

**Fluoreszenzmarker der hochauflösenden  
Einzelmolekülmikroskopie – Entwicklung einer  
Quantum-Dot-Sonde und Charakterisierung organischer  
Fluorophore *in vitro* und *in vivo***

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Ulrike Schmitz-Ziffels  
aus  
Bonn

Bonn, April 2013



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Tag der Promotion: 2. Juli 2013

Erscheinungsjahr: 2013





Für meine Mutter und Jochen



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT . . . . .	1
1.1.1	Kernporenkomplex und Kerncytoplasmatransport . . . . .	1
1.1.2	Modelle der NPC-Permeabilitätsbarriere . . . . .	7
1.1.3	Quantum Dots als KCT-Sonden . . . . .	17
1.1.4	Kerncytoplasmatransport in permeabilisierten Zellen . . . . .	21
1.2	Analyse photophysikalischer Eigenschaften organischer Fluorophore . . . . .	23
1.2.1	Grundlagen zur Entstehung von Fluoreszenz . . . . .	24
1.2.2	Nanolokalisierung eines Fluoreszenzemitters . . . . .	27
1.2.3	Die Photostabilität von Fluorophoren . . . . .	30
1.2.4	Die untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	34
1.2.5	Neutravidin-vermittelte Immobilisierung der Farbstoffe am Deckglas . . . . .	36
1.2.6	Immobilisierung von Atto655 in Lebendzellen . . . . .	39
1.3	Motivation . . . . .	39
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>43</b>
2.1	Allgemeines . . . . .	43
2.1.1	Zellkultur . . . . .	43
2.1.2	Gelchromatographie . . . . .	43
2.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	44
2.1.4	Zellmanipulation <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . . . . .	44
2.1.4.1	Permeabilisieren adhärenter Säugerzellen . . . . .	44
2.1.4.2	Mikroinjektion adhärenter Säugerzellen . . . . .	45
2.1.4.3	Kontrolle der Kerndichtigkeit . . . . .	45
2.1.5	Fluoreszenzmikroskope . . . . .	46
2.1.5.1	Konfokales Fluoreszenzmikroskop . . . . .	46
2.1.5.2	Einzelmolekül Fluoreszenzmikroskop (EMFM) . . . . .	46

2.1.6	Bildbearbeitung . . . . .	47
2.2	Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT . . . . .	47
2.2.1	Gewinnung von Imp $\beta$ 1 durch Überexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	47
2.2.2	Markierung von Imp $\beta$ 1 mit QD600 . . . . .	48
2.2.3	Markierung von GFP mit QD600 . . . . .	48
2.2.4	Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	48
2.2.5	QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	48
2.2.6	QD600-GFP in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	49
2.2.7	MSD-Analyse der QDot-Proben zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers . . . . .	49
2.3	Photobleichen einzelner immobilisierter Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	51
2.3.1	Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen . . . . .	51
2.3.1.1	Einfach-Markierung von Neutravidin . . . . .	51
2.3.1.2	Einfach-Markierung von mAb414 . . . . .	51
2.3.2	Aufnahme von Absorptions-, Emissions- und Transmissionsspektren . . . . .	51
2.3.3	Biotin-Neutravidin vermittelte Immobilisierung der Farbstoffmoleküle . . . . .	52
2.3.3.1	Herstellung PEGylierter Deckgläser . . . . .	52
2.3.3.2	Biotinylierung PEGylierter Deckgläser . . . . .	53
2.3.3.3	Immobilisierung von Neutravidin-Farbstoffkonjugaten auf biotinylierten Deckgläsern . . . . .	53
2.3.4	Abbilden des Photobleichens am Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskop: Aufnahme der Bleichfilme . . . . .	53
2.3.4.1	Justieren des Systems . . . . .	53
2.3.4.2	Aufnahme der Filmserien . . . . .	54
2.3.5	Analyse der Bleichfilme: Ermittlung von Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ und Photonenzahl $\mathcal{N}$ . . . . .	55
2.3.5.1	Bestimmung der Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ . . . . .	56
2.3.5.2	Bestimmung der Photonenzahl $\mathcal{N}$ . . . . .	60
2.3.5.3	Bestimmung der lokalen Anregungsintensität $I(i, j)$ . . . . .	70
2.3.5.4	Erstellen der Bleich- bzw. Photonendiagramme . . . . .	72
2.3.6	Analyse von Atto655 in Lebendzellen . . . . .	73
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>75</b>
3.1	Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT . . . . .	75
3.1.1	Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	75

3.1.2	QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	76
3.1.3	QD600-GFP in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	78
3.1.4	Einzelne QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen . . . . .	80
3.1.5	Hydrodynamische Durchmesser der QD600-Imp $\beta$ 1 . . . . .	83
3.2	Das Photobleichen einzelner immobilisierter Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	83
3.2.1	Biotin-Neutravidin vermittelte Immobilisierung der Farbstoffmoleküle . . . . .	84
3.2.2	Analyse der Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ in Abhängigkeit von der Anregungsintensität $I$ . . . . .	86
3.2.2.1	Die Bestimmung der Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ . . . . .	86
3.2.2.2	Die lokale Anregungsintensität $I(i, j)$ . . . . .	90
3.2.2.3	Die Auftragung der Bleichzeiten $\tau_{\Lambda}$ gegen die Anregungsintensität $I$ . . . . .	91
3.2.2.4	Bleichdiagramme der Fluoreszenzfarbstoffe für TB und PBS . . . . .	92
3.2.3	Analyse der Photonenzahlen $\mathcal{N}$ in Abhängigkeit von der Anregungsintensität $I$ . . . . .	93
3.2.3.1	Bestimmung des Detektionskoeffizienten $Q_F$ . . . . .	93
3.2.3.2	Der Kamerafaktor $\gamma$ . . . . .	100
3.2.3.3	Die Berechnung der Grauwertsumme $\mathcal{B}$ . . . . .	100
3.2.3.4	Die Berechnung der Photonenzahlen $\mathcal{N}$ und Auftragung gegen die Anregungsintensität $I$ . . . . .	101
3.2.3.5	Photonendiagramme der Fluoreszenzfarbstoffe in PBS und TB . . . . .	101
3.2.4	Bleichzeiten von Atto655 in lebenden C2C12-Zellen . . . . .	102
3.2.4.1	Funktionalität von mab414-Atto655 . . . . .	106
3.2.4.2	Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ . . . . .	107
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>109</b>
4.1	Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT . . . . .	109
4.1.1	QD600 lassen sich mit 6xHis-Imp $\beta$ 1 funktionalisieren . . . . .	109
4.1.2	QD600-Imp $\beta$ 1 weisen in permeabilisierten Zellen eine andere Verteilung auf als Cy5-Imp $\beta$ 1 . . . . .	110
4.1.3	QD600-Imp $\beta$ 1 zeigen keine Passage der Kernpore . . . . .	111
4.1.4	Ein Ausblick auf mögliche Vorhaben zur Etablierung von QDots als Kerncyto- plasmatransport-Sonden . . . . .	115
4.2	Das Photobleichen einzelner immobilisierter Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	116
4.2.1	Die Fluorophore lassen sich spezifisch, stabil und mit gezielter Partikeldichte immobilisieren . . . . .	116

4.2.2	Die Auftragung der Bleichzeit $\tau$ gegen die Anregungsintensität $I$ liefert eine praktikable Übersicht der Farbstoffstabilitäten . . . . .	117
4.2.3	Die Zahl der emittierten Photonen $\mathcal{N}$ ist bei den verwendeten Anregungsintensitäten weitestgehend konstant . . . . .	120
4.2.4	Ein Ausblick auf zukünftig mögliche Projekte der <i>in vitro</i> -Farbstoffanalyse . .	122
4.2.5	Erste Analysen <i>in vivo</i> – die Bestimmung der Bleichzeit von Atto655 . . . . .	123
4.2.6	Ein Ausblick auf mögliche Entwicklungen der <i>in vivo</i> -Farbstoffanalyse . . . .	125
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>127</b>
A.1	Typische Fluoreszenzdiagramme für Cy5/TB . . . . .	127
A.2	Typische Fluoreszenzdiagramme für Atto655 <i>in vivo</i> . . . . .	128
A.3	Absorptionsspektren der NAv-Farbstoff-Konjugate . . . . .	128
A.4	Detektionseffizienz des Mikroskopaufbaus . . . . .	129
A.5	Mittlere Bleichzeiten und Anregungsintensitäten . . . . .	130
A.6	Mittlere Photonenzahlen und Anregungsintensitäten . . . . .	131
<b>B</b>	<b>Material</b>	<b>133</b>
B.1	Chemikalien . . . . .	133
B.2	Puffer und Medien . . . . .	134
B.2.1	Medien für die Proteinexpression in <i>E. coli</i> . . . . .	134
B.2.2	Zellkultur Nährmedien . . . . .	135
B.2.3	Puffer . . . . .	135
B.3	Proteine und Antikörper . . . . .	136
B.3.1	Proteine . . . . .	136
B.3.2	Antikörper . . . . .	137
B.4	Quantendots . . . . .	137
B.5	Zelllinien . . . . .	137
B.6	Software . . . . .	137
B.7	Sonstiges . . . . .	138
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>139</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>145</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>147</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>149</b>

<b>Symbolverzeichnis</b>	<b>151</b>
<b>Danksagung</b>	<b>153</b>





## Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fragestellungen bearbeitet, die sich dem Themenkomplex der „Analyse des Kerncytoplasmatransports (KCT) mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie (EMFM)“ zuordnen lassen: Zum einen die Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT und zum anderen die Analyse des Photobleichens organischer Fluorophore.

### **Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT**

In eukaryontischen Zellen findet der Stoffaustausch zwischen Zellkern und Cytoplasma über die in die Zellkernmembran eingebetteten Kernporenkomplexe statt. Makromoleküle können die Pore nur passieren, wenn sie über ein Transportsignal verfügen, welches einen transportvermittelnden, löslichen Transportrezeptor zu binden vermag. Es ist bisher nicht bekannt, wie der Porenkanal beschaffen ist und wie ein Transportrezeptor mit der Kernpore interagiert. Damit ist bisher auch offen, wie die *Selektivität* des Transports auf molekularer Ebene überhaupt realisiert wird. Eine Möglichkeit die ablaufenden Vorgänge zu untersuchen, ist die Abbildung *einzelner* Transportvorgänge mittels EMFM. Dieses Vorhaben stellt hohe Ansprüche an die apparative Technik und die Konzeption des Experiments, da der Vorgang nur wenige Millisekunden dauert und Sprungweiten im Nanometerbereich aufzulösen sind.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine Technik etabliert, um zu transportierende Proteine mit fluoreszierenden Nanopartikeln, sogenannte Quantum Dots (QDots), zu visualisieren. Diese Halbleiterpartikel zeichnen sich durch ihre hohe Photostabilität und Helligkeit aus und ermöglichen damit selbst bei hohen Aufnahmezeiten eine Lokalisierung mit Nanometer-Präzision. Um den Durchmesser der QDot-Sonde gering zu halten, wurde eine Kopplungstechnik verwendet, bei der Protein und QDot-Kern *direkt* miteinander verknüpft werden. Die Transportfähigkeit dieser Sonde wurde mit dem bekannten Importrezeptor Importin $\beta$ 1 überprüft.

Konfokal konnte eine spezifische Interaktion der Sonde mit der Kernmembran beobachtet werden, weder konfokal noch mittels sensitiver EMFM ließ sich allerdings ein erfolgreicher Import nachweisen. Hierfür wurden maßgeblich die Größe der Sonde und mögliche Funktionsbeeinträchtigungen des Imp $\beta$ 1 verantwortlich gemacht. Da sich die vorgestellte Kopplungstechnik jedoch insgesamt als geeignet zur Präparation einer Transportsonde erwies, konnten vielversprechende Ansätze für die zukünftige Präparation einer transportfähigen Sonde abgeleitet werden.

### **Analyse photophysikalischer Eigenschaften organischer Fluorophore**

Trotz ihrer hervorragenden optischen Eigenschaften eignen sich Quantum Dots nicht für alle Anwendungen in der Fluoreszenzmikroskopie. Daher finden in der EMFM weiterhin hauptsächlich organische

Farbstoffe Anwendung – oft unter anspruchsvollen Bedingungen: Um eine präzise Lokalisierung zu erreichen, werden häufig hohe Anregungsintensitäten verwendet, die wiederum verstärkt zu Photobleichen führen. Gerade bei der Abbildung von Bindungsereignissen kann vorzeitiges Bleichen fälschlicherweise als Dissoziation interpretiert werden. Für den Anwender sind daher zwei Kenngrößen der Fluorophore wichtig: Zum einen interessiert die *Bleichzeit*  $\tau$ , die Ausdruck dafür ist, wie lange sich der einzelne Farbstoff im Mittel anregen lässt bevor er bleicht; zum anderen ist die Kenntnis der *Zahl insgesamt emittierter Photonen*  $\mathcal{N}$  sinnvoll, da sie in Bezug auf  $\tau$  ein Maß der Helligkeit darstellt.

Diese Arbeit beschäftigte sich im zweiten Teil mit der Ermittlung der beiden Größen  $\tau$  und  $\mathcal{N}$  für sechs gebräuchliche Fluoreszenzfarbstoffe: Cy5, AF647, AF546, Atto647, Atto647N und Atto655. Zunächst wurde dazu eine Technik etabliert, welche die stabile Immobilisierung der Farbstoffmoleküle an einem Deckglas in wässriger Lösung gewährleistete. Des Weiteren wurde eine größtenteils automatisierte Auswertung entwickelt, die die Analyse von insgesamt knapp 30 000 einzelnen Fluorophorsignalen erlaubte. Für die sechs Farbstoffe konnten so Werte für  $\tau$  und  $\mathcal{N}$  in zwei bekannten Puffersystemen *in vitro* ermittelt werden. Zudem wurde die *in vivo*-Tauglichkeit der Analyse am Beispiel von Atto655 demonstriert.

Damit konnte eine Technik zur Farbstoffanalyse etabliert werden, die sich unmittelbar auf beliebige Farbstoff/Puffer- Kombinationen anwenden lässt.

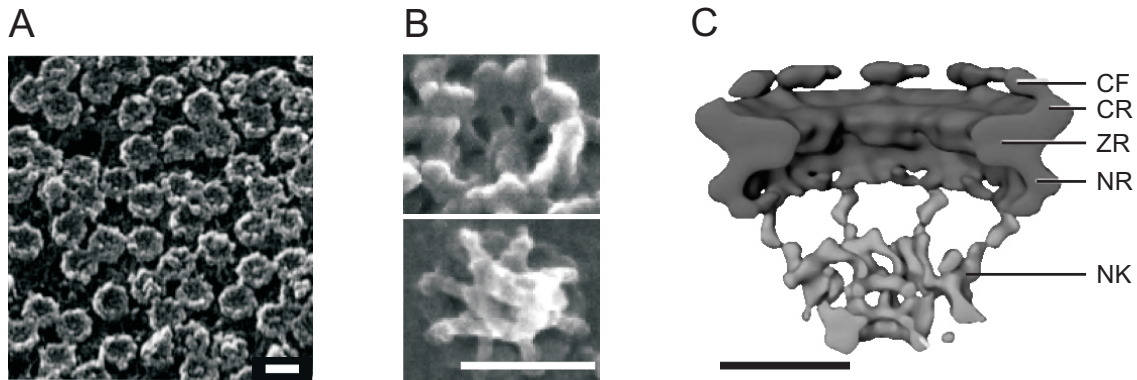
# 1 Einleitung

## 1.1 Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT

### 1.1.1 Kernporenkomplex und Kerncytoplasmatransport

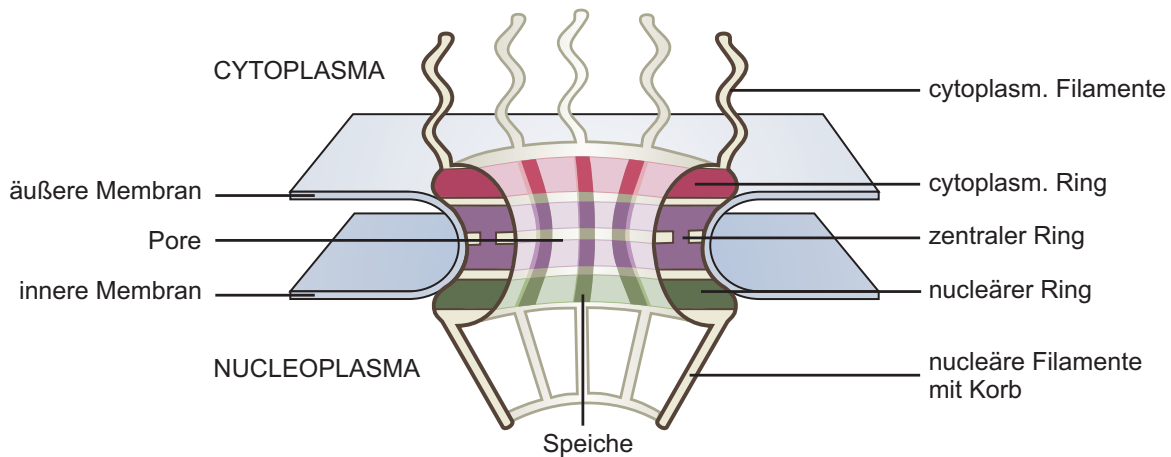
Sämtliche Lebewesen bestehen definitionsgemäß aus mindestens einer Zelle und lassen sich nach C.R. Woese systematisch einer der drei Domänen – Bacteria, Archaea oder Eukaryota – zuordnen [Woese et al., 1990]. Die Zellen der Eukaryota – zu dieser Domäne gehören unter anderem auch die Tiere und Pflanzen – verfügen als Hauptmerkmal, entgegen den Zellen der prokaryontischen Lebewesen der beiden erstgenannten Domänen, über einen Zellkern. Dieses auch als *Nucleus* bezeichnete Organell ist ein in der Interphase vollständig von einer Doppelmembran umgebenes Kompartiment, welches hauptsächlich die DNA und die Transkriptionsmaschinerie enthält. Wie die im Folgenden exemplarisch skizzierte Protein-Biosynthese zeigt, besteht zwischen dem Zellkern und dem ihn umgebenden Cytoplasma die Notwendigkeit des Stofftransports. Die für die Funktion der Zelle essentielle Protein-Biosynthese erfolgt nämlich größtenteils nach den in der DNA fixierten Vorgaben, findet allerdings nicht im Nucleus statt, sondern wird von Ribosomen im Cytoplasma bewerkstelligt. Demnach muss die auf der DNA abgelegte Information vom Zellkern an die Ribosomen im Cytoplasma übertragen werden. Dies wird von einem Überträgermolekül, der mRNA (messenger RNA), bewerkstelligt, bei dem es sich im Wesentlichen um eine „Abschrift“ des jeweils relevanten DNA-Abschnitts handelt. Damit die im Zellkern synthetisierte und geeignet verpackte mRNA an den Ort der Biosynthese gelangen kann, muss sie die Zellkernmembran passieren (Kernexport). In umgekehrter Richtung (Kernimport) besteht ebenfalls Transportbedarf: Die nucleäre Transkriptionsmaschinerie umfasst beispielsweise Polymerasen und Transkriptionsfaktoren, deren Biosynthese im Cytoplasma erfolgt und die, um an ihren Einsatzort im Kern zu gelangen, die Kerndoppelmembran passieren müssen. Die Kernmembran besitzt damit einerseits abgrenzende Eigenschaften, um das Zellkerninnere von der restlichen Zelle zu separieren, andererseits muss sie jedoch einen *selektiven* Stoffaustausch ermöglichen. Dieser wird von hunderten (s.u.) von selektiv permeablen, in die Kernmembran eingebetteten Poren bewerkstelligt, welche als Kernporenkomplexe (NPC, *nuclear pore complex*) bezeichnet werden.

Der NPC ist ein ca. 120 MDa großer Komplex, der aus etwa 30 unterschiedlichen Proteinen, den Nucleo-



**Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopische Methoden ermöglichen die Darstellung des Kernporenkomplexes.** A Ausschnitt der Zellkernmembran einer Speicheldrüsenzelle von *Chironomus thummi*. Eingebettet in die Membran (hier von der cytoplasmatischen Seite zu sehen) befinden sich zahlreiche Kernporenkomplexe, die mit hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie abgebildet wurden [Kiseleva et al., 1998]. Größenbalken 100 nm. B Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Kernporenkomplexes von der cytoplasmatischen Seite (oben) und von der nucleoplasmatischen Seite (unten) gesehen [Kiseleva et al., 2000]. Diese Aufsichten zeigen zum einen die acht cytoplasmatischen Filamente (oben) und lassen gut den nucleären Korb erkennen (unten) (s. Text und vgl. Abbildung 1.2). Zudem geben sie die 8-fach Symmetrie des NPC bezüglich der Kernmembran deutlich wieder. Größenbalken 100 nm. C Rekonstruktion des NPC aufgrund von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen. CF: cytoplasmatische Filamente, CR: cytoplasmatischer Ring, ZR: zentraler Ring, NR: nucleärer Ring, NK: nucleärer Korb [Beck et al., 2004]. Größenbalken 50 nm.

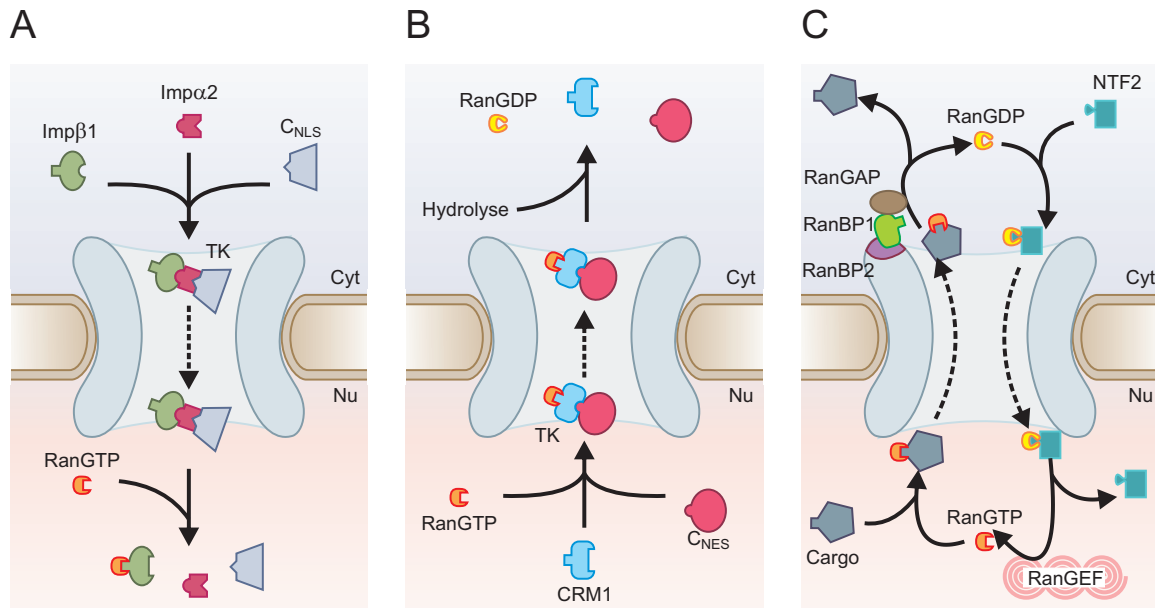
porinen, besteht [Lim et al., 2008]. In HeLa-Zellen sind pro Zellkern knapp 3000 NPC in die Kerndoppelmembran eingebettet, was einer Dichte von etwa 5 Poren/ $\mu\text{m}^2$  entspricht [Ribbeck and Görlich, 2001]. Diese Werte sind nicht allgemeingültig, da sie stark von z. B. Zelltyp oder Zellzyklusphase abhängen [Maul et al., 1972]. Erkenntnisse bezüglich Struktur und Aufbau des NPC konnten v.a. mittels Elektronenmikroskopie (EM) und hier besonders mit Hilfe der Kryoelektronentomographie gewonnen werden (s. [Kiseleva et al., 2000] bzw. [Beck et al., 2007]). Einige EM-Bilder und eine Kryo-EM-Rekonstruktion gibt Abbildung 1.1 wieder. Demnach ist der NPC ein Komplex mit 8-zähliger Drehsymmetrie, dessen Drehachse senkrecht zur Kernmembran verläuft. Entlang der Achse kann der NPC in sechs Untereinheiten gegliedert werden (s. Abbildung 1.2): Das eigentliche Gerüst der Pore bildet dabei der *zentrale Ring*, welcher im Bereich des Übergangs zwischen äußerer und innerer Kernmembran verläuft und die Membrankrümmung durch eine Art Klammerwirkung aufrecht erhält. Er besitzt einen inneren Durchmesser von etwa 60-75 nm und exponiert acht längliche Ausstülpungen, die sowohl in den Kanal als auch rückwärtig in den Membranbereich ragen und die als *Speichen* bezeichnet werden. Weiterhin stabilisieren ein *cytoplasmatischer* und ein *nucleärer Ring* den NPC, wobei ersterer lediglich mit der (äußeren) Membran und letzterer sowohl mit der (inneren) Membran als auch mit dem zentralen Ring verbunden ist. Das von diesem 3-Ringsystem aufgebaute Grundgerüst der Pore überspannt die etwa 30 nm breite Doppelmembran und bildet einen Kanal von ca. 50 nm Länge [Beck et al., 2004]. Auf der Kernaußenseite setzen am cytoplasmatischen Ring acht etwa 35 nm lange *Filamente* an, die in das Cytoplasma ragen. Den Abschluss auf der Kerninnenseite bildet der *nucleäre Korb*, welcher ebenfalls aus acht Filamenten besteht, die ca. 40 nm vom nucleären Ring entfernt im Nucleoplasma in einem



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes.** Die wichtigsten strukturellen Bestandteile des in die Kernmembran eingebetteten Kernporenkomplexes (NPC), Details s. Text (Grafik verändert nach [Strambio-De-Castilla et al., 2010]). Die FG-Nups (s. Text) sind zur besseren Übersicht nicht eingezeichnet.

kleineren Ring zusammenlaufen und so eine korbähnliche Struktur ausbilden. In den Porenkanal ragen die sogenannten FG-Nups – sie verfügen jeweils über eine kurze Ankersequenz, mit der sie an das Grundgerüst des NPC (hauptsächlich am zentralen Ring) gebunden sind und eine relativ lange, strukturlose FG-Wiederholungs-Sequenz (FG = Phenylalanin-Glycin). Die FG-Sequenzen erstrecken sich auf noch nicht im Detail geklärte Weise in den Kanal [Alber et al., 2007] und beeinflussen die Poreneigenschaften so, dass der Transport von Makromolekülen nur unter bestimmten Voraussetzungen erfolgt (s.u.).

Damit besitzt der NPC ausgehend vom nucleären Ring entlang der Porenlängsachse bis zu den cytoplasmatischen Filamenten eine Ausdehnung von etwa 100 nm. Die vorgenannten Werte entstammen den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Beck et al. und beziehen sich auf isolierte Zellkerne des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*, weshalb sie nur bedingt den Dimensionen von NPC anderer Zelltypen entsprechen [Beck et al., 2007]. Der NPC von *Saccharomyces cerevisiae* weist z. B. eine etwa 15% geringere Längsausdehnung als der von *Xenopus laevis* Oozyten auf [Fahrenkrog and Aebi, 2003]. Die spezielle Beschaffenheit des Kanalinneren (s. Kapitel 1.1.2) sorgt für das regulierte Transportverhalten durch den NPC. Dabei existieren grundsätzlich zwei verschiedene Durchtrittsvarianten: Kleine Moleküle bis zu einem Durchmesser von etwa 2,6 nm können die Kernpore rein diffusiv passieren und unterliegen keiner Regulation [Mohr et al., 2009] – auf diesen Transportweg wird hier nicht näher eingegangen. Größeren Molekülen bis zu einem Durchmesser von etwa 39 nm [Panté and Kann, 2002] ist die Passage lediglich rezeptorvermittelt möglich [Macara, 2001]. Makromolekülen, die noch größer sind, steht der rezeptorvermittelte Weg ebenfalls offen, sie müssen dazu vor dem Passieren der Pore allerdings eine Konformationsänderung vollziehen (s. beispielsweise [Daneholt, 2001]). Unter der Beteiligung verschiedenster Transportrezeptoren existieren zahlreiche Import- und Exportrouten,



**Abbildung 1.3: Import von Cargo-NLS, Export von Cargo-NES und RanGTP/RanGDP-Zyklus.** **A** Importpfad für ein NLS aufweisendes Cargo  $C_{NLS}$ : Das  $C_{NLS}$  wird im Cytoplasma über das hier als Adapterprotein fungierende  $Imp\alpha 2$  (Importin $\alpha 2$ ) an den Transportrezeptor  $Imp\beta 1$  (Importin $\beta 1$ ) gebunden. Eingebunden in diesen ternären Komplex gelangt das  $C_{NLS}$  rezeptorvermittelt in den Zellkern. Dort zerfällt der Komplex durch die Bindung von  $Imp\beta 1$  an RanGTP (Ras-related nuclear protein in GTP-gebundener Form). **B** Exportpfad für Cargo, das über ein NES verfügt  $C_{NES}$ : Das  $C_{NES}$  wird im Kern unter Beteiligung von RanGTP vom Transportrezeptor CRM1 (chromosomal region maintenance 1) gebunden und damit in die Lage versetzt, die Pore zu durchtreten. Im Cytoplasma disassembliert der Komplex aufgrund der Hydrolyse des RanGTP zu RanGDP. **C** Der Ran-Zyklus dient der Aufrechterhaltung einer im Vergleich zum Cytoplasma hohen RanGTP-Konzentration im Nucleoplasma. Das Protein Ran kommt sowohl in GTP- als auch in GDP-gebundener Form vor, wobei Ersteres überwiegend im Nucleoplasma und Letzteres im Cytoplasma vorliegt. Um diesen Gradienten aufrechtzuerhalten, wird zum einen das im Zellkern vorliegende RanGDP von RanGEF (Ran Guanine nucleotide Exchange Factor) zu RanGTP umgesetzt. Zum anderen wird RanGTP im Cytoplasma von einem aus dem Nucleoporin RanBP2 (Ran Binding Protein 2) und den löslichen Faktoren RanBP1 (Ran Binding Protein 1) und RanGAP (Ran GTPase-activating protein) bestehenden Komplex zu RanGDP hydrolysiert. Abkürzungen: Cyt=Cytoplasma, Nu=Nucleoplasma, TK=Transportkomplex.

welche unterschiedlichsten Typen von Molekülen den Transport ermöglichen. Jeweils einer dieser Pfade wird im Folgenden vorgestellt, wobei das Grundprinzip dasselbe ist: Ein zu transportierendes Makromolekül (Cargo), welches über das notwendige Transportsignal verfügt, bindet mit diesem (ggf. vermittelt durch ein Adapterprotein) an einen löslichen Transportrezeptor um den sog. Transportkomplex auszubilden. Dieser ist in der Lage die NPC-Barriere zu überwinden, indem der inkorporierte Rezeptor mit der Kernpore interagiert. Nach dem Transport dissoziiert der Komplex und das Cargo wird im Zielkompartiment freigesetzt.

Abbildung 1.3 A zeigt als Beispiel den Importpfad für ein Cargo, welches mit der basischen Aminosäuresequenz PKKKRKV über ein Kernimportsignal verfügt. Die Sequenz wurde als Kernlokalisierungssignal des SV40 Large T Antigen identifiziert und wird daher auch als SV40-NLS (Simian Virus 40-nuclear location signal) bezeichnet [Kalderon et al., 1984]. Das Signal ermöglicht dem Cargo, über das Adapterprotein Importin $\alpha 2$  ( $Imp\alpha 2$ ) mit dem Transportrezeptor Importin $\beta 1$  ( $Imp\beta 1$ ) einen ternären Importkomplex auszubilden [Macara, 2001].  $Imp\beta 1$  vermittelt nun den Kernimport des im Komplex



fixierten Cargo, indem es mit den FG-Nups im Porenkanal wechselwirkt (s. z. B. [Shah et al., 1998]). Die genauen Vorgänge sind dabei noch ungeklärt, beim Durchtritt handelt sich aber vermutlich um einen diffusionsbasierten Prozess [Zilman et al., 2007]. In der Literatur werden verschiedene Modelle diskutiert, die unter anderem Gegenstand von Kapitel 1.1.2 sind. Der ternäre Komplex aus Cargo(NLS)-Imp $\alpha$ 2-Imp $\beta$ 1 dissoziiert schließlich im Kern – ausgelöst durch die Bindung von RanGTP (s.u.) an Imp $\beta$ 1 – und gibt das Cargo frei. Adapter und Rezeptor verlassen auf eigenen Exportpfaden den Kern und stehen für einen neuen Importvorgang zur Verfügung.

Vergleichbar verläuft der Export von Makromolekülen, welche die Aminosäuresequenz LALKLAGLDI bereithalten (s. Abbildung 1.3 B). Die Funktionalität der Sequenz beruht vor allem auf den in der Sequenz fett hervorgehobenen, hydrophoben Aminosäuren und wurde erstmals im *Proteinkinase A Inhibitor* nachgewiesen, weshalb sie auch als *PKI-NES* (nuclear export signal, Kernexportsignal) bezeichnet wird [Wen et al., 1995]. Cargo, welches über diese Sequenz verfügt, kann vom Exportrezeptor CRM1 gebunden und in Form eines zusammen mit RanGTP (s.u.) ausgebildeten, ternären Exportkomplexes aus dem Nucleus geschleust werden [Fornerod et al., 1997]. Analog zum SV40-NLS-Import erfolgt die Porenpassage auch hier aufgrund der Wechselwirkung zwischen Transportrezeptor und Nucleoporinen [Fornerod et al., 1997]. Der Vorgang schließt mit einer Freisetzung des Cargos im Cytoplasma ab.

Dieser schematischen Darstellung je eines Import- bzw. Exportpfades ist schließlich noch ein entscheidender Aspekt hinzuzufügen: um ein Makromolekül gegen einen Konzentrationsgradienten in einem Kompartiment anzureichern, ist eine Triebkraft nötig. Für Transportpfade, an denen Transportrezeptoren der Familie der Karyopherine beteiligt sind – zu der sowohl Imp $\beta$ 1 als auch CRM1 zählen – ist das Protein Ran (Ras-related nuclear protein) für die Transportrichtung entscheidend (s. Abbildung 1.3 C). Ran liegt im Nucleoplasma überwiegend in GTP-gebundener und im Cytoplasma in GDP-gebundener Form vor, sodass über die kurze Distanz des NPC ein RanGTP-Gradient vorliegt (der entsprechende RanGDP-Gradient ist hier unbedeutend). Das Konzentrationsverhältnis von nucleärem zu cytoplasmatischem RanGTP beträgt mindestens 200:1 [Fried and Kutay, 2003]. Der Einfluss des Gradienten auf den Kerncytoplasmatransport lässt sich vereinfacht folgendermaßen ausdrücken: RanGTP verursacht im Nucleoplasma die Dissoziation von Importkomplexen, ist jedoch demgegenüber notwendig für den Zusammenhalt der Exportkomplexe. Dadurch kommt es zu Reaktionen, welche die Transportrichtung für Import bzw. Export wie folgt beeinflussen:

- Import: Sobald der ternäre Komplex das Nucleoplasma erreicht, bindet freies RanGTP an Imp $\beta$ 1, löst eine Konformationsänderung des Transportrezeptors aus und setzt Cargo und Imp $\alpha$ 2 frei. Da RanGDP zu einer Auflösung des Komplexes nicht in der Lage ist, liegt er im Cytoplasma stabil vor [Rexach and Blobel, 1995]. Die hohe Affinität des RanGTP zum Transportrezeptor sorgt somit dafür, dass die Konzentration an *Transportkomplex* im Kern gegen Null geht und

der Transport des Komplexes damit vom Kompartiment hoher zu dem niedriger Konzentration erfolgt.

- Export: Der aus Cargo, CRM1 und RanGTP bestehende ternäre Exportkomplex formiert sich im Zellkern. Bei Erreichen des Cytoplasmas wird RanGTP noch an den cytoplasmatischen Filamenten unter dem Einfluss der beiden Ranbindeproteine RanBP1 und RanBP2 mittels RanGAP, dem *RanGTPase aktivierenden Protein*, zu RanGDP hydrolysiert [Fried and Kutay, 2003]. Da der Komplex von RanGDP nicht stabilisiert werden kann, dissoziiert er daraufhin. Der Komplex kann sich damit lediglich im Nucleus formieren und wird im Cytoplasma umgehend zersetzt. Auch hier erfolgt der Transport damit aus einem Bereich hoher Transportkomplekonzentration in Richtung niedriger Konzentration.

Da RanGTP wegen der Inkorporation in Exportkomplexe ständig den Kern verlässt, muss der RanGTP-Gradient aktiv aufrecht erhalten werden (s. Abbildung 1.3 C). Dazu wird zunächst das im Cytoplasma im Bereich der Filamente entstehende RanGDP über eine separate Importroute vom Importrezeptor NTF2 wieder ins Nucleoplasma verbracht. Dort wird es dann am chromatingebundenen RanGEF (Ran guanine nucleotide exchange factor, RanGTP Austauschfaktor) durch GDP/GTP-Austausch wieder in das im Kern „benötigte“ RanGTP umgesetzt. Die asymmetrische Verteilung der Ran-Regulatoren (RanGAP mit RanBP1 und RanBP2 im Cytoplasma und RanGEF im Nucleoplasma) ist also für die Erhaltung des Gradienten entscheidend [Kuersten et al., 2001] und Transport von Cargo ist selbst dann möglich, wenn das Zielkompartiment bereits hohe Cargo-Konzentrationen aufweist. Die Wichtigkeit des RanGTP-Gradienten zeigt sich auch in der Tatsache, dass sich die Transportrichtung umkehren lässt, wenn im Experiment eine hohe *cytoplasmatische* RanGTP-Konzentration herbeigeführt wird [Nachury and Weis, 1999]. Es sei also betont, dass der NPC selbst keine Transportrichtung vorgibt – er lässt lediglich geeignet vorbereitetes Cargo passieren [Wente and Rout, 2010].

Die beiden vorgestellten Transportpfade dienen der Illustration der molekularen Vorgänge von Teilschritten des Kerncytoplasmatransports – tatsächlich gibt es eine Vielzahl an Transportrezeptoren, die eine Vielzahl an Transportsignalen erkennt, um Cargotransport aller Art zu bewerkstelligen [Tran et al., 2007]. Allen Rezeptoren ist dabei gemein, dass der NPC für sie keine Barriere darstellt und damit eine Wechselwirkung zwischen Nucleoporinen und Transportrezeptoren bzw. -komplexen bestehen muss. Die genauen Interaktionen sind dabei noch nicht vollständig geklärt, da auch die Beschaffenheit des Porenkanals noch größtenteils unbekannt ist. Allerdings wurden vor allem im Laufe der vergangenen zehn Jahre einige Modelle entwickelt, deren wichtigste im folgenden Kapitel vorgestellt werden.



### 1.1.2 Modelle der NPC-Permeabilitätsbarriere

Der Kerncytoplasmatransport (KCT) ist prinzipiell ein dreiteiliger Prozess, der im vorigen Kapitel bereits exemplarisch beleuchtet wurde:

- Ausbilden des Transportkomplexes im Ausgangskompartiment
- Rezeptorvermittelter Durchtritt des Transportkomplexes durch den Kernporenkanal
- Dissoziation des Transportkomplexes und Freisetzung des Cargos im Zielkompartiment

Der erste und letzte Schritt können anhand von *in vitro*-Bindungsstudien gut nachvollzogen werden und sind für einige Transportpfade bereits eingehend untersucht (z. B. [Moroianu et al., 1996], [Ossareh-Nazari et al., 1997]). Der eigentliche Transport (Schritt 2), bei dem die Wechselwirkung zwischen Transportrezeptor und Kernporenkomplex entscheidend ist, bleibt allerdings weiterhin weitgehend unverstanden. Es scheint dabei sicher, dass die FG-Motive der FG-Nups (s. Kapitel 1.1.1) die semipermeable Barriere darstellen und damit einerseits die Bewegung von Transportkomplexen vermitteln und andererseits inerte Makromoleküle abweisen [Stewart, 2007]. Als eines der frühen Experimente zur Untersuchung des Stofftransports vom Cytoplasma in den Nucleus kann eine von Feldherr 1962 veröffentlichte Studie angesehen werden. In dieser waren kolloidale Goldpartikel (mit Polymerhülle ca. 6-10 nm Durchmesser) cytoplasmatisch in Amöben injiziert und deren intrazelluläre Verteilung mittels Elektronenmikroskopie (EM) untersucht worden [Feldherr, 1962]. Kernporenkomplexe waren bereits in den 1950er Jahren elektronenmikroskopisch abgebildet worden (s. z. B. [Watson, 1955]) und auch Transportstudien mit Goldpartikeln hatte es zuvor gegeben – entgegen der vorherigen Studien wurden hier jedoch sehr kleine Partikel injiziert und die Zellen bereits wenige Minuten nach der Injektion abgebildet. Daher gelang es, Momentaufnahmen von Goldpartikeln während des NPC-Transits anzufertigen. Die EM-Aufnahmen zeigten unter anderem tangentielle Membranschnitte mit der Aufsicht auf Kernporenkomplexe, von denen viele ein Goldpartikel aufwiesen. Da fast alle dieser Partikel genau im Zentrum der jeweiligen Pore gefunden wurden, schloss Feldherr, dass die Passage der Goldpartikel auf einen zentralen Kanal innerhalb der ringförmigen Struktur beschränkt ist. Damit war ein frühes Modell zur Gestalt der Permeabilitätsbarriere des NPC aufgestellt.

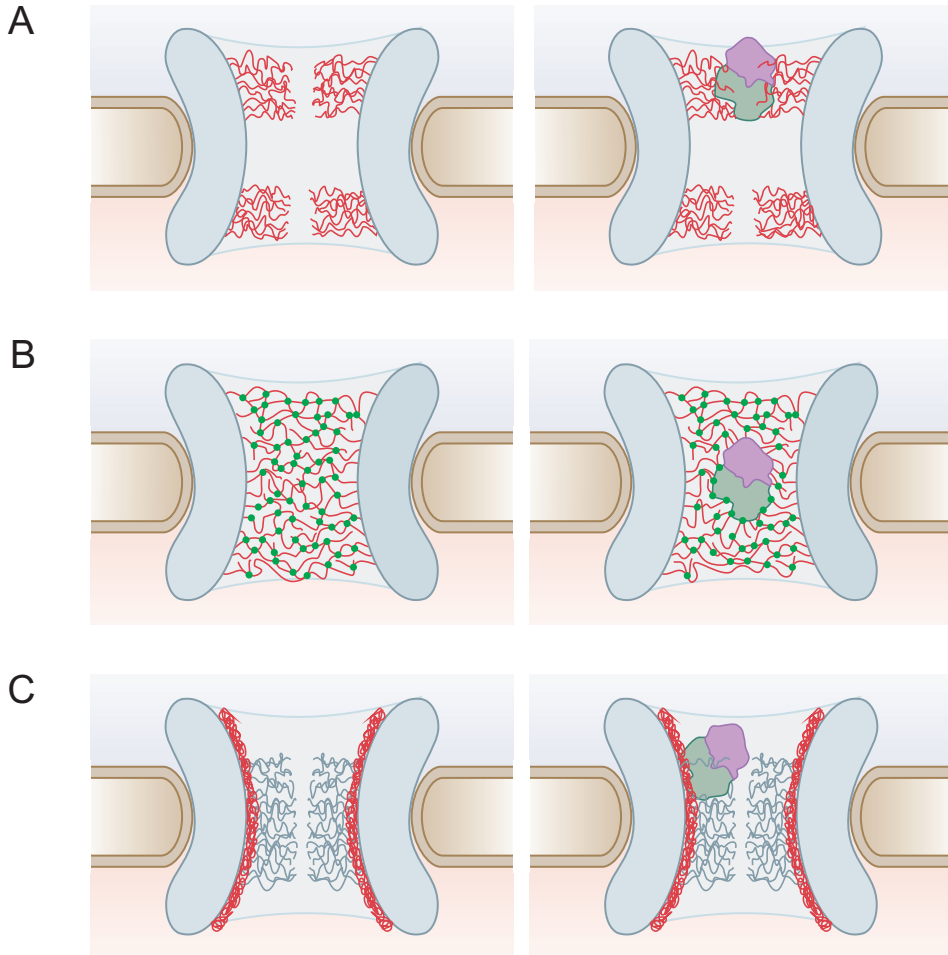
Etwa 40 Jahre später entstanden die aktuellen Theorien zur Gestalt der Barriere, von denen die wichtigsten im Folgenden erläutert werden. Daran anschließend wird auf die Bedeutung der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie zur Aufklärung der Mechanismen eingegangen und es werden entsprechende Studien vorgestellt.

Rout et al. beschrieben in einer 2000 veröffentlichten Studie ein Modell zum Hefe-NPC, welches als *Brownian Affinity Gating* (BAG, Brown'sche Affinitätssperre) bezeichnet wird (s. Abbildung 1.4 A). Die Studie identifizierte nahezu alle der etwa 30 Nucleoporine in isolierten Hefe-NPC und lokalisierte

sie anschließend elektronenmikroskopisch mittels Immunogoldmarkierung [Rout et al., 2000]. Die Autoren fanden dabei für die meisten Nups eine weitgehend symmetrische Verteilung bezüglich einer im Zentrum des NPC parallel zur Membran verlaufenden Spiegelebene. Nur wenige Nups kamen bevorzugt oder exklusiv cytoplasmatisch bzw. nucleär vor. Aus der symmetrischen Verteilung der Nups leiteten die Autoren ab, dass ein durchgehender Affinitätsgradient für Transportrezeptoren in Transportrichtung, wie er in Floer et al. vermutet und später in einem eigenen Modell, dem *Affinity Gradient* Modell, formuliert wurde (s.u.), nicht bestehe [Floer et al., 1997]. Die FG-Nups wurden vorwiegend in der Peripherie der Pore gefunden und ließen zur Porenachse einen kanalähnlichen Bereich frei. Da die Autoren keine Hinweise auf Motorproteine oder Ran-bindende Nups fanden, schlossen sie, dass der Transportvorgang weder mechanoenzym- noch nucleotidgetrieben sei und damit das reine Binden an den NPC ausreiche, um den Transport zu vermitteln. Aus denselben Gründen musste der eigentliche Transport dann aufgrund von Brown'scher Molekularbewegung erfolgen. Demnach würde ein Makromolekül, das nicht in der Lage ist an den NPC zu binden, nicht in den Porenkanal eintreten, sondern an der Öffnung vorbei diffundieren. Cargo hingegen, das durch Interaktion mit einem Transportrezeptor rezeptorvermittelt NPC-bindend ist, erhöhe durch Bindung an die Nups seine Verweildauer am Poreneingang, wodurch eine Diffusion durch den Porenkanal deutlich wahrscheinlicher werde. Einmal in den Kanal eingetreten, vermittelt dann schnelles, reversibles Binden an die FG-Nups den Transport, wobei eine Einschränkung der Freiheitsgrade z. B. im Bereich der Filamente einen zusätzlich begünstigenden Einfluss ausübt. Weiterhin wirken die beweglichen FG-Nups wie eine Art *entropischer Besen*, der durch die beständige Brown'sche Bewegung nicht interaktionsfähige Makromoleküle quasi vom Poreneingang kehrt. In einer weiteren Publikation wurde das Modell erweitert und die Änderung der Freien Reaktionsenthalpie  $\Delta G$  als ausschlaggebende Größe für den erfolgreichen Eintritt eines Transportkomplexes in die Kernpore eingeführt [Rout et al., 2003]. Diese thermodynamische Größe berechnet sich nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung aus der Temperatur  $T$ , der Änderung der Entropie  $\Delta S$  und der Enthalpie  $\Delta H$  des betrachteten Vorgangs:  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Dabei verringert sich beim Eintritt in die Pore zunächst die Entropie des zuvor freier beweglichen Transportkomplexes, wodurch der Term  $-T\Delta S$  positiv wird und damit entgegen einer freiwillig ablaufenden Reaktion arbeitet. Rout et al. argumentieren, dass demgegenüber aus der Bindung des Transportkomplexes an die FG-Nups ein negatives  $\Delta H$  resultiere, welches die Gesamtreaktion in Richtung „freiwillig ablaufend“ lenke. Diese Bindungsenergie dürfe jedoch nicht zu hoch sein, da sonst kein *Austritt* aus der Pore möglich sei.  $\Delta H$  und  $\Delta S$  müssen daher jeweils gerade so groß sein, dass  $\Delta G$  sowohl für den Eintritt in die Pore als auch für das Verlassen des NPC im Bereich  $kT$  liegt. Eine solche entropische Barriere vermuteten auch Lim et al., die die nanomechanischen Eigenschaften von FG-Nups untersuchen und mit Hilfe von Polymer-Modellen eine Theorie für die Selektivität

entwickelten [Lim et al., 2006].

Ein weiteres Modell, welches sich jedoch eher mit den mikroskopischen Wechselwirkungen zwischen Kernporenmaterial und Transportkomplex bzw. -rezeptor beschäftigt, ist das von Ribbeck und Görlich 2001 erstmals beschriebene *Selective Phase Model* (SP, Modell der Selektiven Phase, s. Abbildung 1.4 B), [Ribbeck and Görlich, 2001, Ribbeck and Görlich, 2002]. Die Autoren leiteten aus Transportexperimenten mit permeabilisierten Zellen ab, dass die Permeabilitätsbarriere eines HeLa-NPC einen enormen Materialfluss bewerkstelligt: Impß-vermittelt könnten bis zu 40 MDa pro NPC und Sekunde mit einer Rate von deutlich mehr als 100 Ereignissen umgesetzt werden. Dabei müsse gewährleistet sein, dass die Barriere trotz dieser hohen zeitlichen Dichte an Transportereignissen zuverlässig funktioniere und nicht etwa beim „Öffnen“ für einen großen Transportkomplex das Nachströmen kleinerer, inerte Makromoleküle zulässt (als *inert* werden hier solche Moleküle bezeichnet, die weder mit Transportrezeptoren noch mit Nucleoporinen wechselwirken, sodass ihnen ein vermittelter Transport nicht möglich ist). Ribbeck und Görlich sahen im *Central Plug* (CP), einer in elektronenmikroskopischen Bildern des NPC häufig im Porenkanal gefundenen Struktur, den entscheidenden Barrierebildner. Ihrer Ansicht nach konstituiere er sich aus den einseitig am NPC verankerten FG-Nups. Jedes dieser strukturlosen FG-Nups verfügt über ca. 30 hydrophobe FG-Wiederholungsmotive, die durch hydrophile Sequenzbereiche voneinander abgegrenzt werden. Insgesamt wiederum weist ein NPC etwa  $10^4$  dieser FG-Wiederholungen auf. Das SP-Modell beruht nun zunächst auf der Annahme, dass diese FG-Motive schwache Anziehungskräfte aufeinander ausüben, wohingegen die hydrophilen Unterbrechungssequenzen einander nicht binden. Basierend auf diesen Wechselwirkungen bilden die FG-Nups im Porenkanal ein dreidimensionales Maschengeflecht aus, welches im SP-Modell als *selektive Phase* bezeichnet wird und Gel-ähnlich ist. Kleine Moleküle können das Netzwerk passieren, indem sie durch die Maschen diffundieren. Einem Makromolekül sei die Passage des Gels jedoch lediglich dann möglich, wenn es in der Lage ist die FG-FG-Bindungsstellen aufzubrechen und damit die Maschenweite lokal so zu erhöhen, dass es in die Phase eindringen könne. Die Selektivität der Phase beruhe schließlich darauf, dass FG-FG-Verbindungen nur von oberflächlich hydrophoben Molekülen aufgebrochen werden können. Mit der *in vitro* Analyse von Cytosolextrakt konnten Ribbeck und Görlich zeigen, dass Transportrezeptoren diese hohe Hydrophobizität aufweisen und sich dadurch von inerten Molekülen unterscheiden [Ribbeck and Görlich, 2002]. Ein Transportrezeptor löse sich demnach durch Bruch von FG-FG-Bindungen in der Phase und wird damit gleichzeitig Bindungspartner der getrennten FG-Einheiten. Durch diese selektive Löslichkeit sei dem Rezeptor eine Diffusion im Kernporenkanal möglich, bei welcher ständig neue FG-FG-Kontakte gebrochen und bei der Fortbewegung hinter dem Rezeptor sofort wieder geschlossen werden, wodurch sich das Netzwerk dicht um den Rezeptor lege. Das augenblickliche Schließen frei werdender FG-Kontakte



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung verschiedener Transportmodelle.** Seitliche Ansicht des Kernporenkanals, die Transportachse verläuft vertikal. Der NPC ist in blau in stark vereinfachter Form dargestellt, die Filamente wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen. Seitlich setzt sich jeweils die Kerndoppelmembran fort (braun). Das linke Bild zeigt die Kernpore in vakantem Zustand, rechts ist der im jeweiligen Modell beschriebene Transportvorgang gezeigt. Das Cargo ist violett und der Transportrezeptor grün dargestellt. **A** BAG-Modell: Der Porenkanal wird peripher von den selektierenden FG-Nups (rot) begrenzt, welche die entropische Barriere bilden. Die passive Diffusion kleiner Moleküle erfolgt im zentralen Bereich, den die FG-Nups nicht ausfüllen. **B** SP-Modell: Die Kernpore wird von einem Netzwerk aus FG-Nups (rot) gefüllt, dessen Knoten (grün) aus Wechselwirkungen zwischen den FG-Motiven resultieren. Inerte Makromoleküle werden vom Netzwerk zurückgehalten, für kleine Moleküle sind die Maschen des Netzwerks durchlässig. Cargo passiert die Pore, indem der Transportrezeptor mit den FG-Motiven wechselwirkt (grüne Knoten in der Peripherie des Rezeptors) und das Netzwerk lokal aufbricht. **C** ROD-Modell: Das Modell postuliert zwei Strukturen im NPC: Zum einen eine FG-Nup-Schicht (rot), welche die NPC-Oberfläche inklusive der Filamente überzieht und auf der die Transportkomplexe quasi gleitend die Pore passieren. Das zweite Strukturmerkmal bilden hydrophile Nups oder FG-Nup-Sequenzen (grau), die im Porenkanal ein Netzwerk ausbilden, welches die Passage von inerten Makromolekülen blockiert, jedoch durch Freilassen eines schmalen Kanals im Porenzentrum die Diffusion kleiner Moleküle zulässt.

sei nun Voraussetzung dafür, dass die Barriere für inerte Moleküle ständig geschlossen bleibe. Cargo, welches intrinsisch nicht in der Lage sei FG-FG-Kontakte zu lösen, profitiere laut SP-Modell von der Bindung an einen Transportrezeptor, der das Netzwerk öffne und das Cargo mit durch die geöffneten Maschen zieht. Da Cargo und Rezeptor direkt miteinander verbunden sind, könne das Netzwerk sich hinter dem Rezeptor nicht sofort schließen und ermögliche dem Cargo den Eintritt in die selektive Phase. Der Transport würde dann nach der Zufallsbewegung des Komplexes in der Pore durch die Komplexdissoziation im Nucleus abgeschlossen. Eine auf dem SP-Modell aufbauende Arbeit aus der Görlich-Gruppe zeigte 2006, dass sich aus der wässrigen Lösung einem in *E. coli* exprimierten, aufgereinigten Hefe-Nup, welches über eine FG-reiche Sequenz verfügt, *in vitro* ein Gel formen lässt. Die Polymerisation dieses Gels wurde daraufhin mit der Ausbildung von FG-FG-Bindungen erklärt [Frey et al., 2006]. Für diese artifizielle Barriere konnte in einer weiteren Studie zudem eine selektive Durchlässigkeit nachgewiesen werden, da Transportrezeptoren in sie hineindiffundierten, wohingegen inerte Moleküle ausgeschlossen blieben [Frey and Görlich, 2007].

Ein weiteres Modell, welches die selektierenden Eigenschaften der Kernpore ebenfalls den FG-Nups zuschreibt, ist das 2001 von Macara vorgeschlagene Modell der *Oily Spaghetti* (OS, ölige Spaghetti) [Macara, 2001]. Macara spekulierte, dass die Pore mit lose in den Kanal ragenden FG-Nups gefüllt sei, wobei im Zentrum der Pore ein etwa 10 nm breiter Tubus frei bliebe, durch welchen jegliche passive Translokation erfolge. Ein (für den Tubus zu großer) Transportkomplex würde die Pore nun folgendermaßen passieren: Rezeptorvermittelt sei der Komplex in der Lage, eine schwache, transiente Bindung zu den FG-Nups auszubilden, sich rasch wieder zu lösen, mittels Zufallsbewegung zur nächsten FG-Nup-Bindestelle zu diffundieren und durch Wiederholung dieser Vorgänge schließlich den NPC zu queren. Die Richtung des Transports gebe wie bei den Modellen zuvor der RanGTP/RanGDP-Gradient bzw. die Ran-Regulatoren durch Disassemblierung des Transportkomplexes im Zielkompartiment vor. Aufgrund der hohen Zahl an FG-Nups (s. o.) wäre die Anzahl an Bindungsstellen für den massiven Transportbedarf hier nicht limitierend. Entscheidend sei laut Macara, dass die Bindung des Rezeptors an die FG-Nups nicht zu stark sein dürfe, da ansonsten eine Immobilisierung des Komplexes in der Pore und in der Folge durch ggf. eindringendes RanGTP eine vorzeitige Dissoziation des Transportkomplexes denkbar sei.

Peters publizierte 2005 das Modell der *Reduction of Dimensionality* (ROD, Reduktion der Dimensionalität), welches mit dem OS-Modell von Macara den freien, zentralen Tubus gemein hatte, aber eine andere Art des Transports entwirft [Peters, 2005]. Das ROD-Modell beschreibt den Aufbau des Porenkanals und Transport dabei folgendermaßen: Um zunächst eine passive Diffusion von kleinen Molekülen zu gestatten, gleichzeitig aber sämtliche inerte Makromoleküle am Transport zu hindern, ist der NPC-Kanal mit einem etwa 20 nm starken, hydrophilen Netzwerk aus Peptidketten ausgekleidet,

welches im Zentrum einen etwa 8-10 nm breiten Tubus frei lässt. Das Netzwerk, so wird spekuliert, könne aus den hydrophilen Zwischensequenzen der FG-Nups bestehen, die die einzelnen FG-Motive trennen – andere Nups zur Bildung des Netzwerks wären jedoch ebenfalls denkbar. Die selektiven Eigenschaften des NPC beruhen dann darauf, dass größere Moleküle dieses Netzwerk nicht ohne Weiteres passieren könnten. Neben diesem Netzwerk ist das zweite Strukturmerkmal des ROD-Modells eine etwa 20 nm starke FG-Nup-Schicht, welche sowohl die cytoplasmatischen und nucleären Filamente als auch das Innere des NPC-Kanals überzieht. Die FG-Motive sind hier (wie auch bei den vorgenannten Modellen) die entscheidenden funktionellen Einheiten, die mit den Transportrezeptoren wechselwirken und Transportkomplexen auf diese Weise das Passieren der Pore ermöglichen. Im ROD-Modell fungieren die mit dieser FG-Schicht überzogenen Filamente wie Antennen. Sie fangen Transportkomplexe sehr effizient ein und ermöglichen rezeptorvermittelt eine Diffusion des Komplexes auf der FG-Schicht. Per Zufallsbewegung gelange der Transportkomplex in den Bereich des hydrophilen Netzwerks, welches er durchdringe, indem er sich – weiterhin quasi auf der FG-Schicht gleitend – um die Peptidketten herumbewege. Der Transport werde dann schließlich im Zielkompartiment wie gehabt durch Disassemblierung des Komplexes (s. o.) beendet. Ein herausragendes Merkmal dieses Modells ist die Diffusion des Transportkomplexes auf der FG-Oberfläche. Die 3D-Diffusion der vorigen Modelle wird hier auf eine 2D-Diffusion reduziert, wobei gezeigt werden konnte, dass aus dieser Reduktion eine erhöhte Geschwindigkeit des Prozesses resultieren könne. Die Größenordnung dieser Änderung hänge dabei vom Verhältnis aus Oberfläche, auf der die 2D-Diffusion erfolgt, zum der 3D-Diffusion zur Verfügung stehenden Volumen ab.

Die beschriebenen Modelle beruhen auf Strukturuntersuchung des NPC, welche das jeweilige Modell plausibel stützen. Dennoch handelte es sich bei den Formulierungen noch – wie auch von den Autoren betont – um Arbeitshypothesen und vereinfachte Darstellungen der sehr komplexen selektiven Barriere – in der Literatur werden die Modelle weiterhin diskutiert. Das BAG-Modell stützt sich beispielsweise vor allem auf die cyto- und nucleoplasmatischen Filamente als selektierende Elemente. Fried und Kutay argumentierten 2003 jedoch, dass Experimente gezeigt hätten, dass zumindest die cytoplasmatischen Filamente und Teile des cytoplasmatischen Rings für den selektiven Transport entbehrlich seien [Fried and Kutay, 2003]. Auch Kustanovich und Rabin zweifelten an der Selektion in der Peripherie des NPC, dazu beriefen sie sich auf eine Studie, in welcher unter anderem anhand von elektronenmikroskopischen Schnappschüssen von Gold-Cargo im Transportvorgang die hauptsächliche Diffusionsbarriere in der zentralen Region der Kernpore vermutet wurde [Kustanovich and Rabin, 2004]. Ein weiteres Argument brachten Ribbeck und Görlich in ihrer Publikation von 2002 vor. Dort zeigten sie, dass Größe und Oberflächeneigenschaften bedeutenden Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit haben [Ribbeck and Görlich, 2002]. Hätte lediglich das Binden des Transportkomplexes an die peripheren



FG-Nups Einfluss auf die Rate und würde der anschließende Transport durch einen weitgehend „leeren“ Kanal vonstatten gehen, so argumentierten sie, sei kein großer Effekt der Cargoeigenschaften auf die Transportrate zu erwarten. Dies nahmen Ribbeck und Görlich zum Anlass, das SP-Modell zu veröffentlichen. Bickel und Bruinsma erklärten 2002, dass das im SP-Modell vorgeschlagene *reversible Gel* vom Standpunkt der klassischen Polymerrheologie nicht funktional sei, da es die Mobilität eines Transportrezeptors verringere und nicht erhöhe [Bickel and Bruinsma, 2002]. Sie schlugen einen alternativen Gelypus vor, der unter sorgfältiger Anpassung der Parameter die im SP-Modell postulierten Eigenschaften besitzen könne. Neben den Dehnungseigenschaften des Polymers sei dabei v.a. die Bindungsenergie der Netzwerkknoten ein wesentliches Charakteristikum des Gels. Bezüglich der Bindungsenergien äußerten Kustanovich et al. 2004 Bedenken: Damit der Transportkomplex im Netzwerk nicht zu stark retardiert werde, müsse die Bindungsenergie zwischen FG-Nups und folglich auch zwischen Rezeptor und FG-Nups relativ gering sein [Kustanovich and Rabin, 2004]. Die Autoren vermuteten, dass sich in einem solchen transienten Netzwerk allein aufgrund von thermischer Energie ständig Netzwerkknoten lösen und schließen würden, wodurch sich die Barriere für inerte Moleküle öffne und damit die Selektivität nicht gewährleistet sei. Das OS- und ROD-Modell gehen schließlich von einem freien Kanal im Zentrum der Pore aus. Peters führte jedoch an, dass die Nup-Sequenzen, welche die „Kanalwände“ formen, in voll ausgedehnter Konformation eine Länge von ca. 70-250 nm aufweisen, lässt aber dann offen, warum diese langen Sequenzen ausgerechnet nur so weit in den Porenkanal ragen sollten, dass sie den zentralen Kanal frei lassen. Peters schließt seine Publikation ob der immer noch unklaren Situation im Porenkanal mit der Anmerkung, dass zur Aufklärung der Funktionsweise der selektiven Barriere eine direkte Beobachtung von Transportereignissen überaus aufschlussreich sein könne. Eine Verbesserung der methodischen Vorgehensweise sei dazu unumgänglich, da weder die optische noch die zeitliche Auflösung ausreichte, um die nötigen Informationen gewinnen zu können [Peters, 2005]. Zuvor hatten auch Weis und Macara zum Ausdruck gebracht, dass die exakte Lokalisierung von Cargo im Transit wahrscheinlich die entscheidenden Hinweise zur Aufklärung des KCT liefern würde [Weis, 2003], [Macara, 2001].

Um den Transport auf die genannten Modelle hin zu untersuchen und diskutierte Fragestellungen zu adressieren, bietet sich die Fluoreszenzmikroskopie (FM) an, da sie eine weitgehend zerstörungsfreie Visualisierung von zellulären Abläufen ermöglicht. Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie (EM), bei der wegen der methodisch bedingten Probenfixierung lediglich Momentaufnahmen realisierbar sind, können mit der FM Lebendzellen untersucht und Dynamiken unmittelbar („live“) abgebildet werden. Durch die zunehmende Sensitivität der Mikroskope und vor allem der Detektoren ist dabei mittlerweile die Beobachtung *einzelner*, fluoreszenzmarkierter Moleküle mit hoher zeitlicher und räumlicher Präzision möglich – die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie (EMFM) hat sich dabei für

die Aufklärung von Prozessen *in vivo* zu einer bedeutsamen Technik entwickelt [Gell et al., 2006]. Die Idee, dass die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie zur Aufklärung des NPC-Transports verwendet werden kann, wurde etwa zum Zeitpunkt der Veröffentlichung oben vorgestellter Modelle umgesetzt und entsprechende Experimente wurden durchgeführt und publiziert. Im Folgenden werden die drei wichtigsten EMFM-Studien zum KCT vorgestellt, die zu Beginn dieser Arbeit vorlagen.

Die erste EMFM-Studie, welche die Interaktion *einzelner* Cargomoleküle mit dem Kernporenkomplex zeigen konnte, wurde 2004 publiziert [Yang et al., 2004]. Die Autoren arbeiteten mit einem Imports- substrat, das aus zwei über eine kurze Peptidkette verknüpften GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) und einer NLS-Sequenz bestand, welches zusätzlich an zwei Cysteinen mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor555 markiert worden war und damit insgesamt eine molare Masse von etwa 55 kDa besaß. Nachdem das Substrat in Ensemble-Messungen gezeigt hatte, dass es aufgrund des NLS (s. Kapitel 1.1.1) im Zellkern angereichert wurde, gab man es zusammen mit den nötigen Transportrezeptoren in hoher Verdünnung auf permeabilisierte Zellen (s. Kapitel 1.1.4). Die Betrachtung der Zellen an einem EMFM bei Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs mit hoher Laserintensität ( $9 \text{ kW/cm}^2$ ) ließ die Beobachtung und Nanolokalisierung einzelner Substratmoleküle zu. Yang et al. konzentrierten sich bei der Beobachtung des Substrats auf den Bereich um die Kernmembran, welche zuvor im Durchlicht lokalisiert worden war, und detektierten dort verstärkt transiente Bindungsereignisse der Substratpartikel. Sie deuteten diese aufgrund verschiedener Beobachtungen als Transportereignisse, obwohl sie einräumten, dass die zeitliche und räumliche Auflösung (3 ms bzw. 30 nm) keine Beobachtung von Transmembrantrajektorien zuließ. Dennoch ließ sich aus den Bindungsereignissen für 2xGFP-NLS eine Häufigkeitsverteilung mit exponentiell abfallendem Verlauf erstellen, aus der eine mittlere Aufenthaltzeit am NPC von 10 ms ermittelt wurde und die in einem weiteren Experiment, bei dem kein RanGTP zugegen war, auf 45 ms stieg (vgl. Kapitel 1.1.1). Diese Interaktionszeit mit der Kernmembran sei laut Studie maßgeblich von einer Bewegung des Partikels in einem eng begrenzten Bereich geprägt, der in etwa  $30 \times 50 \text{ nm}^2$  messe und aus einer Zufallsbewegung resultiere. Aus diesen Beobachtungen leiteten die Autoren eine gute Stimmigkeit mit dem SP-Modell (s. o.) ab: (1) Die Zufallsbewegung des Partikels während der Interaktion mit dem NPC spreche für die von Ribbeck und Görlich postulierte zufällige Bewegung des Transportkomplexes im FG-Nup-Netzwerk. (2) Der geschwindigkeitbestimmende Schritt sei laut SP-Modell das Abbinden des Komplexes von der Pore – ein Prozess erster Ordnung, der sich im exponentiellen Abklingen der Interaktionszeitenverteilung widerspiegle. (3) Die maßgebliche Interaktion des Substrats ereigne sich – wie im SP-Modell angenommen – in der Porenregion und nicht etwa im Bereich der Filamente. Die Autoren konnten damit erstmals einzelne Transportsubstrate bei der Interaktion mit der Kernmembran abbilden und das Modell des KCT aufgrund der Beobachtungen erweitern. Gleichwohl zeigte sich die Notwendigkeit, die Methode zu



optimieren. So ist die Nano-Kolokalisierung von fluoreszenten Partikeln mit dem Durchlichtbild der Membran zu unpräzise, um daraus ein Wechselwirken der Partikel mit bestimmten Bereichen des NPC im Nanometermaßstab abzuleiten. Weiterhin zeigten die Autoren in Kontrollexperimenten, dass die Signale von *immobilisierten* Partikeln ebenfalls eine Zufallsbewegung mit einer Standardabweichung von 30 nm wiedergaben, sodass sich die an der Kernmembran detektierten Trajektorien nicht zwingend aus einem „random walk“ im Porenkanal ergaben, sondern auch ein Resultat der Lokalisierungsungenauigkeit sein konnten. Schließlich wird für den Transport von Partikeln durch einen Porenkanal endlicher Länge, der mit einem metastabilen Netzwerk aus FG-Nups blockiert ist, für die Transportdauer verteilung kein exponentiell abklingender Verlauf erwartet, sondern eine Verteilung mit einem Maximum bei einer Transportdauer  $> 0$ . [Kustanovich and Rabin, 2004]. Da die Analyse von Yang et al. sämtliche Ereignisse in Membrannähe einbezog, ist nicht auszuschließen, dass neben tatsächlichen Transporten auch Transportabbrüche und unspezifische Membranbindungen in die Auswertung eingingen, weshalb die ermittelte Interaktionsdauer wahrscheinlich nicht die tatsächliche Transportdauer wiedergibt. Aus den vorgenannten Punkten geht hervor, dass eine Verbesserung der Lokalisierungsgenauigkeit bei gleichzeitiger Erhöhung der zeitlichen Auflösung in Folgeexperimenten und eine präzisere Lokalisierung der Kernmembran für eine detailliertere Analyse des Transports wünschenswert waren.

In einer 2005 erschienenen Publikation von Kubitscheck et al., die sich mit der EMFM-Analyse der beiden Transportrezeptoren NTF2 und Transportin 1 beschäftigte, wurde eine deutliche Verbesserung in der Lokalisierung von Ereignissen relativ zur Kernmembran erreicht [Kubitscheck et al., 2005]. Dazu verwendeten die Autoren permeabilisierte HeLa-Zellen, welche das Protein POM121, ein NPC-Baustein auf der membran zugewandten Seite des zentralen Kernporenrings, stabil als GFP-Fusionsprotein exprimierten. Die resultierende GFP-Markierung der Kernmembran ließ aufgrund der Signaldichte zwar keine Abgrenzung einzelner NPC zu, jedoch konnte der Verlauf der Kernmembran – durch Anpassen von Gaussfunktionen an Intensitätsprofile jeweils senkrecht zur Membran und anschließendes Verknüpfen der einzelnen Maxima – auf Höhe des POM121 mit einer Genauigkeit von 10 nm bestimmt werden. Da die Position von POM121 im Kernporenkomplex bekannt ist, war es somit möglich einzelne Transportereignisse relativ zum Kernporenkomplex zu analysieren. Für den Transportrezeptor NTF2 wurden hunderte von Bindungsereignissen mit einer mittleren Lokalisierungsgenauigkeit von 22 nm aufgelöst, um die Verteilung der Bindungsstellen entlang der Kernporenachse zu ermitteln. Die symmetrische Verteilung mit einer FWHM von 125 nm zeigte, dass NTF2 bevorzugt auf cytoplasmatischer Seite etwa 30 nm vom NPC-Zentrum entfernt retardierte und eine Affinität zu den NPC-Filamenten aufwies. Da die Trajektorien der Transportrezeptoren mit einer hohen zeitlichen Auflösung von 2-5 ms aufgezeichnet worden waren, erlaubte die Analyse der Daten auch die Ermittlung der mittleren

Interaktionszeiten für NTF2 und Transportin 1 mit dem NPC. Durch Auswertung der zeitlichen Intensitätsverläufe von Bindungsereignissen im Bereich der Kernmembran ermittelten die Autoren diese zu 5,8 bzw. 7,2 ms und konnten darüber hinaus zeigen, dass sich die Interaktionszeiten bei Zugabe des zugehörigen Cargo-Proteins (RanGDP bzw. M3-GST) signifikant verkürzten. Die Autoren nahmen nun an, dass der Transport einer Michaelis-Menten Kinetik folge, bei der die maximale Transportrate nicht größer sein könne als die inverse Interaktionszeit. Daraus folgerten sie, dass ein NPC gleichzeitig mehrere Transportrezeptoren passieren lassen könne (bspw. 15 „unbeladene“ NTF2). Die Publikation lieferte damit die Interaktionszeiten für weitere Transportrezeptoren und ein detailliertes Bild von der Verteilung der Bindungsstellen bezüglich der Transportrichtung.

Eine dritte Studie zur Untersuchung des KCT anhand der Bewegung von einzelnen Molekülen wurde 2006 veröffentlicht [Yang and Musser, 2006]. Der Notwendigkeit, die Prozesse sowohl zeitlich als auch räumlich besser auflösen zu können, wurde dort begegnet, indem die Autoren die Viskosität im Cytoplasmabereich der permeabilisierten Zellen erhöhten (Zugabe 25% Glycerol) und damit die Bewegung der Partikel verlangsamten. Dadurch gelang es für immerhin 37% der Interaktionen des Referenzsubstrats NLS-2xGFP-4xAF647 (vgl. [Yang et al., 2004]), mit der Kernmembran längere Trajektorien zu detektieren. Erstmals konnten damit für ein Ereignis Start- und Zielkompartiment eindeutig identifiziert und eine Transporteffizienz berechnet werden. Dabei wurden für sämtliche Analysen ausschließlich auf die 37% „aufgelösten“ Ereignisse zurückgegriffen. Zur Berechnung der Effizienz wurden die Ereignisse in zwei Gruppen eingeteilt: (1) erfolgreicher Import (Startkompartiment Cytoplasma, Zielkompartiment Nucleoplasma) und (2) abgebrochener Import (Start- und Zielkompartiment Cytoplasma). Als Transporteffizienz definierten die Autoren dann das Verhältnis aus der Anzahl erfolgreicher Importe zur Gesamtzahl an Ereignissen. Für das Referenzsubstrat fanden sie eine Effizienz von etwa 50% bei einer Interaktionsdauer von 8,3 ms – Kennzahlen, die die Autoren auch für den vergleichbaren Transport *in vivo* fanden, den sie exemplarisch untersuchten. Nun konnten sie in folgenden Experimenten zeigen, dass sowohl Transporteffizienz als auch -dauer von der Konzentration an Substrat und Transportrezeptor (in diesem Fall Imp $\beta$ 1) abhängen: Wurde jeweils nur die Konzentration des Substrats bzw. Rezeptors geändert und alle übrigen Bestandteile des Transportgemischs (Imp $\alpha$ 1, Ran, GTP, NTF2) unverändert gelassen, so erhöhte sich die Effizienz auf bis zu 80% und die Interaktionsdauer verringerte sich auf bis zu 1 ms. Ein solcher Einfluss des Transportrezeptors auf Geschwindigkeit und Effizienz des Transports wurde mit der strukturellen Natur des Kernporenkanals begründet. Die Autoren stellten vor allem heraus, dass Anzahl, Art und Verteilung von Molekülen *im* Porenkanal (*pore occupancy*) Einfluss auf den Transport eines Substrats hätten – eine mit Molekülen „gefüllte“ Pore könne bspw. das dem diffundierenden Transportkomplex zur Verfügung stehende Volumen verringern, wodurch sich die Passagedauer verkürze. Die Studie etablierte mit der *Effizienz*

eine wichtige Kenngröße zur Analyse des Transports, die lediglich durch Einzelmolekül-Experimente zugänglich ist. Eine präzisere Lokalisierung des Transportkomplexes konnte jedoch selbst durch Erhöhen der Viskosität („Ausbremsen“ der Partikel) nicht erreicht werden.

Diese drei Studien zeigen, dass das Beobachten von *einzelnen* Transportkomplexen in der Umgebung und direkt an der Kernmembran wertvolle Informationen liefert, um die Funktion des NPC zu verstehen. So konnten für einzelne Transportsubstrate bereits wichtige Kenngrößen wie Interaktionszeiten, bevorzugte Bindungsbereiche entlang der Transportachse und Transporteffizienzen ermittelt werden. Dennoch waren vor allem die räumliche aber auch die zeitliche Auflösung noch zu gering, um den Weg der Transportsubstrate wirklich präzise verfolgen zu können. Eine Möglichkeit eine bessere Auflösung zu erlangen, ist die Verwendung hellerer Proben, wobei *heller* bedeutet, dass sich das Signal besser vom Hintergrundrauschen abhebt, woraus ein höheres Signal/Rausch-Verhältnis (SRV) resultiert. Die hier verwendete Methode zur Lokalisierung von Signalen (s. [Kubitscheck et al., 2000]) liefert mit zunehmendem SRV einen präziseren Wert für die „wahre“ Position des Partikels. Bisher wurden für die Markierung der Substrate bei Einzelmolekül-Experimenten ausschließlich organische Fluoreszenzfarbstoffe verwendet (s. o.). Diese bieten unter anderem die Vorteile, dass ihre Kopplung an Proteine unter etablierten Reaktionsbedingungen durchzuführen sind und sie ein geringes Molekulargewicht aufweisen, sodass sie das zu markierende Protein sterisch nicht überfrachten. Des Weiteren bedienen sie eine breite Farbstoffpalette im sichtbaren Spektralbereich. Nachteil dieser „klassischen“ Marker ist allerdings, dass ihre Helligkeit für die hier zu erörternden Fragestellungen nicht ausreicht und sie schon bei mittleren Anregungsleistungen (ca.  $1 \text{ kW/cm}^2$ ) irreversibel photobleichen (s. auch Kapitel 3.2.2.1). Wie unter anderem in [Ziffels, 2007] gezeigt, eignen sich für derartige Anwendungen insbesondere halbleitende Nanopartikel, sog. QDots. Ihre charakteristischen Eigenschaften und Besonderheiten werden daher im folgenden Kapitel beleuchtet.

### 1.1.3 Quantum Dots als KCT-Sonden

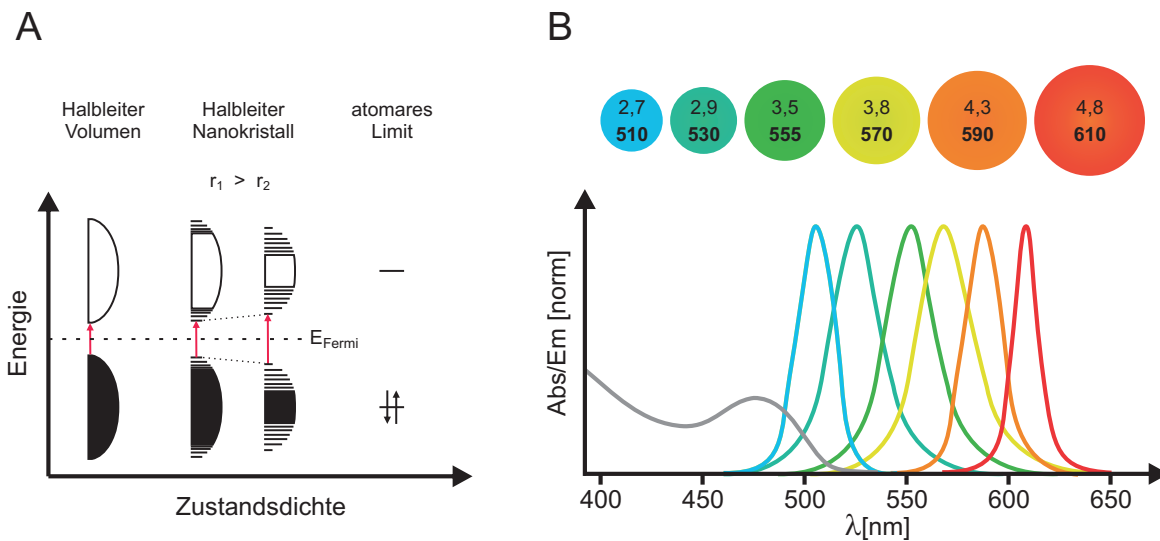
Um eine detaillierte Aufklärung des KCT mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, besteht die Notwendigkeit alternativer Fluoreszenzmarker. Im Wesentlichen muss das Signal/Rausch-Verhältnis der Fluorophore verbessert werden, um eine präzisere Lokalisierung der Probe zu erreichen und auf diese Weise den Weg des markierten Transportsubstrats durch die Kernpore genauer nachvollziehen zu können. Quantum Dots (QDots) erfüllen diese Anforderungen und weisen eine Reihe weiterer positiver Eigenschaften auf (für eine Übersicht s. [Medintz et al., 2005]), weshalb sie in dieser Arbeit als Fluoreszenzmarker für Transportsubstrate ausgewählt wurden.

QDots sind Halbleiter-Kristalle mit einem Partikeldurchmesser von wenigen Nanometern, die sich aus verschiedenen Elementkombinationen darstellen lassen [Michalet et al., 2005]. Für die Anwendung in

biologischen Experimenten haben sich QDots auf der Basis von CdSe etabliert, da deren Chemie die bislang Ausgereifteste ist, weshalb hier im Detail auf CdSe-QDots und deren Modifikationen eingegangen wird. Zur Synthese der QDots werden die Ausgangssubstanzen in ein koordinierendes organisches Lösungsmittel (z. B. Trioctylphosphinoxid, TOPO, s. Abbildung 1.6) injiziert. Dabei bilden sich monodisperse Nanokristalle, deren Durchmesser anhand der Edukt-Konzentrationen und der Reaktionsdauer beeinflusst werden kann [Alivisatos et al., 2005]. Die gezielte Beeinflussung des Partikeldurchmessers ist bei der Synthese der QDots enorm wichtig, da deren Eigenschaften stark größenabhängig sind. Nach größenfraktioniertem Ausfällen der Partikel und Resuspension des Pulvers in einem organischen Lösungsmittel erhält man Partikel, die zu einer sehr schmalbandigen Emission von Fluoreszenz im sichtbaren Bereich angeregt werden können und daher insbesondere in den Lebenswissenschaften für die Markierung von Substraten interessant sind. Besonders wertvoll sind diese Partikel auch, weil ihr Emissionsmaximum durch Variation der Partikelgröße über den gesamten sichtbaren Frequenzbereich verschoben werden kann.

Grundlage der Fluoreszenz von QDots ist die Anregung eines Elektrons vom Valenzband in das – für Halbleiter definitionsgemäß durch eine Bandlücke getrennte – Leitungsband. Übergänge finden stets zwischen Valenz- und Leitungsband statt, da das Fermi-Niveau, also das im Grundzustand höchstbesetzbare Energieniveau, für Halbleiter *zwischen* Leitungs- und Valenzband liegt [Alivisatos, 1996]. Durch die Anregung entsteht aufgrund der Ladungstrennung ein Exciton (Elektron-Lochpaar), welches bei Rekombination die Emission eines Fluoreszenzphotons zur Folge hat. Die Wellenlänge des Photons entspricht der Breite der Bandlücke, welche für Halbleiter-Nanopartikel abhängig von der Partikelgröße ist. Diese Größenabhängigkeit der Bandlücke hat zwei Ursachen:

- Bei der Reduzierung des Nanopartikel-Durchmessers (ein kleineres Partikel besteht aus weniger Atomen) gehen zunächst die Randbereiche des Valenz- und Leitungsbandes von der kontinuierlichen Zustandsdichte in diskrete Energieniveaus über. Die zentralen Bandbereiche bleiben erst einmal kontinuierlich (s. Abbildung 1.5 A). Die Bandlücke wird dadurch also nicht mehr von kontinuierlichen Bändern begrenzt, sondern von einigen diskreten Energieniveaus.
- Gleichzeitig driften das oberste Valenzniveau und das unterste Leitungsniveau bei der Größenreduktion immer weiter auseinander und vergrößern damit die Bandlücke. Dieses Auseinanderdriften ist ein Resultat des sog. *quantum confinement* – das Elektron-Lochpaar ist im immer kleiner werdenden Nanopartikel auf einen immer enger werdenden Raum begrenzt. In einem ausgedehnten Kristall würde das Exciton mindestens den Exciton-Bohr-Radius einnehmen, für CdSe liegt dieser bei 4,9 nm [Gaponenko, 1998]. Da die Nanopartikel, von denen hier die Rede ist, jedoch mit ca. 1,35-2,4 nm deutlich kleinere Radien aufweisen, wird das Exciton in Nanopartikeln zusammengestaucht. Dieser gestauchte Zustand wird mit abnehmendem Partikelradius



**Abbildung 1.5: Abhängigkeit der QDot-Emissionswellenlänge von der Partikelgröße.** **A** Valenz- und Leitungsband (unter bzw. oberhalb des Fermi-Niveaus) eines Halbleiters für einen Volumenkristall (links), Nanokristalle verschiedener Radien (Mitte) und die Energieniveaus des atomaren Limits. Für den Volumenkristall entsprechen die Bänder Kontinuen, bei Verkleinerung des Partikels (Nanomaßstab) lösen sich die Kontinuen in den Randbereichen der Bänder zu diskreten Energieniveaus auf. Aufgrund des *quantum confinements* (s. Text) driften oberstes Valenzniveau und unterstes Leitungslevel mit abnehmendem Radius auseinander, sodass die Bandlücke (roter Pfeil) größer wird. Damit ist mit abnehmendem Partikelradius zunehmend mehr Energie zur Fluoreszenzanregung nötig, umgekehrt ist das emittierte Fluoreszenzphoton zunehmend kurzwelliger. Abgeändert nach [Alivisatos, 1996]. **B** Aus den im Text und in Abbildungsteil A erläuterten Gründen ist die Emissionswellenlänge der QDots von der Partikelgröße abhängig. Oben sind Partikel verschiedener Durchmesser schematisch dargestellt, welche den Zusammenhang zwischen Größe (obere Zahl = Durchmesser) und Emissionswellenlänge (untere Zahl = Emissionsmaximum) illustrieren. Der Graph darunter zeigt die zugehörigen Emissionsspektren (farbliche Zuordnung) und in grau das Anregungsspektrum des bei 510 nm emittierenden Partikels. Abgeändert nach [Medintz et al., 2005].

immer energiereicher, wodurch die Bandlücke zur Erzeugung des Elektron-Lochpaars größer und damit die Wellenlänge des Fluoreszenzphotons kleiner wird. Den Zusammenhang zwischen Wellenlänge und Durchmesser des Nanopartikels zeigt Abbildung 1.5 B.

Aus oben genannten Gründen emittieren QDots mit abnehmender Partikelgröße zunehmend kurzwelliger (s. Abbildung 1.5 B). Für eine QDot-Suspension lässt sich daher anhand des Emissionsspektrums die Größenverteilung ermitteln – je schmalere das Emissionssignal ist, desto geringer die Größenverteilung der enthaltenen QDots. Diese Partikel sind in den letzten Jahren interessant für die Lebenswissenschaften geworden, erste Publikationen zu Biokonjugaten (Konjugat aus QDot und Biomolekül) erschienen 1998: [Bruchez et al., 1998] und [Chan and Nie, 1998]. Bevor die QDots allerdings sinnvoll in biologischen Systemen verwendet werden konnten, mussten die CdSe-Partikel noch einige Modifikationen erfahren:

- CdSe-Nanopartikel blinken stark. Hierfür werden unter anderem Oberflächendefekte verantwortlich gemacht, die die Rekombination der Excitonen behindern und somit die kontinuierliche Emission von Fluoreszenz unterbrechen [Alivisatos, 1996]). Die Quanteneffizienz wird durch diesen Effekt stark herabgesetzt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass das Aufbringen einer ZnS-Schicht auf den CdSe-Kern das Blinken reduziert und so die Quanteneffizienz steigert

[Hines and Guyot-Sionnest, 1996]. Solche CdSe/ZnS Core/Shell-Partikel (Kern/Hülle) werden wegen der verbesserten optischen Eigenschaften meist als Sonden in biologischen Systemen verwendet (s. Abbildung 1.6 links).

- Die CdSe/ZnS-Partikel werden üblicherweise in einem organischen Lösungsmittel (z. B. TOPO) synthetisiert, dessen funktionale Gruppen die Partikeloberfläche koordinieren. Die daher synthesebedingt nur in organischen Lösungsmitteln löslichen Partikel müssen für die Anwendung in biologischen Systemen in wässriger Phase zugänglich gemacht werden. Dazu werden die CdSe/ZnS-Partikel zum Ligandenaustausch mit einem bifunktionalen Molekül umgesetzt, welches einerseits eine hohe Affinität zur Kristalloberfläche aufweist (hier erweisen sich Thiolgruppen als günstig) und andererseits über eine hydrophile Gruppe verfügt (beispielsweise eine terminale Carbonsäure). Das Molekül koordiniert über die metallaffine Gruppe an die QDot-Oberfläche und gewährleistet durch die nach außen weisende, hydrophile Gruppe eine gute Wasserlöslichkeit des QDots. Hierfür können die mit TOPO-kooordinierten Nanopartikel beispielsweise in Dihydroliponsäure (DHLLA) gelöst werden, woraufhin ein Austausch von TOPO durch DHLLA erfolgt (s. Abbildung 1.6). Die resultierenden QDots sind in wässrigem Medium löslich.

Die auf diese Weise modifizierten QDots lassen sich nun zur Analyse biologischer Fragestellungen einsetzen. Mögliche Einsatzgebiete sind z. B. Immunomarkierungen, die Markierung von Lebzellen, FISH- und FRET- Experimente (s. [Alivisatos et al., 2005]) oder – wie in der vorliegenden Arbeit – Studien mittels Einzelpartikelverfolgung. Um eine spezifische Wechselwirkung der QDots mit den zu untersuchenden Zellstrukturen oder Rezeptoren zu erreichen, müssen die Nanokristalle nach Phasentransfer bzw. Hydrophilierung mit dem entsprechenden Protein biofunktionalisiert werden. Dazu existieren zahlreiche Synthesewege, von denen hier drei einander gegenübergestellt werden:

- Die bioaktiven Moleküle lassen sich z. B. über einen bifunktionalen Linker kovalent an den Oberflächenliganden (also hier z. B. das DHLLA) der QDots binden. Bei der Durchführung einer solchen Kopplung kann es zur Quervernetzung und in deren Folge zur irreversiblen Aggregation eines Großteils der in Lösung befindlichen QDots kommen. Zudem muss der im Überschuss eingesetzte Linker vor der Verwendung der Partikel entfernt werden, weshalb ein Materialverlust bei diesem zusätzlichen Aufreinigungsschritt zu erwarten ist. Insgesamt ist diese Variante durchaus verbreitet, aber mit einer unter Umständen aufwendigen Optimierung der Reaktionsbedingungen verbunden.
- Des Weiteren lässt sich die Biotin-Streptavidin-Affinität als verbrückende Funktionalisierung nutzen (s. Abbildung 1.6 B). Hierzu sind QDots erhältlich, die zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen an Zellmaterial in einem ersten Schritt mit Polyethylenglykol (PEG) beschichtetet



wurden, an welches in einem zweiten Syntheseschritt kovalent Streptavidin (SAv) gebunden wurde. Diese QDots lassen sich durch Reaktion mit einem biotinylierten Biomolekül funktionalisieren. Der Vorteil dieser Biofunktionalisierung liegt in der einfachen Durchführung der Kopplungsreaktion und im etablierten Biotin/Streptavidin-System, aufgrund dessen für viele Anwendungen geeignete Biotin-Linker verfügbar sind. Für die hier formulierten Fragestellungen weist dieser Aufbau allerdings einen zentralen Nachteil auf: die PEG-Schicht und das mit einem Molekulargewicht von 55 kDa recht große Streptavidin resultieren in einer Sonde mit großem Durchmesser. Da der funktionale Durchmesser der Kernpore mit 39 nm jedoch begrenzt ist, soll hier in einer alternativen Syntheseroute eine kleinere Sonde entwickelt werden.

- Eine vielversprechende Methode Biomoleküle an QDots zu binden, ist der direkte Ligandenaustausch an der Oberfläche von DHLA-kordinierten QDots (s. Abbildung 1.6 A). Die bereits in der Literatur beschriebene Methode bietet neben dem Vorteil der Größenreduktion einen überschaubaren präparativen Aufwand (s. bspw. [Clapp et al., 2006]). Das Biomolekül muss hierfür allerdings über eine Metallionen-affine Einheit verfügen, welche in der Lage ist, das DHLA zu verdrängen. Die uns zur Verfügung stehende Imp $\beta$ 1-Variante verfügt über eine 6xHis-Sequenz und wurde daher zur Etablierung dieser Funktionalisierungstechnik eingesetzt. Imp $\beta$ 1 bietet zudem den Vorteil, dass es direkt mit der Kernpore interagiert, um den Transport zu vermitteln und daher nicht auf das Binden an weitere KCT-aktive Proteine angewiesen ist (ein NLS-Protein müsste z. B. noch Imp $\alpha$ 2 und Imp $\beta$ 1 binden, was das Partikel unnötigerweise vergrößert).

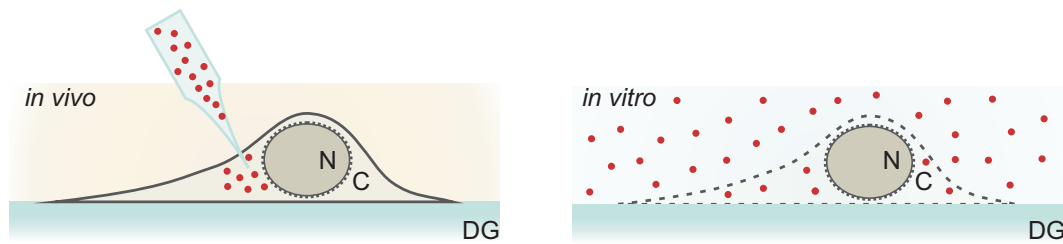
Diese neue Funktionalisierungsstrategie verlangt die Wahl eines geeigneten QDot-Derivats, da bei den zuvor verwendeten, mit SAv und PEG beschichteten QDots die Oberfläche sterisch so abgeschirmt ist, dass der Ligandenaustausch nicht vorgenommen werden kann. Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Funktionalisierung geeigneter QDots mit Imp $\beta$ 1 sowie mit der Untersuchung des Transportverhaltens der resultierenden Sonde in permeabilisierten Zellen.

#### **1.1.4 Kerncytoplasmtransport in permeabilisierten Zellen**

Soll der Import eines fluoreszenzmarkierten Proteins in den Zellkern untersucht werden, so muss dieses zunächst in das Cytoplasma eingebracht werden. Zwei Methoden sind dazu besonders verbreitet: Zum einen kann das Substrat in das Cytoplasma einer lebenden Zelle injiziert werden. Dies erlaubt das Beobachten von Vorgängen *in vivo*, ist jedoch mit vergleichsweise hohem Aufwand zur Mikroinjektion, hohen Ansprüchen an die Umgebung der Zellen zu deren Lebenserhaltung und dadurch einem meist geringen Durchsatz an Einzelexperimenten verknüpft. Eine weitere Methode wurde 1990 von Adam et al. publiziert. Hierbei wird die Plasmamembran der Zellen chemisch permeabilisiert, um das Substrat durch die entstandenen Öffnungen in das Cytosol einbringen zu können. Die Zellen sind nicht mehr







**Abbildung 1.7: Schematische Gegenüberstellung der *in vivo* und *in vitro* Manipulation von Zellen.** Die Grafik zeigt zwei mögliche Manipulationen zum Einbringen von Substrat in das Cytosol einer adhärenz Zelle. Links: Mikrojektion des Substrats in das Zellcytoplasma. Rechts: Die permeabilisierte Plasmamembran lässt das Eindringen von Substrat aus dem extrazellulären Raum zu. N: Nucleus, C: Cytoplasma, DG: Deckglas.

als Lebendzellen zu betrachten, dennoch lässt sich der KCT bei geeigneten Permeabilisationsbedingungen durch Einsatz eines speziellen Puffersystems und den ggf. notwendigen Transportfaktoren untersuchen. Diese Methode bietet zwei Vorteile: Zum einen lässt sich hiermit eine große Zahl von Zellen gleichzeitig manipulieren und analysieren, zum anderen können die Experimentbedingungen durch Variation des Puffersystems oder Zugabe von Faktoren gezielter gesteuert werden als dies in Lebendzellen möglich ist. Das System eignet sich um gezielte Fragestellungen bezügl. des KCT zunächst in diesem „vereinfachten“, gut kontrollierbaren System zu untersuchen. Einige der mittels Einzelmolekülmikroskopie erhaltenen Erkenntnisse zum KCT konnten anhand permeabilisierter Zellen gewonnen werden (z. B. [Yang et al., 2004] und [Kubitscheck et al., 2005]).

## 1.2 Analyse photophysikalischer Eigenschaften organischer Fluorophore

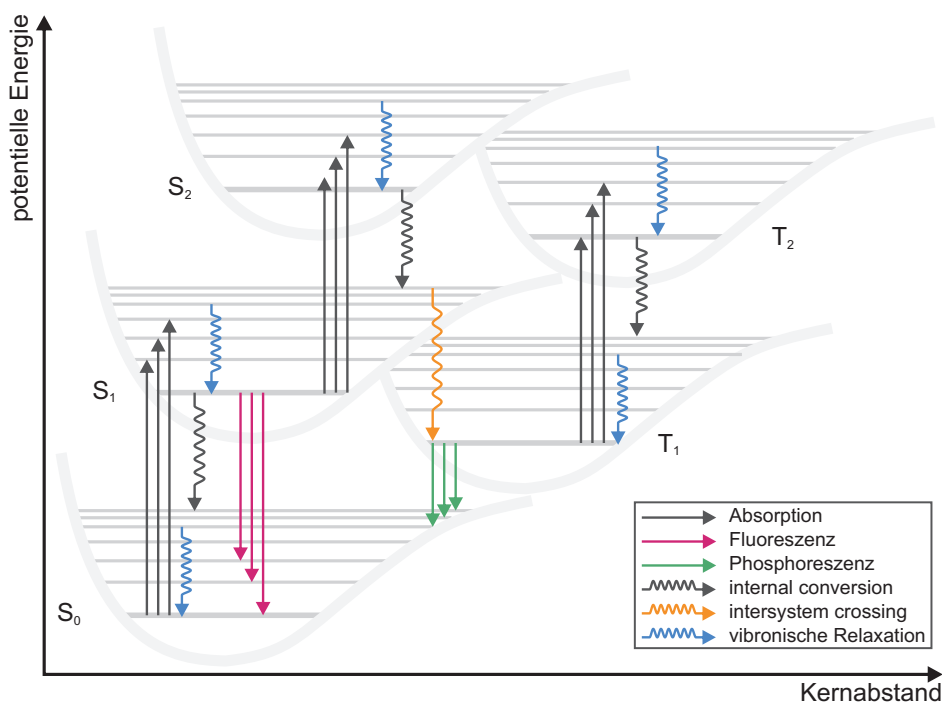
Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein wichtiges Bildgebungsverfahren in den Lebenswissenschaften. Dies liegt zum einen daran, dass Prozesse und Strukturen *in vivo* abgebildet werden können, zum anderen aber auch an der Möglichkeit, die Fluoreszenzmarkierung hochspezifisch durchzuführen und somit die relevanten Strukturen vor einem beinahe unmarkierten Hintergrund darstellen zu können (für eine Übersicht siehe z. B. [Lichtman and Conchello, 2005]). Die Technik erlaubt dabei nicht nur eine detaillierte Analyse von fluoreszenzmarkierten Zell- oder Gewebestrukturen, sondern bei geeigneter Instrumentierung und Konzeption des Experiments auch die Beobachtung *einzelner* fluoreszierender Moleküle (siehe z. B. [Gell et al., 2006]). Insbesondere die Verfolgung fluoreszenzmarkierter Proteine in nativer Umgebung mit ausreichend hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung ermöglicht detaillierte Einblicke in die Funktionsweise regulatorischer Mechanismen z. B. bei der Steuerung von Zellfunktionen. Die eingangs vorgestellten Studien zur Untersuchung des Kerncytoplasmatransports anhand der Beobachtung einzelner fluoreszenzmarkierter Transportrezeptoren (bzw. markiertem Cargo) zeigen etwa, dass es mittlerweile gelingt, Prozesse aufzulösen, die sich innerhalb von einigen Millisekunden auf wenigen Nanometern abspielen. Dazu hat vor allem die Entwicklung sehr schneller

und gleichzeitig sensitiver EMCCD-Kameras beigetragen. Aber auch die zunehmende Verfügbarkeit immer stabilerer und hellerer Fluoreszenzfarbstoffe macht es möglich immer mehr Photonen pro Farbstoff zu sammeln, was sich unmittelbar auf die Zeitdauer auswirkt, die ein Farbstoff beobachtet werden kann. Die Durchführung von Experimenten mit solch hohen Anforderungen an die Auflösung erfordert aus verschiedenen Gründen die Kenntnis einiger photophysikalischer Eigenschaften der abzubildenden Fluorophore. So ist es beispielsweise nicht sinnvoll, für sehr lang zu beobachtende Prozesse ein Fluorophor zu verwenden, welches durch die zur Anregung eingestrahlte Laserstrahlung sehr rasch geblichen wird – vielmehr sollte der Anwender, idealerweise anhand von Referenzdaten, einen Farbstoff wählen, welcher sich für das Experiment besser eignet. Für Analysen, welche sich mit der Bewegung fluoreszenzmarkierter Substrate in Lebendzellen bzw. in permeabilisierten Zellen (s. Kapitel 1.1.4) beschäftigen, fehlen entsprechende Referenzwerte. Da die Eigenschaften von Fluorophoren stark von ihrer Umgebung abhängen, lassen sich Daten für andere als die im jeweiligen Experiment verwendeten Puffer und Medien nicht oder nur bedingt übertragen. Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit im zweiten Teil mit der Quantifizierung zweier wichtiger photophysikalischer Größen von häufig in der Einzelmolekül-Mikroskopie verwendeten Fluorophoren: einerseits der Photostabilität und andererseits der Gesamtzahl der bis zum Photobleichen emittierten Photonen. Im Folgenden werden nun die theoretischen Grundlagen der Entstehung von Fluoreszenz vorgestellt und der Einfluss von Helligkeit und Stabilität auf die Qualität der mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie erhältlichen Daten erläutert.

### 1.2.1 Grundlagen zur Entstehung von Fluoreszenz

Fluoreszenz ist die Emission eines Photons zur elektronischen Relaxation eines Moleküls, ohne dass dabei eine Spinumkehr erfolgt. Eine gute Übersicht zur Entstehung von Fluoreszenz liefert das Buch *Molecular Fluorescence – Principles and Applications* [Valeur, 2002]. Das Prinzip ihrer Entstehung wird im Folgenden zur Einführung der Begrifflichkeiten dargelegt.

In der Fluoreszenzmikroskopie werden neben Proteinen und Nanokristallen vor allem organische Fluorophore (zur Fluoreszenz befähigte Moleküle) zur Markierung des interessierenden Substrats verwendet. Solche Moleküle können durch Wechselwirkung mit sichtbarem Licht oder naher UV-Strahlung elektronisch angeregt werden und bei Desaktivierung Licht emittieren. Die Prozesse, welche der Fluoreszenz zugrunde liegen, werden anhand von Abbildung 1.8 erläutert. Diese zeigt das Jablonski-Diagramm eines beliebigen Fluorophors unter Beachtung der elektronischen und vibronischen Energiezustände des Moleküls. Letztere sind, dem Modell des anharmonischen Oszillators entsprechend, als nicht-äquidistante, zu höheren Energien in ein Kontinuum übergehende Linien innerhalb einer Morse-Potential-Kurve eingezeichnet. Der elektronische Grundzustand des Systems wird als



**Abbildung 1.8: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Entstehung von Lumineszenz.** Das Diagramm veranschaulicht exemplarisch die wichtigsten internen Desaktivierungen, durch welche ein mit sichtbarem Licht angeregter Fluoreszenzfarbstoff relaxiert. Die Darstellung der Schwingungszustände der elektronischen Singulett- und Triplettzustände ( $S_n$  bzw.  $T_n$ ) folgt dem Modell des anharmonischen Oszillators.

$S_0$  bezeichnet, wobei das *S* für *Singulett* steht und sich aus der Spinmultiplizität des elektronischen Zustands ableitet.  $S_1, S_2, \dots, S_n$  sind folglich die energetisch über dem Grundzustand angesiedelten Singulettzustände.

Aus dem Grundzustand heraus lässt sich das Molekül in den nächsthöher gelegenen Singulettzustand  $S_1$  anregen. In der Fluoreszenzmikroskopie werden meist nur solche Moleküle verwendet, bei denen diese Anregung durch Einstrahlung von sichtbarem Licht möglich ist, sodass die Absorption eines Photons der Wellenlänge im Bereich von etwa 400-700 nm den Übergang  $S_0 \rightarrow S_1$  initiiert. Die Absorption ist mit einer Dauer von etwa  $10^{-15}$  Sekunden so schnell, dass es währenddessen zu keiner signifikanten Bewegung der Atomkerne des Moleküls kommt. Der Übergang ist daher vertikal (Kernabstand konstant, Franck-Condon-Prinzip) und findet in dem Schwingungszustand von  $S_1$  seinen Abschluss, welcher bei der im Moment der Photonenabsorption vorliegenden Kerndistanz die höchste Aufenthaltswahrscheinlichkeit aufweist.

Das nun sowohl elektronisch als auch vibronisch angeregte Molekül relaxiert zunächst durch die vibronische Relaxation in den Schwingungsgrundzustand von  $S_1$  bevor es aus diesem, wiederum vertikal, nach  $S_0$  – in den Schwingungszustand mit der maximalen Aufenthaltswahrscheinlichkeit – relaxiert und schließlich auch dort in den vibronischen Grundzustand übergeht. Ist der Übergang  $S_1 \rightarrow S_0$  von der spontanen Emission eines Photons begleitet, so spricht man von *Fluoreszenz*. Das emittierte

Photon ist dabei energieärmer als die absorbierte Strahlung und zwar um genau den Betrag, welcher bei der vibronischen Relaxation an die Umgebung freigesetzt worden ist. Die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsenergie wird als Stokes-Shift bezeichnet und äußert sich im Absorptions-Emissions-Spektrum eines Farbstoffs darin, dass das Maximum des Emissionsspektrums im Vergleich zu dem des Absorptionsspektrums rotverschoben ist. Für die Fluoreszenzmikroskopie ist diese Verschiebung ein wichtiger Parameter: Die bei Raumtemperatur recht breiten Banden der Absorptions- und Emissionsspektren eines organischen Fluoreszenzfarbstoffs überlappen teilweise (für Fluorescein beispielsweise beträgt die Halbwertsbreite der Banden jeweils etwa 50 nm [Sjöback et al., 1995] und die Banden überlappen sich zu je etwa einem Drittel). Bei zunehmendem Stokes-Shift rücken die Banden auseinander und die Überlappung ist geringer. Mit geeigneten Filtern kann dann ein höherer Anteil des Fluoreszenzlichts von der Anregungsstrahlung getrennt werden, woraus schließlich eine höhere Signalausbeute resultiert.

Alternativ ist ein strahlungsloser Übergang in den Grundzustand möglich. Diese „interne Konversion“ (IC) ist ein Konkurrenzphänomen zur Fluoreszenz und besonders effizient, wenn die Energielücke zwischen den beteiligten Zuständen gering ist. Die Energie wird dann, wie auch bei der vibronischen Relaxation, an die Umgebung abgegeben.

Neben den beschriebenen Übergängen zwischen verschiedenen Singulettzuständen besteht auch die Möglichkeit, dass eine Spinumkehr zum Übergang in einen Triplettzustand führt. Prinzipiell sind Übergänge mit Multiplizitätswechsel verboten, sie besitzen jedoch bei entsprechender Spin-Bahn-Kopplung eine gewisse Wahrscheinlichkeit. Abbildung 1.8 zeigt, dass für ein solches *intersystem crossing* (ISC) die Potentialkurven des jeweils involvierten Singulett- und Triplettzustandes überlappen müssen. Nach dem ISC findet in  $T_1$  eine vibronische Relaxation statt, bevor das Molekül durch eine erneute Spinumkehr in  $S_0$  gelangt. Bei diesem Übergang kann es analog der Fluoreszenz ebenfalls zur Emission eines Photons kommen, welche als *Phosphoreszenz* bezeichnet wird. Aufgrund der geringen ISC-Wahrscheinlichkeit befindet sich das Molekül vergleichsweise lange in  $T_1$ , sodass der Triplettzustand mit ca.  $10^{-6}$  bis 1 Sekunde deutlich langlebiger ist als  $S_1$ , dessen Lebensdauer etwa  $10^{-10}$  bis  $10^{-7}$  Sekunden beträgt. Die Phosphoreszenz ist damit ein zur Absorption stark verzögert einsetzender Prozess. Aufgrund der langen Aufenthaltsdauer im angeregten Zustand  $T_1$  steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zur Relaxation alternative Prozesse ablaufen. Denkbar ist z. B. durch weitere Absorption eines Photons der Übergang in höhere Triplettzustände, aber vor allem auch die Reaktion mit Molekülen in der unmittelbaren Umgebung, bei denen das Chromophor unter Umständen zerstört wird (s. Kapitel 1.2.3).

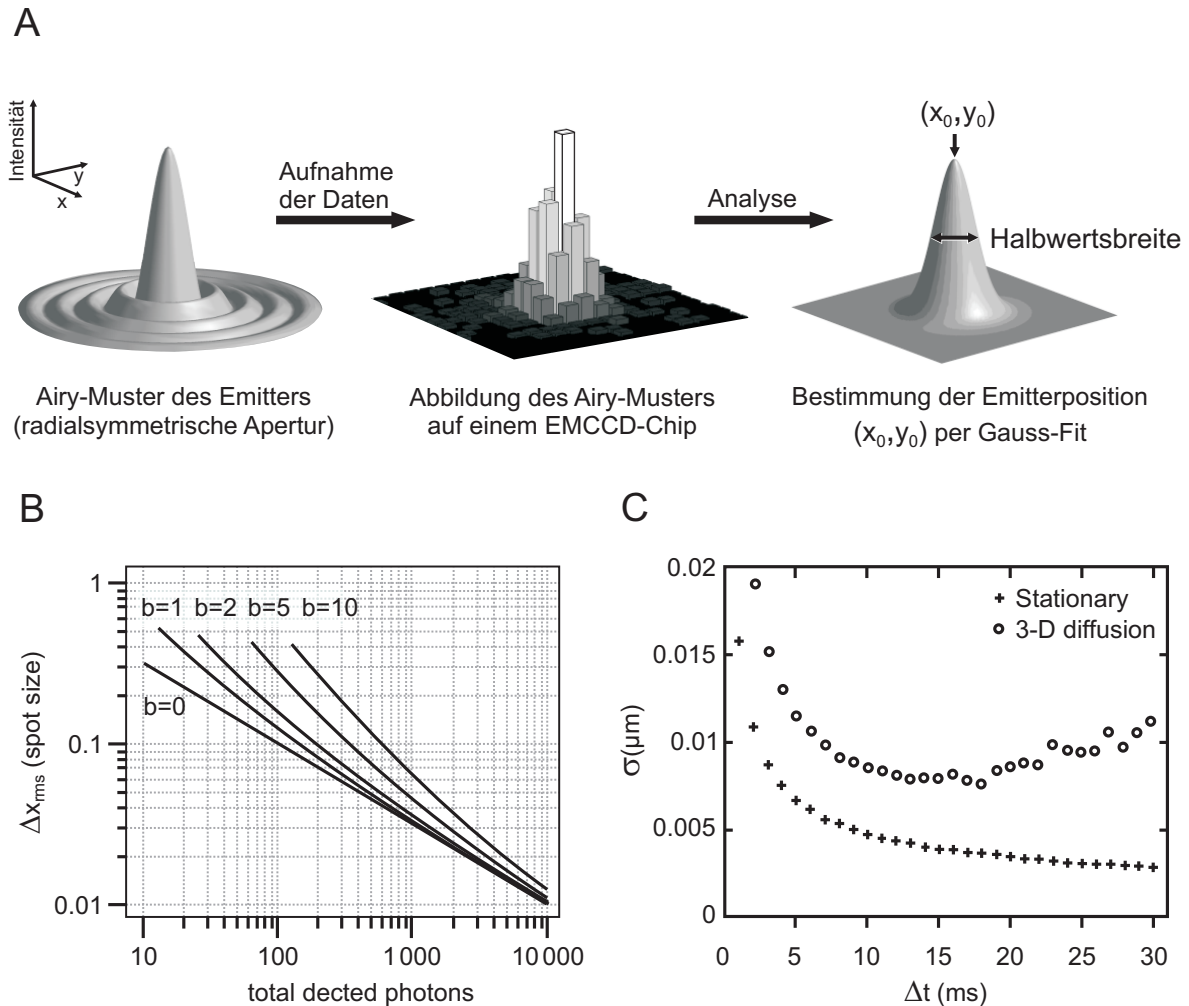
Tritt keine Beschädigung des Chromophors auf, so ist im Prinzip denkbar, dass der Zyklus aus Absorption und Emission bei konstanter Bestrahlung beliebig häufig durchlaufen werden kann. Wie einleitend

erläutert, beschäftigt sich diese Arbeit mit einer Auswahl an fluoreszierenden Molekülen, bei denen es sich um in der Einzelmolekülmikroskopie verwendete Fluoreszenzfarbstoffe handelt. Üblicherweise werden diese im Experiment mit hoher Strahlungsintensität angeregt: Die ständige Verfügbarkeit von Photonen gewährleistet, dass der Fluorophor mit hochfrequent Photonen absorbiert und Fluoreszenz emittiert und damit präzise lokalisierbar ist (s. Kapitel 1.2.2). Eine hohe Strahlungsintensität kann jedoch aus verschiedenen Gründen zu einer irreversiblen Zerstörung des Chromophors führen – ein Prozess, der als Photobleichung bekannt ist und durch welchen der Fluoreszenzfarbstoff selbst und folglich auch das mit ihm markierte Substrat für die Mikroskopie unsichtbar werden. Im Folgenden wird zunächst auf die Notwendigkeit relativ hoher Anregungsleistungen eingegangen, bevor das daraus häufig resultierende Photobleichen erläutert wird.

### 1.2.2 Nanolokalisierung eines Fluoreszenzemitters

Wird die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, um Prozesse auf (makro-)molekularer Ebene, z. B. *in vivo*, zu beobachten, so muss der Fluorophor häufig mit Nanometer-Genauigkeit lokalisiert werden. Nur so können die im Verlauf weniger Millisekunden oft im Nanometerbereich stattfindenden Vorgänge ausreichend aufgelöst werden. Die sog. Nanolokalisierung des Fluorophors, also die Positionsbestimmung mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern, wird in diesem Kapitel vorgestellt, um die Notwendigkeit hoher Anregungsleistungen für die Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie zu erklären.

Die Abbildung einer Punktquelle, also z. B. eines einzelnen Fluoreszenzemitters, mittels Mikroskop liefert in der Bildebene kein unendlich scharfes Signal, sondern ein in seiner Gestalt von der Mikroskopoptik abhängiges Signalmuster (s. z. B. [Murphy, 2001]). Wird beispielsweise eine Optik mit radialsymmetrischer Apertur verwendet, so stellt sich die Punktquelle in der Bildebene als Airy-Muster dar. Abbildung 1.9 A zeigt ein solches Airy-Muster: Ein zentrales Maximum ist radialsymmetrisch von deutlich weniger intensiven Nebenmaxima umgeben. Um das Airy-Muster und damit das Fluorophorsignal abzubilden, wird zur Verfolgung einzelner Emittier meist ein EMCCD-Chip in der Bildebene positioniert. Das photosensitive Material des Chips wird dann für die Dauer der Belichtungszeit  $t_i$  belichtet und die auftreffenden Photonen werden pixelweise als Photoelektronen registriert. Eine Verstärkung der Elektronen und die anschließende Prozessierung liefern schließlich eine Abbildung des Airy-Musters, wie sie in Abbildung 1.9 A (Mitte) zu sehen ist. Die Nebenmaxima sind dabei oft nicht zu erkennen, da ihre geringen Intensitätswerte vom Hintergrundrauschen überlagert werden. Gleichwohl genügt die Abbildung des zentralen Maximums, um eine Lokalisierung des Emitters vorzunehmen. Eine Möglichkeit besteht darin eine 2D-Gaussfunktion an die Intensitätswerte des Signals anzupassen, sodass das Zentrum der Gaussfunktion die Position des Fluorophors liefert. Die Präzision der Bestim-



**Abbildung 1.9: Nanolokalisierung eines Fluoreszenzemitters.** **A** Links: Wird ein Emitter per radialsymmetrischer Apertur detektiert, erzeugt er in der Bildebene des Mikroskops ein als Airy-Muster bezeichnetes Signal (nach [Orfanidis, 2002]). Mitte: Auf einen EMCCD-Chip abgebildet, ist oft nur das zentrale Maximum des Airy-Musters zu erkennen. Rechts: Die Nanolokalisierung des Emitters lässt sich durch Fit einer 2D-Gaussfunktion an das Chip-Signal realisieren – das Zentrum  $(x_0, y_0)$  der Funktion wird dann als Emitterposition angenommen. **B** Theoretische Ergebnisse für die Lokalisierungsgenauigkeit  $\Delta x_{rms}$  in Abhängigkeit von der Anzahl detektierter Photonen [Thompson et al., 2002]. Die  $b$  stehen für die Anzahl an Hintergrundphotonen (verursacht z. B. durch Dunkelrauschen, Streulicht oder Autofluoreszenz). **C** Zusammenhang zwischen Bildaufnahmezeit  $\Delta t$  und der Lokalisierungsgenauigkeit  $\sigma$  (nach [Deschout et al., 2012]). „+“ steht hierin für immobile, „o“ für in 3 Dimensionen diffundierende Emitter.



mung lässt sich aus der Halbwertsbreite der Gaussfunktion (s. Abbildung 1.9 A rechts), der Pixelgröße, der Zahl detektierter Photonen und dem Hintergrundsignal ableiten [Deschout et al., 2012]. Abbildung 1.9 B zeigt den von Thompson et al. für immobile Emitter berechneten Zusammenhang zwischen der Anzahl der ein Signal bildenden Photonen (*total detected photons*) und der Genauigkeit  $\Delta x_{\text{rms}}$ , mit welcher die Signalquelle lokalisiert werden kann. Die logarithmische Auftragung für eine hintergrundfreie Abbildung ( $b = 0$ ) verdeutlicht, dass die 100-fache Photonenzahl eines Signals zu einer 10-fach präziseren Lokalisierung des Emitters führt – eine Optimierung der detektierten Photonenzahl kann also unter Umständen die für ein Experiment entscheidende Verbesserung der Lokalisierungsgenauigkeit bewirken. Deschout et al. stellten in ihrer kürzlich erschienenen Studie eine Möglichkeit zur Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit *diffundierender* Partikel vor [Deschout et al., 2012]. Sie machen deutlich, dass der Ort eines sich während der Belichtungszeit  $t_i$  bewegenden Partikels streng genommen nicht definiert ist und stellen daher eine Methode vor, mit welcher sich die *mittlere* Position des Fluorophors im Bild mit hoher Genauigkeit bestimmen lässt. Abbildung 1.9 C gibt Daten dieser Veröffentlichung wieder und stellt die Lokalisierungsgenauigkeit  $\sigma$  in Abhängigkeit von der Bildaufnahmezeit  $\Delta t$  zum einen für immobile und zum anderen für in alle drei Raumrichtungen diffundierende Emitter dar. Der mit „+“ gekennzeichnete Verlauf für immobile Partikel zeigt ein zu den Ergebnissen von Thompspon et al. analoges Verhalten: Mit zunehmender Bildaufnahmezeit lässt sich ein immobiler Emitter auch mit höherer Präzision lokalisieren, da gleichermaßen die Anzahl der zum Signal beitragenden Photonen zunimmt. Bewegt sich nun der zu lokalisierende Partikel (mit „o“ gekennzeichnet), so ähnelt der Verlauf der Auftragung  $\sigma$  gegen  $\Delta t$  nur für geringe Bildaufnahmezeiten dem für immobile Partikel. Bei längeren Belichtungszeiten führen die Bewegungsunschärfe und eine veränderte Signalgestalt für Außerfokus-Partikel wieder zu einer zunehmend unpräzisen Positionsbestimmung. Abbildung 1.9 C gibt damit auch ein grundlegendes Problem der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie für die Beobachtung sehr schneller Prozesse wieder: Eine höhere zeitliche Auflösung geht immer auch mit einer geringeren Lokalisierungsgenauigkeit einher. Experimente, welche sowohl eine sehr präzise Lokalisierung wie auch eine hohe zeitliche Auflösung erfordern, stoßen hier an prinzipielle Grenzen.

Für den Anwender resultieren daraus nun folgende Überlegungen:

Um die Position des zu verfolgenden Emitters mit maximal möglicher Präzision bestimmen zu können, muss das Signal in jedem Bild mit der größtmöglichen Anzahl an Photonen abgebildet werden. Für immobile Emitter lässt sich diese erhöhen, indem die Belichtungszeit heraufgesetzt wird, sodass innerhalb von  $t_i$  mehr Photonen auf den Chip treffen. Für mobile Emitter ist diese Möglichkeit aus verschiedenen, zuvor erwähnten Gründen nur bedingt sinnvoll: Zum einen kann zur Auflösung des zu beobachtenden Prozesses eine Mindest-Bildwiederholungsrate erforderlich sein, zum anderen wirken

sich aber auch die Bewegungs- und Außerfokusunschärfe bei langen Belichtungsdauern ungünstig auf die Lokalisierungsgenauigkeit aus. In diesem Fall besteht eine Möglichkeit zur Steigerung der Photonenzahlen (bei ansonsten gleichem Aufbau des Experiments) in der Anregung der Fluorophore mit höherer Intensität. Dadurch lässt sich die Frequenz des Zyklusdurchlaufs *Photonenabsorption – Fluoreszenzemission* (s. Kapitel 1.2.1) bis zu einem farbstoffspezifischen Schwellenwert erhöhen und damit die Zahl emittierter Photonen je Zeiteinheit steigern.

Um also eine hohe Lokalisierungsgenauigkeit zu ermöglichen, wird in der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe vergleichsweise intensiver Strahlung angeregt. Begleitet wird eine hohe Anregungsintensität meist allerdings zum einen von einem höheren mittleren Hintergrundrauschen und zum anderen von beschleunigtem Photobleichen (s. Kapitel 1.2.3). Ersteres führt zu einer Abnahme der Lokalisierungsgenauigkeit (s. hierzu Abbildung 1.9 B für  $b > 0$ ). Letzteres ist vor allem dann ein kritischer Parameter für das Experiment, wenn sich der zu beobachtende Vorgang und das Bleichen auf vergleichbaren Zeitskalen abspielen. Bei diesbezüglich kritischen Experimenten (z. B. Ermittlung von Bindungszeiten) muss daher das Bleichen in Abhängigkeit von der Anregungsintensität untersucht oder auf geeignete Referenzdaten zurückgegriffen werden.

Das folgende Kapitel bietet einen Einblick in mögliche molekulare Ursachen für das Bleichen von Fluoreszenzfarbstoffen.

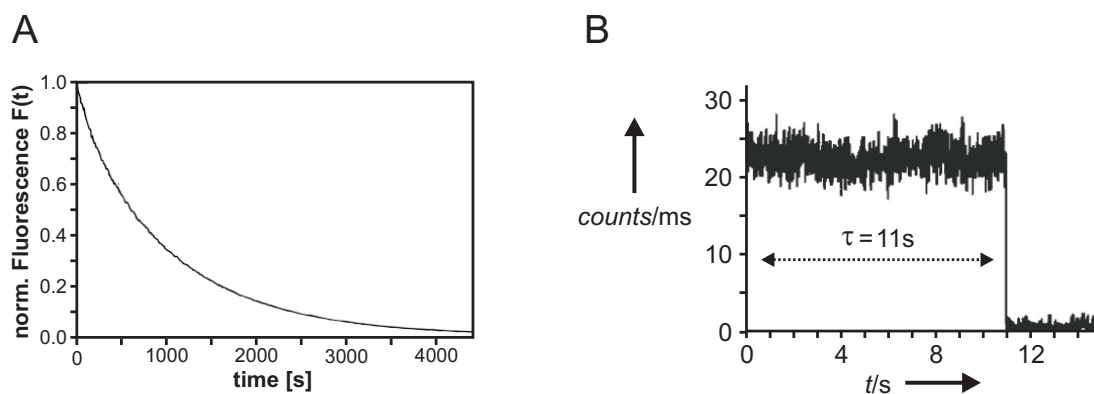
### 1.2.3 Die Photostabilität von Fluorophoren

Als *Photobleichung* eines Fluoreszenzfarbstoffs wird die von der Anregungsstrahlung ausgelöste, irreversible Schädigung des für die Emission von Fluoreszenzphotonen verantwortlichen Elektronensystems bezeichnet. Das Photobleichen versetzt das betroffene Molekül dauerhaft in einen nicht-fluoreszenten Zustand. Eine Fluorophor-Lösung, welche kontinuierlich bestrahlt wird, verliert damit durch das Photobleichen zusehends an Fluoreszenzintensität. Abbildung 1.10 A zeigt den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität einer 10  $\mu\text{M}$  Rhodamin 6G-Lösung unter kontinuierlicher Anregung. Der experimentell ermittelte Zusammenhang zwischen Zeit und Fluoreszenz konnte in diesem Fall mit einer zweikomponentigen exponentiellen Abklingfunktion beschrieben werden, aus welcher sich die mittlere Stabilität des Farbstoffs ableiten lässt. Während das Photobleichen für einige Mikroskopietechniken grundlegende Voraussetzung ist (beispielsweise für FRAP oder STORM), stellt es für den Großteil der Einzelmolekül-Techniken ein limitierendes Phänomen dar. Dies insbesondere dann, wenn einzelne Fluorophore über einen Zeitraum verfolgt werden sollen, welcher in der Größenordnung der mittleren Bleichzeit  $\tau$  liegt.<sup>1</sup> Dabei wird  $\tau$  hier als die Zeitspanne definiert, für die ein *einzelner*

---

<sup>1</sup>In der englischsprachigen Literatur wird für die hier als *Bleichzeit* bezeichnete Zeitspanne oft der Begriff *survival time* verwendet. Die direkte Übersetzung *Überlebensdauer* wird hier nicht eingeführt, um die formale Nähe zum Begriff *Lebensdauer* (z. B. eines elektronischen Zustands) zu vermeiden.





**Abbildung 1.10: Photobleichen eines Emitter-Ensembles und eines einzelnen Fluorophors.** **A** Zeitabhängige, exponentielle Abnahme des Fluoreszenzsignals von Rhodamin 6G in Wasser ( $c=10\ \mu\text{M}$ ) bei kontinuierlicher Laseranregung (Ordinate: Fluoreszenzintensität, Abszisse: Zeit. Abgeändert nach [Eggeling et al., 1998]). **B** Fluoreszenzspur eines einzelnen Atto647N-Moleküls in wässriger Lösung. Der abrupte Übergang von etwa  $22\ \text{counts/ms}$  auf 0 bei  $t=11$  Sekunden stellt den Zeitpunkt des Photobleichens dar. Die Zeitspanne von Beginn der Anregung ( $t=0$ ) bis zum Bleichen wird *Bleichzeit*  $\tau$  genannt (Ordinate: Fluoreszenzintensität, Abszisse: Zeit. Abgeändert nach [Vogelsang et al., 2008]).

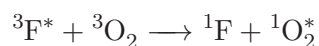
Fluorophor bei *konstanter* Anregung Fluoreszenz emittiert, bevor er bleicht (zur Definition des in dieser Arbeit ermittelten  $\tau_{\Lambda}$  s. Kapitel 2.3.5.1). Zur Verdeutlichung der Bleichzeit zeigt Abbildung 1.10 B das Fluoreszenzdiagramm eines einzelnen Atto647N-Moleküls (das *Fluoreszenzdiagramm* ist hier die graphische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzintensität für einen einzelnen Emitter). Solange der Fluorophor Photonen emittiert, verläuft die Spur im Diagramm bei einem für den Emitter unter den jeweiligen Bedingungen typischen Intensitätswert. Die Schwankung der Spur resultiert aus verschiedenen Rauschquellen, wie z. B. Photonen- oder Ausleserauschen. Der Zeitpunkt des Photobleichens äußert sich dann in einem abrupten Rückgang der Intensität. Das abgebildete Diagramm zeigt einen Emitter, welcher nach einer Bleichzeit  $\tau$  von 11 Sekunden irreversibel bleicht. Ein Prozess, für den eine Beobachtung des Fluorophors von 11 Sekunden ausreicht, hätte mit diesem konkreten Emitter analysiert werden können, ein länger anhaltender Prozess wäre jedoch nicht vollständig abgebildet worden. Das mittlere  $\tau$  eines Fluorophors darf daher bei der Auswahl eines geeigneten Farbstoffs nicht unbeachtet bleiben.

Zahlreiche Studien haben sich mit der Analyse des Photobleichens von Fluoreszenzemittern beschäftigt. Das Feld ist sehr breit, da ein allgemeiner, auf alle Fluorophore übertragbarer Bleichmechanismus nicht existiert und immer wieder neue Farbstoffe oder bereits bekannte Farbstoffe in abgeänderter Umgebung analysiert werden. Das Bleichen eines Fluorophors ist nicht nur ein farbstoffspezifischer Prozess, sondern stark von der Umgebung des Emitters abhängig. Im Folgenden werden einige zum Photobleichen führende Mechanismen beschrieben, um einen Einblick in die in das Phänomen *Photobleichen* zu geben.

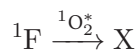
In der Literatur werden häufig die Triplettzustände  $T_n$  der organischen Emitter – in ihrer Eigenschaft als langlebige und gleichzeitig reaktive Zustände (s. Kapitel 1.2.1) – als entscheidende Vorstufen des

Photobleichens diskutiert. Eine generelle Festlegung, welche elektronischen Zustände das Photobleichen begünstigen bzw. sogar initiieren, existiert allerdings nicht [Diaspro et al., 2006]. Xie und Trautmann sprechen sich jedoch in einem 1998 erschienenen Übersichtsartikel zu optischen Studien einzelner Moleküle für eine entscheidende Bedeutung des Triplettzustands aus und nennen zwei grundlegende Mechanismen unter dessen Beteiligung [Xie and Trautman, 1998]:

Zum einen besteht die Gefahr der Fluorophorschädigung durch eine Photooxidation. Bei dieser reagiert der Fluorophor im Triplettzustand (s. Abbildung 1.8) mit gelöstem Sauerstoff. Da dieser im Grundzustand eine Triplett-Multiplizität aufweist, kommt es bei einer Kollision des angeregten Triplett-Fluorophors  ${}^3F^*$  mit Sauerstoff  ${}^3O_2$  zu einer Triplett-Triplett-Annihilation. Diese erfolgt strahlungslos, wobei der Fluorophor in den Grundzustand und der Sauerstoff in einen angeregten Singulettzustand übergeht:



Diese Desaktivierung des Fluorophors wird auch als *physikalische Fluoreszenzlöschung* bezeichnet und stellt an sich noch keine Photoschädigung des Fluorophors dar. Diese vollzieht sich erst im nächsten Schritt: Der aus der Reaktion hervorgegangene Singulett-Sauerstoff besitzt als starkes Oxidationsmittel eine hohe Reaktivität gegenüber Kohlenstoffdoppelbindungen [Wiberg, 2007]. Da organische Chromophore meist auf dem  $\pi$ -Elektronensystem konjugierter Doppelbindungen basieren, überführt die Addition von Singulett-Sauerstoff den Farbstoff in einen nicht-fluoreszenten Zustand  $X$ :



Xie et al. halten fest, dass die Reduktion des Sauerstoffgehalts in der Probe daher üblicherweise die Stabilität des Fluorophors erhöht. Eine entsprechende Beobachtung machten Song und Varma et al. bei der Untersuchung des Bleichverhaltens von Fluorescein: Das in PBS gelöste Fluorescein wies nach einer Bestrahlungsdauer von 60 Minuten eine um etwa 35% höhere Fluoreszenzintensität auf, wenn die Lösung zuvor 15 Minuten lang mit Argon gespült worden war [Song et al., 1996]. Für den zu Fluorescein strukturverwandten Farbstoff Eosin Y konnten sie weiterhin zeigen, dass die *Phosphoreszenz*bande des Lumineszenzspektrums für eine sauerstoffgesättigte Lösung deutlich geringer ausfiel als für die mit Argon gespülte Lösung. Daraus folgerten sie, dass molekularer Sauerstoff den Triplettzustand des Eosin Y, welcher Ausgangspunkt für die Phosphoreszenzemission ist, sehr effektiv löscht ( $T_1 \rightarrow S_0$  strahlungslos, Lebensdauer von  $T_1$  gering), während das Molekül bei geringen Sauerstoffkonzentrationen so lange im Triplettzustand vorliegt, bis die spinverbotene Relaxation unter Emission eines Phosphoreszenzphotons erfolgt ( $T_1 \rightarrow S_0$  strahlend, Lebensdauer von  $T_1$  hoch). Eine vollständige Abwesenheit von Sauerstoff ist demnach ebenfalls nicht günstig, da die hohe Lebensdauer

von  $T_1$  sich negativ auf die Helligkeit des Farbstoffs auswirkt [Vogelsang et al., 2008] oder bei Einzelmolekül-Experimenten störendes Blinken verursachen kann.

Der zweite von Xie et al. vorgestellte Photobleich-Mechanismus ist vor allem für Anwendungen mit hohen Anregungsintensitäten, insbesondere für die 2-Photonen-Anregung, relevant. Dabei wechselwirkt der langlebige Tripletzustand  $T_1$  mit einem weiteren Photon und geht durch die sog. Triplet-Triplet-Absorption in einen höheren Tripletzustand  $T_{n>1}$  über. Von dort aus führen irreversible Reaktionen, wie z. B. die Abspaltung eines H-Atoms, zur Zerstörung des Chromophors. Eggeling et al. stellen in einer Studie zum Bleichverhalten von Fluoreszenzfarbstoffen unter Einzelmolekül-Detektionsbedingungen fest, dass diese sog. 2-Stufen-Photolyse beispielsweise bei den in der konfokalen Mikroskopie zur Detektion einzelner Moleküle üblichen Laserleistungen auftritt und dadurch für komplexe Bleichkinetiken sorgen kann [Eggeling et al., 1998]. Für den Farbstoff Rhodamin 6G berechneten sie, dass ab einer Anregungsintensität von  $10 \text{ kW/cm}^2$  die 2-Stufen-Photolyse den dominierenden Bleichprozess darstellt, betonen aber, dass dieser Wert farbstoffspezifisch sei und keinen allgemeingültigen Schwellenwert darstelle. Anregungsintensitäten in dieser Größenordnung und darüber hinaus finden allerdings auch in der nichtkonfokalen Einzelmolekülmikroskopie Anwendung (vgl. [Yang and Musser, 2006] u. [Ma and Yang, 2010]).

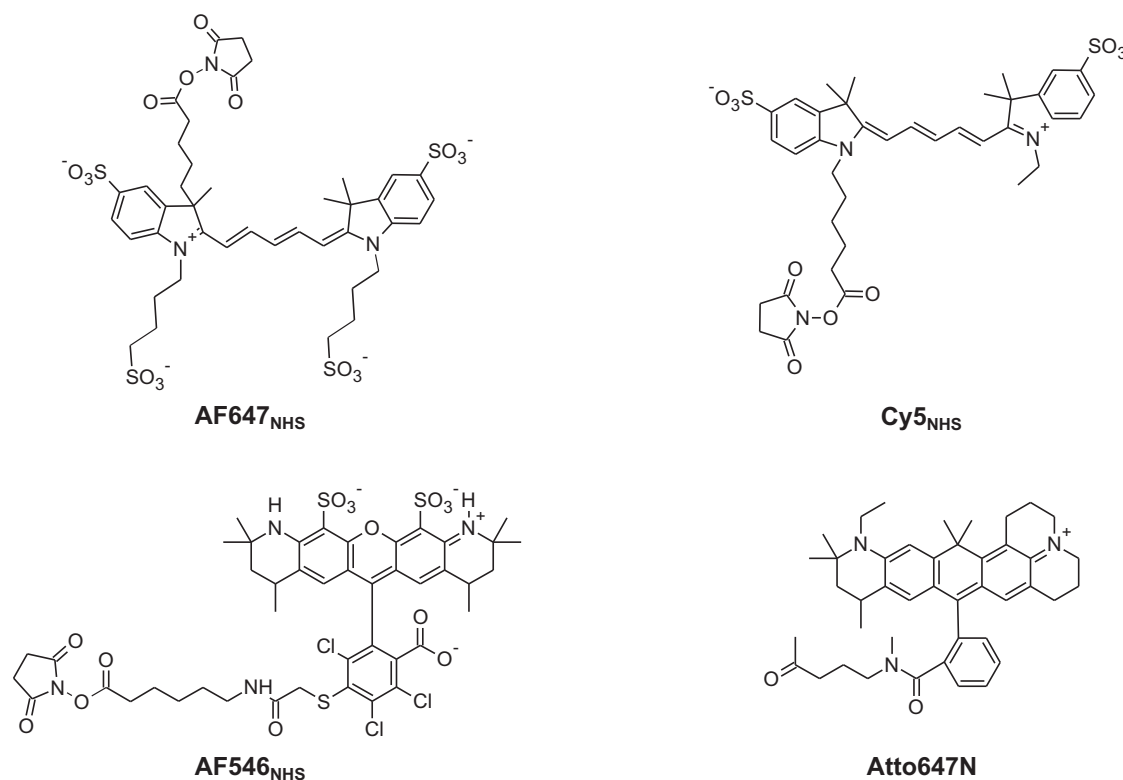
Neben der Reaktion des Fluorophors mit Sauerstoff (D-O-Reaktion) wiesen Song und Hennink et al. in einer 1995 publizierten Studie zur Photobleichkinetik von Fluorescein auf einen weiteren intermolekularen Reaktionstypus hin: die Reaktion eines Fluorophors im Tripletzustand mit einem weiteren Fluorophor im Triplet- oder auch Singulettzustand (D-D-Reaktion). Die Autoren zitieren dabei eine Studie aus dem Jahr 1965, welche für Fluorescein gezeigt hatte, dass die D-O-Reaktion für hohe  $\text{O}_2$ -Konzentrationen und die D-D-Reaktion für hohe Fluorophorkonzentrationen dominiert [Usui et al., 1965]. Vor allem für hohe Farbstoffkonzentrationen, wie sie bei spektroskopischen Experimenten an Fluorophorlösungen in Küvetten vorherrschen, ist demnach der D-D-Typus relevant. In der Mikroskopie liegen die Farbstoffmoleküle jedoch häufig immobilisiert (Immunofluoreszenzen) oder stark vereinzelt (Einzelmolekül-Experimente) vor, sodass D-D-Reaktionen wegen der begrenzten Zahl an Nachbarmolekülen bzw. aufgrund der hohen Verdünnung eine eher untergeordnete Rolle spielen. In solchen Fällen ist von einer Dominanz der D-O-Reaktion auszugehen. Da die  $\text{O}_2$ -Konzentration in luftgesättigter, phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, s. Kapitel B.2.3) etwa  $240 \mu\text{M}$  beträgt [Bier, 2011], während die Fluorophor-Konzentration bei Experimenten zur Verfolgung einzelner Moleküle lediglich im pikomolaren Bereich liegt, erscheint die Annahme von Song und Hennink et al. angesichts des etwa  $10^6$ -fachen Sauerstoff-Überschusses plausibel. Aus diesen Feststellungen leiten die Autoren ab, dass die Ergebnisse aus spektroskopischen Bleichexperimenten sich nicht auf das Verhalten der Fluorophore in der Mikroskopie übertragen lassen. Sie liefern somit einen Grund dafür,

photophysikalische Eigenschaften von Fluorophoren in der für die jeweilige Anwendung relevanten Umgebung zu analysieren. Weiterhin betonen sie, dass die chemische Komplexität und Inhomogenität der in der Mikroskopie analysierten biologischen Systeme unterschiedlichste Photobleichreaktionen ermöglichen und damit äußerst komplexe Bleichkinetiken hervorbringen können. Diese Schlussfolgerung leiten sie aus einer von Benson et al. publizierten Studie ab, in welcher die Autoren das Bleichverhalten von Fluorophoren in fixierten und lebenden Zellen analysierten und räumlich variierende Photobleichraten fanden. Fluorophore in Arealen, welche das Bleichen besonders begünstigen, waren demnach im Fluoreszenzbild unterrepräsentiert [Benson et al., 1985]. Um die intrazelluläre Inhomogenität zu relativieren, empfehlen sie für fixierte Zellen, den Sauerstoffgehalt im verwendeten Medium zu verringern. Experimente an lebenden Zellen setzen meist eine möglichst natürliche Zellumgebung voraus, sodass über das Medium wenig Einfluss auf das Zellinnere zu nehmen ist. Das inhomogene Photobleichen könne daher *in vivo* lediglich durch Verringern der Anregungsintensität nivelliert werden.

Neben Fluorescein wurden zahlreiche andere Farbstoffe auf ihr Bleichverhalten hin untersucht und spezifische Ergebnisse zu ihren photophysikalischen Eigenschaften publiziert. Für den Anwender, welcher entsprechende Daten als Referenz für eigene Experimente verwenden möchte, eignen sich diese jedoch nicht, wenn er beispielsweise mit einem biologischen System arbeitet und lediglich Referenzwerte aus spektroskopischen Küvetten-Experimenten zur Verfügung stehen. Aus den oben genannten Gründen sollte daher immer dann, wenn die Farbstoffeigenschaften einen kritischen Einfluss auf die Aussagekraft der zu erhebenden Daten haben, eine Untersuchungsreihe zum jeweiligen Phänomen – Blinken, Photobleichen, Helligkeit o.ä. – in vergleichbarer Umgebung durchgeführt werden. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Anfertigung einer solchen Reihe für verschiedene Farbstoffe, bei welcher die Fluoreszenz einzelner Farbstoffmoleküle untersucht wurde. Diese befanden sich dabei in Transportpuffer, einem Puffer, welcher Anwendung im von Adam et al. 1990 etablierten *in vitro* System zur Untersuchung des Kerncytoplasmatransports findet 1.1.4. Darüber hinaus wurde einer der Farbstoffe antikörpervermittelt in Lebendzellen immobilisiert und sein dortiges Bleichverhalten untersucht. Die nun folgenden Kapitel gehen auf die untersuchten Fluorophore (Kapitel 1.2.4) und einige Grundlagen zu den Experimenten ein (Kapitel 1.2.5 u 1.2.6).

### **1.2.4 Die untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe**

Die hier untersuchten Farbstoffe wurden für die Analyse ausgewählt, da sie bei der Untersuchung des Kerncytoplasmatransports häufig Anwendung in Einzelmolekül- aber auch Ensemble-Experimenten finden und Erkenntnisse zum Photobleichen daher zukünftig von Nutzen sein können. Zunächst wurden die in den Anfängen der Einzelmolekülspektroskopie als sehr bleichresistent geltenden,



**Abbildung 1.11: Strukturformeln von vier der sechs analysierten Fluoreszenzfarbstoffe.** Die Strukturformeln für die ebenfalls analysierten Farbstoffe Atto647 und Atto655 sind aus patentrechtlichen Gründen nicht publiziert. NHS im Index steht für die Darstellungen des Fluorophors als N-Hydroxysuccinimidester. [Levitus and Ranjit, 2011], [Chiuman and Li, 2007], [Panchuk-Voloshina et al., 1999]

mittlerweile jedoch angesichts der Entwicklung neuer Farbstoffe als wenig bleichstabil zu bewertenden Farbstoffe Cy5 und Alexa Fluor 647 (AF647) in die Reihe der zu analysierenden Farbstoffe aufgenommen. Cy5 wurde beispielsweise für konfokale Ensemble-Experimente zur Markierung von Transportsubstraten (s. Kapitel 1.1.1) verwendet [Ziffels, 2007]. Die Struktur des Farbstoffs ist publiziert und Abbildung 1.11 zu entnehmen. Der mit Cy5 strukturverwandte Farbstoff AF647 fand z. B. in einer Einzelmolkekülstudie zur indirekten Markierung von mRNP-Partikeln Anwendung [Siebrasse et al., 2008] (Struktur von AF647 siehe Abbildung 1.11). Der einzige nicht im roten Bereich des sichtbaren Spektrums emittierende Farbstoff, welcher hier untersucht wurde, ist AF546, der in hier nicht gezeigten Einzelmolekül-Experimenten zur Markierung der Kernmembran verwendet wurde und aus diesem Grund ebenfalls analysiert wurde (s. Abbildung 1.11). Schließlich wurden drei Farbstoffe der Atto-Farbstoffreihe analysiert: Atto647, Atto647N und Atto655. Bei diesen handelt es sich um relativ neue Farbstoffe, für die eine sehr hohe Bleichstabilität und Helligkeit festgestellt wurde und die sich daher für Einzelmolekülstudien besonders eignen (s. z. B. [Veith et al., 2010]). Die Strukturen von Atto647 und Atto655 sind nicht publiziert, für die Struktur von Atto647N s. wiederum Abbildung 1.11, [Eggeling et al., 2009].

Die sechs Farbstoffe wurden in PBS und Transportpuffer (TB) analysiert. Die in PBS zu ermittelnden

Bleichzeiten dienen als Referenzwerte, da es sich bei PBS um einen in den Lebenswissenschaften häufig verwendeten Puffer handelt. Demgegenüber wird das Verhalten der Farbstoffe in Transportpuffer untersucht. TB wird bei Transport-Experimenten in permeabilisierten Zellen verwendet [Adam et al., 1990] und stellt damit eine Umgebung dar, deren Analyse im Hinblick auf die Aussagekraft verschiedener *in vitro*-Experimente zum KCT lohnt. Transportpuffer enthält unter anderem Dithiothreitol (DTT), ein thiolbasiertes Reduktionsmittel. Levitus et al. haben für thiolische Reduktionsmittel festgehalten, dass diese für einige Cyanin-Farbstoffe bereits als Ursache langlebiger Fluoreszenzlöschung identifiziert wurden. Die Vermutung, ein abweichendes Bleichverhalten der Farbstoffe in TB zu beobachten, ist damit nicht unbegründet.

Damit wurden hier die folgenden Farbstoff/Puffer-Kombinationen analysiert:

Cy5/PBS	Cy5/TB
AF647/PBS	AF647/TB
AF546/PBS	AF546/TB
Atto647/PBS	Atto647/TB
Atto647N/PBS	Atto647N/TB
Atto655/PBS	Atto655/TB

Weiterhin sollte exemplarisch für einen der Farbstoffe das Photobleichen *in vivo* analysiert werden: Die Analyse von mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Substraten, beispielsweise Proteinen, Antikörpern oder RNA, erfolgt schlussendlich meist in nativer Umgebung, also *in vivo*. Daher kann die Kenntnis solcher *in vivo*-Farbstoffeigenschaften besonders auch für diese Experimente interessant sein. Die Analyse in lebenden C2C12-Zellen wurde mit Atto655 durchgeführt, der als Farbstoff für Zellexperimente besonders interessant erscheint: In der Laborpraxis hat sich gezeigt, dass sich seine tiefrote Fluoreszenz spektral sehr gut von eventueller Autofluoreszenz trennen lässt und es entstand der qualitative Eindruck einer hohen Photostabilität und Helligkeit – beides sind wichtige Eigenschaften für die nanolokalisierende Einzelpartikelverfolgung.

### **1.2.5 Neutravidin-vermittelte Immobilisierung der Farbstoffe am Deckglas**

Die Analyse der zuvor genannten Fluoreszenzfarbstoffe unter definierten Bedingungen setzt eine Immobilisierung der Moleküle voraus. Diese gewährleistet, dass die Moleküle zum einen nicht aus dem beobachtbaren Volumen diffundieren und zum anderen durch ihre feste Position stets derselben Anregungsleistung ausgesetzt sind. Eine mit präparativ geringem Aufwand verbundene Möglichkeit die Fluorophore mikroskopierfähig zu immobilisieren, ist ihre Adsorption an der Oberfläche eines Deckglases. Dazu wird die Farbstofflösung auf das Deckglas gegeben, zur Anhaftung über einen gewissen Zeitraum darauf belassen und schließlich mit frischem Lösungsmittel abgespült. Für quantitativ auszuwertende Experimente ist diese Methode jedoch mit Nachteilen behaftet: Zunächst erfolgt diese



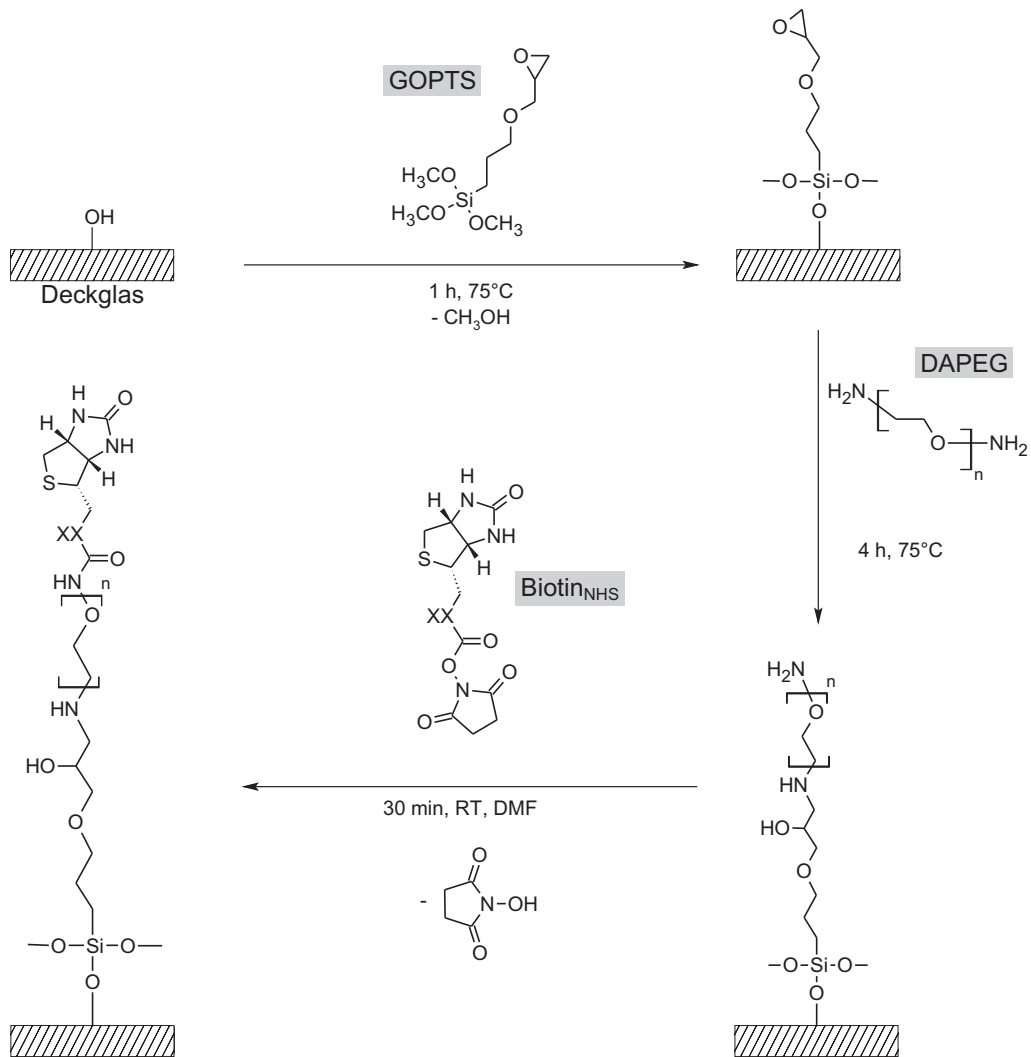
Art der Adsorption unspezifisch. Die Bedingungen, unter denen ggf. eine Desorption erfolgt, sind damit ebenfalls unspezifisch, sodass ein Ablösen der Moleküle im Verlauf des Experiments nicht auszuschließen ist. Weiterhin wurde spekuliert, dass die Adsorption eines Fluoreszenzfarbstoffs an einer Glasoberfläche die Emissionseigenschaften des Fluorophors beeinflusst bzw. die Fluoreszenz sogar vollständig löscht [Huang et al., 2005] [Eggeling et al., 1998].

Um diesen Problematiken zu begegnen, wurde hier eine von Piehler et al. publizierte Oberflächenfunktionalisierung etabliert, welche das durch mehrere Komponenten vermittelte, in den meisten Bindungsschritten kovalente Immobilisieren der Farbstoffmoleküle erlaubt [Piehler et al., 2000]. Abbildung 1.12 zeigt die einzelnen Reaktionen der Funktionalisierung:

In einem ersten Schritt wird die Deckglasoberfläche silanisiert. Das aufgebrachte GOPTS bindet dabei kovalent an das Glas und ermöglicht weitere Reaktionen an der Epoxidgruppe – es fungiert somit als reines Kopplungsagens. Durch Zugabe von DAPEG wird die Epoxidgruppe dann im nächsten Schritt nucleophil geöffnet und das langkettige Polyethylenglykol (PEG) als zweite Komponente der funktionalen Oberfläche gebunden. Diese sog. PEGylierung versieht die Glasoberfläche mit einer etwa 4 nm starken „Schutzschicht“, die sich besonders inert gegenüber der unspezifischen Bindung von Proteinen erweist [Piehler et al., 2000]. Die letzte Reaktion versieht das PEGylierte Deckglas nun mit der eigentlichen Oberflächenfunktion – hier mit einer funktionellen Gruppe, welche die Immobilisierung der Farbstoffe ermöglicht. Dazu wird Biotin in Form eines Aktivesters (hier NHS-Ester) mit der zweiten Aminogruppe des DAPEG umgesetzt. Die Peripherie der Beschichtung weist nun eine hohe Affinität zu Avidin und dessen Homologen Streptavidin (SAv) und Neutravidin (NAv) auf. Piehler et al. geben in ihrer Publikation an, dass die im ersten Schritt der Oberflächenbeschichtung vorgenommene Silanisierung der Deckgläser eine Silan-Dichte von  $1,3 \text{ ng/mm}^2$  liefert. Dies entspricht einer Teilchendichte von  $3,3$  Molekülen pro  $\text{nm}^2$ . Bei einem Durchmesser des Neutravidins von etwa 6 nm sollten demnach bei vollständiger PEGylierung und Biotinylierung (Ausbeute jeweils 100%) ca. 90 Biotinmoleküle je Neutravidin zur Verfügung stehen (bei jeweils 50% Ausbeute wären es immer noch etwa 20 Moleküle). Folglich sollten sich die Farbstoffe, kovalent an Neutravidin gebunden, unter Ausnutzung der hohen Biotin-Neutravidin-Affinität an der Oberfläche immobilisieren lassen (Affinitätskonstante  $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$ , [Wilchek and Bayer, 1988]).

Diese Art der Oberflächenimmobilisierung bietet insgesamt folgende Vorteile:

- Der Farbstoff kann frei rotieren, sodass seine Emissionseigenschaften denen einer freien Diffusion nahe kommen sollte. (zu beachten ist hier allerdings die veränderte Abstrahlcharakteristik von Farbstoffen in Deckglasnähe [Lukosz and Kunz, 1977])
- Die Bindung des NAv-Farbstoffs erfolgt mit hoher Bindungskonstante [Wilchek and Bayer, 1988], sodass eine Dissoziation des Farbstoffs im Verlauf des Experiments nicht zu erwarten ist.



**Abbildung 1.12: Funktionalisieren eines Deckglases zur vermittelten Immobilisierung der Fluoreszenzfarbstoffe.** Die hier gezeigte Reaktionsfolge erlaubt die Herstellung PEGylierter Deckgläser mit einem endständigen Biotin, an welches Neutravidin-Farbstoff-Konjugate, wegen der hohen Bindungskonstante der Avidine zu Biotin, spezifisch und stabil gebunden werden können.



- Die PEG-Schicht schirmt die Glasoberfläche effektiv ab, sodass nur für einen sehr geringen Teil der NAV-Farbstoff-Konjugate eine unspezifische Bindung an die Oberfläche zu erwarten ist [Piehler et al., 2000].

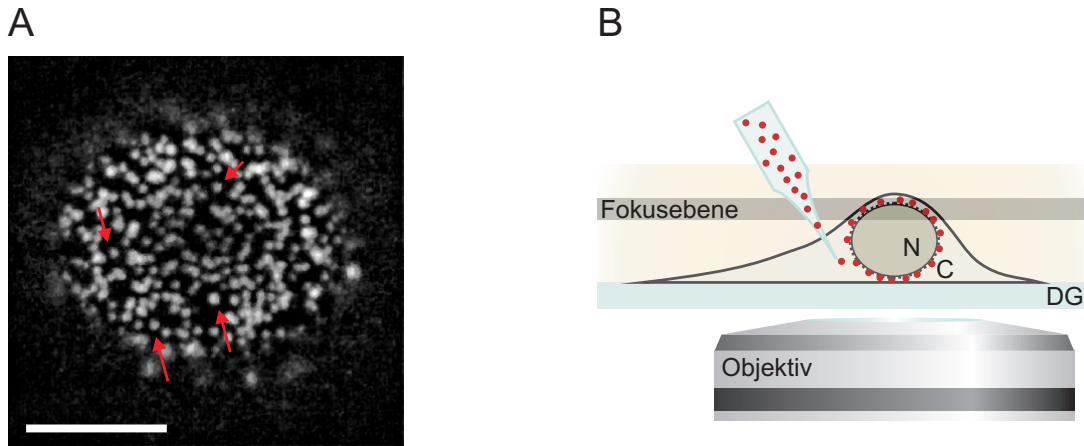
### 1.2.6 Immobilisierung von Atto655 in Lebendzellen

Die Immobilisierung von Atto655 in Lebendzellen soll eine der Deckglasimmobilisierung vergleichbare Anordnung vereinzelter Fluorophore liefern, damit die Auswertung der *in vivo* und *in vitro*-Analysen parallel verlaufen kann und sich die Ergebnisse miteinander vergleichen lassen.

Eine Möglichkeit besteht darin, einen primären, gegen eine immobile, intrazelluläre Struktur gerichteten Antikörper mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und hochverdünnt in die Zelle einzubringen. Anschließend können die durch den Antikörper immobilisierten Farbstoffmoleküle zur Bleichanalyse abgebildet werden. Abbildung 1.13 A zeigt den konfokalen Schnitt durch die Oberseite des mit dem Antikörper mab414 markierten Zellkerns einer permeabilisierten 3T3-Zelle [Kubitscheck et al., 1996]. Bei mab414 handelt es sich um einen gegen verschiedene Kernporenproteine gerichteten Antikörper [Davis and Blobel, 1986] – die Markierung wurde in einer sekundären Immunfluoreszenz von Kubitscheck et al. zur Lokalisierung einzelner Kernporen vorgenommen. Das Prinzip soll hier für die *in vivo*-Bleichanalyse verwendet werden: Atto655-markiertes mab414 soll dazu in vitale C2C12-Zellen injiziert werden, um anschließend das intrazelluläre Photobleichen der am Zellkern immobilisierten Fluorophore abzubilden. Die Skizze in Abbildung 1.13 B zeigt die Konzipierung des *in vivo*-Bleichexperiments, bei welchem die Fokusebene durch die, meist durch Abplattung des Zellkerns recht flächige, Oberseite des Zellkerns verläuft.

## 1.3 Motivation

Die einleitenden Kapitel haben einen Eindruck davon vermittelt, welchen Stellenwert das Verständnis des Kerncytoplasmatransports (KCT) einnimmt. Obwohl viele Interaktionen von am Transportprozess beteiligten Rezeptoren und Adaptern mit molekularbiologischen Methoden aufgeklärt werden konnten, bleiben die Gestalt des Poreninneren und dessen Wechselwirkung mit dem Transportkomplex weitgehend ungeklärt. Erste Studien zur Verfolgung einzelner Transportsubstrate mittels EMFM hatten u.a. Interaktionszeiten für verschiedene Transportrezeptoren hervorgebracht und für einige der Rezeptoren entlang der Transportachse Bereiche erhöhter Aufenthaltsdauer identifizieren können. Um den Prozess jedoch hochaufgelöst abbilden zu können, ist aufgrund der geringen Ausdehnung des NPC eine Lokalisierungsgenauigkeit im einstelligen Nanometerbereich notwendig – die genannten Studien erreichten jedoch lediglich eine Präzision von 20-50 nm.



**Abbildung 1.13: Immobilisierung von Farbstoffen in Lebendzellen.** **A** Konfokaler Schnitt durch die Oberseite eines mit mab<sub>414</sub> markierten Zellkerns (nach [Kubitschek et al., 1996]). Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ , die Pfeile markieren einzelne Signale. **B** Skizze zum *in vivo*-Bleichexperiment: Der kovalent mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper mab<sub>414</sub>, welcher gegen unterschiedliche Kernporenproteine gerichtet ist, wird in Lebendzellen injiziert und bindet dort an die Kernmembran. Zur Abbildung der immobilisierten Fluorophore wird die Zelle so in z-Richtung ausgerichtet, dass die Fokusebene wie gezeigt durch den oberen Bereich des Kerns verläuft. N: Nucleus, C: Cytoplasma, DG: Deckglas.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher im ersten Teil mit der Etablierung von QDots als neuartigen Fluoreszenzmarkern zur Untersuchung des KCT. Diese Halbleiterpartikel verfügen über Eigenschaften, welche sie als Substratmarker interessant machten: Dies sind maßgeblich ihre Helligkeit und Photostabilität. Dabei beruht die hier verfolgte Strategie auf Erkenntnissen aus den Arbeiten [Ziffels, 2007] und [Klaiberg, 2007], in denen die verwendeten QDots Transportkomplexen zu großen Durchmessers hervorbrachten und sich in der Folge als nicht-transportfähig erwiesen:

- Zur Abbildung des Imp $\beta$ 1-vermittelten Transports waren die QDots in [Ziffels, 2007] mit einem NLS-funktionalisierten Trägerprotein umgesetzt worden. Da das NLS nicht mit der Kernpore interagieren kann, mussten das Adapterprotein Imp $\alpha$ 2 und der Rezeptor Imp $\beta$ 1 zugegeben werden, um den Transportkomplex auszubilden. Die Sonden zeigten eine spezifische Bindung an die Membran, waren aber zu groß für einen Import. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit nun durch Binden des Transportrezeptors an den QDot, und damit Verzicht auf NLS und Imp $\alpha$ 2, eine kleinere Transportsonde entstehen.
- Die bisher verwendeten QDots wiesen zur Verbesserung der Biokompatibilität und Partikelstabilisierung eine PEG-Beschichtung auf dem Halbleiterkern auf. Zur Reduktion der Partikelgröße sollte nun auf diese verzichtet werden, ohne dass die QDots ihre Löslichkeit in Puffer verlieren oder eine verstärkte Aggregationstendenz zeigen.
- Des Weiteren sollte die bisher angewandte Vorschrift zur Verknüpfung von QDot und Protein verändert werden, um die Sondengröße weiter zu reduzieren. War bisher ein biotinyliertes Protein an den mit PEG-beschichteten und Streptavidin konjugierten QDot gebunden worden, so sollte hier nun die direkte Bindung von 6xHis-markiertem Transportrezeptor an die QDot-

Oberfläche etabliert werden. Dies sollte unter Erhalt der Rezeptorfunktionalität realisiert werden.

- Abschließend sollte überprüft werden, ob sich eine nach den obigen Gesichtspunkten konstruierte QDot-Sonde in permeabilisierten Zellen als transportfähig erweist und inwieweit eine importfähige Sonde die hochaufgelöste Abbildung des Transportvorgangs zulässt.

Eine erfolgreiche Umsetzung der Strategie könnte das Verständnis der molekularen Vorgänge beim Zellkernimport von Makromolekülen entscheidend vorantreiben. Es würde vor allem aber eine neue Perspektive zur Markierung von Proteinen aufzeigen, die den extremen Ansprüchen einer Nanometer-Lokalisierung und Millisekunden-Auflösung genügt. Die aktuellen organischen Fluoreszenzfarbstoffe stoßen hier aufgrund des Photobleichens an ihre Grenzen.

In der EMFM stellt die Markierung von Substraten mit organischen Fluorophoren nach wie vor das Standardvorgehen dar. Die Versuchsvorschriften hierzu sind etabliert und die kommerziell erhältlichen Fluorophore auf die Reaktion mit Proteinen und die Anwendung in Lebendzellen optimiert. Trotz der permanenten Weiter- und Neuentwicklung der Fluorophore stößt auch die aktuelle Generation der leistungsfähigen Farbstoffe im Bereich der Videomikroskopie an ihre Grenzen – so beispielsweise bei der hochaufgelösten Einzelpartikelverfolgung sehr schneller Prozesse. Hier muss mit hohen Bildwiederholungsraten abgebildet werden, die zur präzisen Lokalisierung sehr hohe Anregungsintensitäten bedingen. Das daraufhin verstärkt einsetzende Photobleichen kann die Aussagekraft der gewonnenen Daten drastisch reduzieren, etwa wenn Bleichen und zu untersuchender Prozess sich auf der gleichen Zeitskala abspielen. Um die diesbezügliche Beurteilung eines Farbstoffs vornehmen zu können, muss dieser geeignet untersucht werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Analyse zweier photophysikalischer Eigenschaften, welche für die Verfolgung von markierten Sonden vorrangig interessant sind: es handelt sich dabei um die Bleichzeit  $\tau$  und die Zahl der insgesamt vom Fluorophor emittierten Photonen  $\mathcal{N}$ . Entsprechende Daten lassen sich für verschiedene Farbstoffe vereinzelt in der Literatur finden. Allerdings wurden diese häufig in wenig anwendungsrelevanter Umgebung gewonnen, da die Fluorophore zur Analyse beispielsweise in ein Polymer eingebettet vorlagen, so dass sie sich nicht zur Beurteilung der Farbstoffleistung im Experiment eignen.

Die hier zu entwickelnde Analysemethode sollte daher folgende Forderungen berücksichtigen:

- Die Farbstoffe sollten sich in beliebigen Puffern oder Medien untersuchen lassen.
- Mittels EMFM sollten die Signale einzelner Farbstoffmoleküle analysiert werden.
- Die Fluorophore sollten spezifisch und stabil an Deckgläschen immobilisiert werden, um eine definierte Beleuchtung jedes Moleküls realisieren zu können.
- Die Farbstoffe sollen bei verschiedenen Anregungsintensitäten  $I$  untersucht werden um  $\tau$  und  $\mathcal{N}$  abhängig von  $I$  darstellen zu können.

Vor der Erhebung von Datensätzen zu  $\tau(I)$  und  $\mathcal{N}(I)$  standen daher zwei methodische Entwicklungen an: Zum einen musste eine geeignete Methode zur Immobilisierung der Farbstoffe etabliert werden, die von überschaubarem Aufwand war, um die effiziente Analyse verschiedener Farbstoffe zu ermöglichen. Zum anderen sollte ein automatisierendes Auswertungsskript erstellt werden, um mit vertretbarem Zeit- und Arbeitsaufwand zu jedem Farbstoff eine ausreichende Anzahl einzelner Molekülen untersuchen zu können. Schließlich sollte die *in vitro*-Analyse auf ihre Anwendbarkeit *in vivo* ausgeweitet werden.

## 2 Methoden

### 2.1 Allgemeines

#### 2.1.1 Zellkultur

Zur Kultivierung der hier verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien wird 1 mL in flüssigem Stickstoff lagernde Zellsuspension aufgetaut und in einer Kunststoffkulturflasche mit 9 mL 37°C warmem Nährmedium versetzt. Die Proliferation findet im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> statt. Passagierung der Zellen erfolgt sobald der Zellrasen etwa 80% des Flaschenbodens bedeckt (etwa alle 2-3 Tage). Dazu wird das Nährmedium abgesaugt, die Zellen mit 10 mL sterilem PBS gewaschen und mit 0,5 mL einer Trypsin/EDTA-Lösung 2 min bei 37°C inkubiert. Die angedauten Zellen werden mit 9,5 mL Nährmedium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung in neuen Kulturflaschen in insgesamt 10 mL Nährmedium ausgesät. Die Subkultivierung erfolgt etwa bis zur 20. Passage.

Für fluoreszenzmikroskopische Experimente werden die Zellen ein oder zwei Tage vorher in geeigneter Verdünnung ausgesät. Dabei werden für Einzelmolekül-Beobachtungen ausschließlich Matekschalen zur Kultivierung verwendet, für konfokale Ensemble-Beobachtungen kommen auch einfache Deckgläschen zum Einsatz.

#### 2.1.2 Gelchromatographie

Bei der Markierung von Proteinen mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen (vgl. Kapitel 2.3.1) erfolgt meist keine vollständige Umsetzung des Farbstoffs. Da freier Farbstoff gerade bei der Untersuchung von Prozessen auf Einzelmolekülebene stört, muss dieser nach Ablauf der Reaktionszeit von markiertem Protein abgetrennt werden. Hierzu genügt bei ausreichender Reinheit des Ausgangsproteins die Trennleistung einer selbstgepackten Säule aus Bio Gel p6 DG:

1,5 g Bio Gel P6 DG wird in 20 mL PBS aufgequollen und ein 7 cm hohes Gelbett mit 1 cm Durchmesser gegossen. Das Reaktionsgemisch wird auf das Gelbett pipettiert und das markierte Protein mit etwa 5 mL PBS in der ersten farbigen Bande eluiert. Die Abwesenheit von freiem Farbstoff wird mittels SDS-PAGE nachgewiesen.

### **2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Analyse von Proteinen oder Proteingemischen erfolgt durch SDS-PA-Gelelektrophorese. Dazu wird abhängig von der Proteingröße ein 10%iges (für  $\sim 100$  kDa-Proteine) oder 15%iges (für  $\sim 20$  kDa-Proteine) Polyacrylamid-Trenngel gegossen und mit einem die Probenaschen enthaltenden 5%igen Sammelgel versehen. In die Probenaschen wird ein 1:1-Gemisch aus zu analysierender Lösung und Probenpuffer aufgetragen, welches zuvor 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  erhitzt worden ist. Als Laufpuffer diente Tris-Glycin-Puffer. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgt bei 90 V, die anschließende Auftrennung im Trenngel bei 120 V. Soll der Erfolg einer Markierungsreaktion bzw. der anschließenden Aufreinigung begutachtet werden, so wird das Gel an dieser Stelle bereits im UV-Licht betrachtet. Das markierte Protein und ggf. freier Farbstoff können anhand der Fluoreszenz meist gut ausgemacht werden. Zur Färbung der Proteinbanden wird das Gel schließlich etwa 2 h in Coomassie-Färbelösung und dann 2 h in Gelentfärbelösung geschüttelt. Die Dokumentation des Gels erfolgt per Digitalfotografie.

### **2.1.4 Zellmanipulation *in vitro* und *in vivo***

#### **2.1.4.1 Permeabilisieren adhärenter Säugerzellen**

Bei der hier verwendeten Permeabilisierung von Zellen wird die Plasmamembran durch Einwirken einer Digitonin-Lösung für Substrate durchlässig gemacht [Adam et al., 1990]. Die auf einem Deckglas vorliegenden Zellen werden dazu 3 mal mit je 1,5 mL eiskaltem TB (s. Kapitel B.2) gewaschen, dann 4 min mit 1 mL des zu  $33\ \mu\text{M}$  in TB gelösten Digitonin (s. Kapitel B.1) behandelt und schließlich wie zuvor gewaschen. Die Zellen werden unmittelbar danach für fluoreszenzmikroskopische Experimente verwendet.

Für Ensemble-Messungen mit permeabilisierten Zellen müssen Konzentrationen der beteiligten Rezeptoren und Substrate im  $\mu\text{M}$ -Bereich eingesetzt werden. Um dabei mit möglichst geringen Volumina arbeiten zu können, wird für solche Experimente eine Minikammer verwendet. Zur deren Herstellung werden zwei Stücke trägerloses, doppelseitiges Klebeband (je  $2 \times 1\ \text{cm}^2$ ) aufeinander geklebt, mittig gelocht und auf einen Objektträger geklebt. Die so gefertigte Vertiefung kann mit  $7\ \mu\text{L}$  der zu untersuchenden Lösung gefüllt werden bevor sie mit dem Deckglas, welches die permeabilisierten Zellen enthält, abgedeckt wird. Zur Verwendung am inversen konfokalen Mikroskop kann die Kammer problemlos mit dem Deckglas nach unten auf dem Objektisch platziert werden.

Einzelmolekül-Experimente kommen mit geringen Substratkonzentrationen aus und können daher auf Matekschalen (s. B.7) mit einem Lösungsvolumen von etwa  $500\ \mu\text{L}$  durchgeführt werden.

#### 2.1.4.2 Mikroinjektion adhärenter Säugerzellen

Das Einbringen eines Substrats in Zellen mittels Mikroinjektion erlaubt gegenüber der Verwendung von permeabilisierten Zellen eine Substratanalyse im lebenden System. Die Mikroinjektion wird mit einem Mikromanipulator (InjectMan NI2, Eppendorf AG) und Mikroinjektor (FemtoJet, Eppendorf AG) durchgeführt. Das Deckglas mit den zu injizierenden Zellen wird zunächst in eine dafür vorgesehene Deckglashalterung gespannt und mit 500  $\mu\text{L}$  des jeweiligen für die Mikroinjektion modifizierten Zellmediums überschichtet (s. Kapitel B.2.2). Alternativ können auch auf Matekschalen ausgesäte Zellen verwendet werden. Die Mikroinjektionsnadel (FemtotipsII, Eppendorf AG) wird mit 5  $\mu\text{L}$  einer etwa 5  $\mu\text{M}$  Lösung des zu untersuchenden Substrats befüllt und am Manipulator befestigt. Das Substrat kann nun entweder per Knopfdruck mit zuvor eingestelltem Injektionsdruck für die gewählte Injektionsdauer automatisch injiziert oder durch manuelle Injektion über den permanent anliegenden Haltedruck in die Zelle eingebracht werden. Optimale Werte für Haltedruck, Injektionsdruck und Injektionsdauer lassen sich nicht angeben, da sie abhängig von Substrat, verwendetem Puffer und Zelltyp variieren. Richtwerte sind für die erste Variante ein Haltedruck  $p_c \approx 15 \text{ hPa}$ , ein Injektionsdruck  $p_i \approx 50 \text{ hPa}$  und eine Injektionszeit  $t_i \approx 0,3 \text{ s}$  für die zweite Variante muss der Haltedruck auf  $p_c \approx 50 \text{ hPa}$  erhöht werden,  $p_i$  und  $t_i$  sind dabei irrelevant. Für Ensemble-Experimente wird dem Substratgemisch fluoreszenzmarkiertes BSA als Dichtigkeitskontrolle beigeetzt, mit deren Hilfe sich leicht feststellen lässt, ob der Kern bei der Injektion beschädigt wurde (näheres dazu in Kapitel 2.1.4.3).

#### 2.1.4.3 Kontrolle der Kerndichtigkeit

Bei der Permeabilisierung von Zellen (s. Kapitel 2.1.4.1) sowie auch bei der Mikroinjektion (s. Kapitel 2.1.4.2) können immer auch Zellkerne beschädigt werden, die für die Analyse des Kerncytoplasma-transportes nicht aussagekräftig sind und daher aussortiert werden müssen. Daher muss parallel zum zu untersuchenden Protein stets eine Kern-Dichtigkeitskontrolle vorliegen. Hierzu kann ein bezüglich des Transports als inert anzusehendes Protein in fluoreszenzmarkierter Form auf die Zellen gegeben werden. Dieses Kontrollprotein sollte ein Molekulargewicht von mindestens 60 kDa aufweisen, da dann gewährleistet ist, dass es nicht diffusiv in den Zellkern gelangen kann [Ribbeck and Görlich, 2001]. Ist also im Verlauf des Experiments festzustellen, dass das Kontrollprotein in den Kern eindringt, so muss davon ausgegangen werden, dass der Zellkern beschädigt ist, da dem Kontrollprotein aufgrund seiner Größe der Weg durch den Kernporenkomplex verwehrt ist und es nur bei Beschädigung in den Kern gelangen kann. Für die hier durchgeführten Ensemble-Experimente wird BSA als Dichtigkeitskontrolle in jeweils zum Experiment korrespondierender Fluoreszenzmarkierung verwendet, so dass sich das Signal des zu untersuchenden Proteins durch geeignete Filterwahl von dem der Dichtigkeitskontrolle



spektral trennen lässt.

## 2.1.5 Fluoreszenzmikroskope

### 2.1.5.1 Konfokales Fluoreszenzmikroskop

Alle konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden am Laserscanningmikroskop *LSM 510 Meta* der Carl Zeiss AG angefertigt. Dies betraf Experimente, bei denen keine Einzelmolekül-Sensitivität erforderlich oder gewünscht war und die daher im Folgenden auch als *Ensemble-Experimente* bezeichnet werden. Der Mikroskopaufbau verfügt über eine Mikroinjektionsanlage der Firma Eppendorf (s. Kapitel 2.1.4.2).

### 2.1.5.2 Einzelmolekül Fluoreszenzmikroskop (EMFM)

Das hier verwendete EMFM stützt sich auf das inverse Stativ *Axiovert 200* (Carl Zeiss AG). Es verfügt über eine speziell angefertigte Lasereinkopplung, welche durch die Verwendung eines elektronisch steuerbaren akustooptischen Filters (AOTF) zum einen die wellenlängenabhängige Schaltung der drei zur Verfügung stehenden Laser (488nm, 532nm, 640nm) ermöglicht und zum anderen eine stufenlose Intensitätsanpassung des Anregungsstrahls erlaubt. Die elektronische Lasersteuerung gibt dazu eine Spannung zwischen 0 V und 10 V an die AOTF-Steuereinheit weiter, welche den auftreffenden Strahl entsprechend mit einer Leistung von 0 % bis 100 % der Eintrittsleistung passieren lässt. Vor der Einkopplung in das Mikroskop wird der selektierte Laserstrahl über ein Teleskop aufgeweitet, um durch eine in den Strahlengang eingebrachte Irisblende in seiner x/y-Ausdehnung variabel zu sein. Dadurch ist es möglich den auf der Probe beleuchteten Bereich an das Kameragesichtsfeld anzupassen und damit eine Bestrahlung der Probe außerhalb des Gesichtsfelds zu vermeiden.

Das Fluoreszenzlicht wurde bei den meisten Messungen mit einem 100-fach vergrößernden Ölimmersionsobjektiv ( $\alpha$  Plan-Fluar NA 1,45, Carl Zeiss AG) gesammelt. Es fand allerdings auch ein 63-fach vergrößerndes Ölimmersionsobjektiv (Plan-Apochromat NA 1,40, Carl Zeiss AG) Anwendung. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird über einen Hauptfarbteiler von der Anregungsstrahlung getrennt, passiert einen auf die Anregungswellenlänge abgestimmten Notchfilter und eine 4-fach vergrößernde Optik bevor es auf die EMCCD-Kamera trifft. Hier standen zwei Kameras zur Auswahl: Zum einen eine iXon<sup>EM</sup>+ DU-897D-Coo-BV (Andor), die mit 512x512 Pixel ein relativ großes Gesichtsfeld bietet und über einen linearisierten EM-gain verfügt und zum anderen eine iXon DV-860DCS-BV (Andor) deren 128x128 Pixel-Chip eine zeitlich sehr hochaufgelöste Detektion ermöglicht. Die beiden Kameras werden über Peltier-Elemente auf mindestens -80 °C gekühlt. Um unnötiges Photobleichen in der Probe zu verhindern, kommunizieren beide Kameras jeweils mit dem AOTF, um die Lasereinkopplung



Abkürzung	Filter
ec	Enhance Contrast
gam	Gamma Korrektur
gb	Gaussian Blur
med	Median
sb	Subtract Background
sub	Subtract

**Tabelle 2.1: Abkürzung der zur Bearbeitung der Bilder in ImageJ angewendeten Operationen.**

so steuern zu können, dass lediglich während der Belichtungszeiten Strahlung auf die Probe fiel. Jeweils während der Auslesezeit des Chips regelte der AOTF die Intensität vollständig herab. Der Mikroskopaufbau verfügt zudem über eine Mikroinjektionsanlage der Firma Eppendorf (s. Kapitel 2.1.4.2), die es ermöglicht Lebendzellen unmittelbar nach Injektion eines Substrats abzubilden.

### 2.1.6 Bildbearbeitung

Die hier gezeigten Mikroskopaufnahmen wurden, falls nicht anders angegeben, mit dem Bildverarbeitungs- und Bildanalyseprogramm *ImageJ* bearbeitet (s. B.6). Dabei enthalten die Bildunterschriften im folgenden Text die Abkürzungen der verwendeten Filter mit zugehörigem Argument in der Form *Filter[Argument]* in der angewendeten Reihenfolge. Tabelle A.6 schlüsselt die Abkürzungen auf.

## 2.2 Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT

### 2.2.1 Gewinnung von Imp $\beta$ 1 durch Überexpression in *E. coli*

100 mL 2YT-Medium werden mit ca. 1  $\mu$ L der Kryokultur, 100  $\mu$ L Ampicillin und 100  $\mu$ L Kanamycin versetzt und bei 37 °C und 150 rpm über Nacht geschüttelt. 50 mL dieser Startkultur wird zusammen mit 1 mL Ampicillin und 1 mL Kanamycin in 1 L 2YT-Medium überführt und bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Bei Erreichen von  $OD_{600}=0,8$  erfolgt die Induktion durch Zugabe von 1 mL 1 M IPTG. Die Bakterien werden nach weiteren 4 h bei 37 °C und 150 rpm abgeerntet, die Pellets in wenig ILP resuspendiert und zusammengeführt. Die Lyse erfolgt auf Eis durch 5-maliges Sonifizieren der Suspension für je 5 min und 4 min Pause. Nach Abzentrifugieren des Lysats wird der Überstand zur Isolation des Proteins für 1 h bei 4 °C zu 1,5 mL zuvor mit ILP gewaschenem TALON-Harz gegeben. Anschließend wird das Harz 3 mal mit 50 mL ILP gewaschen und das Protein mit folgendem Imidazol-Gradienten eluiert: 2 x 1 mL 20 mM Imidazol in ILP, 2 x 1 mL 50 mM Imidazol in ILP, 3 x 1 mL 100 mM Imidazol in ILP und 1 x 1 mL 200 mM Imidazol in ILP. Die Analytik der das Protein enthaltenden Fraktionen erfolgt mittels SDS-PAGE. Zur Lagerung werden alle Imp $\beta$ 1 enthaltenden Fraktionen

vereint, über Amicon-Zentrifugenfilter in ILP umgepuffert, aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **2.2.2 Markierung von Imp $\beta$ 1 mit QD600**

Bei der Markierung von Imp $\beta$ 1 (s. Kapitel B.3) mit QD600 (s. Kapitel B.4) wird die Affinität der 6xHis-Aufreinigungssequenz des Proteins zu zweiwertigen Metallionen der QD-Oberfläche ausgenutzt [Clapp et al., 2006]. Zur Anlagerung des Proteins werden 20  $\mu\text{L}$  der 1  $\mu\text{M}$  QD600 Stammlösung (pH 10-11) mit 20  $\mu\text{L}$  des zu 17  $\mu\text{M}$  in TB (s. Kapitel B.2) gelösten Imp $\beta$ 1 versetzt und 1 h zur Reaktion bei RT belassen. Anschließend werden die QD600-Imp $\beta$ 1 unmittelbar für das jeweilige Experiment verwendet.

### **2.2.3 Markierung von GFP mit QD600**

Bei der Markierung von GFP (s. Kapitel B.3) mit QD600 (s. Kapitel B.4) wird die Affinität der 6xHis-Aufreinigungssequenz des Proteins zu zweiwertigen Metallionen der QD-Oberfläche ausgenutzt [Clapp et al., 2006]. Zur Anlagerung des Proteins werden 15  $\mu\text{L}$  der 1  $\mu\text{M}$  QD600 Stammlösung (pH 10-11) mit 1,5  $\mu\text{L}$  des zu 290  $\mu\text{M}$  in TB (s. Kapitel B.2) gelösten GFP versetzt und 1 h zur Reaktion bei RT belassen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zur Entfernung des überschüssigen GFP durch 2-maliges Waschen mit je 200  $\mu\text{L}$  TB in einem Microcon-Ultrazentrifugenfilter (30 kDa) umgepuffert.

### **2.2.4 Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten C2C12-Zellen**

Die Funktionalität des bereits markiert vorliegenden Importrezeptors Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten Zellen (s. Kapitel 2.1.4.1) wird folgendermaßen überprüft: 3,2  $\mu\text{L}$  Imp $\beta$ 1-Cy5 (Stammkonzentration etwa im  $\mu\text{M}$ -Bereich) werden zunächst mit 0,5  $\mu\text{L}$  BSA-AF488 (11  $\mu\text{M}$ ) und 3,8  $\mu\text{L}$  TB versetzt, bevor dieses Substratgemisch in eine Minikammer pipettiert und mit den unmittelbar zuvor permeabilisierten C2C12-Zellen (s. Kapitel B.5) inkubiert wird. Die Verteilung des markierten Importrezeptors in den Zellen wird anschließend konfokal zu verschiedenen Zeitpunkten bis insgesamt 30 min nach Zugabe des Substratgemischs dokumentiert.

### **2.2.5 QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen**

Nachdem die QD600 wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben mit Imp $\beta$ 1 funktionalisiert worden sind, wird ihr Verhalten in permeabilisierten Zellen zunächst im Ensemble-Experiment konfokal untersucht (s. Kapitel 2.1.5.1). Dazu werden 8  $\mu\text{L}$  der QD600-Imp $\beta$ 1 (0,5  $\mu\text{M}$ ) mit 2  $\mu\text{L}$  BSA-AF488 (11  $\mu\text{M}$ ) und 10  $\mu\text{L}$  TB gemischt, bei 8.000xg und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert und in einer Minikammer zu den permeabilisierten C2C12-Zellen gegeben (s. Kapitel 2.1.4.1 und B.5). Eine Betrachtung der Zellen

erfolgt am konfokalen Mikroskop, bei simultaner Anregung von BSA-AF488 und QD600-Imp $\beta$ 1 mit 488 nm.

Für die entsprechenden Einzelmolekül-Experimente werden dieselben QD600-Imp $\beta$ 1 1:1000 in TB verdünnt (finale Konzentration von etwa 0,5 nM) und auf permeabilisierte C2C12-Zellen gegeben. Die Zellen werden im unmittelbaren Anschluss am EMFM untersucht (s. Kapitel 2.1.5.2) und bei Anregung mit 488 nm mit dem 63-fach vergrößernden Objektiv und Aufnahmezeiten von 50 Hz, 100 Hz und 460 Hz auf die EMCCD-Kamera abgebildet (hier: iXon DV-860DCS-BV). Zu jedem untersuchten Zellkern wird zudem ein Durchlichtbild aufgenommen, welches den Verlauf der Kernmembran dokumentiert und für eine ungefähre Lokalisierung der QDots relativ zur Kernmembran verwendet wird. Die Zellen werden mindestens 30 min beobachtet.

### 2.2.6 QD600-GFP in permeabilisierten C2C12-Zellen

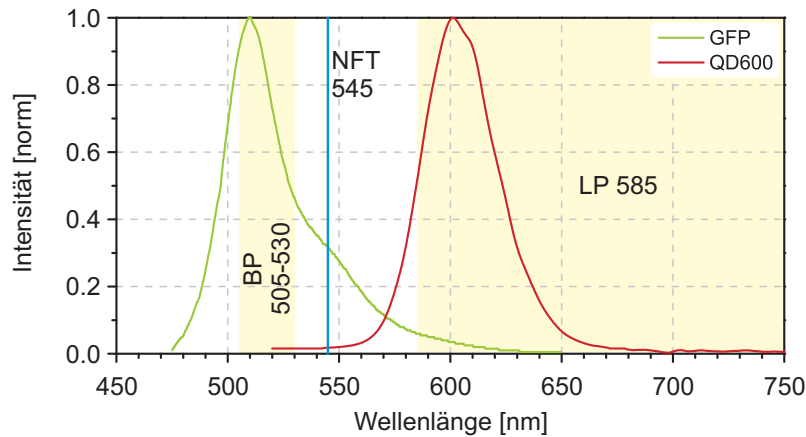
Nachdem die QD600 wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben mit GFP umgesetzt worden sind, wird ihr Verhalten in permeabilisierten Zellen im Ensemble-Experiment konfokal untersucht. Dazu werden 7  $\mu$ L der in TB umgepufferten QD-GFP in einer Minikammer mit permeabilisierten C2C12-Zellen zusammengeführt (s. Kapitel 2.1.4.1). Die Anregung der QD- bzw. GFP-Fluoreszenz erfolgt simultan bei 488 nm.

Da bei diesem Experiment im weiteren Verlauf eine qualitative Kolo-kalisierung vorgenommen werden soll (s. Kapitel 3.1.3), wird im Folgenden kurz auf die verwendeten Filtereinstellungen eingegangen: Um die Emission der QD600 von der des GFP spektral zu trennen, werden diese durch einen dichroitischen Spiegel bei 545 nm (NFT 545) jeweils auf einen der beiden Detektionskanäle gelenkt. Vor den Detektoren befinden sich zur weiteren Filterung ein Bandpassfilter 505-530 nm (BP 505-530, GFP-Kanal) zum anderen ein Langpassfilter 585 nm (LP 585, QD-Kanal). Abbildung 2.1 zeigt die Emissionsspektren der QD600 (spektrometrisch vermessen) und des GFP (abgeändert aus *Fluorescence Spectra Viewer, life technologies*<sup>1</sup>) und gibt auch die von den jeweiligen Filtern transmittierten Wellenlängenbereiche wieder. Der NFT 545 ist als blaue Linie dargestellt, BP 505-530 und LP 585 jeweils als gelb hinterlegte Bereiche. Mit diesen Einstellungen ist eine Trennung beider Fluoreszenzsignale möglich.

### 2.2.7 MSD-Analyse der QDot-Proben zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers

Zur Analyse des mittleren Verschiebungsquadrats (MSD) der QDot-Proben werden diese folgendermaßen vorbereitet:

<sup>1</sup>[www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html).



**Abbildung 2.1: Emissionsspektren der QD600 und von GFP und die im Experiment verwendeten Filter.** Dargestellt ist das Emissionsspektrum der QD600 (rot) und das von GFP (grün). Um die Güte der spektralen Trennung der beiden Fluoreszenzsignale beurteilen zu können, sind zusätzlich die im Experiment verwendeten Filter eingezeichnet (s. Text).

- QD600 bei pH 7,0: Die Stammlösung der QD600 wird zu einer finalen Konzentration von 120 pM in PBS (pH-Wert 7,0) verdünnt.
- QD600-Impf $\beta$ 1: Die nach Kapitel 2.2.2 hergestellten Partikel werden 1:8.000 in PBS (pH-Wert 7,0) verdünnt.

Die einzelnen Lösungen werden auf Matekschalen gegeben und am EMFM mit einer Bildwiederholungsrate von 460 Hz, bei Anregung mit 488 nm abgebildet. Es werden von jeder Probe 40 Filme mit jeweils 500 Bildern aufgenommen.

Zur Bestimmung der Partikelpositionen und Trajektorien werden die Filme mit DiaTrack 3.03 PRO (s. Kapitel B.6) analysiert. Die Bestimmung der Partikelpositionen erfolgt im Modus „High Precision“, für das Tracking wird eine maximale Sprungweite von 20 Pixeln vorgegeben. Details zum Einzelpartikeltracking und der Ermittlung der MSD sind der Dissertation [Veith, 2011] zu entnehmen. Dort findet sich insbesondere das Vorgehen zur Vermeidung der Übergewichtung vereinzelter, sehr langer Trajektorien (üblicherweise von langsamen Aggregaten stammend), wie es hier Anwendung findet. Die Auswertung der Trajektorien erfolgt in Origin 8.0 Pro (s. Kapitel B.6). Dazu werden die MSD gegen die Zeit aufgetragen und folgende Funktion angefitet:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt \quad (2.1)$$

Mit  $\langle r^2 \rangle$ : MSD;  $D$ : Diffusionskoeffizient,  $t$ : Bildfolgezeit (reziproke Bildwiederholungsrate). Der Steigung des Linearfits kann dann der Diffusionskoeffizient  $D$  entnommen werden, aus dem sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung schließlich der mittlere hydrodynamische Durchmesser  $d_h$  berechnen

lässt:

$$d_h = 2 \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.2)$$

Darin sind:  $k_B$ : Boltzmann-Konstante;  $T$ : absolute Temperatur;  $\eta$ : Viskosität des Lösungsmittels.

## 2.3 Photobleichen einzelner immobilisierter Fluoreszenzfarbstoffe

### 2.3.1 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

#### 2.3.1.1 Einfach-Markierung von Neutravidin

Die Markierung von Neutravidin mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen soll mit einer mittleren Markierungsrate von einem Farbstoffmolekül pro Neutravidin erfolgen. Daher wird Neutravidin in den Markierungsreaktionen bezüglich des Farbstoffs in geringem molarem Überschuss eingesetzt. Zunächst werden 500 µg (8,3 nmol) Neutravidin eingewogen und in 200 µL 0,1 M Natriumhydrogencarbonat Puffer bei pH 8,5 gelöst. Diese Lösung wird mit 7,5 nmol des als NHS-Ester vorliegenden Fluoreszenzfarbstoffes versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 3,5 h bei RT belassen, alle 30 min geschwenkt und schließlich größenchromatographisch aufgetrennt (s. Kapitel 2.1.2). Auf diese Weise wird Neutravidin mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert: Cy5, AF546, AF647, Atto647, Atto647N, Atto655.

#### 2.3.1.2 Einfach-Markierung von mAb414

Zur Markierung von mAb414 mit im Mittel einem Farbstoff pro Antikörper werden 45 µL der 7 µM Antikörper-Lösung (*Covance*) mit 3 µL einer 100 µM Atto655-NHS-Ester Lösung versetzt, vorsichtig durchmischt und 2 h bei RT belassen. Das Reaktionsgemisch wird dann in einem speziellen Zentrifugenfilter (*Dye Removal Column*) aufgereinigt. Vorbereitet wird der Filter durch Zugabe von 100 µL Trennharz und Entfernen des Lagerungspuffers durch Zentrifugation. Das Reaktionsgemisch wird mit 50 µL PBS verdünnt, auf das Harz aufgetragen und kräftig durchmischt. Zentrifugation des Filters für 30 sec mit 1.000 g liefert die vom überschüssigem Farbstoff befreite Antikörper-Lösung, welche zu 5 µL-Aliquots bei -80 °C gelagert wird.

### 2.3.2 Aufnahme von Absorptions-, Emissions- und Transmissionsspektren

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgt am UV/Vis Spektrometer Lambda 35 (Perkin Elmer). Die zu untersuchenden Neutravidin-Farbstoff-Varianten werden in µM Verdünnung in PBS-Puffer vorgelegt und in einer 30 µL fassenden Ultra-Mikroküvette (Hellma) vermessen.

Die Aufnahme der Emissionsspektren der Neutravidin-Farbstoff-Varianten und der QD600 wird am Fluoreszenzspektrometer LS55 (Perkin Elmer) vorgenommen. Die Proben werden in µM Verdünnung

in PBS-Puffer vorgelegt und in einer 30  $\mu\text{L}$  fassenden Ultra-Mikroküvette (Hellma) mit einer Wellenlängenabtastrate von 500 nm/min vermessen. Anregung erfolgt jeweils mit der Wellenlänge maximaler Absorption, die den Absorptionsspektren (s. o.) entnommen wird.

Zur Messung der Transmission der dichroitischen Spiegel werden diese im Filterwürfel belassen und vor dem Strahlaustrittsfenster des Spektrometers positioniert ( $45^\circ$ -Orientierung bezüglich Strahlengang). Die Transmission der Notchfilter wird ermittelt, indem diese unmittelbar vor dem Strahlaustrittsfenster des Spektrometers fixiert und dann im interessierenden Wellenlängenbereich abgetastet werden. Für sämtliche Spektren wird der Wellenlängenbereich mit einer Abtastrate von 480 nm/min abgefahren.

### **2.3.3 Biotin-Neutravidin vermittelte Immobilisierung der Farbstoffmoleküle**

#### **2.3.3.1 Herstellung PEGylierter Deckgläser**

Zur Herstellung von PEG-funktionalisierten Deckgläsern (PEGylierte DG) werden Deckgläser der Stärke 1,5 mit den Maßen 18 mm x 18 mm verwendet. 20 DG werden dazu zunächst jeweils in der rechten oberen Ecke mit einem Diamantstift fortlaufend nummeriert, um im Verlauf die zu funktionalisierende Deckglasseite identifizieren zu können (*Oberseite*). Daraufhin werden die markierten DG zur Reinigung der Oberfläche für 2 h bei RT in eine frisch hergestellte Mischung aus 2 Volumenteilen Schwefelsäure 96 % und 1 Volumenteil Wasserstoffperoxid 30 % gelegt. Die DG werden anschließend mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Reaktion mit dem bifunktionellen Silan wird nun die eine Hälfte der DG auf der Oberseite mit jeweils ca. 10  $\mu\text{L}$  (3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan (GOPTS) benetzt und mit je einem DG der verbleibenden Hälfte so abgedeckt, dass auch dessen Oberseite dem GOPTS-Film zugewandt ist. Die kovalente Verknüpfung des Silans mit der Glasoberfläche erfolgt anschließend für 1 h bei  $75^\circ\text{C}$ . Die Deckgläser werden dann einzeln mit Aceton gespült um ungebundenes GOPTS zu entfernen und im Stickstoffstrom getrocknet. Hiernach wird auf die Oberseiten von 10 DG je eine Spatelspitze  $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$  (DAPEG) gegeben, bevor sie mit jeweils einem der verbleibenden 10 DG Oberseite auf Oberseite abgedeckt werden. Nach 5 min bei  $75^\circ\text{C}$  hat sich das DAPEG zwischen den beiden DG zu einem Film verflüssigt, so dass sämtliche Luftbläschen durch Druck zu den Rändern herausgeschoben werden können. Die vollständige Reaktion findet schließlich für 4 h bei  $75^\circ\text{C}$  statt. Die so PEGylierten DG werden nun voneinander getrennt, einzeln in Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Lagerung der PEGylierten DG erfolgt in mit Parafilm versiegelten Kunststoffschalen bei  $-20^\circ\text{C}$ .

### **2.3.3.2 Biotinylierung PEGylierter Deckgläser**

Zur Biotinylierung von 6 PEGylierten DG wird mit der Spitze einer Glas-Pasteurpipette bis zu einer Füllhöhe von 2 mm Biotin-NHS aufgenommen und in 70  $\mu\text{L}$  DMF gelöst. Drei der PEGylierten DG werden auf der Oberseite mit je 10  $\mu\text{L}$  dieser Lösung benetzt und mit je einem der verbleibenden DG Oberseite auf Oberseite abgedeckt. Nach Reaktion für 30 min bei RT werden die biotinylierten DG in DMF gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und in mit Parafilm versiegelten Kunststoffschalen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.3.3.3 Immobilisierung von Neutravidin-Farbstoffkonjugaten auf biotinylierten Deckgläsern**

Das Neutravidin-Farbstoff-Konjugat wird, wenn nicht anders erwähnt, zu einer finalen Konzentration von 2 nM in PBS verdünnt. 50  $\mu\text{L}$  dieser Lösung werden für 5 s mittig auf ein biotinyliertes DG gegeben, anschließend sofort in Reinstwasser gespült und für 10 min in 100 mL Reinstwasser mit Ultraschall behandelt. Unmittelbar nach abschließendem Spülen mit Reinstwasser und Trocknen im Stickstoffstrom wird das DG zur Analyse des immobilisierten Farbstoffs verwendet (s. Kapitel 2.3.4). Für die Charakterisierung der Deckgläser bezüglich der Abhängigkeit der Fluorophordichte von der Konzentration der NAV-Farbstoff-Lösung (s. Kapitel 3.2.1) wird ähnlich vorgegangen. Allerdings werden hier nicht 50  $\mu\text{L}$  der NAV-Farbstoff-Lösung mittig auf das DG getropft, sondern jeweils 5  $\mu\text{L}$ -Tropfen unterschiedlich konzentrierter NAV-AF546-Lösungen mit einigem Abstand voneinander auf das selbe Deckglas gegeben und 5 min inkubiert. Eine offensichtlich sehr hohe Oberflächenspannung der wässrigen Lösung auf dem biotinylierten Deckglas gewährleistet dabei, dass die Tropfen nicht auseinander laufen und somit nur ein begrenzter Bereich des Deckglases jeweils mit Lösung benetzt wird. Nach der Inkubation mit den NAV-Farbstoff-Lösungen wird wie oben beschrieben gespült, getrocknet und das DG am EMFM analysiert.

## **2.3.4 Abbilden des Photobleichens am Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskop: Aufnahme der Bleichfilme**

### **2.3.4.1 Justieren des Systems**

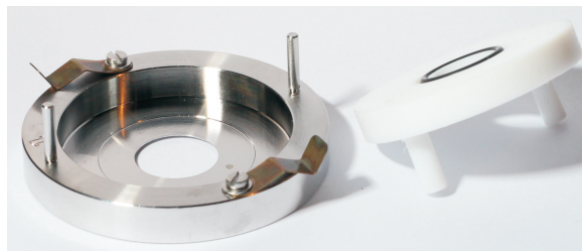
Bevor die eigentliche Messung zur Farbstoffanalyse durchgeführt werden kann, müssen zunächst der Laserstrahl justiert, die Anregungsleistung auf Probenhöhe bestimmt und ein Bild des aus der Justierung resultierenden Anregungsprofils aufgenommen werden. Die Justierung wird mit Hilfe eines dünn auf eine Matekschale aufgetragenen Textmarkerfilms vorgenommen. Dazu wird die Probe zunächst im Durchlicht fokussiert und dann mit der für die Messungen relevanten Laserlinie angeregt. Sowohl für



die Justierung als auch für sämtliche Messungen wird das Fluoreszenzsignal mit der EMCCD-Kamera iXon<sup>EM</sup> + DU-897D-Coo-BV detektiert. Das Abbilden der Textmarkerprobe ermöglicht es den Anregungsstrahlengang so einzurichten, dass lediglich ein sehr scharf begrenzter, im Gesichtsfeld der Kamera zentrierter Bereich angeregt wird. Der Durchmesser dieses Bereichs konnte dabei über eine Irisblende variiert werden, das Zentrieren wird über Spiegel vorgenommen (s. Kapitel 2.1.5.2). Das Anregungsprofil des so ausgerichteten Strahls ist Grundlage für eine genaue Bestimmung der Anregungsintensität (s. Kapitel 2.3.5.3). Daher wird das Profil zu jedem Experiment dokumentiert, indem nach erfolgter Justierung des Systems ein Einzelbild  $S(i, j)$  der laserangeregten Textmarkerprobe, das sog. „Profilbild“, aufgenommen wird. Gleichermäßen wird das Hintergrundniveau bei abgeschaltetem Laser in einem Bild  $H(i, j)$  dokumentiert. Nach Justieren der Beleuchtung wird schließlich mit einem optischen Leistungsmessgerät (Powermeter) die Laserleistung  $P$  auf Höhe der Probe für die ganzzahligen Werte der elektronischen Lasersteuerung zwischen 0 V und 10 V gemessen und notiert (vgl. Kapitel 2.1.5.2).

#### 2.3.4.2 Aufnahme der Filmserien

Nach Vorbereiten des Mikroskopaufbaus wird mit der Aufnahme der Filmserien begonnen. Dazu wird das für die Messung vorbereitete Deckglas in eine für die Messungen eigens gefertigte Deckglashalterung (s. Abbildung 2.2) gespannt und mit 500  $\mu$ L sterilem PBS bzw. frisch zubereitetem TB überschichtet. Die das Deckglas überschichtende Lösung kommt dabei lediglich mit dem Teflonstempel und der Gummidichtung der Kammer in Berührung. Beide sind so beschaffen, dass sie in 2% Helmanex-Lösung gereinigt werden können und keine fluoreszenten Moleküle in die Lösung freisetzen (Kontrollexperiment hier nicht gezeigt). Die Deckglashalterung wird auf einem mit Hilfe



**Abbildung 2.2: Deckglashalterung zur Verwendung am EMFM.** In die ausgedrehte Vertiefung der Edelstahlaufnahme (links) wird ein Deckglas eingelegt und mit dem Niederhalter aus Teflon (rechts) fixiert. Der Niederhalter verfügt mittig über eine Öffnung, die auf der dem Deckglas zugewandten Seite von einem Dichtungsring umgeben ist. Er wird mit den beiden Federn auf der Edelstahlaufnahme festgespannt, wodurch der Dichtungsring an das Deckglas gepresst wird und so den Raum über dem Deckglas abdichtet. Dadurch kann das Deckglas mit ca. 500  $\mu$ L Flüssigkeit überschichtet werden. Die Kammer wird in die Aufnahme am Mikroskopisch so eingesetzt, dass das Objektiv durch die untere Öffnung in der Edelstahlaufnahme auf Arbeitsabstand an das Deckglas herangefahren werden kann. Äußerer Durchmesser der Edelstahlaufnahme: 50 mm.

von Mikrometerschrauben lateral verschiebbaren Probenstisch am Mikroskop eingespannt. Zur Un-



Farbstoff	$w [s^{-1}]$
Cy5	45,99800
AF647	45,99800
AF546	1,99310
Atto647	4,95690
Atto647N	9,82900
Atto655	0,99826

**Tabelle 2.2: Bildwiederholungsrate  $w$ , die zur Aufnahme der Bleichfilme des jeweiligen Farbstoffs verwendet wurde.**

tersuchung des Photobleichens werden nun die immobilisierten Farbstoffmoleküle in einem Bereich des DG in den Fokus gebracht. Dies erfolgt bei hoher Verstärkung der Kamera (EM gain=300), relativ langer Belichtungszeit (ca. 500 ms) und sehr geringer Anregungsleistung (abhängig vom Farbstoff ca. 10-40  $\mu\text{W}$  auf Probenhöhe). Anschließend wird der erste Film zur Dokumentation des Photobleichens („Bleichfilm“) aufgezeichnet. Dazu wird eine feste Anregungsleistung eingestellt und das Bleichen sämtlicher Moleküle im Kameragesichtsfeld aufgezeichnet. Hierbei ist darauf zu achten, dass der Film eine ausreichende Länge aufweist, um das Bleichen alle Fluorophore im Gesichtsfeld abzubilden (Toleranz: max. 5 fluoreszierende Partikel im letzten Bild des Films). Die optimale Filmlänge muss durch vorheriges Ausprobieren bestimmt werden. Gleichzeitig wird für sämtliche Bleichfilme eines Farbstoffs eine konstante Bildwiederholungsrate beibehalten. Diese wird so gewählt, dass die Bleichfilme bei geringen Laserleistungen nicht über 2000 Bilder umfassen während das Bleichen bei hohen Leistungen in einer ausreichenden Anzahl an Bildern aufgelöst wird. Photostabile Farbstoffe müssen daher mit geringerer Bildwiederholungsrate abgebildet werden als wenig photostabile Farbstoffe. Der EM gain wird so eingestellt dass die Signale mit maximalem Kontrast abgebildet werden, ohne dass eine Sättigung der Pixel erfolgt (auch hier ist vorweg Austesten nötig). Nach Aufnahme de Films wird eine noch nicht beleuchtete Stelle auf dem Deckglas ausgewählt (es ist sinnvoll, das Deckglas nach einem festen Muster abzufahren) und wie oben beschrieben fokussiert und abgebildet. Zu jeder Farbstoff/Puffer-Kombination werden auf diese Weise 2 Deckgläser analysiert und jeweils 6 Bleichserien angefertigt. Eine Bleichserie umfasst dabei jeweils 6 bei unterschiedlichen Anregungsleistungen aufgenommene Filme. Tabelle 2.2 zeigt die für die Farbstoffe jeweils gewählte Bildwiederholungsrate  $w$ .

### 2.3.5 Analyse der Bleichfilme: Ermittlung von Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ und Photonenzahl $\mathcal{N}$

Ein Teil der Arbeit befasste sich mit der Analyse des Photobleichens einiger in der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie gebräuchlicher Fluoreszenzfarbstoffe (s. Einleitung): Zum einen wurde die Bleichzeit  $\tau_{\Lambda}$  der Farbstoffe bestimmt zum anderen die Gesamtzahl  $\mathcal{N}$  an Photonen ermittelt, die der

Farbstoff innerhalb  $\tau_\Lambda$  emittiert. Sie wurden durch Analyse der Fluorophorsignale aus den Bleichfilmen erhalten. Weiterhin sollte der Zusammenhang zwischen  $\tau_\Lambda$  bzw.  $\mathcal{N}$  und der Anregungsintensität ermittelt werden. Daher wurde für die einzelnen Fluorophore eine lokale Anregungsintensität  $I(i, j)$  bestimmt.

### 2.3.5.1 Bestimmung der Bleichzeit $\tau_\Lambda$

In dieser Arbeit wurde für die sechs zu analysierenden Fluorophore statt der Bleichzeit  $\tau$ , welche aus der kontinuierlichen Anregung eines Fluorophors resultiert, die modifizierte Bleichzeit  $\tau_\Lambda$ , das Analogon bei intermittierender Beleuchtung (s. Kapitel 2.1.5.2), bestimmt. Der Index  $\Lambda$  lässt sich als Produkt aus Belichtungszeit und Bildwiederholungsrate berechnen.

Sowohl  $\tau$  als auch  $\tau_\Lambda$  werden hier, trotz unterschiedlicher Definition, als *Bleichzeit* bezeichnet, im Folgenden ist mit dem Begriff *Bleichzeit* jedoch, bis auf weiteres, stets  $\tau_\Lambda$  gemeint (zudem verschafft auch der (ggf. fehlende) Index Klarheit, welche Größe gemeint ist).

Zur Bestimmung der Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  werden die Filme aus Kapitel 2.3.4.2 herangezogen. Für eine Auswertung der einzelnen Moleküle muss für jedes Signal durch Auftragen der mittleren Fluoreszenzintensität gegen die Zeit ein Fluoreszenzdiagramm erstellt werden, aus dem sich jeweils der Zeitpunkt des Photobleichens feststellen lässt: Während das Molekül fluoresziert, liegt die Emissionsintensität nahezu konstant bei einem unter den jeweiligen Experimentbedingungen farbstoffspezifischen Wert; nach Ablauf von  $\tau_\Lambda$  fällt die Intensität abrupt auf Hintergrundniveau ab (s. Kapitel 1.2.3).

Aufgrund der Datenmenge wurde das im Folgenden beschriebene Skript entworfen, welches einen Großteil der Analyse automatisiert durchführt (s. Abbildung 2.3).

#### Schritt 1

- Datenimport:

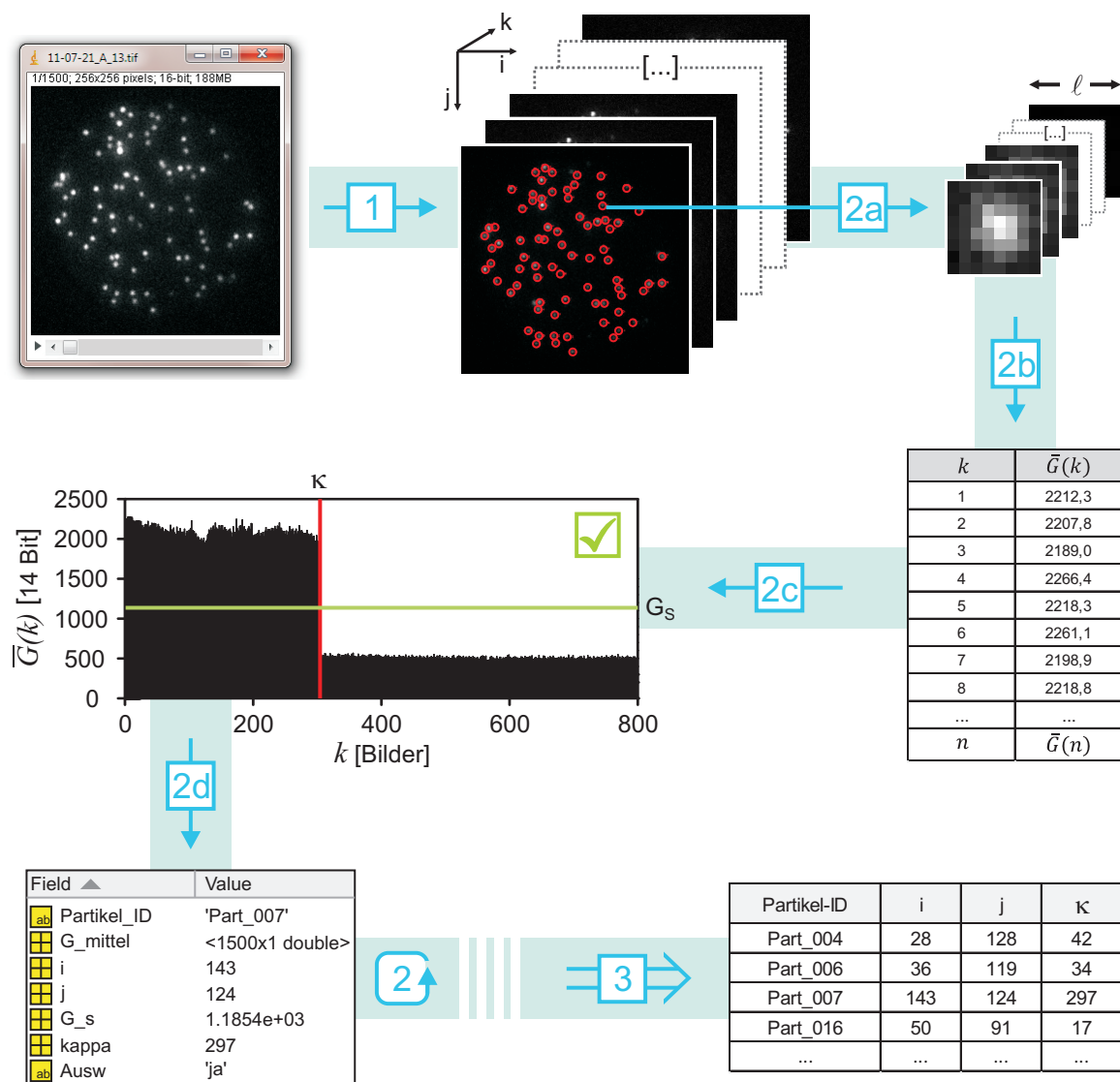
Ausgangspunkt für die Analyse ist ein Film im TIFF-Format mit  $K$  Bildern, welcher die Molekülsignale mit  $256 \times 256$  Pixeln und einer Datentiefe von 14 bit darstellt. Dieser Film wird zunächst in  $K$   $256 \times 256$ -Matrizen eingelesen. Dazu wird für jeden Pixel an der Stelle  $i, j$  im  $k$ -ten Bild der Grauwert  $G(i, j, k)$  festgestellt und in Spalte  $i$  und Zeile  $j$  der  $k$ -ten Matrix eingetragen.

- Lokalisieren der Moleküle:

Die zum ersten Bild des Films gehörende Matrix ( $k = 1$ ) ist Grundlage für die Lokalisierung der Moleküle, welche mit Hilfe der Funktion `pkfnd2` vorgenommen wird. Dazu wird das 1. Bild des Films dargestellt, der Anwender schätzt einen Schwellenwert und einen Signaldurchmesser für die pixelgenaue Lokalisierung ab und übergibt diese Startparameter an das Skript. Daraufhin erfolgt die Lokalisierung, deren Ergebnis grafisch dargestellt wird, indem im 1. Bild des Films die gefundenen

---

<sup>2</sup>The Matlab Particle Tracking Code Repository, <http://physics.georgetown.edu/matlab/>



**Abbildung 2.3:** Schema zum Aufbau des Matlab-Skripts zur Bestimmung des Bleichindex  $\kappa$ . **Schritt 1** Datenimport – Lokalisieren der Moleküle – Zuweisen der Partikel-ID. **Schritt 2a** Platzieren des  $\ell \times \ell$ -ROI für das jeweils zu analysierende Molekülsignal. **Schritt 2b** Berechnen und Tabellieren der mittleren Grauwerte  $\bar{G}(k)$  des ROI. **Schritt 2c** Berechnung des Schwellenwerts  $G_s$  und Bestimmung des Bleichindex  $\kappa$  – Visuelle Ausgabe des Fluoreszenzdiagramms  $\bar{G}(k)$  vs.  $k$ . **Schritt 2d** Manuelle Sortierung anhand des Fluoreszenzdiagramms – Erstellung eines Datenblattes für das Molekül. Die Schritte 2a-d werden nacheinander für alle Moleküle durchgeführt. **Schritt 3** Ausgabe von  $\kappa$  für alle Moleküle des Films als Excel-Tabelle.

Molekülpositionen markiert werden. Der Anwender prüft anhand dieser Grafik die Lokalisierung und wiederholt sie ggf. unter Angabe alternativer Startparameter so lange, bis mindestens etwa 90% der Signale erkannt wurden. Das Skript notiert die gefundenen Molekülpositionen als  $(i, j)$ -Wertepaare,  $i$  und  $j$  sind dabei natürliche Zahlen, da hier eine pixelgenaue Lokalisierung ausreicht.

- Zuweisen der Partikel-ID:

Nach der Lokalisierung erhält jedes Moleküle eine Identifikationsnummer (Partikel-ID), anhand derer es zusammen mit dem Dateinamen des zugehörigen Films (Film-ID) auf übersichtliche Weise eindeutig identifizierbar ist. Die nun folgenden Schritte 2a-d werden für jedes der lokalisierten Moleküle nacheinander durchgeführt.

#### Schritt 2a

- Platzieren des  $\ell \times \ell$ -ROI für das jeweils zu analysierende Molekülsignal:

Für das betrachtete Molekül wird im weiteren Verlauf (Schritt 2c) ein Fluoreszenzdiagramm erstellt, bei dem der mittlere Grauwert des Signals im  $k$ -ten Bild  $\overline{G}(k)$  (s.u.) gegen die Bildnummer  $k$  aufgetragen wird. Um  $\overline{G}(k)$  berechnen zu können, wird in diesem Schritt für das Signal ein umliegender Bereich definiert, innerhalb dessen alle Pixel bzw. deren Grauwerte zu  $\overline{G}(k)$  des jeweiligen Signals beitragen. Dieser sog. Sg-ROI (das Signal enthaltende ROI) ist stets quadratisch und besitzt eine Seitenlänge von  $\ell$  Pixeln. Die Seitenlänge  $\ell$  wird ausgehend vom zur Lokalisierung angegebenen Signaldurchmesser (s. Schritt 1) einmal für jeden Film festgelegt als  $\ell = \text{Durchmesser} + 2$  Pixel (empirischer Wert). Der Sg-ROI wird über das Molekülsignal gelegt, indem der zentrale Pixel des Sg-ROI mit der jeweiligen Molekülposition in Deckung gebracht wird (bei geradem  $\ell$  liegen Molekülposition und Sg-ROI-Zentrum 0,5 Pixel auseinander). Um die anschließende Berechnung von  $\overline{G}(k)$  deutlicher machen zu können, wird die Position der oberen linken Ecke des ROI als  $(a, b)$  und die der unteren rechten Ecke als  $(d, e)$  bezeichnet.

#### Schritt 2b

- Berechnen und Tabellieren der mittleren Grauwerte  $\overline{G}(k)$  des ROI:

Der mittlere Grauwert  $\overline{G}(k)$  des Moleküls im  $k$ -ten Bild berechnet sich anhand des zuvor durch die Eckpunkte  $(a, b)$  und  $(d, e)$  aufgespannten ROI indem aus den Grauwerten  $G(i, j, k)$  aller innerhalb des ROI liegenden, insgesamt  $\ell^2$  Pixel das arithmetische Mittel gebildet wird:

$$\overline{G}(k) = \frac{1}{\ell^2} \cdot \sum_{i=a}^d \sum_{j=b}^e G(i, j, k) \quad (2.3)$$

Alle  $\overline{G}(k)$  des Moleküls (insgesamt  $K$  an der Zahl) werden zusammen mit der zugehörigen Bild-Nr.  $k$  tabelliert. Sie liefern die Datengrundlage für die Bestimmung des Bleichindex in Schritt 2c.

#### Schritt 2c

- Berechnung des Schwellenwerts  $G_s$  und Bestimmung des Bleichindex  $\kappa$ :

Der Zeitpunkt des Photobleichens eines Moleküls lässt sich anhand des zugehörigen Fluoreszenzdiagramms ermitteln: Für ein konstant fluoreszierendes Molekül liegt  $\overline{G}(k)$  zu Filmbeginn auf einem relativ konstanten Niveau und fällt dann zum Zeitpunkt des Bleichens (in Bild  $\kappa$ ) auf das Niveau des Hintergrundrauschens ab. Der Bleichindex  $\kappa$  lässt sich daraus ermitteln, indem alle  $\overline{G}(k)$  von  $k = 1$  bis  $K$  mit einem noch näher zu erläuternden Schwellenwert  $G_s$  (s.u.) verglichen werden:  $\kappa$  ist für ein einstufig bleichendes nicht blinkendes Fluorophor dann erreicht, wenn der Wert von  $\overline{G}(k)$  das letzte mal oberhalb des Schwellenwerts  $G_s$  liegt, so dass alle nachfolgenden  $\overline{G}(k)$  (für  $k > \kappa$ ) kleiner als  $G_s$  sind. In der Praxis können Fluoreszenzfarbstoffe allerdings blinken, so dass ( $\overline{G}(k)$  nur temporär kleiner  $G_s$  wäre und die Bleichzeit unterschätzt würde. In dieser Analyse wird das Blinken zunächst ignoriert (eine manuelle Korrektur folgt in Schritt 2d) und das Molekül erst dann als „geblichen“ betrachtet, wenn alle  $\overline{G}(k)$  für  $k > \kappa$  durchgehend bis ans Filmende  $< G_s$  sind. Daher erweist es sich als praktikabel den Bild-für-Bild-Vergleich von  $\overline{G}(k)$  mit  $G_s$  am *Filmende* bei Bild  $K$  zu beginnen und in Richtung *Filmanfang* zu durchlaufen.  $\kappa$  ist in diesem Fall dann erreicht, wenn  $\overline{G}(k)$  das erste mal über den Schwellenwert  $G_s$  steigt, welcher über die (empirisch ermittelte) Gleichung 2.4 bestimmt wurde.

$$G_s = \overline{G}_{min} + 0,4 \cdot (\overline{G}_{max} - \overline{G}_{min}) \quad (2.4)$$

Darin stehen  $\overline{G}_{min}$  und  $\overline{G}_{max}$  für den niedrigsten bzw. höchsten Wert aller  $\overline{G}(k)$ .

Die Auswertungsroutine berechnet nun anhand der tabellierten  $\overline{G}(k)$  (s. Abbildung 2.3 Mitte rechts) zunächst den Schwellenwert  $G_s$  (s. Gleichung 2.4) und nimmt dann den Bild-für-Bild-Vergleich  $\overline{G}(k)$  mit  $G_s$  für alle  $k = K$  bis  $k = 1$  vor. Dabei wird der Zeitpunkt des Photobleichens im Bild  $\kappa$  (wie in Schritt 2c beschrieben: Vergleich von  $\overline{G}(k)$  mit  $G_s$  ausgehend vom Filmende) festgestellt.

- Visuelle Ausgabe des Fluoreszenzdiagramms  $\overline{G}(k)$  vs.  $k$ :

in Schritt 2d folgt ein Sortierschritt, der vom Anwender vorgenommen werden muss: dazu wird das aktuelle Fluoreszenzdiagramm so ausgegeben, wie es in Abbildung 2.3 Mitte links zu sehen ist. Es zeigt neben dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz eine rote, vertikale Linie, für den Zeitpunkt des Photobleichens  $\kappa$  und eine grüne, horizontal verlaufende Linie, für den ermittelten Schwellenwert  $G_s$ .

#### Schritt 2d

- Manuelle Sortierung anhand des Fluoreszenzdiagramms:

Anhand des Diagramms entscheidet der Anwender ob das angezeigte Ergebnis in den Auswertungspool aufgenommen oder verworfen wird. Der manuelle Schritt ist notwendig, da das Skript für eine solche Sortierung nicht ausgelegt ist und eine Automatisierung den Rahmen dieser Arbeit überstieg.

- Erstellung eines Datenblattes für das Molekül:

Abschließend werden die Ergebnisse als Datenblatt dokumentiert (s. Abbildung 2.3 unten links). Dazu werden die Identifikationsnummer des Moleküls (*Partikel\_ID*), die  $\overline{G}(k)$ , (*G\_mittel*), die Position des Moleküls (*i* bzw. *j*), der Schwellenwert  $G_s$  (*G\_s*),  $\kappa$  (*kappa*) und die vom Anwender getroffene Entscheidung das Molekül in die Auswertung einzubeziehen oder es zu verwerfen (*Ausw*) notiert. Die Routine schließt damit die Schleife ab und durchläuft Schritte 2a-d für die übrigen Moleküle.

### Schritt 3

- Ausgabe von  $\kappa$  für alle Moleküle des Films als Excel-Tabelle:

Sobald die Schritte 2a-d für alle Moleküle eines Films durchgeführt wurden, legt die Auswertungsroutine zur späteren Analyse der Daten eine Excel-Tabelle an. Sie enthält die  $\kappa$  für alle in die Auswertung einbezogenen Moleküle, die jeweilige Partikel-ID sowie -Position (*i, j*). Außerdem wurden sämtliche Fluoreszenzdiagramme als Grafiken gespeichert (s. z. B. Abbildung A.1) und die Datenblätter der einzelnen Moleküle gesichert. Dies ermöglicht eine spätere Revision der Daten.

Abschließend wird die Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  mit Hilfe der Bildwiederholungsrate  $w$  aus  $\kappa$  berechnet: Da das Molekül nach  $\kappa$  Bildern bleicht, muss  $\kappa$  mit der Bildfolgezeit (*frame time*) multipliziert werden (diese setzt sich aus der Belichtungszeit und der zum Prozessieren der Daten benötigten Zeit zusammen). Sie entspricht der reziproken Bildwiederholungsrate  $1/w$ , so dass man  $\tau_\Lambda$  in  $s$  nach Gleichung 2.5 erhält:

$$\tau_\Lambda = \frac{\kappa}{w} \quad [\kappa] = \text{Bilder} \quad [1/w] = \text{Bilder}/s \quad (2.5)$$

Schließlich muss wegen der nicht kontinuierlichen Anregung auch hier  $\Lambda$ , als Produkt aus Belichtungszeit und Bildwiederholungsrate, angegeben werden:

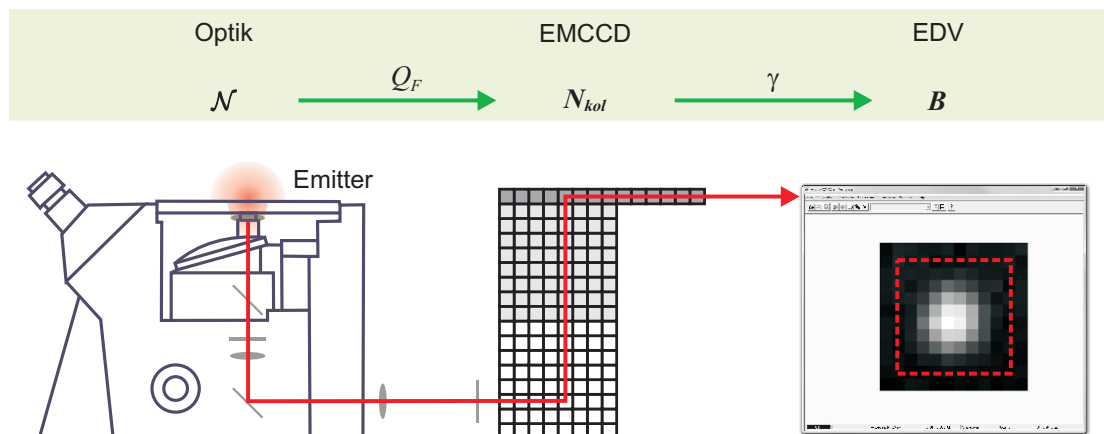
$$\Lambda[\%] = t_i \cdot w \quad (2.6)$$

$\Lambda$  wird als Prozentsatz formuliert.

In Kapitel 2.3.5.4 wird dargelegt wie  $\tau_\Lambda$  schließlich für jeden Farbstoff in Abhängigkeit von der Anregungsintensität  $I(i, j)$  (s. Kapitel 2.3.5.3) grafisch dargestellt wurde.

#### **2.3.5.2 Bestimmung der Photonenzahl $\mathcal{N}$**

Der hier verwendete EMFM-Aufbau (s. Kapitel 2.1.5.2) umfasst eine sensitive EMCCD-Kamera, welche es erlaubt einen einzelnen Fluoreszenzemitter als beugungsbegrenztes Signal in Form einer Grauwertmatrix als Bild  $G(i, j)$  bzw. Bildstapel  $G(i, j, k)$  darzustellen. Dazu wird ein Teil der vom Fluorophor emittierten Photonen mittels Mikroskopoptik gesammelt und auf den Kamerachip gelenkt, dort pro-



**Abbildung 2.4:** Schematisierte Darstellung der Abbildung eines Fluorophors mittels EMFM. Zur Detektion (roter Pfeil) der Fluoreszenz eines Fluorophors werden die emittierten Photonen mit Hilfe der Mikroskopoptik (links) auf den Chip der EMCCD-Kamera (Mitte) abgebildet, dort prozessiert und das Signal als Bildstapel  $G(i, j, k)$  ausgegeben (rechts).  $\mathcal{N}$ : im Zeitraum  $\tau_\Lambda$  emittierte Photonen,  $Q_f$ : Detektionskoeffizient,  $N_{kol}$ : Zahl der im Zeitraum  $\tau_\Lambda$  mit dem Kamerachip kollidierten Photonen,  $\gamma$ : Kamerafaktor,  $\mathcal{B}$ : Summe über alle  $G(i, j, k)$ .

zessiert und als Rastergrafik ausgegeben. Abbildung 2.4 zeigt schematisch den Detektionspfad. Die Anzahl  $\mathcal{N}$  der innerhalb der Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  emittierten Photonen kann bei Kenntnis sämtlicher relevanter Parameter des Mikroskopaufbaus bestimmt werden. Im Folgenden wird die Methode zur Quantifizierung dieser Parameter erläutert.

Im Grunde werden dazu die Grauwerte sämtlicher zu einem Fluorophorsignal gehörender Pixel in einem Bild  $k$  hintergrundkorrigiert (s. Kapitel 2.3.5.2) und zur Summe  $B(k)$  aufsummiert; die einzelnen  $B(k)$  wiederum werden dann für  $k = 1$  bis  $k = \kappa$  (zu  $\kappa$  s. Kapitel 2.3.5.1) aufsummiert um  $\mathcal{B}$  erhalten (s. Kapitel 2.3.5.2). Dieses lässt sich über einen Faktor  $f$  mit  $\mathcal{N}$  in Beziehung setzen:

$$\mathcal{B} = f \cdot \mathcal{N} \quad (2.7)$$

$f$  setzt sich aus zwei Beiträgen zusammen (s. Abbildung 2.4 grüne Box): Zum einen geht der farbstoffspezifische Detektionskoeffizient  $Q_f$  ein, welche das Verhältnis zwischen den innerhalb einer Zeitspanne  $\Delta t$  auf den Chip treffenden Photonen und den im selben Zeitraum vom Fluorophor emittierten Photonen wiedergibt (s. Kapitel 2.3.5.2); zum anderen wird der Kamerafaktor  $\gamma$  benötigt. Er gibt den Zusammenhang zwischen der Zahl an Photonen, die auf einen beliebigen Pixel des Chip treffen und dem Grauwert im Bild wieder (s.u.).  $f$  lässt sich aus diesen beiden Größen bestimmen:

$$f = Q_f \cdot \gamma \quad (2.8)$$

Die zentrale Gleichung für die Berechnung von  $\mathcal{N}$  anhand der Photobleichfilme ergibt sich damit zu:

$$\mathcal{N} = \frac{\mathcal{B}}{Q_f \cdot \gamma} \quad (2.9)$$



**Detektionskoeffizient  $Q_F$** 

Der Detektionskoeffizient  $Q_F$  wird hier als die mittlere Wahrscheinlichkeit dafür definiert, dass ein vom Farbstoffmolekül emittiertes Fluoreszenzphoton auf den Detektor trifft. Er drückt also das Verhältnis aus den innerhalb einer Zeitspanne, z. B.  $\tau_\Lambda$ , auf den Detektor treffenden Photonen  $N_{kol}$  zu den im gleichen Zeitraum vom Fluorophor emittierten Photonen  $\mathcal{N}$  aus:

$$Q_F = \frac{N_{kol}}{\mathcal{N}} \quad (2.10)$$

Der Verlust von Photonen tritt dabei hauptsächlich aus zwei Gründen auf:

- (1) Das Objektiv sammelt nur einen Teil der emittierten Photonen. Das Verhältnis aus den vom Objektiv gesammelten zu den emittierten Photonen wird als Sammeleffizienz  $\eta(\lambda)$  bezeichnet und ist von der Wellenlänge der Fluoreszenz abhängig.
- (2) Die optischen Elemente im Strahlengang (Linsen, Filter, Prismen) besitzen Transmissionswerte  $< 100\%$ , da sie einen Teil der auftreffenden Photonen reflektieren oder streuen. Dieser Verlust wird über die Gesamttransmission  $T(\lambda)$  quantifiziert, die sich aus den Einzeltransmissionen der Elemente zusammensetzt und ebenfalls wellenlängenabhängig ist.

Aus diesen beiden wellenlängenabhängigen Größen lässt sich eine systemspezifische Detektionseffizienz  $q(\lambda)$  berechnen:

$$q(\lambda) = \eta(\lambda) \cdot T(\lambda) \quad (2.11)$$

Um  $q(\lambda)$  berechnen zu können, müssen somit  $\eta(\lambda)$  und  $T(\lambda)$  im Bereich der relevanten Wellenlängen bestimmt werden:

Die Sammeleffizienz  $\eta(\lambda)$  wird nach einer von Leutenegger und Lasser für die TIRF-Mikroskopie vorgestellten Methode berechnet [Leutenegger and Lasser, 2008]. Sie berücksichtigt das besondere Emissionsverhalten von Emittlern in Deckglasnähe. Die eigentliche Berechnung wird dabei mit Hilfe eines Matlab-Funktionenpakets durchgeführt, welches freundlicherweise von Dr. Marcel Leutenegger zur Verfügung gestellt und an das hier verwendete Mikroskop angepasst worden ist. Das Paket simuliert die Detektion eines Photons der Wellenlänge  $\lambda$ , welches unmittelbar am Deckglas in wässriger Umgebung emittiert wird. Der gedachte Mikroskopaufbau besteht dabei aus einem Objektiv, einer Tubuslinse, einer Vergrößerungsoptik und einem  $(51 \text{ px})^2$  EMCCD-Chip. Für jeden Pixel  $(i, j)$  des Chips die Wahrscheinlichkeit  $p(i, j, \lambda)$  berechnet, dass das Photon in diesem Pixel auftritt. Die Summe über alle  $p(i, j, \lambda)$  liefert schließlich die Gesamtwahrscheinlichkeit dafür, dass das Photon in einem



beliebigen Pixel auf den Chip trifft und entspricht  $\eta(\lambda)$ :

$$\eta(\lambda) = \sum_{i=1}^{51} \sum_{j=1}^{51} p(i, j, \lambda) \quad (2.12)$$

Die Gesamttransmission  $T(\lambda)$  des Aufbaus für eine Wellenlänge  $\lambda$  ergibt sich multiplikativ aus den Transmissionen  $T_e(\lambda)$  der optischen Elemente des Strahlengangs.

$$T(\lambda) = \prod_e T_e(\lambda) \quad (2.13)$$

Die  $T_e(\lambda)$  werden für die zugänglichen Bauteile spektrometrisch vermessen (s. Kapitel 2.3.2) und für die fest verbauten Komponenten vom Hersteller bezogen.

Mit  $q(\lambda)$  und  $T_e(\lambda)$  lässt sich schließlich die Detektionseffizienz  $q(\lambda)$  des Systems für eine konkrete Wellenlänge  $\lambda$  berechnen. Fluoreszenzfarbstoffe emittieren jedoch, besonders unter den hier analysierten Experimentbedingungen, nicht nur bei einer diskreten Wellenlänge. Vielmehr erstreckt sich die Fluoreszenzbande über einen ganzen Wellenlängenbereich. Dieser ist dem jeweiligen Emissionsspektrum  $E(\lambda)$  vs.  $\lambda$  des Fluorophors zu entnehmen. Aus diesem Grund muss abschließend für jeden Fluoreszenzfarbstoff (F), anhand seines Emissionsspektrums, der spezifische Detektionskoeffizient  $Q_F$  berechnet werden. Hierzu wird das Emissionsspektrum  $E(\lambda)$  des Farbstoffs zunächst normiert, so dass die Fläche unter der Fluoreszenzbande den Wert 1 annimmt. Dann wird die Detektionseffizienz für jede Wellenlänge mit dem Wert des normierten Emissionsspektrums bei gleicher Wellenlänge gewichtet und die erhaltenen Produkte werden aufsummiert:

$$Q_F = \sum_{\lambda=450 \text{ nm}}^{800 \text{ nm}} E_{\text{norm.}}(\lambda) \cdot q(\lambda) \quad (2.14)$$

$Q_F$  ergibt sich schlussendlich aus den Gleichungen 2.11 und 2.14 zu:

$$Q_F = \sum_{\lambda=450 \text{ nm}}^{800 \text{ nm}} E_{\text{norm.}}(\lambda) \cdot \eta(\lambda) \cdot T(\lambda) \quad (2.15)$$

In diese Berechnung gehen beinahe ausschließlich theoretisch ermittelte Werte ein, daher soll im Folgenden in Kürze auf verschiedene Fehlerquellen hingewiesen werden, damit deutlich wird, dass Werte, die aus Rechnungen unter Verwendung von  $Q_F$  ermittelt wurden, mit einem hier nicht quantifizierten Fehler behaftet sind: Die Sammeleffizienz des Objektivs entstammt einer Berechnung aufgrund theoretischer Überlegungen, in die vereinfachende Annahmen einfließen. Aus diesem Grund sollte üblicherweise ein Fehler quantifiziert werden oder die Sammeleffizienz per Messung z. B. für eine Wellenlänge mit dem theoretischen Wert abgeglichen werden. Da diese Messungen nicht trivial sind, wurde hier der theoretische Wert übernommen ohne eine Ungenauigkeit angeben zu können.

Weiterhin lässt sich über die Genauigkeit der von den Herstellern bezogenen Spektren keine Aussage treffen und auch die im Rahmen der Arbeit gemessenen Spektren werden ohne Angabe von Fehlern verwendet.

**Kamerafaktor  $\gamma(\lambda)$** 

Der Kamerafaktor  $\gamma(\lambda)$  beschreibt den Zusammenhang zwischen der Anzahl an Photonen  $N_{kol}(i, j)$ , welche im Bildintegrationszeitraum  $t_i$  auf einen Pixel  $(i, j)$  des EMCCD-Chips treffen und dem Grauwert  $G(i, j)$ , der im korrespondierenden Pixel des Bildes ausgegeben wird:

$$\gamma = \frac{G(i, j)}{N_{kol}(i', j')} \quad (2.16)$$

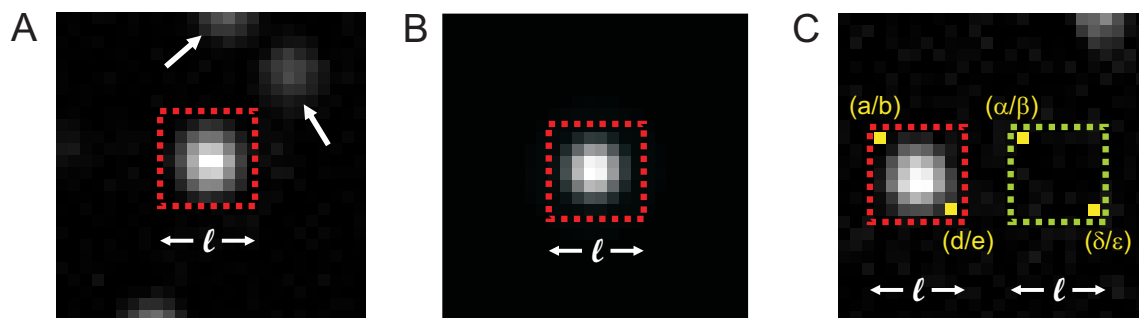
Zu seiner Berechnung wird folgende Gleichung verwendet, in der  $M$  für den Vervielfachungsfaktor,  $\theta(\lambda)$  für die wellenlängenabhängige Quanteneffizienz und  $W$  für die Wandlungsrate stehen:

$$\gamma(\lambda) = \frac{M}{\theta(\lambda) \cdot W} \quad (2.17)$$

Die Gleichung lässt sich bei Betrachtung der wesentlichen Prozesse zur Erzeugung eines Bildes mittels EMCCD-Chip verstehen:

Nicht jedes auf den EMCCD-Chip treffende Photon erzeugt durch Wechselwirken mit dem photosensitiven Material des Chips auch ein Photoelektron. Die wellenlängenabhängige Wahrscheinlichkeit, mit der auf dem Kamerachip ein Photoelektron erzeugt wird, wird als sog. Quanteneffizienz  $\theta(\lambda)$  vom Hersteller angegeben. Die aufgrund von  $\theta(\lambda)$  im Verlauf von  $t_i$  erzeugten Photoelektronen werden beim Auslesen des Chips zur Erhöhung der Detektionssensitivität im Multiplikationsregister vervielfacht. Der Vervielfachungsfaktor  $M$  wird dabei vom Anwender in der Software eingestellt. Bei der hier verwendeten Kamera entspricht der Wert von  $M$  dem Faktor, mit dem die Photoelektronen tatsächlich vervielfacht werden („real gain“) – streng genommen entspricht er dem Erwartungswert einer Verteilung, da der Vervielfachung im Chip stochastische Prozesse zugrunde liegen ist. Schließlich werden die Elektronen zur Erstellung der Rastergrafik mit dem Wandlungsfaktor  $W$  (Zahl der Elektronen je Grauwertstufe) in einen Grauwert umgerechnet.

**Grauwertsumme  $\mathcal{B}$**  Die zu analysierenden Fluoreszenzemitter werden mittels EMFM entsprechend dem Nyquist-Kriterium [Pawley, 2006] beugungsbegrenzt auf einen EMCCD-Chip abgebildet und als Rastergrafik bzw. „Rastergrafik-Stapel“ (= Film) ausgegeben. Das heißt, die von einem als Punktquelle zu betrachtenden Fluorophor emittierten Photonen sammeln sich nicht in einem Pixel, sondern verteilen sich mit charakteristischem Muster auf einen Bereich von Pixeln. Gleichung 2.9 gibt vor, wie die Gesamtphotonenzahl  $\mathcal{N}$  für ein Fluorophor zu ermitteln ist. Die Berechnung der Faktoren  $q$  und  $\gamma$



**Abbildung 2.5: Zur Berechnung der Grauwertsomme  $\mathcal{B}$**  **A** Emissionssignale von am Deckglas immobilisierten Fluorophoren. Das Signal im Zentrum ist mit dem sog. Signal-ROI (rot gestrichelt) der Seitenlänge  $\ell$  markiert (s. Text). Die Pfeile markieren zwei weitere Signale. **B** Analog **A** jedoch für ein gerechnetes Fluoreszenzsignal. **C** Wie **A** jedoch mit zusätzlich in grün eingezeichnetem Hintergrund-ROI (s. Text). Zudem sind die Variablenbezeichnungen für die Eckpixel der ROIs angegeben. Bildmaße für alle:  $(2,0 \mu\text{m})^2$

wurde in den vorigen Unterkapiteln beschrieben.

$\mathcal{B}$  eines Fluorophorsignals ist die Summe der rauschkorrigierten Grauwerte  $G^0(i, j, k)$  über sämtliche das Signal abbildende Pixel  $(i, j)$  und die Bilder  $k = 1$  bis  $\kappa$  (zu  $\kappa$  s. Kapitel 2.3.5.1):

$$\mathcal{B} = \sum_{k=1}^{\kappa} \sum_{i=s_1}^{s_2} \sum_{j=s_3}^{s_4} G^0(i, j, k) \quad (2.18)$$

Diese Formulierung von  $\mathcal{B}$  wird nun um folgende beiden Erläuterungen ergänzt: (1.) Es wird vorgestellt wie die signalzugehörigen Pixel identifiziert wurden – die obige Formulierung enthält für den Pixelbereich in den Summen hierzu noch die Platzhalter  $s_{1...4}$ . (2.) Die Korrektur der Grauwerte zur Beseitigung von Rauschbeiträgen  $G \rightarrow G^0$  wird gezeigt. Mit (1) und (2) ergibt sich dann die Form der Gleichung 2.18 wie sie zur Berechnung von  $\mathcal{B}$  in der Praxis verwendet wurde.

- (1) Zunächst wird ein Kriterium für die Unterscheidung signalzugehöriger und nicht-signalzugehöriger Pixel definiert. Dazu wird das Signal eines Fluorophors betrachtet (s. Abbildung 2.5 A). Der rot gestrichelte Kasten grenzt darin die signalzugehörigen von den nicht-signalzugehörigen Pixeln ab. Da er das Signal enthält, wird er fortan als Signal-ROI (Sg-ROI) bezeichnet. Er ist gerade so groß, dass er sämtliche der deutlich sichtbaren Signalpixel umfasst aber nicht in die benachbarten Signale ragt (Pfeile). Die Grauwerte der im Sg-ROI liegenden Pixel können nun aufsummiert und zur Berechnung von  $\mathcal{N}$  verwendet werden. Zuvor wird jedoch die Güte der ROI-Größe anhand der simulierten Abbildung eines einzelnen Fluorophors in Abbildung 2.5 B begutachtet. Diese wurde mit dem von Dr. Marcel Leutenegger zur Verfügung gestellten Matlab-Paket berechnet (s. Kapitel 2.3.5.2) und zeigt das Signal eines Fluorophors, welcher bei einer hier relevanten Wellenlänge emittiert (600 nm). Das simulierte Bild bietet die Möglichkeit das Signal ohne Rauschen und den Einfluss benachbarter Signale zu analysieren. Dabei lässt sich feststellen, dass selbst die Pixel in den Randbereichen einen zwar geringen aber doch von Null verschiedenen Grauwert aufweisen.

Legt man nun einen Sg-ROI gleicher Größe wie in A über das errechnete Signal, summiert die Grauwerte der *darin* enthaltenen Pixel auf und vergleicht diesen Wert mit der Summe über die Grauwerte *aller* Pixel des Bildes, so ist festzustellen, dass die *Gesamtsumme* das etwa 1,3-fache der *Sg-ROI-Summe* beträgt. Daraus wird ersichtlich, dass ein signifikanter Teil der Photonen in Bereichen außerhalb des Sg-ROI auftreten. Bei ausschließlicher Betrachtung der Sg-ROI-Pixel würde die nachfolgende Berechnung von  $\mathcal{N}$  demnach einen zu geringer Wert für die insgesamt emittierten Photonen liefern. Gleiches gilt entsprechend für das *reale* Signal in Abbildung 2.5 A, wobei dort die geringen Beiträge in den Pixeln außerhalb des Sg-ROI meist ohnehin im Hintergrund untergehen und damit nicht detektierbar sind. Zudem kann der Sg-ROI im realen Bild häufig wegen der hohen Moleküldichte nicht größer aufgespannt werden, weshalb an dem kleinen Sg-ROI festgehalten und der ROI-Korrekturfaktor  $\varrho$  eingeführt wird, mit dem die im Sg-ROI ermittelte Grauwertsumme multipliziert wird.  $\varrho$  wird anhand des simulierten Bildes als Quotient aus *Gesamt-* zu *Sg-ROI-Summe* berechnet (in der Gleichung unten verkürzt als Quotient  $\sum_{i,j}^{Ges} G_{sim}(i, j, \lambda) / \sum_{i,j}^{ROI} G_{sim}(i, j, \lambda)$  ausgedrückt). Dabei genügt es, dies für jede Emissionswellenlänge  $\lambda$  und Sg-ROI-Seitenlänge  $\ell$  einmal zu ermitteln:

$$\varrho(\lambda, \ell) = \frac{\sum_{i,j}^{Ges} G_{sim}(i, j, \lambda)}{\sum_{i,j}^{ROI} G_{sim}(i, j, \lambda)} \quad (2.19)$$

Damit ist nun das Kriterium zur Positionierung des Sg-ROI, die *zentralen Pixel* des Signals in einem quadratischen ROI der Seitenlänge  $\ell$ , welcher sich von Pixel  $(a, b)$  bis  $(c, d)$  erstreckt, zu erfassen. Die 3-fach-Summe in Gleichung 2.18 wird damit wie folgt umgeschrieben:

$$\mathcal{B} = \varrho \sum_{k=1}^{\kappa} \sum_{i=a}^d \sum_{j=b}^e G^0(i, j, k) \quad (2.20)$$

Die Berechnung von  $G^0$  folgt in der unter (2) dargelegten Hintergrundkorrektur.

- (2) Die im Sg-ROI ausgelesenen Grauwerte wurden hintergrundkorrigiert, um Signalbeiträge, hervorgerufen z. B. durch Außerfokusfluoreszenz, Dunkelstrom oder Ausleserauschen, zu eliminieren. Dazu wurde in unmittelbarer Nähe des Sg-ROI ein weiterer quadratischer Bereich markiert, welcher keine Signal- sondern lediglich Hintergrundbeiträge enthält und sich von Pixel  $(\alpha, \beta)$  bis  $(\delta, \varepsilon)$  erstreckt (Hg-ROI, s. Abbildung 2.5 C). Innerhalb des Hg-ROI wurde nun das arithmetische

Mittel  $\overline{H}(k)$  aller sich darin befindender Pixel-Grauwerte  $G(i, j, k)$  gebildet,

$$\overline{H}(k) = \frac{1}{\ell^2} \sum_{i=\alpha}^{\delta} \sum_{j=\beta}^{\varepsilon} G(i, j, k) \quad (2.21)$$

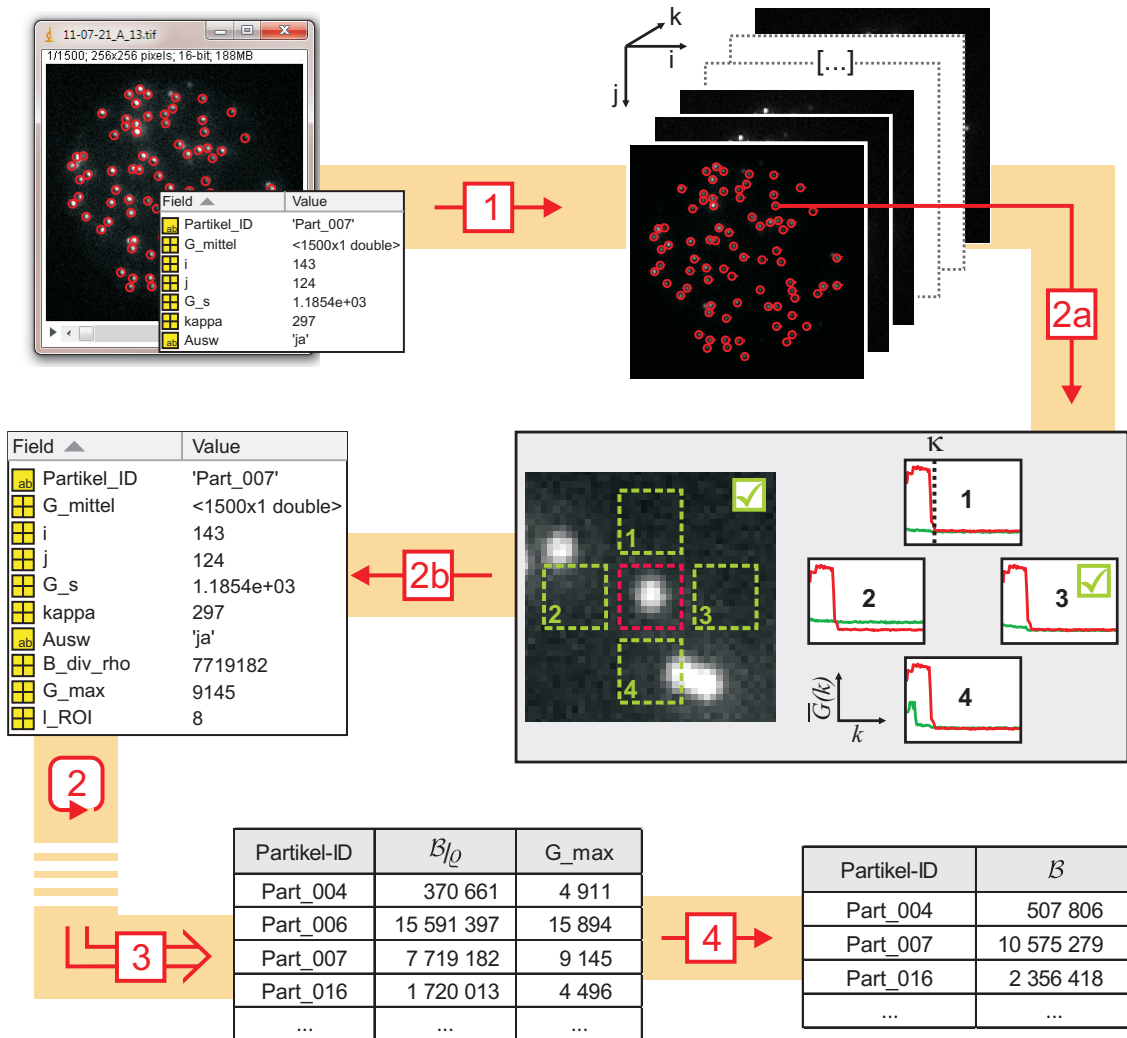
welches dann von jedem Signal-Grauwert im Bild ( $k$ ) subtrahiert wurde um die  $G^0(i, j, k)$  zu erhalten:

$$G^0(i, j, k) = G(i, j, k) - \overline{H}(k) \quad (2.22)$$

Mit der Hintergrundkorrektur wird die 3-fach-Summe aus Gleichung 2.18 damit zu:

$$\mathcal{B} = \varrho \sum_{k=1}^{\kappa} \sum_{i=a}^d \sum_{j=b}^e G(i, j, k) - \overline{H}(k) \quad (2.23)$$

Zur Berechnung von  $\mathcal{B}$  nach Gleichung 2.23 werden also ein quadratischer Sg-ROI mit den Eckkoordinaten  $(a, b)$ ,  $(d, e)$  und ein Hg-ROI mit  $(\alpha, \beta)$ ,  $(\delta, \varepsilon)$  jeweils mit der Seitenlänge  $\ell$  definiert und der ROI-Korrekturfaktor  $\varrho$  aus der Signal-Simulation bestimmt. Dies wird wegen der großen Anzahl zu analysierender Fluorophorsignale Matlab-gestützt durchgeführt. Das dafür erstellte Skript (Schema s. Abbildung 2.6) wird im Folgenden erläutert.



**Abbildung 2.6:** Schema zum Aufbau des Matlab-Skripts zur Bestimmung der Grauwertsumme  $\beta$ . **Schritt 1** Datenimport. **Schritt 2a** Zusammenstellen der Informationen zur Auswahl eines geeigneten Sg-ROI und Hg-ROI. **Schritt 2b** Manuelle Auswahl eines geeigneten Sg-ROI und Hg-ROI – Berechnen von  $\beta$  und Dokumentation im Datenblatt. **Schritt 3** Ausgabe von  $\beta/\phi$  für alle Moleküle eines Films als Excel-Tabelle. **Schritt 4** Berechnung von  $\beta$  und Aussortieren übersteuerter Signale. Details siehe Text.

### Schritt 1

- Datenimport:

Für die Analyse wurden sämtliche Filme ausgewertet, die bereits bezüglich  $\tau_{\Lambda}$  nach der in Kapitel 2.3.5.1 beschriebenen Methode analysiert worden waren. Daher wurde auf einige dort bereits ermittelte Informationen zurückgegriffen und zusammen mit dem Import des Films (s. hierzu Schritt 1 in Kapitel 2.3.5.1) zu jedem Molekül auch bereits die lokalisierte Position und das erstellte Datenblatt eingelesen. Die folgenden Schritte 2a und 2b wurden anschließend für jedes Molekül ausgeführt, der im manuellen Sortierschritt der  $\tau_{\Lambda}$ -Auswertung (s. Kapitel 2.3.5.1 Schritt 2b) als Fluoreszenzsignal eines einzelnen Emitters identifiziert worden war.

### Schritt 2a

- Zusammenstellen der Informationen zur Auswahl eines geeigneten Sg-ROI und Hg-ROI:

Für das Signal wurden nun gemäß den obigen Ausführungen zum Erhalt von Gleichung 2.23 ein geeigneter Sg-ROI und ein Hg-ROI gesucht. Die Entscheidung ob ein ROI *geeignet* ist, trifft dabei der Anwender. Aus diesem Grund wurde in diesem Schritt ein Fenster mit hierzu notwendigen Informationen erstellt (s. Abbildung 2.6, Mitte rechts). Dieses ist wie folgt aufgebaut: im linken Teil sind das Molekülsignal und ein Teil seiner Umgebung vergrößert dargestellt. In diese Darstellung sind in rot der Sg-ROI und in grün vier zur Auswahl stehende Hg-ROIs eingezeichnet. Die Seitenlänge der ROIs  $\ell$  ist dabei festgelegt zur Lokalisierung der Moleküle verwendete Signaldurchmesser plus 2 Pixel. Zur Positionierung der ROIs wurde der Sg-ROI bezüglich der Molekülposition zentriert, und die Hg-ROIs mit einem Abstand von je zwei Pixeln um ihn angeordnet (bei geradem  $\ell$  liegen Molekülposition und Sg-ROI-Zentrum 0,5 Pixel auseinander). Der rechte Teil des Fensters zeigt in vier Graphen jeweils in grün den zeitlichen Verlauf des mittleren Grauwertes  $\overline{G}(k)$  für jeden Hg-ROI und als Referenz in rot den zeitlichen Verlauf von  $\overline{G}(k)$  des Sg-ROI.

#### Schritt 2b

- Manuelle Auswahl eines geeigneten Sg-ROI und Hg-ROI:

Der Anwender musste nun nach folgenden beiden Kriterien sortieren: (1.) Ist der Sg-ROI so platziert, dass er das Signal vollständig erfasst (vgl. hierzu die obige Herleitung des ROI-Faktors  $\varrho$ )? Ragen keine anderen Signale in den Sg-ROI hinein? Werden beide Fragen mit ja beantwortet, so wurde der Sg-ROI bestätigt. Andernfalls wurde das Molekül aus der Auswertung ausgeschlossen und Schritt 2a wird für das nächsten Molekül gestartet. (2.) Welcher der Hg-ROIs beschreibt das Rauschniveau des Hintergrunds? Dazu wurden die Graphen auf der rechten Seite herangezogen und ein Hg-ROI gewählt, welcher selbst kein Signal enthält (hier scheidet beispielsweise Hg-ROI 4 aus) und dessen Werte für  $\overline{G}(k)$  ein vergleichbares Niveau zu den  $\overline{G}(k)$  im Sg-ROI *nach* Photobleichen aufwiesen. Im Beispiel entspricht z. B. Hg-ROI 3 diesen Anforderungen. War keiner der Hg-ROIs geeignet, so wurde das Molekül aus der Analyse ausgeschlossen und 2a für das nächsten Molekül initiiert.

- Berechnen von  $\mathcal{B}/\varrho$  und Dokumentation im Datenblatt:

Nachdem die beiden ROIs bzw. deren Lage in Form der Eckpixel  $(a, b)$ ,  $(d, e)$  (Sg-ROI) bzw.  $(\alpha, \beta)$ ,  $(\delta, \epsilon)$  (Hg-ROI) für das Molekül bestimmt worden waren, wurde nach Gleichung 2.23 der Wert  $\mathcal{B}/\varrho$  berechnet (Multiplikation mit  $\varrho$  folgt im nächsten Schritt) und als  $B\_div\_rho$  im Datenblatt verzeichnet. Das zur Berechnung von  $\mathcal{B}$  notwendige  $\kappa$  war bereits im Datenblatt hinterlegt und wurde von dort aufgerufen. Weiterhin wurde der maximale Grauwert  $G_{max}$  innerhalb des Sg-ROI im ersten Bild bestimmt und zusammen mit der Seitenlänge  $\ell$  der ROIs im Datenblatt des Moleküls als  $G\_max$  bzw.  $l\_ROI$  gespeichert. Damit endete die Analyse des Moleküls und die Schleife begann mit Schritt 2a beim nächsten Signal.



### Schritt 3

- Ausgabe von  $\mathcal{B}/\varrho$  für alle Moleküle eines Films als Excel-Tabelle:

Nachdem sämtliche Moleküle des Films analysiert worden waren, gab das Skript eine Excel-Tabelle aus, welche für alle den geforderten Kriterien genügenden Moleküle die  $\mathcal{B}/\varrho$  und  $G_{max}$  enthielt.

### Schritt 4

- Berechnung von  $\mathcal{B}$  und Aussortieren übersteuerter Signale:

In einem letzten, manuell auszuführenden Schritt wurden die  $\mathcal{B}/\varrho$  nun mit dem zuvor nach Gleichung 2.19 für die entsprechende Wellenlänge  $\lambda$  und ROI-Seitenlänge  $\ell$  berechneten  $\varrho(\lambda, \ell)$  multipliziert um  $\mathcal{B}$  zu erhalten. Abschließend wurden sämtliche Moleküle aussortiert, welche im ersten Bild einen Grauwert  $G_{max}$  größer als 14.000 aufwiesen (bei 14 bit Datentiefe), um die Auswertung von Signalen, welche gesättigte Pixel enthalten, auszuschließen.

Die aus Schritt 4 resultierende Tabelle (s. Abbildung 2.6 rechts unten) enthält nun die zur Berechnung der Photonenzahl nach Gleichung 2.9 notwendigen  $\mathcal{B}$  für alle Moleküle eines Films.  $\mathcal{N}$  wurde nicht mehr von der Auswertungsroutine sondern für alle Filme eines Experimenttages gesondert berechnet. Kapitel 2.3.5.4 zeigt wie  $\mathcal{N}$  anschließend für jeden Farbstoff in Abhängigkeit von der Anregungsintensität  $I(i, j)$  (s. Kapitel 2.3.5.3) grafisch aufbereitet wurde.

#### 2.3.5.3 Bestimmung der lokalen Anregungsintensität $I(i, j)$

Im Rahmen dieser Einzelmolekül-Farbstoffanalyse wurde zu jedem analysierten, an der Stelle  $(i, j)$  lokalisierten Farbstoffmolekül eine lokale Anregungsintensität (oder Leistungsdichte)  $I(i, j)$  angegeben, welcher das Fluorophor während dem Photobleichen ausgesetzt war. Per Definition berechnet sich die Anregungsintensität  $I$  als Quotient aus Anregungsleistung  $P$  und bestrahlter Fläche  $A$ . Platziert man den Messkopf eines optischen Leistungsmessgerätes auf dem Mikroskop oberhalb der Probenaufnahme, so lässt sich bei eingeschaltetem Laser die Anregungsleistung  $P$  bestimmen (im Folgenden bezeichnet  $P$  stets die Anregungsleistung auf Probenhöhe). Da ein gaußscher Laserstrahl jedoch eine radial abnehmende Leistungsdichte aufweist, kann über oben genannten Quotienten lediglich eine *mittlere* Anregungsintensität  $\bar{I}$  berechnet werden:

$$\bar{I} = \frac{P}{A} \quad (2.24)$$

Im Folgenden wird nun die Methode vorgestellt, mit welcher für jeden Pixel  $(i, j)$  eines Bildes die *lokale* Anregungsintensität  $I(i, j)$  ermittelt wurde, um sie den pixelgenau lokalisierten Fluorophoren zuzuordnen. Dazu genügen die vor jedem Experiment auf Höhe der Probe gemessene Anregungsleistung  $P$  des Lasers und das Profilbild  $S(i, j)$  – also das Bild des Strahlprofils durch Abbilden einer Textmarkerprobe (vgl. Kapitel 2.3.4.1). Ziel dieser Methode ist es, für einen Fluorophor, der im

Bleichfilm im Pixel  $(i, j)$  lokalisiert worden ist, den zugehörigen Grauwert  $S(i, j)$  im Profilbild zu identifizieren und diesen durch Multiplikation mit einem Faktor  $c$  in die lokale Anregungsintensität  $I(i, j)$  in diesem Pixel zu überführen:

$$I(i, j) = c \cdot S(i, j) \quad (2.25)$$

Es gilt damit nun den Faktor  $c$  zu bestimmen. Zu seiner Berechnung betrachtet man zunächst die Definition der Leistung als Flächenintegral einer *kontinuierlichen* Intensitätsverteilung (z. B. im Objektraum entlang  $x, y$ ), wie sie Gleichung 2.26 zeigt.

$$P = \iint I(x, y) dx dy \quad (2.26)$$

Aus 2.26 lässt sich nun die analoge Formulierung für die Berechnung von  $P$  anhand *diskreter* Werte, wie sie die Intensitätsmatrix  $I(i, j)$  enthält, ableiten. Dabei ist  $A_{px}$  eine Konstante, die für die Pixelfläche steht:

$$P = \sum_i \sum_j I(i, j) \cdot A_{px} \quad (2.27)$$

Aus den Gleichungen 2.25 und 2.27 ergibt sich:

$$c = \frac{P}{A_{px} \sum_i \sum_j S(i, j)} \quad (2.28)$$

Damit ist  $c$  eine Funktion von  $P$  und  $\sum_i \sum_j S(i, j)$  ( $A_{px}$  ist konstant und beträgt hier  $(80 \text{ nm})^2$ ). Für die beiden Größen gilt folgendes:

- $P$  wird für die Aufnahme der Bleichserie eines Farbstoffes variiert und nimmt üblicherweise in einer Serie sechs unterschiedliche Werte an.
- $\sum_i \sum_j S(i, j)$  ist für eine solche Serie konstant, da ein einziges Profilbild genügt, um das Strahlprofil am jeweiligen Messtag abzubilden. Zur Berechnung für das jeweilige Profilbild werden die Grauwerte aller Pixel  $S(i, j)$  addiert. Allerdings muss zuvor eine Hintergrundkorrektur erfolgen: Dazu wird von jedem Pixel des Profilbilds ein mittlerer Wert des Hintergrundes abgezogen. Dieser wurde aus einem bei abgeschaltetem Laser aufgenommenen Bild als arithmetisches Mittel aller Grauwerte bestimmt. Zudem wurde das korrigierte Profilbild noch mit einem Medianfilter ( $\text{med}[10]$ ) geglättet (s. Kapitel 2.1.6).

Innerhalb einer Bleichserie müssen damit 6 Werte für  $c$  bestimmt werden, bezeichnet als  $c_S(P)$ , wobei das Index- $S$  die für eine Bleichserie (und damit ein Profilbild  $S$ ) konstante Doppelsumme anzeigt. Für ein Molekül, welches im (mit Anregungsleistung  $P$  aufgenommenen) Film im Pixel  $(i, j)$  lokalisiert worden war, kann schließlich nach Gleichung 2.25 die lokale Anregungsintensität  $I(i, j)$

berechnet werden: Dazu wird das entsprechende  $S(i, j)$  als Grauwert im Profilbild ermittelt und durch Multiplikation mit  $c_S(P)$  in  $I(i, j)$  überführt. Die lokale Anregungsintensität ist dann die unabhängige Variable bei der Untersuchung der Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  und der Photonenzahl  $\mathcal{N}$  und geht wie in Kapitel 2.3.5.4 beschrieben in die grafische Aufarbeitung und Auswertung der Daten ein.

Abschließend sei darauf hingewiesen, dass die vorangegangene Betrachtung nur dann gilt, wenn das Profilbild auch den *gesamten* beleuchteten Bereich darstellt, also alle  $I(i, j)$  (bzw. eigentlich die diskreten  $I(x, y)$  des Objektraumes), die zu  $P$  beitragen, im Profilbild registriert wurden. Das konnte weitestgehend dadurch bewerkstelligt werden, dass der einfallende Laserstrahl mit der Irisblende (s. Kapitel 2.3.4.1) so beschnitten wurde, dass der beleuchtete Fleck kleiner als das Kameragesichtsfeld war. Abbildung 3.10 zeigt beispielhaft ein Profilbild in A als Konturgraph und in B als räumliche Darstellung. Es ist in beiden Darstellungen gut zu erkennen, dass die Grauwerte  $S(i, j)$  in den Bildecken zwar gegen null gehen und sich der beleuchtete Bereich damit weitestgehend auf das Kameragesichtsfeld beschränkt; vor allem Abbildungsteil B gibt jedoch anschaulich wieder, dass die Grauwerte zu den Seitenmitten des Bildes hin nicht ganz auf Null abfallen. Dadurch geht Intensität, die vom Powermeter registriert wurde (und damit zu  $P$  beiträgt) für diese Analyse außerhalb des Kameragesichtsfelds „verloren“. Die Doppelsumme über alle Grauwerte berücksichtigt diese Intensitätswerte daher auch nicht, so dass die Gleichheit in Gleichung 2.27 nicht gilt und  $c$  daher mit einem Fehler behaftet ist. Dieser wurde graphisch abgeschätzt, indem eine 2D-Gaußfunktion generiert wurde, welche die Flanken des Beleuchtungsprofils in den Ecken gut wiedergibt. Aufgrund der annähernden Symmetrie des Beleuchtungsprofils konnte der „fehlende“ Teil des Profils anhand der Gaußfunktion rekonstruiert werden. Daraus resultierte, dass 5% des Beleuchtungsprofils verloren gingen – um diesen Wert wurde die mit dem Powermeter gemessene Leistung korrigiert.

#### 2.3.5.4 Erstellen der Bleich- bzw. Photonendiagramme

Die Analyse der Fluoreszenzfarbstoffe in PBS und TB liefert Daten, die einen Zusammenhang zwischen Anregungsintensität  $I_{ex}$  und Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  bzw. Photonenzahl  $N_{p,ges}$  herstellen. Um diese klar zu veranschaulichen, werden für jede Farbstoff/Puffer-Kombination nach folgender Vorgehensweise Plots erstellt:

Zur Ermittlung der Bleichzeiten (s. Kapitel 2.3.5.1) werden zum Erreichen einer ausreichend guten Statistik je Farbstoff/Puffer-Kombination mehrere 1000 Moleküle analysiert und damit genauso viele Wertepaare ( $\tau_\Lambda/I_{ex}$ ) erhalten. Diese Menge an Datenpunkten erstreckt sich auf der Abszisse über einen Bereich von 0,2-1,4 kW/cm<sup>2</sup> und resultiert in einer unübersichtlichen Grafik mit hoher Datenpunktdichte. Aus diesem Grund zur besseren Veranschaulichung der Daten wird eine Mittelung durchgeführt. Der Literatur ist zu entnehmen, dass die Bleichzeit eines Fluorophors bei konstanter An-

regungsintensität exponentiell verteilt ist [Eggeling et al., 1998], so dass eine nichtlineare Regression der Daten nicht vorgenommen werden kann (Grundbedingung für die Regression ist eine *normalverteilte* Schwankung des Messwerts). Deshalb werden die Daten durch eine *Medianglättung* in eine anschauliche Form überführt. Dazu werden die Datenpunkte zunächst entlang der x-Achse in Blöcke zu je  $0.1 \text{ kW/cm}^2$  Breite eingeteilt. Somit umfasst z. B. der erste Block der Daten alle Wertepaare mit einer Anregungsintensität von  $0.0\text{-}0.1 \text{ kW/cm}^2$ , der zweite Block alle mit  $0.1\text{-}0.2 \text{ kW/cm}^2$  usw. Innerhalb jedes Blocks wird dann für alle x-Werte und für alle y-Werte jeweils ein Median berechnet, so dass für jeden Block *ein* Median-Wertepaar resultiert. Trägt man diese Werte nun statt der einzelnen Datenpunkte auf, so erhält man eine deutlich übersichtlichere Darstellung, die eine Abschätzung der Bleichzeit bei gegebener Anregungsintensität zulässt. Um neben dem Median zudem eine Information über die Streuung der Werte in y-Richtung bereitzustellen, werden die beiden, an den Median angrenzenden Quartile in Form von vertikal ausgerichteten, an den Median angrenzenden Linien aufgetragen. Mediane, die aus Blöcken mit weniger als 20 Datenpunkten resultieren, werden verworfen. Die medianglätteten Diagramme werden im Folgenden als *Bleichdiagramme* bezeichnet. Aus Gründen der Konsistenz wurde bei der Aufbereitung der Daten der Photonenzahl-Auswertung analog verfahren, die Diagramme werden im Folgenden demnach als *Photonendiagramme* bezeichnet.

### 2.3.6 Analyse von Atto655 in Lebendzellen

Um nach 2.3.5.3 auch zu den *in vivo* analysierten Molekülen jeweils eine Anregungsintensität ermitteln zu können, wird der Mikroskopaufbau vor Aufnahme der Bleichserien analog zum Vorgehen in Kapitel 2.3.4.1 justiert.

Zur anschließenden Aufnahme der Bleichserien von Atto655 *in vivo*, wird der fluoreszenzmarkierte Antikörper mab<sub>414</sub>-Atto655 (s. Kapitel 2.3.1.2) zusammen mit NTF2-AF568 in das Cytosol von C2C12-Zellen injiziert (s. auch Kapitel 2.1.4.2). Der Injektionsmix enthält dabei  $50 \text{ nM}$  mab<sub>414</sub>-Atto655 in PBS. Zunächst wird die Ortsstabilität der Zelle überprüft, indem das NTF2-Signal in der Kernäquatorebene unmittelbar nach der Mikroinjektion und 3 min später aufgenommen wird. Kommt es in diesem Zeitraum zu einer mit bloßem Auge feststellbaren Drift, so wird die Zelle verworfen. Bei nicht erkennbarer Drift wird die Kernoberseite anhand des NTF2-Signals in den Fokus gebracht. Wegen der chromatischen Abberation des Mikroskopaufbaus wird die Feineinstellung der mab<sub>414</sub>-Atto655-Fokusebene anschließend bei nur sehr geringer Laserleistung anhand des Atto655-Signals vorgenommen. Durch Abbildung der Kernoberseite können daraufhin zahlreicher, an der Kernmembran immobilisierte Fluorophore beobachtet werden. Die prinzipiell ebenfalls mögliche Abbildung der Kernunterseite oder des Kernäquators zur Analyse der immobilisierten Fluorophore bringt verschiedene Nachteile mit sich und wird daher hier nicht gewählt. Nun werden für verschiedene Anregungsintensitäten Filme mit

einer Bildrate von 0,9983 Hz aufgezeichnet, welche das Bleichen sämtlicher sich im Kameragesichtsfeld befindender Moleküle dokumentieren.

Die Auswertung der Filme erfolgt analog Kapitel 2.3.5.1 und 2.3.5.3, wobei die Filme jedoch wegen der Inhomogenität der Zellproben zuvor mit ImageJ (s. B.6) gefiltert werden müssen, um störendes Hintergrundsignal zu entfernen. Dazu werden die Filme zunächst mit dem Filter sb[5] hintergrundkorrigiert (s. Kapitel 2.1.6). Anschließend wird von den letzten 50 Bildern jedes Films (in denen üblicherweise bereits alle fluoreszenten Moleküle gebleichen sind) ein Bild der mittleren Intensitäten berechnet und vom hintergrundkorrigierten Film subtrahiert. Die so bearbeiteten Filme werden dann zur Auswertung herangezogen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT

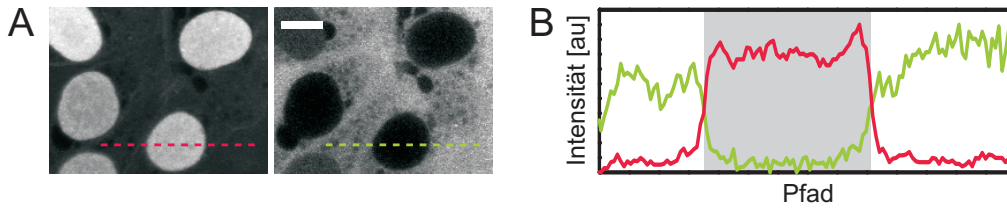
Die Untersuchung des Kerncytoplasmatransports (KCT) erfordert eine besonders hohe Lokalisierungsgenauigkeit, deren Güte unmittelbar mit dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Fluorophors zusammenhängt (s. Kapitel 1.2.2). Hier steht der „klassischen“ Markierung der Substrate mit organischen Fluorophoren o. fluoreszenten Proteinen als Alternative die Markierung mit Quantendots (QDots) gegenüber, welche sich durch ihre Helligkeit und Photostabilität auszeichnen (s. Kapitel 1.1.3). Im Folgenden wird nun die Eignung eines eigens synthetisierten QDots (QD600, T. Basché, Universität Mainz) als Substratmarker für die Analyse des KCT analysiert. Dazu wurde Imp $\beta$ 1, vermittelt über die zu Aufreinigungszwecken am Protein vorliegende 6-fach His-Sequenz (6xHis), an die QD600 (s. Anhang B.4) gebunden und in permeabilisierten Zellen untersucht.

Um einen Eindruck von der Funktionalität des Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten Zellen zu erhalten und damit auch über eine Referenz für die eigentlichen QD600-Imp $\beta$ 1-Experimente zu verfügen, wurde als erstes die Verteilung von Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten Zellen untersucht (Kapitel 3.1.1). Danach erfolgte die Untersuchung des Substrats (QD600-Imp $\beta$ 1) in permeabilisierten Zellen (Kapitel 3.1.2). Um den Einfluss unspezifischer Bindungen der QD600 auf dieses Experiment zu klären, schloss sich ein Kontrollexperiment an, welches in Kapitel 3.1.3 vorgestellt wird. Schließlich wurden einzelne QD600-Imp $\beta$ 1 mit dem hochsensitiven Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskop in permeabilisierten Zellen abgebildet – Kapitel 3.1.4 zeigt die dabei erhaltenen Ergebnisse.

#### 3.1.1 Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten C2C12-Zellen

Die Funktionalität des Imp $\beta$ 1 wurde durch konfokale Abbildung der Verteilung des mit Cy5 markierten Proteins in permeabilisierten Zellen überprüft.

Imp $\beta$ 1 ist als löslicher Kernimportrezeptor in der Lage, den Kernporenkomplex zu passieren, wobei es dadurch in permeabilisierten Zellen zu einer Anreicherung des Proteins im Zellkern kommt [Miyamoto et al., 2002]. Da Proteine sehr empfindlich auf die Expressionsbedingungen und den Markierungsprozess reagieren können, kann nicht ohne Weiteres von einem intakten Protein ausgegangen



**Abbildung 3.1: Verteilung von Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten C2C12-Zellen.** Konfokale Aufnahmen der Situation 15 min. nach Zugabe des Substratgemischs zu den Zellen (vgl. Kapitel 2.2.4). **A** Links: Die erhöhte Fluoreszenz von Imp $\beta$ 1-Cy5 in den Zellkernen bestätigt die erwartete Akkumulation des Transportrezeptors. Rechts: Die Fluoreszenz von BSA-AF488 lässt erkennen, dass der Kerndichtigkeitsmarker lediglich im Cytosol und interzellulär vorliegt und indiziert damit intakte Zellkerne. Größenbalken: 10  $\mu$ m. **B** Intensitätsprofile entlang der markierten Pfade in A entsprechend farblich codiert. Der Zellkernbereich ist grau hinterlegt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

werden. Daher galt es zunächst die Kernakkumulation mit der hier verwendeten Präparation des Proteins zu überprüfen. Zudem diente die Untersuchung von Imp $\beta$ 1-Cy5 als Referenz für die nachfolgenden QDot-Experimente, da erwartet wurde, dass die intrazelluläre Verteilung der QD600-Imp $\beta$ 1 bei voller Funktionalität aller beteiligten Komponenten vergleichbar der von Imp $\beta$ 1-Cy5 ist.

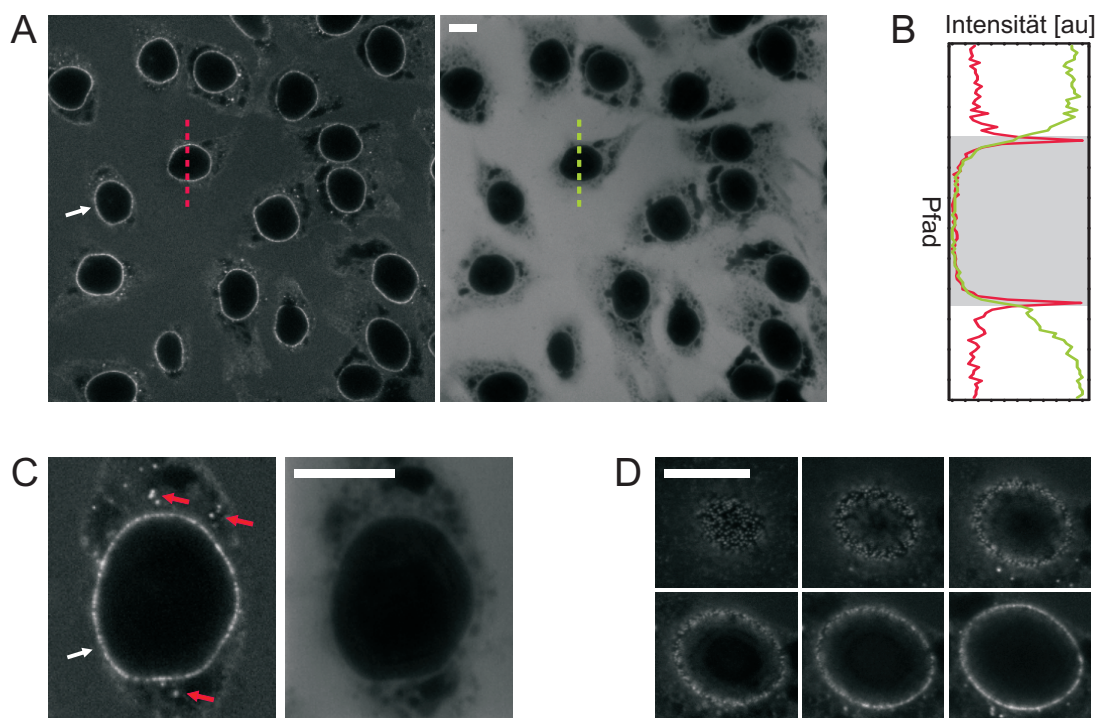
Imp $\beta$ 1-Cy5 wurde daher zusammen mit dem Dichtigkeitsmarker BSA-AF488 (vgl. 2.1.4.3) auf frisch permeabilisierte Zellen gegeben (s. Kapitel 2.2.4) und die Verteilung der beiden Proteine in festen Zeitabständen konfokal abgebildet. Abbildung 3.1 A zeigt im linken Bild die 15 min nach Zugabe der Proteine vorliegende Verteilung des Imp $\beta$ 1-Cy5 und im rechten Bild die Fluoreszenz von BSA-AF488. Im rechten Bild ist zu erkennen, dass die drei gezeigten Kerne zum Zeitpunkt der Aufnahme intakt waren, da der Dichtigkeitsmarker im Zellkern nicht detektiert wurde. Die linke Abbildung zeigt in allen Zellkernen eine im Vergleich zum Cytosol bzw. interzellulären Raum deutlich erhöhte Fluoreszenz für Imp $\beta$ 1-Cy5. Es kam demnach zur erwarteten Akkumulation des Rezeptors im Zellkern. Diese qualitative Aussage wird durch die in B dargestellten Profilverläufe verdeutlicht. Darin sind jeweils farblich codiert die Intensitätsverläufe zu den in A eingezeichneten Pfaden aufgetragen. Das rote Profil lässt für Imp $\beta$ 1-Cy5 (rot) im Kern deutlich höhere Intensitätswerte als im weiß hinterlegten Bereich außerhalb des Kerns erkennen.

Damit konnte gezeigt werden, dass das vorliegende Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten Zellen im Zellkern akkumulierte und somit über die erwartete Funktionalität verfügte. Aus diesem Grund wurde es für die weitere Umsetzung mit den QD600 verwendet.

### 3.1.2 QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen

Nach der Funktionsüberprüfung des mit dem organischen Fluorophor Cy5 markierten Imp $\beta$ 1 wurden QD600 mit Imp $\beta$ 1 in der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Weise umgesetzt und das Substrat in permeabilisierten Zellen untersucht (s. Kapitel 2.2.5). Abbildung 3.2 enthält die zugehörigen konfokalen Aufnahmen, die einen Eindruck der Verteilung der QD600-Imp $\beta$ 1 im Ensemble-Experiment geben.





**Abbildung 3.2: Verteilung von QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen.** Konfokale Aufnahmen der Situation ca. 15 min nach Zugabe des Substratgemischs. Alle Größenbalken: 10  $\mu$ m. **A** Links: Fluoreszenzsignal der QD600-Imp $\beta$ 1. Die mit Pfeil markierte Zelle ist in **C** vergrößert dargestellt. Rechts: BSA-AF488 als Kerndichtigkeitsmarker. **B** Intensitätsprofil entlang der in **A** markierten Pfade entsprechend farblich codiert. Der Zellkernbereich ist grau hinterlegt. **C** Vergrößerung der mit Pfeil markierten Zelle aus **A**. Links: Fluoreszenz der QD600-Imp $\beta$ 1. Die roten Pfeile markieren einige im Cytosol immobilisierte QDots, der weiße Pfeil deutet auf die „perlenkettenartige“ Markierung im Bereich der Kernmembran. Rechts: BSA-AF488 als Indikator für die Kerndichtigkeit. **D** z-Bildstapel eines mit QD600-Imp $\beta$ 1 markierten Zellkerns beginnend am Kernboden und endend auf Kernäquatorebene. Abstand zwischen den Bildern jeweils 1  $\mu$ m

Abbildung 3.2 A gibt eine Übersichtsaufnahme wieder, welche im linken Teil die Fluoreszenz der QD600-Imp $\beta$ 1 und rechts die Dichtigkeitskontrolle BSA-AF488 zeigt. Die Ausgrenzung des BSA aus den Zellkernen bestätigt, dass sämtliche Zellkerne im Bildausschnitt intakt sind. Im linken Bild von Abbildung 3.2 A ist eine erhöhte Fluoreszenz der QD600-Imp $\beta$ 1 im Randbereich der Zellkerne zu erkennen. Deutlich zu entnehmen ist diese Anreicherung auch in den in Abbildung 3.2 B exemplarisch dargestellten Intensitätsprofilen entlang der durch den Zellkern aus **A** laufenden, entsprechend farblich codierten Pfade (Kernbereich grau hinterlegt). Sie lassen erkennen, dass die BSA-AF488-Fluoreszenz am Übergang von Cytosol zu Nucleus, und damit im Bereich der Kernmembran, stark abnimmt wohingegen die Fluoreszenz der QD600-Imp $\beta$ 1 gerade dort über ein ausgeprägtes Maximum verfügt. Abbildung 3.2 C, zeigt in einer Vergrößerung den in **A** mit Pfeil markierten Zellkern. Sie lässt erkennen, dass sich die QDots im Bereich der Kernmembran nicht durchgängig anlagern, sondern ein Art „perlenkettenartiges“ Markierungsmuster vorliegt (weißer Pfeil). Dies zeigen z. B. auch Hela-POM121-GFP-Zellen, bei denen das Kernporenprotein POM121 stabil als GFP-Fusion exprimiert wird [Kubitscheck et al., 2005]. Die Abbildung lässt zudem erkennen, dass ein geringer Anteil der QD600-Imp $\beta$ 1 im Cytosol immobilisiert

wird (roter Pfeil). Der in Abbildung 3.2 D dargestellte z-Stapel eines mit QD600-Imp $\beta$ 1 inkubierten Zellkerns, zeigt von der Kernuntersseite ausgehend bis in die äquatoriale Kernebene reichend, die durchgehende Markierung der Kernmembran mit den funktionalisierten Nanopartikeln.

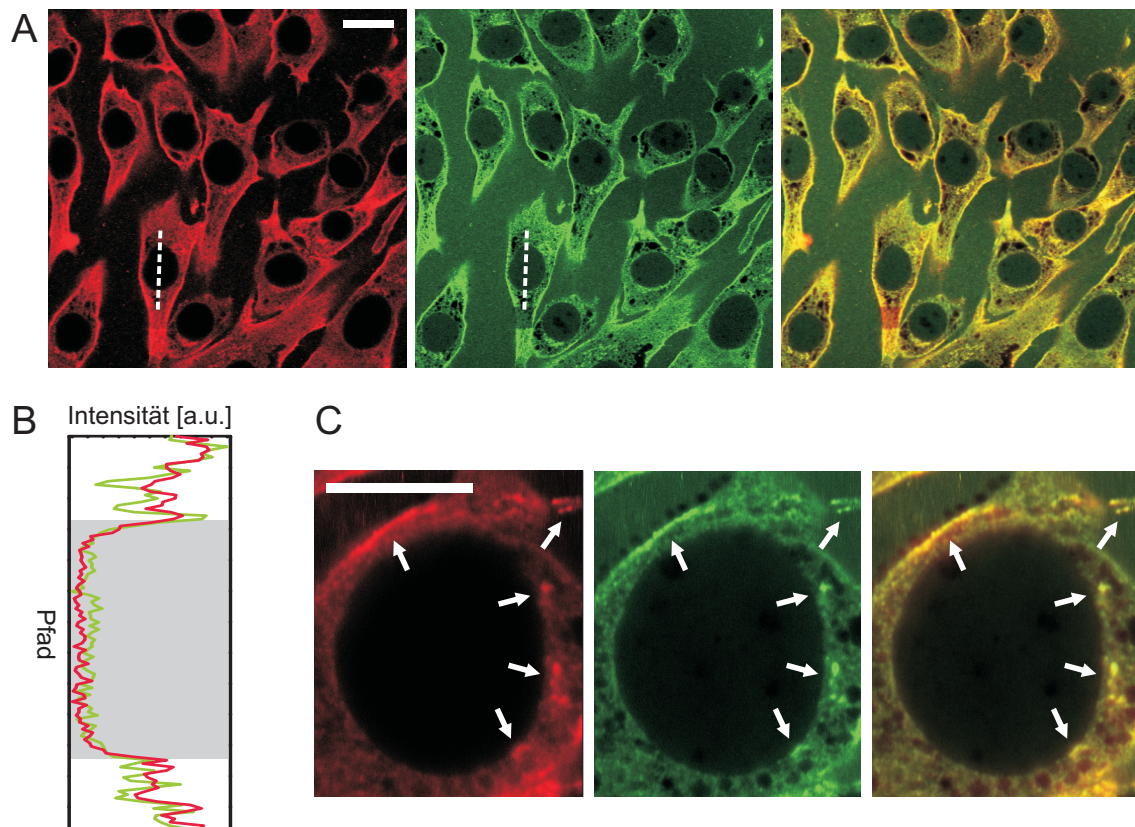
Der bis hierhin gewonnene Eindruck von der Verteilung der QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten Zellen deutete auf eine spezifische Interaktion der QDots mit Strukturen der Kernmembran hin. Ein Hinweis auf intranucleäre QDots konnte jedoch nicht gefunden werden. Um nachfolgend nun zunächst zu klären ob möglicherweise eine unspezifische Bindung der QDot vorlag, schloss sich hierzu ein Kontrollexperiment von GFP-gebundenen QD600 an (s. folgendes Kapitel). Die „Suche“ nach intranucleären QDots sollte durch eine Abbildung der Probe mit dem im Vergleich zum LSM weitaus sensitiveren Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

### 3.1.3 QD600-GFP in permeabilisierten C2C12-Zellen

Nachdem die im vorigen Kapitel vorgestellten Ergebnisse für QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten Zellen eine signifikante Interaktion mit der Kernmembran gezeigt hatten, musste nun überprüft werden, ob diese spezifischer oder unspezifischer Natur war. Dazu sollten die QD600 in dem im Folgenden beschriebenen Kontrollexperiment statt mit Imp $\beta$ 1 mit einem bezüglich des Kerncytoplasmatransports inerten Protein umgesetzt werden. Als inertes Protein eignete sich aus mehreren Gründen das Grün Fluoreszierende Protein (kurz: GFP): Hierzu waren keine spezifischen Wechselwirkungen mit der Zellkernmembran bekannt, welche z. B. zu einer Akkumulation des GFP an der Membran oder im Kern führen (s. dazu bspw. [Kamata et al., 2005]). Zudem wies die zur Verfügung stehende GFP-Variante die für die Bindung an QD600 nötige 6xHis-Sequenz auf und das Protein ließ sich in größeren Mengen aufreinigen.

Zur Durchführung des Kontrollperiments wurden die QD600 analog der Imp $\beta$ 1-Funktionalisierung mit 6xHis-GFP umgesetzt (s. Kapitel 2.2.3) und ihre Verteilung in permeabilisierten C2C12-Zellen untersucht (s. Kapitel 2.2.6). Abbildung 3.3 A dokumentiert die Verteilung der QD600-GFP in permeabilisierten Zellen. Die QD-Fluoreszenz im linken Bild zeigt, dass die Nanopartikel bevorzugt im Cytosol der Zellen lokalisiert sind, wohingegen die Zellkerne und der interzelluläre Bereich völlig von ihnen ausgespart erscheinen. Der Aufnahme ist keine verstärkte Wechselwirkung der QD600-GFP mit der Kernmembran zu entnehmen, wie sie für QD600-Imp $\beta$ 1 beobachtet worden war. Dies verdeutlicht das in Abbildung 3.3 B exemplarisch aufgeführte Intensitätsprofil (rot), welches die Intensitäten entlang des in A im linken Bild eingezeichneten Pfads wiedergibt. In den Randbereichen des Zellkerns ist, anders als mit QD-Imp $\beta$ 1, kein Intensitätsmaximum zu erkennen.

Offen war allerdings noch die Frage, ob das 6xHis-GFP überhaupt an die QD600 gebunden vorlag. Um dies zu beurteilen, sollen Abbildung 3.3 A und die Bilder in C, welche einen vergrößerten Zellkern



**Abbildung 3.3: Verteilung von QD600-GFP in permeabilisierten C2C12-Zellen.** Konfokale Aufnahmen, Größenbalcken 10  $\mu\text{m}$ . **A** Links: Falschfarbendarstellung der QD-Fluoreszenz der QD600-GFP. Mitte: Falschfarbendarstellung der GFP-Fluoreszenz der QD600-GFP. Rechts: Überlagerung der beiden Bilder links und Mitte zur Verdeutlichung der Kolo-kalisierung. Die Abbildung zeigt durch die überwiegend gelbe Färbung (Mischfarbe rot/grün) der dargestellten Strukturen, dass die Fluoreszenz der beiden Einzelbilder räumlich gleich verteilt ist. **B** Die Intensitätsverläufe der in A markierten Pfade entsprechend farblich codiert. Der Zellkernbereich ist grau hinterlegt. **C** Diese zu Abbildung A analoge Darstellung zeigt die Vergrößerung eines Zellkerns. Die Pfeile weisen auf markante Strukturen (v. a. Aggregate), die sowohl in der Abbildung der QD600- als auch der GFP-Fluoreszenz in gleicher Ausprägung zu erkennen sind. Die rechts dargestellte Überlagerung der beiden Bilder (links und Mitte) lässt die Kolo-kalisierung der Strukturen aus beiden Fluoreszenzkanälen in Form der überwiegend gelben Einfärbung erkennen.

zeigen, herangezogen werden. Das linke Bild zeigt wiederum die Fluoreszenz der QDots, mittig ist die des GFP zusehen und rechts ein Überlagerung beider. In den Bildern sind einige charakteristische Strukturen jeweils mit Pfeilen markiert. Diese lassen sich allesamt sowohl im roten QD600-Bild als auch im grünen GFP-Bild wiederfinden. Das Mischbild zeigt durch den hohen Gelbanteil (Mischung aus grün und rot) in der gesamten Darstellung und besonders bei den zuvor erwähnten Strukturen, dass eine qualitative Kollokalisierung von QD600 und GFP vorgenommen werden konnte.

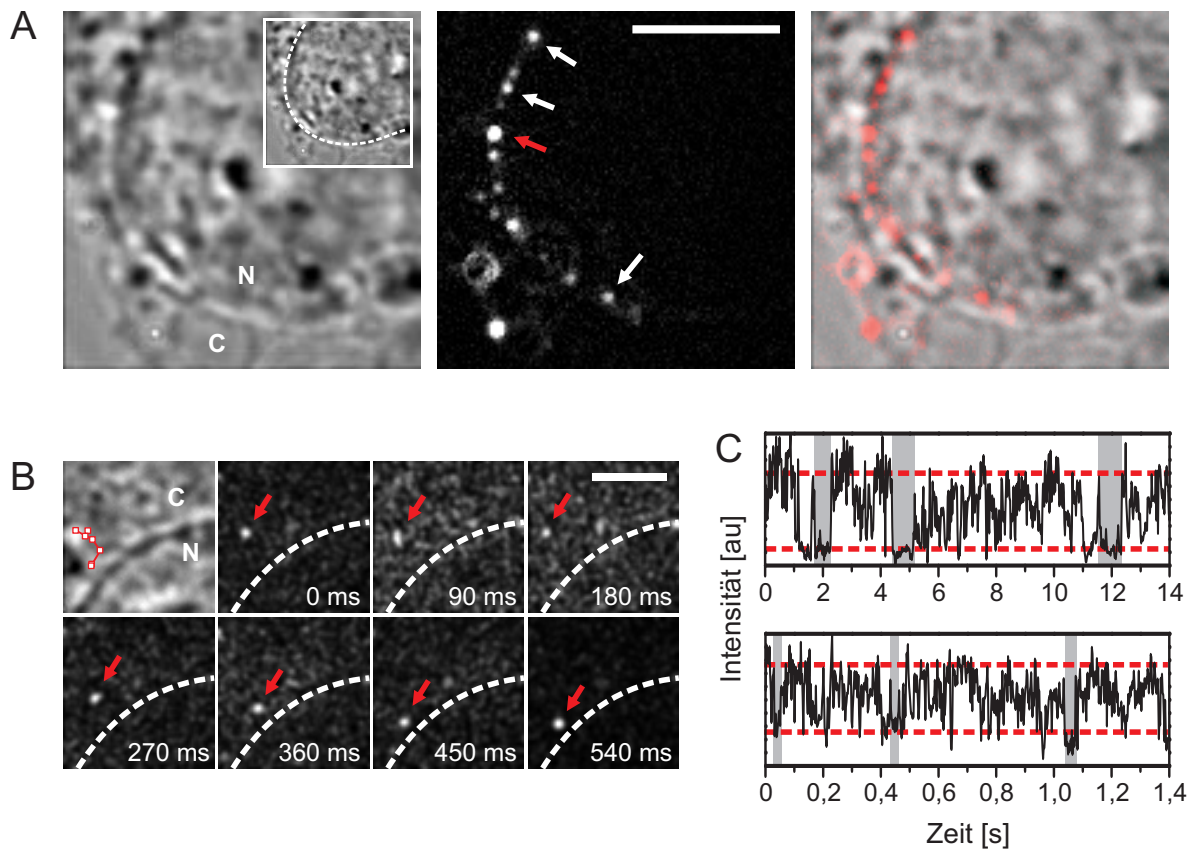
Das in diesem Kapitel vorgestellte Kontrollexperiment gibt also durch eine fehlende Wechselwirkung der QD600-GFP mit der Kernmembran einen Anhaltspunkt dafür, dass die im Kapitel zuvor gezeigte Interaktion der QD600-Imp $\beta$ 1 mit der Kernmembran als spezifische Wechselwirkung der Sonde mit den Kernporen betrachtet werden kann.

### **3.1.4 Einzelne QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen**

Die vorangegangenen Ensemble-Experimente mit QD600 hatten zunächst zeigen können, dass QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten Zellen eine durch Imp $\beta$ 1 vermittelte Interaktion mit der Kernmembran eingingen (vgl. Kapitel 3.1.2). Weiterhin konnte diese Interaktion aufgrund des Kontrollperiments mit QD600-GFP als spezifische Wechselwirkung eingestuft werden (vgl. Kapitel 3.1.3). Damit stand eine potentielle Sonde zur Untersuchung des Kerncytoplasmatransports zur Verfügung, die allerdings in den Ensemble-Experimenten aus Kapitel 3.1.2 bisher keinen Transport in den Zellkern gezeigt hatte. Das sensitive EMFM sollte weiteren Aufschluss bieten – einzelne intranucleäre QDots sollten sich hiermit detektieren lassen.

Zur Durchführung der Experimente am EMFM wurden die QD600-Imp $\beta$ 1 frisch präpariert und in hoher Verdünnung auf permeabilisierte Zellen gegeben bevor sie auf die EMCCD-Kamera abgebildet wurden (vgl. Kapitel 2.2.5 und 2.1.5.2). Typische aus diesen Messungen erhaltene Daten werden in Abbildung 3.4 vorgestellt und im Folgenden erläutert. Abbildung 3.4 A zeigt links das Durchlichtbild des am EMFM beobachteten Teils einer permeabilisierten C2C12-Zelle. Der Verlauf der Zellkernmembran ist deutlich als mehrere Pixel breite, bogenförmig von rechts unten nach oben links laufende Struktur zu erkennen. In der verkleinerten Darstellung oben rechts ist die Membran zur Verdeutlichung mit einer gestrichelten Linie nachgezeichnet. Um diese relativ kontrastreiche Abbildung der Membran zu erzielen, wurde die Fokusebene leicht über bzw. unter den Äquator verschoben. Dadurch stellt die Membran sich allerdings als breitere Struktur dar und eine präzise Kollokalisierung mit dem Fluoreszenzkanal ist nicht mehr möglich. Für die qualitative Beurteilung der Experimente wurde die hier verwendete Technik zur Abbildung der Membran jedoch als ausreichend erachtet. In der Mitte ist derselbe Ausschnitt bei Fluoreszenzanregung abgebildet – er zeigt das aus 500 Einzelbildern der QD600-Imp $\beta$ 1-Fluoreszenzemission aufsummierte Bild (Integrationszeit je Bild 10 ms). Der Großteil





**Abbildung 3.4: Einzelne QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen.** **A** Links: Das Durchlichtbild zeigt den Ausschnitt eines C2C12-Zellkerns. Um den Verlauf der Kernmembran zu illustrieren, ist dieser als gestrichelte Linie in die verkleinerte Darstellung desselben Zellausschnitts oben rechts eingezeichnet. Mitte: Fluoreszenz einzelner QD600-Imp $\beta$ 1 (beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet), selber Ausschnitt wie links, Einzelbild mit einer Integrationsdauer von 10 ms. Der rote Pfeil kennzeichnet ein Signal, welches möglicherweise von einem Aggregat mehrerer QDots stammt. Bildbearbeitung: ec[0.4], sb[5], ec[0.6]. Rechts: Überlagerung der Bilder links und Mitte (Falschfarbe rot), bei welcher die Position der einzelnen QD relativ zur Kernmembran deutlich wird. Größenbalken: 5  $\mu$ m, N=Nucleus, C=Cytosol. **B** Trajektorie eines an die Kernmembran bindenden QDots, Größenbalken 2  $\mu$ m. Das Durchlichtbild oben links zeigt einen Zellbereich, bei dem das Anbinden eines QD600-Imp $\beta$ 1 beobachtet werden konnte – die Trajektorie aus sieben Einzelpositionen ist eingezeichnet. Nachfolgend sind von links nach rechts die einzelnen EMFM-Bilder (Integrationszeit 10 ms) gezeigt, aus denen die Trajektorie ermittelt wurde. Zwischen den Bildern liegen jeweils 90 ms. Die gestrichelte Linie zeigt den aus dem Durchlichtbild in B abgeleiteten ungefähren Verlauf der Kernmembran. Der in diesem Experiment verwendete Transportpuffer enthielt zur Erhöhung der Viskosität 25% Glycerin. Bildbearbeitung: sb[2], gb[1]. **C** Die Intensitätsverläufe zweier an die Kernmembran gebundener QD600-Imp $\beta$ 1 zeigen das für die Nanopartikel typische Blinken auf unterschiedlichen Zeitskalen. Die roten, gestrichelten Linien geben in etwa die Niveaus wieder, die jeweils dem „an“- bzw. „aus“-Zustand des Nanopartikels entsprechen. Grau hinterlegt sind exemplarisch einige „aus“-Phasen.

der zu erkennenden QD600-Imp $\beta$ 1 bindet im Bereich der Kernmembran, deren Verlauf sich durch die relativ dichte Besetzung mit Nanopartikeln deutlich abzeichnet. Diese perlenkettenartige Anordnung der QD600-Imp $\beta$ 1 entlang der Zellkernmembran wird besonders deutlich in dem in Abbildungsteil A rechts gezeigten Mischbild aus Durchlichtbild (grau) und QD-Fluoreszenz (rot) und entspricht den im Ensemble-Experiment gemachten Beobachtungen (s. Kapitel 3.1.2). Anhaltspunkte, dass es sich bei den an der Kernmembran lokalisierten Partikeln um einzelne QDots und nicht etwa um aggregierte Spezies handelte, lieferten für einige der Partikel die zeitlichen Intensitätsverläufe, die für zwei QDots exemplarisch in Abbildungsteil C dargestellt sind. Sie zeigen das für QDots typische Blinken, bei dem die Nanopartikel immer wieder vom fluoreszierenden „an“-Zustand in einen nicht-fluoreszierenden „aus“-Zustand übergehen und damit vorübergehend gelöscht erscheinen [Shimizu et al., 2001]. Einige dieser „aus“-Phasen sind zur Verdeutlichung in C grau hinterlegt, wobei die ungefähre Lage des „an“- bzw. „aus“-Intensitätsniveaus durch die gestrichelten Linien angedeutet ist. Schwankt die Emissionsintensität des Partikels nun mit der Zeit immer zwischen Hintergrundniveau („aus“) und *einem* festen Intensitätsniveau („an“), so handelt es sich bei dem detektierten Fluorophor um einen einzelnen QD – dies war für die gezeigten Profile der Fall und konnte auch für andere QD600-Imp $\beta$ 1 an der Kernmembran beobachtet werden.

Nachdem einzelne QD600-Imp $\beta$ 1 an der Kernmembran lokalisiert worden waren, sollte die Mobilität der Nanopartikel bezüglich des Kernimports untersucht werden. Ein erfolgreicher Importvorgang kann dabei intuitiv in drei Teilschritte gegliedert werden:

1. In Cytosol diffundierendes Substrat bindet an Kernporenkomplex
2. Substrat wird rezeptorvermittelt transportiert
3. Substrat löst sich auf Kernseite vom Kernporenkomplex und diffundiert ins Nucleoplasma

Die Analyse des Kerncytoplasmatransports umfasst idealerweise die Beobachtung von Ereignissen, bei denen *alle* drei Schritte zeitlich und räumlich ausreichend gut aufgelöst werden können. Bei den hier abgebildeten QD600-Imp $\beta$ 1 konnte wenig Mobilität festgestellt werden: Für einen im Cytosol diffundierenden QD600-Imp $\beta$ 1 konnte das Anbinden im Bereich der Kernmembran (Teilschritt 1) abgebildet werden (der Transportpuffer enthielt hier 25% Glycerol, um die Partikeldiffusion zu verlangsamen). Die zugehörige Trajektorie ist in Abbildung 3.4 B in Einzelbildern dargestellt. Das erste Bild oben links gibt dabei das entsprechende Durchlichtbild mit deutlich zu erkennendem Verlauf der Kernmembran wieder (vgl. Abbildungsteil A) und zeigt zudem – rot eingezeichnet – die Positionen der Trajektorie. Nachfolgend sind die einzelnen Fluoreszenzbilder dargestellt, anhand derer die Partikelpositionen ermittelt worden waren, wobei der beobachtete QDot jeweils mit einem roten Pfeil markiert ist. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Bildern beträgt 90 ms. Nachdem die Bindung des Partikels im Bereich der Kernmembran etwa 540 ms nach erstmaliger Detektion im Cytosol erfolgt war, konnte

Probe	$d_h$ [ nm ]	N [Sprünge]
QD600 (pH 7,3)	$35 \pm 3$	2215
QD600-Imp $\beta$ 1 (pH 7,3)	$39 \pm 3$	2822

**Tabelle 3.1: Hydrodynamische Durchmesser als Resultat der Diffusionsanalyse für QD600 und QD600-Imp $\beta$ 1.**  
 $d_h$ : hydrodynamischer Durchmesser, N: Anzahl ausgewerteter Sprünge.

er dort weitere 3,8 s bis zum Filmende lokalisiert werden. Weder wurde ein Kernporendurchtritt in Richtung Nucleoplasma und dortiges Ablösen beobachtet (Teilschritte 2 und 3) noch löste sich der Partikel von der Kernmembran um wieder ins Cytosol zu diffundieren. Das Ablösen eines QDots von der Kernmembran wurde in keinem der aufgenommenen Filme detektiert, so dass Teilschritt 3 damit unbeobachtet blieb. Die an der Kernmembran detektierten Partikel verblieben für die gesamte Dauer des jeweiligen Films (5-20 s) an derselben Stelle, so dass sich die mit der Kernmembran interagierenden QD600-Imp $\beta$ 1 hier als immobil darstellten. Trotz der fehlenden Beobachtung von Teilschritt 3, war nicht auszuschließen, dass unbeobachtet Transport stattgefunden hatte. Um dies zu verifizieren, wurde das Nucleoplasma gezielt auf QDots hin untersucht, da hier vorkommende QD600-Imp $\beta$ 1 als Hinweis auf einen erfolgreichen Kernimport der Partikel verstanden werden musste. Diese Schlussfolgerung gilt jedoch nur für den Fall eines intakten Zellkerns. Da eine Dichtigkeitskontrolle bei Einzelmolekül-experimenten jedoch wegen der resultierenden Hintergrundfluoreszenz nicht vorgesehen ist, kann der Fund intranucleärer Fluoreszenz nur als Hinweis auf Kernporen-Transport aufgefasst werden. Die Durchsicht sämtlicher Filme ließ jedoch in keinem der 10 Zellkerne QDots erkennen.

### 3.1.5 Hydrodynamische Durchmesser der QD600-Imp $\beta$ 1

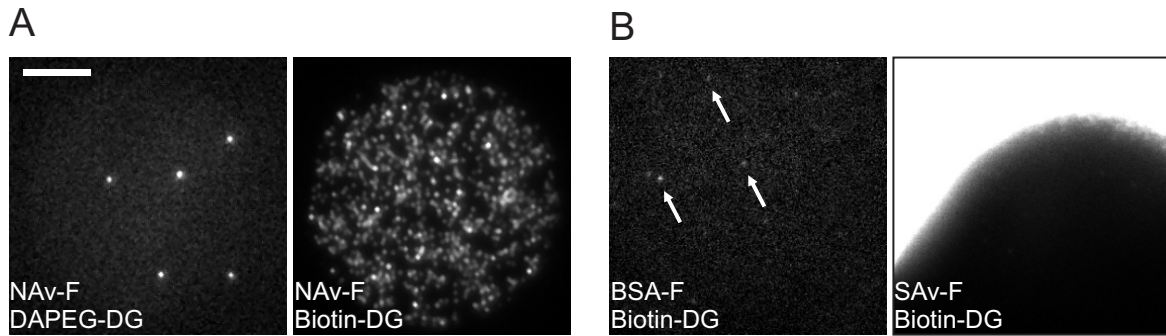
Um einen Eindruck von der Größe der reinen und der funktionalisierten QDots zu erhalten, waren die hydrodynamischen Durchmesser der QD600 und QD600-Imp $\beta$ 1 per MSD-Analyse (s. Kapitel 2.2.7) bestimmt worden. Die dabei erhaltenen mittleren Durchmesser sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

## 3.2 Das Photobleichen einzelner immobilisierter Fluoreszenzfarbstoffe

Für sechs kommerziell erhältliche Fluoreszenzfarbstoffe wurde mittels EMFM zum einen die Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  und zum anderen die Zahl der innerhalb von  $\tau_\Lambda$  emittierten Photonen  $\mathcal{N}$  jeweils in Abhängigkeit von der Anregungsintensität bestimmt. Dazu wurde eine Methode etabliert, welche die gezielte Immobilisierung der Farbstoffmoleküle auf einer geeigneten Oberfläche ermöglichte, um einzelne Fluorophore in stationärem Zustand beobachten zu können.

Das folgende Kapitel beschreibt zunächst die indirekte Immobilisierung von Farbstoffmolekülen am





**Abbildung 3.5: Überprüfung der unspezifischen und spezifischen Bindung an beschichtete Deckgläser.** **A** Links ist die typische Partikeldichte auf einem mit 15 nM NAV-Atto647N inkubierten DAPEG-Deckglas dargestellt. Rechts zum Vergleich die typische Partikeldichte für den Fall, bei dem unter sonst gleichen Bedingungen wie links ein Biotin-Deckglas mit NAV-Atto647N inkubiert worden war. Bildbearbeitung: med[1], ec[0.1]. **B** Links ist ein Biotin-DG nach Inkubation mit 100 nM BSA-AF488 zu sehen. Es lassen sich nur wenige Partikel auf der Oberfläche ausmachen (s. Pfeile). Rechts *dasselbe* Deckglas wie links nach Inkubation mit SAV-Cy5 und Waschen mit Puffer. Die Oberfläche ist so dicht mit Emitttern belegt (oberer Bildbereich), dass erst nach längerem Bleichen bei voller Laserpower ein nahezu fluoreszenzfreier Bereich erhalten wird (unterer Bereich). Bildbearbeitung: ec[0.5], med[1], gam[1.5] Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

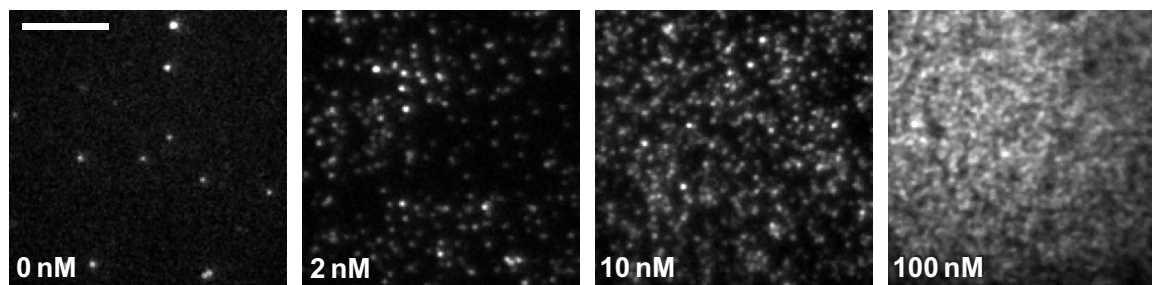
Deckglas. Anschließend werden die ermittelten Werte für Bleichzeit  $\tau_{\Lambda}$  und Photonezahl  $\mathcal{N}$  für die immobilisierten Fluorophore vorgestellt (Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.3). Schließlich werden die Ergebnisse der exemplarischen Untersuchung des Fluoreszenzfarbstoffs Atto655 in Lebendzellen gezeigt (Kapitel 3.2.4).

### 3.2.1 Biotin-Neutravidin vermittelte Immobilisierung der Farbstoffmoleküle

Die Untersuchung des Photobleichens erfolgte, indem die Farbstoffmoleküle in Neutravidin-gebundener Form (NAV-F, s. Kapitel 2.3.1.1) auf einer modifizierten Deckglasoberfläche immobilisiert und am EMFM abgebildet wurden (s. Kapitel 2.3.3 bzw. 2.3.4).

In einem Vorversuch wurden die NAV-bindenden Eigenschaften eines Biotin-DG mit dem eines DAPEG-DG (s. Kapitel 2.3.3.1) verglichen, um das Ausmaß unspezifischer Bindungen von NAV an die DAPEG-Oberfläche zu erfassen. Dazu wurden ein DAPEG- und ein Biotin-DG, jeweils mit einer 15 nM, also vergleichsweise hoch konzentrierten, NAV-Atto647N-Lösung inkubiert (s. Kapitel 2.3.3.3) und am EMFM abgebildet. Abbildung 3.5 A gibt je einen typischen Bereich der beiden Deckgläser wieder. Dem linken Bild ist die Partikeldichte des DAPEG-Deckglases zu entnehmen. Sie liegt im Mittel bei etwa 5 im Kameragesichtsfeld detektierbaren Fluorophoren und ist damit im Bereich der Anzahl intrinsisch vorhandener, fluoreszenter Partikel angesiedelt (vgl. Abbildung 3.6 (0 nM)). Im Vergleich dazu weist die Oberfläche des Biotin-Deckglases (Abbildung 3.5 A, rechts) bei gleicher Behandlung eine sehr hohe Fluorophor-Dichte auf (Randbereiche wegen der Beleuchtungsbegrenzung durch die Irisblende ohne Signal, vgl. Abbildung 3.10).

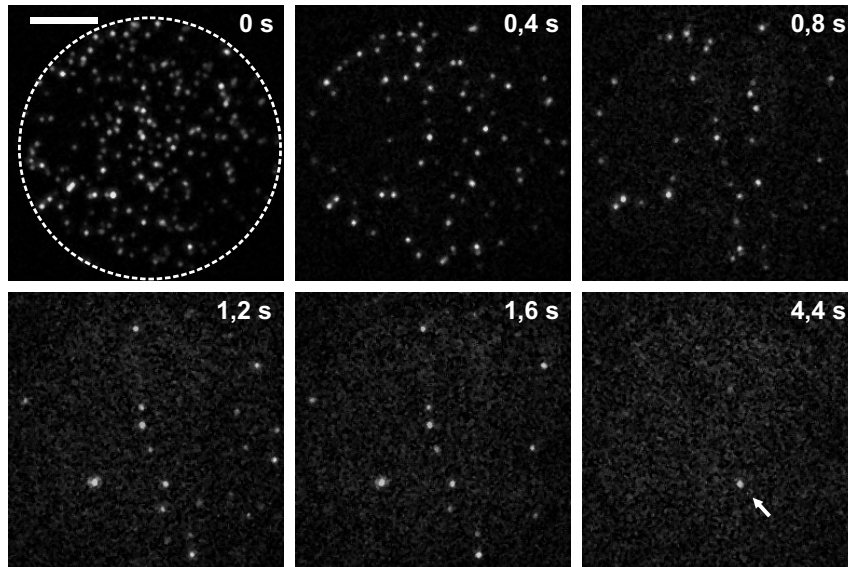
Weiterhin wurden auch die Biotin-DG auf unspezifisches Binden von Proteinen untersucht. Dazu wurde ein Biotin-DG mit einer 100 nM BSA-AF488-Lösung inkubiert, gewaschen und analysiert. Ab-



**Abbildung 3.6: Steuerung der Fluorophordichte durch Inkubation mit unterschiedlich konzentrierten NAV-AF546-Inkubationslösungen.** Versuchsreihe, bei der NAV-AF546 ausgehend von verschiedenen Ausgangskonzentrationen der jeweiligen Inkubationslösung auf unterschiedlichen Bereichen eines Biotin-Deckglases immobilisiert wurde. Die Ausschnitte zeigen typische Partikeldichten, die bei Inkubation des Biotin-Deckglases mit den jeweils unten links angegebenen NAV-AF546-Konzentrationen erhalten wurden. Bildbearbeitung (s. 2.1.6): med[2], ec[0.1], Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 3.5 B gibt links die Partikeldichte dieser Kontrolle wieder: Die Oberfläche ist nahezu frei von Signalen. Dasselbe Deckglas wurde anschließend gründlich mit Puffer gespült, mit einer 100 nM Streptavidin-Cy3-Lösung überschichtet, gewaschen und am Mikroskop untersucht – Abbildung 3.5 B zeigt rechts das Ergebnis. Im oberen Bildbereich sieht man einen ungeblichen Teil der Oberfläche, in welchem die Dichte an Emittern so hoch ist, dass sämtliche Pixel übersättigt sind. Die untere Bildhälfte zeigt im Gegensatz dazu einen zuvor bei voller Laserpower geblichenen Bereich. (Anmerkung: Der Unterschied in der Partikeldichte zwischen dieser Oberfläche und der in Abbildung 3.6 rechts Gezeigten, beide wurden mit einer 100 nM SAV/NAV-L-Lösung inkubiert, besteht in der unterschiedlichen Markierungsrate der beiden Avidin-Derivate. NAV lag einfach markiert vor, während zur Markierung von SAV ein hoher Farbstoffüberschuss eingesetzt worden.)

Damit bei einer überschaubaren Anzahl an Filmen eine ausreichende Statistik erstellt werden konnte, sollte jeder abgebildete Bereich möglichst viele Moleküle aufweisen, jedoch ohne dass sich die einzelnen Fluoreszenzsignale überlagerten. Die Bedingungen, unter denen eine solche Oberflächendichte an Farbstoffmolekülen erhalten wird, wurden zunächst durch Inkubation eines Biotin-Deckglases (Biotin-DG, s. Kapitel 2.3.3.2) mit unterschiedlich hoch konzentrierten NAV-AF546-Lösungen ermittelt. Dazu wurde das Deckglas in unterschiedlichen, voneinander abgegrenzten Bereichen mit jeweils einer der NAV-AF546-Inkubationslösungen benetzt (s. Kapitel 2.3.3.3) und die Fluorophordichte in den einzelnen Bereichen anschließend abgebildet. Abbildung 3.6 zeigt typische, für die einzelnen Bereiche mittels EMFM erhaltene Bilder. Das linke Bild gibt die Situation in einem Bereich des biotinylierten DG wieder, welcher lediglich mit PBS inkubiert worden war und stellt damit quasi die Dichte an intrinsisch auf der modifizierten Deckglasoberfläche vorhandenen, fluoreszenten Partikeln dar (im Mittel etwa 10 im Kameragesichtsfeld). Mit steigender NAV-AF546-Konzentration in der Inkubationslösung lässt sich in den folgenden Bildern erkennen, dass die Oberfläche zunehmend dichter mit Fluorophoren besiedelt ist. Die bei Verwendung von 10 nM und 100 nM NAV-AF546-Lösung erhaltene Partikeldichte ist für



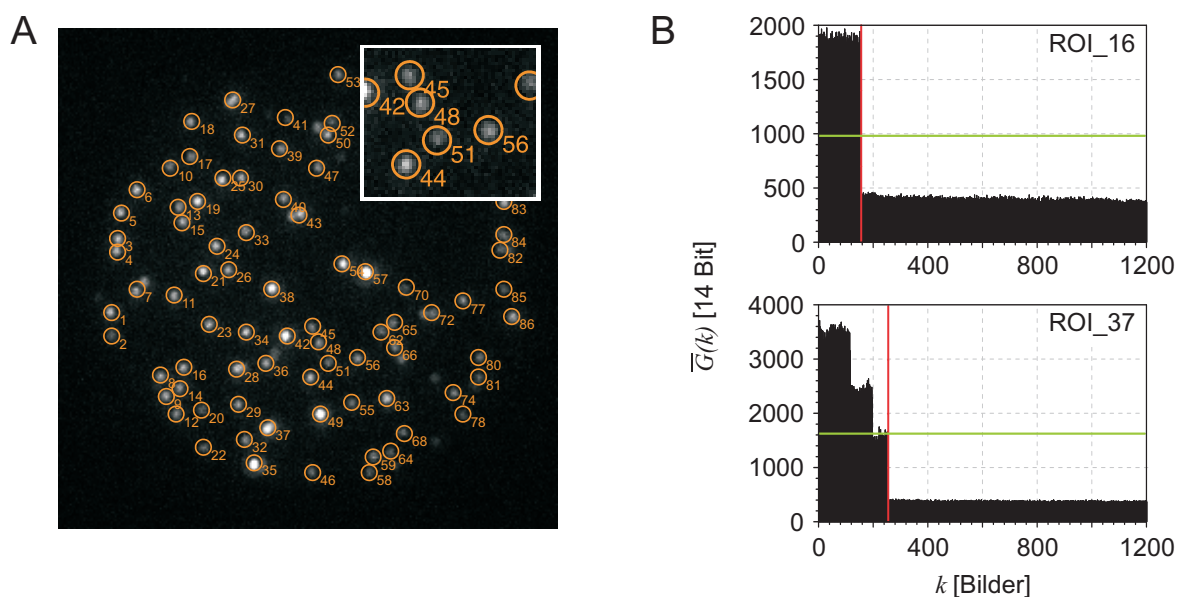
**Abbildung 3.7: Photobleichen von NAV-AF647 in Transportpuffer.** Das erste Bild zeigt die zu Beginn des Films dicht mit fluoreszierenden Partikeln bedeckte Oberfläche. Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf der Beleuchtungsgrenze wieder, welche mit Hilfe der Irisblende (s. Kapitel 2.1.5.2) justiert worden war. Die nachfolgenden Bilder geben die Situation bei intermittierender Anregung zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wieder. Im letzten Bild ist lediglich noch ein Fluorophor im beleuchteten Bereich aktiv. Bildbearbeitung: ec[0.4], sb[10], med[1.0], Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

die Analyse einzelner Fluorophorsignale erkennbar zu hoch – es lassen sich bereits bei der 10 nM Lösung nur noch wenige und bei der 100 nM gar keine isolierten Farbstoffsignale erkennen. Die 2 nM Lösung hingegen erzielte eine Partikeldichte, bei der sich einzelne Signale gut voneinander separieren ließen. Daher wurden im Folgenden sämtliche NAV-Farbstoff-Konjugate, falls nicht anders erwähnt, durch Inkubation einer 2 nM Lösung auf den Biotin-Deckgläser immobilisiert (s. Kapitel 2.3.3.3).

### 3.2.2 Analyse der Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ in Abhängigkeit von der Anregungsintensität $I$

#### 3.2.2.1 Die Bestimmung der Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$

Im vorigen Kapitel wurde gezeigt, dass sich das System Biotin-DG/NAV-Farbstoff zur Analyse des Photobleichens einzelner Fluorophore eignet: NAV-gebundene Farbstoffe lassen sich reproduzierbar, sowohl mit optimaler Dichte als auch spezifisch gebunden, am Biotin-DG immobilisieren. Zudem ist die intrinsische Verunreinigung der Biotin-DG mit fluoreszierenden Partikeln gering. Das System wurde daher für die Photobleichanalyse verwendet, wobei der jeweilige Farbstoff nach der in Kapitel 2.3.3.3 beschriebenen Methode immobilisiert und das Photobleichen bei intermittierender Laseranregung am EMFM aufgezeichnet wurde (s. Kapitel 2.3.4.2). Auf diese Weise wurden die in Kapitel 1.2.4 genannten Farbstoffe jeweils in PBS und TB (Transportpuffer) mit verschiedenen Anregungsleistungen abgebildet. Die resultierenden Filme wurden zunächst bezüglich der Bleichzeit  $\tau_{\Lambda}$  ausgewertet. Insgesamt knapp 28.000 Partikel wurden dazu mit der in Kapitel 2.3.5.1 beschriebenen Methode analysiert.



**Abbildung 3.8: Lokalisierung der Partikel und Auslesen der mittleren Grauwerte  $\bar{G}(k)$  exemplarisch für NAV-Atto647N in Transportpuffer.** **A** Die Lokalisierung der Moleküle erfolgt anhand des ersten Bildes eines Films. Dabei wurde jedem Molekül-ROI eine Nummer zugewiesen. Bildmaße:  $20,5 \times 20,5 \mu\text{m}^2$ . Eingelassen: Ausschnitt des Bildes, 2-fach vergrößert. **B** Zwei Fluoreszenzdiagramme – oben einstufiges und unten mehrstufiges Photobleichen. Die grüne Linie zeigt den Schwellenwert zur Ermittlung des Bleichzeitpunkts an, die rote Linie markiert den vom Skript ermittelten Bleichzeitpunkt.  $\bar{G}(k)$ : mittlerer Grauwert im  $k$ -ten Bild.

Abbildung 3.7 stellt sechs Bilder eines Films dar, welcher das Photobleichen von immobilisiertem NAV-AF647 festhält („Bleichfilm“). Die Sequenz zeigt für einen Bereich des Deckglases das zeitabhängige Photobleichen bei intermittierender Laseranregung. Das erste Bild dokumentiert die Situation bei Aufnahmebeginn. Der beleuchtete Bereich im Zentrum des Bildes lässt zahlreiche, größtenteils gut separierbare Fluoreszenzsignale erkennen. Außerhalb des von der Blende begrenzten Bereichs wird deutlich sichtbar, dass die (in vergleichbarer Dichte auf der Oberfläche vorhandenen) Fluorophore nicht angeregt wurden. Im weiteren zeitlichen Verlauf nimmt die Zahl der Signale ab bis das letzte Bild des Films, 4,4 s nach Aufnahmebeginn, nur noch ein einziges weiterhin fluoreszierendes Molekül enthält (Pfeil). Anhand dieser Bleichfilme erfolgte mit dem eigens erstellten Matlab-Skript die Photobleichanalyse des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs (s. Kapitel 2.3.5.1).

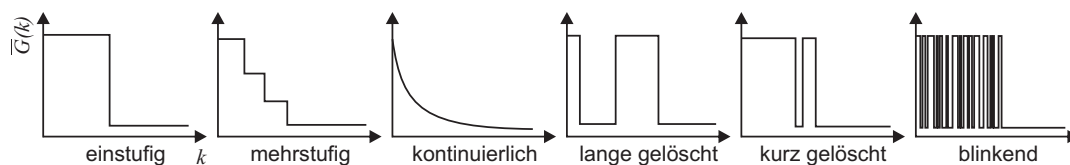
Das Skript gliedert sich in 3 Schritte, die sich zusammenfassend folgendermaßen beschreiben lassen: (1) Einlesen des Bleichfilms – (2) Analyse der Signale – (3) Ausgabe der Ergebnisse. Es wurde auf die insgesamt 776 Bleichfilme angewendet und die Ergebnisse schließlich je Farbstoff/Puffer-Kombination geeignet zusammengefasst und aufbereitet. Im Folgenden werden die drei Schritte anhand eines Datensatzes skizziert:

zu (1) Dem Einlesen des Bleichfilms folgte die Lokalisierung der im ersten Bild sichtbaren Fluorophorsignale. Sie wurde interaktiv vorgenommen, indem der Anwender zunächst geeignete Startwerte für eine erste Positionsermittlung angab und umgehend das Ergebnis einer ersten Lokalisierung



in Form der in Abbildung 3.8 A dargestellten Grafik erhielt. Sie zeigt das erste Bild des jeweiligen Films und die lokalisierten und durch Nummerierung individualisierten Partikel. Die Kreise markieren die vom Skript ermittelten Signalpositionen, wobei das Zentrum eines jeden Kreises der jeweiligen Partikelposition entspricht und damit im weiteren Verlauf Ausgangspunkt für die Positionierung des (rechteckigen) Sg-ROI ist. Der vergrößerte Ausschnitt wurde hier hinzugefügt, um einen Eindruck von der Lokalisierungsgenauigkeit zu geben. Anhand des Bildes musste der Anwender nun entscheiden, ob zum einen die Mehrzahl der Partikel ( $\sim 90\%$ ) erfasst wurde und dies zum anderen mit einer Genauigkeit sinnvoll (der Kreis überdeckt mindestens etwa 75% des Signals) lokalisiert worden war oder ob nach einer Anpassung der Parameter eine erneute Lokalisierung durchgeführt werden musste. Da auf eine subpixelgenaue Lokalisierung verzichtet wurde, kam es nicht immer zu einer optimalen Deckung von Markierung und Signal – ein Umstand, der für die Bleichanalyse jedoch unerheblich war, da durch obiges Kriterium genügend Signalpixel erfasst wurden, um ein aussagekräftiges Fluoreszenzdiagramm erstellen zu können (s. Schritt(2)). Insgesamt kann festgehalten werden, dass die zur Lokalisierung implementierte Funktion eine den obigen Kriterien entsprechende Lokalisierung für alle hier untersuchten Filme vornehmen ließ.

zu (2) Die in diesem Schritt vorgenommene eigentliche Datenanalyse stütze sich im Wesentlichen auf das zu jedem lokalisierten Partikel erstellte Fluoreszenzdiagramm bzw. die seiner Erstellung zugrunde liegenden mittleren Grauwerte  $\bar{G}(k)$  im jeweils  $k$ -ten Bild. Sie umfasste eine Abfolge von Operationen, welche sequentiell für alle in Schritt (1) lokalisierten Partikel durchlaufen wurde. Dabei wurden zunächst, wie in Kapitel 2.3.5.1 ausführlich beschrieben, anhand der  $\bar{G}(k)$  ein Schwellenwert  $G_s$  (grüne Linie) und der Bleichzeitpunkt  $\kappa$  bestimmt und diese zusammen mit dem Fluoreszenzdiagramm ausgegeben. Zwei dieser zeitabhängigen Intensitätsverläufe sind in Abbildung 3.8 B exemplarisch dargestellt, wobei Schwellenwert und vom Skript angenommener Bleichzeitpunkt als grüne bzw. rote Linie markiert sind. Das obere der beiden Diagramme zeigt das einstufige Bleichen eines Atto647N-Moleküls das untere Diagramm ist demselben Bleichfilm entnommen, gibt jedoch einen mehrstufigen Bleichprozess wieder. Einstufiges Bleichen rührt mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Photoschädigung eines einzelnen Moleküls her, da mit einer Schädigung des Chromophors das abrupte Verlöschen der Fluoreszenz zu erwarten ist. Ein mehrstufiger Prozess hingegen spricht dafür, dass sich im analysierten Signal die Fluoreszenz mehrerer Farbstoffmoleküle überlagert und diese nacheinander gelöscht werden. Da lediglich die Fluoreszenz einzelner Moleküle untersucht werden sollte, mussten alle Signale, die ein nicht-einstufiges Photobleichen zeigten, aussortiert werden. Das Skript ist nicht dazu ausgelegt, eine solche Unterscheidung zu treffen, denn es gilt nicht nur mehrstufiges Bleichen, sondern auch

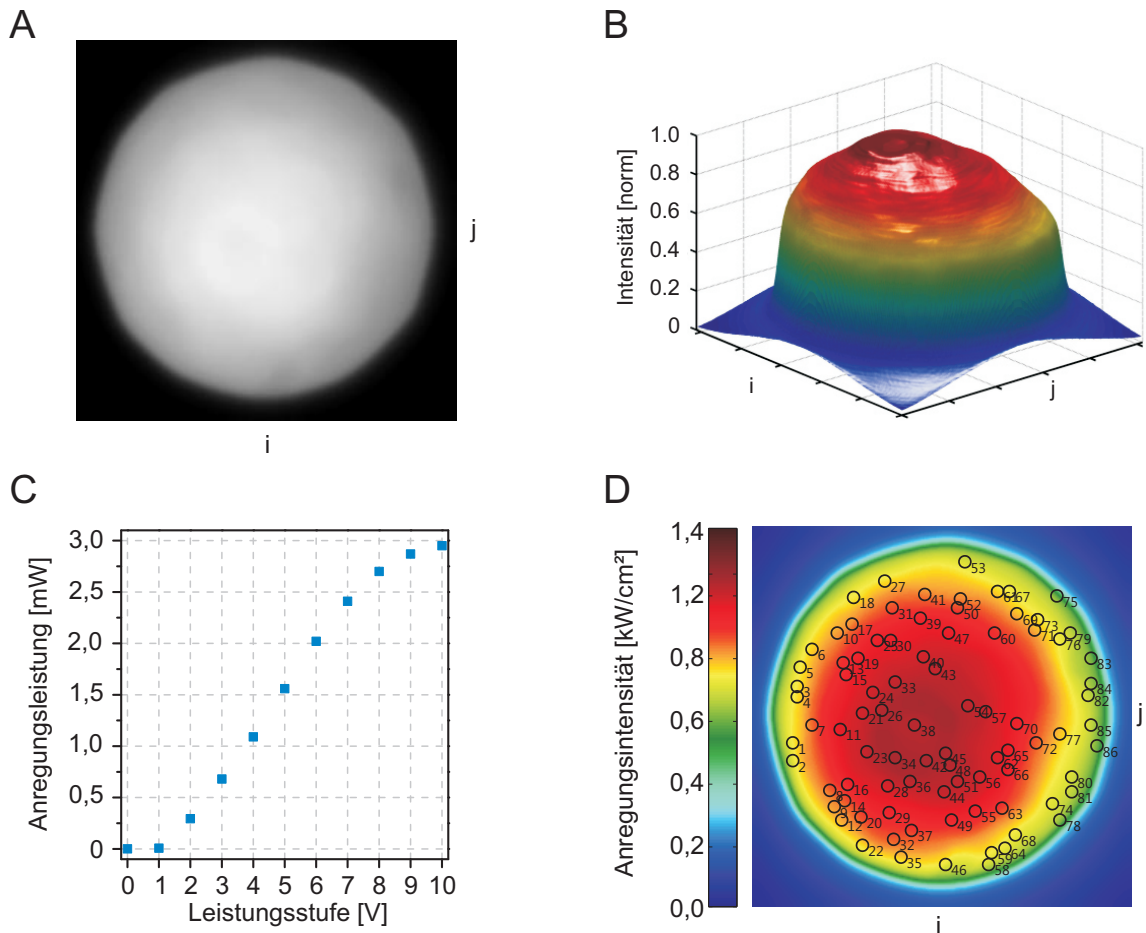


**Abbildung 3.9:** Schematisierte Fluoreszenzdiagramme zur Veranschaulichung verschiedenartiger Bleichprozesse.  $\bar{G}(k)$ : mittlerer Grauwert des Signals,  $k$ : Bildnummer.

kontinuierliches Abklingen der Fluoreszenz, fehlerhaft bestimmte Bleichzeitpunkte, temporär gelöschte Fluoreszenz und Blinken zu identifizieren. Das Formulieren der Ausschlusskriterien und das Umsetzen in einen automatischen Sortiermechanismus ging über den Rahmen dieser Arbeit hinaus, so dass der Anwender in einem manuellen Sortierschritt entschied, ob die Daten eines Moleküls in den Ergebnisdatensatz zu übernehmen waren. Abbildung 3.9 zeigt die dabei am häufigsten beobachteten Typen von Bleichprozessen. Bei der manuellen Sortierung wurden lediglich Diagramme des Typs „einstufig“, „kurz gelöscht“ (Dauer des nichtfluoreszenten Zustands nicht länger als etwa 10% der Bleichzeit) und „Blinken“ ausgewählt, alle übrigen Diagramme wurden verworfen. Einige der Bleichtypen lassen sich auch in der im Anhang enthaltene Abbildung A.1 wiederfinden, welche typische Fluoreszenzdiagramme für Cy5/TB zeigt. Durch das Aussortieren ungeeigneter Fluoreszenzdiagramme wurden im Schnitt etwa 70% der lokalisierten Signale verworfen, die übrigen 30% gingen mit ihren Bleichzeiten in den Ergebnisdatensatz ein.

zu (3) Die Ausgabe des Ergebnisdatensatzes umfasste zum einen das Anlegen einer Tabelle, welche für jedes selektierte Molekül unter anderem die Molekülposition  $(i, j)$  und den Bleichzeitpunkt in Form des Bleichindex  $\kappa$  dokumentierte. Weiterhin wurden die Fluoreszenzdiagramme sämtlicher Partikel als Grafiken abgelegt (ein Beispiel hierfür ist Abbildung A.1 zu entnehmen) und die Datenblätter aller Partikel, unter anderem für die weitere Prozessierung, aber auch eine evtl. spätere Revision der Daten, gespeichert.

Auf die oben beschriebene Weise wurde unter Beachtung der jeweils angegebenen Kriterien für jedes Farbstoff/Puffer-Kombination ein Ergebnisdatensatz je Bleichfilm erhalten. Aus diesen wurde eine Tabelle zusammengestellt, die nach Überführung von  $\kappa$  in  $\tau_{\Lambda}$  zu jedem Partikel die Position  $(i, j)$ , Bleichzeit  $\tau_{\Lambda}$  und dazu zugehörige  $\Lambda$  enthielt. Aus den Daten dieser Tabellen wurden im weiteren Verlauf Diagramme erstellt, welche für jeden Farbstoff und Puffer den Zusammenhang zwischen Bleichzeit und Anregungsintensität illustrieren (s. Abbildung 3.12 und 3.13). Dazu mussten zuvor jedoch die Anregungsintensitäten berechnet werden, denen die bleichenden Moleküle ausgesetzt waren (s. Kapitel 3.2.2.2).



**Abbildung 3.10: Ermittlung der Anregungsintensität anhand des Beleuchtungsprofils und der Anregungsleistung.** **A** Bild des Strahlprofils, erhalten durch Abbildung eines dünnen Textmarkerfilms. Die scharfe Beleuchtungsgrenze, hervorgerufen durch die Irisblende im Strahlengang, ist gut zu erkennen – der Textmarker in den Randbereichen des Bildes wird sichtbar nicht angeregt. Bildbearbeitung: `sub[100]`, `med[10]`, `ec[0.4]`. **B** 3D-Darstellung des Strahlprofils zur besseren Veranschaulichung. **C** Zusammenhang zwischen der vom Anwender wählbaren AOTF-Leistungsstufe zur Steuerung der Laserintensität und der auf Probenhöhe gemessenen Anregungsleistung. **D** Konturplot der Anregungsintensitäten-Matrix wie sie aus Profilbild und Anregungsleistung mit der in Kapitel 2.3.5.3 beschriebenen Methode erhalten wird. Zusätzlich sind die Partikelpositionen eines Bleichfilms über den Plot gelegt.

### 3.2.2.2 Die lokale Anregungsintensität $I(i, j)$

Um das rein qualitativ beobachtbare Phänomen, dass Fluoreszenzfarbstoffe bei hohen Laserleistungen schneller bleichen als bei geringen, quantitativ beschreiben zu können, wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe sich die Anregungsleistung für ein nah an der Oberfläche eines Deckglases immobilisiertes Molekül bestimmen ließ (s. Kapitel 2.3.5.3). Diese Methode setzte voraus, dass das Strahlprofil der Anregungsquelle, hier des jeweils verwendeten Lasers, auf Höhe der Probe bekannt war. Aus diesem Grund wurde zu jedem Experiment jeweils das aktuelle Strahlprofil mit Hilfe eines auf ein Deckglas aufgetragenen Textmarkerfilms abgebildet („Profilbild“, s. Kapitel 2.3.4.1). Abbildung 3.10 A zeigt ein solches Profilbild. Die 3D-Darstellung desselben Profils (Abbildung 3.10 B), dargestellt mit einer kontrastreichen Farbpalette, lässt deutlich erkennen, dass die Anregungsintensität ortsab-

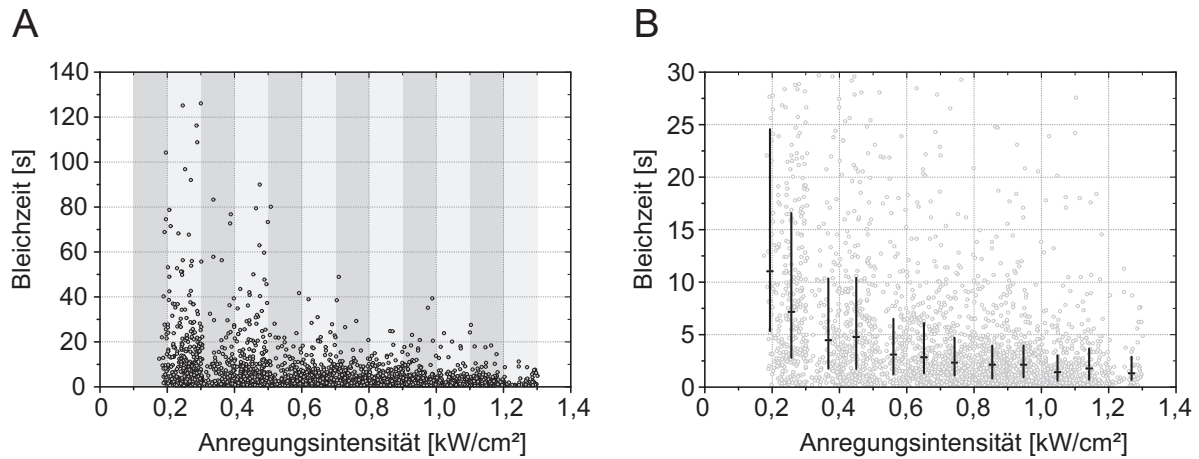


hängig ist. Daher wurde hier für die Analyse des Photobleichens nicht eine mittlere, für alle Partikel gültige Anregungsintensität berechnet, sondern für jede Partikelposition  $(i, j)$  ein lokaler Wert  $I(i, j)$  ermittelt (Kapitel 2.3.5.3). Da das Photobleichen für jeden Farbstoff jeweils für sechs verschiedene Anregungsleistungen abgebildet worden war, mussten die  $I(i, j)$  für jede dieser sechs verschiedenen  $P$ -Werte berechnet werden.  $P$  wiederum ließ sich durch Messungen mit einem Powermeter, dessen Messkopf auf dem Probenstisch zu platzieren war, ermitteln. Da dies im laufenden Experiment nicht möglich war, wurde vor Beginn der Aufnahme der Bleichfilme eine Messreihe erstellt, bei welcher  $P$ , abhängig von der AOTF-Laserleistungsstufe, ermittelt wurde – Letztere konnte immer auch während des Experiments abgelesen werden. Die AOTF-Einstellung wurde stets zum jeweiligen Bleichfilm notiert und konnte später über die Messreihe in die jeweilige Anregungsleistung  $P$  umgerechnet werden. Abbildung 3.10 C gibt den sigmoiden Zusammenhang zwischen AOTF-Einstellung und  $P$  eines Experimenttages wieder. In diesem konkreten Fall wurde die Probe z. B. bei der AOTF-Einstellung 5 einer Anregungsleistung  $P$  von 1,56 mW ausgesetzt. Da  $P$  nun jeweils bekannt war, ließen sich die  $I(i, j)$  berechnen. Eine solche Matrix ist in Abbildung 3.10 D als Konturplot dargestellt, dessen qualitativer Verlauf dem des Profilbilds gleicht. Anhand der Matrizen ließ sich nun jedem Partikel eines Bleichfilms (hier sind beispielhaft die lokalisierten Partikel eines Experiments eingezeichnet) eine Anregungsintensität zuordnen.

Das Strahlprofil in Abbildung 3.10 B zeigt, dass die Intensität am Rand des beleuchteten Bereichs sehr schnell abfällt. Partikel, die in diesen Randbereichen lokalisiert worden waren (vgl. grüner und gelber Bereich in Abbildung 3.10 D), wurden aus sämtlichen Analysen ausgeschlossen.

### 3.2.2.3 Die Auftragung der Bleichzeiten $\tau_{\Lambda}$ gegen die Anregungsintensität $I$

Um die Abhängigkeit  $\tau_{\Lambda}$  von  $I$  herauszuarbeiten, wurde für jedes Farbstoff/Puffer-Kombination zunächst ein Diagramm erstellt, in welchem die Wertepaare  $(\tau_{\Lambda}, I)$  der analysierten Moleküle aufgetragen wurden. Diese Auftragung kann der Abbildung 3.11 A exemplarisch am Beispiel von Atto647N/TB entnommen werden. Das Diagramm enthält 2492 Wertepaare für Anregungsintensitäten zwischen etwa 0,2 bis 1,4 kW/cm<sup>2</sup>. Die längste beobachtete Bleichzeit für Atto647N/TB betrug 126 s bei 0,3 kW/cm<sup>2</sup>. Die kürzeste Bleichzeit lag bei 0,1017 s und wurde mehrfach über den gesamten Intensitätsbereich beobachtet. Sie entspricht gleichzeitig der Bildfolgezeit der Bleichfilme. Da an der AOTF-Elektronik immer nur ganzzahlige Stufen zur Anregung der Proben gewählt worden waren, weist der Plot Einschnitte mit einer reduzierten Datenpunktdichte auf – hier vor allem jeweils oberhalb von 0,3 kW/cm<sup>2</sup> und 0,5 kW/cm<sup>2</sup> zu erkennen. Der Plot lässt zwar vermuten, dass für geringe Anregungsintensitäten längere Bleichzeiten erwartet werden können als für hohe. Aufgrund der starken Streuung der Werte und gleichzeitiger Überlagerung vieler Datenpunkte im Bereich 0-10 s, lassen sich jedoch kaum weitere



**Abbildung 3.11: Auftragung der Bleichzeit gegen die Anregungsintensität und Mediangelättung.** **A** Auftragung der Wertepaare  $(\tau_{\Lambda}, I)$  aus der Bleichzeitanalyse von Atto647N/TB. Die alternierend hell- bzw. dunkelgraue Hinterlegung markiert die zur Glättung der Daten eingerichteten, jeweils  $0,1 \text{ kW/cm}^2$  breiten Blöcke. **B** Selbe Auftragung wie in A, jedoch sind die  $(\tau_{\Lambda}, I)$ -Wertepaare ausgegraut und die Wertepaare der Mediangelättung überlagert. Die waagerechten Balken geben dabei jeweils die vertikale Lage des Medians innerhalb des Blocks (vgl. A) wieder. Die horizontale Ausdehnung des Balkens ist ohne Aussage. Die sich an den Balken anschließenden vertikalen Linien überstreichen die beiden angrenzenden Quartile. Das Diagramm ist gegenüber A in y-Richtung gespreizt.

Informationen extrahieren. Für eine Bewertung des Farbstoffs sollte die grafische Präsentation der Daten jedoch so beschaffen sein, dass sich aus den Diagrammen zu einer bestimmten Anregungsintensität eine mittlere Bleichzeit ablesen lässt. Weiterhin musste auch für den Vergleich der Farbstoffe untereinander eine alternative Darstellungsform gefunden werden. Die Daten wurden aus diesen Gründen geglättet (s. Kapitel 2.3.5.4) und in dieser Form grafisch dargestellt (s. Abbildung 3.11 B). Aus der Glättung resultierte für jeden der sich über eine Distanz von  $0,1 \text{ kW/cm}^2$  erstreckenden Blöcke (s. Abbildung 3.11 A, grau hinterlegt) ein Median-Wertepaar. Dabei wurde der waagerechte Balken jeweils so platziert, dass sein Mittelpunkt sich mit dem Lage des Median-Wertepaares deckte. Der Breite des Balkens kam keine Bedeutung zu. Um einen Eindruck von der Streuung der Werte in y-Richtung zu geben, wurden angrenzend an den Balken die beiden Quartile durch vertikale Linien markiert (ähnlich wie bei der Darstellung von Box-Plots). Die Streuung der Werte in x-Richtung (also die an den x-Median angrenzenden Quartile) lagen für alle Farbstoffe im Mittel bei etwa  $0,023 \text{ kW/cm}^2$  und wurde hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mit aufgetragen.

#### 3.2.2.4 Bleichdiagramme der Fluoreszenzfarbstoffe für TB und PBS

Abschließend wurden die Bleichdiagramme aller Farbstoffe für die beiden Puffer in Grafiken zusammengestellt. Abbildung 3.12 zeigt die Diagramme der Farbstoff in PBS und Abbildung 3.13 diejenigen der Farbstoffe in TB.

Die Diagramme lassen für alle Farbstoffe eine Abhängigkeit  $\tau = f(I)$  erkennen. Im Bereich niedriger Anregungsintensitäten stellt sich die Entwicklung der Bleichzeit besonders klar dar: ein Anheben von

$I$  resultiert hier in einer deutlichen Abnahme der Bleichzeit. Für höhere Anregungsleistungen lässt sich allerdings zunehmend die Annäherung an eine feste Bleichzeit erkennen: Für alle Farbstoffe wird etwa ab  $I \leq 0,9 \text{ kW/cm}^2$  ein farbstoffspezifisches Niveau erreicht, welches jeweils in den Diagrammen eingezeichnet ist. Deren Wert  $\tau_a$  wurde zu jeder Farbstoff/Puffer-Kombination als arithmetisches Mittel aus den jeweils zu den drei höchsten Anregungsintensitäten gehörigen Bleichzeit-Medianen berechnet. Hiervon ausgenommen ist AF546, da für diesen Farbstoff wegen zu geringer Leistung des grünen Lasers keine Annäherung an ein  $\tau_a$  festzustellen war.

Die ermittelten  $\tau_a$  bieten sich als kompakte Werte zum Vergleich der Farbstoffe untereinander an, es sei jedoch gesagt, dass sie nicht zur Extrapolation der Bleichzeit über die hier untersuchten Anregungsintensitäten hinaus dienen können (s. Diskussion).

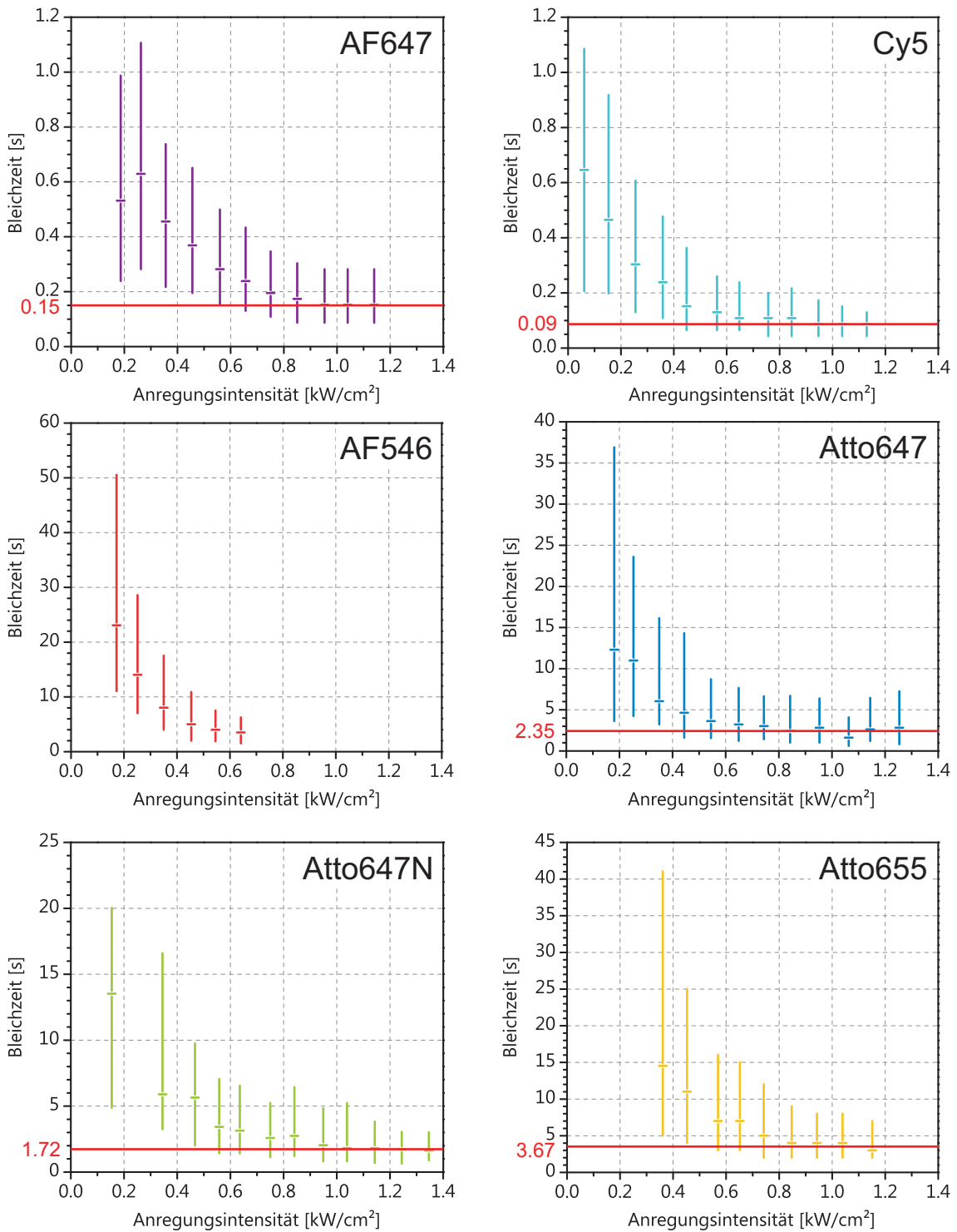
Damit ein detaillierterer Vergleich der Farbstoffe untereinander möglich ist, wurde für jeden Puffer eine Übersichtsgrafik angefertigt, welche sämtliche Median-Werte der Farbstoffe ohne die Quartilmarkierung enthält. Da sich die Bleichzeiten der verschiedenen Farbstoffe über mehrere Größenordnungen erstrecken, wurde eine halb-logarithmische Darstellung gewählt. Die Abbildungen 3.14 und 3.15 lassen damit jeweils für die Farbstoffe in PBS bzw. TB einen direkten Vergleich der Bleichzeiten und damit eine Beurteilung der Farbstoffe für jede Anregungsintensität zu.

### 3.2.3 Analyse der Photonenzahlen $\mathcal{N}$ in Abhängigkeit von der Anregungsintensität $I$

Neben der Bleichzeit wurde als weitere zentrale Größe die Anzahl der bis zum Photobleichen emittierten Photonen  $\mathcal{N}$  bestimmt. Die entsprechende Analyse wurde anhand der Bleichfilme vorgenommen, welche bereits zur Ermittlung von  $\tau_\Lambda$  ausgewertet worden waren. Teilweise wurde auf Inhalte der dort erstellten Datenblätter zurückgegriffen. Details zur Auswertung sind dem Kapitel 2.3.5.2 zu entnehmen. Der zentrale Zusammenhang ist dort in Gleichung 2.9 festgehalten. Demnach kann aus der Summe aller zu einem Signal gehörenden Pixel-Grauwerte  $\mathcal{B}$  die Anzahl der im jeweiligen Zeitraum emittierten Photonen  $\mathcal{N}$  berechnet werden. Benötigt werden dazu der farbstoffspezifische Detektionskoeffizient  $Q_F$  und der Kamerafaktor  $\gamma$ . Das folgende Kapitel beschäftigt sich daher zunächst mit den Ergebnissen zur Bestimmung der Größen  $Q_F$  und  $\gamma$ . Kapitel 3.2.3.3 zeigt die Ergebnisse der Bleichfilm-Analyse zur Ermittlung der Grauwertsumme  $\mathcal{B}$  und die daraus berechnete Zahl emittierter Photonen  $\mathcal{N}$  auf. Schlussendlich sind Kapitel 3.2.3.5 die *Photonendiagramme* für alle untersuchten Farbstoffe, jeweils als Auftragung Photonenzahl  $\mathcal{N}$  vs. Anregungsintensität  $I$ , zu entnehmen.

#### 3.2.3.1 Bestimmung des Detektionskoeffizienten $Q_F$

Der Detektionskoeffizient  $Q_F$  wurde für jeden der sechs Farbstoffe (F) nach Gleichung 2.15 berechnet. Dazu mussten zunächst die drei Beiträge – die normierten Emissionsspektren  $E(\lambda)$ , die Detektionsef-



**Abbildung 3.12: Bleichdiagramme der Farbstoffe in PBS.** Details zur Auftragung s. Abbildung 3.11. Die roten Linien und Werte verdeutlichen  $\tau_a$ .

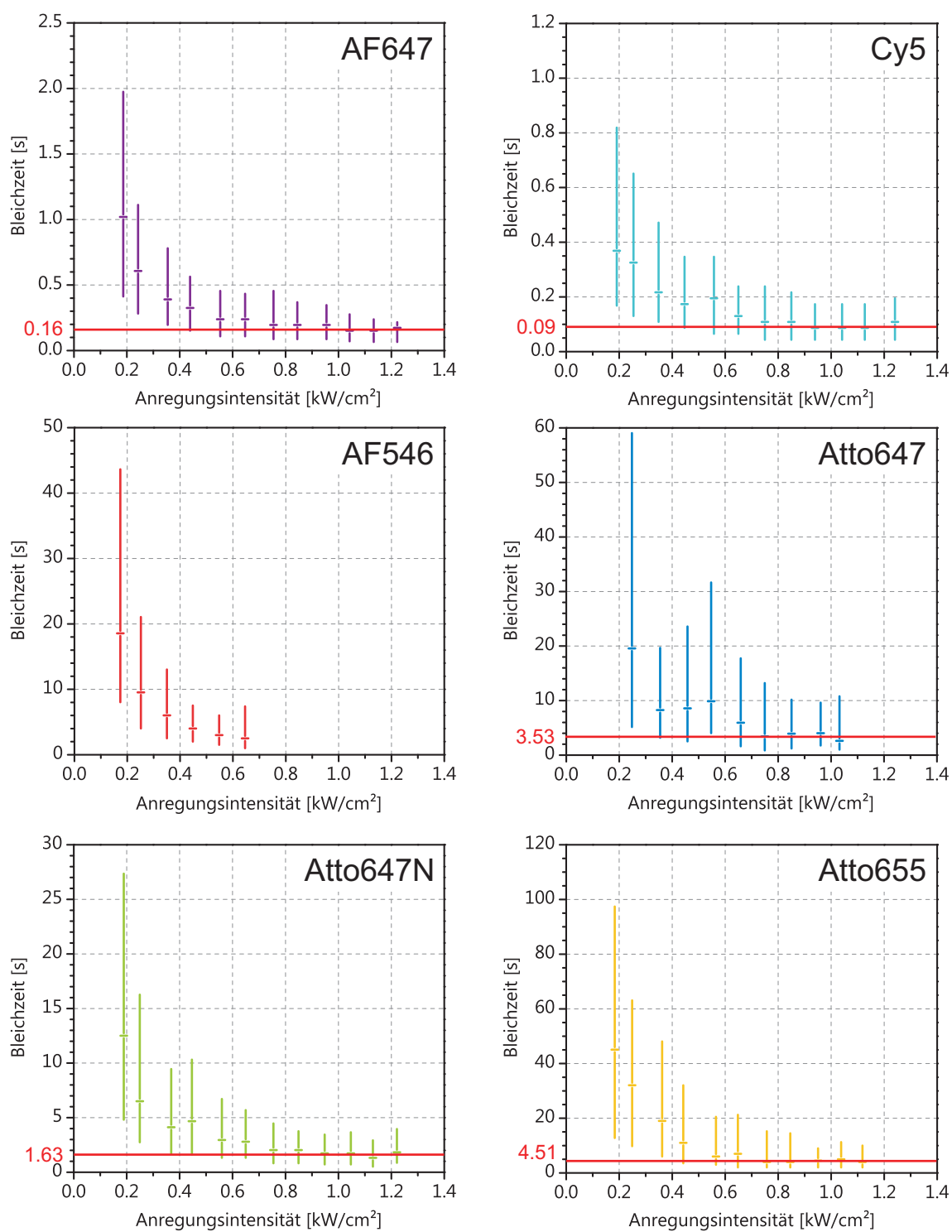
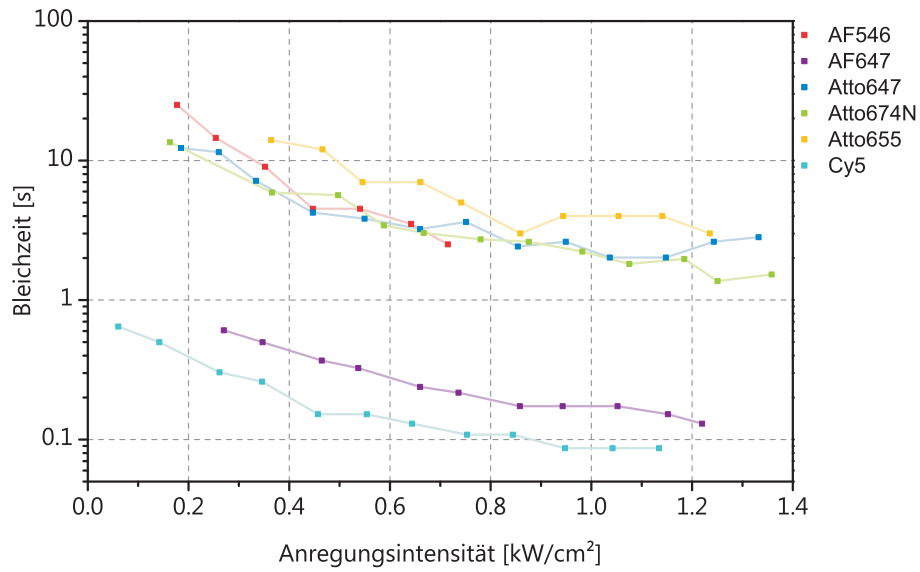
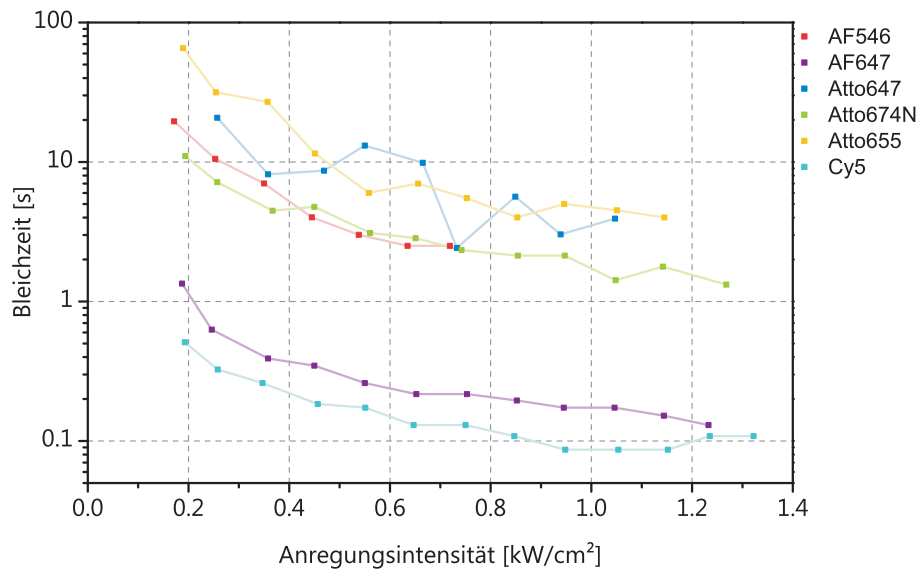


Abbildung 3.13: Bleichdiagramme der Farbstoffe in TB. Details zur Auftragung s. Abbildung 3.11. Die roten Linien und Werte verdeutlichen  $\tau_a$ .



**Abbildung 3.14: Übersicht der Bleichzeiten aller Farbstoffe in PBS.** Dargestellt sind die Mediane, errechnet aus allen Werten, die jeweils in einem  $0.1 \text{ kW/cm}^2$  breiten Block liegen. Die Verbindung der einzelnen Datenpunkte dient der Übersichtlichkeit.



**Abbildung 3.15: Übersicht der Bleichzeiten aller Farbstoffe in TB.** Dargestellt sind die Mediane, errechnet aus allen Werten, die jeweils in einem  $0.1 \text{ kW/cm}^2$  breiten Block liegen. Die Verbindung der einzelnen Datenpunkte dient der Übersichtlichkeit.

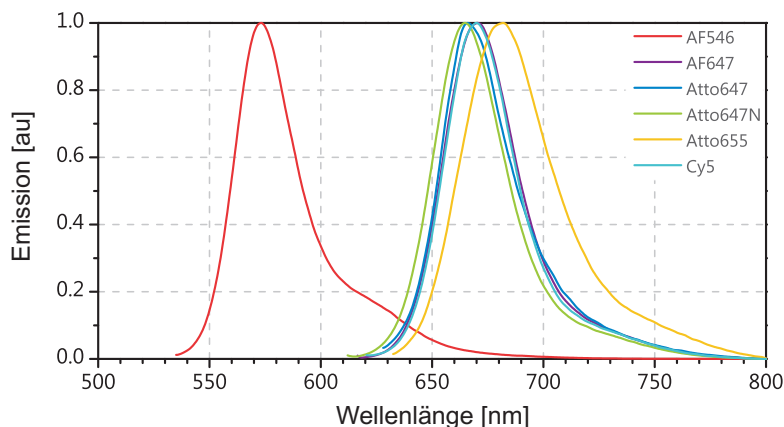


Abbildung 3.16: Emissionsspektren der sechs NAv-Farbstoff-Konjugate in PBS.

fizienz des Mikroskops  $\eta(\lambda)$  und die Gesamttransmission aller optischen Elemente  $T(\lambda)$  – bestimmt werden.

### Normierung der Emissionsspektren

Die Emissionsspektren der Neutravidin-Farbstoff-Verbindungen wurden, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, aufgenommen und sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Der Anhang enthält der Vollständigkeit halber die jeweiligen Absorptionsspektren (s. Abbildung A.3) und tabellarisch die  $\lambda_{max}$  aller Absorptions- und Emissionsbanden (s. Tabelle A.1). Die normierten Spektren ließen sich für die rot emittierenden Farbstoffe nach folgender Gleichung berechnen:

$$E_{norm}(\lambda) = \frac{E(\lambda)}{\sum_{\lambda=600\text{ nm}}^{800\text{ nm}} E(\lambda)} \quad (3.1)$$

Für den gelb emittierenden Farbstoff AF546 wurde die Summe im Nenner von 540-740 nm berechnet.

### Sammeleffizienz des Objektivs $\eta(\lambda)$

Die Sammeleffizienz des Objektivs wurde nach der in Kapitel 2.3.5.2 beschriebenen Methode berechnet. Die Berechnungen wurden mit dem von Dr. Marcel Leutenegger zur Verfügung gestellten Matlab-Funktionenpaket angefertigt. Die relevanten Parameter sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. Da die Sammeleffizienz eine wellenlängenabhängige Größe ist, wurde sie für den Bereich 450-800 nm berechnet. Ihr in diesem Wellenlängenbereich annähernd linearer Verlauf kann Abbildung 3.17 A entnommen werden.

### Die Gesamttransmission aller optischen Elemente $T(\lambda)$

Zur Berechnung der Gesamttransmission des Mikroskopaufbaus wurden die Einzeltransmissionen aller optischen Elemente miteinander multipliziert (s. Gleichung 2.13). Die Aufstellung in Tabelle 3.3



Parameter	Wert
Brechungsindex der Probe (wässrige Umgebung)	1,33
Abstand des Emitters vom Deckglas	0
Brechungsindex (Objektiv, Deckglas, Immersionsöl)	1,52
Numerische Apertur des Objektivs	1,45
Vergrößerung des Objektivs	100-fach
Zusätzliche Vergrößerungsoptik	4-fach
Brennweite der Tubuslinse	164 mm
Transmission der Tubuslinse	0,95
Pixelgröße des EMCCD-Chips	16x16 $\mu\text{m}^2$

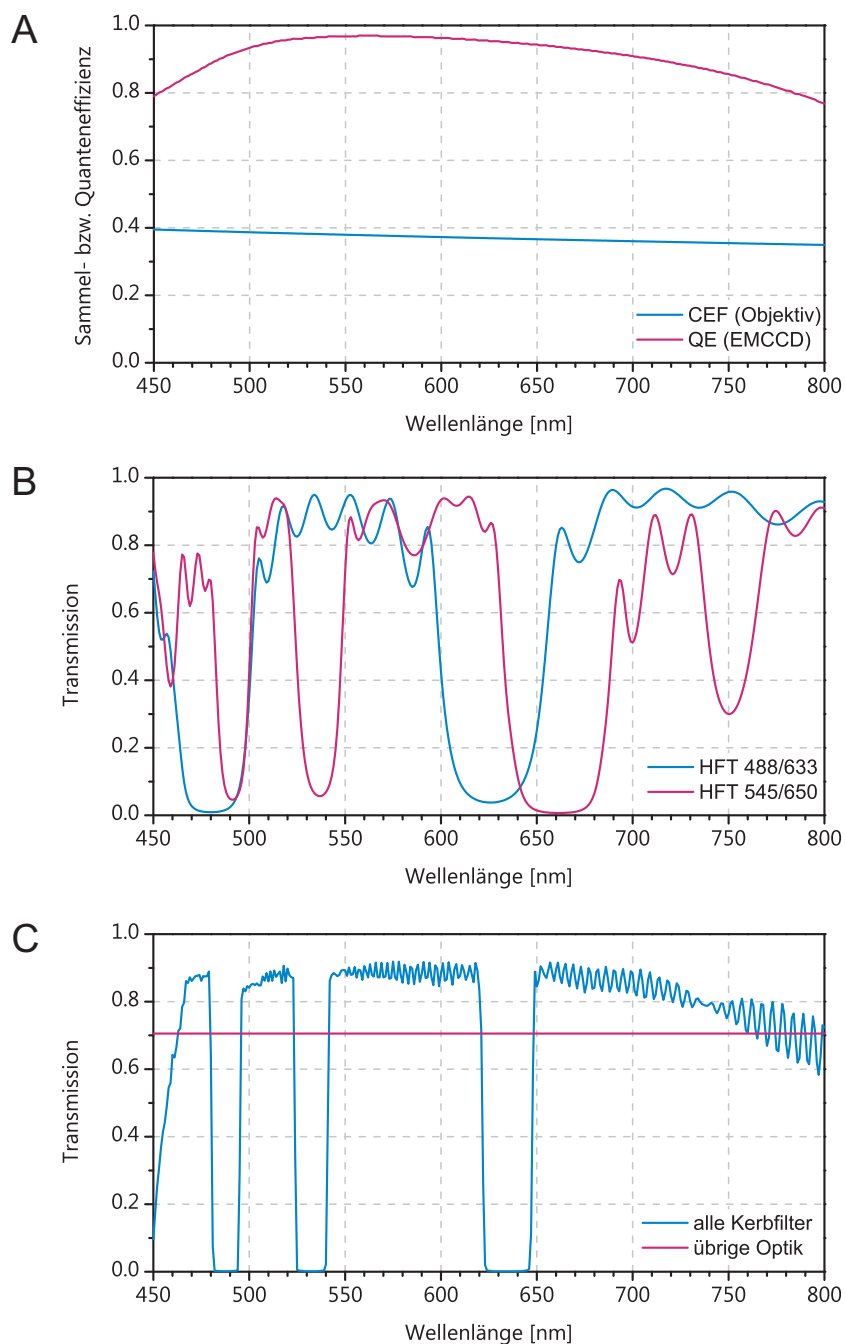
**Tabelle 3.2: Mikroskop- bzw. Experimentspezifische Angaben zur Berechnung der Sammeleffizienz.**

Element	Wert bzw. Spektrum	Herkunft der Werte
Hauptfarbteiler	s. Abbildung 3.17 B	Messung (s. Kapitel 2.3.2)
Notchfilter	s. Abbildung 3.17 C	Messung (s. Kapitel 2.3.2)
Sideport Prisma	0,80	Hersteller
4-fach Vergrößerungsoptik	0,90	Hersteller
Kamerafenster	0,98	Hersteller
(Tubuslinse)	(0,95)	(Hersteller)

**Tabelle 3.3: Transmission der optischen Elemente.** Der Wert für die Tubuslinse ging bereits in die Berechnung der Sammeleffizienz ein und ist daher in Klammern gesetzt.

gibt einen Überblick über die betrachteten Elemente und nennt die Herkunft der Transmissionswerte. Die Transmission der Tubuslinse ist hier in Klammern gesetzt, da sie bereits bei der Berechnung der Sammeleffizienz einbezogen worden ist. Abbildung 3.17 gibt die Spektren zu den ersten drei der in Tabelle 3.3 aufgelisteten Elemente wieder. Zum Prisma, der Vergrößerungsoptik und dem Kamerafenster wurden vom jeweiligen Hersteller wellenlängenunabhängige Werte geliefert, es wurde daher davon ausgegangen, dass ihre Transmissionen im relevanten Wellenlängenbereich konstant waren. Sie sind, multiplikativ zu einem Wert vereint, in Abbildung 3.17 C als vertikale Linie („sonstige Optik“) eingetragen, um den Einfluss der Elemente auf die Lichtabschwächung zu verdeutlichen. Abbildung 3.17 C zeigt auch die Transmission der drei stets im Strahlengang befindlichen Notchfilter mit den typischen schmalbandigen Einschnitten zum Herausfiltern der Anregungswellenlänge. Um die Transmission der Hauptfarbteiler zu ermitteln, wurden die zwei in dieser Arbeit verwendeten Filterwürfel (grüne bzw. rote Anregung) spektrometrisch vermessen. Die Transmissionen der Hauptfarbteiler sind jeweils in Abbildung 3.17 B zu sehen.

Aus den bis hierhin aufgeführten Werten konnte nach Gleichung 2.11 auch die Detektionseffizienz des Mikroskopaufbaus berechnet werden. Obwohl sie in der Herleitung der Formeln nur als Zwischenergebnis erscheint, sind für die beiden Hauptfarbteiler, die beiden wellenlängenabhängigen



**Abbildung 3.17: Wellenlängenabhängige Transmission der relevanten optischen Elemente und Quanteneffizienz des Kamerachips.** **A** Sammelleffizienz des Objektivs (blau) und Quanteneffizienz des Kamerachips (rot). **B** Transmission der beiden hier verwendeten Hauptfarbteiler. **C** Der blaue Verlauf zeigt die Transmission der drei das Anregungslicht blockenden Notchfilter, welche sich stets gleichzeitig im Strahlengang befanden. Der rote Verlauf zeigt die Transmission folgender Elemente: Sideport-Prisma, 4-fach Vergrößerung und Kamerafenster.

Farbstoff	$Q_F$
AF647	0,155
Cy5	0,155
AF546	0,175
Atto647	0,153
Atto647N	0,143
Atto655	0,168

**Tabelle 3.4: Die Detektionskoeffizienten  $Q_F$  der Fluoreszenzfarbstoffe.**

Detektionseffizienzen im Anhang abgebildet (s. Abbildung A.4).

### **Die Detektionskoeffizienten $Q_F$ der Fluorophore**

Nachdem die drei zur Berechnung der  $Q_F$  benötigten Größen bestimmt worden waren, konnten die Detektionskoeffizienten für die einzelnen Farbstoffe nach Gleichung 2.15 berechnet werden. Tabelle 3.4 gibt die erhaltenen Werte wieder.

#### **3.2.3.2 Der Kamerafaktor $\gamma$**

Der Kamerafaktor wurde entsprechend Gleichung 2.17 berechnet. Neben der Quanteneffizienz  $\theta(\lambda)$  des EMCCF-Chips wurden dazu zwei Größen benötigt – die Wandlungsrate  $W$  und der EMgain  $M$  – welche oft von Bleichfilm zu Bleichfilm variierten. Die  $\gamma(\lambda)$  wurden für jeden Film gesondert berechnet, weshalb an dieser Stelle keine allgemeingültigen Werte gezeigt werden.

#### **3.2.3.3 Die Berechnung der Grauwertsumme $\mathcal{B}$**

Abschließend wurde zur Berechnung der Zahl emittierter Photonen die Grauwertsumme  $\mathcal{B}$  benötigt. Das Vorgehen zu deren Ermittlung ist ausführlich in Kapitel 2.3.5.2 beschrieben und umfasste die halbautomatisierte Auswertung der Bleichfilme mit einem eigens für diesen Zweck entwickelten Skript.

Das Skript griff teilweise auf die Datenblätter der Bleichzeit-Analyse zurück. So wurde der jeweilige Film zwar eingelesen, aber die Lokalisierung der darin abgebildeten Partikel beispielsweise aus dem Archiv abgerufen. Um nun ein Signal  $G(i, j, k)$  nach Gleichung 2.23 analysieren zu können, musste zunächst der Sg-ROI platziert werden. Dazu griff das Skript auf die Partikelpositionen der Bleichanalyse zurück und zeigte den entsprechenden Sg-ROI in einem Feedback-Fenster an - der Anwender musste entscheiden, ob die Platzierung den Anforderungen genügte. Das Kriterium für ein Beibehalten des Partikel samt Sg-ROI war im Wesentlichen die mittige Lage eines einzigen Partikelsignals im ROI. Lag das Signal zu sehr am Rand des Sg-ROIs, so befanden sich signalzugehörige Pixel außerhalb des

ROI und gingen für die Bestimmung von  $\mathcal{B}$  verloren. Signale, die sichtbar über den ROI hinausragten wurden demnach verworfen. Weiterhin wurden die Datensätze derjenigen Partikel aus der Analyse entfernt, bei denen benachbarte Partikel in den Sg-ROI ragten. Durch diesen Sortierschritt wurden jeweils etwa 50% der Moleküle aussortiert. Weiterhin wurde der zur Hintergrundkorrektur benötigte Hg-ROI manuell aus vier möglichen ROIs ausgewählt. Bildete unter den vier zur Auswahl gestellten Hg-ROI keiner lediglich das Hintergrundrauschen ab, so wurde der gesamte Datensatz des gerade aktiven Moleküls verworfen. Nach diesen beiden Schritten, die jeweils eine Eingabe vom Anwender forderten, berechnete das Skript für alle selektierten Moleküle jeweils eine Grauwertsumme, welche  $\mathcal{B}/\varrho$  entsprach und im folgenden Schritt mit  $\varrho$ , dem zuvor für jeden der sechs Farbstoffe berechneten ROI-Korrekturfaktor, multipliziert wurde, um schließlich die Grauwertsumme  $\mathcal{B}$  zu erhalten. In einem letzten Sortierschritt wurden schließlich noch die Datensätze aller Moleküle verworfen, bei denen im ersten Bild des Filmes Grauwerte im Sättigungsbereich detektiert worden waren.

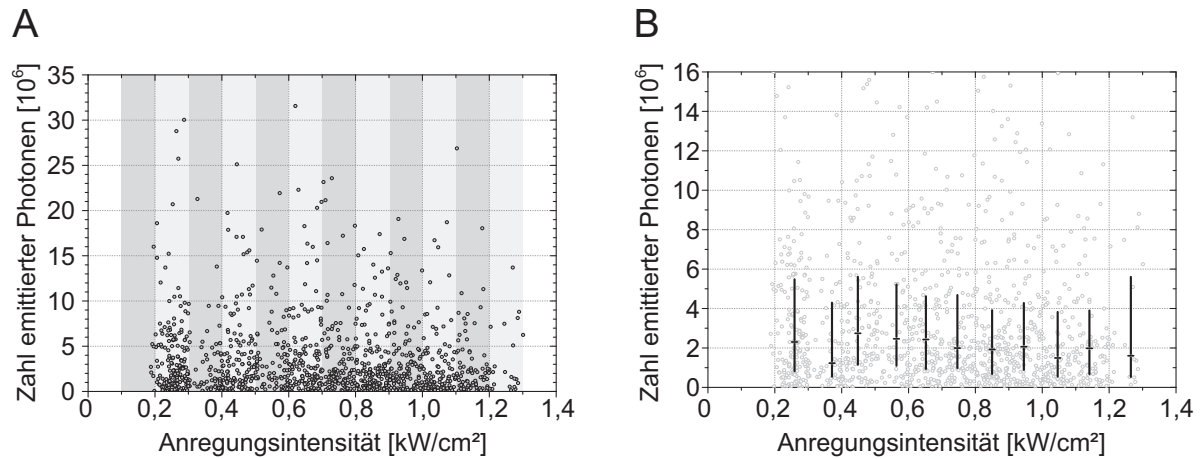
Die halbautomatische Analyse der bereits zur Bleichanalyse selektierten Moleküle resultierte damit in einer tabellarischen Aufstellung sämtlicher obigen Kriterien entsprechenden Moleküle, welche deren pixelgenau lokalisierte Position und die Grauwertsumme enthielt, aus der die Anzahl der insgesamt bis zum Einsetzen des Photobleichens emittierten Photonen berechnet wurde.

#### 3.2.3.4 Die Berechnung der Photonenzahlen $\mathcal{N}$ und Auftragung gegen die Anregungsintensität $I$

Mit den zuvor quantifizierten Größen  $\mathcal{B}$ ,  $Q_F$  und  $\gamma$  wurde nach Gleichung 2.9 für jedes, den zuvor genannten Auswahlkriterien entsprechende Molekül die Anzahl der insgesamt bis zum Einsetzen des Photobleichens emittierten Photonen berechnet. Wie bei der grafischen Aufbereitung der Bleichzeiten (s. Kapitel 3.2.2.3) wurden auch die Photonenzahlen  $\mathcal{N}$  gegen die Anregungsintensitäten  $I$  aufgetragen. Abbildung 3.18 A zeigt die Auftragung für Atto647N/TB. Von den 2492 für die Bleichzeitanalyse untersuchten Molekülen trugen nach der oben beschriebenen Selektion noch 1181 zur Berechnung von  $\mathcal{N}$  bei. Die Übersichtlichkeit leidet bei diesem Diagramm an der starken Streuung der Wertepaare. Daher wurde über die Bildung der Mediane, jeweils über alle Datenpunkte innerhalb eines  $0,1 \text{ kW/cm}^2$ -breiten Blockes (alternierend grau hinterlegte Bereiche in Abbildung 3.18), ein geglättete Graph erstellt (Abbildung 3.18 B). In dieser Form wurden die Photonenzahlen der Anregungsintensität gegenübergestellt.

#### 3.2.3.5 Photonendiagramme der Fluoreszenzfarbstoffe in PBS und TB

Die folgenden Grafiken enthalten die medianeglätteten Photonenzahlen, welche die einzelnen Farbstoffe in PBS (s. Abbildung 3.19) bzw. TB (s. Abbildung 3.20) während der Bleichzeit  $\tau_\Lambda$  emittieren.

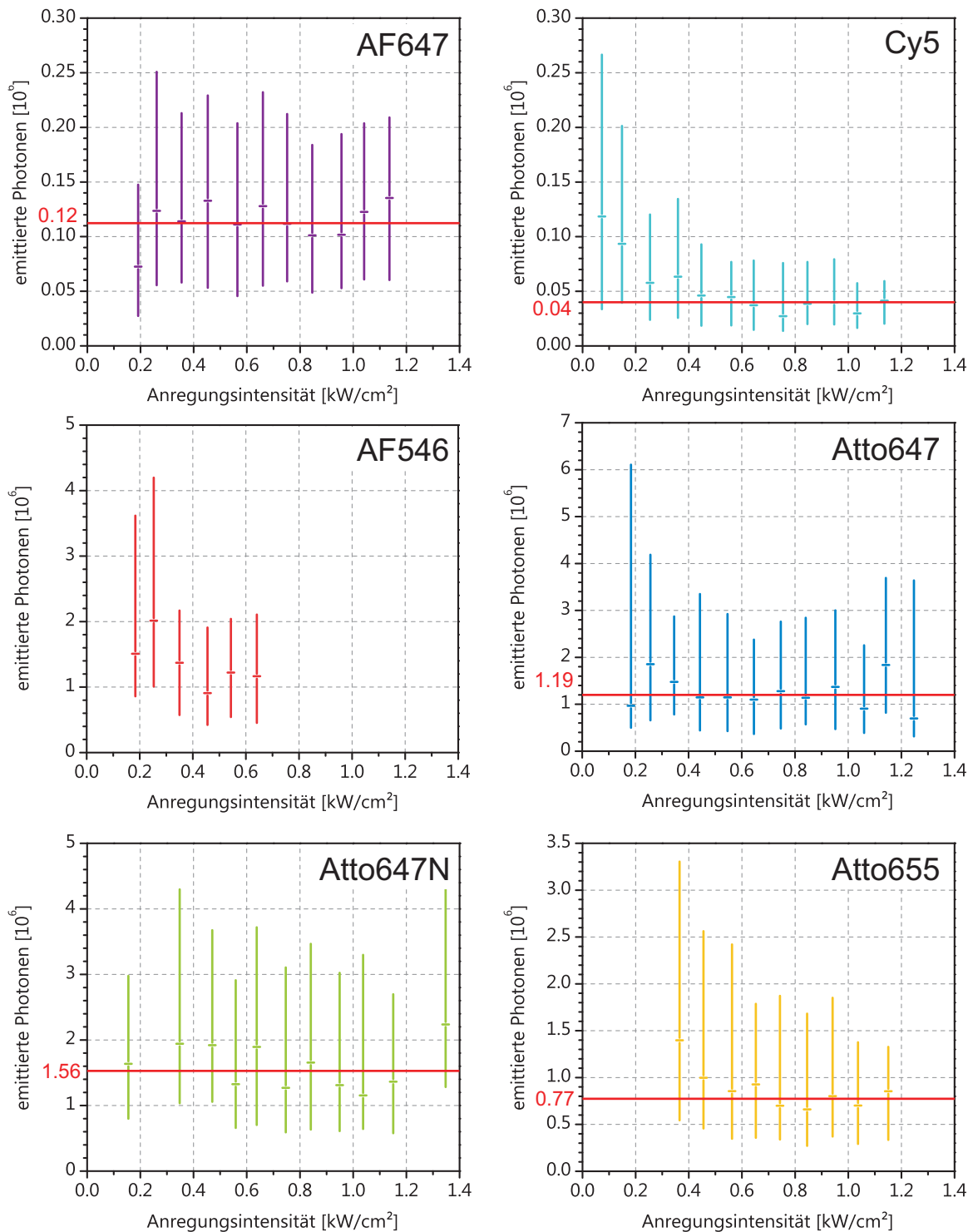


**Abbildung 3.18: Auftragung der Photonenzahl gegen die Anregungsintensität.** **A** Auftragung der Wertepaare  $(\mathcal{N}, I)$  für Atto647N/TB. Die alternierend hell- bzw. dunkelgraue Hinterlegung markiert die zur Glättung der Daten eingerichteten, jeweils  $0,1 \text{ kW/cm}^2$  breiten Blöcke. **B** Selbe Auftragung wie in **A**, jedoch sind die  $(\mathcal{N}, I)$ -Wertepaare ausgegraut und die Wertepaare der Medianglättung überlagert. Die waagerechten Balken geben dabei jeweils die vertikale Lage des Medians innerhalb des Blocks (vgl. **A**) wieder. Die horizontale Ausdehnung des Balkens ist ohne Aussage. Die sich an den Balken anschließenden vertikalen Linien überstreichen die beiden angrenzenden Quartile. Das Diagramm ist gegenüber **A** in  $y$ -Richtung gespreizt.

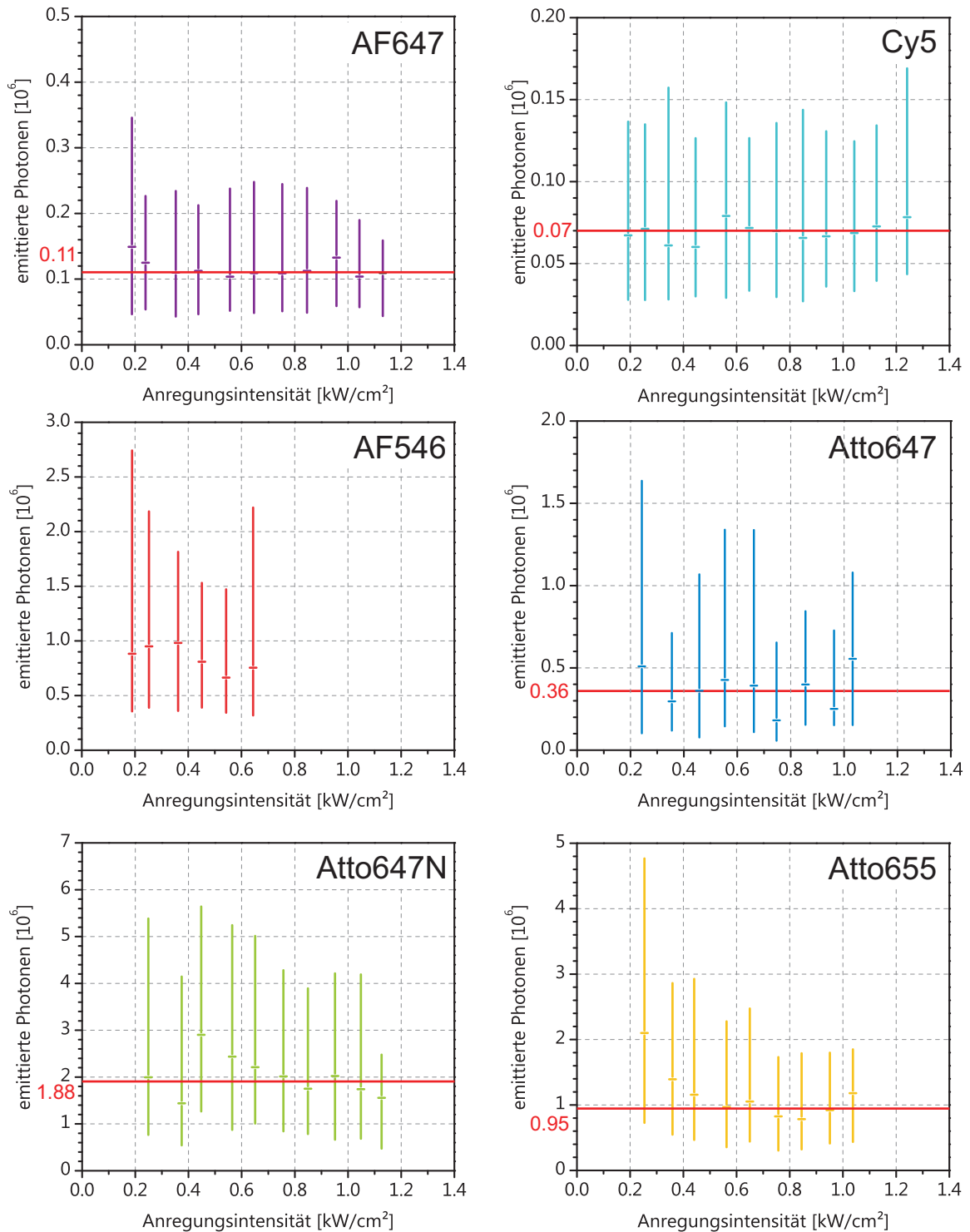
Zum besseren Vergleich der Farbstoffe eines Puffersystems untereinander wurden auch hier Übersichtsgrafiken angefertigt, die im Anschluss an die Einzeldiagramme gezeigt werden (s. Abbildungen 3.21 und 3.22). Da die Photonenzahlen vor allem für höhere Anregungsintensitäten konstant zu sein scheinen, wurde, vergleichbar  $\tau_a$ , ein Mittelwert  $\mathcal{N}_a$  eingeführt (vgl. Kapitel 3.2.2.4), welcher jeweils aus den Werten bei Anregungsintensitäten größer  $0,6 \text{ kW/cm}^2$  berechnet wurde.

### 3.2.4 Bleichzeiten von Atto655 in lebenden C2C12-Zellen

Der Fluoreszenzfarbstoff Atto655 sollte in Lebendzellen mit einem analog zu dem in Kapitel 3.2.2.1 gezeigten Verfahren untersucht werden. Um den Farbstoff in C2C12-Zellen immobilisieren zu können, sollte er, an den Antikörper mab414 gebunden, in die Zelle eingebracht werden. Durch eine stabile Bindung von mab414 an das zugehörige Antigen – verschiedene Kernporenproteine sind als solche bekannt – sollte sich der Fluorophor über den nötigen Zeitraum hinweg immobil abbilden lassen. Die Verteilung von mab414-Atto655 an der Kernmembran sollte dabei eine den Versuchen am Deckglas ähnliche Verteilung liefern (s. Abbildung 1.13 A), so dass die oben ausgearbeiteten Analysemethoden auf dieses System übertragen werden konnten. In den folgenden beiden Kapiteln werden die Ergebnisse zunächst der Funktionsüberprüfung von mab414-Atto655 und anschließend der Bleichanalyse von *in vivo* immobilisiertem Atto655 gezeigt.

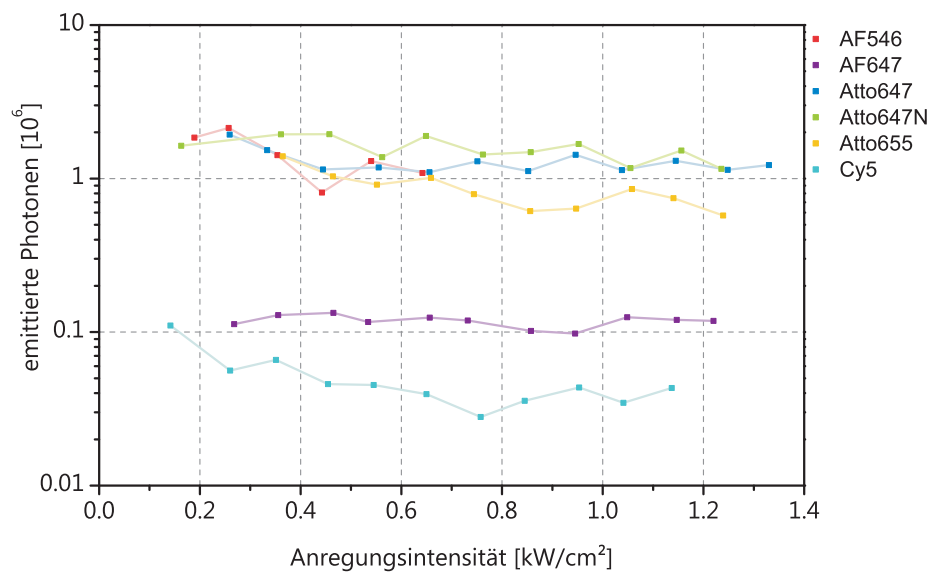


**Abbildung 3.19:** Zahl der während der Bleichzeit emittierten Photonen der in PBS untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe. Aufgetragen ist als waagerechte Linie jeweils der Median über alle Anregungsintensitäten innerhalb eines  $0.1 \text{ kW}/\text{cm}^2$  breiten Bereichs. Die vertikalen Linien reichen bis zu den angrenzenden Quartilen und geben einen Eindruck von der Streuung der Werte. Für AF546 konnten die Werte aufgrund der geringeren Leistung des grünen Lasers nur bis zu einer Intensität von etwa  $0.75 \text{ kW}/\text{cm}^2$  ermittelt werden. Die roten Linien und Werte verdeutlichen  $\mathcal{N}_a$ .

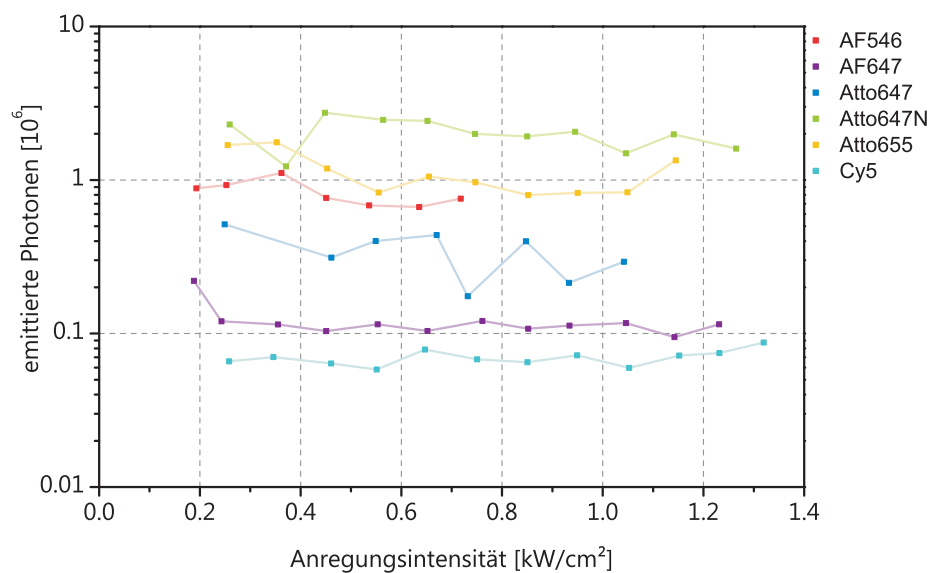


**Abbildung 3.20: Zahl der während der Bleichzeit emittierten Photonen der in TB untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe.** Aufgetragen ist als waagerechte Linie jeweils der Median über alle Anregungsintensitäten innerhalb eines  $0.1 \text{ kW}/\text{cm}^2$  breiten Bereichs. Die vertikalen Linien reichen bis zu den angrenzenden Quartilen und geben einen Eindruck von der Streuung der Werte. Für AF546 konnten die Werte aufgrund der geringeren Leistung des grünen Lasers nur bis zu einer Intensität von etwa  $0.75 \text{ kW}/\text{cm}^2$  ermittelt werden. Die roten Linien und Werte verdeutlichen  $\mathcal{N}_a$ .

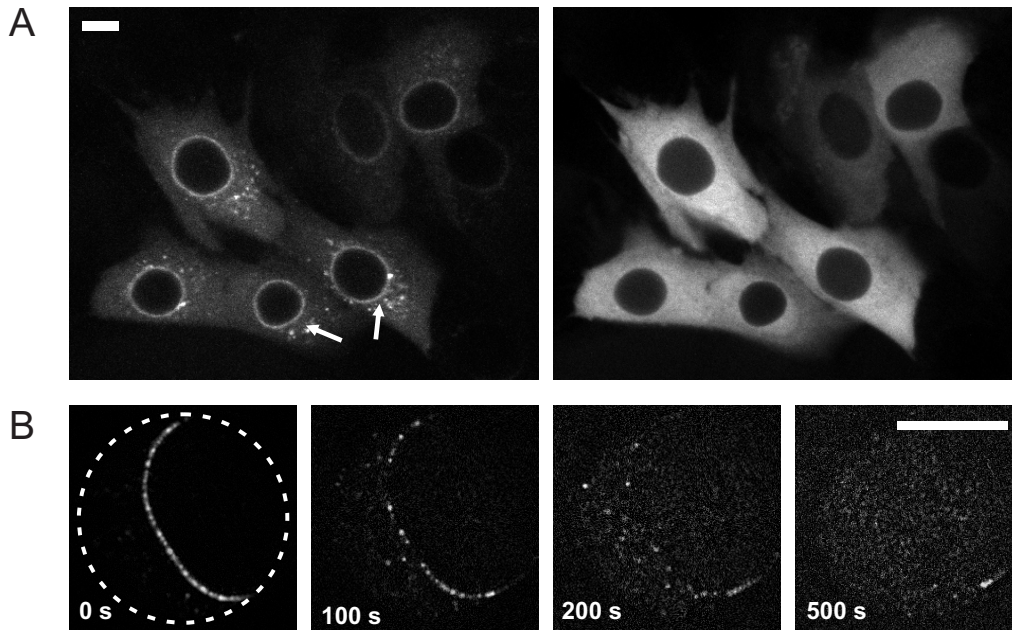




**Abbildung 3.21: Übersicht zur Zahl emittierter Photonen der Farbstoffe in PBS.** Dargestellt sind die Mediane, errechnet aus allen Werten, die jeweils in einem  $0.1 \text{ kW/cm}^2$  breiten Block liegen. Die Verbindung der einzelnen Datenpunkte dient der Übersichtlichkeit.



**Abbildung 3.22: Übersicht zur Zahl emittierter Photonen der Farbstoffe in TB.** Dargestellt sind die Mediane, errechnet aus allen Werten, die jeweils in einem  $0.1 \text{ kW/cm}^2$  breiten Block liegen. Die Verbindung der einzelnen Datenpunkte dient der Übersichtlichkeit.

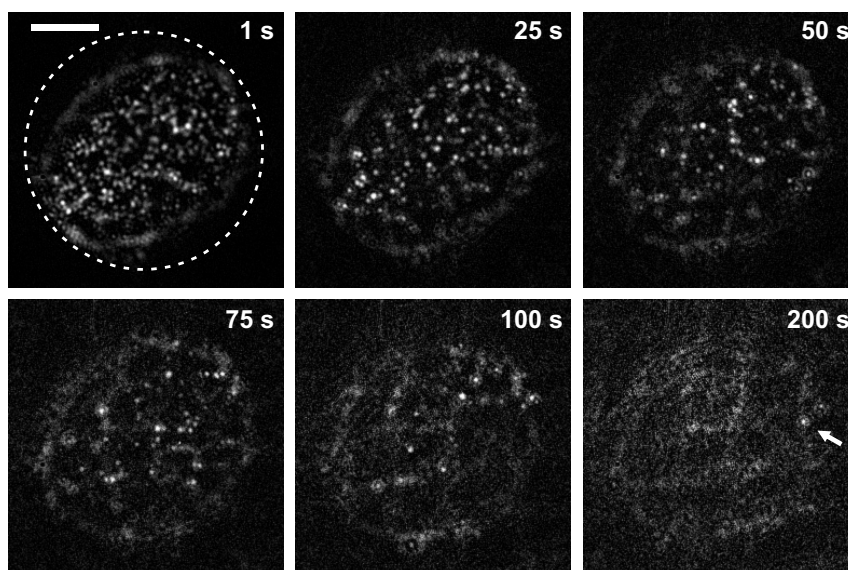


**Abbildung 3.23: Verteilung des mit Atto655 markierten Antikörpers mab<sub>414</sub> in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen.** **A** Konfokale Abbildung von cytosolisch in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen injiziertem mab<sub>414</sub>-Atto655 1 min nach der Injektion. Links: Fluoreszenz von mab<sub>414</sub>-Atto655. Rechts: BSA-AF488 als Dichtigkeitskontrolle. Die Pfeile markieren im Cytosol gebundenes mab<sub>414</sub>-Atto655. **B** EMFM-Abbildungen von cytosolisch in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> injiziertem mab<sub>414</sub>-Atto655, die Fokusebene liegt in der Kernäquatorebene. Die Bilder zeigen eine Bleichserie von 500 s Länge. Die gestrichelte Linie verdeutlicht den beleuchteten Bereich. Größenbalken (A und B): 10 µm, Bildbearbeitung: ec[0.1], sb[5].

### 3.2.4.1 Funktionalität von mab<sub>414</sub>-Atto655

Zunächst wurde das in chromatographisch aufgereinigter Form bezogene, murine mab<sub>414</sub> mit Atto655-NHS-Ester umgesetzt und überschüssiger Farbstoff abgetrennt 2.3.1.2. Um die Funktion nach der Markierungsreaktion zu überprüfen, wurde der markierte Antikörper in das Cytosol von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>-Zellen injiziert (s. Kapitel 2.1.4.2) und die Zellen konfokal abgebildet. Einen Eindruck der dabei typischerweise erhaltenen Verteilung des Antikörpers geben die Aufnahmen in Abbildung 3.23 A, welche eine Minute nach der Mikroinjektion aufgenommen wurden. Das linke Bild zeigt die Fluoreszenz von mab<sub>414</sub>-Ato655 und lässt eine Markierung der Zellkernmembran, das sog. „rim-stain“, erkennen (vgl. [Davis and Blobel, 1987]). Zusätzlich finden sich einige Bereiche hoher Antikörperdichte im Cytosol (Pfeil). Die Unversehrtheit der Zellkerne kann dem rechten Bild entnommen werden, welches das Signal der Dichtigkeitskontrolle BSA-AF488 zeigt (vgl. Kapitel 2.1.4.3).

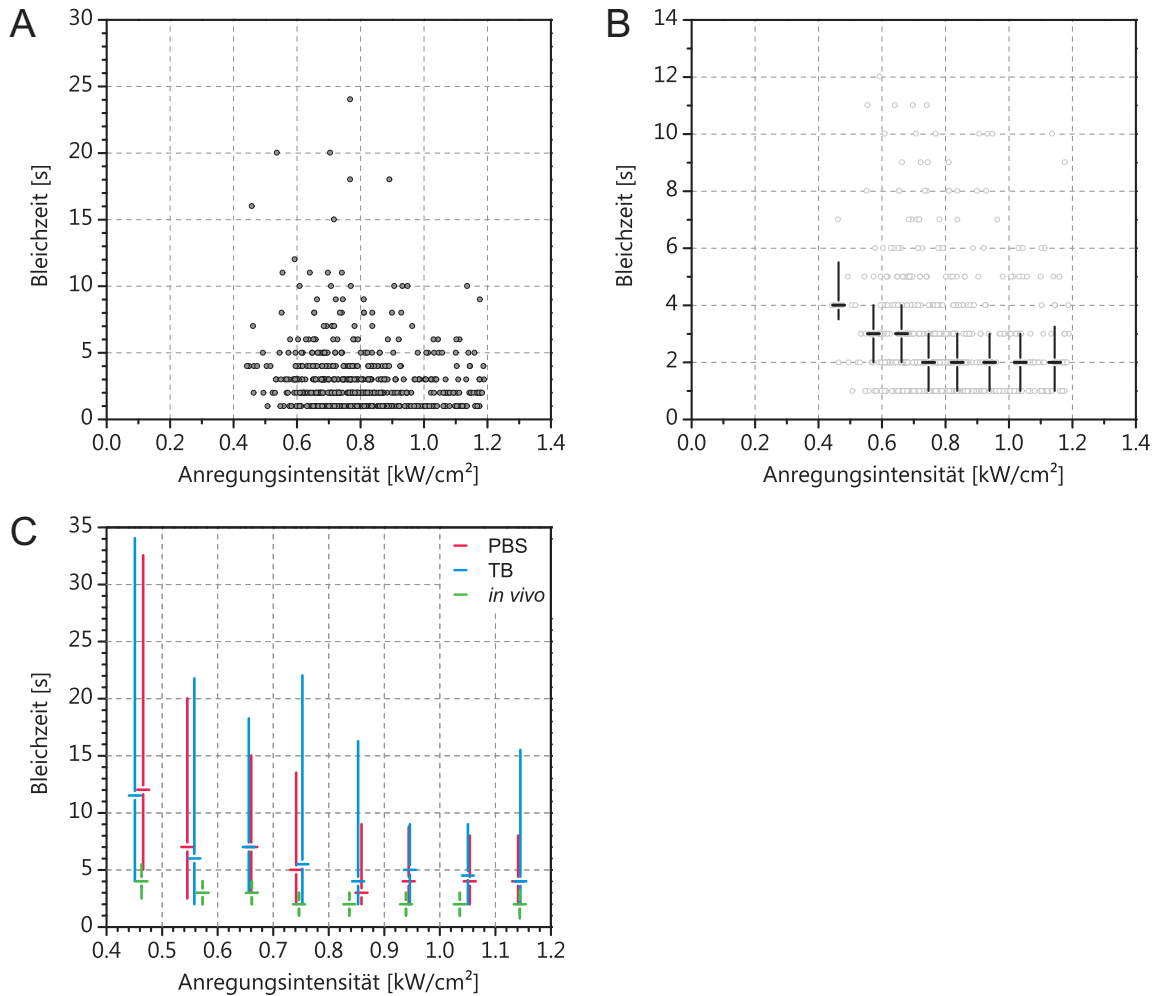
Offensichtlich bindet der *markierte* Antikörper an die erwarteten Bindungsstellen entlang der Kernmembran, daher wurden die im folgenden Kapitel beschriebenen Bleichexperimente unter Verwendung von mab<sub>414</sub> durchgeführt.



**Abbildung 3.24: Bilder eines Bleichfilms von Atto655 *in vivo*.** Das erste Bild zeigt die zu Beginn des Films dicht mit fluoreszierenden Partikeln besetzte Kernoberfläche (der ovale Kern liegt diagonal im Bild). Die gestrichelte Linie gibt den Verlauf der Beleuchtungsgrenze wieder. Die nachfolgenden Bilder geben die Situation bei intermittierender Anregung zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wieder, der Pfeil markiert ein nicht gebleichenes Fluorophor. Bildbearbeitung: sb[7], ec[0.1], gb[0.5](s. Kapitel 2.1.6), Größenbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2.4.2 Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$

Zur Aufnahme der *in vivo*-Bleichserien wurde jeweils eine C2C12-Zelle mit der mab<sub>414</sub>-Atto655-Lösung mikroinjiziert und anschließend umgehend ein Bleichfilm bei entsprechender Anregungsleistung aufgenommen (vgl. Kapitel 2.3.6). Abbildung 3.24 zeigt sechs Bilder eines solchen Films. Sie geben die Situation zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten, gemessen ab Beginn der Anregung, wieder. Aufgrund der Immobilisierung von mab<sub>414</sub>-Atto655 ist die Oberseite des ovalen, schräg im Bild liegenden Zellkerns im ersten Bild gut zu erkennen. Die gestrichelte Linie zeigt auch hier den Verlauf der Beleuchtungsbegrenzung an (vgl. Kapitel 2.1.5.2 und 2.3.4.1). Bei der Injektion des Substrats musste darauf geachtet werden, dass die Markierungsdichte möglichst gering war, so dass einzelne Signale aufgelöst werden konnten. Die dazu optimalen Einstellungen für den Injektionsdruck und die Injektionsdauer, aber auch eine geeignete Konzentration von mab<sub>414</sub>-Atto655 wurden daher vorab durch Austesten bestimmt. Im Verlauf der dargestellten Bildserie ist die Abnahme fluoreszierender Partikel erkennbar. Das letzte Bild der Serie zeigt, dass bis auf einen Partikel in der rechten Bildhälfte keine einzelnen Fluorophore mehr zu erkennen sind. Anders als bei den am Deckglas immobilisierten Partikeln (vgl. Abbildung 3.7) ist jedoch in den letzten Bildern dieser *in vivo*-Aufnahme deutlich eine zurückbleibende Struktur zu erkennen. Sie resultiert vermutlich aus der Fluoreszenz von Außerfokus-Partikeln und erscheint hier aufgrund der Bildbearbeitung und hohen Kontrastierung relativ dominant. Eine Beeinträchtigung der Bleichanalyse durch diesen inhomogenen Hintergrund wurde nicht fest-



**Abbildung 3.25: Bleichdiagramme für Atto655 *in vivo*.** **A** Auftragung der Bleichzeiten  $\tau_{\Lambda}$  gegen die Anregungsintensität  $I$ . **B** Bleichdiagramm – die mediangeglätteten Werte (schwarz) sind als Überlagerung der  $\tau_{\Lambda}/I$ -Datenpunkte (grau) dargestellt (Skalierung von A abweichend). **C** Bleichdiagramm zum Vergleich der mediangeglätteten Bleichzeiten für Atto655 in PBS, in TB und *in vivo*.

gestellt, da die Helligkeitswerte der Struktur deutlich unter denen eines durchschnittlichen Signals lagen.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Bleichzeitanalyse von Atto655, werden im Folgenden in Form eines bereits aus der *in vitro*-Analyse bekannten Bleichdiagramms gezeigt. Zu ihrer Anfertigung wurden bei 3 unterschiedlichen Laserleistungsstufen 616 Partikel in insgesamt 18 Zellen ausgewertet. Da die Auswertung gänzlich analog zu der Auswertung der *in vitro*-Bleichfilme erfolgte, sind Details zu den in Abbildung 3.25 gezeigten Diagrammen der dortigen Beschreibung zu entnehmen (s. Kapitel 3.2.2.4).

## 4 Diskussion

### 4.1 Entwicklung einer hellen, stabilen Sonde zur Untersuchung des KCT

#### 4.1.1 QD600 lassen sich mit 6xHis-Imp $\beta$ 1 funktionalisieren

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung von QDots als Fluoreszenzmarker zur Untersuchung des Kerncytoplasmatransports. Ziel war zunächst die Präparation einer auf Qdots basierenden Sonde, welche Kernimport in permeabilisierten C2C12-Zellen zeigte.

Basierend auf den Resultaten vorangegangener Arbeiten (s. Einleitung) wurde eine Strategie zur Herstellung der Sonden verfolgt, die einen alternativen Kopplungsmechanismus zur Umsetzung von biotinylierten Biomolekülen mit Streptavidin-konjugierten QDots zur Funktionalisierung der Nanopartikel vorsah. Dabei stand die Verringerung der Sondengröße im Vordergrund, da diese zur Visualisierung des Kerncytoplasmatransports verwendet werden und damit den funktionalen Durchmesser der Pore von ca. 39 nm nicht überschreiten sollte. Dazu sollte nun die funktionelle Einheit nicht mehr wie bisher unter Ausnutzung der Biotin-Streptavidin-Affinität am Nanopartikel verankert sondern direkt an die QDot-Oberfläche gebunden werden. Entsprechend der in [Clapp et al., 2006] beschriebenen Methode wurden daher QDots, die lediglich mit dem die Wasserlöslichkeit ermöglichenden Liganden DHLA versehen waren, mit dem Importrezeptor Imp $\beta$ 1 umgesetzt (s. Kapitel 2.2.2). Der Erfolg dieser Kopplung wurde durch Inkubation der Sonde mit permeabilisierten C2C12-Zellen überprüft. Abbildung 3.2, welche konfokale Aufnahmen des Experiments wiedergibt, zeigt, dass der Transportrezeptor erfolgreich an die Nanopartikel gebunden werden konnte: die in Abbildung 3.2 A dargestellten Zellkerne geben sämtlich eine Akkumulation der fluoreszenten Nanopartikel im Bereich der Kernmembran wieder. Die sich ringförmig darstellende Markierung der Kernmembran – in einer vergrößerten Darstellung besonders gut in Abbildung 3.2 C zu erkennen – lässt sich auf die Interaktion des QDot-gebundenen Transportrezeptors mit dem Kernporenkomplex zurückführen. Die Konzentration der Partikel ist dabei räumlich scharf begrenzt, wie das in Abbildung 3.2 B dargestellte Intensitätsprofil erkennen lässt. Zusammen mit der Beobachtung, dass die Membran nicht durchgehend markiert ist, sondern im optischen Schnitt ein „perlenkettenartiges“ Fluoreszenzmuster aufweist (s. dazu Kapitel 3.1.2), lässt sich daraus ableiten, dass hier eine spezifische Affinität der Sonde zum

Kernporenkomplex vorliegt. Diese Schlussfolgerung wird von einem Kontrollexperiment gestützt, bei welchem die QD600 mit dem bezüglich des Kerncytoplasmatransport inerten 6xHis-GFP umgesetzt worden waren (s. Kapitel 3.1.3). Die resultierenden QD600-GFP zeigten in permeabilisierten C2C12-Zellen keine Markierung der Kernmembran (s. Abbildung 3.3). Die QD600-GFP können ausschließlich im Cytosol der Zellen und an der Plasmamembran lokalisiert werden. Dass es sich bei der in Kapitel 3.1.3 vorgestellten Kontrolle um QD600-GFP und nicht QD600 handelte, wird aus der qualitativen Kolo-kalisierung der QD- und GFP-Fluoreszenz geschlossen (Abbildung 3.3 C).

Die Ergebnisse lassen damit den Schluss zu, dass die für QD-Imp $\beta$ 1 gefundene Membranmarkierung darauf beruhte, dass die QD600 den Transportrezeptor erfolgreich gebunden hatten und aufgrund dieser Bindung Imp $\beta$ 1-vermittelt in Interaktion mit dem NPC treten konnten. Damit lag eine Sonde vor, welche für eine weitere Untersuchung des KCT verwendet werden konnte.

#### **4.1.2 QD600-Imp $\beta$ 1 weisen in permeabilisierten Zellen eine andere Verteilung auf als Cy5-Imp $\beta$ 1**

Bei der weiteren Analyse der QDot-Sonde in permeabilisierten Zellen lag der Fokus auf dem Importverhalten der funktionalisierten Nanokristalle.

Dazu wurde die intrazelluläre Verteilung der Sonde mit der eines „herkömmlich markierten“ Imp $\beta$ 1 verglichen. Dessen Verwendung zur Untersuchung des Kerncytoplasmatransports gilt als etabliert (vgl. beispielsweise [Kubitscheck et al., 2005]) und eignet sich damit als Referenz. Imp $\beta$ 1 wurde daher zunächst mit Cy5 markiert und dessen Verteilung in permeabilisierten Zellen abgebildet. Abbildung 3.1 A zeigt die Fluoreszenz von Imp $\beta$ 1-Cy5 etwa 15 Minuten nach Zugabe zu den Zellen: der organisch fluoreszenzmarkierte Transportrezeptor akkumuliert, wie nach [Miyamoto et al., 2002] erwartet, in den Zellkernen (deutlich auch am Intensitätsprofil in Abbildung 3.1 B zu erkennen).

Demgegenüber ist nun die Verteilung der QD600-Imp $\beta$ 1 zu beurteilen. Diese ist in Abbildung 3.2 dargestellt und war bereits im vorigen Kapitel zur Bewertung des Kopplungserfolgs herangezogen worden. Dabei hatte sich gezeigt, dass die Sonde zwar spezifisch im Bereich der Kernmembran bindet, sich nucleär allerdings nicht detektieren ließ. Selbst nach einer Beobachtungsdauer von 50 Minuten (Abbildungen nicht gezeigt) konnte in den konfokalen Aufnahmen keine QD600-Fluoreszenz im Zellkern nachgewiesen und damit auch keine Akkumulation beobachtet werden. Es deutete sich an, dass die Qdots trotz Membranbindung *nicht* importiert wurden.

Yang et al. konnten allerdings zeigen, dass das Verteilungsmuster von Imp $\beta$ 1 abhängig von der Konzentration des Rezeptors ist – geringe Imp $\beta$ 1-Konzentrationen verursachen zunächst das sog. Rim-Staining (also die hier beobachtete Fluoreszenzmarkierung der Membran), erst bei höheren Konzentrationen kommt es zur starken Akkumulation des Rezeptors im Zellkern. Allerdings detektierten die Autoren



selbst für geringe Konzentrationen eine signifikante Fluoreszenz im Zellkern [Yang and Musser, 2006]. Dennoch wäre denkbar, dass die QD600-Imp $\beta$ 1 hier in zu geringer Konzentration eingesetzt worden waren, um über die Markierung der Membran hinaus konfokal auch nucleäre Fluoreszenz beobachten zu können. Da sich höhere Konzentrationen wegen der Aggregationstendenz der QDots nicht realisieren ließen, wurde das Experiment erneut am EMFM durchgeführt um nucleäre QD600-Imp $\beta$ 1 mit dieser sensitiveren Methode „aufzuspüren“.

#### 4.1.3 QD600-Imp $\beta$ 1 zeigen keine Passage der Kernpore

Bei der Analyse des Experiments am sensitiveren EMFM stellte sich eine ähnliche Situation, wie bereits konfokal beobachtet, dar: Die QDot-Sonde zeigte, bis auf wenige cytosolisch immobilisierte Partikel, eine sehr spezifische Markierung der Kernmembran (s. Abbildung 3.4 A). Anhand der EMFM-Aufnahmen konnten zahlreiche der immobilisierten QDots als *einzelne* Nanopartikel identifiziert werden: die in Abbildung 3.4 C dargestellten Fluoreszenzdiagramme zeigen das für einzelne QDots typische binäre Blinken (vgl. [Michalet et al., 2005]).

Um erfolgreichen Import dennoch nachzuweisen, waren 10 Zellen genauer untersucht worden. Dabei wurden insgesamt lediglich *zwei* mobile Partikel gefunden, beide bewegten sich ausschließlich im Cytosol. Einer der beiden wurde beim Binden an die Kernmembran abgebildet (s. Abbildung 3.4 B), der andere bei einer Bewegung entlang der Membran (nicht gezeigt). Die übrigen Nanopartikel verweilten ohne maßgebliche Bewegung an der Membran. Eine Trajektorie, die echten Transport vom Cytosol ins Nucleoplasma zeigte, konnte nicht beobachtet werden. Zudem fanden sich im Beobachtungszeitraum von bis zu einer halben Stunde keine QD600-Signale *innerhalb* des Zellkerns.

Die QD600-Imp $\beta$ 1 binden also, vermittelt durch den Transportrezeptor, an den NPC, werden dann aber weder in den Zellkern transportiert noch lösen sie sich Richtung Cytosol ab. Es muss daher von einer irreversiblen Immobilisierung der QD600-Imp $\beta$ 1 am NPC ausgegangen werden. Mögliche Gründe hierfür könnten sein:

- **Sondengröße:** Die Beobachtung immobilisierter, rot fluoreszierender QDot-Sonden am NPC war bereits für die in [Ziffels, 2007] und [Klaiberg, 2007] analysierten Proben gemacht worden. In beiden Arbeiten war spekuliert worden, dass die irreversible Immobilisierung der verschiedenen QDot-Sonden am NPC auf deren Durchmesser zurückzuführen war, welche den funktionalen Durchmesser der Kernpore von 39 nm [Panté and Kann, 2002] überschritten. Die Diffusionsanalyse der hier verwendeten Sonde lieferte für QD600-Imp $\beta$ 1 einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von  $39 \pm 3$  nm und liegt damit bezüglich des funktionalen Porendurchmessers bereits im kritischen Bereich (s. Tabelle 3.1). Da die Diffusionsanalyse allerdings nur einen mittleren Durchmesser liefert, können die Größenangaben nur als ungefähre Werte verstan-



den werden. Zudem liegt den Nanokristallen synthesebedingt eine Größenverteilung zugrunde [Xie et al., 2005], so dass durchaus erwartet werden konnte, dass ein Teil der QD600-Imp $\beta$ 1 klein genug für den Porendurchtritt ist.

- **Oberflächendichte des Imp $\beta$ 1:** Zur Reaktion zwischen QD600 und Imp $\beta$ 1 war ein beinahe 20-facher Überschuss des Transportrezeptors eingesetzt worden, so dass von einer dichten Belegung der Partikeloberfläche mit Imp $\beta$ 1 ausgegangen werden kann. Eine solche Sonde würde nach den aktuellen Theorien zu den molekularen Vorgängen im Verlauf des Transports sehr viele Bindungsstellen zu den Nups im Poreninneren aufweisen (s. Kapitel 1.1.2). Diese zunächst prinzipiell erwünschten Bindungen – sie ermöglichen überhaupt erst einmal den Eintritt in die Kernpore – können sich allerdings nachteilig auf das Ablösen der Sonde im Nucleoplasma auswirken: Nach dem Transportmodell des *entropischen Besens*, darf die Bindungsenergie zwischen Transportkomplex und Nucleoporinen nicht zu hoch sein, da sonst der Entropiegewinn beim Austritt aus der Kernpore, welcher als Triebkraft für die Freisetzung des Cargos im Zielkompartiment angesehen wird, durch die hohe Bindungsenthalpie kompensiert wird. Hier könnte sich also die Umsetzung der QD600 mit geringeren Mengen Imp $\beta$ 1 als günstiger erweisen. Allerdings exponiert der Nanopartikel dann vermutlich einen sehr großen Teil seiner Oberfläche in einer Form, welche nicht mit den Nups wechselwirken kann, so dass – geht man z. B. vom Modell der *selektiven Phase* aus – eine Löslichkeit im Porenkanal nur sehr schwer möglich wäre und ein Transport damit nicht unbedingt wahrscheinlicher würde (s. hierzu auch [Ribbeck and Görlich, 2002]).

- **Eingeschränkte Funktionalität des Imp $\beta$ 1:** Eine weiterer Grund für die Immobilisierung der QD600-Imp $\beta$ 1 im Porenkanal kann auch darin liegen, dass der Transportrezeptor durch die Bindung an den QDot über eine physiologisch nicht vorgesehene Bindungsstelle (C-terminale 6xHis-Sequenz) signifikante Funktionseinbußen erfährt. Bei Imp $\beta$ 1 handelt es sich um ein gebogenes zylindrisches Protein, dessen konkave Seite für die Nucleoporin-Bindung verantwortlich ist und dessen konvexe Seite Substrate, wie beispielsweise RanGTP oder Cargo bindet [Bednenko et al., 2003]. Eine Beeinträchtigung der Nup- und/oder RanGTP-Bindungseffizienz kann eine eingeschränkte Transportfähigkeit des Rezeptors bewirken:

Imp $\beta$ 1 verfügt über zwei Nup-bindende Bereiche, von denen sich der eine in der N-terminalen und der andere in der C-terminalen Hälfte des Proteins befindet. Bednenko et al. konnten zeigen, dass der Import des Rezeptors durch Punktmutationen innerhalb einer der beiden Nup-Bindungsgebiete verlangsamt und bei Manipulation *beider* Bindungsstellen vollständig unterdrückt wird. Für die hier verwendete QDot-Sonde bedeutet dies, dass eine Beeinträchtigung einer oder beider Nup-Bindungsgebiete des Imp $\beta$ 1 – denkbar beispielsweise durch

ungünstige Orientierung des Rezeptors an der QDot-Oberfläche – die Importfähigkeit der Sonde einschränken kann.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass das Binden von RanGTP an Imp $\beta$ 1 für ein Loslösen des Rezeptors von den Nucleoporinen und damit dem NPC verantwortlich ist, indem es eine Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt [Görlich et al., 1996], [Shah et al., 1998]. Sorgt der QDot für eine sterische Hinderung der konkaven Seite des Imp $\beta$ 1, so ist denkbar, dass die RanGTP-Imp $\beta$ 1-Bindung nicht ausgebildet wird und auch in diesem Fall das Loslösen der Sonde vom NPC gestört ist.

Die Beeinträchtigung eines an sich funktionalen Importsignals durch die Bindung an einen QDot wurde bereits in [Ziffels, 2007] beobachtet: Biotinyliertes NLS-Peptid, welches sich im Test mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin als funktional erwiesen hatte, war nach Binden an Streptavidin-QDots nicht mehr in der Lage einen Transportkomplex zu bilden

Einer oder mehrere der oben aufgeführten Gründe sind vermutlich für die Immobilisierung der hier vorgestellten QDot-Imp $\beta$ 1-Sonde an der Kernhülle verantwortlich.

Dass die prinzipielle Visualisierung des Kerncytoplasmatransports mit QDot-Sonden möglich ist, konnten Lowe et al. in einer Publikation aus dem Jahr 2010 zeigen [Lowe et al., 2010]. Die Autoren entwickelten durch umfangreiche Tests eine Sonde, indem sie einen Amino-PEG-beschichteten QDot in einer 2-Schritt-Synthese über einen biofunktionalen Linker mit der Imp $\beta$ 1-Bindedomäne (IBB) koppelten. Laut ihren Berechnungen ließen sich an diese Sonde IBB-vermittelt etwa 40 Imp $\beta$ 1 binden, was in der Ausbildung eines Cargokomplexes der finalen Größe von  $30 \pm 6$  nm resultierte (Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung). Die Transportanalyse dieses Cargos wurde auf Einzelmolekülebene durchgeführt und ergab, dass die Sonde zur Passage der Kernpore im Mittel 1,4 s(!) benötigte. Dange et al. hatten demgegenüber gezeigt, dass ein einzelnes Imp $\beta$ 1 sich nur wenige ms im Bereich des NPC aufhält [Dange et al., 2008]. Die großen QDot-Sonden sorgten damit offensichtlich für die prinzipiell angestrebte Verlangsamung des Transportvorgangs (Optimierung der Auflösung). Allerdings weichen die von den Autoren ermittelten Transportzeiten um etwa 3 Größenordnungen von bisher ermittelten Werten ab (vgl. [Dange et al., 2008] o. [Frey and Görlich, 2007]), so dass die physiologische Relevanz des von Lowe et al. beobachteten Prozesses kritisch bewertet werden muss. Der Import scheint zu stark von den Eigenschaften des QDot dominiert worden zu sein und bildet damit vermutlich nicht das *native* Verhalten eines Transportkomplexes ab, welches von eigentlichem Interesse ist. Weiterhin kann man spekulieren, dass eine Sonde, deren Durchmesser sehr nahe am funktionalen Durchmesser des NPC liegt, eine stark eingeschränkte Bewegungsfreiheit im Porenkanal zeigt: Geht man von der Selektivitätsbarriere des ROD-Modells aus, so sollte ein solch großer Transportkomplex den Importvorgang ebenso abbilden lassen wie eine eher kleine Probe, da der Komplex

dort lediglich eine 2D-Diffusion aufweist; bei einem Poreninneren, wie es das SP-Modell postuliert, wird allerdings von einer freien Beweglichkeit des Transportkomplexes im *gesamten* Poreninneren ausgegangen. Ein entsprechendes Bewegungsmuster ließe sich mit einer sehr großen Sonde jedoch nicht abbilden, da diese im Querschnitt ohnehin quasi die gesamte Pore ausfüllt und damit wenig Raum für laterale Bewegung bleibt. Eine um wenige Nanometer kleinere Sonde könnte bereits deutlich detailliertere Informationen liefern und damit gegebenenfalls auch einen höheren Transporterfolg ermöglichen – Lowe et al. konnten lediglich für 20% der mit der Membran interagierenden QDots eine erfolgreiche Translokation beobachten.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse können allerdings dazu beitragen, die beschriebenen Probleme zukünftig zu minimieren. Durch die Kopplungstechnik sollten sich im Grunde die kleinstmöglichen QDot-Sonden herstellen lassen, da sie auf jegliche Beschichtung der QDot-Kerne verzichten. Sowohl die in [Ziffels, 2007] als auch in [Lowe et al., 2010] verwendeten QDots, wiesen auf der Nanokristall-Oberfläche eine PEG-Beschichtung auf. Mit dieser werden die Halbleiter-Kerne aus drei Gründen versehen: Zunächst ermöglicht sie die Wasserlöslichkeit des QDots, weiterhin sorgt sie für eine Reduktion von unspezifischen Bindungen in biologischen Proben und schließlich lässt sich der QDot an einem PEG, welches über eine geeignete funktioneller Gruppe verfügt, biofunktionalisieren. Die PEG-Beschichtung wirkt sich jedoch nachteilig auf die Größe der Sonde aus.

Die hier entwickelte Methode bietet eine Alternative zur Verwendung PEG-beschichteter QDots: Die benötigte Wasserlöslichkeit der QDots wurde durch den DHLA-Liganden gewährleistet, so dass die QDots in Pufferlösungen mit physiologischem pH-Wert über Wochen stabil gelagert werden konnten. Weiterhin hatte sich gezeigt, dass die QDot-Imp $\beta$ <sub>1</sub>-Sonde kaum Tendenzen zur Ausbildung unspezifischer Bindungen aufwies, so dass auch diesbezüglich die Notwendigkeit einer PEG-Beschichtung hinfällig wird. Schließlich konnte demonstriert werden, dass die Biofunktionalisierung der QDots durch direkte Wechselwirkung des 6xHis-markierten Importrezeptors mit der Nanokristall-Oberfläche gelang und damit auch in diesem Punkt die Anwesenheit einer PEG-Schicht obsolet scheint. Zudem verläuft die Funktionalisierung gegenüber einer 2-stufigen Kopplungsreaktion mit bifunktionalem Linker ressourcenschonender und es entfällt ein Aufreinigungsschritt. Durch die hier vorgestellte Kopplungsstrategie konnte die Sonde damit auf die beiden essentiellen Bestandteile – den fluoreszenten Nanokristall und das funktionalisierende Biomolekül – reduziert werden. Eine weitere Größenreduktion der Sonde ist daher nun durch unabhängige Optimierung der beiden Bindungspartner denkbar.

#### 4.1.4 Ein Ausblick auf mögliche Vorhaben zur Etablierung von QDots als Kerncytoplasma-transport-Sonden

Zukünftige Arbeiten werden sich mit den oben problematisierten Aspekten beschäftigen müssen und könnten folgende Möglichkeiten aufgreifen:

- **Verwendung eines kleineren Nanokristalls:** Die in [Klaiberg, 2007] verwendeten, kommerziell erhältlichen Nanokristalle geringen Durchmessers zeigten bei geeigneter Funktionalisierung erfolgreichen Kernimport. Sie eigneten sich allerdings aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften (zu dunkel selbst bei sehr kurzweiliger Anregung) nicht für weitere Analysen der Sonde. Zur Optimierung der Nanokristalle bietet sich in diesem Fall die Kooperation mit einer Forschungsgruppe an, welche sich mit der Synthese von Nanokristallen beschäftigt, an. Die hier verwendeten QDots entstammten der Arbeitsgruppe von Prof. T. Basché in Mainz, in welcher die Entwicklung von intensiv und stabil fluoreszierenden Nanopartikel vorangetrieben wird (siehe beispielsweise [Xie et al., 2005]). Ziel einer solchen Zusammenarbeit muss sein, durch Verwenden aktueller Synthesestrategien oder auch veränderter Materialzusammensetzung die Größe der zu verwendenden QDots zu verringern ohne die Fluoreszenzeigenschaften der resultierenden Nanokristalle zu beeinträchtigen.
- **Verwendung eines kleineren Transportrezeptors:** Diese Anforderung gestaltet sich auf den ersten Blick schwierig. Soll der Imp $\beta$ <sub>1</sub>-vermittelte Import untersucht werden, so ist kein Transportkomplex denkbar, bei dem auf diesen Transportrezeptor verzichtet werden kann. Allerdings lässt sich nun mit Hilfe der Ergebnisse von Lowe et al. überlegen, ob die Funktionalisierung des QDots statt mit Imp $\beta$ <sub>1</sub> nicht sinnvoller mit der mit 6xHis-markierten Imp $\beta$ <sub>1</sub>-Bindedomäne (IBB) vorgenommen werden sollte. Mit einem solchen Aufbau könnten auch die oben angesprochenen Probleme (2) und (3) adressiert werden. QDot-IBB allein sollte zunächst deutlich kleiner sein als QDot-Imp $\beta$ <sub>1</sub>. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Sonde erst durch Binden von Imp $\beta$ <sub>1</sub> transportfähig wird und sich somit wieder ein voluminöserer Partikel ausbilden könnte. Die Sonde ließe sich jedoch in Experimenten an permeabilisierten Zellen durch Zugabe verschiedener Konzentrationen an Imp $\beta$ <sub>1</sub> auf Importaktivität bereits bei geringer Imp $\beta$ <sub>1</sub>-Konzentrationen untersuchen. Unter Umständen reicht ein geringes QDot-IBB/Imp $\beta$ <sub>1</sub>-Verhältnis um Import zu ermöglichen. Gleichzeitig stünde bei Verwendung von QDot-IBB eine Sonde zur Verfügung, welche die Bindungssituation Imp $\beta$ <sub>1</sub>-Cargo physiologisch relevant wiedergäbe. Hier läge der Transportrezeptor nicht fest an den QDot gebunden vor, sondern in der vom Transportmechanismus vorgesehenen IBB-gebundenen Form.

Auch wenn der Import im Rahmen dieser Arbeit mit den QDot-Imp $\beta$ 1 nicht direkt visualisiert werden konnte, so ließen sich aus den gezeigten Experimenten jedoch wichtige Schlüsse für ein weiteres Vorgehen bei der Synthese einer QDot-Sonde zur Untersuchung des Kerncytoplasmatransports ableiten. Künftige Arbeiten werden zeigen müssen, in wie weit die hier vorgestellten Strategien tatsächlich zu einer erfolgreichen Beobachtung von annäherungsweise physiologischen Transportvorgängen beitragen können.

## **4.2 Das Photobleichen einzelner immobilisierter Fluoreszenzfarbstoffe**

### **4.2.1 Die Fluorophore lassen sich spezifisch, stabil und mit gezielter Partikeldichte immobilisieren**

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse des Photobleichens von sechs in der EMFM gebräuchlichen Farbstoffen. Dabei waren die Bleichzeiten der Farbstoffe jeweils in zwei Puffersystemen für verschiedene Anregungsintensitäten ermittelt worden, um diese als Referenzwerte – beispielsweise für Bindungszeitanalysen – zur Verfügung stellen zu können. Weiterhin wurde jeweils die Zahl der bis zum Bleichen emittierten Photonen bestimmt, da sie aufgrund ihres Einflusses auf die Lokalisierungsgenauigkeit von weiterem Interesse ist. Zu diesem Zweck wurden mit geringer Oberflächendichte am Deckglas immobilisierte Farbstoffmoleküle einzeln analysiert.

Bei der Bleichanalyse der sechs Fluorophore lag der Fokus auf der Verwendung anwendungsrelevanter Bedingungen: Die Farbstoffe waren daher zur Immobilisierung nicht in ein Polymer eingebettet worden, wie dies häufig zur Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen geschieht (s. z. B. [Davies et al., 2011]) und ebenso wenig direkt an die Oberfläche eines Deckglases adsorbiert worden (vgl. Kapitel 1.2.5) sondern wurden als Neutravidin-Fluorophor-Konjugate (Nav-F) spezifisch an zunächst mit Polyethylenglycol (PEG) passivierte und dann biotinylierte Deckgläser gebunden. Dadurch können sie mit beliebigen Puffern überschichten werden. Die nach [Piehler et al., 2000] präparierten Biotin-Oberflächen waren dabei weitgehend frei von fluoreszierenden Verunreinigungen. Abbildung 3.6 (0 nM) vermittelt hierzu einen Eindruck: im Mittel wurden etwa jeweils 10 Signale in einem abgebildetem Bereich detektiert. Nach der Umsetzung mit Nav-F wurden im Mittel etwa 100 Signale auf der Oberfläche lokalisiert, so dass ein Fremdpartikel-Anteil in den Bleichfilmen von etwa 10% vorliegt. Da weiteres Waschen der Biotin-Deckgläser (Biotin-DG) und auch die Behandlung mit Ultraschall keine Verminderung der Fremdpartikelzahl bewirkte, muss deren Anteil als potentielle Fehlerquelle bei der Ermittlung von Bleichzeiten und Photonenzahlen benannt werden.

Die Passivierung der Glasoberfläche mit PEG, zur Unterdrückung unspezifischer Bindung gelang sehr gut: Für die beiden Fälle, welche keine spezifische Bindung erwarten ließen, also zum einen die

Inkubation von NAV-F mit einem DAPEG-DG und zum anderen die von BSA-F mit einem Biotin-DG, wiesen die Deckgläser lediglich eine sehr geringe Signaldichte in der Größenordnung der intrinsischen Verunreinigungen auf (Abbildung 3.5). Demgegenüber lieferte die Inkubation eines Biotin-DG mit NAV-F (und auch mit SAV-F) eine dicht markierte Oberfläche. Dies erlaubt den Schluss, dass die NAV-F *spezifisch* mit dem Biotin-DG interagierten und die Fluorophore stabil immobilisiert wurden. Das „farbstoffmarkierte“ Deckglas erlaubte nun die Analyse des jeweiligen Fluorophors in beliebiger Umgebung – jegliche Puffer und Lösungen unterschiedlicher pH-Werte, Leitfähigkeiten, Redox-Potentiale etc. lassen sich verwenden, solange sie die Immobilisierung der Fluorophore nicht beeinträchtigen. Hierdurch können Fluorophore in der für ein geplantes Experiment relevanten Umgebung analysiert werden, so dass nicht auf Daten zurückgegriffen werden muss, die unter gänzlich zum Experiment abweichenden Bedingungen erhoben wurden. Die weiter unten diskutierten Daten wurden in PBS und dem für die Analyse des Kerncytoplasma-Transports relevanten Transportpuffer (TB) ermittelt. Neben der Reinheit und Passivität der Biotin-DG war eine weitere wichtige Voraussetzung zur Analyse einzelner Fluorophorsignale die gezielte Steuerung der Partikeldichte auf der Oberfläche. Ziel war es die Moleküldichte reproduzierbar einstellen zu können, um die abgebildeten Fluoreszenzsignale bei der Analyse der Bleichfilme voneinander separieren zu können. Die optimale Dichte ließ sich durch Einwirken unterschiedlich konzentrierter NAV-F-Lösungen auf ein Biotin-DG ermitteln. Abbildung 3.6 gibt die Moleküldichte für drei verschiedene Konzentrationen wieder. Die Inkubation mit 2 nM konzentrierter NAV-AF<sub>546</sub>-Lösung erzielte eine optimal Dichte, bei der sowohl die Abgrenzung einzelner Signale gelang als auch genügend Moleküle im beleuchteten Bereich vorlagen, um möglichst effizient eine ausreichende Anzahl Signale auswerten zu können. Zur Präparation der insgesamt 24 hier analysierten Deckgläser konnte diese Dichte mit 2 nM-Lösungen der verschiedenen NAV-F in allen Fällen reproduziert werden (vgl. Abbildungen 3.7 und 3.8).

Die gewählte Methode zur Immobilisierung der Fluoreszenzfarbstoffe eignete sich damit sehr gut für die Probenvorbereitung zur Bleichanalyse – die Immobilisierung erfolgte auf weitgehend sauberen, PEG-passivierten Glasoberflächen durch die spezifische und stabile Affinität zwischen Biotin und NAV mit optimaler Signaldichte. Zudem ließ sich das den Farbstoff umgebende Medium problemlos variieren um den Einfluss verschiedener Puffer untersuchen zu können.

#### **4.2.2 Die Auftragung der Bleichzeit $\tau$ gegen die Anregungsintensität $I$ liefert eine praktische Übersicht der Farbstoffstabilitäten**

Die hier vorgestellte Analyse ermöglichte die systematische Bestimmung der Bleichzeiten von sechs verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen jeweils in zwei unterschiedlichen Puffern. Durch die Entwicklung eines die Filmanalyse größtenteils automatisierenden Skripts konnte die Auswertung mehrerer



tausend Signale für jeden Farbstoff sowohl in PBS als auch in TB vorgenommen werden, weshalb die in Kapitel 3.2.2.4 gezeigten Ergebnisse als statistisch gut abgesichert zu betrachten sind. Zudem liefert die Analyse wegen der präzisen Bestimmung der Anregungsintensitäten „echte“ Einzelmoleküldaten. Die Immobilisierung von Fluorophoren zur Analyse ihrer Photophysik ist dabei keine neue Vorgehensweise (s. [Gell et al., 2006]). Die systematische Ermittlung der Bleichzeit als von der Anregungsintensität abhängige Größe ist jedoch weitgehend unüblich, wenngleich der Zusammenhang für den Anwender von großem Nutzen sein kann: Dies gilt sowohl für die Planung von Experimenten, bei welcher der Experimentator sich zwischen hoher und niedriger Anregungsintensität entscheiden und die jeweiligen Auswirkungen abwägen muss, als auch für die Interpretation von Ergebnissen. Das Hauptaugenmerk bei der Analyse der Bleichfilme lag daher zunächst darauf, die Abhängigkeit der Bleichzeit von der Anregungsintensität herauszuarbeiten.

Der Zusammenhang zwischen Anregungsintensität und Bleichzeit für die sechs Farbstoffe ist den Abbildungen 3.12 und 3.13 für PBS bzw. TB zu entnehmen. Die Auftragungen zeigen für alle Farbstoffe, dass die Bleichzeit im Bereich von 0 bis etwa  $0,8 \text{ kW/cm}^2$  bei zunehmender Anregungsintensität abnimmt. Bei der Arbeit mit geringen Laserleistungen bewirkt damit eine geringe Variation der Leistung auch eine direkte Auswirkung auf die Bleichzeit des verwendeten Fluorophors. Im Falle von Atto647N in TB beispielsweise bewirkt ein Senken der Intensität um 25% (von  $0,25$  auf  $0,19 \text{ kW/cm}^2$ ) eine Bleichzeitverlängerung von etwa 90% (von  $6,51$  auf  $12,51 \text{ s}$ ). Ab etwa  $0,6$  bis  $0,8 \text{ kW/cm}^2$  ist der Einfluss der Anregungsintensität auf die Bleichzeit jedoch nur noch sehr gering, da sich letztere hier jeweils auf einem farbstoffspezifischen, konstanten Niveau wiederfinden. Die Niveaus wurden für alle Farbstoffe (außer AF546, s. Kapitel 3.2.2.4) quantifiziert und in den Diagrammen der Abbildungen 3.12 und 3.13 als  $\tau_a$  angegeben, um zur kompakten Beurteilung der Farbstoffe herangezogen werden zu können. Die Verwendung höherer Anregungsintensitäten, zum Beispiel um hellere Signale zu erhalten, resultiert in diesem Intensitätsbereich kaum noch in einer Bleichzeitverkürzung. Eine Extrapolation der  $\tau_a$  in den Bereich höherer, nicht analysierter Intensitäten darf allerdings nicht vorgenommen werden, da das bestrahlte Molekül für hohe  $I$  andere Relaxations- und Reaktionspfade einschlagen kann [Diaspro et al., 2006]. Sind Bleichzeiten für höhere Anregungsintensitäten von Interesse so müssen diese gesondert erhoben werden.

Mit hier maximal möglichen Anregungsintensitäten von  $1,3 \text{ kW/cm}^2$  ( $640 \text{ nm}$ ) bzw.  $0,7 \text{ kW/cm}^2$  ( $532 \text{ nm}$ ) wurde in einem relativ niedrigen Intensitätsbereich gemessen: Einzelmolekül-Studien zur Untersuchung des KCT arbeiten mit sehr unterschiedlichen Anregungsintensitäten - so verwendeten beispielsweise [Kubitscheck et al., 2005] und [Kahms et al., 2009] Intensitäten im zuvor genannten Bereich, wohingegen [Yang and Musser, 2006] und [Dange et al., 2008] mit ca.  $4\text{-}9 \text{ kW/cm}^2$  und [Ma and Yang, 2010] sogar mit  $500 \text{ kW/cm}^2$  anregten. Die hier gezeigten Daten sind also zur Beurteilung beispielsweise der



letztgenannten Studie ungeeignet, lassen sich aber auf die erstgenannten Studien durchaus anwenden (s.u.). Die Bleichanalyse eines Fluorophors beim 500-fachen der hier realisierten Anregungsintensitäten durchzuführen, liefert jedoch sicherlich einen interessanten Datensatz – insbesondere auch bezüglich der Zahl emittierter Photonen (s. folgendes Kapitel).

Beim Vergleich der unterschiedlichen  $\tau_a$  in Abbildung 3.14 fällt auf, dass sich die sechs analysierten Fluorophore in zwei Stabilitätsklassen einteilen lassen:

Die erste Stabilitätsklasse umfasst die beiden strukturverwandten Fluorophore AF647 und Cy5, welche sowohl in PBS als auch in TB  $\tau_a < 0.2$  s aufweisen. Dabei ist Cy5 in beiden Puffern der noch einmal deutlich bleichempfindlichere Farbstoff. Die zweite Stabilitätsklasse umfasst AF546 und die drei roten Atto-Farbstoffe. Letztere verfügen mit  $\tau_a$ -Werten von 1,7 s (Atto647N) bis 3,7 s (Atto655) in PBS und 1,6 s bzw. 4,5 s in TB im Vergleich zu den instabileren Farbstoffen über um eine Größenordnung längere Bleichzeiten. Sie bieten sich damit besonders zur Markierung an, wenn einzelne Moleküle über einen relativ langen Zeitraum bei höheren Anregungsintensitäten abgebildet werden sollen (Verwendung von Atto647 und Atto647N s. z. B. [Veith et al., 2010]). Grundsätzlich gilt für die Verfolgung einzelner Partikel, dass die Bleichzeit eines Fluorophors länger sein sollte als die Dauer des zu beobachtenden Prozesses. Vor allem wenn Bindungsdynamiken beobachtet werden, zu denen keine Trajektorien abgebildet werden können, ist die Kenntnis der Bleichzeit essentiell, um das Photobleichen nicht versehentlich mit einem Dissoziationsprozess zu verwechseln. Beispiele für solche Experimente sind die Studien zur Analyse der Bindungsdauern von Transportrezeptoren, z. B. [Kubitscheck et al., 2005] oder [Yang et al., 2004]. Letztere enthält aus diesem Grund eine Abschätzung der Bleichzeit durch Abbilden von am Deckglas adsorbierten Farbstoffmolekülen, detaillierte Angaben zum Vorgehen werden dabei jedoch nicht gemacht. Die hier vorgestellte Technik lässt solche Messungen unter definierten Bedingungen mit überschaubarem Aufwand zu. Damit liefert sie verlässliche Zahlenwerte, um solche Bindungszeiten zukünftig abzusichern.

Neben der Ermittlung der Bleichzeiten in PBS wurden die Farbstoffe hier auch in TB untersucht, da die Daten zur Beurteilung von *in vitro*-Transportexperimenten verwendet werden sollten, bei welchen das fluoreszenzmarkierte Substrat in TB vorgelegt wird. Da der Puffer reduzierend wirkendes Dithiothreitol (DTT) enthält, wurde ein Einfluss auf die Bleichzeiten der Farbstoffe erwartet (vgl. [Levitus and Ranjit, 2011]). Für die beiden Farbstoffe AF647 und Cy5 konnte ein solcher Einfluss nicht gefunden werden. Die stabileren Farbstoffe zeigen kein eindeutiges Bild: AF546 und Atto647N weisen in PBS um etwa 20% bzw. 30% längere Bleichzeiten auf, während Atto655 keine signifikanten Unterschiede zeigt und Atto647 im Mittel in PBS etwa 40% schneller bleicht. Zu Atto647 muss einschränkend angemerkt werden: Obwohl die Präparationen der Deckgläser für die Farbstoffanalyse in PBS und in TB gleich verliefen, gingen für TB nur 439 Molekülen in die Analyse ein (gegenüber 2641 für PBS).

Zum einen lag dies daran, dass schlicht weniger fluoreszierende Moleküle detektiert wurden und zum anderen mussten sehr viele Signale aussortiert werden, da sie den Sortierkriterien nicht entsprachen. TB hat somit einen deutlichen Einfluss auf den Farbstoff Atto647, welcher sich für Experimente in TB dadurch als eher ungeeignet darstellt.

Aus den unterschiedlichen Auswirkungen von TB auf die untersuchten Farbstoffe folgt, dass Farbstoffmoleküle zur Ermittlung von Bleichzeiten nach der hier vorgestellten Analyse im jeweils interessierenden Medium oder Puffer abgebildet werden müssen, um verlässliche Referenzwerte zu erhalten. Für Fragestellungen, die sich auf Experimente in PBS bzw. TB beziehen, sollten sich die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Bleichzeiten jedoch übertragen lassen (s. dazu auch Tabelle A.5).

Es lässt sich abschließend festhalten, dass bezüglich der Bleichzeit alle sechs hier untersuchten Farbstoffe uneingeschränkt zur Analyse der Bindungsdauer von Transportrezeptoren in permeabilisierten Zellen mittels Epi-Beleuchtung geeignet sind. Die Bleichzeiten liegen deutlich über den meist im einstelligen ms-Bereich angesiedelten Bindungsdauern. Dies gilt insbesondere, da die hier gezeigten Daten nur für den Fall gelten, dass das Substrat mit lediglich einem Fluorophor markiert ist. Da in der Einzelmolekülmikroskopie eine Mehrfachmarkierung der Substrate üblich ist, ist bis zum Bleichen aller Fluorophore ein Mehrfaches der hier gezeigten Bleichzeit zu erwarten. Eine präzise Analyse mehrfach markierter Substrate kann trotzdem notwendig sein, da sich Fluorophore in unmittelbarer Nachbarschaft nicht unbeeinflusst lassen [Diaspro et al., 2006]. Dazu kann mehrfach markiertes Neutravidin (beispielsweise im Verhältnis NAv:Farbstoff 1:2 oder 1:3 etc.) mittels der gezeigten Bleichanalyse untersucht werden, wobei die Selektion der Fluoreszenzdiagramme dann nicht nach 1-stufigem sondern 2- bzw. 3-stufigem Bleichen erfolgen würde.

#### **4.2.3 Die Zahl der emittierten Photonen $\mathcal{N}$ ist bei den verwendeten Anregungsintensitäten weitestgehend konstant**

Neben der Kenntnis der Bleichzeiten ist bei der Planung eines Experiments auch die Helligkeit einer Sonde wichtig – besonders dann, wenn eine Nanolokalisierung angestrebt wird. Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Helligkeit eines Farbstoffs ist die Anzahl an Photonen, die pro Zeiteinheit auf den Detektor gelangen. Eine mittlere Helligkeit lässt sich z. B. berechnen, indem die Anzahl der insgesamt emittierten Photonen  $\mathcal{N}$  auf die Bleichzeit  $\tau$  bezogen wird.

Die zur Ermittlung der Photonenzahlen  $\mathcal{N}$  entwickelte Auswertungsroutine baute auf dem Skript zur Bestimmung der Bleichzeiten auf und nahm eine Umrechnung der Signalgrauwerte in Photonenzahlen vor (s. Kapitel 2.3.5.2). Hierzu mussten der Kamerafaktor  $\gamma$ , die Detektionseffizienz  $Q_F$  und die Grauwertsumme  $\mathcal{B}$  bestimmt werden. Alle drei Größen sind mit einem unbestimmten Fehler behaftet, so dass auch die ermittelten Photonenzahlen nur ungefähre Werte darstellen (vgl. Kapitel

2.3.5.2). Dennoch besitzt die Angabe der Photonenzahlen einen entscheidenden Vorteil gegenüber beispielsweise der von Signal/Rausch-Werten: sie sind weitestgehend von systembedingten Einflüssen befreit und lassen sich daher auch in Relation zu an anderen Geräten gewonnen Photonenzahlen setzen. Der Vergleich der hier ermittelten Photonenzahlen mit Literaturwerten zeigt, dass die Werte für  $\mathcal{N}$  in etwa mit publizierten Werten übereinstimmen (s. z. B. [Davies et al., 2011] und [Jung et al., 2009]). Die Abbildungen 3.19 und 3.20 geben die ermittelten Photonenzahlen für die Farbstoffe in PBS bzw. TB wieder. Auffällig ist zunächst, dass die Werte im Vergleich zu den Bleichzeiten, für die zumeist relativ unverrauschte Verläufe beobachtet werden konnten, stärkeren Schwankungen unterliegen. Dies ist wahrscheinlich in der komplexeren Auswertung der Daten begründet – während es zur Ermittlung der Bleichzeiten ausreicht, nur einen Teil des Fluorophorsignals mit dem Auslesebereich zu erfassen, reagiert die Ermittlung der Photonenzahlen sehr empfindlich darauf, wenn Bereiche des Signals nicht erfasst oder der Hintergrund fehlerhaft analysiert wird. Weiterhin zeigen die Auftragungen, dass die Zahl emittierter Photonen für die meisten Farbstoffe bei Anregungsintensitäten oberhalb von etwa  $0,5 \text{ kW/cm}^2$  konstant ist – für kleinere Intensitäten lässt sich allerdings teilweise noch eine Abhängigkeit beider Größen erkennen (z. B. Cy5/PBS o. Atto655/PBS). Der jeweils in die Diagramme eingezeichnete Wert für die mittlere Photonenzahl  $\mathcal{N}_a$  kann, wie bereits zuvor die  $\tau_a$ , zur kompakten Bewertung der Farbstoffe verwendet werden.

Eine konstante Photonenzahl bei gleichzeitig abnehmender Bleichzeit bedeutet, dass die Fluorophore mit zunehmender Anregungsintensität auch zunehmend heller werden. Im betrachteten Intensitätsbereich läuft die Bleichzeit schließlich für höhere  $I$  gegen  $\tau_a$ , so dass ab dem Erreichen dieses Wertes auch die Helligkeit ihr Maximum erreicht. Beispielsweise führt für Atto647/PBS eine Erhöhung der Anregungsintensität von  $0,8 \text{ kW/cm}^2$  auf  $1,3 \text{ kW/cm}^2$  nicht mehr zu einem Helligkeitsgewinn, sondern ggf. durch eine Verstärkung der Hintergrundfluoreszenz sogar zu einem schlechteren Signal/Rausch-Verhältnis. Bei Kenntnis dieser Farbstoffcharakteristika kann damit eine unnötig intensive Anregung der Probe vermieden werden.

Anhand der der Diagramme in den Abbildungen 3.19 und 3.20 lässt sich auch erkennen, dass die Photonenzahlen der instabileren Farbstoffe AF647 und Cy5 deutlich geringer sind als die der stabileren Farbstoffe. Die beiden erstgenannten emittieren im Mittel in PBS  $0,11 \cdot 10^6$  bzw.  $0,04 \cdot 10^6$  Photonen, wohingegen Atto647 und Atto647N mit etwa  $1,1 \cdot 10^6$  bzw.  $1,5 \cdot 10^6$  Photonen um eine Größenordnung darüber liegen. Interessant ist der Befund, dass der äußerst bleichstabile Farbstoff Atto655 sich hier mit  $0,7 \cdot 10^6$  emittierten Photonen in der Gruppe der bleichstabilen Farbstoffe am emissionsschwächsten herausstellt.

Blickt man nun auf die Photonenzahlen der Farbstoffe in TB, so zeigt sich innerhalb der Gruppe der instabileren Farbstoffe, dass AF647 unverändert emittiert, während Cy5 in TB etwa 60% höhere

Photonenzahlen aufweist. Obwohl TB keinen Effekt auf Cy5 bezüglich der Bleichzeiten hatte, lassen sich somit deutliche Auswirkungen auf die Photonenzahl erkennen. In der Gruppe der stabileren Farbstoffe zeigt sich auch hier ein uneinheitliches Bild: AF546 und Atto647 emittieren in TB etwa 60% bzw. fast das 4-fache weniger Photonen als in PBS. Demgegenüber liegt die Emission für Atto647N und Atto655 in TB im Mittel etwa 20% höher als in PBS.

Auch für die Photonenzahlen gilt damit, dass prinzipiell eine Abhängigkeit vom umgebenden Medium vorausgesetzt werden muss, so dass Referenzwerte im jeweils für das Experiment relevanten Medium bzw. Puffer gemessen werden müssen.

Die Kenntnis der Photonenzahlen und Bleichzeiten liefert insgesamt in der Vorbereitungsphase eines Experiments eine Vorstellung davon, in welchem Intensitätsbereich eine Anregung der Fluorophore sinnvoll ist, um die gewünschte Nanolokalisierung erreichen und den Fluorophor gleichzeitig ausreichend lange beobachten zu können.

#### **4.2.4 Ein Ausblick auf zukünftig mögliche Projekte der *in vitro*-Farbstoffanalyse**

Die hier vorgestellte Analyse der Bleichzeiten und Photonenzahlen stellt bereits ein Set an Referenzwerten zur Verfügung, welche zur Planung von Experimenten verwendet werden können. Allerdings ist ihre Einbeziehung nur dann sinnvoll, wenn das jeweilige Experiment vorsieht, mit dem gewählten Fluorophor einen Prozess in PBS oder TB abzubilden. Weitere Farbstoff-Puffer-Kombinationen müssten zunächst analysiert werden. Insbesondere die Analyse in Cytosol- oder Zellkernextrakt kann interessante Datensätze liefern, die sich auch mit „echten“ *in vivo*-Daten vergleichen ließen (s. folgendes Kapitel). Aber auch durch die Analyse in mit speziellen Molekülen angereicherten Lösungen können sinnvolle Referenzwerte geschaffen werden, anhand derer sich der Einfluss verschiedener Pufferkomponenten unter definierten Bedingungen quantifizieren ließe. Diesbezüglich ließen sich beispielsweise die Auswirkungen von Reagenzien, die das Farbstoffblinken unterdrücken oder fördern (beispielsweise in [Vogelsang et al., 2008]) oder bleichreduzierenden Zusätzen untersuchen.

Neben solchen Screening-Vorhaben zum Ausbau einer Datenbank mit Fluorophoreigenschaften, stehen zukünftig ebenso methodische Optimierungen an. Hier ist beispielsweise an die Entwicklung eines automatischen Sortieralgorithmus gedacht, um den Datendurchsatz weiter steigern zu können. Gleichzeitig würde dadurch das subjektive Moment des manuellen Sortierens eliminiert. Darüber hinaus wäre eine detaillierte Analyse des Blinkens wünschenswert. Gerade wenn das Blinken hochfrequent erfolgt und die An- und Auszustände nur wenige Millisekunden andauern, kann dies beispielsweise bei der Analyse von Bindungsereignisse als Dissoziation fehlinterpretiert werden. Eine solche Analyse ist methodisch anspruchsvoll: Zum einen müssen Filme bei verschiedenen Bildwiederholungsraten aufgenommen werden, um Blinken auf verschiedenen Zeitskalen zu erfassen; zum anderen sind die

---

Kriterien zur Unterscheidung von An- und Auszustand zu definieren und automatisieren.

Damit lässt sich für zukünftige Arbeiten bereits ein umfangreiches Programm formulieren, durch welches das Fluorophorverhalten, welches in der Einzelmolekülmikroskopie häufig aufgrund mangelnder Daten unbeachtet bleibt, vertiefen ließe.

#### 4.2.5 Erste Analysen *in vivo* – die Bestimmung der Bleichzeit von Atto655

Nachdem die Einzelmolekülmikroskopie erste Erkenntnisse zu Bindungsdynamiken am NPC vor allem in permeabilisierten Zellen ermitteln konnte, zeigen aktuelle Publikationen zunehmend auch Daten aus Analysen im lebenden System. Gerade für solche Experimente ist die Kenntnis von Bleichzeit und Photonenzahlen von großer Bedeutung. Bei der Abbildung von lebenden Zellen muss aufgrund von Autofluoreszenz grundsätzlich mit einer höheren Hintergrundintensität gerechnet werden, so dass eine möglichst geringe Anregungsintensität zur Optimierung der Signalqualität gewählt werden sollte. Diese ist gerade auch zur Vermeidung einer Photoschädigung der Lebzelle prinzipiell zu empfehlen. Bei Kenntnis der intensitätsabhängigen Photonenzahlen und Bleichzeiten lässt sich die optimale Anregungsintensität bei gleichzeitigem Erreichen der benötigten Helligkeit und Bleichstabilität bereits in die Planung eines Experiments einbeziehen.

Benson et al. hatten bereits 1985 das Photobleichen verschiedener Farbstoffe in lebenden und fixierten Zellen untersucht und fanden in Ensemble-Experimenten eine Ortsabhängigkeit der Photobleich-Ratenkonstanten [Benson et al., 1985]. Da die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Analyse einzelne, immobilisierte Fluorophore unter möglichst definierten Bedingungen abzubilden suchte, wurde der *in vivo* zu untersuchende Farbstoff gezielt an *eine* bestimmte Zellstruktur – nämlich die Kernporenkomplexe – gebunden, um den Einfluss der von Benson et al. gefundenen Ortsabhängigkeit des Bleichens möglichst gering zu halten.

Die Bleichzeit-Analyse *in vivo* wurde exemplarisch für Atto655 durchgeführt. Dazu wurde der Farbstoff kovalent an den Antikörper mab<sub>414</sub> gebunden und in Lebzellen injiziert, in welchen dieser spezifisch an verschiedene Kernporenproteine bindet und das Fluorophor somit immobilisiert.

Für diese Immobilisierungstechnik ist die Stabilität der Antikörper-Epitop-Bindung eine wichtige Größe: Weist die Bindung eine nur geringe Affinität auf, so kann es im Verlauf der Bleichexperimente zu Ab- und Anbinden der mab<sub>414</sub>-Farbstoff-Konjugate kommen – ein Vorgang, der als Bleichen fehlinterpretiert werden kann. Obwohl mab<sub>414</sub> ein häufig zur Markierung der Kernporenkomplexe verwendeter Antikörper ist, konnten in der Literatur keine Bindungskonstanten gefunden werden. Generell liegen die Affinitätskonstanten für Antikörper-Epitop-Wechselwirkungen im Bereich von  $10^5 M^{-1}$  bis  $10^{12} M^{-1}$  und sind damit deutlich kleiner als die Konstante der Biotin-Neutravidin-Bindung [Harlow and Lane, 1999]. Für die ersten Versuche einer Bleichanalyse *in vivo* wurde die

genaue Kenntnis der Bindungsstabilität vernachlässigt, da es zunächst darum ging, die prinzipielle Anwendbarkeit der Analyse auf in Lebendzellen immobilisierte Fluorophore zu prüfen.

Das Vorgehen zur Bestimmung der *in vivo*-Bleichzeiten gestaltete sich analog dem der Deckglas-Experimente. Abbildung 3.24 zeigt die zu Abbildung 3.7 vergleichbare Zeitserie für das Photobleichen der immobilen mab<sub>414</sub>-Atto655. Aufgrund der vergleichsweise hohen Hintergrundfluoreszenz, mussten die Filme vor der Auswertung der Daten stark gefiltert werden. Insgesamt konnten 616 Moleküle in 18 Zellen ausgewertet und die in Abbildung 3.25 gezeigten Diagramme erstellt werden. Diese gibt das durch Angabe der Mediane geglättete Diagramm wieder und lässt, wie bereits für die *in vitro*-Daten festgestellt, eine Abhängigkeit zwischen Bleichzeit und Anregungsintensität erkennen: Die für die ersten drei Intensitäten bei 4 bzw. 3 s liegenden Bleichzeiten sinken bei höheren Intensitäten auf 2 s ab. Im Vergleich zu den *in vitro*-Werten finden sich in Lebendzellen deutlich geringere Bleichzeiten, sie betragen nur etwa die Hälfte bis ein Viertel der am Deckglas ermittelte Werte. Verschiedene Ursachen sind denkbar:

- **Einfluss cytosolischer Komponenten:** Die *in vivo*-Analyse soll etabliert werden, um den Einfluss des Cytosols auf die Fluoreszenzeigenschaften eines in Lebendzellen eingesetzten Farbstoffes analysieren zu können. Weichen die *in vivo* ermittelten Daten von den *in vitro*-Daten ab, so kann als Hauptursache der Einfluss von im Cytosol enthaltenen Effektoren vermutet werden. Da dessen Zusammensetzung äußerst komplex ist, lässt sich anhand der vorgestellten Analyse keine Aussage zur Natur der Wechselwirkungen machen.
- **Unzureichend stabile Immobilisierung:** Die Affinität von mab<sub>414</sub> zu seinen Epitopen konnte anhand der Literatur nicht geklärt werden. Denkbar ist daher, dass die Bindungskinetik sich im Bereich der Bleichkinetik bewegt, so dass eine Dissoziation von Antikörper und Nucleoporin die Bleichzeiten verfälschen, da sie methodisch bedingt nicht vom Photobleichen unterschieden werden kann.
- **Einfluss des Antikörpers:** Als direkter Bindungspartner des Fluorophors könnte mab<sub>414</sub> einen Einfluss auf die Fluoreszenz des Farbstoffs ausüben. Dies gilt zwar im gleichen Maße auch für Neutravidin in den *in vitro*-Studien, dort war allerdings die Konsistenz für die Vergleiche der Farbstoffe untereinander gewahrt, da durchgehend dieselbe Immobilisierungsvariante verwendet wurde. Beim Vergleich von Daten, die am System *NAv-Fluorophor* erhalten wurden, mit denen, die mittels *mab<sub>414</sub>-Fluorophor* ermittelt wurden, muss der Effekt des immobilisierenden Proteins (NAv bzw. mab<sub>414</sub>) bedacht werden.
- **Diffuse Beleuchtung:** Der Einfluss des Zellgewebes auf das Beleuchtungsprofil ist unklar, ein Linseneffekt des gewölbten Zellkerns könnte für eine nicht dem Beleuchtungsprofil entsprechende Anregung sorgen. Damit wären die absoluten Werte der Anregungsintensitäten in Frage



zu stellen.

#### 4.2.6 Ein Ausblick auf mögliche Entwicklungen der *in vivo*-Farbstoffanalyse

Aus dem oben genannten Ursachen geht hervor, dass die ermittelten *in vivo*-Bleichzeiten sich noch nicht für eine sinnvolle Beurteilung des Farbstoffverhaltens in Lebendzellen eignen und die Methode zur Ermittlung von zuverlässigen Daten zukünftig noch einiger Optimierung bedarf. Folgende Punkte ließen sich adressieren:

- Zunächst muss die Dissoziationskinetik von mab<sub>414</sub> bezüglich seiner Epitope geklärt werden. Liegt die mittlere Bindungsdauer im Bereich der zu erwartenden Bleichzeit, so eignet sich der Antikörper nicht für die Analyse. Entsprechende Bindungsassays können *in vitro* ausgeführt werden.
- Der Einfluss des Antikörpers ließe sich beispielsweise durch Biotinylierung von mab<sub>414</sub>-Atto655 und anschließender Immobilisierung des Substrates auf einem Neutravidin-PEG-Deckglas analysieren. Zeigt der Fluorophor in PBS oder TB ein im Vergleich zu NAv-Atto655 verändertes Fluoreszenzverhalten, so muss von einem Einfluss des Antikörpers auf den Farbstoff ausgegangen werden.
- Die Beleuchtungssituation an der Zellkernoberseite lässt sich kaum präzise analysieren. Eine Möglichkeit das daraus entstehende Problem zu umgehen, bestünde darin, statt der Kernoberseite die Moleküle an der -unterseite abzubilden, da der Laserstrahl dort erst einen kurzen Weg durch die Probe zurückgelegt hat. Diese Methode ist jedoch nicht ohne Probleme: Unterhalb des Kerns wurde häufig eine Schicht immobiler fluoreszenten Partikel unbekannter Herkunft beobachtet, von der sich die Kernunterseite oft nur schlecht abgrenzen ließ.
- Schließlich wäre interessant, ob sich *in vivo*-Daten von in Cytosolextrakt gewonnenen *in vitro*-Daten unterscheiden.

Diese Vorschläge zur Weiterentwicklung der *in vivo*-Analyse ließen sich in einem zukünftigen Projekt bearbeiten. Damit kann die Analyse schließlich in einen Zustand versetzt werden, welcher die Fluoreszenzeigenschaften von Farbstoffen *in vivo* genauso zuverlässig bestimmen lässt, wie die zuvor diskutierte *in vitro*-Analyse es bereits vermag. Der Bedarf an *in vivo*-Daten zur Stabilität und Helligkeit von Fluorophoren wird aufgrund der Zunahme an Einzelmolekül-Experimenten in Lebendzellen, zur Aufklärung beispielsweise des Kerncytoplasmatransports, sicherlich in den nächsten Jahren zunehmen. Eine funktionierende *in vivo*-Analyse könnte die benötigten Daten liefern.





# A Anhang

## A.1 Typische Fluoreszenzdiagramme für Cy5/TB

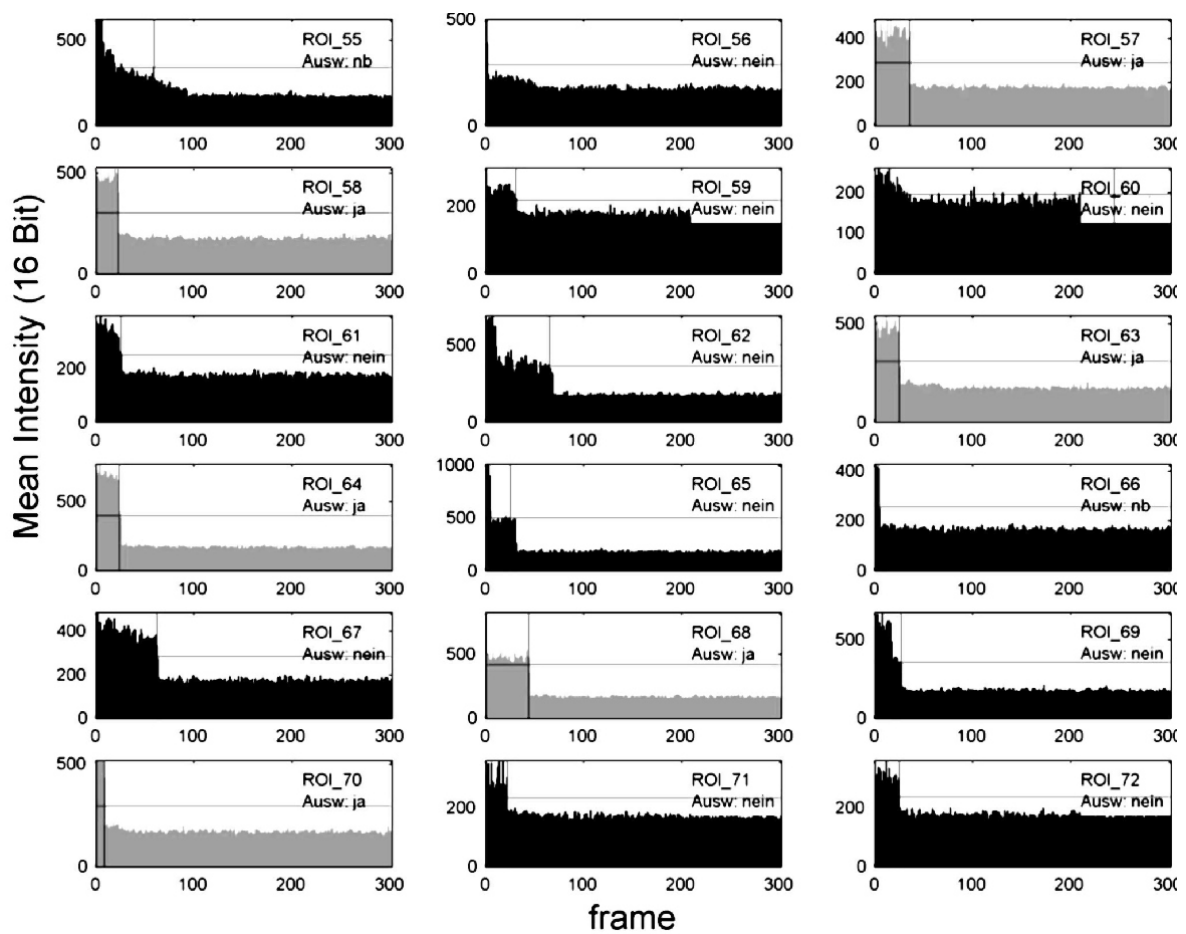
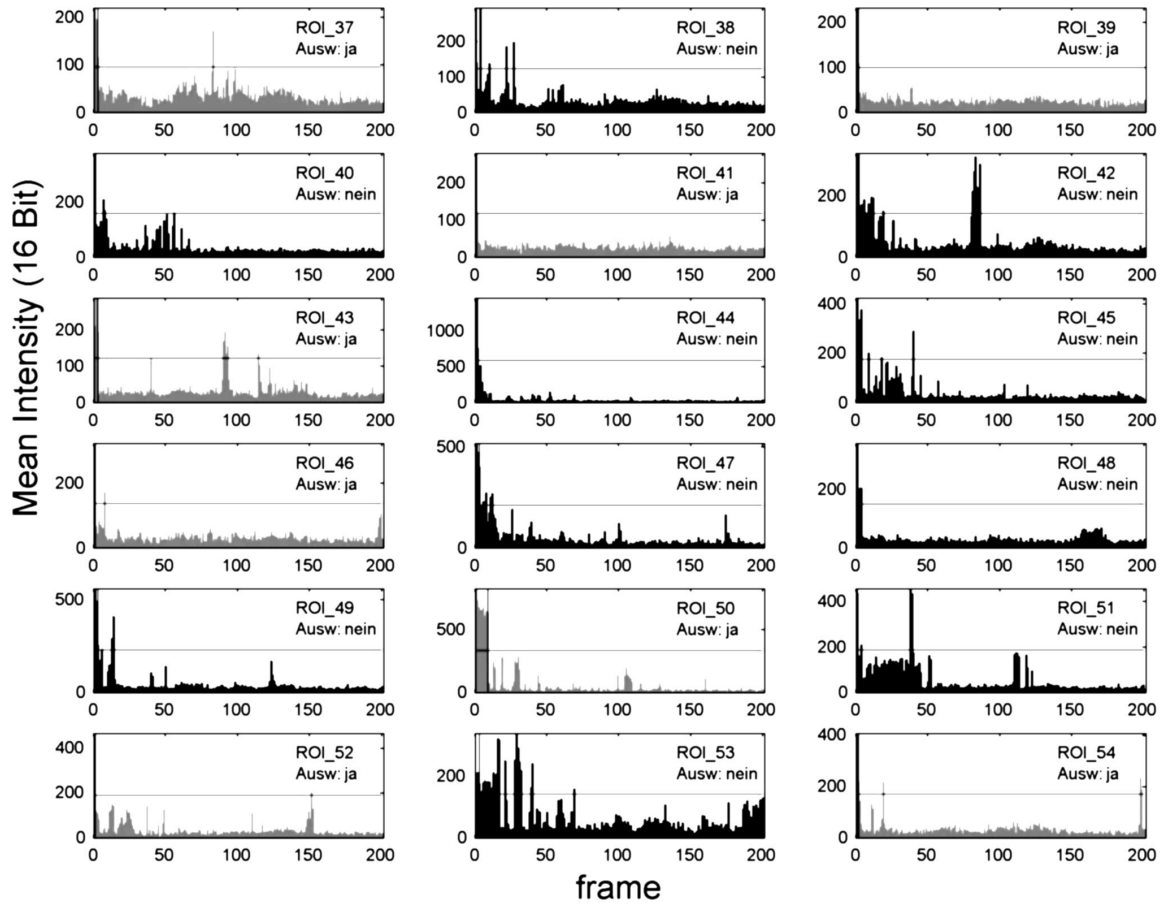


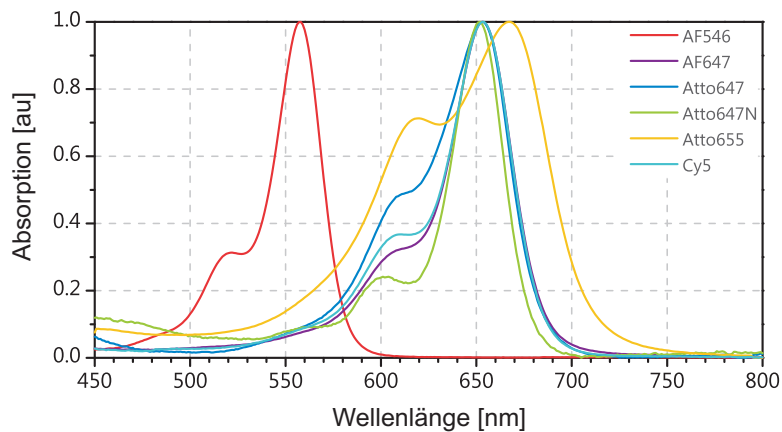
Abbildung A.1: Typische Fluoreszenzdiagramme für Cy5/TB. Der Auswertungsstatus des jeweiligen Diagramms kann dem Vermerk hinter „Ausw.“ entnommen werden: „ja“ bedeutet, dass das Molekül in die Auswertung einbezogen wurde (hellgraue diagramme), „nein“, dass das Molekül verworfen wurde und „nb“, dass das Molekül zu nah am Rand des beleuchteten Bereichs lokalisiert worden war und daher verworfen wurde. Die horizontale Linie gibt den Schwellenwert  $G_s$  wieder, die vertikale Linie markiert den von der Matlab-Routine bestimmten Bleichzeitpunkt.

## A.2 Typische Fluoreszenzdiagramme für Atto655 *in vivo*



**Abbildung A.2: Typische Fluoreszenzdiagramme für Atto655 *in vivo*.** Der Auswertungsstatus des jeweiligen Diagramms kann dem Vermerk hinter „Ausw:“ entnommen werden: „ja“ bedeutet, dass das Molekül in die Auswertung einbezogen wurde (hellgraue diagramme), „nein“, dass das Molekül verworfen wurde und „nb“, dass das Molekül zu nah am Rand des beleuchteten Bereichs lokalisiert worden war und daher verworfen wurde. Die horizontale Linie gibt den Schwellenwert  $G_s$  wieder, die vertikale Linie markiert den von der Matlab-Routine bestimmten Bleichzeitpunkt.

## A.3 Absorptionsspektren der NAV-Farbstoff-Konjugate

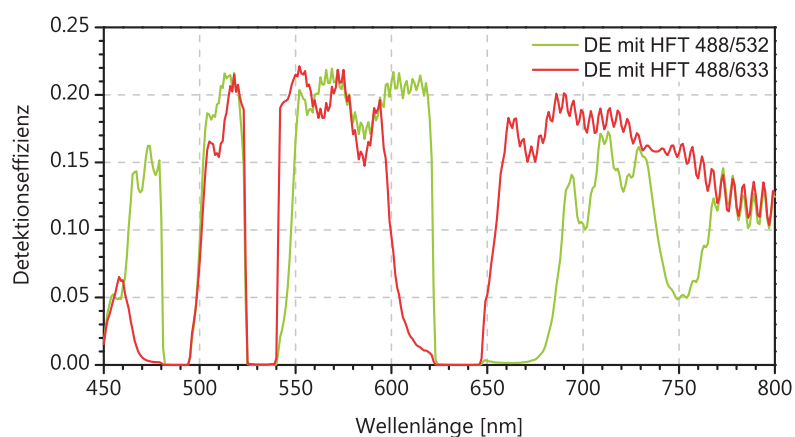


**Abbildung A.3: Absorptionsspektren der NAV-Farbstoff-Konjugate.**

	$\lambda_{\max, \text{Abs}} [\text{nm}]$	$\lambda_{\max, \text{Em}} [\text{nm}]$
NAv-AF546	558	573
NAv-Cy5	654	670
NAv-AF647	653	671
NAv-Atto647	653	666
NAv-Atto647N	652	665
NAv-Atto655	667	682

Tabelle A.1: Absorptions- und Emissionsmaxima der NAv-Farbstoff-Verbindungen.

#### A.4 Detektionseffizienz des Mikroskopaufbaus



**Abbildung A.4: Detektionseffizienzen des Mikroskopaufbaus.** Für die hier durchgeführten Experimente wurde der Strahlengang lediglich um den mit der entsprechenden Anregungswellenlänge korrespondierenden HFT variiert. Die Detektionseffizienz für das System mit HFT 488/633 ist rot dargestellt und die bei ansonsten gleichem Aufbau und Verwendung des HFT 488/532 als grüner Verlauf eingezeichnet. In die Berechnung der beiden Detektionseffizienzen gingen die Sammeleffizienz (enthält Tubuslinse) ein und die Transmissionen der 3 Notchfilter, jeweils eines der genannten Hauptfarbteiler, des Sideport-Prismas, der 4-fach Vergrößerungsoptik und des Kamerafensters. Weitere Details sind Kapitel 3.2.3.1 zu entnehmen.

## A.5 Mittlere Bleichzeiten und Anregungsintensitäten

A																
in PBS	$\Lambda$ [%]	N	Median Anregungsintensität [kW/cm <sup>2</sup> ]/Median Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ [s]													
AF546	100	1431	0,17/23,08	0,25/14,05	0,35/8,03	0,45/5,02	0,55/4,01	0,64/3,51								
AF647	92	4340	0,19/0,53	0,26/0,63	0,36/0,46	0,46/0,37	0,56/0,28	0,66/0,24	0,75/0,20	0,85/0,17	0,95/0,15	1,04/0,15	1,14/0,15			
Atto647	99	2641	0,18/12,30	0,25/10,99	0,35/6,05	0,44/4,64	0,54/3,63	0,65/3,23	0,74/3,03	0,84/2,42	0,95/2,82	1,06/1,61	1,14/2,62	1,25/2,82		
Atto647N	98	1640	0,15/13,53		0,35/5,90	0,47/5,65	0,56/3,43	0,64/3,14	0,75/2,58	0,84/2,75	0,95/2,03	1,04/1,82	1,14/1,82	1,25/1,73	1,35/1,63	
Atto655	100	1539			0,36/14,52	0,45/11,02	0,57/7,01	0,65/7,01	0,74/5,01	0,85/4,01	0,94/4,01	1,04/4,01	1,15/3,01			
Cy5	92	3431	0,06/0,65	0,15/0,47	0,26/0,30	0,36/0,24	0,45/0,15	0,56/0,13	0,65/0,11	0,76/0,11	0,85/0,11	0,95/0,09	1,04/0,09	1,13/0,09		
Blöcke zu je 0,1 kW/cm <sup>2</sup>			0 - 0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	0,3 - 0,4	0,4 - 0,5	0,5 - 0,6	0,6 - 0,7	0,7 - 0,8	0,8 - 0,9	0,9 - 1,0	1,0 - 1,1	1,1 - 1,2	1,2 - 1,3	1,3 - 1,4

B																
in TB	$\Lambda$ [%]	N	Median Anregungsintensität [kW/cm <sup>2</sup> ]/Median Bleichzeit $\tau_{\Lambda}$ [s]													
AF546	100	2014	0,17/18,56	0,25/9,53	0,35/6,02	0,45/4,01	0,55/3,01	0,65/2,51								
AF647	92	3654	0,19/1,02	0,24/0,61	0,35/0,39	0,44/0,33	0,55/0,24	0,65/0,24	0,75/0,20	0,84/0,20	0,95/0,20	1,04/0,15	1,13/0,15	1,22/0,17		
Atto647	99	439		0,25/19,56	0,35/8,27	0,46/8,57	0,55/9,88	0,66/5,95	0,75/3,43	0,85/3,93	0,96/4,03	1,03/2,62				
Atto647N	98	2491	0,19/12,51	0,25/6,51	0,37/4,12	0,45/4,68	0,56/2,95	0,65/2,80	0,75/2,03	0,85/2,03	0,95/1,73	1,05/1,73	1,13/1,32	1,22/1,83		
Atto655	100	1178	0,18/45,08	0,25/32,05	0,36/19,03	0,44/11,02	0,57/6,01	0,65/7,01	0,76/4,01	0,85/4,01	0,95/4,51	1,04/5,01	1,12/4,01			
Cy5	92	2804	0,19/0,37	0,25/0,33	0,35/0,22	0,45/0,17	0,56/0,20	0,65/0,13	0,75/0,11	0,85/0,11	0,94/0,09	1,04/0,09	1,13/0,09	1,24/0,11		
Blöcke zu je 0,1 kW/cm <sup>2</sup>			0 - 0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	0,3 - 0,4	0,4 - 0,5	0,5 - 0,6	0,6 - 0,7	0,7 - 0,8	0,8 - 0,9	0,9 - 1,0	1,0 - 1,1	1,1 - 1,2	1,2 - 1,3	1,3 - 1,4

**Tabelle A.2: Medianwerte der Bleichzeiten und Anregungsintensitäten.** Wertepaare zu den Abbildungen 3.12 und 3.13 **A** Bestrahlungslast  $\Lambda$ , Anzahl der analysierten Moleküle  $N$  und Mediane zu den Bleichzeiten  $\tau_{\Lambda}$  und jeweiligen Anregungsintensitäten für die Farbstoffe in PBS. **B** Wie A, jedoch für die Farbstoffe in TB.

## A.6 Mittlere Photonenzahlen und Anregungsintensitäten

A

in PBS	$\Lambda$ [%]	N	Median Anregungsintensität [kW/cm <sup>2</sup> ]/Median Photonenzahl $\mathcal{N}_\Lambda$ [10 <sup>6</sup> ]													
AF546	100	583	0,18/1,51	0,25/2,01	0,35/1,37	0,46/0,91	0,54/1,22	0,64/1,17								
AF647	92	1804	0,19/0,07	0,26/0,12	0,35/0,11	0,45/0,13	0,56/0,11	0,66/0,13	0,75/0,11	0,85/0,10	0,96/0,10	1,04/0,12	1,14/0,14			
Atto647	99	1393	0,18/0,97	0,26/1,85	0,35/1,48	0,44/1,15	0,55/1,15	0,65/1,10	0,75/1,28	0,84/1,14	0,95/1,37	1,06/0,91	1,14/1,84	1,25/0,70		
Atto647N	98	1190	0,16/1,64		0,35/1,94	0,47/1,92	0,56/1,33	0,64/1,89	0,75/1,27	0,84/1,66	0,95/1,31	1,04/1,15	1,15/1,36	1,35/2,24		
Atto655	100	990			0,37/1,40	0,46/1,00	0,56/0,86	0,65/0,93	0,74/0,70	0,85/0,66	0,94/0,80	1,04/0,70	1,15/0,85			
Cy5	92	1655	73/0,12	0,15/0,09	0,25/0,06	0,36/0,06	0,45/0,05	0,56/0,04	0,64/0,04	0,75/0,03	0,85/0,04	0,95/0,04	1,03/0,03	1,14/0,04		
Blöcke zu je 0,1 kW/cm <sup>2</sup>			0 - 0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	0,3 - 0,4	0,4 - 0,5	0,5 - 0,6	0,6 - 0,7	0,7 - 0,8	0,8 - 0,9	0,9 - 1,0	1,0 - 1,1	1,1 - 1,2	1,2 - 1,3	1,3 - 1,4

B

in TB	$\Lambda$ [%]	N	Median Anregungsintensität [kW/cm <sup>2</sup> ]/Median Photonenzahl $\mathcal{N}_\Lambda$ [10 <sup>6</sup> ]													
AF546	100	715	0,19/0,88	0,25/0,95	0,36/0,98	0,45/0,81	0,54/0,66	0,64/0,76								
AF647	92	1637	0,19/0,15	0,24/0,13	0,35/0,11	0,44/0,11	0,56/0,10	0,65/0,11	0,75/0,11	0,85/0,11	0,96/0,13	1,04/0,10	1,13/0,11			
Atto647	99	349		0,24/0,51	0,36/0,30	0,46/0,36	0,55/0,43	0,66/0,39	0,75/0,18	0,86/0,40	0,96/0,25	1,03/0,56				
Atto647N	98	1173		0,25/2,00	0,37/1,44	0,45/2,90	0,56/2,44	0,65/2,21	0,76/2,01	0,85/1,75	0,95/2,02	1,05/1,74	1,13/1,56			
Atto655	100	653		0,25/2,10	0,36/1,39	0,44/1,16	0,56/0,97	0,65/1,05	0,76/0,83	0,85/0,78	0,95/0,92	1,04/1,18				
Cy5	92	1751	0,19/0,07	0,26/0,07	0,34/0,06	0,45/0,06	0,56/0,08	0,65/0,07	0,75/0,07	0,85/0,07	0,94/0,07	1,04/0,07	1,13/0,07	1,24/0,08		
Blöcke zu je 0,1 kW/cm <sup>2</sup>			0 - 0,1	0,1 - 0,2	0,2 - 0,3	0,3 - 0,4	0,4 - 0,5	0,5 - 0,6	0,6 - 0,7	0,7 - 0,8	0,8 - 0,9	0,9 - 1,0	1,0 - 1,1	1,1 - 1,2	1,2 - 1,3	1,3 - 1,4

**Tabelle A.3: Medianwerte der Photonenzahlen und Anregungsintensitäten.** Wertepaare zu den Abbildungen 3.19 und 3.20. **A** Bestrahlungslast  $\Lambda$ , Anzahl der analysierten Moleküle  $N$  und Mediane der Photonenzahlen  $\mathcal{N}_\Lambda$  und der jeweiligen Anregungsintensitäten für die Farbstoffe in PBS. **B** Wie A, jedoch für die Farbstoffe in TB.





## B Material

### B.1 Chemikalien

Die folgende Tabelle enthält die verwendeten Chemikalien, ergänzende Angaben und Bezugsquellen:

Chemikalie	ergänzende Angaben	Bezugsquelle
(3-Glycidyoxypropyl)trimethoxysilan	GOPTS	Sigma-Aldrich
Aceton	Uvasol	Merck KGaA
Alexa Fluor 546	als NHS-Ester	invitrogen
Alexa Fluor 647	als NHS-Ester	invitrogen
Ampicillin Natriumsalz	Stammlösung 100 g/L	Carl Roth
Atto647	als NHS-Ester	Sigma-Aldrich
Atto647N	als NHS-Ester	Atto-Tec
Atto655	Als NHS-Ester	Atto-Tec
Bio-Gel P-6 DG	extrafein 45 µm	Bio-Rad
Biotin-X-X-NHS	Biotin-NHS	Sigma-Aldrich
Borax		Carl Roth
Chloramphenicol	Stammlösung 34 g/L	Carl Roth
Cy5	als NHS-Ester	GE Healthcare
Digitonin		Carl Roth
Dimethylformamid, zur Analyse	DMF	Fisher Scientific
Dinatriumhydrogencarbonat		Carl Roth
DMSO		Sigma-Aldrich
DTT		Carl Roth
Dulbecco's Modified Eagle Medium		Gibco
EGTA		Carl Roth
fötales Kälberserum	FCS	Hyclone
Geneticin	30.000 U/mL	Biochrom AG

Chemikalie	ergänzende Angaben	Bezugsquelle
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow		GE Healthcare
Glycin		Grüssing
Hefeextrakt		Carl Roth
HEPES		Carl Roth
Kaliumacetat		Carl Roth
Kanamycinsulfat	Stammlösung 25 g/L	Carl Roth
L-Glutamin		Biochrom
Magnesiumacetat		Carl Roth
Natriumacetat		Carl Roth
Natriumdihydrogencarbonat		Carl Roth
NH <sub>2</sub> -PEG-NH <sub>2</sub> , 2000 g/mol	DAPEG	Rapp Polymere
NHS-Biotin		Sigma-Aldrich
p-Aminobenzamidin-Agarose		Sigma-Aldrich
PBS, vorgemischt		Biochrom
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/mL/10.000 µg/mL	Biochrom
Roti-Mark 10-150		Carl Roth
Schwefelsäure	96%	Carl Roth
SDS	Natriumdodecylsulfat	Carl Roth
TALON Metal Affinity Resin		BD Biosciences
Thrombin	Stammlösung 1 U/µL	GE Healthcare
Tris-HCl		Carl Roth
Trypsin/EDTA Lösung	0,25%/0,02%	Biochrom AG
Trypton/Pepton aus Casein		Carl Roth
Wasserstoffperoxid	30%	CarlRoth

## B.2 Puffer und Medien

### B.2.1 Medien für die Proteinexpression in *E. coli*

#### 2YT-Medium:

16 g Trypton/Pepton, 10 g Hefeextrakt und 5 g Natriumchlorid werden mit Wasser auf 1 L aufgefüllt, der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt und das Medium autoklaviert.

#### LB-Medium:

---

10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid werden mit Wasser auf 1 L aufgefüllt, der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt und das Medium autoklaviert.

### **B.2.2 Zellkultur Nährmedien**

Für die Kultivierung von C2C12- und Hela-S3-Zellen:

500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium mit folgenden Zusätzen: FCS (10%), L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 U/mL/100 µg/mL). Lagerung steril bei 4°C.

Für die Kultivierung von Hela-POM121-GFP-Zellen:

500 mL Dulbecco's Modified Eagle Medium mit folgenden Zusätzen: FCS (10%), L-Glutamin (2 mM), Penicillin/Streptomycin (100 U/mL/100 µg/mL), Geneticin(300 U/mL). Lagerung steril bei 4°C.

Modifikation der Zellmedien für die Mikroskopie:

Um lebende Zellen bei Raumtemperatur und atmosphärischem CO<sub>2</sub>-Partialdruck für ca. 30 min bei einem physiologischen pH-Wert halten zu können, wurde ein modifiziertes Nährmedium verwendet. Dazu wurden 4 Volumenteile des jeweiligen Nährmediums mit 1 Volumenteil 100 mM HEPES-Puffer (pH=7,0) gemischt. Dieses modifizierte Medium wurde umgehend zur Mikroskopie lebender Zellen verwendet.

### **B.2.3 Puffer**

PBS-Puffer:

Das für 1 L Lösung portionierte Gemisch wurde in Reinstwasser gelöst, der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und die Lösung wenn benötigt autoklaviert. Lagerung steril bei RT, nicht steril bei 4°C.

Transportpuffer (TB):

Zusammensetzung des 1-fach TB in Reinstwasser: Kaliumacetat (110 mM), Natriumacetat (5 mM), Magnesiumacetat (2 mM), EGTA (1 mM), DTT (2 mM), HEPES (20 mM). Der 1-fach konzentrierte TB wurde aus einer 10-fach Stammlösung (ohne DTT) mit Reinstwasser angesetzt. Anschließend erfolgten die Zugabe von DTT und das Einstellen des pH-Wertes auf 7,3. Lagerung für 1 Woche bei 4°C.

Tris-Glycin-Puffer:

Der 1-fach Puffer enthält 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin und 0,1% SDS in Reinstwasser. Der Puffer wurde als 5-fach konzentrierte Stammlösung mit einem pH-Wert von 8,3 bei RT gelagert und bei Bedarf verdünnt.

Coomassie-Färbelösung:

Die Färbelösung besteht aus 2,5 g Coomassie-Brilliantblau R-250 in 900 mL Methanol/H<sub>2</sub>O (1:1) und

100 mL Eisessig.

Gelentfärbelösung:

Die Gelentfärbelösung besteht aus 900 mL Methanol/H<sub>2</sub>O (4:5) und 100 mL Eisessig und wird bei RT gelagert.

Importin $\beta$  Lagerungspuffer (ILP):

50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> in Reinstwasser bei pH-Wert 7,5.

Boratpuffer:

Zu einer 0,2 M Borat-Lösung (76,2 g Borax in 1 L Wasser) wurde soviel einer 0,2 M Borsäure-Lösung (12,4 Borsäure in 1 L Wasser) gegeben bis der gewünschte pH-Wert erreicht war. Anschließend wurde dieser 0,2 M Puffer mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

## **B.3 Proteine und Antikörper**

### **B.3.1 Proteine**

BSA (Bovines Serumalbumin):

BSA wurde in gefriergetrockneter Form von Sigma-Aldrich bezogen. Es ist in Bezug auf den Kernytoplasmatransport als inertes Protein anzusehen, da es keine funktionelle Wechselwirkung mit den Transportrezeptoren oder dem Kernporenkomplex eingehen kann und somit nicht transportiert wird. Mit einem Molekulargewicht von 66 kDa ist es zudem für eine reine Diffusion durch die Kernpore zu groß und eignet sich daher als Indikator für evtl. Beschädigungen der Kernmembran.

Imp $\beta$ 1 (Importin $\beta$ 1):

Lag als folgendes Plasmid mit Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz vor: Imp $\beta$ 1 pQE in M15/pRep4. Expression und Aufreinigung über das 6xHis-Aufreinigungstag ergaben ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa.

NAv (Neutravidin):

NAv wurde in gefriergetrockneter Form von Thermo Scientific bezogen. Bei NAv handelt es sich um eine Variante des Biotin-bindenden Proteins Avidin mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Es besitzt bei gleich hoher Affinität zu Biotin ( $K_d = 10^{-15} M$ ) im Vergleich zu Avidin einen niedrigeren isoelektrischen Punkt und geht in geringerem Maße unspezifische Bindungen ein.

GFP (Green Fluorescent Protein):

Das Protein wurde freundlicherweise von J. Kappler zur Verfügung gestellt. Der Expression und Aufreinigung des 27kDa schweren Proteins lag das Plasmid pQE80L-His-GFP zugrunde.

### **B.3.2 Antikörper**

#### mAb414 (Covance Inc):

Ein gegen verschiedene Kernporenproteine gerichteter monoklonaler Antikörper, der hier in muriner, chromatographisch aufgereinigter Form bezogen wurde.

### **B.4 Quantendots**

#### QD600:

Quantendots der Zusammensetzung CdSe/CdS/ZnCdS/ZnS und Liponsäure als Oberflächenligand. Die Stammlösung besaß einen pH-Wert von ca. 10-11 und eine QD-Konzentration von 1 µM. Das Emissionsmaximum der QD600 lag bei 600 nm. Die core/shell-Nanopartikel wurden von Prof. T. Basché, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

### **B.5 Zelllinien**

#### C2C12:

Aus dem Muskelgewebe der Maus stammende, adhärent wachsende Myoblasten. Lagerung in flüssigem Stickstoff in mit 5% DMSO versetztem Nährmedium (s. Kapitel B.2.2).

#### Hela-POM121-GFP:

Hela-Zelllinie, welche POM121 als GFP-Fusion bei Geneticin-Resistenz stabil exprimiert [Kubitscheck et al., 2005]. Lagerung in flüssigem Stickstoff in mit 5% DMSO versetztem Nährmedium (s. Kapitel B.2.2).

#### Hela-S3:

Subklon der Hela-Zelllinie, welcher hier adhärent wachsend kultiviert wurde. Lagerung in flüssigem Stickstoff in mit 5% DMSO versetztem Nährmedium (s. Kapitel B.2.2).

### **B.6 Software**

Folgende Software wurde zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet:

- Bildver- und -bearbeitung: ImageJ, Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- Datenverarbeitung:
  - MATLAB v. 7.6.0.324, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA, 2008.

- Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA, 2010.
- Origin Pro 8G, v8.0988, OriginLab, Northampton, MA, USA.
- Einzelpartikeltracking: Diatrack 3.03 PRO, Semasopht, Schweiz (Entwicklung und Distribution eingestellt).
- EMCCD-Kamera: Andor SOLIS for Imaging, v 4.12.300003.0, Andor Technology plc., Belfast, Northern Ireland.
- Grafikbearbeitung: CorelDRAW X3, Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada 2005.
- LaTeX-Editor: Texmaker, Pascal Brachet, <http://www.xm1math.net/texmaker/>, 2003-2012.
- Literaturverzeichnis: JabRef, v 2.7, JabRef Development Team, <http://jabref.sf.net>, 2012.
- Strukturformeln: ACD/ChemSketch Freeware, version 12.01, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2012.
- TeX-Distribution: MikTeX, v 2.9, Christian Schenk, <http://miktex.org/>, 2012.

## B.7 Sonstiges

Weiterhin fanden die in Tabelle B.2 aufgeführten Materialien Anwendung.

Material	ergänzende Angaben	Lieferant
Deckgläser, Borosilikatglas	Stärke 1,5, 18 mm x 18 mm	Menzel Gläser
Gelchromatographiesäule	Superose 12 PC 3.2/30	GE Healthcare
Glasboden-Petrischalen	Stärke 1,5, 50/14 mm	Mattek Corporation
Mikroinjektionsnadeln	Femtotips II	Eppendorf AG
Mikrozentrifugenfilter	Microcon	Millipore
Pinzette f. Deckgläser	Tweezers Style 2AZ	Science Services
Spritzenfilter	0,22 µm Membran	TPP
Zentrifugenfilter	Dye Removal Column	Thermo Scientific
Zentrifugenfilter	Amicon Ultra-4 & Ultra-15	Millipore

**Tabelle B.2: Sonstiges Material.**

## Literaturverzeichnis

- [Adam et al., 1990] Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L. (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol*, 111(3):807–816.
- [Alber et al., 2007] Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. M., Zhang, W., Kipper, J., Devos, D., Suprpto, A., Karni-Schmidt, O., Williams, R., Chait, B. T., Sali, A., and Rout, M. P. (2007). The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature*, 450(7170):695–701.
- [Alivisatos, 1996] Alivisatos, A. P. (1996). Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry*, 100:13226–13239.
- [Alivisatos et al., 2005] Alivisatos, A. P., Gu, W., and Larabell, C. (2005). Quantum dots as cellular probes. *Annu Rev Biomed Eng*, 7:55–76.
- [Beck et al., 2004] Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O. (2004). Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 306(5700):1387–1390.
- [Beck et al., 2007] Beck, M., Luci, V., Förster, F., Baumeister, W., and Medalia, O. (2007). Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature*, 449(7162):611–615.
- [Bednenko et al., 2003] Bednenko, J., Cingolani, G., and Gerace, L. (2003). Importin beta contains a cooh-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *J Cell Biol*, 162(3):391–401.
- [Benson et al., 1985] Benson, D. M., Bryan, J., Plant, A. L., Jr, A. M. G., and Smith, L. C. (1985). Digital imaging fluorescence microscopy: spatial heterogeneity of photobleaching rate constants in individual cells. *Journal of Cell Biology*, 100:1309–1323.
- [Bickel and Bruinsma, 2002] Bickel, T. and Bruinsma, R. (2002). The nuclear pore complex mystery and anomalous diffusion in reversible gels. *Biophys J*, 83(6):3079–3087.
- [Bier, 2011] Bier, C. (2011). Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit kleinen organischen Farbstoffen. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [Bruchez et al., 1998] Bruchez, Jr, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., and Alivisatos, A. P. (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281(5385):2013–2016.
- [Chan and Nie, 1998] Chan, W. C. and Nie, S. (1998). Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281(5385):2016–2018.
- [Chiuman and Li, 2007] Chiuman, W. and Li, Y. (2007). Efficient signaling platforms built from a small catalytic dna and doubly labeled fluorogenic substrates. *Nucleic Acids Res*, 35(2):401–405.
- [Clapp et al., 2006] Clapp, A. R., Goldman, E. R., and Mattoussi, H. (2006). Capping of cdse-zns quantum dots with dhla and subsequent conjugation with proteins. *Nat Protoc*, 1(3):1258–1266.
- [Daneholt, 2001] Daneholt, B. (2001). Assembly and transport of a premessenger rnp particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7012–7017.
- [Dange et al., 2008] Dange, T., Grünwald, D., Grünwald, A., Peters, R., and Kubitscheck, U. (2008). Autonomy and robustness of translocation through the nuclear pore complex: a single-molecule study. *J Cell Biol*, 183(1):77–86.
- [Davies et al., 2011] Davies, M., Jung, C., Wallis, P., Schnitzler, T., Li, C., Müllen, K., and Bräuchle, C. (2011). Photophysics of new photostable rylene derivatives: Applications in single-molecule studies and membrane labelling. *ChemPhysChem*, 12:1588–1595.
- [Davis and Blobel, 1986] Davis, L. I. and Blobel, G. (1986). Identification and characterization of a nuclear pore complex protein. *Cell*, 45(5):699–709.
- [Davis and Blobel, 1987] Davis, L. I. and Blobel, G. (1987). Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(21):7552–7556.
- [Deschout et al., 2012] Deschout, H., Neyts, K., and Braeckmans, K. (2012). The influence of movement on the localization precision of sub-resolution particles in fluorescence microscopy. *J Biophotonics*, 5(1):97–109.



- [Diaspro et al., 2006] Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P., and Dobrucki, J. (2006). Handbook of Biological Confocal Microscopy, pages 690–702. Springer Science+Business Media, New York.
- [Eggeling et al., 2009] Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., von Middendorff, C., Schönle, A., and Hell, S. W. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. Nature, 457(7233):1159–1162.
- [Eggeling et al., 1998] Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R., and Seidel, C. A. (1998). Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis. Anal Chem, 70(13):2651–2659.
- [Fahrenkrog and Aebi, 2003] Fahrenkrog, B. and Aebi, U. (2003). The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(10):757–766.
- [Feldherr, 1962] Feldherr, C. M. (1962). The nuclear annuli as pathways for nucleocytoplasmic exchanges. J Cell Biol, 14:65–72.
- [Floer et al., 1997] Floer, M., Blobel, G., and Rexach, M. (1997). Disassembly of rangtp-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. J Biol Chem, 272(31):19538–19546.
- [Fornerod et al., 1997] Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997). Crm1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. Cell, 90(6):1051–1060.
- [Frey and Görlich, 2007] Frey, S. and Görlich, D. (2007). A saturated fg-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. Cell, 130(3):512–523.
- [Frey et al., 2006] Frey, S., Richter, R. P., and Görlich, D. (2006). Fg-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. Science, 314(5800):815–817.
- [Fried and Kutay, 2003] Fried, H. and Kutay, U. (2003). Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. Cell Mol Life Sci, 60(8):1659–1688.
- [Gaponenko, 1998] Gaponenko, S. V. (1998). Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals. Cambridge University Press.
- [Gell et al., 2006] Gell, C., Brockwell, D., and Smith, A. (2006). Handbook of Single Molecule Fluorescence Microscopy. Oxford University Press.
- [Görlich et al., 1996] Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F. R. (1996). Identification of different roles for rangdp and rangtp in nuclear protein import. EMBO J, 15(20):5584–5594.
- [Harlow and Lane, 1999] Harlow, E. and Lane, D. (1999). Using Antibodies. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [Hines and Guyot-Sionnest, 1996] Hines, M. A. and Guyot-Sionnest, P. (1996). Synthesis and characterization of strongly luminescing zns-capped cdse nanocrystals. The Journal of Physical Chemistry, 100(2):468–471.
- [Huang et al., 2005] Huang, Z., Ji, D., and Xi, A. (2005). Fluorescence intensity and lifetime fluctuations of single cy5 molecules immobilized on the glass surface. Colloids and Surfaces A, 257-258:203–209.
- [Jung et al., 2009] Jung, C., Ruthardt, N., Lewis, R., Michaelis, J., Sodeik, B., Nolde, F., Peneva, K., Müllen, K., and Bräuchle, C. (2009). Photophysics of new water-soluble terrylenediimide derivatives and applications in biology. Chemphyschem, 10(1):180–190.
- [Kahms et al., 2009] Kahms, M., Lechrich, P., Hüve, J., Sanetra, N., and Peters, R. (2009). Binding site distribution of nuclear transport receptors and transport complexes in single nuclear pore complexes. Traffic, 10:1228–1242.
- [Kalderon et al., 1984] Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell, 39(3 Pt 2):499–509.
- [Kamata et al., 2005] Kamata, M., Nitahara-Kasahara, Y., Miyamoto, Y., Yoneda, Y., and Aida, Y. (2005). Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 vpr. J Virol, 79(6):3557–3564.
- [Kiseleva et al., 1998] Kiseleva, E., Goldberg, M. W., Allen, T. D., and Akey, C. W. (1998). Active nuclear pore complexes in chironomus: visualization of transporter configurations related to mrnp export. J Cell Sci, 111 ( Pt 2):223–236.
- [Kiseleva et al., 2000] Kiseleva, E., Goldberg, M. W., Cronshaw, J., and Allen, T. D. (2000). The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 10(1):101–112.
- [Klaiberg, 2007] Klaiberg, B. (2007). Untersuchung des Kern-Cytoplasma-Transports von p10/NTF2-funktionalisierten Quantenpunkten mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [Kubitscheck et al., 2005] Kubitscheck, U., Grünwald, D., Hoekstra, A., Rohleder, D., Kues, T., Siebrasse, J. P., and Peters, R. (2005). Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex. J Cell Biol, 168(2):233–243.
- [Kubitscheck et al., 2000] Kubitscheck, U., Kückmann, O., Kues, T., and Peters, R. (2000). Imaging and tracking of single gfp molecules in solution. Biophys J, 78(4):2170–2179.
- [Kubitscheck et al., 1996] Kubitscheck, U., Wedekind, P., Zeidler, O., Grote, M., and Peters, R. (1996). Single nuclear pores visualized by confocal microscopy and image processing. Biophys J, 70(5):2067–2077.

- [Kuersten et al., 2001] Kuersten, S., Ohno, M., and Mattaj, I. W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. Trends Cell Biol, 11(12):497–503.
- [Kustanovich and Rabin, 2004] Kustanovich, T. and Rabin, Y. (2004). Metastable network model of protein transport through nuclear pores. Biophys J, 86(4):2008–2016.
- [Leutenegger and Lasser, 2008] Leutenegger, M. and Lasser, T. (2008). Detection efficiency in total internal reflection fluorescence microscopy. Opt Express, 16(12):8519–8531.
- [Levitus and Ranjit, 2011] Levitus, M. and Ranjit, S. (2011). Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments. Q Rev Biophys, 44(1):123–151.
- [Lichtman and Conchello, 2005] Lichtman, J. W. and Conchello, J.-A. (2005). Fluorescence microscopy. Nat Methods, 2(12):910–919.
- [Lim et al., 2008] Lim, R. Y. H., Aebi, U., and Fahrenkrog, B. (2008). Towards reconciling structure and function in the nuclear pore complex. Histochem Cell Biol, 129(2):105–116.
- [Lim et al., 2006] Lim, R. Y. H., Huang, N.-P., Köser, J., Deng, J., Lau, K. H. A., Schwarz-Herion, K., Fahrenkrog, B., and Aebi, U. (2006). Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(25):9512–9517.
- [Lowe et al., 2010] Lowe, A. R., Siegel, J. J., Kalab, P., Siu, M., Weis, K., and Liphardt, J. T. (2010). Selectivity mechanism of the nuclear pore complex characterized by single cargo tracking. Nature, 467(7315):600–603.
- [Lukosz and Kunz, 1977] Lukosz, W. and Kunz, R. E. (1977). Light emission by magnetic and electric dipoles close to a plane interface. i. total radiated power. J. Opt. Soc. Am., 67(12):1607–1615.
- [Ma and Yang, 2010] Ma, J. and Yang, W. (2010). Three-dimensional distribution of transient interactions in the nuclear pore complex obtained from single-molecule snapshots. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(16):7305–7310.
- [Macara, 2001] Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. Microbiol Mol Biol Rev, 65(4):570–94, table of contents.
- [Maul et al., 1972] Maul, G. G., Maul, H. M., Scogna, J. E., Lieberman, M. W., Stein, G. S., Hsu, B. Y., and Borun, T. W. (1972). Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in hela cells during the cell cycle. J Cell Biol, 55(2):433–447.
- [Medintz et al., 2005] Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R., and Mattoussi, H. (2005). Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. Nat Mater, 4(6):435–446.
- [Michalet et al., 2005] Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., and Weiss, S. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. Science, 307(5709):538–544.
- [Miyamoto et al., 2002] Miyamoto, Y., Hieda, M., Harreman, M. T., Fukumoto, M., Saiwaki, T., Hodel, A. E., Corbett, A. H., and Yoneda, Y. (2002). Importin alpha can migrate into the nucleus in an importin beta- and ran-independent manner. EMBO J, 21(21):5833–5842.
- [Mohr et al., 2009] Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Güttler, T., and Görlich, D. (2009). Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. EMBO J, 28(17):2541–2553.
- [Moroianu et al., 1996] Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1996). Nuclear protein import: Ran-gtp dissociates the karyopherin alphabeta heterodimer by displacing alpha from an overlapping binding site on beta. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(14):7059–7062.
- [Murphy, 2001] Murphy, D. B. (2001). Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Wiley-Liss.
- [Nachury and Weis, 1999] Nachury, M. V. and Weis, K. (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(17):9622–9627.
- [Orfanidis, 2002] Orfanidis, S. J. (2002). Electromagnetic Waves and Antennas. <http://eceweb1.rutgers.edu/orfanidi/ewa/>.
- [Ossareh-Nazari et al., 1997] Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F., and Dargemont, C. (1997). Evidence for a role of crm1 in signal-mediated nuclear protein export. Science, 278(5335):141–144.
- [Panchuk-Voloshina et al., 1999] Panchuk-Voloshina, N., Haugland, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgat, M. K., Millard, P. J., Mao, F., Leung, W. Y., and Haugland, R. P. (1999). Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. J Histochem Cytochem, 47(9):1179–1188.
- [Panté and Kann, 2002] Panté, N. and Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. Mol Biol Cell, 13(2):425–434.
- [Pawley, 2006] Pawley, J. B. (2006). Handbook of Biological Confocal Microscopy, pages 59–79. Springer Science+Business Media, New York.
- [Peters, 2005] Peters, R. (2005). Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. Traffic, 6(5):421–427.

- [Piehler et al., 2000] Piehler, J., Brecht, A., Valiokas, R., Liedberg, B., and Gauglitz, G. (2000). A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces. *Biosens Bioelectron*, 15(9-10):473–481.
- [Rexach and Blobel, 1995] Rexach, M. and Blobel, G. (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, 83(5):683–692.
- [Ribbeck and Görlich, 2001] Ribbeck, K. and Görlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J*, 20(6):1320–1330.
- [Ribbeck and Görlich, 2002] Ribbeck, K. and Görlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J*, 21(11):2664–2671.
- [Rout et al., 2003] Rout, M. P., Aitchison, J. D., Magnasco, M. O., and Chait, B. T. (2003). Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. *Trends Cell Biol*, 13(12):622–628.
- [Rout et al., 2000] Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, 148(4):635–651.
- [Shah et al., 1998] Shah, S., Tugendreich, S., and Forbes, D. (1998). Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin nup153 and the adjacent nuclear filament protein tpr. *J Cell Biol*, 141(1):31–49.
- [Shimizu et al., 2001] Shimizu, K. T., Neuhauser, R. G., Leatherdale, C. A., Empedocles, S. A., Woo, W. K., and Bawendi, M. G. (2001). Blinking statistics in single semiconductor nanocrystal quantum dots. *Phys. Rev. B*, 63:205316.
- [Siebrasse et al., 2008] Siebrasse, J. P., Veith, R., Dobay, A., Leonhardt, H., Daneholt, B., and Kubitschek, U. (2008). Discontinuous movement of mrnp particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(51):20291–20296.
- [Sjöback et al., 1995] Sjöback, R., Nygren, J., and Kubista, M. (1995). Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochimica Acta Part A*, 51:L7–L21.
- [Song et al., 1996] Song, L., Varma, C. A., Verhoeven, J. W., and Tanke, H. J. (1996). Influence of the triplet excited state on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Biophys J*, 70(6):2959–2968.
- [Stewart, 2007] Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3):195–208.
- [Strambio-De-Castillia et al., 2010] Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(7):490–501.
- [Thompson et al., 2002] Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–2783.
- [Tran et al., 2007] Tran, E. J., Bolger, T. A., and Wentz, S. R. (2007). Snapshot: nuclear transport. *Cell*, 131(2):420.
- [Usui et al., 1965] Usui, Y., Itoh, K., and Koizumi, M. (1965). Switch-over of the mechanism of the primary processes in the photo-oxidation of xanthene dyes as revealed by the oxygen consumption experiments. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 38:1015–1022.
- [Valeur, 2002] Valeur, B. (2002). *Molecular Fluorescence*. Wiley-VCH.
- [Veith, 2011] Veith, R. (2011). Mobilität endogener mRNA im chromatinfreien Nucleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne von *Chironomus tentans*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [Veith et al., 2010] Veith, R., Sorkalla, T., Baumgart, E., Anzt, J., Häberlein, H., Tyagi, S., Siebrasse, J. P., and Kubitschek, U. (2010). Balbiani ring mrnps diffuse through and bind to clusters of large intranuclear molecular structures. *Biophys J*, 99(8):2676–2685.
- [Vogelsang et al., 2008] Vogelsang, J., Kasper, R., Steinhauer, C., Person, B., Heilemann, M., Sauer, M., and Tinnefeld, P. (2008). Ein system aus reduktions- und oxidationsmittel verringert photobleichen und blinken von fluoreszenzfarbstoffen. *Angewandte Chemie*, 120:5545–5550.
- [Watson, 1955] Watson, M. L. (1955). The nuclear envelope; its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J Biophys Biochem Cytol*, 1(3):257–270.
- [Weis, 2003] Weis, K. (2003). Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, 112(4):441–451.
- [Wen et al., 1995] Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsiens, R. Y., and Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, 82(3):463–473.
- [Wentz and Rout, 2010] Wentz, S. R. and Rout, M. P. (2010). The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(10):a000562.
- [Wiberg, 2007] Wiberg, N. (2007). *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. Walter de Gruyter, Berlin, 102 edition.
- [Wilchek and Bayer, 1988] Wilchek, M. and Bayer, E. A. (1988). The avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Anal Biochem*, 171(1):1–32.

- [Woese et al., 1990] Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12):4576–4579.
- [Xie et al., 2005] Xie, R., Kolb, U., Li, J., Basché, T., and Mews, A. (2005). Synthesis and characterization of highly luminescent cdse-core cds/zno.5cdo.5s/zns multishell nanocrystals. *J Am Chem Soc*, 127(20):7480–7488.
- [Xie and Trautman, 1998] Xie, X. S. and Trautman, J. K. (1998). Optical studies of single molecules at room temperature. *Annu Rev Phys Chem*, 49:441–480.
- [Yang et al., 2004] Yang, W., Gelles, J., and Musser, S. M. (2004). Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(35):12887–12892.
- [Yang and Musser, 2006] Yang, W. and Musser, S. M. (2006). Nuclear import time and transport efficiency depend on importin beta concentration. *J Cell Biol*, 174(7):951–961.
- [Ziffels, 2007] Ziffels, U. (2007). Analyse des Kern-Zytoplasma-Transports durch Beobachtung von Quantendots an einzelnen Kernporen mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [Zilman et al., 2007] Zilman, A., Di Talia, S., Chait, B. T., Rout, M. P., and Magnasco, M. O. (2007). Efficiency, selectivity, and robustness of nucleocytoplasmic transport. *PLoS Comput Biol*, 3(7):e125.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Elektronenmikroskopische Methoden ermöglichen die Darstellung des Kernporenkomplexes. . . . .	2
1.2	Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes. . . . .	3
1.3	Import von Cargo-NLS, Export von Cargo-NES und RanGTP/RanGDP-Zyklus. . . . .	4
1.4	Schematische Darstellung verschiedener Transportmodelle. . . . .	10
1.5	Abhängigkeit der QDot-Emissionswellenlänge von der Partikelgröße. . . . .	19
1.6	QDots zum Einsatz in biologischen Systemen. . . . .	22
1.7	Schematische Gegenüberstellung der <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Manipulation von Zellen. . . . .	23
1.8	Vereinfachtes Jablonski-Diagramm zur Entstehung von Lumineszenz. . . . .	25
1.9	Nanolokalisierung eines Fluoreszenzemitters. . . . .	28
1.10	Photobleichen eines Emitter-Ensembles und eines einzelnen Fluorophors. . . . .	31
1.11	Strukturformeln von vier der sechs analysierten Fluoreszenzfarbstoffe. . . . .	35
1.12	Funktionalisieren eines Deckglases zur vermittelten Immobilisierung der Fluoreszenzfarbstoffe. . . . .	38
1.13	Immobilisierung von Farbstoffen in Lebendzellen. . . . .	40
2.1	Emissionsspektren der QD600 und von GFP und die im Experiment verwendeten Filter . . . . .	50
2.2	Deckglashalterung zur Verwendung am EMFM. . . . .	54
2.3	Schema zum Aufbau des Matlab-Skripts zur Bestimmung des Bleichindex $\kappa$ . . . . .	57
2.4	Schematisierte Darstellung der Abbildung eines Fluorophors mittels EMFM. . . . .	61
2.5	Zur Berechnung der Grauwertsumme $\mathcal{B}$ . . . . .	65
2.6	Schema zum Aufbau des Matlab-Skripts zur Bestimmung der Grauwertsumme $\mathcal{B}$ . . . . .	68
3.1	Verteilung von Imp $\beta$ 1-Cy5 in permeabilisierten C2C12-Zellen. . . . .	76
3.2	Verteilung von QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen. . . . .	77
3.3	Verteilung von QD600-GFP in permeabilisierten C2C12-Zellen. . . . .	79
3.4	Einzelne QD600-Imp $\beta$ 1 in permeabilisierten C2C12-Zellen. . . . .	81
3.5	Überprüfung der unspezifischen und spezifischen Bindung an beschichtete Deckgläser. . . . .	84
3.6	Steuerung der Fluorophordichte durch Inkubation mit unterschiedlich konzentrierten NAv-AF546-Inkubationslösungen. . . . .	85
3.7	Photobleichen von NAv-AF647 in Transportpuffer. . . . .	86
3.8	Lokalisierung der Partikel und Auslesen der mittleren Grauwerte $\overline{G}(k)$ exemplarisch für NAv-Atto647N in Transportpuffer. . . . .	87
3.9	Schematisierte Fluoreszenzdiagramme zur Veranschaulichung verschiedenartiger Bleichprozesse. . . . .	89
3.10	Ermittlung der Anregungsintensität anhand des Beleuchtungsprofils und der Anregungsleistung. . . . .	90
3.11	Auftragung der Bleichzeit gegen die Anregungsintensität und Mediänglättung. . . . .	92
3.12	Bleichdiagramme der Farbstoffe in PBS. . . . .	94
3.13	Bleichdiagramme der Farbstoffe in TB. . . . .	95
3.14	Übersicht der Bleichzeiten aller Farbstoffe in PBS. . . . .	96
3.15	Übersicht der Bleichzeiten aller Farbstoffe in TB. . . . .	96
3.16	Emissionsspektren der sechs NAv-Farbstoff-Konjugate in PBS. . . . .	97
3.17	Wellenlängenabhängige Transmission der relevanten optischen Elemente und Quanteneffizienz des Kameraschips. . . . .	99
3.18	Auftragung der Photonenzahl gegen die Anregungsintensität. . . . .	102
3.19	Zahl der während der Bleichzeit emittierten Photonen der in PBS untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe. . . . .	103
3.20	Zahl der während der Bleichzeit emittierten Photonen der in TB untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe. . . . .	104
3.21	Übersicht zur Zahl emittierter Photonen der Farbstoffe in PBS. . . . .	105
3.22	Übersicht zur Zahl emittierter Photonen der Farbstoffe in TB. . . . .	105
3.23	Verteilung des mit Atto655 markierten Antikörpers mab414 in C2C12-Zellen. . . . .	106
3.24	Bilder eines Bleichfilms von Atto655 <i>in vivo</i> . . . . .	107
3.25	Bleichdiagramme für Atto655 <i>in vivo</i> . . . . .	108
A.1	Typische Fluoreszenzdiagramme für Cy5/TB. . . . .	127

A.2	Typische Fluoreszenzdiagramme für Atto655 <i>in vivo</i> . . . . .	128
A.3	Absorptionsspektren der NAv-Farbstoff-Konjugate. . . . .	128
A.4	Detektionseffizienzen des Mikroskopaufbaus. . . . .	129



# Tabellenverzeichnis

2.1	Abkürzung der zur Bearbeitung der Bilder in ImageJ angewendeten Operationen. . . . .	47
2.2	Bildwiederholungsrate $w$ , die zur Aufnahme der Bleichfilme des jeweiligen Farbstoffs verwendet wurde. . .	55
3.1	Hydrodynamische Durchmesser als Resultat der Diffusionsanalyse für QD600 und QD600-Imp $\beta$ 1. . . . .	83
3.2	Mikroskop- bzw. experimentspezifische Angaben zur Berechnung der Sammeleffizienz. . . . .	98
3.3	Transmission der optischen Elemente. . . . .	98
3.4	Die Detektionskoeffizienten $Q_F$ der Fluoreszenzfarbstoffe. . . . .	100
A.1	Absorptions- und Emissionsmaxima der NAV-Farbstoff-Verbindungen. . . . .	129
A.2	Medianwerte der Bleichzeiten und Anregungsintensitäten. . . . .	130
A.3	Medianwerte der Photonenzahlen und Anregungsintensitäten. . . . .	131
B.2	Sonstiges Material. . . . .	138



## Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor (Bezeichnung einer Gruppe von Fluoreszenzfarbstoffen)
AOTF	engl. Abk. f. <i>akustooptischer Modulator</i> (acousto-optic tunable filter)
a.u.	engl. Abk. f. <i>beliebige Einheit</i> (arbitrary unit)
BAG	Brownian Affinity Gating (Transportmodell)
BP	Bandpass
BSA	Bovines Serum Albumin
DG	Deckglas
DHLA	Dihydroliponsäure (aus d. Englischen: Dihydrolipoic Acid))
DTT	Dithiothreitol
ec[x]	Kürzel für die Bildbearbeitung in ImageJ: Enhance Contrast mit Argument [x]
EM	elektronenmikroskopisch, Elektronenmikroskopie
EMCCD	engl. Abk. f. <i>elektronenvervielfachendes CCD</i> , (electron multiplying CCD)
EMFM	Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskop(ie)
EMgain	engl. Abk. f. <i>Verstärkungsfaktor der Elektronenvervielfachung</i> , (electron-multiplying gain)
FM	Fluoreszenzmikroskopie
FPLC	engl. Abk. f. <i>schnelle Flüssigchromatographie für Proteine</i> (fast protein liquid chromatography)
FRAP	fluorescence recovery after photo bleaching, Fluoreszenzrückkehr nach Photobleichen
FWHM	engl. Abk. f. <i>Halbwertsbreite</i> (full width at half maximum)
gb[x]	Kürzel für die Bildbearbeitung in ImageJ: Gaussian Blur mit Argument [x]
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HeLa	Permanente Zelllinie aus dem Zervixkarzinom von Henrietta Lacks, 1951 entnommen und erstmals kultiviert.
HFT	Hauptfarbteiler
Hg	Hintergrund
HILO	Anregungstechnik in der Fluoreszenzmikroskopie (highly inclined and laminated optical sheet)
HOMO	engl. Abk. für höchstes besetztes Molekülorbital (highest occupied molecular orbital)
IC	internal conversion
ID	Identifikationsnummer
Int.	Intensität
ISC	intersystem crossing
KCT	Kerncytoplasmtransport
LP	Langpass
LUMO	engl. Abk. für niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (lowest unoccupied molecular orbital)
MSD	engl. Abk. für mittleres Verschiebungsquadrat (mean square displacement)
med[x]	Kürzel für die Bildbearbeitung in ImageJ: Median-Filter mit Argument [x]
min	Minute
NAv	Neutravidin
NAv-F	Neutravidin-Farbstoff-Konjugat
NES	engl. Abk. f. Kernexportsignal (nuclear export signal)
NFT	Nebenfarbteiler
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLS	engl. Abk. f. <i>Kernlokalisierungssignal</i> (nuclear location signal)
NPC	engl. Abk. f. <i>Kernporenkomplex</i> (nuclear pore complex)
NTF <sub>2</sub>	engl.: nuclear transport factor 2
NXT <sub>1</sub>	NTF <sub>2</sub> -related export protein 1
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei Wellenlänge 600 nm
OS	Oily Spaghetti (Transportmodell)
PALM	photoactivated localization microscopy, photoaktivierte Lokalisierungsmikroskopie
PBS	engl. Abk. f. phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)

PEG	Polyethylenglykol
px	Pixel
QD	Quantendot
QDot	Quantendot
ROD	Reduction of Dimensionality (Transportmodell)
ROI	engl. Abk. f. <i>interessierende Bildregion</i> (region of interest)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
SAv	Streptavidin
SAv-F	Streptavidin-Farbstoff-Konjugat
sb[x]	Kürzel für die Bildbearbeitung in ImageJ: Subtract Background mit Argument [x]
SDS-PAGE	engl. Abk. f. <i>Polyacrylamid Gelelektrophorese mit SDS</i> (sodium dodecyl sulfate)
Sg	Signal
SRV	Signal/Rausch-Verhältnis
SP	Selektive Phase (Transportmodell)
sum[x]	Kürzel für die Bildbearbeitung in ImageJ: Aufsummierung von [x] benachbarten Bildern
SV <sub>40</sub>	Simian Virus 40
TB	engl. Abk. f. <i>Transportpuffer</i> (transport buffer)
TIRF	Anregungstechnik in der Fluoreszenzmikroskopie, (total internal reflection fluorescence)
TOPO	Triethylphosphinoxid, organisches Lösungsmittel

# Symbolverzeichnis

$A$	Bildfläche
$A_{px}$	Fläche eines Pixels
$\mathcal{B}$	Grauwertsumme
$d_h$	hydrodynamischer Durchmesser
$D$	Diffusionskoeffizient
$\eta$	Sammeleffizienz ( <i>collection efficiency</i> )
$\eta$	nur Stoke-Einstein-Gleichung: Viskosität des Mediums
$E$	Emissionsintensität
$f$	Umrechnungsfaktor $\mathcal{B} \leftrightarrow \mathcal{N}$
$f_j$	Anteil einer Komponente in der Sprungweitenanalyse
$\gamma$	Kamerafaktor
$G(i, j, k)$	Grauwert an der Stelle $(i, j)$ im $k$ -ten Bild
$\overline{G}(k)$	mittlerer Grauwert eines Fluoreszenzsignals im $k$ -ten Bild
$G_s$	Schwellenwert Photobleichen
$H(i, j, k)$	Intensität des Hintergrunds an der Stelle $(i, j)$ im $k$ -ten Bild
$I/I(i, j)$	Anregungsintensität/ an der Stelle $(i, j)$
$k$	Bildnummer
$k_B$	Boltzmannkonstante
$\kappa$	Bleichindex
$K$	Bildzahl eines Films
$K_d$	Dissoziationskonstante
$\Lambda$	Bestrahlungslast
$\lambda$	Wellenlänge
$\ell$	Seitenlänge eines quadr. ROI
$M$	Elektronenvervielfachungsfaktor ( <i>EM-gain value</i> )
$\mathcal{N}_\Lambda$	Gesamtzahl der während $\tau_\Lambda$ emittierten Photonen
$n_{kol}(i, j)$	Zahl der während $t_i$ im Pixel $(i, j)$ auftreffenden Photonen
$P$	Anregungsleistung
$p(i, j)$	Wahrscheinlichkeit, dass Photon im Pixel $i, j$ auf den EMCCD-Chip trifft
$q$	Detektionseffizienz
$Q_{Farbstoff}$	farbstoffspezifischer Detektionskoeffizient
$\varrho$	ROI-Korrekturfaktor
$S(i, j)$	Bild des Beleuchtungsprofils
$t_i$	Belichtungszeit ( <i>exposure time</i> )
$\tau$	Bleichzeit bei kontinuierlicher Anregung
$\tau_a$	mittlere Bleichzeit
$\tau_\Lambda$	Bleichzeit bei intermittierender Anregung
$\theta(\lambda)$	Quanteneffizienz d. EMCCD-Chips
$T$	Gesamttransmission aller optischen Elemente
$T$	Temperatur
$T_E$	Transmission optisches Element
$w$	Bildwiederholungsrate ( <i>frame rate</i> )
$W$	Wandlungsrate (EMCCD)



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen Personen danken, die an der Fertigstellung dieser Arbeit Anteil haben:

Prof. Dr. **Ulrich Kubitscheck** danke ich für die Möglichkeit die vorgestellten Themen unter hervorragenden Arbeitsbedingungen bearbeiten zu dürfen. Er nahm sich stets Zeit für Diskussionen, ließ genügend Freiraum für die Entwicklung eigener Ideen und ermöglichte mir nicht zuletzt die Teilnahme an vielen interessanten Tagungen.

Prof. Dr. **Rudolf Merkel** danke ich für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Dr. **Jan-Peter Siebrasse** danke ich für die kompetente Unterstützung bei Problemen mit biologischen Fragestellungen und für die Hilfe bei der Erarbeitung verschiedener Labortechniken.

Bei Prof. Dr. **Thomas Basché** möchte ich mich für die Bereitstellung der QDot-Proben bedanken.

Prof. Dr. **Jacob Piehler** danke ich für die Möglichkeit die Beschichtung der Glasoberflächen vor Ort in Osnabrück erlernen zu können. Speziell gilt mein Dank Maniraj Bhagawati und Markus Staufenbiel, mit denen ich die ersten DAPEG-Deckläschen präparierte.

Dr. **Marcel Leutenegger** gilt mein Dank für die ausführliche Beantwortung meiner Fragen und die freundliche Bereitstellung der Matlab-Funktionen zur Berechnung der Sammeleffizienz des EMFM.

**Daniel Jakobs** und Dr. **Thomas Sorkalla** danke ich für ihre unkomplizierte Unterstützung bei der Aufreinigung verschiedener Peptide.

Bei **Andreas Veenendaal** bedanke ich mich für seine freundliche Hilfe bei allen Problemen, Fragen und Umbauwünschen bezüglich der Mikroskope.

**Claudio Nietzel** danke ich für die Unterstützung bei Klonierungen und Proteinpräparationen.

**Julia Hockling** danke ich für ihre zuverlässige Versorgung der Zellen sowie für ihre entgegenkommende Hilfsbereitschaft bei der Präparation und der Aufreinigung von Proteinen.

**Werner Wendler** danke ich für seine Unterstützung bei der Planung und Umsetzung von technischen Hilfsmitteln zur Untersuchung der Fluoreszenzfarbstoffe.



Bei **Simone Scholl** möchte ich mich für die Planung und Durchführung zahlreicher Klonierungen, die Pflege der Zellkultur, Präparation von Proteinen, Hilfe bei den ARS- und QD-Messungen, der Analyse von Daten und ihre stets freundschaftliche Unterstützung bedanken.

Dr. **Anke Kuhn** danke ich für das Korrekturlesen von Teilen der Arbeit.

Dr. **Lisa Maus** und Dr. **Christian Maus** danke ich für das Korrekturlesen von Teilen der Arbeit und zahlreiche Diskussionen, die sich als zielführend erwiesen haben.

Dr. **Roman Veith** danke ich für seine fortwährende freundschaftliche Unterstützung. Seine kreativen Ideen und pointierten Schlussfolgerungen haben viele Diskussionen zum Fortgang der Arbeit belebt. Ich danke ihm auch für die intensive kritische Durchsicht des Textes und die hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Meiner Schwester **Cornelia Ziffels** danke ich für das intensive Korrekturlesen der Arbeit mit ihrer sehr gründlichen und zuverlässigen Art.

Meiner Mutter **Edith Ziffels-Röhr** danke ich für den steten Zuspruch, für ihr Vertrauen und ihre fortwährende und umfassende Unterstützung.

Meinem Ehemann **Jochen** danke ich für die motivierenden Worte, wann immer es nötig war. Für Geduld und Ruhe, die an vielen Stellen den Druck verringerten und für sein uneingeschränktes Vertrauen in mich, das mir den langen Atem gab.