experimenten mit den vier Nukleobasen erhaltene Stern-Volmer-Konstanten als Maß für die Stärke der Fluoreszenzlöschung sind in Tabelle 5.1 gezeigt.

Löschmolekül	Quantum Dot 655 K_{SV} [Mol^{-1}]	Quantum Dot 705 K_{SV} [Mol^{-1}]
dGMP	186,5 +/- 4	56,4 +/- 2,5
dCMP	115 +/- 2,15	38,5 +/- 0,5
dAMP	72,0 +/- 1,4	34,5 +/- 1,4
TMP	148,5 +/- 1,7	209,5 +/- 2,9

Tabelle 5.1 Übersicht der durch lineare Anpassung erhaltenen Stern-Volmer-Konstanten.

Während der Quantum Dot 655 (Halbleitermaterial CdSe) von allen Nukleobasen stark gelöscht wird, tritt beim Quantum Dot 705 (Halbleitermaterial CdTe) eine nahezu spezifische Löschung durch Thymidin-Monophosphat auf. Möglicherweise lässt sich dieser Effekt in Zukunft für die Entwicklung spezifischer Sonden nutzen.

Weitergehende Studien zeigten, dass der Mechanismus der Löschung eher dem Modell der statischen Fluoreszenzlöschung ähnelt, da eine Verkürzung der Fluoreszenzlebensdauer, ein Zeichen für dynamische Löschung, zumindest bei Raumtemperatur nicht beobachtet wurde. Allerdings scheint auch das Modell eines nicht fluoreszierenden Grundzustandkomplexes in dieser Form für Quantum Dots nicht zutreffend zu sein. Untersuchungen der Löschung an einzelnen Molekülen zeigten, dass einzelne Quantum Dots bei Zugabe eines Löschers ihre Fluoreszenzintensität nicht auf einen Schlag sondern kontinuierlich verlieren. Zudem war es nicht möglich, die ursprüngliche Fluoreszenz durch Austausch der Pufferlösung über der Oberfläche, und somit dem Entfernen des Löschers, wieder herzustellen. Zusammen mit einem beobachteten Sättigungsverhalten bei hohen Quencherkonzentrationen und dem Auftreten einer Restfluoreszenz lässt sich die Löschung nur mit einer direkten Wechselwirkung der Quencher mit der Oberfläche der Nanokristalle erklären. Diese äußerte sich auch in einer deutlichen Veränderung der Extinktionen sowohl der Quantum Dots als auch des Löschers Guanin, die über entsprechende UV-Vis Absorptionsmessungen verfolgt werden konnten. Experimente bei unterschiedlichen pH-Werten zeigten zudem, dass die Löscheffizienz aller untersuchten Substanzen bei pH 7,3 deutlich stärker ist als bei sauren oder basischen pH-Werten. Abbildung 5.1.3 zeigt die normierten Stern-Volmer-Konstanten für den Quantum Dot 655 und die vier Nucleobasen.

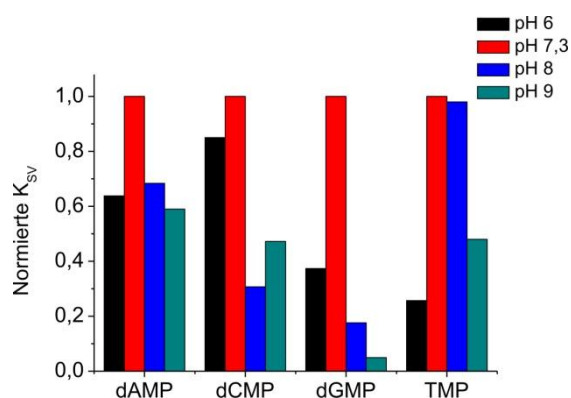


Abbildung 5.1.3: Normierte Stern-Volmer-Konstanten bei Verwendung des QD 655 mit den Monophosphaten der vier Nucleobasen.

Interessanterweise offenbarten sich bei analogen Experimenten mit dem QD 705 sehr ähnliche Ergebnisse. Zwar variierten die absoluten Werte, allerdings wurde in beiden Fällen jeweils die selbe Abstufung bei den unterschiedlichen pH-Werten beobachtet; ein deutlicher Hinweis darauf, dass die durch den pH-Wert beeinflussten Parameter, die einen Einfluss auf die Fluoreszenzlöschung haben, an den Löschern selber und nicht an den Halbleiterkristallen verursacht werden.

Ein, aus den durchgeführten Experimenten abgeleitetes, mögliches Modell zieht das Vorhandensein von fluoreszierenden Grundzustandskomplexen in Betracht. Durch eine zuneh-

mende Anlagerung von Löschmolekülen sinkt die Restfluoreszenz bei steigenden Quencherkonzentrationen kontinuierlich, eine komplette Fluoreszenzlöschung wird allerdings nicht erreicht:



Dieses Modell erlaubt es, alle oben beschriebenen experimentellen Befunde zu erklären, eine deutliche Unterstützung erhält es durch die Beobachtungen an einzelnen Quantum Dots.

Einzig der beobachtete deutliche Anstieg der Löschkonstanten bei steigenden Temperaturen lässt sich bisher nicht eindeutig erklären. Möglicherweise liegt bei höheren Temperaturen ein signifikanter dynamischer Anteil durch Stoßlöschung vor, oder der zu Grunde liegende Mechanismus zur Fluoreszenzlöschung erfordert eine Aktivierungsenergie, die thermisch oder photochemisch aufgebracht werden muss. Die Idee einer möglichen Aktivierungsenergie wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die beobachtete Löschung anregungswellenlängenabhängig ist. Je niedriger die Anregungswellenlänge gewählt wurde, desto höher war, wie in Abbildung 5.4 gezeigt, die beobachtete Fluoreszenzlöschung. Als Beispiel ist die Löschung des Quantum Dot 655 durch dGMP gezeigt.

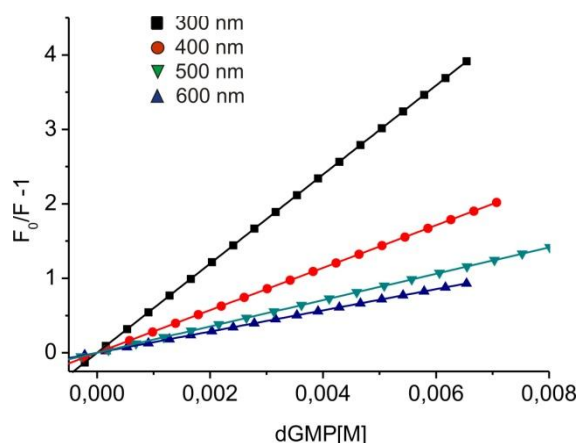


Abbildung 5.1.4: Wellenlängenabhängige Stern-Volmer-Plots; deutlich zu erkennen ist eine deutliche Verstärkung der Löschung bei kürzeren Wellenlängen.

Durch energiereiche Anregung entstehen energiereichere Excitonen, die offensichtlich durch ihre höhere Energie gegenüber Wechselwirkungen mit den Fluoreszenzlöschern „anfälliger“ sind.

Der eigentliche Löschmechanismus scheint über einen photoinduzierten Elektronentransfer, der zu einer Oxidation der Quantum Dots führt. Ähnliche Beobachtungen werden in der Literatur bei Verwendung extrem elektronenarmer aromatischer Verbindungen beschrieben. Ab-

Abbildung 5.5 zeigt den Effekt, den das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol (BME) auf die Fluoreszenzlöschung ausübt. Erneut ist der Effekt auf das System QD 655 / dGMP gezeigt. In der Literatur ist bekannt, dass BME in der Lage ist, das *Blinking*, starke stochastische Schwankungen in der Fluoreszenzintensität der Quantum Dots durch Reduktion von in Folge von Auger-Prozessen oxidierten Nanokristallen zu unterdrücken.

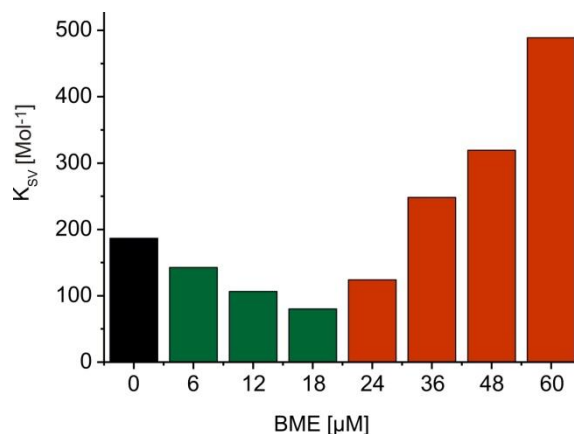


Abbildung 5.1.5: Experimentell bestimmte Stern-Volmer-Konstanten bei unterschiedlichen BME-Konzentrationen.

Bis zu einer Konzentration von 18 μM BME ist die erwartete signifikante Reduzierung der Löschung aufgetreten. Der starke Anstieg bei hohen Konzentrationen hingegen lässt auf Dimerbildung des β -Mercaptoethanols und daraus entstehenden Radikalkationen schließen. Um diesem Problem zu entgehen, wurden ähnliche Experimenten mit dem Reduktionsmittel TROLOX durchgeführt. Bei der Verwendung von TROLOX konnte sogar eine Verminderung der Löscheffizienz um nahezu 95 % erreicht werden. Darüberhinaus war es möglich, das *Blinking* bei Quantum Dots durch den Einsatz von Trolox komplett zu unterdrücken.

Darüberhinaus wurde in Arbeiten mit verschiedenen Aminosäuren eine starke Korrelation der Löschkonstanten mit dem pKs-Wert der entsprechenden Aminosäuren festgestellt. Daraus lässt sich ableiten, dass unterschiedliche Mechanismen für organische und aliphatische Verbindungen vorliegen müssen. Die pKs-Werte der Nukleobasen liegen alle im Bereich zwischen 9,4 und 9,8, ein Bereich bei dem für aliphatische Aminosäuren keine Löschung mehr beobachtet wurde. Lediglich die aromatische Aminosäure Tryptophan konnte in diesem Wertebereich noch eine signifikante Löschung hervorrufen.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus könnten Fluoreszenzlebensdauermessungen bei unterschiedlichen Temperaturen einen großen Beitrag leisten, die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzlöschung aufzuklären. Die gerade fertiggestellte Einbindung einer TCSPC-Einheit in das konfokale Laserscanning-Mikroskop Leica SP 5x wird es in Zukunft ermögli-

chen, Emissions- und Anregungsspektren von einzelnen oberflächenimmobilisierten Quantum Dots zu messen. Dadurch aufgelöste Heterogenitäten, die in Ensemble-Messungen verborgen bleiben, können ebenfalls wertvolle Hinweise, insbesondere zum Verständnis der Anregungswellenlängenabhängigkeit der Löschung beitragen. Mit den bei diesen Experimenten gewonnenen Ergebnissen sollte es möglich sein, die aktuell vorliegende und teilweise noch widersprüchliche Erkenntnislage zu einem universellen Modell zur Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots zu verknüpfen.

Aber auch die spezifische Löschung des QD 705 durch Thymidin bietet Möglichkeiten zur Entwicklung sondenbasierter Verfahren, ähnlich den, in der Gruppe von Prof. Sauer entwickelten, Smart Probes [Knemeyer 2000, Stöhr 2005], einem diagnostischen Ansatz zur Identifizierung spezifischer DNA-Zielsequenzen, das auf der spezifischen Löschung des Farbstoffs MR 121 durch die DNA-Base Guanodin basiert.

Wird die Erkenntnislage über die spezifische Löschung des Quantum Dots 705 weiter verbessert, sollte es in Zukunft möglich sein, ähnliche SONDENSYSTEME zur Identifikation biorelevanter Verbindungen zu entwickeln.

In Verbindung mit einigen Schwermetallionen wie Gold, Kupfer, Silber oder Quecksilber [Zhang 2008, Xia 2008, Liang 2004] ist es bereits gelungen, spezifische und quantitative SONDENSYSTEME zu entwerfen, die auf der Fluoreszenzlöschung von Quantum Dots basieren.

5.2 Mechanistische Untersuchungen der Diffusion durch den Kernporen-Komplex mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Die gerichtete Diffusion von molekularer Fracht durch den Kernporenkomplex ist einer der grundlegendsten bisher unverstandenen Transportvorgänge in eukaryontischen Zellen. Die gesamte Versorgung des Zellkerns mit wichtigen Biomolekülen verläuft unter sehr geringem Energieverbrauch und mit hoher Geschwindigkeit durch die etwa 2000 Kernporenkomplexe, die die Kernmembran perforieren. Der Kernporenkomplex selber ist aus etwa 30 unterschiedlichen Proteinen aufgebaut; alle haben jeweils eine strukturgebende Domäne zum Aufbau der Ringstruktur und langkettige Wiederholungen des Aminosäuremotivs Phenylalanin-Glycin, die sogenannten *FG-Repeats*, die den Innenraum der Kernpore mit einem dichten, dreidimensionalen und hydrophoben Netzwerk ausfüllen. Deren Aufgabe ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt worden. Unstrittig ist hingegen, dass dieses dreidimensionale Netzwerk die Aufgabe übernimmt, die freie Diffusion größerer molekularer Fracht mit Massen über 40 kDa zu unterbinden, sofern diese nicht die zum Transport nötige Kernlokalisationsssequenz (*Nuclear Localization Sequence*, NLS) aufweisen. Besitzt das entsprechende Protein allerdings diese NLS, so wird es von speziellen Importrezeptoren (z. B. Importin α , Importin β) gebunden und sehr schnell in den Kern transportiert. Zum Transport selber gibt es verschiedene Modellvorstellungen, experimentell belegt wurde allerdings, dass der Transport offensichtlich als eine Folge schneller Zufallsbewegung beschrieben werden kann [Yang 2004].

Um einen Einblick in die Transportvorgänge im Inneren der Kernpore zu erhalten sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst Diffusionsvorgänge verschiedener Proteine unter möglichst physiologischen Bedingungen gemessen werden. Physiologische Bedingungen im Zytoplasma entsprechen einer Gesamtproteinkonzentration von bis zu 400 mg/ml [Ellis 2003], zusammengesetzt aus mehreren tausend Proteinen unterschiedlichster Größen.

Bereits zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurde klar, dass solche Bedingungen nur durch komplexere Mischungen aus mehreren Proteinen und mit geeigneten Methoden zur Oberflächenpassivierung erreicht werden können. Der zu Beginn gewählte Ansatz, einzelne Proteine, in hohen Konzentrationen gelöst, als Messmedium zu verwenden, scheiterte an den spezifischen Nachteilen dieser Proteine wie Eigenfluoreszenz, Wasserlöslichkeit oder Reflektion des Anregungslichts. Abbildung 5.2.1 zeigt die Fluoreszenzintensitätsspuren einer $5 \cdot 10^{-11}$ M Lösung des Farbstoffs ATTO 633 in reinem PBS-Puffer und in einer Lösung mit 150 mg/ml BSA in PBS. Deutlich zu erkennen ist, dass das BSA in diesen Konzentrationen eine starke Eigenfluoreszenz aufweist, die zu einem starken Fluoreszenzhintergrund führt.

Die daraus resultierende Verschlechterung des Signal zu Hintergrund Verhältnisses machte eine vertrauenswürdige Auswertung der erhaltenen Korrelationskurven unmöglich.

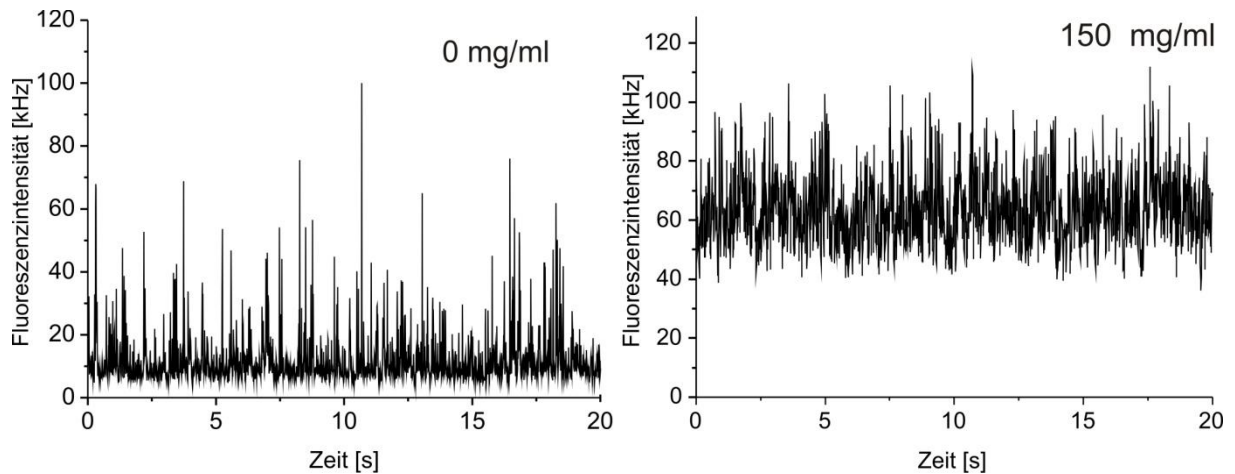


Abbildung 5.2.1: Fluoreszenzintensitätskurven des Farbstoffs ATTO 633 in reinem PBS-Puffer links und in Anwesenheit von 150 mg/ml BSA rechts. Ein starker Autofluoreszenzbeitrag des BSA führte zu sehr schlechten Signal-Rausch-Verhältnissen.

Erst durch die Modellierung von Gemischen aus bis zu vier unterschiedlichen Proteinen, BSA, Ovalbumin, desaktiviertem Pepsin und γ -Globulinen, war es schließlich möglich, geeignete Messbedingungen zu finden. Zusammen mit dem Einsatz neuartiger Methoden zur Oberflächenpassivierung, zum Einsatz kam hier ein Kopolymer aus Poly-L-Lysin und Poly-Ethylenglykol, konnten auch bei sehr hohen Proteinkonzentrationen von bis zu 377 mg/ml konsistente und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Auch bei diesen sehr hohen Konzentrationen waren stets gute Signal zu Hintergrund Verhältnisse bis zu zehn zu beobachten. Je nach Zusammensetzung der verschiedenen Proteine wurde in den Experimenten ein unterschiedlich stark ausgeprägter Anstieg der Diffusionszeit beobachtet. Abbildung 5.2.3 zeigt die erhaltenen Ergebnisse für zwei unterschiedliche Mischungsansätze.

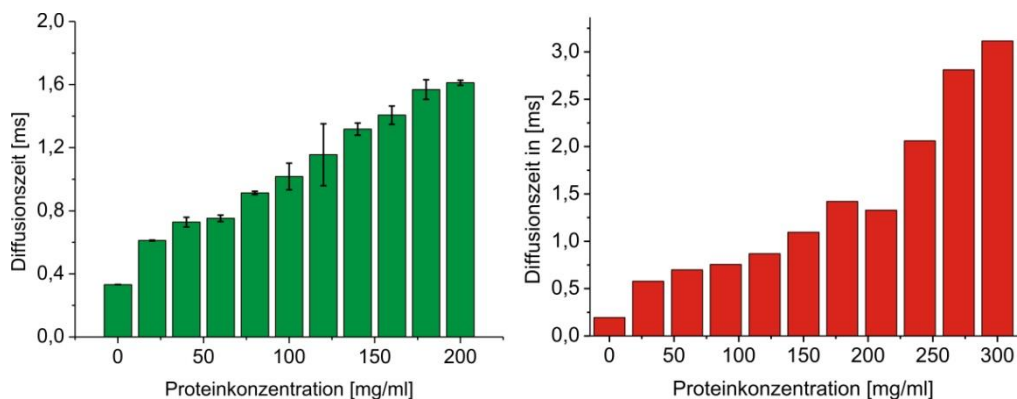


Abbildung 5.2.3: Verlauf der Diffusionszeiten bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der beteiligten Proteine.

Die Abbildung zeigt zwei Extremfälle, die bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen erhalten wurden. Wurden alle Proteine in ungefähr gleichen Mengen eingesetzt so resultierte daraus in der Regel ein linearer Anstieg der Diffusionszeiten, während höhere Anteile der schwereren γ -Globuline und BSA zu einem exponentiellen Anstieg geführt haben. Daneben wurden allerdings auch Gemische getestet, in denen keine systematischen Veränderungen der Diffusionszeiten beobachtet werden konnten, bei diesen traten lokale Maxima und Minima auf. Weitergehende Experimente zeigten, dass sich die resultierende Diffusionszeit über die Variation der Mengenverhältnisse deutlich regulieren lässt. Größere Konzentrationen der γ -Globuline führten zu deutlich verlängerten Diffusionszeiten, während erhöhte Konzentrationen des leichten Pepsins zu einer deutlichen Verkürzung führten.

Vergleichende Messungen mit einem biomimetischen Kernporenlumen konnten bisher allerdings noch nicht durchgeführt werden. Zwar wurden bereits mehrere Ansätze zur Proteinexpression, -extraktion und -aufreinigung in *E. coli* Bakterien durchgeführt, allerdings musste dabei festgestellt werden, dass die erhaltenen Mengen deutlich zu gering waren. Erste Expressionsvorgänge lieferten Ausbeuten im Bereich von einigen hundert Mikrogramm, weit unter den benötigten 15 – 20 Milligramm, die vergleichende Messungen erlauben würden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hurt (ZMBH, Uni Heidelberg) soll in zukünftigen Experimenten zunächst ein einzelnes Nukleoporin, Nsp1, untersucht werden, von dem, im Gegensatz zu den anderen Nukleoporinen, bekannt ist, dass es in den nötigen Ausbeuten gewonnen werden kann. Von Nsp1 ist zusätzlich bekannt, dass es sich durch eine Erniedrigung des pH-Wertes leicht in eine gallertartige Masse überführen lässt, deren Eigenschaften möglicherweise denen des Kernporenlumens entsprechen. In diesem künstlich modellierten Kernporenlumen sollen anschließend FCS-Messungen mit Proteinen ober- und unterhalb der 30 kDa-Grenze durchgeführt werden. Falls es möglich ist, über diesen vereinfachten experimentellen Ansatz Ergebnisse zu erhalten, die mit den literaturbekannten Trends übereinstimmen, könnte ein konsequenter „Ausbau“ des Modells durch schrittweise Erweiterung mit weiteren Nukleoporinen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Transportes durch den Kernporenkomplex erbringen. Ein potenzielles Fernziel läge, einen entsprechend positiven experimentellen Verlauf vorausgesetzt, in der Untersuchung von Grenzflächendynamiken zwischen dem künstlichen Hydrogel und einem umgebenden künstlichen Zytoplasma mit Hilfe bildgebender Techniken wie DIFIM.

In unserer Gruppe wird momentan mit dem Aufbau einer Zwei-Fokus-FCS begonnen, eine Erweiterung der Standard-FCS, die in der Lage ist, viele der bekannten experimentellen Schwierigkeiten im Umgang mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zu reduzieren. Die starke Abhängigkeit der Ergebnisse von der Dicke des verwendeten Objektträgers oder vom Brechungsindex der Probelösung lässt sich so auf ein Minimum reduzieren.

Da die bei der Proteinexpression zu erwartenden Mengen sehr begrenzt sind, bieten sich zusätzlich Techniken an, bei denen mit deutlich kleineren Probevolumen gearbeitet werden kann, um die erforderlichen Konzentrationen trotzdem zu erreichen. Ein möglicher Weg dahin, wäre die Durchführung der Diffusionsmessungen in Nanokavitäten mit Durchmessern im Submikrometerbereich.

Eine Weiterentwicklung des Ansatzes des künstlichen Zytoplasmas könnte sich in Zukunft als sehr nützlich zur Bewertung von Ergebnissen aus *in vivo* Diffusionsmessungen mit FCS oder DIFIM erweisen. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Diffusionszeit eine sehr starke Abhängigkeit von der Zusammensetzung eines Proteingemischs aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass bei nahezu gleichen Gesamtproteinkonzentrationen sehr starke Abweichungen in den gemessenen Diffusionszeiten auftraten, die sich eindeutig auf die jeweiligen Anteile leichter und schwerer Proteine zurückführen ließen. Daraus eröffnet sich ein neuer Ansatz zur Interpretation von Diffusionsmessungen in komplexen Systemen wie eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen.

5.3 Untersuchung der Diffusion des Signalproteins CheY mit Hilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie DIFIM

Die bakterielle Chemotaxis gilt als das am besten untersuchte Signalweiterleitungs- und Verarbeitungssystem in lebenden biologischen Systemen. Der Weg der Informationsweiterleitung von den Rezeptorclustern an den Zellpolen über eine Kaskade von Signalproteinen hin zu den Effektoren, den auf die gesamte äußere Membran der Bakterien verteilten Flagellenmotoren wurde, mechanistisch ausgiebig untersucht und die einzelnen Wechselwirkungen charakterisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Diffusionsverhalten des letzten Gliedes in der Signalkaskade, CheY, untersucht und mithilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie visualisiert werden. Diese TCSPC-gestützte Methode wurde von Dr. Christian Roth in unserer Gruppe entwickelt und mit ersten Messungen in eukaryontischen Zellen etabliert. Im Gegensatz zu ähnlichen Methoden, wie der Familie der Image Correlation (ICS) Verfahren, die in aller Regel auf der großflächigen Detektion mit CCD-Kameras basieren, können mit DIFIM auf Grund der sehr hohen Zeitaufösung auch schnelle Dynamiken wie die Diffusion einzelner Farbstoffe untersucht werden. Schnelle Dynamiken lassen sich hingegen mit kameragestützten Verfahren, auf Grund der langsamen Aufnahmezeiten der verwendeten Kameras, nur schwer erfassen.

Zur Untersuchung einer biologisch relevanten Fragestellung wurde zunächst ein bakterielles System ausgewählt. Neben der deutlich geringeren Größe im Vergleich zu eukaryontischen Zellen und der daraus resultierenden niedrigeren Messdauer von lediglich einigen Minuten im Vergleich zu bis zu einer Stunde zur Untersuchung eines eukaryontischen Zellkerns ist insbesondere das Anfärben der Bakterien mit geeigneten Fluorophoren deutlich erleichtert. Zur spezifischen und stöchiometrischen Markierung des zu untersuchenden CheY-Signalproteins wurde das kommerziell erhältliche SNAP-Tag-System verwendet. Es verbindet die spezifischen Vorteile von fluoreszierenden Proteinen, ihre stöchiometrische Anwendbarkeit, und von gut charakterisierten photostabilen organischen Fluorophoren und umgeht gleichzeitig die experimentellen Schwierigkeiten, die sowohl die fluoreszierenden Proteine als auch die organischen Fluorophore aufweisen. Das Zielmolekül kann mit dem Snap-Tag selektiv mit jedem gewünschten Farbstoff angefärbt werden. Um mit dem SNAP-Tag arbeiten zu können, musste zunächst ein Fusionsprotein zwischen dem CheY und dem für dieses System spezifischen DNA-Reparaturprotein hAGT kloniert werden. Die eigentliche Anfärbung des Proteins erfolgt in einer Reaktion zwischen der hAGT und ihrem Substrat, einem farbstoffmarkierten O⁶-Benzylguanin (BG).

Da dieses Substrat ein Derivat des bekannten Fluoreszenzlöschers Guanin ist, ist es in der Lage, einige gängige Fluorophore zu löschen [Stöhr 2008]. Eines dieser fluoreszenzgelöschten Substrate, BG-MR 121, wurde zur *in vivo* Markierung in *E. coli* verwendet, um einen unspezifischen Fluoreszenzhintergrund zu vermeiden. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 5.3.1 verschiedene Anfärbungen von *E. coli* mit BG-MR 121 und dem nicht gelöschten BG-ATTO 647N.

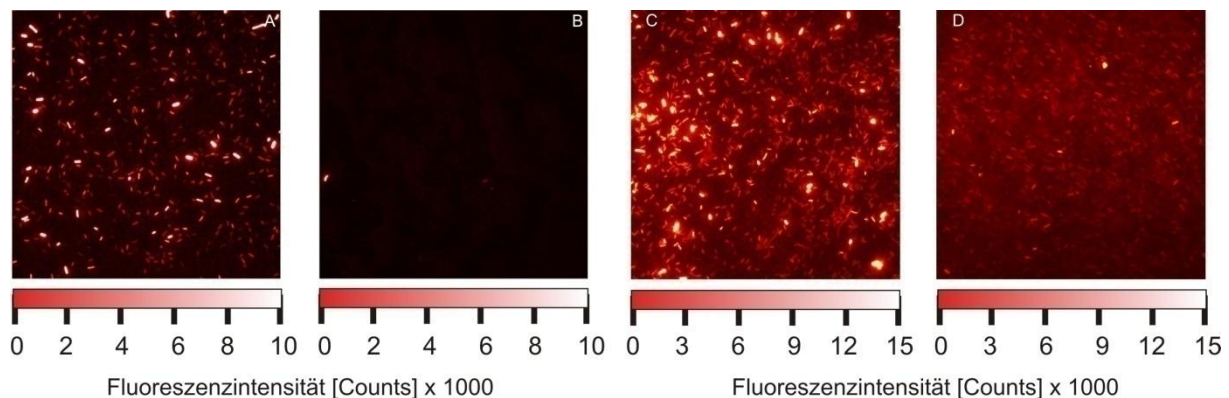


Abbildung 5.3.1: Fluoreszenzmarkierte *E. coli* Bakterien. Teil A und B Markierung mit BG-MR 121, A positiv-Probe in Anwesenheit von hAGT, B Negativ-Kontrolle. Teil C und D Markierung mit BG-ATTO 647 N. C ist die Positiv-Probe, D die Negativkontrolle. Anregung erfolgte über eine Quecksilberdampflampe, die Detektion wurde mit einer EMCCD-Kamera (Andor Ixon) durchgeführt.

Deutlich zu erkennen ist, dass bei Anfärbung in Anwesenheit der hAGT (Bild A: BG-MR121 und Bild C: BG-ATTO 647N) jeweils hohe Fluoreszenzintensitäten erreicht wurden, und dass im Falle der Negativkontrollen ohne hAGT nur bei Verwendung des nicht gelöschten BG-ATTO 647N eine signifikante Hintergrundfluoreszenz auftritt. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Untersuchungen des Diffusionsverhaltens stets das fluoreszenzgelöschte BG-MR 121 verwendet.

Nachdem mit diesen fluoreszenzgelöschten BG-Substraten ein sehr spezifisches Markierungsverfahren gefunden wurde, das sowohl die Spezifität endogener Markierung als auch die Photostabilität organischer Fluorophore verbindet, konnten Untersuchungen mit Hilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie durchgeführt werden. Der einfachere Ansatz, die Wahl fluoreszenter Proteine als Fluoreszenzmarker konnte nicht gewählt werden, da entsprechende Vorexperimente zeigten, dass die langen Messzeiten von bis zu 100 Millisekunden pro Bildpunkt zu einem signifikanten Ausbleichen der Probe als Folge von Photozerstörungsprozessen verursachen.

Abbildung 5.3.2.a Zeigt ein typisches Fluoreszenzintensitätsbild und das dazu gehörenden Fluoreszenzlebensdauerbild eines *E. coli* bei einer 5 μ M IPTG-Induktion zur Expression des CheY-hAGT Fusionsproteins.

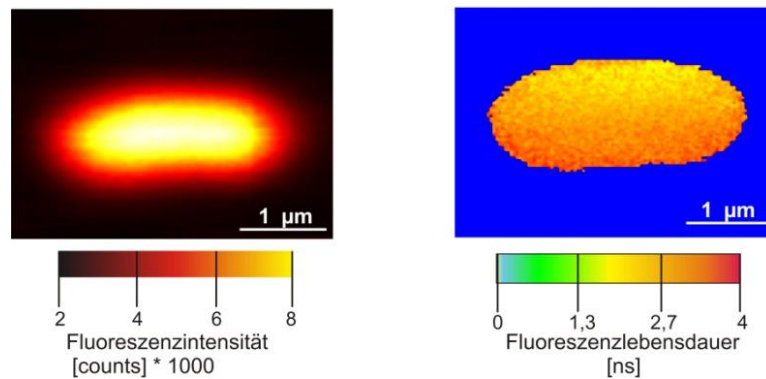


Abbildung 5.3.2.a: Fluoreszenzintensitäts- und -lebensdauerbild eines einzelnen *E. coli*.

Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität gleichmäßig über die gesamte Bakterienzelle verteilt ist. Aus der Fluoreszenzlebensdaueraufnahme lässt sich ableiten, dass nur an das Fusionsprotein gebundener Farbstoff vorhanden ist. Dieser sollte eine Lebensdauer zwischen 2,5 und 3 Nanosekunden aufweisen und somit gelb-orange erscheinen. Nicht gebundener Farbstoff hingegen sollte mit einer Lebensdauer von deutlich unter 2 Nanosekunden eher grünlich-gelb kodiert sein. Die restlichen bei der Auswertung erhaltenen Parameter sind in Abbildung 5.3.2.b dargestellt.

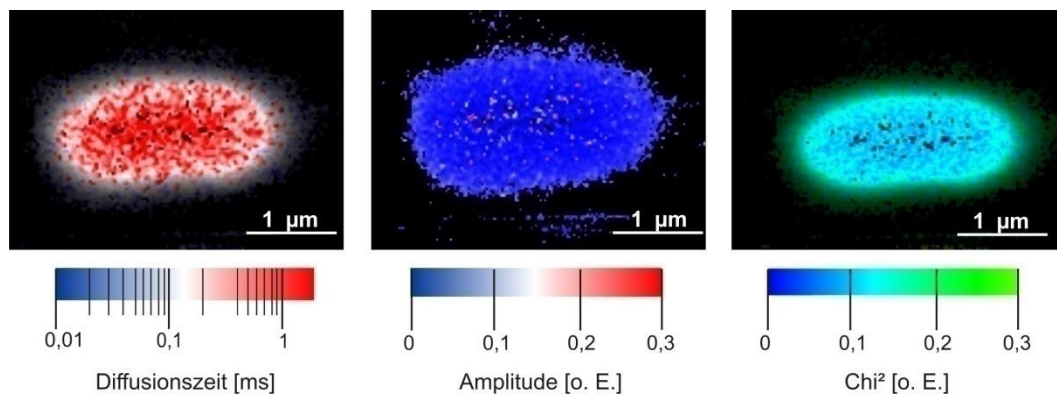


Abbildung 5.3.2.b: Graphische Darstellungen der Diffusionszeit (links) der Amplitude (mitte) sowie des χ^2 -Wertes als Goodness-of-fit Parameter. Lediglich das Diffusionszeitbild zeigt einen sichtbaren Kontrast.

Von besonderem Interesse in dieser Abbildung ist die Diffusionszeit. Während sowohl die Amplitude als Maß für die Konzentration der fluoreszierenden Spezies als auch der Goodness-of-fit Parameter χ^2 eine relativ homogene Verteilung zeigen, ist in der Diffusion ein deutlicher Unterschied zwischen dem Zellinneren und dem umgebenden Periplasma zu erkennen. Im Zellinneren wurden Diffusionszeiten im Bereich von zwei bis drei Nanosekunden festgestellt, während im Periplasma eine deutlich schnellere Diffusionszeit im Bereich von einigen 100 Mikrosekunden ermittelt wurde. Durch die deutlich höhere Konzentration an Proteinen und DNA im Zellinneren wäre ein solches Verhalten durchaus plausibel zu erklären.

Werden hingegen deutlich reduzierte IPTG-Induktionen durchgeführt, so stellt sich ein anderes Bild dar, das das Abbildung 5.3.3 zeigt.

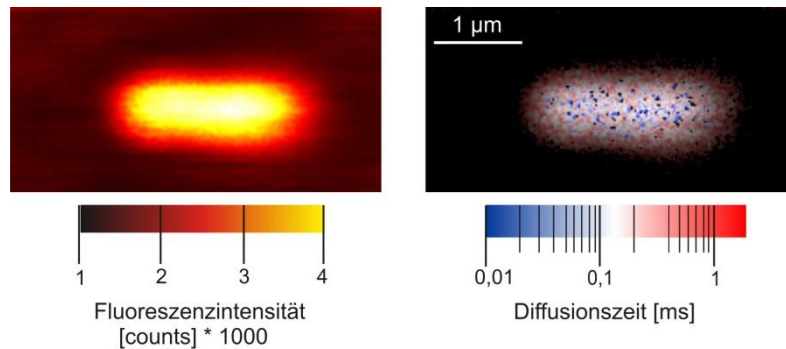


Abbildung 5.3.3: Fluoreszenzintensitäts- und Diffusionszeitbild eines E. Coli Bakteriums nach 1,5 µM IPTG Induktion. Gut zu erkennen ist eine inverse Verteilung der Diffusionszeiten im Gegensatz zu hohen Induktionsniveaus.

Durch eine signifikante Reduktion der IPTG-Induktion sind zwei signifikante Veränderungen aufgetreten. Neben einem Absinken der Fluoreszenzintensität um mehr als 50 % hat sich auch die Heterogenität der Diffusionszeit gravierend verändert. Bei niedrigeren CheY-Konzentrationen ist die Diffusionszeit im Zellinneren deutlich kürzer als im Periplasma. Da sowohl die Rezeptorcluster als auch die Flagellenmotoren in der äußeren Membran verankert sind, sollten in diesen Bereichen auch die grundlegenden Wechselwirkungen zwischen CheY und den anderen an der Chemotaxis beteiligten Komponenten am stärksten sein. Somit wäre in diesem Bereich auch eine deutlich langsamere Diffusion als im Zellinneren zu erklären.

Wird der Gradient der Diffusionszeit allerdings mit dem der Fluoreszenzintensität verglichen, so treten gewisse bei sehr hohen Intensitäten Parallelen zwischen Intensität und Diffusionszeit auf. Um experimentelle Artefakte ausschließen zu können, sollen in Zukunft DIFIM-Messungen in mit Farbstofflösungen gefüllten Vesikeln durchgeführt werden. Da innerhalb der Vesikel eine völlig ungestörte Diffusion stattfinden kann, sollten es diese Experimente ermöglichen, festzustellen, ob und in welchem Maße Artefakte an Grenzflächen zwischen hohen und niedrigen Fluoreszenzintensitäten auftreten.

Für die nähere Zukunft sind zudem Experimente geplant, bei denen die Bakterienzellen gezielt verschiedenen Lock- und Schreckstoffen ausgesetzt werden sollen, um weitergehende Erkenntnisse zu gewinnen. Um experimentelle Unsicherheiten so gering wie möglich zu halten wurden die bisherigen Untersuchungen ohne gezielte Zugabe solcher Substanzen durchgeführt, sodass die Chemotaxis möglicherweise im „Leerlauf“ beobachtet wurde. Vermutlich lassen sich durch die Durchführung der Experimente bei verschiedenen Konzentrationen dieser Substanzen systematische Veränderungen verfolgen.

Abschließend könnte es für die Zukunft sinnvoll sein, anstelle der Anpassung an Modellfunktion lediglich eine Abschätzung über das Korrelationsverhältnis durchzuführen. Hierfür wird an einem bestimmten Wert der Korrelationsfunktion eine Grenze gesetzt und über das Verhältnis der Amplitudenwerte eine Schätzung über die Diffusionszeit durchgeführt. Da die erhaltenen Daten für die Amplitude und den χ^2 -Wert ohnehin für die Evaluierung der erhaltenen Daten nur qualitativ nützlich sind, wäre deren Verlust durch die Schätzung keine allzu große Einschränkung für die Methode, hätte aber eine deutliche Beschleunigung der Auswertung zur Folge. Somit könnten die sehr langen Auswertezeiten, für die vorgestellten Bilder lagen diese im Bereich zwischen 30 und 60 Minuten, reduziert werden, so dass DIFIM zu einer Routinemethode entwickelt werden könnte.

Ein möglicher Ansatz zur Offenlegung vorhandener Heterogenitäten läge in der Verbindung der Auswerteroutine mit hochauflösenden optischen Methoden. Da mit den stochastischen Methoden nur sehr geringe Photonenstatistiken zu erwarten sind, ist eine solche Verbindung nur mit der STED-Mikroskopie durchzuführen. Hierfür ist die Verwendung von Farbstoffen von Nöten, die sowohl durch das BG-Substrat gelöscht werden als auch die speziellen Anforderungen der STED-Methode erfüllen.

6. Literaturverzeichnis

- Alivisatos 2005 A. P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell, "Quantum Dots as cellular probes" *A. Rev. Biomed Eng.*, **2005**, 7, 55-76.
- Ando 2004 R. Ando, H. Mizuno. "Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting". *Science*, **2004**, 306, 1370-1373.
- Astbury 1944 O. T. Avery, C. M McLeod, M. McCarty, "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types", *J Exp Med.*, **1944**, 79, Nr. 2,, S. 137–158.
- Auger 1925 P. Auger, „Sur L'effet Photoélectrique Composé", *Journal de Physique et Le Radium*, **1925**, 6, 205-208.
- Bawendi 2001 K. T. Shimizu, R. G. Neuhauser, C. A. Leatherdale, S. A. Empedocles, W. K. Woo, M. G. Bawendi; "Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots" *Physical Review B*, **2001**, 63, 205316.
- Betzig 2006 E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, C. Lindwasser, S. Plenych, J. Bonifacio, M. Davidson, Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution." *Science*, **2006**, 313, 5793, 1642-5.
- Boukhalova 2002 M. Boukhalova, F. W. Dahlquist, R. C. Stewart, „CheW binding interactions with CheA and Tar", *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 22251-22259.
- Brown 2007 C. M. Brown, R. B. Dalal, B. Hebert, M. A. Digman, A. R. Horwitz, E. Gratton , "Raster image correlation spectroscopy (RICS) for measuring fast protein dynamics and concentrations with a commercial laser scanning confocal microscope", *J. Micros.*, **2007**, 129 (1), 78-91.
- Brüssow 2004 H. Brüssow, C. Canchaya, W. D. Hardt. "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2004**, 68 (3): 560–602.
- Campbell 2001 R. E. Campbell, O. Tour. "A monomeric red fluorescent protein". *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, 99, 7877-7882.
- Darnton 2007 N. C. Darnton, L . Turner, S .Rojevsky, H. C. Berg. "On torque and tumbling in swimming Escherichia coli." *J Bacteriol.*, **2007**, 189(5),1756-64.
- De Clercq 2007 E. De Clercq, "The design of drugs for HIV and HCV", *Nat Rev Drug Discov*, **2007**, 6 (12): 1001–18.

- Demas 1971 J. N. Demas, G. A. Crosby, "The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields". *J Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991-1024.
- Derfus 2004 A. M. Derfus, W. C. W. Chan, S. N. Bhatia, *Nano Lett.* **2004**, 4, 11.
- Dertinger 2007 T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, I. Gregor, J. Enderlein. "Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements." *ChemPhysChem* **2007**, 8, 433-443.
- Digman 2008 M.A Digman, R. Dalal, A. F: Horwitz, E. Gratton, "Mapping the number of molecules and brightness in the laser scanning microscope", *Biophys Journal*, **2008**, 94, 2330-2332.
- Dubertret 2002 B. Dubertret et al, *Science* **2002**, 298, 1759.
- Eigen 1994 M. Eigen and M. Rigler, "Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 5740-5747.
- Elfros 2000 A. L. Elfros, D. Menashe, O. Biham, B. D. Laiktman, "Glassy properties and localization of interacting electrons in two-dimensional system" *Condensed Matter*, **2000**, 1-15.
- Ellis 2003 R. J. Ellis, A. P. Minton, "Cell biology: Join the crowd", *Nature*, **2003**, 425, 6953, 27.
- Enderlein 2004 J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra, J. Fitter, "The Arts and Artifacts of FCS", *Curr. Pharmacol. Biotechnol.*, **2004**, 5, 155-61.
- Falke 2001 J. J. Falke, G. L. Hazelbauer. „Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors." *Trends Biochem. Sc.*, **2001**, 26, 257-265.
- Feldherr 2001 C. M. Feldherr, D. Akin, R. J. Cohen, "Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts". *J. Cell Sci.*, **2001**, 114, 4621-7.
- Försters 1948 T. Förster. „Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz“, *Annalen der Physik*, **1948**, 2, 55-75.
- Frey 2006 S. Frey, R. P. Richter, D. Görlich, "FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties." *Science*, **2006**, 314, 5800, 815-7.
- Gaietta 2002 G. Gaietta, T. J. Deerinck. "Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking". *Science*, **2002**, 296, 503-507.
- Giepmans 2006 B. N. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, "The fluorescent toolbox for assessing protein location and function", *Science*, **2006**, 312, 5771, 217-24.
- Goueroui 2004 Z. Goueroui, A. Libchaber ; "Single Molecule Measurements of Gold Quenched Quantum Dots" *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 93, 166108-1.

- Grabowski 1976 Z. R. Grabowski, A. Grabowska. "The Förster cycle reconsidered", *Z Phys Chem, Neue Folge*, **1976**, 101, 197-208.
- Gregor 2007 I. Gregor, J. Enderlein. "Time-resolved methods in biophysics. 3. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy". *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, 6, 13-18.
- Griesbeck 2001 O. Griesbeck, G. S. Baird. "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein - Mechanism and applications". *J Biol Chem*, **2001**, 267, 29188-29194.
- Groll 2004 J. Groll, E. V. Amirgoulova, "Biofunctionalized, ultrathin coatings of cross-linked star-shaped PEG allow reversible folding of immobilized proteins" *J Am Chem Soc*, **2004**, 126(13) 4234-4239.
- Hammond 1979 P. R. Hammond. "Self-absorption of molecular fluorescence, the design of equipment for measurement of fluorescence decay, and the decay time of some laser dyes". *J Chem Phys*, **1979**, 70, 3884-3894.
- Hardeland 2006 U. Hardeland, E. Hurt, "Coordinated import of RNA polymerase III subunits", *Traffik*, **2006**, 7, 465-473.
- Haupts 1998 U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille, W. W. Webb. „Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 13273-8.
- Haustein 2007 E. Haustein and P. Schwille, "Fluorescence correlation spectroscopy: Novel variations of an established technique" *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, **2007**, 36: 151-169.
- Heafey 2007 E. Heafey, M. Laferriere, J. C. Scaiano, "Comparative study of the quenching of core and core-shell CdSe quantum dots by binding and non-binding nitroxides". *Photochem Photobiol Sci*, **2007**, 6, 5, 580-4.
- Hebert 2005 B. Hebert, S. Costantino, P. W. Wiseman. "Spatio-temporal image correlation spectroscopy (STICS): theory, verification, and application to protein velocity mapping in living CHO cells", *Biophys. J.*, **2005**, 88:3601-3614.
- Heilemann 2005 M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, and P. Tinnefeld "Carbocyanine dyes as efficient reversible single-molecule optical switch" *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 3801-3806.
- Heilemann 2008 M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, "Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, accepted.

- Hell 1992 S. Hell, and E.H.K. Stelzer; "Properties of a 4Pi-confocal fluorescence microscope". *J. Opt. Soc. Am. A* **1992**, 9: 2159.
- Herten 2003 D.P. Herten, M. Sauer; „Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie – Analytik an der ultimativen Grenze der Empfindlichkeit“. *Bunsenberichte* **2003**, 1: 5
- Herten 2008 D.-P. Herten "Einblicke in den Nanokosmos – Optische Einzelmolekül-spektroskopie" *Chemie in unserer Zeit*, **2008**, 42, 192-199.
- Herten 2008 b D. P. Herten, "Neue Einzelmolekültechniken und Fluoreszenzsonden zur Untersuchung chemischer Reaktionen, zur Entwicklung diagnostischer Methoden und für quantitative Messungen in lebenden Zellen" *Habilitationsarbeit*, **2008**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Heuberger 2005 M. Heuberger, T. Drobek, N. D. Spencer, Interaction forces and morphology of a protein-resistant poly(ethylene glycol) layer. *Biophys. J.*, **2005**, 88:495–504.
- Hirschfeld 1976 T. Hirschfeld; *Appl. Opt.* **1976**, 15, 2965-2966.
- Inoué 1995 S. Inoué; "Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy", In *Handbook of biological confocal microscopy*; 2nd ed; J.B. PAWLEY, Ed; Plenum Press: New York, **1995**, 1.
- Jasny 2001 B. R. Jasny and L. Roberts, "Unlocking the Genome", *Science*, **2001**, 294, 5540, 81.
- Kascha 1952 M. Kasha, "Collisional Perturbation of Spin-Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation", *J Chem Phys*, **1952**, 20, 71-74.
- Keppler 2003 A. Keppler, S. Gendreizig, "A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo", *Nature Biotech*, **2003**, 21, 86-89.
- Keppler 2004 A. Keppler, "Covalent Labeling of Fusion Proteins inside Living Cells", *Dissertation*, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, **2004**.
- Kiel 2007 A. Kiel, J. Kovacs, A. Mokhir, R. Krämer, D. P. Herten, "Direct Monitoring of Formation and Dissociation of Individual Metal Complexes by Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy", *Angew Chem Int Ed*, **2007**, 46, 3363-3366.
- Kim 2003 S. Kim, M. G. Bawendi, "Oligomeric ligands for luminescent and stable nanocrystal quantum dots", *J Am Chem Soc*, **2003**, 125(48):14652.
- Klar 2000 T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egnér, S. W. Hell, "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission", *Proc. Nat. A. Sci USA*, **2000**, 97, 15.

- Knemeyer 2000 J.-P. Knemeyer, N. Marmé, M Sauer, "Probes for detection of specific DNA sequences at the single molecule level", *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3717-3724.
- Kobe 1999 B. Kobe, "Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha", *Nat Struct Biol*, **1999**, 4 388-397.
- Krichevsky 2002 O. Krichevsky and G. Bonnet, "Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications", *Rep. Prog. Phys.*, **2002**, 65, 251-297.
- Kubitschek 1990 H.E. Kubitschek, "Cell volume increase in Escherichia coli after shifts to richer media", *J. Bacteriol.*, **1990**, 172 (1): 94–101.
- Kubitschek 2005 U. Kubitscheck, D. Grunwald, A. Hoekstra, D. Rohleder, T. Kues, J. P. Siebrasse, R. Peters, "Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex", *J Cell Biol*, **2005**, 168, 2 233-243
- Künzler 2001 M. Künzler, E. Hurt, "Targeting of RAN: Variations of a common theme?", *J. Cell Sci.*, **2001**, 114, 3233-3241.
- Kulkarni 2005 R. P. Kulkarni, D. D. Wu, M. E. Davis, S. E. Fraser, "Quantitating intracellular transport of polyplexes by spatio-temporal image correlation spectroscopy", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2005**, 102(21): 7523–7528.
- Kuno 2000 M. Kuno, D. P. Fromm, H. F. Hamann, A. Gallagher, D. J. Nesbitt; "Nonexponential blinking kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behaviour" *J. Chem. Phys*, **2000**, 112, 7, 3117-3120.
- Lakowicz 1999 J. R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition", *Plenum Press, New York*, **1999**.
- Langer 2007 J. D. Langer, C. M. Roth, J. Béthune, E. H. Stoops, B. Brügger, D. P. Herten and F. T. Wieland, "A conformational change in the alpha-subunit of coatamer induced by ligand binding to gamma-COP revealed by single-pair FRET", *Traffic*. Epub, **2007**.
- Levene 1919 P. Levene, "The structure of yeast nucleic Acid", *J. Biol. Chem*, **1919**, 40, 2, 415-424.
- Li 2004 M. Li, G. L. Hazelbauer, "Cellular stoichiometry of the components of chemotaxis signaling complex", *J. Bacteriol*, **2004**, 186, 3687-3694.
- Liang 2004 J.-G. Liang, H. Xie, X. P. Ai, Z. K. He, D. W. Pang, "Functionalized CdSe quantum dots as selective silver ion chemodosimeters" *The Analyst*, **2004**, 129(7), 619-622.
- Lippincott-Schwarz 1999 J. Lippincott-Schwartz, J. F. Presley, "Monitoring the dynamics and mobility of membrane proteins tagged with green fluorescent protein", *Me-*

- thods Cell Biol*, **1999**, 58, 261-281.
- Lippincott-Schwarz 2003 J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, "Development and use of fluorescent protein markers in living cells", *Science*, **2003**, 300, 87-91.
- Macara 2001 I.G. Macara, "Transport into and out of the nucleus", *Microbiol Mol Biol Rev*, **2001**, 65, 570-594.
- Madge 1972 D. Madge, E. L. Esilon, W. W. Webb, "Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System – Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy", *Phys. Rev.Lett.*, **1972**, 29, 705-8.
- Marcus 1956 R. A. Marcus, "On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer", *J Chem Phys*, **1956**, 24, 966-978.
- Matsuura 2004 Y. Matsuura, M. Stewart. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature*, **2004**, 432, 7019, 872-7.
- Medina 2002 M. A. Medina and P. Schwille, "Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology", *BioEssays*, **2002**, 24, 758-764.
- Meitner 1922 L. Meitner, "Über die β -Strahl-Spektren und ihren Zusammenhang mit der γ -Strahlung", *Zeitschrift für Physik A: Hadrons and Nuclei*, **1922**, 11, 35-54.
- Michalet 2005 X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics", *Science*, **2005**, 307, 538-544.
- Minsky 1957 M. Minsky. *Microscopy Aperatus*; U.S. Patent #3013467.
- Moerner 1989 W.E. Moerner, and L. Kador; "Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid." *Phys. Rev. Lett.* **1989**, 62: 2535.
- Moore 2000 J. P. Moore and M. Stevenson, "New targets for inhibitors of HIV-1 replication", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2000**, 1 (1): 40–9.
- Morgan 1993 D. G. Morgan, J. W. Baumgartner, G. L. Hazelbauer, "Proteins antigenically related to methyl-accepting chemotaxis protein of E. Coli detected in a wide range of bacterial species", *J Bacteriol*, **1993**, 175, 133-140.
- Nagai 2002 T. Nagai, K. Ibata, "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications", *Nat Biotechnol*, **2002**, 20, 87-90.
- Neuweiler 2005 H. Neuweiler, S. Doose, M. Sauer, "A microscopic view on mini-protein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 16650-16655.

- Nikoobakht 2002 B. Nikkobakht, C. Burda, M. Braun, M. Hun, M. A. El-Sayed, "The quenching of CdSe quantum dots photoluminescence by gold nanoparticles in solution", *Photochem. Photobiol*, **2002**, 75, 6 591-7.
- Nord 1998 S. Nord, „Spektroskopische Untersuchung der inter- und intramolekularen Fluoreszenzlöschung von Rhodaminfarbstoffen durch Nukleotide und Aminosäuren“, *Dissertation*, Universität Heidelberg **1998**.
- O'Connor 1984 D. V. O'Connor, D. Phillips, "Time-correlated single photon counting", *Ap Op*, **1984**, 25, 460-463.
- Oevering 1987 H. Oevering, M. N. Paddon-Row, M. Heppner, A. M. Oliver, E. Cotsaris, J. W. Verhoeven, N.S. Hush, "Long-Range Photoinduced Through-Bond Electron Transfer and Radiative Recombination via Rigid Nonconjugated Bridges: Distance and Solvent Dependence", *J Am Chem Soc*, **1987**, 109, 3258-3269.
- Orrit 1990 M. Orrit, J. Bernard, "Single pentacene molecules detected by fluorescence excitation in a p-terphenyl crystal", *Phys. Rev. Lett.*, **1990**, 14, 1057-66.
- Pasche 2005 S: Pasche, M. Textor, L. Meagher, N. D. Spencer, H. J. Griesser, "Relationship between interfacial forces measured by colloid-probe atomic force microscopy and protein resistance of poly(ethylene glycol)-grafted poly(L-lysine) adlayers on niobiasurfaces", *Langmuir*, **2005**, 21:6508-6520.
- Pemberton 2001 L. F. Pemberton, B. M. Paschal, "Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export", *Traffic*, **2001**, 6, 3, 187.
- Rehm 1969 D. Rehm, A. Weller, „Kinetik und Mechanismus der Elektronenübertragung bei der Fluoreszenzlöschung in Acetonitril“, *Ber Bunsenges Physik Chem*, **1969**, 73, 834-839.
- Reiss 2003 P. Reiss, S. Carayon, J. Bleuse, A. Pron, "Low polydispersity core/shell nanocrystals of CdSe/ZnSe and CdSe/ZnSe/ZnS type: preparation and optical studies", *Synthetic Metals*, **2003**, 139 (3), 649-652.
- Remington 2006 S. J. Remington, "fluorescent Protein: maturation, photochemistry and photophysics" *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2006**, 16: 714-21.
- Ribbeck 2002 K. Ribbeck, D. Görlich, "The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion", *EMBO J*, **2002**, 21, 11 2664-71.
- Ribbeck 2001 K. Ribbeck, D. Görlich, "Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes", *EMBO J*, **2001**, 20, 6, 1320-30.

- Riegler 2008 J. Riegler, F. Ditengou, K. Palme, T. Nann, "Blue shift of CdSe/ZnS nanocrystal-labels upon DNA-hybridization", *J Nanobiotechnology*, **2008**, 6, 7.
- Ries 2006 J. Ries and P. Schwille, "Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence spectroscopy", *Biophys. J.*, **2006**, 88: 372A.
- Rigler 1972 M. Ehrenberg, R. Rigler, "Polarized fluorescence and rotational brownian motion", *Chem Phys Letters*, **1972**, 14,5 539-544.
- Rigler 1995 R. Rigler; *J. Biotechnol.* **1995**, 41, 177-186.
- Rodriguez 2004 M. Rodriguez, C . Dargemont, F. Stutz. "Nuclear export of RNA". *Biol Cell*, **2004**, 96 (8): 639–55.
- Roth 2006 C. M. Roth, „Untersuchungen in lebenden Zellen mit Hilfe neuer Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie“, **2006**, *Dissertation Universität Heidelberg*
- Roth 2007 C. M. Roth, P. I. Heinlein, M. Heilemann and D. P. Herten, „Imaging Diffusion in living cells using time-correlated single photon counting“, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 7340-7345.
- Rout 2000 M. P. Rout, J. D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, B. T. Chait, "The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism", *J Cell Biol*, **2000**, 148, 4, 635-51.
- Rust 2006 M. J. Rust, M. Bates, X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)", *Nat Methods*, **2006**, 3, 10, 793-5
- Sauer 1995 M. Sauer, K-T Han, R. Müller, S. Nord, A. Schulz, S. Seeger, J. Wolf- rum, J. Arden Jacob, G. Deltau, N. J. Marx, C. Zander, and K. H. Drex- hage, "New fluorescent dyes in the red region for biodiagnostics", *J. Fluoresc.*, **1995**, 5, 247-261.
- Schuler 2005 B. Schuler, E. A. Lipman, P. J. Steinbach, M. Kumke, W. A. Eaton, "Po- lyproline and the "spectroscopic ruler" revisited with single molecule fluorescence", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 2754-2759.
- Schuler 2005 B. Schuler, "Single-molecule fluorescence spectroscopy of protein fold- ing", *ChemPhysChem*, **2005**, 6, 1206-1220 (2005).
- Schulmeister 2008 S. Schulmeister, M. Ruttorf, S. Thiem, D. Kentner, D. Lebiez and V. Sourjik, „Protein exchange dynamics at chemoreceptor cluster in *Escherichia coli*“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008**, 105 (17): 6403-6408.

- Seidel 1992 C. Seidel, „Laserspektroskopische Untersuchungen molekularer Aspekte der nukleobasenspezifischen Löschung von Fluoreszenzfarbstoffe“, *Dissertation*, Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, **1992**
- Selhuber 2006 C. Selhuber, “Biological Adhesion on Nanopatterned Substrates Studied with Force Spectroscopy and Microinterferometry”, *Dissertation*, **2006**, Universität Heidelberg.
- Shaner 200 N. C. Shaner, M Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. Y. Tsien, “Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein”, *Nat Biotechn*, **2004**, 22 (12) 1567-1572.
- Shaner 2008 N. C. Shaner, M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. Y. Tsien, “Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins”, *Nat Methods*, **2008**, 5 (6), 545-551.
- Sharma 2003 S. N. Sharma, Z. S. Pillai, P. V. Kamat, “Photoinduced Charge Transfer between CdSe Quantum Dots and p-Phenylene-diamine”, *J. Phys. Chem. B*, **2003**, 107, 10088-10095.
- Shera 1990 E.B. Shera, N.K. Seitzinger, L.M. Davis, R.A. Keller, and S.A. Soper, “Detection of single fluorescent molecules”. *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, 174: 553.
- Shimomura 1962 O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, “Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*”, *J Cell Comp Physiol*, **1962**, 59, 223-239.
- Sourjik 2000 V. Sourjik, H. C. Berg, “Localisation of components on the chemotaxis machinery on *E. Coli* using fluorescent proteins”, *Mol. Microbiol.*, **2000**, 37 740-751.
- Sprague 2004 B. L. Sprague and J.G. McNally, “FRAP analysis of binding: proper and fitting”. *Trends in Cell Biology*, **2004**, 15(2):84-91.
- Srivasta 2004 M. Srivasta, N. O. Petersen, “Image cross-correlation spectroscopy: A new experimental biophysical approach to measurement of slow diffusion of fluorescent molecules”, *Methods in Cell Science*, **2004**, 18, 1.
- Stock 2000 A. M. Stock, V. L. Robinson, P. N. Goudreau, “Two component signal transduction”, *Ann. Rev. Biochem.*, **2000**, 69, 183-215.
- Stöhr 2005 K. Stöhr, B. Häfner, O. Nolte, J. Wolfrum, M. Sauer, and D. P. Herten, “Species-specific identification of mycobacterial 16S rRNA signature sequences using smart probes”, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7195-7203.

- Stöhr 2008 K. Stöhr, "Fluoreszenzgelöschte Sonden für diagnostische und analytische Anwendungen", *Dissertation* Universität Heidelberg, **2008**.
- Stöhr 2009 K. Stöhr, D. Sieberg, D. P. Herten, "Quenched substrates for background-free fluorescence labeling of hAGT in living *E.coli*" *Bioconjugate Chemistry*, **2009**, manuscript in preparation.
- Stokes 1852 G. G. Stokes, "On the Change of Refrangibility of Light" *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1852**, 142, 463-562.
- Strickler 1962 S. J. Strickler, R. A. Berg, "Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetimes of molecules", *J Chem Phys.*, **1962**, 37, 814-822.
- Stroffekova 2001 K. Stroffekova, C. Proenza, "The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins", *Pflugers Arch*, **2001**, 442, 859-866.
- Stryer 1978 L. Stryer, "Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler", *Ann Rev Biochem*, **1978**, 47, 819-846.
- Tershkik 2000 J. Lippincott-Schwartz, G. H. Patterson, "Development and use of fluorescent protein markers in living cells", *Science*, **2003**, 300, 87-91.
- Thiem 2007 S. Thiem, D. Kentner, V. Sourjik, "Positioning of chemosensory clusters in *E. Coli* and its relation to cell division", *The EMBO Journal*, **2007**, 26, 1615-1623.
- Todar 2007 Kenneth Todar, "Pathogenic *E. coli*", *Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Tokumasu 2003 F. Tokumasu, J. Dvorak, "Development and application of Quantum Dots for immunocytochemistry of human erythrocytes", *J. Micros.*, **2003**, 211, 256-261.
- Touceda-Varela 2008 A. Touceda-Varela, E. I. Stevenson, J. A. Galve-Gasion, D. T. Dryden, J. C. Mareque-Rivas. "Selective turn-on fluorescence detection of cyanide in water using hydrophobic CdSe quantum dots." *Chem Commun (Camb)*, **2008**, 17, 1998-2000.
- Tsien 1998 R. Y. Tsien. "The green fluorescent protein." *Annu Rev Biochem*, **1998**, 67, 509-544.
- Vaiana 2003 A. Vaiana, H. Neuweiler, A. Schulz, J. Wolfrum, M. Sauer, and J. C. Smith, "Fluorescence quenching of dyes by tryptophan: Interactions at atomic detail from combination of experiment and computer simulation", *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14564-14572.
- Vaillancourt P. E. Vaillancourt (Editor) "Methods in Molecular Biology, vol. 205, *E. coli* Gene Expression Protocols", Humana Press Inc., Totowa, NJ.

- Van Sarck 2002 W. G. H M. van Sarck, P. L. T. M. Frederix, D. J. van den Heuvel, A. A, Bol J. N. J. van Lingen, C. de Mello Donega, H. C. Gerritsen, A. Meijerink, "Blueing, Bleaching and Blinking of single CdSe/ZnS Quantum Dots", *ChemPhysChem*, **2002**, 3 (10), 871-879.
- Vogelsang 2008 J. Vogelsang, R. Kasper, C. Steinhauer, B. Persson, M. Heilemann, M. Sauer, P. Tinnefeld, "A Reducing and Oxidizing System Minimizes Photobleaching and Blinking of Fluorescent Dyes", *Angew Chem Int Ed*, **2008**, in press.
- Watson 1953 J. D. Watson, F. H. C. Crick; "Molecular Structure of Nucleic Acids" *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
- Webb 1995 R. H Webb, "The pixilated image", In *Handbook of biological confocal microscopy*, 2 ed; J.B. PAWLEY, Ed; Plenum Press: New York, **1995**, 55.
- Weiss 1999 S. Weiss, "Fluorescence spectroscopy of single biomolecules"; *Science*, **1999**, 283, 1676-83.
- Welch 1993 M. Welch, K. Oosawa, S. Aizawa, M. Eisenbach. "Phosphorylation-dependent binding of a signal protein to the flagella switch of bacteria", *Proc. Natl. Acad Sci U S A*, **1993**, 90, 8787-8791.
- Weller 1982 A. Weller, "Photoinduced electron transfer in solution: exciplex and radical ion pair formation free enthalpies and their solvent dependence", *Z Phys Chem*, **1982**, Neue Folge 133, 93-98.
- Weston 2002 K. D. Weston, M. Dyck, D. P. Herten, C. Müller, P. Tinnefeld, M. Sauer, "Measuring the number of independent emitters in single molecule fluorescence images and trajectories using coincident photons", *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 5342-5349.
- Wichmann 1994 J. Wichmann and S. W. Hell, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission", *Opt. Letters*, **1994**, 19 (11), 780-782.
- Widengren 1999 J. Widengren, P. Schwille, "Characterization of photoinduced isomerization and back-isomerization of the cyanine dye Cy5 by fluorescence correlation spectroscopy", *Chem. Phys.*, **1999**, 250, 171-86.
- Wiseman 1999 P. Wiseman, N. Petersen, "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.
- Wiseman 2000 P. Wiseman, J. Squier, M. Ellisman, K. Wilson, "Two-photon image correlation spectroscopy and image cross-correlation spectroscopy", *J. Microsc.*, **2000**, 200:14-25.

-
- Xia 2008 Y. S. Xia, C. Q. Zhu, "Use of surface-modified CdTe quantum dots as fluorescent probes in sensing mercury (II)", *Talanta*, **2008**, 75, 1, 215-21.
- Xiao 2004 Y. Xiao, P. E. Barker, "Semiconductor nanocrystal probes for human metaphase chromosomes" *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32:27.
- Yang 2004 W. Yang, J. Gelles, M. S. Musser, "Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2004**, 101, 35, 12887-92.
- Yu 2005 Z. Yu, L. Guo, H. Du, T. Krauss, J. Silcox, "Shell distribution on Colloidal CdSe/ZnS Quantum Dots", *Nano Lett.*, **2005**, in press.
- Zhang 2002 J. Zhang, R. E. Campbell, "Creating new fluorescent probes for cell biology". *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2002**, 3, 906-918.
- Zhang 2008 J. Zhang, R. Badugu, J. R. Lakowicz, "Fluorescence Quenching of CdTe Nanocrystals by Bound Gold Nanoparticles in Aqueous Solution". *Plasmonics*, **2008**, 3, 1, 3-11.

7. Anhang

Abkürzungen

A	Absorption
ADC	Analog zu Digital Wandler (eng. Analog to digital converter)
AGT	Alkylguanosin-Alkyl-Transferase
APD	Avalanche Photo Diode
APS	Amino-Propylsilan
BG	Benzyldguanosin
BME	β -Mercaptoethanol
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Lichtgeschwindigkeit
CCD	Charge-coupled Device
CFP	Cyan fluorescent protein
dAMP	2-Desoxy-Adenosinmonophosphat
dCMP	2-Desoxy-Cytosinmonophosphat
dGMP	2-Desoxy-Guanosinmonophosphat
DIFIM	Bildgebende Diffusionsmikroskopie (Diffusion Imaging Microscopy)
DNA	Desoxy-Ribo-Nukleinsäure
DOL	Degree of labeling (Markierungsgrad)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device
eV	Elektronenvolt
FCS	Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie
FIFO	First in – first out
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GFP	Green fluorescent protein

GTP	Guanosintriphosphat
HIV	HIV Human Immundeficiency Virus (menschliches Immunschwächevirus)
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital (eng. Highest occupied molecular orbital)
I	Intensität
IC	Internal Conversion (Innere Umwandlung)
IPTG	Isopropyl- β -D1 thiogalactopyranosid
ISC	Intersystem Crossing
kDa	Kilodalton
K_{sv}	Stern-Volmer-Konstante
LED	Light emitting diode
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (eng. Lowest unoccupied molecular orbital)
M	Molar (Mol/l)
MCS	Multi Channel Scalar
MHz	Megahertz
MLE	Maximum Likelihood Estimator
NHS	N-Hydroxy-Succinimid
NLS	Kernlokalisierungssequenz (eng. Nuclear localization sequence)
nm	Nanometer
NWE	Normalwasserstoffelektrode
OD	Optische Dichte
PALM	Photo-activated localization microscopy
PBS	Phosphine Buffered Saline
PEG	Poly-Ethylen-Glykol
PET	Photoelektronentransfer
PLL	Poly-L-Lysin
PMT	Photo-multiplier Tube
QD	Quantum Dot
RNA	Ribonukleinsäure

s	Sekunde
SFLIM	Spectrally resolved fluorescence lifetime microscopy
S_n	Singulettzustand
SOMO	Einfach besetztes Molekülorbital (Single occupied molecular orbital)
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic optical reconstruction microscopy
TAC	Zeit zu Amplitude Wandler (eng. Time to amplitude converter)
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting
TEAA	Triethylammoniumacetat
TMP	Thymin-Monophosphat
T_n	Tripletzustand
TROLOX	6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-carbonsäure
VR	Vibrational Relaxation (Schwingungsrelaxation)
YFP	Yellow fluorescent protein
ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
ν	Frequenz

Artikel

„Quenched substrates for background-free fluorescence labeling of hAGT in living *E.coli*“, K. Stöhr, D. Siegberg, S. Schulmeister, V. Sourjik, D.P. Herten, Manuskript in Vorbereitung.

“Specific Quenching of Quantum Dot Fluorescence”, D. Siegberg, D. P. Herten, Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge

“Single molecule fluorescence spectroscopy: approaches toward quantitative investigations of structure and dynamics in living cells”. D. Siegberg, C.M. Roth, D.P. Herten, *BIOS/SPIE 2006*, San Jose, USA.

“Application of a novel labeling technique to visualize the Diffusion of chemotaxis proteins in *E. coli* using DIFIM”, *1st Bioquant Group Seminar, 2008*.

Poster

“Development of a new technique for background reduced *in vivo* labeling”, D. Siegberg, K. Stöhr, D. P. Herten. 14th Anniversary International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences, **2008**, Berlin, Deutschland.

“Diffusion Imaging Microscopy (DIFIM) in living cells”, J. Balbo, P. Heinlein, D. Siegberg, K. Stöhr, D. P. Herten. 14th Anniversary International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences, **2008**, Berlin, Deutschland.

“Development of a method to study diffusion processes in living cells” J. Balbo, D. Siegberg, D. P. Herten. ViroQuant Retreat, **2008**, Asselheim, Deutschland.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen danken, deren Unterstützung maßgeblich zur Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum und Dr. Dirk-Peter Hertzen danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis und das Übertragen der interessanten und herausfordernden Themen sowie ihr fortwährendes Interesse an meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Forschungspraktikanten Marcus Böhm und Jan-Willi Janiesch, deren Ideen und Einsatz einen substantziellen Beitrag zu den Diffusionsmessungen in wässrigen Proteinlösungen geleistet haben.

Sonja Schulmeister aus der Gruppe von Dr. Victor Sourjik (ZMBH) und Tanja Ehrhard danke ich für die Bereitstellung der verschiedenen *E. coli* Klone, die im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden.

Der gesamten Arbeitsgruppe BQ0007, Jessica Balbo, Daniel Barzan, Tanja Ehrhard, Pia Heinlein, Dr. Alexander Kiel, Anton Kurz, Michael Schwering, Anne Seefeld, Christina Spasova, Dr. Katharina Stöhr, Haisen Ta, Coli sowie Dr. Kyung-Tae Han und Dr. Mike Heilemann danke ich für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die vielen Anlässe, die mit Weißwurst, Grillfleisch und Bier oder Kuchen begangen wurden.

Hervorzuheben sind Dr. Katharina Stöhr und Dr. Kyung-Tae Han, die, zumeist ohne Meckern, das Vorhandensein der verschiedensten USB-Geräte in unserem gemeinsamen Büro bewundert haben.

Für die kritischen Kommentare und Anmerkungen beim Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dr. Kyung-Tae Han, Jessica Balbo, Alexander Kiel und Michael Schwering.

Ich danke meinen Eltern, meiner Freundin Susanne und allen meinen Freunden für ihre Unterstützung und ihr Verständnis insbesondere in der Endphase meiner Promotion.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst habe und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, im Januar 2009 _____

(Daniel Siegberg)

In Erinnerung an Dr. Katharina Stöhr