

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Michael Schwering
aus: Meppen, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2012

Die Entwicklung neuer Methoden
in der
Fluoreszenzmikroskopie
auf Basis
reversibler chemischer Reaktionen

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Jähne
PD Dr. Dirk-Peter Herten

Die Entwicklung neuer Methoden in der Fluoreszenzmikroskopie auf Basis reversibler chemischer Reaktionen

Zum besseren Verständnis lebender Organismen sind Informationen über die Organisation und Struktur zellulärer Bausteine und deren detaillierte Funktion unerlässlich. Seit kurzem erlauben neue fluoreszenzmikroskopische Methoden, die Beugungsgrenze der optischen Mikroskopie zu umgehen und dadurch Strukturen kleiner als 200 nm aufzulösen. Einige dieser Methoden basieren auf der photophysikalischen Schaltung der Fluoreszenz durch Bestrahlung mit Licht. In dieser Arbeit wurde der Ansatz der lichtunabhängigen Hochauflösungsmikroskopie verfolgt. Dazu wurde die reversible Bindung von Kupfer(II) an einen Liganden genutzt, welche die Fluoreszenz der Sonde ausschaltet. Mit dieser Sonde wurde eine Auflösung von 20 nm erreicht, mit der strukturierte Filamente von Zellen, weit unter der klassischen Beugungsgrenze, aufgelöst werden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die chemisch schaltbare Sonde eine Möglichkeit zur aberrationsfreien Kolo-kalisation in biologischen Proben ist. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode der Hochauflösungsmikroskopie, bietet einen alternativen Ansatz zu lichtgetriebenen Mechanismen, um Strukturen unter der Beugungsgrenze aufzulösen. Hiermit lassen sich Probleme, wie etwa Phototoxizität und eine hohe Hintergrundfluoreszenz vermeiden, die bei anderen Methoden mit den hohen Lichtintensitäten einhergehen. Eine Limitierung der Methode liegt in der Natur der genutzten reversiblen chemischen Reaktion der Sonde. Die Kinetik der Reaktion begrenzt die Kontrolle über die Dauer der An/Aus-Zustände.

Development of novel methods based on reversible chemical reactions for fluorescence microscopy

To improve knowledge on living organisms it is essential to gain information on the organization and structure of cellular building blocks. Recently, new fluorescence microscopy methods have been established that circumvent the diffraction barrier of optical microscopy and allow resolving structures below 200 nm. Some of these methods are based on photophysical switching by irradiation with light.

This thesis describes the approach of light-independent high-resolution microscopy. To this end, the mechanism of reversible binding of Cu(II) to a ligand has been used, which leads to a quenching of the probes fluorescence. This approach yielded a resolution of 20 nm, allowing to resolve structured filaments below the classical resolution limit. Additionally, I could show that the probe allows aberration-free colocalization in biological samples.

The method developed within this thesis allows an alternative approach for high-resolution microscopy without being based light-driven. Thereby problems like photo toxicity and background noise are reduced as compared to existing approaches using high excitation intensities. A limitation of the presented method is the mechanism of the reversible chemical reaction used to switch the probe. The kinetic of the reaction is limiting control over the duration of on/off-states.

*Meinen Freunden, meiner Familie
und besonders meinem Vater
Manfred Schwering - er wäre sicher stolz.*

BAZINGA!
(The Big Bang Theory)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung & Grundlagen	1
1.1. Beugungsbegrenzung	6
1.2. Aberrationen	9
1.3. Fluoreszenzmikroskopie	11
1.4. Der Aufbau moderner Mikroskope	25
1.5. STED	31
1.6. Lokalisationsmikroskopie	34
1.6.1. Lichtgetrieben	36
1.6.2. Alternative Mechanismen	39
2. Zielsetzung der Arbeit	43
3. Experimente & Ergebnisse	45
3.1. Der Aufbau der chemisch schaltbaren Sonde	45
3.2. Ensemble-Messungen zur Quantisierung der Fluoreszenzlöschung	48
3.3. Charakterisierung des Mikroskop-Setups bezüglich der Lokalisationsmikroskopie	57
3.4. Einzelmolekülmessungen zur Charakterisierung der Sonde	63
3.5. Lokalisationsmikroskopie in biologischen Proben	71
3.6. Chemisches Multiplexing	78
3.7. Toxizität von Kupfersulfat	86
4. Diskussion & Ausblick	89
5. Materialien & Methoden	105
5.1. Material & Chemikalien	105
5.2. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) & Sondenherstellung	107
5.3. Ensemble-Messungen	107
5.4. Aufbau des TIRF-Mikroskops	110
5.5. Einzelmolekül-Oberflächen Messungen	112
5.6. Lokalisationsmikroskopie-Messungen	115
5.7. Messungen zum Chemischen Multiplexing	116
5.7.1. Manders-Koeffizient	116
5.8. Zytotoxizität von Kupfer	118
Appendizes	121

1. Einleitung & Grundlagen

Die ersten Mikroskope wurden zwischen Ende des 16. Jahrhunderts und Anfang des 17. Jahrhunderts nahezu zeitgleich von Zacharias Janssen [1] und Galileo Galilei [2] entwickelt (vgl. Abb. 1.1). Seit der Erfindung dieser ersten Geräte, die im Wesentlichen nur aus zwei Linsen bestanden, hat die Mikroskopie eine lange Entwicklung hinter sich. So gab es beispielsweise technische Weiterentwicklungen auf Grund von besser geschliffenen Linsen und der Benutzung von mehreren Linsen, was eine Verbesserung der Vergrößerung mit sich bringt. Aus Sicht der biologischen und medizinischen Forschung ist besonders ein Name mit der Mikroskopie verknüpft: Anton von Leeuwenhoek. Er gilt als die Person, die die Mikroskopie zur Anwendung in der Biologie brachte [3]. Von Leeuwenhoek gelang es gegen Ende des 17. Jahrhunderts einzelne Zellen zu beobachten. Ihm werden unter anderem die Entdeckung von roten Blutkörperchen, Bakterien und Protozoen zugeschrieben. Die Bedeutung der Mikroskopie für die Biologie wird auch dadurch deutlich, dass es 1665 mit einem Mikroskop gelang, einzelne Zellen zu beobachten, die dann von ihrem Entdecker Robert Hooke als *cellula*, Kämmerchen, bezeichnet wurden, was ihnen ihren heutigen Namen verlieh [4]. Solche Mikroskope, wie sie für die Forschung in der Biologie benutzt wurden, erreichten etwa $275 \times$ Vergrößerungen. Dadurch gelang es unter anderem auch Zellkerne und die Brown'sche Molekularbewegung zu beobachten [5]. Für die einfache Mikroskopie, die darauf basiert, dass eine Probe mit Licht durchleuchtet und das Objekt anschließend auf das Auge abgebildet wird, sind Objekte mit der Größe der Zellkerne an der Grenze des Beobachtbaren (vgl. Abb. 1.2) [6]. Objekte unterhalb dieser Grenze sind so klein, dass eine Vergrößerung nicht mehr zu einer scharfen Abbildung führen kann. Viele interessante biologische Strukturen, wie zum Beispiel Ribosomen, einzelne Proteine, aber auch Strukturen, die von mehreren Proteinen ausgebildet werden können, besitzen jedoch eine Größe, die unter eben dieser Begrenzung liegt. Ein interessantes Beispiel für die Begrenzung der Auflösung in der Lichtmikroskopie ist die Abbildung

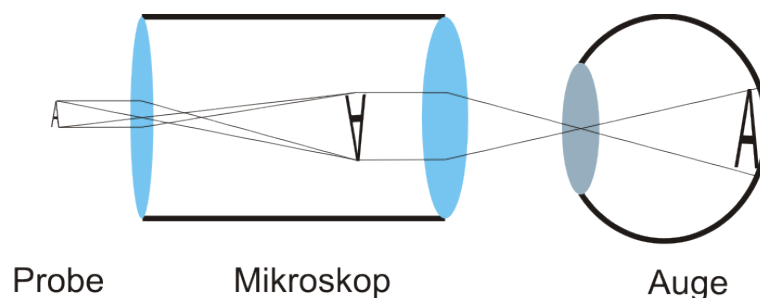


Abbildung 1.1.: Schema der Funktionsweise eines einfachen Lichtmikroskops. Ein Objekt wird beleuchtet. Das transmittierte Licht wird mit Hilfe von zwei Linsen auf die Netzhaut fokussiert, was zu einer Vergrößerung führt.

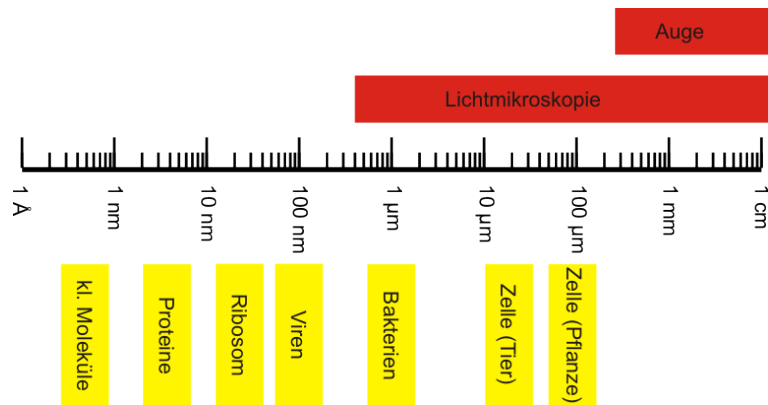


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung des Auflösungsvermögens des menschlichen Auges und eines Mikroskops. Viele biologisch relevante Strukturen bleiben weit hinter dem Auflösungsvermögen des Mikroskops verborgen.

des Zytoskeletts von Zellen.

Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist verantwortlich für einige der grundlegenden Zelleigenschaften. Es nimmt nicht nur eine wichtige Rolle dabei ein, den Zellen eine äußere Struktur zu geben, um sie möglichst robust gegenüber äußeren Einflüssen zu machen; unter anderem spielt es auch eine Rolle bei der Strukturierung im Inneren der Zelle. Viele Zellen wechseln ihre Form, oder bewegen sich auf Grund von äußeren Einflüssen. Bei der Zellteilung z. B. zieht das Zytoskelett die Chromosomen auseinander und teilt die Zelle in zwei Untereinheiten auf. Das Zytoskelett unterteilt sich in drei Klassen von Filamenten (vgl. Tab. 1.1) [6].

Die Aktinfilamente bestehen aus zwei Strängen von aneinander gereihten Aktin-Monomeren, die sich umeinander wickeln. Jedes dieser Filamente hat einen Durchmesser von 5–9 nm. Aktinfilamente organisieren sich zu Bündeln, die zwei-dimensionale Netzwerke ausbilden können. Aktinfilamente sind nicht nur für die Stabilität der Zelle wichtig, sie organisieren auch den intrazellulären Transport.

Mikrotubuli sind längliche, hohle Röhren, die aus den Tubulin-Proteinen gebildet werden. Der Durchmesser von Mikrotubuli beträgt 25 nm. Diese Röhren bilden lange und sehr starre Strukturen aus, die von einem zentralen Punkt in der Zelle, dem Zentrosom, ausgehen. Die Hauptaufgabe der Mikrotubuli ist zum einen der Transport von Vesikeln durch Zellen und die Bildung des Spindelapparates während der Zellteilung, über den die Chromatiden zu den beiden Enden, der in der Teilung befindlichen Zelle, gezogen werden.

Die dritte Unterklasse sind die Intermediärfilamente. Die Struktur dieser Klasse entspricht mehreren Strängen, die ringförmig, mit einem Durchmesser von ca. 10 nm, angeordnet sind. Diese große Unterklasse umfasst viele verschiedene Filamente, die sich auch in ihrer räumlichen Anordnung und Organisation unterscheiden. Die Aufgaben der Mikrofilamente hängen stark davon ab, um welches Filament es sich genau

handelt. So sind die Laminfilamente beispielsweise für die Reparatur der Hülle des Zellkerns nach der Mitose verantwortlich.

Diese Informationen über die strukturelle Anordnung der Proteine zu einem Filament, oder die Verteilung der Filamente in der Zelle, lassen sich auf Grund der geringen Größe der Strukturen nicht mit der herkömmlichen Lichtmikroskopie gewinnen. Dadurch ist es nicht möglich, eine Beschreibung der Zelle zu entwickeln, die sowohl Wechselwirkungen als auch Funktionen des Zytoskeletts deterministisch beschreibt. Auf Basis dieser Limitierung haben sich in den letzten Jahren verschiedene Mikroskopiemethoden etabliert, die in der Lage sind, Informationen hinter der Grenze der Lichtmikroskopie zu gewinnen. Dazu gehören unter anderem die Röntgen- und Elektronenmikroskopie sowie verschiedene Nahfeldmethoden, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird.


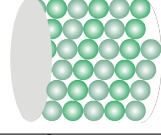
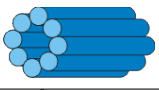
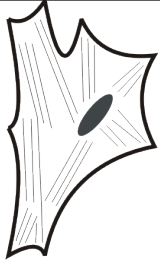
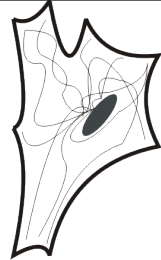
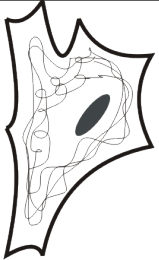
Unterklasse	Aktinfilamente	Mikrotubulin	Intermediärfilamente
Durchmesser	5 – 9nm	25nm	10nm
Struktur			
Räumliche Anordnung			

Tabelle 1.1.: Das Zytoskelett: Übersicht über die Größe und Struktur der einzelnen Untergruppen des Zytoskeletts.

Röntgenmikroskopie

Bei der Röntgenmikroskopie wird Licht mit einer Wellenlänge von 10 nm – 1 pm benutzt. Da die Auflösung eines Mikroskops stark von der Wellenlänge, die benutzt wird, abhängt (vgl. Kap. 1.1), erlaubt es die Röntgenmikroskopie Strukturen aufzulösen, die eine Größe von 20–30 nm haben. Nachteilig bei der Röntgenmikroskopie ist zum einen die Strahlungsquelle, da diese sehr intensiv sein muss, wie z. B. bei der Synchrotron-Strahlung und zum anderen gibt es keine Linsen, die für Röntgenstrahlung geeignet sind. Deshalb muss hier auf Fresnel-Zonenplatten zurückgegriffen werden. Auf Grund der Strahlung ist die Röntgenmikroskopie nicht für *in vivo* Experimente geeignet. Des Weiteren besitzen Röntgenmikroskope eine aufwändige Hardware, die die Anschaffung und den Unterhalt sehr teuer machen. Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie, können biologische Proben naturbelassen bleiben. Es sind keine speziellen Präparationen notwendig und auch die Probendicke spielt keine essentielle Rolle [7–9].

Elektronenmikroskopie

Ähnlich wie bei einem Röntgenmikroskop, wird auch bei einem Elektronenmikroskop die kleine Wellenlänge ausgenutzt. Hierzu werden Elektronen auf eine Energie von $E_{\text{kin}} = 100 \text{ keV}$ beschleunigt. Damit ergibt sich für die De-Broglie-Wellenlänge der Elektronen zu:

$$\lambda_{\text{dB}} = \frac{h}{\sqrt{2m_0 E_{\text{kin}}}} \approx 4 \text{ pm} \quad (1.1)$$

Hier gibt m_0 die Ruhemasse der Elektronen an und h ist das Plancksche Wirkungsquantum und E_{kin} die kinetische Energie der Elektronen. Die daraus folgende Auflösung im pm-Bereich kann jedoch auf Grund der hohen Aberrationen, die in diesen Mikroskopen vorliegen, nicht erreicht werden. Das wirkliche Auflösungsvermögen von Elektronenmikroskopen liegt bei ca. 1 nm. Die Elektronenmikroskope unterteilen sich in Mikroskope, die die transmittierten Elektronen detektieren, wie z. B. das Transmissionselektronenmikroskop (TEM), und jene, welche von den Elektronen induzierte Signale messen (Rückstreuungsmikroskope), wie z. B. das Rasterelektronenmikroskop (REM). Bei der Elektronenmikroskopie liegen die größten Nachteile in der Probenvorbereitung. So ist es meist nötig die Proben mit einer dünnen leitfähigen Schicht zu überziehen. Zusätzlich muss bei der TEM die Probe in sehr dünnen Schichten mit einer Dicke von 10 – 500 nm präpariert werden. Des Weiteren sind Elektronenmikroskope (EM) extrem teuer in Anschaffung und Unterhalt und sehr anfällig für Artefakte, die durch die Probenpräparation entstehen können. *In vivo* Messungen sind auch bei der EM auf Grund der Probenvorbereitung und Schädigung des Untersuchungsobjektes durch den Elektronenstrahl unmöglich [9, 10].

Nahfeldmikroskopie

Neben den gesamten Methoden, die auf Ausnutzung von Wechselwirkungen zwischen hochenergetischen Teilchen, wie Elektronen oder auch Neutronen, oder hochenergetischer, elektromagnetischer Strahlung, wie etwa Röntgenstrahlung, und Materie beruhen, gibt es noch ein großes Feld von so genannten Nahfeld-Methoden. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM) [11]. Mit einem AFM wird eine Probe in sehr geringem Abstand abgetastet. Dazu wird ein Messkopf (*Cantilever*) über die Probe gefahren und die Kräfte, die auf diesen wirken, gemessen. Der Cantilever besitzt dabei die Eigenschaft, dass die Spitze einen Durchmesser von gerade einmal 5 – 15 nm besitzt. Mit einem AFM lassen sich somit Oberflächen sehr genau, mit einer Auflösung von 0,1 – 10 nm, abtasten [12]. Diese Methode lässt sich auch durch Modifikation der Spitze, z. B. durch die spezifische Bindung von Proteinen, erweitern, um Kräfte, die bei der Proteinfaltung oder -entfaltung wirken, zu untersuchen [13–15]. Der offensichtliche Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass es nur möglich ist, Oberflächen abzubilden.

Ein anderer bekannter Vertreter der Gruppe der Nahfeldmikroskope ist das optische Rasternahfeldmikroskop (Scanning Nearfield Optical Microscope, SNOM). Dabei wird eine Aperturspitze in geringem Abstand über die Probe geführt. Durch eine kleine Öffnung an der Spitze, üblicherweise 20 – 100 nm, kann Licht, in Form eines evaneszenten Feldes, aus der Spitze austreten und die Probe beleuchten. Da die Probe nicht im Fernfeld sondern im Nahfeld beleuchtet wird, gilt hier die Beugungsbegrenzung nicht

(vgl. Kap. 1.1). Dadurch können Auflösungen im Bereich einiger weniger Nanometer erreicht werden [16]. Auch bei dieser Methode können nur Oberflächen untersucht werden und es herrscht eine Limitierung bezüglich rapider Änderungen in der Höhe der Probe.

Optische Fernfeldmikroskopie

Obwohl jede der oben beschriebenen Methoden es ermöglicht, Strukturen sehr genau zu untersuchen, sind fast alle Untersuchungsmöglichkeiten auf fixierte Zellen beschränkt. Die Problematik bei der Arbeit mit fixierten Zellen liegt darin, dass keine Informationen über dynamische Prozesse gewonnen werden können und durch den Eingriff in den natürlichen Metabolismus der Zellen auch grundlegende biologische Eigenschaften verändert werden können [17]. So führt beispielsweise eine Fixierung von Zellen mit Hilfe von Methanol zu einer Zerstörung der Aktinfilamente in den Zellen [18].

Alle bisher erwähnten Methoden sind nur dafür geeignet, Objekte zu untersuchen, die keinem dynamischen Prozess unterliegen - dies ist jedoch in der zellulären Umgebung so nicht gegeben. Betrachtet man die Zelle als ein in sich geschlossenes System, ohne dass Stimulationen der Zelle von außen auftreten, befindet sich das Innere der Zelle in einem dynamischen Zustand. So wird beispielsweise das Zytoskelett der Zelle durchgängig neu organisiert, Proteine werden degradiert und neu produziert und es werden Informationen über Boten-RNAs vom Zellkern an die Ribosomen versendet. Um ein Verständnis über diese dynamischen Prozesse zu erhalten, ist es nötig, zeitabhängig zu messen. Werden zusätzlich noch die Zellen stimuliert, zum Beispiel durch die Aktivierung von Rezeptoren auf der Zellmembran, reagiert die Zelle auf eine solche Stimulation über Signalkaskaden und Proteinproduktion oder -degradation. An einem solchen Signalweg sind viele unterschiedliche Proteine beteiligt und um einen Informationsgewinn zu erreichen, sind zeitabhängige Messungen unerlässlich. Hier bieten zeitaufgelöste Messungen eine größere Informationsdichte als z. B. die Untersuchung von fixierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten [6].

Neben den Methoden der Elektronen- und Röntgenmikroskopie, die allerdings nur bei toten Objekten verwendet werden können, dafür aber eine optische Auflösung im Bereich einiger Nanometer bieten, den Nahfeldmikroskopiemethoden, die lediglich für die Beobachtung von Zelloberflächen geeignet sind, aber ebenfalls mit einer sehr hohen Auflösung, gibt es noch die optischen Fernfeldmikroskopiemethoden. Hierbei werden die zu untersuchenden Ziele, wie z. B. Proteine, spezielle DNA Sequenzen oder Boten RNAs, mit selbstleuchtenden Markierungen versehen und mit Hilfe eines Mikroskops abgebildet. Da die Markierung der Zelle nicht invasiv ist, kann somit die zeitliche Entwicklung der Untersuchungsobjekte, mit einer Zeitauflösung in Bereichen zwischen Mikrosekunden und Tagen, beobachtet werden. Nachteilig bei diesen optischen Methoden ist allerdings die Beugungsbegrenzung, die die Visualisierung von Strukturen mit Größen unterhalb von ca. 300 nm verhindert.

Auf Basis der Vor- und Nachteile dieser Mikroskopiemethoden wird deutlich, dass es einen Bedarf an anderen Techniken gibt, die vor allem für die Untersuchung von lebenden Organismen und eine zeitaufgelöste Mikroskopie geeignet sind. Da, beispielweise bei der molekularen Interaktion zwischen Proteinen, kleine Objekte - weit unter der

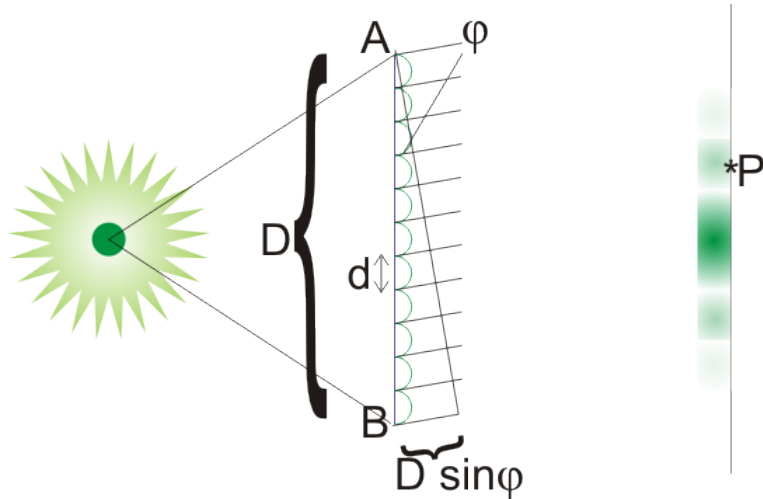


Abbildung 1.3.: Die Entstehung von Interferenzmustern durch Abbildung eines Emitters durch eine Linse.

Beugungsgrenze der optischen Mikroskopie - eine Rolle spielen und deren quantitative Erfassung zum Verständnis der Prozesse in Zellen notwendig ist, sollte diese Technik eine Auflösung im Bereich einiger Nanometer besitzen.

Ein Kandidat, der das Potential hat alle Bedürfnisse zu erfüllen, ist die optische Fernfeldmikroskopie. Auch wenn diese Methode auf den klassischen Mikroskopen, die mit Licht im sichtbaren Spektrum arbeiten, basiert, haben sich durch Weiterentwicklungen neue Möglichkeiten und Techniken entwickelt, um verschiedene Objekte gleichzeitig zu untersuchen, um die Diffusion einzelner Moleküle zu beobachten und um Auflösungen von 10 – 50 nm zu erreichen. Die herausstechendste Veränderung gegenüber der Mikroskopie vor dem 20. Jahrhundert und gleichzeitig die Grundvoraussetzung für die modernen Mikroskopiertechniken ist die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie von August Köhler und Carl Reichert zu Beginn des 20. Jahrhunderts [19]. Proben werden nicht mehr mit Licht *durchleuchtet*, stattdessen wird kurzwelliges Licht benutzt, um fluoreszente Moleküle anzuregen, die daraufhin selbst Licht aussenden können (vgl. Kap. 1.3). Basierend auf diesem Prinzip ist es möglich, mit Hilfe von Filtern die Farbkanäle voneinander zu separieren und somit mehrere Objekte gleichzeitig zu messen, oder durch die Änderung der Fluoreszenzintensität in einem scharf abgegrenzten Bereich auf Konzentrationsänderungen zu schließen (wie im Fall der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, FCS [20–22]). In Kombination mit modernen Detektoren, die in der Lage sind einzelne Photonen zu registrieren, ist es möglich einzelne Farbstoffe zu detektieren. Auf Basis dieser Einzelmoleküldaten haben sich auch Methoden etabliert, die in der Lage sind die Beugungsbegrenzung zu umgehen (vgl. Kap. 1.6: Lokalisationsmikroskopie).

1.1. Beugungsbegrenzung

Wie bereits erwähnt, unterliegt die Fernfeldmikroskopie der Beugungsbegrenzung. Diese Grenze betrifft jegliche Abbildung, die auf Gauß'scher Optik aufbaut. Geht man

davon aus, dass sich ein punktförmiger Lichtemitter im Raum befindet, der über eine Linse auf eine Bildebene projiziert wird, gilt das Huygens'sche Prinzip analog zu der Beugung des Lichts an einer Kreisblende (vgl. Abbildung 1.3). Da die Wellenlänge des Lichtes um mehrere Größenordnungen geringer ist als der Durchmesser der Linse $D = \overline{AB}$, ist die Anzahl der Elementarwellen, die von der Linse ausgehen mit $N = \frac{D}{d}$ entsprechend groß. Der Gangunterschied g zwischen der ersten und der letzten Elementarwelle beträgt $g = D \sin \varphi$. Wenn die Bedingung $g = k\lambda$ erfüllt ist, gibt es eine konstruktive Interferenz, für $g = (k + \frac{1}{2})\lambda$ herrscht destruktive Interferenz. Betrachtet man die Lichtintensität J an einem Punkt P in der Brennebene im Abstand l von der Linse, so lässt sich für die konstruktive Interferenz die Bedingung $\overline{PA} - \overline{PB} = z\lambda$ aufstellen, wobei $z = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$ ist. Es folgt direkt für die Maxima:

$$\sin \varphi = \frac{z\lambda}{d} \quad (1.2)$$

Da die Winkel im Allgemeinen recht klein sind, lässt sich der Sinus durch $\sin(x) \xrightarrow{x \rightarrow 0} x$ linear annähern zu:

$$\varphi = \frac{z\lambda}{d} \quad (1.3)$$

Der Gangunterschied zwischen zwei benachbarten Wellen beträgt $d \sin \varphi$. Die Phasendifferenz ergibt sich somit zu $\delta = 2\pi \frac{d}{\lambda} \sin \varphi$. Jede Elementarwelle hat eine Amplitude A' , wobei zu der benachbarten Elementarwelle eine Phasendifferenz von δ vorliegt. A ist die Amplitude aller einzelnen Elementarwellen. Ein Maximum ergibt sich, wenn alle Wellen in Phase sind, sprich $\delta = 0$ und $\delta = z2\pi$. Mit Hilfe der Maximumsbedingung 1.2 lässt sich dies umformulieren zu:

$$d \cdot \sin \varphi = z\lambda \quad (1.4)$$

Da jede Elementarwelle auch als Amplitudenzeiger beschrieben werden kann, ergibt sich für die Summe der Amplitudenverteilung ein Zusammenhang, der durch einen Kreis mit Radius r gegeben ist:

$$r = \frac{A'}{2 \sin(\delta/2)} \quad (1.5)$$

Der Gesamtphasenwinkel umspannt also den Phasenwinkel $N\delta$ und die Gesamtamplitude ergibt sich zu:

$$A = 2r \sin \frac{N\delta}{2} = A' \frac{\sin(\pi N d \lambda^{-1} \sin \varphi)}{\sin(\pi d \lambda^{-1} \sin \varphi)} \quad (1.6)$$

Benutzt man die Phasendifferenz $\delta = 2\pi \frac{d}{\lambda} \sin \varphi$ und den Zusammenhang $D = N \cdot d$ so folgt:

$$A = NA' \frac{\sin(\pi D \lambda^{-1} \sin \varphi)}{\pi D \lambda^{-1} \sin \varphi} \quad (1.7)$$

Um die Intensitätsverteilung zu erhalten, muss die Amplitude quadriert werden $I(\varphi) = A^2(\varphi)$. Benutzt man noch die Definition der sinc-Funktion, $\text{sinc}(x) = \frac{\sin(x)}{x}$, folgt:

$$I(\varphi) = A^2 \text{sinc}^2(D\pi\lambda^{-1} \sin \varphi) \quad (1.8)$$

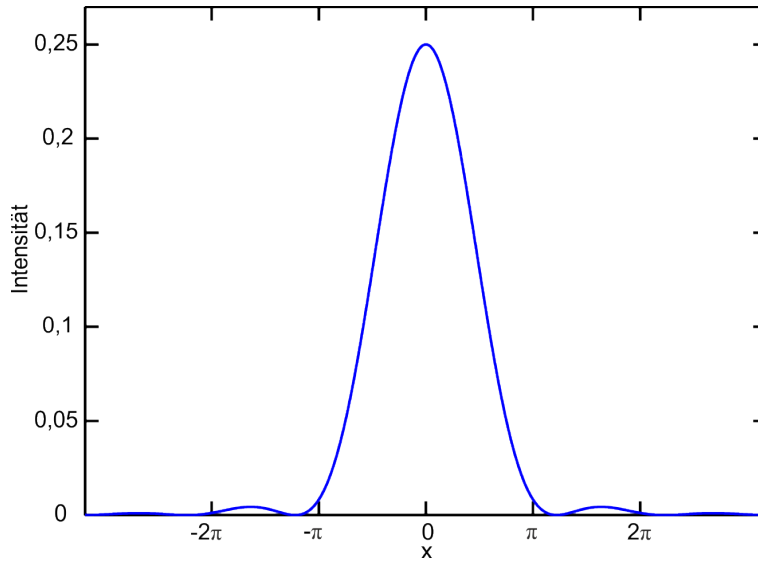


Abbildung 1.4.: Die Punktabbildungsfunktion eines Emitters, der über eine Linse abgebildet wird (Bessel-Funktion).

Da die sphärische Bessel-Funktion nullter Ordnung J_0 eben diese sinc-Funktion ist, wird im Allgemeinen die Intensitätsverteilung über die Bessel-Funktion angegeben zu:

$$I(\varphi) \approx J_0^2(D\pi\lambda^{-1} \sin \varphi) \quad (1.9)$$

Von besonderem Interesse für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ist die Lage der ersten Minima. Diese liegen bei den Nullstellen der Bessel-Funktion $z_0 = 0,61$ (vgl. Abbildung 1.4). Auf Grund dieser Nullstelle der Bessel-Funktion führte Lord Rayleigh das *Rayleigh-Kriterium* ein. Er definierte den Winkel unter dem zwei Objekte mittels eines Teleskopes gerade noch auflösbar sind, auf die doppelte Entfernung von der Nullstelle der Bessel-Funktion:

$$\alpha = 1,22\lambda/r \quad (1.10)$$

Wobei r die Objektivöffnung des Teleskopes ist.

Im Fall der Mikroskopie wird besonders ein anderer Name mit der Definition des Auflösungsvermögens verbunden. Ernst Abbe definierte mit Hilfe der Numerischen Apertur (NA), $NA = n \cdot \sin \alpha$, mit n dem Brechungsindex des Immersionsmediums und α dem halben Öffnungswinkel des Objektivs (vgl. Abbildung 1.5), das Rayleigh-Kriterium um. Die folgende Gesetzmäßigkeit wird als die Abbe'sche Auflösungsgrenze bezeichnet:

$$d_{min} = \frac{1,22 \lambda}{2 NA} \quad (1.11)$$

Betrachtet man einige Spezialfälle der Abbildung zweier Objekte über eine Linse, kann man für den Fall von zwei weit voneinander entfernten Objekten eine gute Unterscheidung durchführen. Befinden sich die Objekte nahe der Auflösungsgrenze, gibt es schon eine deutliche Überlagerung der Punktabbildungsfunktionen (Point-Spread Function, PSF), was dazu führt, dass die beiden Maxima kaum noch voneinander zu trennen sind. Liegen die Objekte zu dicht beieinander, $d < d_{min}$, ist eine Auflösung der zu

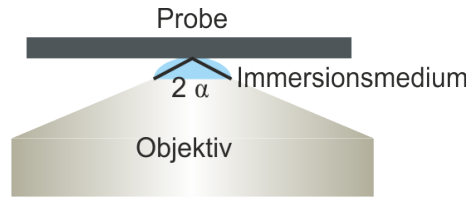


Abbildung 1.5.: Die Numerische Apertur wird durch die Brechzahl des Immersionsmediums und den halben Öffnungswinkel α berechnet.

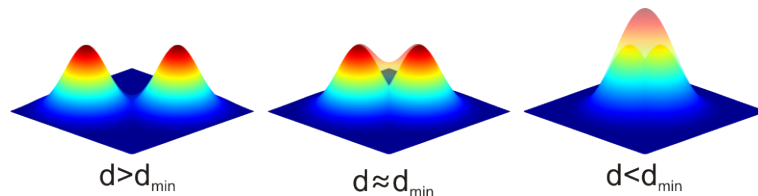


Abbildung 1.6.: Die Beugungsbegrenzung für die Mikroskopie: Sind zwei Emittoren weit voneinander entfernt ($d > d_{min}$) lassen sich Objekte gut voneinander unterscheiden. Bei $d \approx d_{min}$ zeigt die resultierende Superposition schon eine beträchtliche Verwischung im Bereich zwischen den Emittoren. Für den Fall, dass beide Objekte sehr nah beieinander sind ($d < d_{min}$) entsteht eine Superposition, die alle Details über die Emittoren verbirgt.

Grunde liegenden Verteilung unmöglich (vgl. Abbildung 1.6) [23–26]. Für rotes Licht ($\lambda = 650 \text{ nm}$) und ein Ölimmersionsobjektiv liegt dieses Limit somit bei ca. 250 nm . Um diese Grenze in kleinere Bereiche zu drücken, werden auch andere Wellenlängen benutzt (Röntgenstrahlung, Neutronen, Elektronen), was jedoch wiederum zu anderen Einschränkungen führt.

Neben der Beugungsbegrenzung, die die Auflösung limitiert, treten bei allen Fernfeldmikroskopiearten noch andere Probleme auf, die mit der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie zusammenhängen. Bei der Abbildung von Photonen im sichtbaren Spektrum, spielen diese Aberrationen eine große Rolle.

1.2. Aberrationen

Bei Aberrationen oder auch Abbildungsfehlern handelt es sich um eine ganze Klasse möglicher Abweichungen von der idealen Optik. Einige dieser Fehler können durch geschicktes Anordnen von Linsen unterdrückt werden. Die meisten Fehler spielen jedoch immer noch eine Rolle in der optischen Mikroskopie. [23, 27]

Sphärische Aberrationen

Die sphärische Aberration tritt auf, da Linsen im Allgemeinen keine Kugeln sind. Achsenferne Strahlen werden nicht in den Brennpunkt der Linse gebrochen (vgl. Abb. 1.7). Dieser Fehler kann durch asphärisches Schleifen von Linsen zwar eliminiert werden,

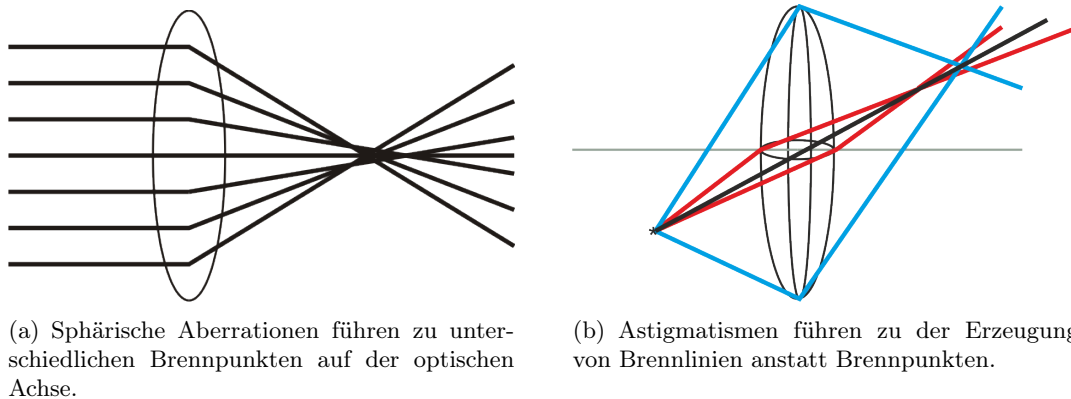


Abbildung 1.7.: Sphärische Aberration und Astigmatismus

dies ist jedoch komplexer als eine Linse sphärisch zu schleifen und wird deswegen meist nur in teuren und komplexen Linsensystemen, wie z. B. Objektiven, durchgeführt.

Astigmatismus

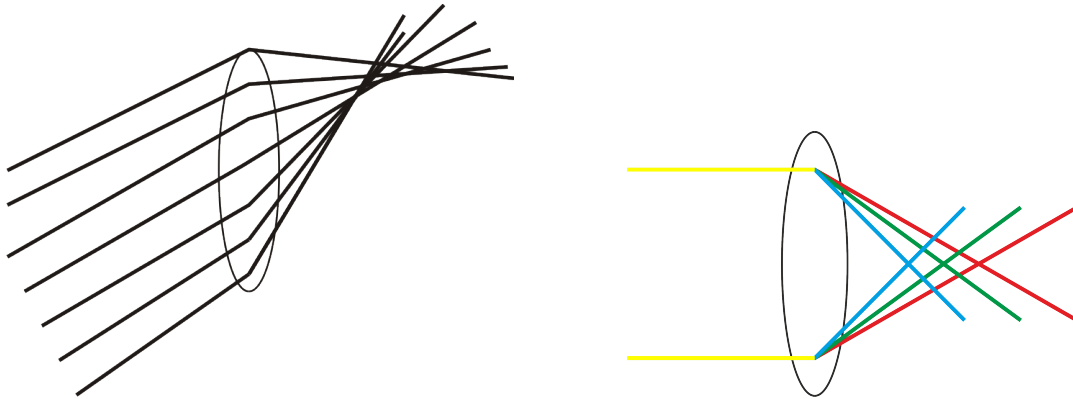
Der Astigmatismus tritt auf, wenn das Licht, das ein Objekt aussendet, schräg in eine Linse fällt. In der horizontalen Ebene treten durch die perspektivische Verkürzung kürzere Brennweiten auf (vgl. Abb. 1.7). Der Astigmatismus kann nicht durch spezielle Schleifverfahren oder Oberflächenbeschichtungen beseitigt werden. Die Linsen in einem mikroskopischen Aufbau sollten deswegen immer mittig zentriert sein, so dass keine Objekte fern der optischen Achse abgebildet werden. Der Astigmatismus zeigt sich dadurch, dass in der Fokusebene keine Brennpunkte auftreten, sondern Brennlinien.

Koma

Bei dem Koma handelt es sich um eine Kombination aus sphärischer Aberration und Astigmatismus (vgl. Abb. 1.8). Hierbei zeigt sich der Abbildungsfehler durch das Entstehen einer Art Schweif um die Punktabbildungsfunktion einer Lichtquelle. Auch das Koma kann durch Schleifen unterdrückt werden. Objektive, die diesen speziellen Schliff aufweisen, heißen *Aplanate*.

Chromatische Aberrationen

Neben den geometrischen Fehlern treten auch wellenlängenabhängige Fehler auf. Gerade diese chromatischen Aberrationen spielen in der Fluoreszenzmikroskopie eine große Rolle, da oftmals mehrere biologische Objekte in einer unterschiedlichen Farbe markiert sind und gleichzeitig abgebildet werden sollen. Grund für diesen Abbildungsfehler ist die Tatsache, dass Licht mit einer kurzen Wellenlänge stärker gebrochen wird, als Licht mit einer großen Wellenlänge (vgl. Abb. 1.8). Dieser Effekt ist auch für die spektrale Zerlegung von weißem Licht in einem Prisma verantwortlich. Bei Mikroskopobjektiven wird deswegen großer Wert auf die Farbkorrektur gelegt - diese korrigierten Objektive heißen *Apochromaten*. Kommt es trotzdem zu chromatischen Aberrationen, z. B. durch weitere optische Komponenten im Detektionsstrahlengang, müssen nach



(a) Das Koma zeigt sich durch die Erzeugung von Phantombildern, die wie eine Art Schweif wirken.

(b) Chromatische Aberrationen führen zu unterschiedlichen fokalen Ebenen für Licht mit unterschiedlicher Wellenlänge.

Abbildung 1.8.: Koma und chromatische Aberration

der Datenakquise mathematische Methoden angewendet werden, um die Daten überlagern zu können. Dazu wird meistens ein Bild mit einer perfekten Kolokalisation aufgenommen und anhand von deutlich erkennbaren Strukturen eine Transformationsmatrix erstellt und mit einem der Farbkanäle multipliziert.

1.3. Fluoreszenzmikroskopie

Neben der Verbesserung von optischen Systemen, die wiederum maßgeblich zur Verbesserung der Mikroskopie beigetragen haben, spielte auch die Entdeckung und Anwendung der Fluoreszenz eine entscheidende Rolle für die moderne Mikroskopie. Obwohl das Phänomen der Fluoreszenz schon Anfang des 20. Jahrhunderts in der Mikroskopie Anwendung fand, dauerte es 50 Jahre, bevor mit der Entdeckung eines grünfluoreszierenden Proteins (GFP) die Fluoreszenzmikroskopie Einzug in die Zellbiologie erhielt [28–30]. Gerade in den letzten Jahren hat die Bedeutung der Photophysik und das Bedürfnis nach einem Verständnis der Prozesse eines Farbstoffes stark zugenommen, um damit neue Möglichkeiten für die Mikroskopie zu eröffnen (vgl. Abbildungen B.1 und B.2 im Anhang). So war es auf Basis eines Verständnisses der Photophysik von fluoreszenten Proteinen möglich, die Molekülstruktur der chromophoren Systeme zu variieren. Damit einhergehend wurden Farbstoffe entwickelt, die in der Lage sind, Licht im nahezu kompletten sichtbaren Farbspektrum zu absorbieren und emittieren. Durch die Manipulation der Farbstoffe ist es auch möglich die Photostabilität und die Quantenausbeute zu verbessern. Die modernen Ansätze, um mit Fluoreszenzmikroskopie die Auflösungsgrenze zu umgehen, wären ohne ein tiefes Verständnis der Photophysik gar nicht möglich. So ist es bei speziellen Farbstoffen möglich die Fluoreszenz zu aktivieren (Photoaktivierbare Fluoreszente Proteine, pa-FP), oder aber Farbstoffe durch Einstrahlung von Licht gezielt aus- und wieder anzuschalten (Photoschaltbare Farbstoffe). Diese beiden Mechanismen bieten die Grundvoraussetzungen für eine ganze Klasse an Hochauflösungsmikroskopiemethoden, auf die später eingegangen wird (vgl. Kap. 1.6).

Absorption

Die Absorption von Licht, welches im sichtbaren und ultravioletten Spektrum liegt, beruht im Normalfall auf elektronischen Übergängen. Ein Elektron wird aus dem HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) in das LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) überführt. Das bedeutet, dass das Fluorophor aus dem S_0 -Zustand, dem Grundzustand, in den nächst höheren Zustand, den S_1 -Zustand, angeregt wird. Da bei Raumtemperatur der angeregte Zustand nahezu unbesetzt ist, entspricht das HOMO dem Singulettzustand S_0 . Hier sind alle Molekülorbitale vollständig besetzt und das höchste besetzte Orbital ist durch ein Elektronenpaar mit entgegengesetztem Spin bevölkert. Durch Besetzen des LUMO wird das Molekül in einen Zustand gebracht, bei dem das HOMO und das LUMO jeweils ein Elektron mit entgegengesetztem Spin enthalten. Das LUMO kann dabei erst durch Zufuhr von Energie im Bereich von 1,5 bis 3 eV erreicht werden. Diese Menge an Energie kann thermisch, $E = k_B T \approx 25$ meV bei 20°C , nicht zugeführt werden. Ein Photon im sichtbaren Spektrum mit einer Wellenlänge von 490 nm hingegen besitzt nach $E = h\nu$ eine Energie von etwa 2,5 eV, was der Menge an Energie entspricht, um ein Molekül anzuregen. Dieser Übergang vom Grund- in den ersten angeregten Zustand, geschieht auf einer Zeitskala von 10^{-15} s (vgl. Abb. 1.9). Da diese Absorption zu schnell ist, um Einfluss auf die Atomkerne zu haben, gilt das Franck-Condon-Prinzip. [31] Der wahrscheinlichste Übergang $\langle \Psi_{S_0} | \hat{\mu} | \Psi_{S_1} \rangle$ mit

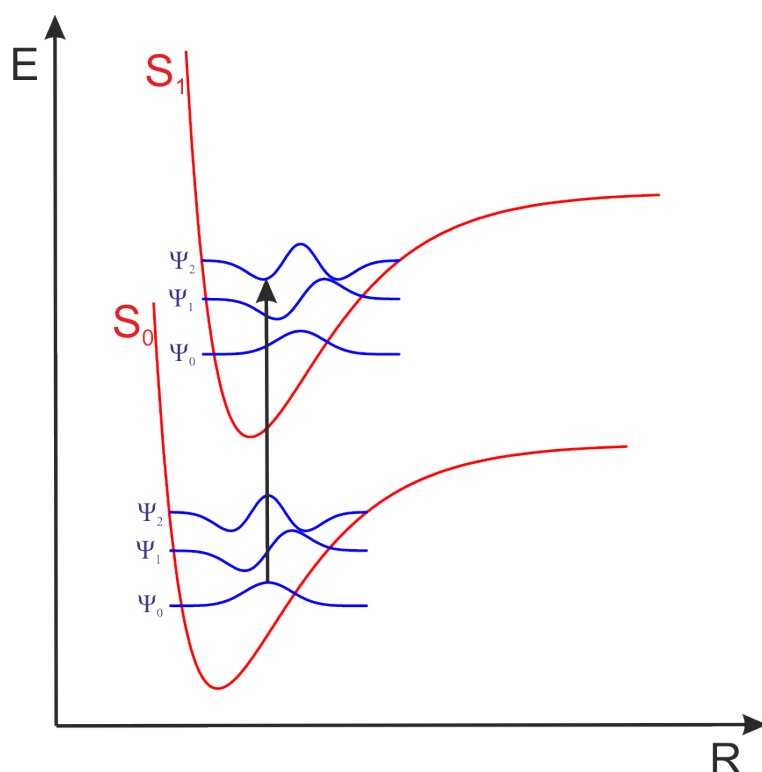


Abbildung 1.9.: Potentialkurven für den Grund- und den ersten angeregten Zustand (rot). Die eingezeichneten Wellenfunktionen (blau) eines harmonischen Oszillators stellen eine Näherung für die Schwingungszustände dar.

dem Dipoloperator $\hat{\mu}$ in den angeregten Zustand kann über die Wahrscheinlichkeitsdichte $|\langle \Psi_{S_0} | \hat{\mu} | \Psi_{S_1} \rangle|^2$ berechnet werden. Im Normalfall ist der Gleichgewichtszustand R des S_1 Zustandes gegenüber dem Grundzustand leicht verschoben. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit, in einen schwingungsangeregten Zustand zu gelangen, erhöht (vgl. Abb. 1.9). Es existieren aber, je nach Potentialkurve, mehrere mögliche Übergänge. Für den Fall, dass viele Moleküle gleichzeitig beobachtet werden, hat man mehrere Beiträge zu der Gesamtübergangswahrscheinlichkeit. Dies spiegelt sich dann im molekül- bzw. farbstoffspezifischen Absorptionsspektrum wider. Strahlt man Licht mit einer bestimmten Wellenlänge λ auf ein Ensemble von Molekülen, wird ein Teil der eingestrahnten Photonen entsprechend der Übergangswahrscheinlichkeiten absorbiert. Der absorbierte Anteil wird durch den Extinktionskoeffizienten $\epsilon^*(\lambda)$ angegeben. Setzt man als Grundannahme voraus, dass die eingestrahlte Lichtintensität I_0 so klein ist, dass nur eine geringe Besetzungswahrscheinlichkeit des angeregten Zustandes erreicht wird, folgt, dass der Extinktionskoeffizient unabhängig von der Intensität I ist. Die Übergangswahrscheinlichkeit ist dagegen abhängig von dem Anregungslicht. Es ergibt sich die Abhängigkeit aus Formel 1.12:

$$\frac{dI}{dx} = -\epsilon^*(\lambda)I(x) \quad (1.12)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung ist das Lambert-Beersche-Gesetz (vgl. Formel 1.13) [24].

$$I(x) = I_0 e^{-\epsilon^*(\lambda)x} \quad (1.13)$$

Bei dieser Formel ist x ein Produkt aus der Anzahl der Moleküle pro beleuchteter Fläche (Konzentration c) und Dicke der Probe (d). Da es in automatisierten Instrumenten möglich ist, direkt die Abnahme der Intensität I_0/I nach dem Passieren der Probe zu messen, lässt sich die Formel weiterhin vereinfachen zu:

$$E(\lambda)^* = -\ln \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon^*(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1.14)$$

In der Entwicklung der Spektroskopie wurde jedoch standardmäßig statt dem natürlichen Logarithmus der dekadische Logarithmus verwendet. Hieraus folgt die Definition des gebräuchlichen *dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten* $\epsilon(\lambda) = \log(e) \cdot \epsilon^*$. Die Abnahme der Intensität, die Extinktion E , wird somit mit der Formel 1.15 beschrieben:

$$E(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (1.15)$$

Strahlungslose Übergänge und Lumineszenz

Wie schon bei der Absorption beschrieben, wird ein Fluorophor im Allgemeinen in einen schwingungsangeregten S_1 -Zustand getrieben, von wo aus eine *Vibrationsrelaxation* (VR) es dem Fluorophor ermöglicht, strahlungslos in den energetisch günstigsten S_1 -Zustand zu relaxieren. Alternativ kann der Farbstoff auch über Anregung in höhere Zustände, wie z. B. den S_2 -Zustand über *innere Konversion* (Internal Conversion, IC) in den S_1 -Zustand zurückfallen (vgl. Abb. 1.12). Alle diese Vorgänge geschehen auf einer Zeitskala von Picosekunden. Befindet sich der Farbstoff nach VR im energetisch günstigsten S_1 -Zustand, hat er die Möglichkeit von hier aus in einen

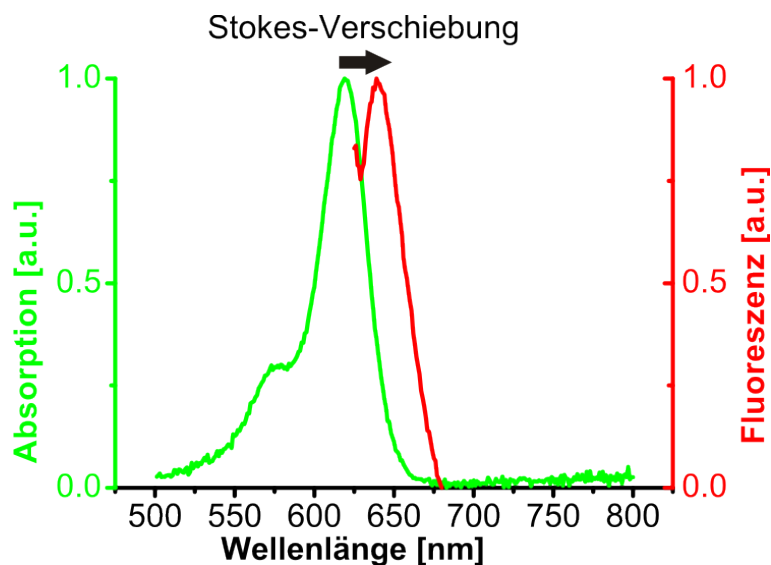


Abbildung 1.10.: Die Stokes-Verschiebung am Beispiel des Farbstoffes Atto 620.

anderen Zustand überzugehen. Hierbei ist anzumerken, dass das angeregte Fluorophor in einem Zeitbereich von mehreren Nanosekunden kurzfristig stabil ist, dies ist die *Fluoreszenzlebensdauer*. Auf Grund der metastabilen Natur dieses Zustandes, gibt es mehrere Möglichkeiten die überschüssige Energie zu dissipieren. Ein möglicher Prozess, über den der Farbstoff strahlungslos in den Grundzustand fallen kann, ist die Wechselwirkung mit den Lösungsmittelmolekülen (Non-Radiative Relaxation, NRR). Andere Übergänge finden unter Emission eines Photons statt. Alle Übergänge von dem angeregten in den Grundzustand, bei denen ein Photon emittiert wird, werden als *Lumineszenz* bezeichnet. Die Energiedifferenz, die zwischen dem Anregungsvorgang $S_0 \rightarrow S_1$ und dem Emissionsvorgang $S_1 \rightarrow S_0$ auf Grund der strahlungslosen Vibrationsrelaxation vorhanden ist, wird als Stokes-Shift bezeichnet und äußert sich durch eine Rotverschiebung der Fluoreszenz im Vergleich zum absorbierten Licht (vgl. Abb. 1.10). Alle Übergänge, die unter Emission eines Photons direkt vom S_1 in den S_0 -Zustand führen, werden als *Fluoreszenz* bezeichnet (vgl. Abb. 1.12).

Neben den fluoreszenten Übergängen gibt es noch eine andere Klasse von Übergängen, die unter Strahlungsemission stattfinden, der *Phosphoreszenz*. Phosphoreszenz beschreibt dabei einen Übergang, der unter Änderung des Spins eines Elektrons stattfindet. Grundvoraussetzung ist, dass sich ein Farbstoff zunächst im angeregten Singulett-Zustand, dem S_1 -Zustand, befindet. In diesem Zustand sind die Spins der Elektronen im HOMO und LUMO antiparallel ausgerichtet, $s_1 = +1/2$ und $s_2 = -1/2$, der Gesamtspin des Fluorophors liegt bei $S = 2 \cdot (s_1 + s_2) + 1 = 1$. Auf Grund der Spin-Bahn-Kopplung ist es jedoch quantenmechanisch erlaubt, dass für schwere Moleküle auch Übergänge vom S_1 in den ersten angeregten Triplett-Zustand T_1 möglich sind. Der Übergang wird als *Inter-System-Crossing* (ISC) bezeichnet. Bei diesem Triplett-Zustand sind die Spins der Elektronen parallel ausgerichtet, so dass der Gesamt-Spin sich zu $S = 2 \cdot (1/2 + 1/2) + 1 = 3$ ergibt (vgl. Abb. 1.11). Die Übergänge zurück in den S_1 -Zustand sind zwar möglich, aber im Vergleich zu der Fluoreszenzübergangswahrscheinlichkeit sehr unwahrscheinlich. Darum ist die Verweil-

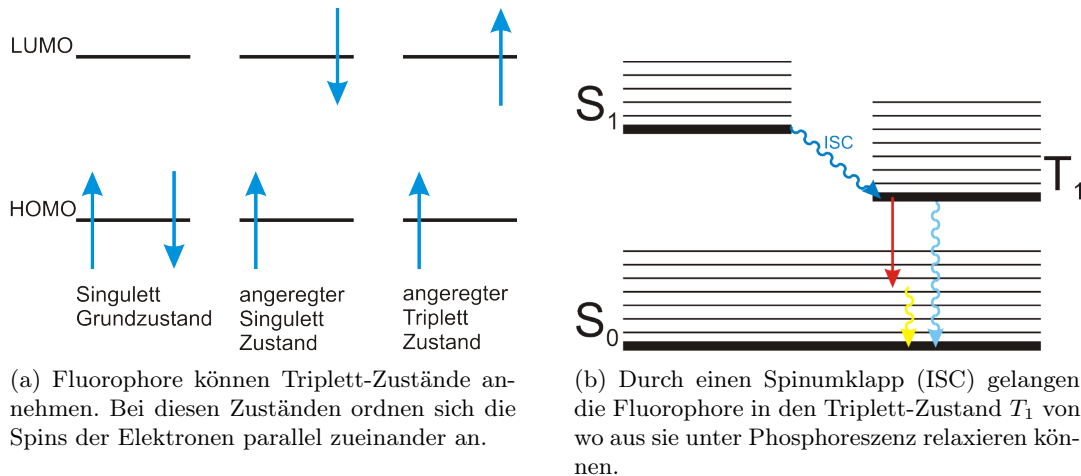


Abbildung 1.11.: Triplet-Zustand und Phosphoreszenz

dauer des Fluorophors im T_1 -Zustand sehr viel länger als im S_1 -Zustand. Man spricht von der *Triplet-Lebensdauer*, welche in Bereichen zwischen $\tau_T \approx 10^{-6} - 10^2$ s liegt [32, 33].

Die Gesamtheit, der hier behandelten photophysikalischen Phänomene, lässt sich mit Hilfe eines Jablonski-Diagrammes darstellen (vgl. Abb. 1.12). In Grün sind die Absorptionsvorgänge dargestellt, nach der Absorption relaxiert das Fluorophor über Vibrationsrelaxation und eventuell innere Konversion (gelb) in den niedrigsten S_1 -Zustand. Von dem angeregten Zustand aus, kann das Molekül entweder strahlungslos (hellblau) oder unter Aussendung eines Photons (Fluoreszenz, rot) in den Grundzustand übergehen. Durch Änderung des Spins ist es möglich, den Triplet-Zustand anzunehmen (blau), aus dem der Übergang in den Grundzustand unter Phosphoreszenz möglich ist. Das Diagramm ist nicht auf diese Prozesse beschränkt und kann erweitert werden, um zu skizzieren, wie weitere Effekte ein chromophores System beeinflussen können.

Farbstoffcharakteristika

Über Farbstoffcharakteristika ist es möglich, unterschiedliche chromophore Systeme voneinander zu unterscheiden. Direkt zugängliche Eigenschaften sind das Absorptionsspektrum und das zugehörige Emissionsspektrum. Die oben eingeführte Fluoreszenzlebensdauer, die angibt, wie lange ein Molekül im angeregten Zustand verharrt, bevor es unter Emission eines messbaren Photons zerfällt, ist eine weitere Größe, die dazu beiträgt, Farbstoffe zu charakterisieren und es somit auch ermöglicht, verschiedene Farbstoffe voneinander zu unterscheiden. Dies erreicht man über eine Fluoreszenzlebensdauer-Messung [34, 35]. Obwohl die Lebensdauer eine charakteristische Größe der Farbstoffe ist, kann die Umgebung doch dazu beitragen, dass sich die Lebensdauer drastisch verändert. Zumeist sind polare Lösungsmittel der Grund einer Lebensdaueränderung, aber auch die molekulare Umgebung, falls der Farbstoff an ein Molekül gekoppelt ist, kann auf Grund von elektronischen Zuständen hier eine Rolle spielen. Neben der Lebensdauer ist die Quantenausbeute eine andere wichtige charakteristische Eigenschaft von Farbstoffen. Die Quantenausbeute Q gibt das Verhältnis

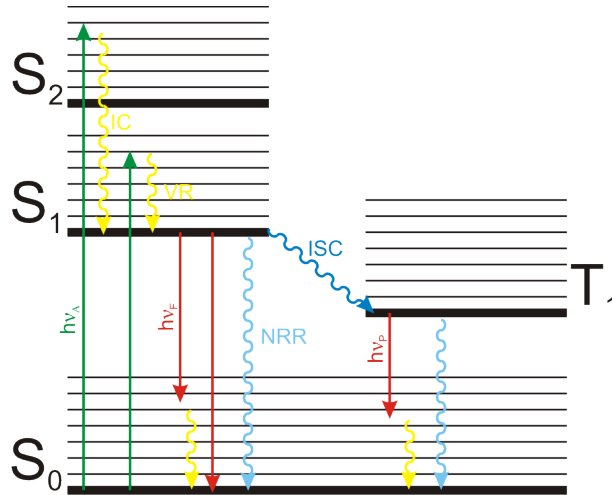


Abbildung 1.12.: Das vereinfachte Jablonski-Diagramm eignet sich, um sämtliche photophysikalischen Prozesse innerhalb eines Chromophors darzustellen. Darunter fallen die Absorption von Photonen (grün), die innere Konversion (IC, gelb), strahlungslose Übergänge (NRR), der Übergang in den Triplett-Zustand (ISC) und die lumineszenten Übergänge (rot).

von emittierten zu absorbierten Photonen an und befindet sich damit immer zwischen 0 und 1. Die strahlungslosen Übergänge zwischen angeregtem und Grundzustand werden mit der Rate k_{nr} angegeben (vgl. Abb. 1.13).

Mit Hilfe dieser beiden Übergangsraten lässt sich die Quantenausbeute mathematisch formulieren zu:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.16)$$

Die Lebensdauer des angeregten Zustandes ergibt sich entsprechend zu:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.17)$$

Die Aussendung eines Photons ist ein stochastischer Prozess und lässt sich für einfache Fluorophore mit einem exponentiellen Abfall beschreiben. Das heißt, dass in diesem Fall τ den Wert angibt, bei dem die Funktion auf $\frac{1}{e}$ abgefallen ist, also 63% der Moleküle ein Photon emittiert haben. Treten bei der Rückkehr in den Grundzustand keine strahlungsfreien Übergänge auf, spricht man von der intrinsischen Fluoreszenzlebensdauer $\tau_n = \frac{1}{\Gamma}$. Aus den Gleichungen 1.17 und 1.16 und der Definition der intrinsischen Lebensdauer folgt:

$$\tau_n = \frac{\tau}{Q} \quad (1.18)$$

Die Formel 1.18 ist wichtig, da als direkte Messgröße nur die Lebensdauer und die Quantenausbeute zur Verfügung stehen.

Während der Fluorophor sich im angeregten Zustand befindet, kann dieser durch verschiedene Prozesse depopuliert werden. Man spricht dann von der Fluoreszenzlöschung. Eine Unterscheidung der Löschmechanismen erfolgt z. B. durch Differenzierung zwischen Kollisionslöschung und Komplexlöschung. Für die Kollisionslöschung

lässt sich die Fluoreszenzabnahme über den Stern-Volmer-Plot darstellen. Dazu wird die Fluoreszenzintensität F in Abhängigkeit der Konzentration an Löschmolekülen $[Q]$, wie zum Beispiel Sauerstoff, Halogene oder Ionen, durch folgende Formel beschreiben:

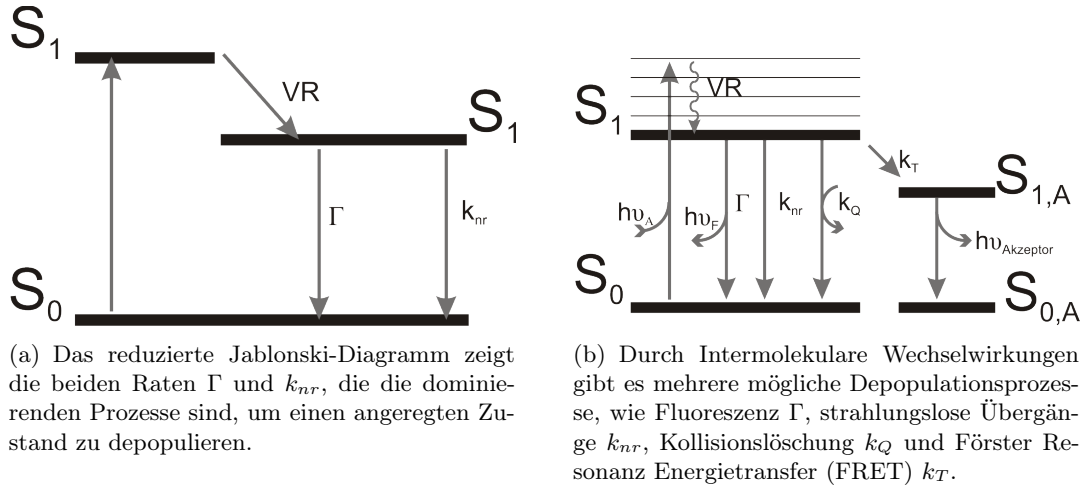


Abbildung 1.13.: Vereinfachtes Jablonski Diagramm.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1.19)$$

F_0 gibt hier die Fluoreszenzintensität ohne Quencher an, K ist die Stern-Volmer-Konstante und k_q ist die bimolekulare Löschkonstante. Da die messbare Fluoreszenzlebensdauer antiproportional zu der Stoßwahrscheinlichkeit korreliert, muss auch die Fluoreszenzlebensdauer ohne Anwesenheit der Löschmoleküle τ_0 verwendet werden. Bei der Kollisionslöschung sind verschiedene Prozesse möglich, die eine Rolle spielen können, wie z. B. Elektronentransfer zwischen den beiden Molekülen oder durch Kopplung des Spin-Bahndrehimpulses über Wechselwirkungen der zwei Molekülorbitale und dem daraus resultierenden Intersystem Crossing. Durch Einführung von intermolekularen Prozessen in das Jablonski-Diagramm, lassen sich die konkurrierenden Prozesse gut darstellen (vgl. Abb. 1.13).

Der letzte intramolekulare Parameter, der hier erwähnt werden soll, ist die *Photostabilität*. Bei der Untersuchung von biologischen Prozessen, die über einen Zeitraum von Minuten oder sogar Stunden geschehen, ist es sehr wichtig, dass ein Farbstoff so lange wie möglich in der Lage ist, Photonen zu emittieren. Die Photostabilität von Farbstoffen hängt oft von ihrer lokalen Umgebung ab und kann in einigen Fällen beispielsweise durch Entzug von Sauerstoff stark erhöht werden, oder aber auch durch Zusatz von Reduktions- und Oxidationsmitteln [36–43]. Besonders im Fall einiger Mikroskopiemethoden, die im Laufe der letzten Jahre entwickelt wurden, um die Beugungsbegrenzung zu umgehen, ist es wichtig, dass ein Farbstoff über einen Zeitraum von zwanzig Minuten bis hin zu einigen Stunden seine Fluoreszenzeigenschaft behält. Diese intrinsische Eigenschaft der Fluorophore wird bei diesen Methoden artifiziell durch Puffersysteme erhöht. Die Chemikalien, die bei den meisten Farbstoffen eine Erhöhung der Stabilität erzielen, sind allerdings hoch toxisch (z. B. Methylviologen) und kommen in so hohen Konzentrationen vor, dass eine Anwendung solcher Puffersysteme für *in vivo* Messun-

gen nicht in Frage kommt. Eine andere Möglichkeit, die ebenfalls oft eine Erhöhung der Photostabilität zur Folge hat, ist der Entzug von Sauerstoff aus dem Messpuffer. Dies wird in der Regel über Enzyme oder durch Fluten des Puffers mit Stickstoff erreicht. Da Zellen Sauerstoff für die aerobe Atmung brauchen, ist auch die Nutzung von sauerstofffreien Puffern in der Mikroskopie von lebenden Zellen nicht praktikabel.

Fluoreszenzlöschung

Wie bereits bei den intramolekularen Eigenschaften der Fluorophore deutlich wird, spielen nicht nur die spektralen Eigenschaften eine Rolle, auch die Ausnutzung von Mechanismen, wie der Photoaktivierung oder des Photoschaltens, finden in einigen Methoden Anwendung. Diese beiden Mechanismen können vereinfacht als der Wechsel eines Farbstoffes zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen dargestellt werden - einem hellen, fluoreszenten Zustand und einem dunklen, gelöschten Zustand. Da es jedoch möglich ist, durch das Einbringen von Interaktionspartnern auch intermolekulare Prozesse zu ermöglichen, sind die zu Grunde liegenden Mechanismen der Wechselwirkung sehr interessant. Da eine Fluoreszenzlöschung zwischen zwei molekularen Partnern das Potential hat, den Prozess des Photoschaltens zu ersetzen, wird im Folgenden auf die Theorie der Fluoreszenzlöschung durch zwei Moleküle eingegangen.

Resonanz Energietransfer

Das Jablonski-Diagramm (vgl. Abb. 1.12) erlaubt ein Grundverständnis über die Vorgänge, die in einem Farbstoffmolekül, das mit Photonen wechselwirkt, zu erlangen. Jegliche bisher betrachtete Art des Energietransfers, geschieht farbstoffintern, durch Absorption/Emission eines Photons, durch Energiedissipation via Wärme oder durch direkte Wechselwirkung mittels Stoßlöschung mit einem Löschmolekül. Sobald die Farbstoffe jedoch zusätzlich mit anderen Molekülen, die weit entfernt sind, wechselwirken können, führt dies zu neuen Phänomenen.

Ein Mechanismus, der weit verbreitet Anwendung findet, ist der Resonanz Energietransfer (RET). Der am häufigsten vorkommende Mechanismus ist dabei der Förster Energietransfer (FRET). Bei diesem Energietransfer wird ein Molekül, das hochenergetisches Licht absorbieren kann (Donor), in den angeregten Zustand gebracht. Befindet sich nun ein Molekül mit einem Absorptionsspektrum, das mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappt (Akzeptor), in der Nähe des Donors, kann es zu einem Energietransfer kommen. Dieser Vorgang geschieht nicht über die Emission eines Photons durch den Donor und anschließende Absorption des gleichen Photons durch den Akzeptor, sondern über Dipol-Dipol-Kopplung. Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung hat eine für molekulare Dimensionen große Reichweite von bis zu 10 nm. Für diese Art des Transfers kann das Akzeptormolekül sowohl ein fluoreszenter Farbstoff sein, der die aufgenommene Energie durch Emission eines rot-verschobenen Photons wieder abgeben kann, als auch ein nicht fluoreszierender Farbstoff, der die Energie strahlungslos, z. B. über innere Konversion, wieder abgeben kann. Eine Grundvoraussetzung für das Stattfinden der Dipol-Dipol Wechselwirkung ist die Ähnlichkeit der Energieniveaus von Donor und Akzeptor. Der gebräuchlichste Parameter, um diesen Resonanz Energietransfer zu beschreiben, ist der von T. Förster eingeführte Förster-Radius R_0 [44]. Er beschreibt die Entfernung, auf welche der Energietransfer zwischen zwei Molekü-

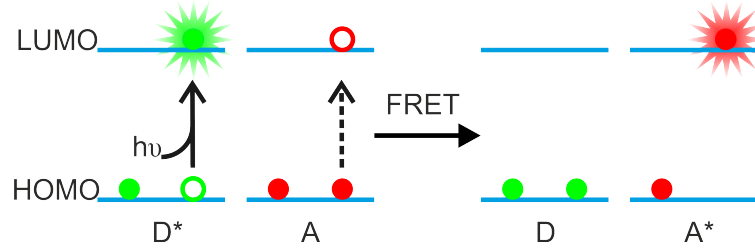


Abbildung 1.14.: Schematische Darstellung des Förster-Energietransfers.

len bei 50 % liegt. Die Rate des Transfers zwischen Donor und Akzeptor wird durch folgende Formel beschrieben:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.20)$$

Hierbei ist τ_D die Fluoreszenzlebensdauer des Donormoleküls ohne Akzeptor und r die Entfernung zwischen Donor und Akzeptor [30]. Der Resonanzenergietransfer ist gebräuchlich, um Abstände zwischen zwei mit Farbstoff markierten biologischen Proben zu messen. Die Abstände zwischen Donor und Akzeptor lassen sich durch die R^6 Abhängigkeit sehr genau im nm-Bereich angeben. Es wurden Messungen durchgeführt, die es erlaubten DNAs zu unterscheiden, die sich in der Länge um ein Basenpaar unterschieden, was $3,4 \text{ \AA}$ entspricht [45–50]. Die Bestimmung des Förster-Radius geschieht zumeist über experimentelle Messungen, kann allerdings auch theoretisch mit der Formel 1.21 berechnet werden:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \underbrace{\int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}_{J(\lambda)} \quad (1.21)$$

Hierbei ist $J(\lambda)$ das Überlappungsintegral, welches sich zusammensetzt aus der korrigierten Fluoreszenz des Donors $F_D(\lambda)$, ϵ_A dem dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors und der Wellenlänge λ . In die Berechnung des Förster-Radius fließen auch noch die Quanteneffizienz des Donors Q_D , der Brechungsindex des Lösungsmittels n , die Avogadro Zahl N und der Faktor κ ein. Dieser Faktor beschreibt die relative räumliche Anordnung der beiden Dipole und wird üblicherweise mit $\kappa^2 = 2/3$ angenommen, was einer frei-drehenden Konfiguration entspricht. Neben der komplexen Berechnung des Förster-Radius, gibt es noch die Möglichkeit, diesen Wert experimentell zu bestimmen. Aus Formel 1.20 lässt sich unter der Definition, dass die Energietransfereffizienz E als Anteil der vom Donor absorbierten Photonen, die an den Akzeptor weitergegeben werden können, folgende Gleichung aufstellen:

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.22)$$

Die experimentelle Bestimmung der Energieeffizienz erfolgt über die Messung der Fluoreszenzintensität ohne Akzeptor F_D und bei Anwesenheit des Akzeptors F_{DA} , respek-

tive der Fluoreszenzlebensdauern τ_D und τ_{DA} :

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (1.23)$$

Statische Fluoreszenzlöschung

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung kann auch zu einer strahlungsfreien Relaxation des Akzeptors führen. Wie gezeigt, ist die Abhängigkeit der Energietransferrate aus Formel 1.20 proportional zu r^{-6} und die Reichweite der Fluoreszenzlöschung beträgt mehrere Nanometer. Tritt eine dynamische Löschung durch Elektronentransfer zwischen zwei Molekülen auf, hängt die Löschrates im Allgemeinen exponentiell vom Abstand ab:

$$k_E(r) = A e^{-\beta(r-r_c)} \quad (1.24)$$

Auch bei dieser Formel ist r der Abstand der Zentren von Farbstoff und Quencher, r_c ist der Abstand zwischen den beiden Molekülen, bei denen eine Wechselwirkung stattfinden kann, A liegt für Orbitalwechselwirkungen bei 10^{-13}s^{-1} und β nimmt typischerweise Werte um 1Å^{-1} an. An dieser Abhängigkeit wird deutlich, dass die Fluoreszenzlöschung durch Elektronentransfer viel stärker mit der Entfernung abfällt und nur bis ca. 10Å effizient ist.

Der Unterschied zwischen der Kollisionslöschung und der statischen oder Komplexlöschung liegt darin, dass bei der statischen Löschung die Moleküle einen Komplex formen, der die Photophysik beeinflusst. Eine Beschreibung der Löscheffizienz erfolgt durch:

$$E_Q = \frac{k(r)}{k_2 + k(r)} \quad (1.25)$$

$k(r)$ gibt dabei die Übergangsrates der Löschung an und k_2 die Dissoziationsrate des Komplexes. Die dynamische Fluoreszenzlöschung wird meist in drei Klassen unterteilt:

1. Intersystem Crossing
2. Elektronenaustausch / Dexter-Energietransfer
3. Photoinduzierter Elektronentransfer

Das Intersystem Crossing tritt hauptsächlich bei Löschung durch sehr schwere Atome auf, wie z. B. Halogene und Sauerstoff [30, 51]. Wechselwirkungen mit diesen Molekülen führen dazu, dass der Komplex einen Triplett-Zustand ausbildet, der z. B. wiederum durch Sauerstoff als Triplett-Quencher in den Grundzustand überführt werden kann [52, 53] oder aber durch typische strahlungslose Übergänge relaxiert.

Der Elektronenaustausch findet zwischen zwei Partnern, dem Donor D_E und dem Akzeptor A_E , statt. Ähnlich wie bei FRET, handelt es sich beim Elektronenaustausch um einen Energieaustausch, der vom spektralen Überlapp abhängt.

Der Dexter-Energieaustausch hat einen quantenmechanischen Ursprung mit geringen Wahrscheinlichkeiten. Auf Grund der geringen Wahrscheinlichkeiten sind solche Übergänge im Ensemble nur bei sehr hohen Konzentrationen von Donor und Akzeptor beobachtbar. Auf Einzelmolekülebene sind diese Ereignisse so selten, dass sie nahezu nie beobachtet werden können. Der Dexter-Energietransfer kann dabei sowohl als

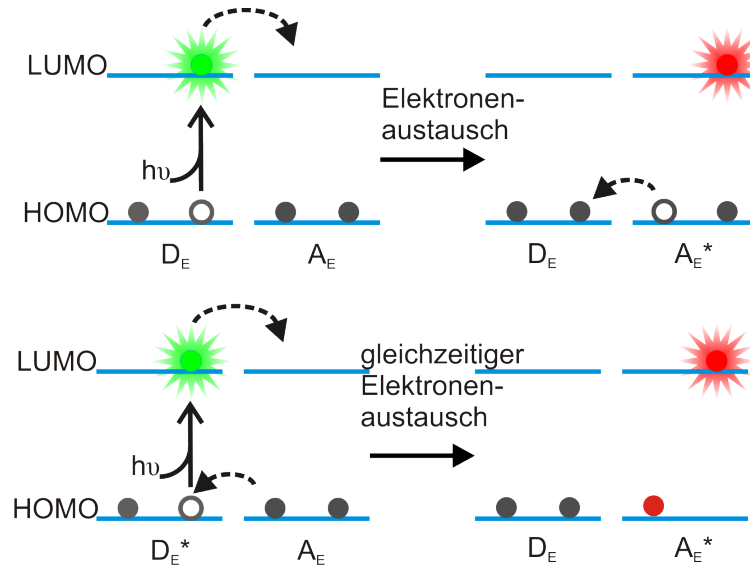


Abbildung 1.15.: Schematische Darstellung des Dexter Energietransfers.

Prozesse, die aufeinander folgen, geschehen, aber auch als gleichzeitiger Elektronentransfer stattfinden (vgl. Abb. 1.15) [30, 54, 55].

Der dritte Mechanismus, der Photoinduzierte Elektronentransfer (PET), ist der häufigste Löschmechanismus. Hier bildet sich zwischen Donor und Akzeptor ein Komplex $[D^+A^-]$. Dabei findet ein Ladungstransfer von Donor auf Akzeptor statt. Dieser Komplex kann strahlungslos in den Grundzustand relaxieren, danach kann das überschüssige Elektron des Akzeptors wieder auf den Donor zurückgehen (vgl. Abb. 1.16). Bei dem photoinduzierten Elektronentransfer kann der Farbstoff sowohl als Elektrodonor als auch als Elektronenakzeptor vorliegen. Der häufigste Fall ist allerdings, dass der angeregte Fluorophor als Akzeptor dient (beispielsweise bei der Wechselwirkung zwischen Oxazinen und Aminen) [30, 56–58]. Auf Grund der hohen Effizienz der Fluoreszenzlöschung durch PET findet dieser Mechanismus oft Anwendung, um Wechselwirkungen auf kurzen Distanzen auszunutzen, beispielsweise um die Faltungskinetik von Peptiden oder DNA-Strängen zu messen [59, 60]. Die Energieänderung, die mit dem PET einhergeht, wird durch die Rehm-Weller-Gleichung beschrieben [30, 57, 61]:

$$\Delta G = E(D^+/D) - E(A/A^-) - \Delta G_{00} - \frac{e^2}{\epsilon d} \quad (1.26)$$

Hierbei beschreiben die ersten beiden Terme das Potential des Elektronenaustausches in Donor D und Akzeptor A , ΔG_{00} ist die Übergangsenergie zwischen Grund- und angeregtem Zustand $S_0 \rightarrow S_1$ und der letzte Term beschreibt die Coulomb-Kraft des Ionen-Paares. ϵ ist die dielektrische Konstante und d der Abstand zwischen den Ladungen.

Stern-Volmer-Plots

Wie bei der Kollisionslöschung bereits erwähnt, lässt sich die Veränderung der Fluoreszenz mit der Stern-Volmer-Gleichung 1.19 beschreiben. Um zu verstehen, wie sich

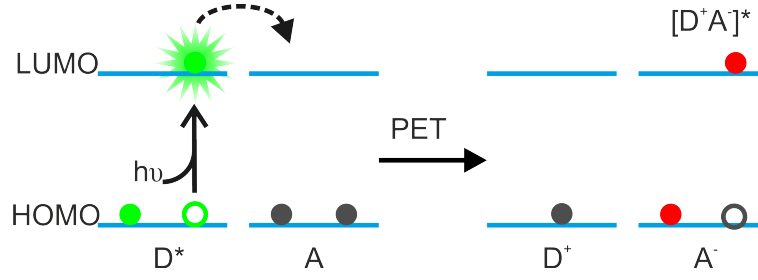


Abbildung 1.16.: Schematische Darstellung des photoinduzierten Elektronentransfers.

dynamische und statische Löschung in Ensemblemessungen unterscheiden lassen, ist es hilfreich die Stern-Volmer-Gleichung näher zu betrachten.

Zunächst soll der Fall der dynamischen Löschung beschrieben werden. Da die dynamische Löschung auf der Kollision von Farbstoffmolekülen mit Löschmolekülen basiert, lässt sich die mittlere Stoßzahl Z in Abhängigkeit der Quencherkonzentration $[Q]$ und der bimolekularen Diffusionsgeschwindigkeit k_{diff} definieren als:

$$Z = k_{\text{diff}} \cdot [Q] \quad (1.27)$$

Hierbei wird die zeitabhängige Rate $k_{\text{diff}}(t)$ durch die Smoluchowski-Gleichung beschrieben zu:

$$k_{\text{diff}}(t) = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' \left(1 + \underbrace{\frac{R_0}{\sqrt{\pi D_{F,Q} t}}}_{\rightarrow 0} \right) \quad (1.28)$$

Geht man davon aus, dass sich das System im Gleichgewicht befindet, fällt der letzte Term weg. $D_{F,Q}$ gibt bei der Gleichung die Summe von beiden Diffusionskoeffizienten an, N' ist eine Konstante, die die Anzahl der Moleküle in einem Kubikzentimeter Raumvolumen angibt, mit $N' = \frac{N_A}{1000} = 6,02 \cdot 10^{20}$ und R_0 gibt die Größe einer virtuellen Kugel an, die das Farbstoffmolekül beschreibt, den hydrodynamischen Radius. Unter Einsetzen des Diffusionskoeffizienten $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}$, der aus der Stokes-Einstein-Gleichung folgt, mit der Boltzmannkonstanten k_B , der Temperatur T , der Viskosität η und unter der Annahme, dass beide Moleküle eine ähnliche Größe mit Radius R_0 besitzen, folgt unter Vernachlässigung des zeitabhängigen Terms:

$$k_{\text{diff}} = 4\pi R_0 D_{F,Q} N' = \frac{2RT}{3\eta} \quad (1.29)$$

Hierbei gibt R die universelle Gaskonstante an. Geht man davon aus, dass unter normalen Bedingungen nicht jeder Stoß, der über k_{diff} gegeben ist, zu einer Löschung führt, lässt sich der Korrekturfaktor $\gamma = \frac{k_q}{k_{\text{diff}}}$ definieren. k_q gibt in diesem Fall die Löschrates durch Quencher-moleküle an. Unter diesen Grundannahmen lässt sich eine Differentialgleichung aufstellen:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k + k_q[Q])[F^*] + I_{\text{ex}}(t) \quad (1.30)$$

$I_{\text{ex}}(t)$ gibt die angeregten Moleküle an, $k[F^*]$ gibt die Löschrates der angeregten Moleküle durch alternative Prozesse zur Stoßlöschung an. Diese Depopulation findet vor

allem durch Fluoreszenz und innere Konversion (IC) statt, deshalb lässt sich die Rate als Summe konkurrierender Prozesse schreiben:

$$\frac{d[F^*]}{dt} = - \left(\underbrace{k_F + k_{IC}}_k + k_q[Q] \right) [F^*] + I_{ex}(t) \quad (1.31)$$

Da bei der Beobachtung der Fluoreszenz gewartet wird, bis sich das Gleichgewicht eingestellt hat, ist die zeitliche Entwicklung gleich 0 zu setzen. Betrachtet man das Verhältnis dieser Formel für den Fall $[Q] = 0$ und den Fall $[Q]$ als Variable, erhält man die Stern-Volmer-Gleichung aus Formel 1.19, wobei K_{SV} die Stern-Volmer-Konstante darstellt.

$$\frac{F_0}{F} = \frac{k + k_q[Q]}{k} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1.32)$$

Im Fall einer Komplexbildung sieht der Zusammenhang anders aus. Im Gleichgewicht gilt der Zusammenhang für die Gleichgewichtskonstante:

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1.33)$$

Die Gesamtzahl der Fluorophore ist:

$$[F]_0 = [F] + [FQ]. \quad (1.34)$$

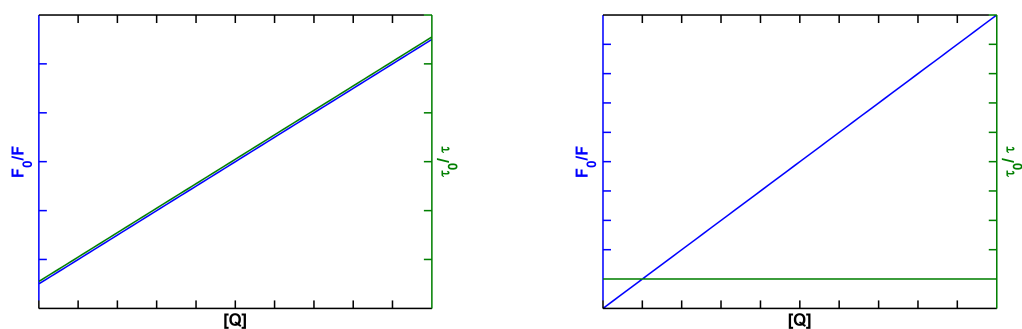
Durch Ersetzen von $[FQ]$ in Formel 1.33 und Umformung erhält man für die Stern-Volmer Gleichung:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q] \quad (1.35)$$

Eine Grundannahme, die bei der Herleitung der Konstanten eine wichtige Rolle spielt, ist die Tatsache, dass der Komplex $[FQ]$ keine Fluoreszenz zeigt, also komplett gelöscht ist. Anhand der Fluoreszenzintensität lassen sich die beiden Prozesse nicht unterscheiden. Eine Möglichkeit der Unterscheidung liegt aber in der Fluoreszenzlebensdauer. Da beim statischen Löschen nur noch die Farbstoffe fluoreszieren, die kein Löschmolekül gebunden haben, bleibt die Lebensdauer dieser Fluorophore unverändert. Bei der dynamischen Löschung hingegen vermindert sich auf Grund der Stoßwahrscheinlichkeit die Fluoreszenzlebensdauer (vgl. Abb.1.17) [30].

Farbstoffklassen

Mit Hilfe von Farbstoffen lassen sich biologisch relevant Ziele, wie Proteine oder Nucleinsäuren, markieren und mit Hilfe von modernen Mikroskopen abbilden. Da sich die Fluorophore in verschiedene Klassen mit sehr spezifischen Eigenschaften gliedern, ist es essentiell diese Farbstoffklassen zu unterscheiden, da sie zum Teil grundverschiedene Charakteristika aufweisen und sich somit auch ihre Anwendbarkeit auf spezielle Teilbereiche beschränkt. Das auffälligste Unterscheidungsmerkmal der bedeutendsten Farbstoffklassen ist ihre Größe. Organische Farbstoffe, beispielsweise Tetramethylrhodamin (TMR) (vgl. Abb. 3.2), haben in der Regel einen Durchmesser zwischen 5 Å und 1 nm und sind die kleinste Klasse der fluoreszenten Marker. Die Größe der Farbstoffmarkierungen spielt natürlich eine Rolle. Sind diese etwas größer als das eigentliche Untersuchungsobjekt, kommt es durch diese Markierung zu sterischen Hinderungen oder



(a) Die dynamische- / Stoßlöschung. Sowohl Fluoreszenz als auch Fluoreszenzlebensdauer hängen von der Löschmolekülkonzentration ab.

(b) Die statische- / Komplexbildungslöschung. Nur die Fluoreszenz hängt von der Löschmolekülkonzentration ab.

Abbildung 1.17.: Stern-Volmer-Plots

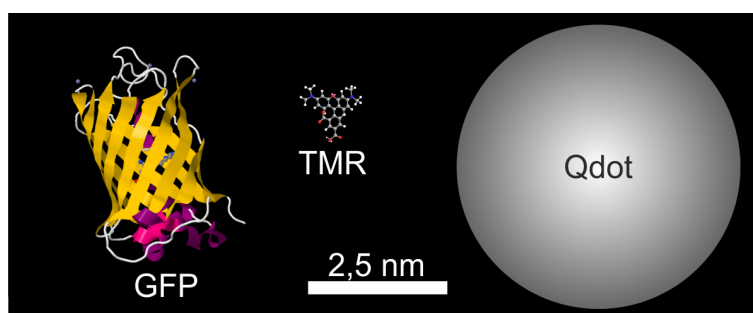


Abbildung 1.18.: Größenvergleich der bekanntesten Farbstoffklassen. Links: enhanced GFP (PDB:1KYS [66]); Mitte: Tetramethylrhodamin (TMR); Rechts: Quantendot.

Veränderungen der Funktion des Objektes (vgl. Abb. 1.18). Ein anderer Parameter, der bei der Wahl des Farbstoffes eine Rolle spielt, ist die Photostabilität, da man in der Regel die Fluoreszenz eines Farbstoffes über einen möglichst langen Zeitraum betrachten möchte. Bei diesem Kriterium bieten die Quantendots einen großen Vorteil, da sie eine herausragende Photostabilität besitzen - sie können auf Grund ihrer Photophysik nicht zerstört werden. Fluoreszente Proteine sind gegenüber der Photozerstörung am anfälligsten, sie bleichen unter normalen Bedingungen innerhalb von Sekunden [62]. Ein weiteres wichtiges Auswahlkriterium ist die Möglichkeit, das Untersuchungsobjekt zu markieren. Für zelluläre Proteine bieten die farbstoffmarkierten Proteine die einfachste Möglichkeit. Hier muss einfach ein entsprechender Vektor in die DNA des Zielproteins eingebunden werden, anschließend wird das mit dem Farbstoff fusionierte Protein automatisch von der Zelle hergestellt. Für organische Farbstoffe gibt es chemische Standardkopplungen, mit denen sich Proteine oder DNA-Stränge markieren lassen. Bei Quantendots ergibt sich die Schwierigkeit der stöchiometrischen Markierung. Quantendots benötigen für die Markierung von biologischen Zielen meistens eine zusätzliche Oberflächenbeschichtung, die aber wiederum das gezielte stöchiometrische Markieren erschwert [62–65] (vgl. Tabelle 1.2). Eine weitere Klasse, die bisher aber kei-

	Organische Farbstoffe	fluoreszente Proteine	Quantendots
Größe	+	o	-
Photostabilität	o	-	+
Markierung	o	+ (für Proteine)	-

Tabelle 1.2.: Fluorophorklassen: Vor- und Nachteile der einzelnen Klassen.

ne große Anwendung findet, sind Nanodiamanten mit einer Stickstofffehlstelle. Diese Fehlstelle verleiht dem Nanodiamanten eine Fluoreszenz, die nicht photozerstört werden kann. Bei den Nanodiamanten ist nachteilig zu bemerken, dass die Größe mit ca. 35 nm die Größe der Quantendots noch einmal übersteigt und die Oberflächenfunktionalisierung, die notwendig ist, um eine stöchiometrische Markierung zu ermöglichen, viele Probleme bereitet [67–70].

1.4. Der Aufbau moderner Mikroskope

Moderne Mikroskope können von ihrer Konzeption her in zwei separate Bereiche, den Anregungsteil und den Detektionsteil, zerlegt werden. Den sensitiven Mikroskopen, wie sie in der Einzelmolekülspektroskopie und den Hochauflösungsmikroskopen verwendet werden, ist eins gemein, sie besitzen einen oder mehrere Laser zur Anregung der Fluoreszenz. Laser haben mehrere Vorteile, die sie trotz ihrer relativ hohen Preise, als Anregungslichtquelle für die Mikroskopie favorisieren:

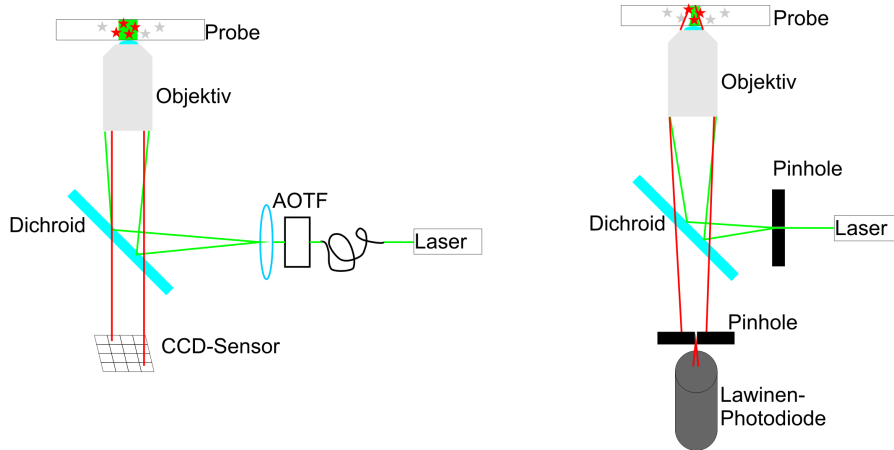
1. ein schmales Anregungsspektrum
2. geringe Pulsbreite bei gepulster Anregung
3. parallele Strahlen

Dadurch, dass das Licht sehr schmalbandig emittiert wird, hat man die Möglichkeit Fluorophore selektiv anzuregen und z. B. erhöhte Hintergrundfluoreszenz von unabsichtlicher Anregung anderer Moleküle zu unterdrücken - ein Problem, das bei biologischen Proben oft eine wichtige Rolle spielt [71]. Ein anderer Vorteil liegt darin, dass, durch Verwendung zusätzlicher Laser, auch mehrere Farbstoffe parallel angeregt werden können, so dass es möglich ist, mehrere Farbkanäle gleichzeitig zu messen.

Die geringe Pulsbreite spielt eine wichtige Rolle, wenn man die Fluoreszenzlebensdauer in einer Probe bestimmen möchte. Dadurch, dass ein kurzer Anregungspuls eingestrahlt wird, kann anhand der Zeitdifferenz zwischen Puls und Fluoreszenzphoton die Fluoreszenzlebensdauer berechnet werden.

Die parallele Strahlung ermöglicht es sehr genau kleine Bereiche einer Probe gleichmäßig zu illuminieren, was wiederum kritische Effekte auf Grund von unterschiedlich starker Beleuchtung und der Phototoxizität verringert [72, 73].

Basierend auf der Anregung mit Hilfe von Lasern, haben sich unterschiedliche Beleuchtungsmethoden etabliert, wie z. B. das Weitfeld-Mikroskop (vgl. Abb. 1.19 (a)). Bei dieser Art der Mikroskopie wird Licht parallel aus dem Objektiv ausgestrahlt. Dadurch wird ein relativ großes Feld mit einer hohen Eindringtiefe des Lichtes in die Probe beleuchtet. Es lassen sich biologische Proben mit einer axialen Integration über



(a) Das Weitfeld-Mikroskop beleuchtet eine große Fläche mit einer Dicke von ca. $1 - 2 \mu\text{m}$ mit einem parallelen Laserstrahl. Das Fluoreszenzlicht wird mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert.

(b) Beim konfokalen Mikroskop wird das Anregungslicht auf einen kleinen Punkt mit einem Durchmesser von ca. 450 nm fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird ebenfalls fokussiert. Mit Hilfe einer Lochblende wird das Hintergrundlicht vom Fluoreszenzlicht aus dem Fokus getrennt und dann mit einer Lawinen Photodiode (Avalanche Photodiode, APD) gemessen.

Abbildung 1.19.: Weitfeld und Konfokale Mikroskopie

$1 - 2 \mu\text{m}$ abbilden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das Fluoreszenzsignal direkt auf einen 2D-Sensor wie z. B. einen CCD-Chip abgebildet werden kann - dies ermöglicht die Betrachtung einer recht großen Fläche, typischerweise mit einer Seitenlänge von $40 - 150 \mu\text{m}$.

Das konfokale Mikroskop hat seinen Ursprung in den 50-er Jahren des letzten Jahrhunderts. Marvin Minsky benutzte eine Lochblende, um das detektierte Fluoreszenzsignal von einem kleinen beleuchteten Bereich weiter einzuschränken und somit insgesamt nur noch das Signal aus einem konfokalen Volumen von ca. 300 nm Durchmesser und mit einer axialen Richtung von 700 nm zu detektieren. Die Einschränkung dieser Methode bezüglich der Bildgebung liegt darin, dass ein 1D-Detektor, wie z. B. eine Lawinen-Photodiode (APD) verwendet wird, um das Signal zu detektieren. Will man eine 2D-Karte von seinem Signal erstellen, so muss entweder der Laserstrahl über die Probe, oder der komplette Mikroskoptisch muss über den Laserstrahl gerastert werden (vgl. Abb. 1.19 (b)) [74–76].

Das Rastern mit Hilfe des Lasers funktioniert in den meisten Fällen durch das gezielte Verkippen der letzten Spiegel vor dem Objektiv mit je zwei Piezomotoren. Der Laserstrahl wird dann an mehreren Punkten in der Probe geparkt und die Fluoreszenz in diesen Punkten gemessen. Um ein Bild mit 512×512 Bildpunkten zu messen, müssen also ca. 25.000 einzelne Positionen angefahren werden. In jeder Position muss das Fluoreszenzsignal für einen Zeitbereich von einigen hundert μs bis hin in den ms Bereich detektiert werden. Ein Problem dieser Methode ist, dass sich das konfokale Volumen mit dem Kippen der Spiegel leicht ändert, was zu Unterschieden in der detektierten Fluoreszenz führt. Diese Fehler müssen im Nachhinein mathematisch korrigiert wer-

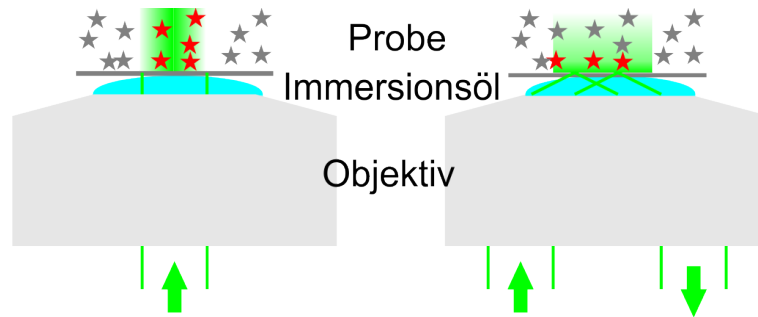


Abbildung 1.20.: Vergleich des Strahlenverlaufes bei Weitfeld (links) und TIRF Mikroskopie (rechts).

den. Wird statt dem Laser der Mikroskoptisch bewegt, entstehen die Probleme mit der Änderung des Fokus nicht, allerdings ist ein Mikroskoptisch im Verhältnis zu einem Spiegel sehr schwer und das Verfahren mittels Piezomotoren benötigt deutlich mehr Zeit.

Die dritte große Klasse der Mikroskope, die erwähnt werden muss, ist die Interne Totalreflektionsmikroskopie (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, TIRFM). Im Rahmen dieser Arbeit soll dabei lediglich eine der beiden Möglichkeiten der TIRF-Mikroskopie erwähnt werden, das Objektiv basierte TIRF. Diese Methode basiert auf der Weitfeldmikroskopie, das Laserlicht wird jedoch nicht mittig in das Objektiv eingekoppelt, sondern leicht versetzt. Durch die Anordnung der Linsen in dem TIRF-Objektiv, wird das Licht zur Mitte hin abgelenkt, so dass es schräg aus dem Objektiv austritt (vgl. Abb. 1.20).

Bei dem Weg, den das Licht zurücklegt, trifft dieses fast immer in einem Winkel von nahezu 90° auf die optisch durchlässigen Medien. Erst im Objektiv wird das Licht zur Mitte hin gebrochen. Die Linsen im Objektiv sind so beschaffen und angeordnet, dass es nicht zu Reflektionen kommen kann. Deswegen reicht es, das Objektiv als einfache Linse mit einem Brechungsindex von $n \approx 1,51$ zu betrachten. Nach dem Austreten aus dem Objektiv tritt das Licht in ein Immersionsmedium ein, das einen Brechungsindex von $n = 1,515$ besitzt. Danach tritt das Licht in das Deckglas mit einer Dicke von $0,17\text{ mm}$ und einem Brechungsindex von $n = 1,523$ ein. Die Probe, die beobachtet werden soll, befindet sich in der Regel in einem wässrigen Medium, welches einen Brechungsindex von $n = 1,33$ besitzt.

Trifft Licht von einem optisch dünneren auf ein optisch dichteres Medium $n_2 > n_1$, so wird das Licht nach folgender Gesetzmäßigkeit (*Snelliussches Gesetz*) zum Lot hin gebrochen:

$$\sin \beta = \frac{n_1 \cdot \sin \alpha}{n_2} \quad (1.36)$$

Dabei ist α der Einfallswinkel und β der Transmissionswinkel. Trifft jedoch Licht von einem optisch dichten auf ein optisch dünneres Medium, wie z. B. zwischen Deckglas und Probenmedium, so wird das Licht vom Lot weggebogen. Dies kann ausgenutzt werden, um den der TIRF-Mikroskopie zu Grunde liegenden Effekt zu erzeugen. Im Extremfall kann es zu einer Situation kommen, bei der das austretende Licht parallel zur Grenzfläche verläuft. Dies ist der kritische Winkel α_c . Er kann aus Formel 1.36

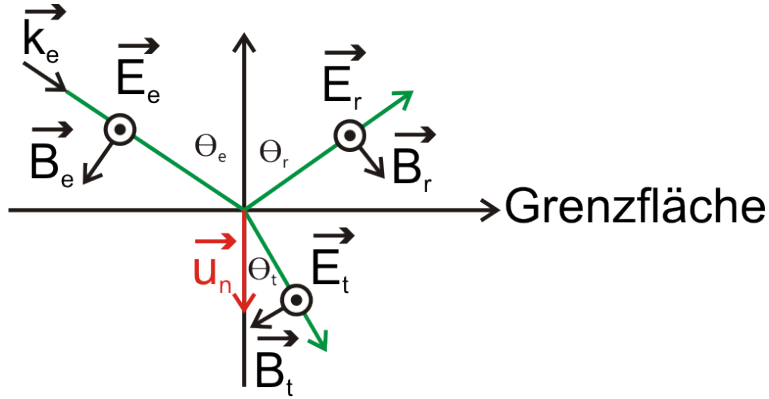


Abbildung 1.21.: Schema des Feldverlaufs, wenn E senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist.

und über die Bedingung $\beta = 90^\circ$ berechnet werden:

$$\sin \alpha_c = \frac{n_2 \cdot \sin(90^\circ)}{n_1} = \frac{n_2}{n_1} \quad (1.37)$$

Wenn Licht unter einem größeren Winkel als α_c einfällt, wird es totalreflektiert. Diese Theorie ist bisher unabhängig von der Polarisation des einfallenden Lichts und basiert rein auf der klassischen Strahlenoptik. Zerlegt man eine einfallende elektromagnetische Welle in seine Anteile \vec{E} und \vec{B} , die senkrecht zueinander stehen und nimmt weiterhin an, dass das \vec{E} -Feld senkrecht zu der Einfallsebene steht, lässt sich formulieren (vgl. Abbildung 1.21):

$$\vec{k} \times \vec{E} = v\vec{B} \quad (1.38)$$

und

$$\vec{k} \cdot \vec{E} = 0. \quad (1.39)$$

Da das einfallende E -Feld an der Grenzfläche kontinuierlich in die reflektierten und transmittierten Anteile übergehen muss, gilt:

$$\vec{E}_{0,e} + \vec{E}_{0,r} = \vec{E}_{0,t} \quad (1.40)$$

Das einfallende und das reflektierte Licht erfahren die gleichen Materialeigenschaften. Daraus lässt sich eine weitere Randbedingung aufstellen:

$$\frac{-B_e}{\mu_e} \cos \Theta_e + \frac{B_r}{\mu_e} \cos \Theta_r = \frac{-B_t}{\mu_t} \cos \Theta_t \quad (1.41)$$

Hierbei stellt μ die Permeabilität dar. Aus Gl. 1.38 folgen:

$$B_e = E_e/v_e \quad (1.42)$$

$$B_r = E_r/v_r \quad (1.43)$$

$$B_t = E_t/v_t \quad (1.44)$$

Da Einfallswinkel und Ausfallswinkel gleich sind, ebenso wie v_e und v_r lässt sich Formel 1.41 umformulieren:

$$\frac{1}{\mu_e v_e} (E_e - E_r) \cos \Theta_e = \frac{1}{\mu_t v_t} E_t \cos \Theta_t \quad (1.45)$$

Setzt man in diese Gleichung die Definition des E-Feldes $\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)$ für die einfallende Welle sowie einen Phasenversatz für die reflektierten und transmittierten Felder ϵ ein, $\vec{E}_t = \vec{E}_{0,t} \cos(\vec{k}_t \cdot \vec{r} - \omega t + \epsilon_t)$ und für das reflektierte Feld entsprechend, folgt:

$$\frac{n_e}{\mu_e} (E_{0,e} - E_{0,r}) \cos \Theta_e = \frac{n_t}{\mu_t} E_{0,t} \cos \Theta_t \quad (1.46)$$

Der Brechungsindex lässt sich durch die Definition $n = \frac{c}{v}$ in die Formel einführen. Das Einsetzen von Formel 1.40 führt zu den Fresnel-Gleichungen:

$$\frac{E_{0,r}}{E_{0,e}} = \frac{\frac{n_e}{\mu_e} \cos \Theta_e - \frac{n_t}{\mu_t} \cos \Theta_t}{\frac{n_e}{\mu_e} \cos \Theta_e + \frac{n_t}{\mu_t} \cos \Theta_t} \quad (1.47)$$

und

$$\frac{E_{0,t}}{E_{0,e}} = \frac{2 \frac{n_e}{\mu_e} \cos \Theta_e}{\frac{n_e}{\mu_e} \cos \Theta_e + \frac{n_t}{\mu_t} \cos \Theta_t} \quad (1.48)$$

Diese Gleichungen gelten, wenn das E-Feld senkrecht zur Einfallsebene polarisiert ist. Liegt das E-Feld in der Einfallsebene, lässt sich das transmittierte und das reflektierte Feld analog herleiten. Besonders interessant ist der Fall der Totalreflektion, also wenn $\Theta_e \geq \alpha_c$ ist. Formuliert man Gleichung 1.47 um, lässt sich der reflektierte Anteil schreiben als:

$$r_{\text{senkrecht}} = \frac{\cos \Theta_e - (\sin^2 \alpha_c - \sin^2 \Theta_e)^{1/2}}{\cos \Theta_e + (\sin^2 \alpha_c - \sin^2 \Theta_e)^{1/2}} \quad (1.49)$$

Der parallele Anteil ergibt sich zu:

$$r_{\text{parallel}} = \frac{\sin^2 \alpha_c \cos \Theta_e - (\sin^2 \alpha_c - \sin^2 \Theta_e)^{1/2}}{\sin^2 \alpha_c \cos \Theta_e + (\sin^2 \alpha_c - \sin^2 \Theta_e)^{1/2}} \quad (1.50)$$

Die einzige Vereinfachung, die in diese Formel eingegangen ist, ist die Annahme, dass die Medien eine ähnliche magnetische Permeabilität μ besitzen, und dass Formel 1.37 gilt. Da $90^\circ > \Theta_e > \alpha_c$ gilt, gilt auch $\sin \Theta_e > \sin \alpha_c$. Beide reflektierten Anteile nehmen also komplexe Werte an [23].

Dieser Sachverhalt lässt sich nur quantenmechanisch mit der Entstehung eines evaneszenten Feldes erklären. Das heißt, dass ein elektromagnetisches Feld entsteht, das direkt an der Grenzfläche die eingestrahelte Intensität besitzt, dessen Stärke dann aber stark abfällt. Der Intensitätsabfall dieses Feldes kann beschrieben werden als

$$I(z) = I_0 e^{-z/d} \quad (1.51)$$

wobei d als die charakteristische Eindringtiefe definiert ist, bei der das Feld auf den $1/e$ -ten Anteil seiner Anfangsintensität gefallen ist.

$$d = \frac{\lambda}{4\pi n_t} \left(\frac{\sin^2 \Theta_e}{\sin^2 \alpha_c} - 1 \right)^{-1/2} \quad (1.52)$$

In der TIRF-Mikroskopie ist der Zusammenhang zwischen der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes und dem einfallenden Licht vereinfacht, da lediglich s-polarisiertes Licht verwendet wird [77–79].

Benutzt man die Formel 1.52, um die charakteristische Eindringtiefe zu bestimmen, erhält man Werte im Bereich von 100 nm. Diese hohe axiale Auflösung, die die Auflösung von einem konfokalen Setup in axiale Richtung um fast eine Größenordnung unterschreitet, macht die Benutzung des TIRFMs zur Untersuchung von Objekten, die auf Glasoberflächen immobilisiert werden können und von Zellmembranen besonders geeignet.

Neben diesen klassischen Mikroskopiemethoden, die sehr weit verbreitet sind, gibt es einige Mikroskope, die auf den Grundprinzipien der Gauß'schen Optik basieren. Das Strukturierte Beleuchtungsmikroskop (Structured Illumination Microscopy, SIM) beispielsweise nutzt eine Technik, die auf der Erzeugung von Moiré-Ringen basiert. Dazu wird ein gestreiftes Beleuchtungsmuster in die Probe eingestrahlt. Durch das Verschieben und Drehen dieses Musters werden unterschiedliche Teilbereiche des Untersuchungsobjektes illuminiert. Nach der Datenaufnahme kann aus den unterschiedlich beleuchteten Daten ein Bild rekonstruiert werden, bei dem die Auflösung in der Regel einen Faktor 2–5 über der Auflösung eines konfokalen Mikroskops liegt [80–83]. Ein anderer Ansatz, um die Beugungsgrenze in der Mikroskopie zu umgehen, ist die 2-Photonen Mikroskopie. Dabei wird ein Molekül, das zumeist ein Absorptionsmaximum im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums hat, durch zwei Photonen mit halber Energie angeregt. Dazu müssen die beiden Photonen innerhalb einer Atto-Sekunde auf das Fluorophor treffen. Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass viel weniger Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Absorption entsteht und der Fokus, in dem die Photonendichte hoch genug ist, um die Doppelabsorption zu ermöglichen, viel kleiner ist, als in einem konfokalen Mikroskop (Faktor 2–4). Durch die hohe Wellenlänge sinkt auch die Wechselwirkungswahrscheinlichkeit der Anregungsphotonen mit Materie. Dies macht es sehr viel einfacher tief in biologischen Proben, wie z. B. Gewebeschnitten, zu messen [84–86]. Die Nachteile dieser Methode liegen in der hohen Photonendichte, die nötig ist, um eine 2-Photonen Absorption zu erhalten und dem Fakt, dass die Anzahl der geeigneten Fluorophore für diese Methode sehr gering ist. Eine weitere Methode der Beleuchtung von farbstoffmarkierten Proben bietet die Mikroskopie mit flächiger Anregung (Single-Plane Illumination Microscopy, SPIM). Bei dieser Art der Mikroskopie wird ein neues Feld eröffnet, welches bei allen anderen bildgebenden Mikroskopiemethoden unzugänglich ist. Viele biologische Proben sind zu dick, um sie mit einem Weitfeld- oder TIRF-Mikroskop abzubilden. In diesem Fall bietet SPIM eine Alternative. So wird bei SPIM über ein zweites Objektiv von der Seite eine Art Lichtebene in die Probe projiziert. Diese Lichtebene basiert auf dem Gauß'schen Strahlprofil und hat eine Dicke von 2–5 μm zwischen den charakteristischen Halbwertsintensitäten in axialer Richtung zum Beobachtungsobjektiv (vgl. Abb. 1.22). Durch geschicktes Einbringen einer zylindrischen Linse in den Detektionsstrahlengang kann das verzerrte Fluoreszenzbild genutzt werden, um Informationen über die relative Position von einzelnen Fluoreszenzemittern innerhalb des Lichtfeldes zu erhalten und somit, durch Rastern der Probe, eine 3D-Rekonstruktion über einen Bereich von mehreren 10 μm in axialer Richtung zu ermöglichen [72, 87, 88]. Nachteilig bei SPIM ist der Sachverhalt, dass es auf Grund des Strahlprofils nicht möglich ist, Objekte nah an der Oberfläche anzuregen und dass für die Detektion der Fluoreszenz

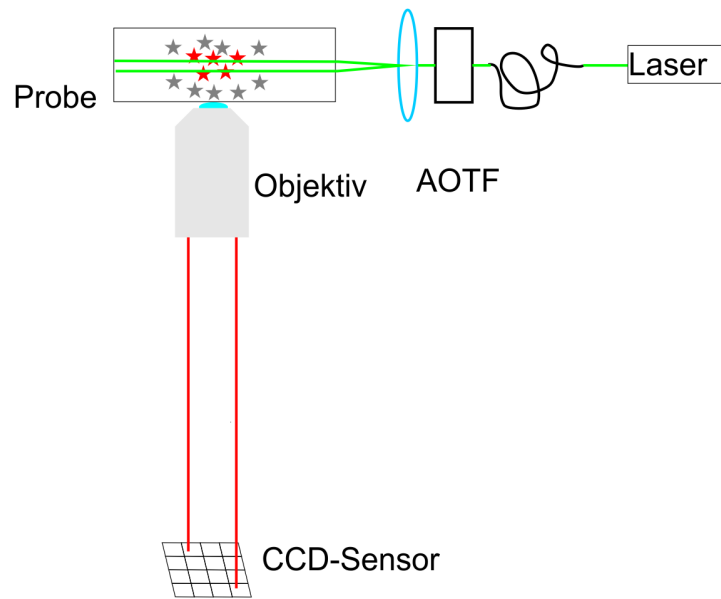


Abbildung 1.22.: Schema der Mikroskopie mit Hilfe flächiger Anregung (SPIM).

ein Objektiv mit einem hohen Arbeitsabstand vonnöten ist. Die numerische Apertur für solche Objektive liegt in der Regel bei $NA = 1,15$. Nach der Beugungsbegrenzung aus Formel 1.11 folgt, dass die Auflösung in einem SPIM im Vergleich zu einem Weitfeld- oder TIRF-Mikroskop ($NA = 1,49$) um einen Faktor 0,25 schlechter ist.

1.5. STED

Die bisher beschriebenen Mikroskopiemethoden unterliegen alle der Beugungsbegrenzung und sind in ihrer Auflösung limitiert. Einige Methoden, wie etwa die Multiphotonenmikroskopie, bieten zwar Wege, um die Auflösung zu verbessern, diese Verbesserung ist jedoch lediglich um einen kleinen Faktor möglich. Zwei unterschiedliche Herangehensweisen haben sich aber innerhalb der letzte Jahre durchgesetzt, mit dem Ziel, die Auflösung in den Bereich einiger Nanometer zu reduzieren. Die erste Methode basiert auf der von Albert Einstein postulierten induzierten/stimulierten Emission [89]. Man kann die Besetzungsänderung in einem Zweizustandssystem für den Grundzustand beschreiben als:

$$\frac{dN_0(t)}{dt} = \underbrace{-N_0 \cdot B_{01} \cdot u}_{\text{Absorptionsprozesse}} + \underbrace{N_1 \cdot B_{10} \cdot u}_{\text{stimulierte Emission}} + \underbrace{N_1 \cdot A_{10}}_{\text{spontane Emission}} \quad (1.53)$$

Hierbei gibt $u = \frac{2h\nu^3}{c^2(e^{h\nu/kT}-1)}$ die Strahlungsdichte nach Planck an [90], B_{01} , B_{10} und A_{10} sind die Einstein-Koeffizienten der unterschiedlichen Übergänge. Die Stimulierte Emissions Mikroskopie (Stimulated Emission Depletion, STED) basiert auf Ausnutzung zusätzlicher induzierter Emission. Dazu wird in einem konfokalen Mikroskop ein

Laser implementiert, der eine hohe Leistung bei einer Wellenlänge besitzt, die etwas langwelliger ist als das Emissionsmaximum des Farbstoffes. Formuliert man dann die Gleichung statt mit den Einstein-Koeffizienten über die Intensität des STED-Lasers I_{STED} und dem molekularen Wechselwirkungsquerschnitt σ , so lässt sich die Besetzungsänderung des ersten angeregten Zustands formulieren als:

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = \underbrace{-N_1\sigma I_{\text{STED}}/\hbar\omega}_{\text{stimulierte Emission}} + \underbrace{N_0^*\sigma I_{\text{STED}}/\hbar\omega}_{\text{Wiederanregung}} - \underbrace{N_1 k_{Fl}}_{\text{spontane Emission}} \quad (1.54)$$

Hierbei gibt $\hbar\omega$ die Energie der Photonen an, die im STED-Puls enthalten sind, k_{Fl} gibt die Rate für die spontane Emission an und N_0^* beschreibt die Population eines vibrationsangeregten Zustandes im Grundzustand. Analog lässt sich die Besetzungsänderung im vibrationsangeregten Grundzustand beschreiben:

$$\frac{dN_0^*(t)}{dt} = \underbrace{N_1\sigma I_{\text{STED}}/\hbar\omega}_{\text{stimulierte Emission}} - \underbrace{N_0^*\sigma I_{\text{STED}}/\hbar\omega}_{\text{Wiederanregung}} - \underbrace{N_0^* k_{vr}}_{\text{spontane Relaxation}} \quad (1.55)$$

In dieser Formulierung ist der dritte Teil der Gleichung wichtig. Er gibt eine Wahrscheinlichkeit für eine spontane Vibrationsrelaxation in den Grundzustand, die über k_{vr} angegeben wird. Bleiben die fokalen Intensitäten klein genug, ist die Wahrscheinlichkeit für die Vibrationsrelaxation, die in Picosekunden stattfindet, dominierend und die restlichen Terme können vernachlässigt werden. Daraus folgt, dass $N_0^* \rightarrow 0$ und es findet nahezu keine Wiederanregung mit dem Laserpuls statt. Dies kann nun verwendet werden, um die Farbstoffpopulation im angeregten Zustand soweit zu dezimieren, dass idealerweise nur noch ein Farbstoffmolekül, in einem Volumen unter der Beugungsgrenze, im angeregten Zustand bleibt [91]. Um eine solche räumliche Anordnung der Fluorophore zu erreichen, wird - zusätzlich zu dem Anregungslaser eines konfokalen Aufbaus - ein weiterer Laser mit geeigneter Wellenlänge und hoher Leistung in das Mikroskop eingekoppelt. Durch das Einbringen einer Phasenplatte in den Strahlengang lässt sich das Profil des Laserpulses so verändern, dass es eine *Donut-Form* annimmt (vgl. Abbildung 1.23) [92–95].

Die Stärken der STED-Mikroskopie liegen eindeutig darin, dass inzwischen für viele Farbstoffe eine Lokalisation im Bereich einiger weniger Nanometer möglich ist. So kann die maximal erreichbare Auflösung in Abhängigkeit der eingestrahelten Leistung I_{STED} und der farbstoffspezifischen Sättigungsleistung $I_{\text{Sät}}$ beschrieben werden als:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{\text{NA} \sqrt{1 + \frac{I_{\text{STED}}}{I_{\text{Sät}}}}} \quad (1.56)$$

Da es sich bei der STED-Mikroskopie um eine Rastertechnik handelt, bei der einzelne Messpunkte der Reihe nach gemessen werden, ist die Messzeit direkt von der Dichte der Messpunkte und der Größe des aufgenommenen Bildes abhängig. Die Limitierung dieser Methode ist vor allem darin begründet, dass für die STED-Mikroskopie eine Laserenergie zur Depopulation notwendig ist, die um mehrere Größenordnungen über der Intensität herkömmlicher konfokaler Mikroskope liegt und der dadurch entstehenden Phototoxizität für lebende Objekte. Die hohen Laserintensitäten führen des Weiteren dazu, dass die Photozerstörung der Farbstoffe sehr hoch ist. Ein Puffer, bestehend aus Reduktions- und Oxidationsmitteln, ist jedoch in der Lage, die Photozerstörung zu minimieren.

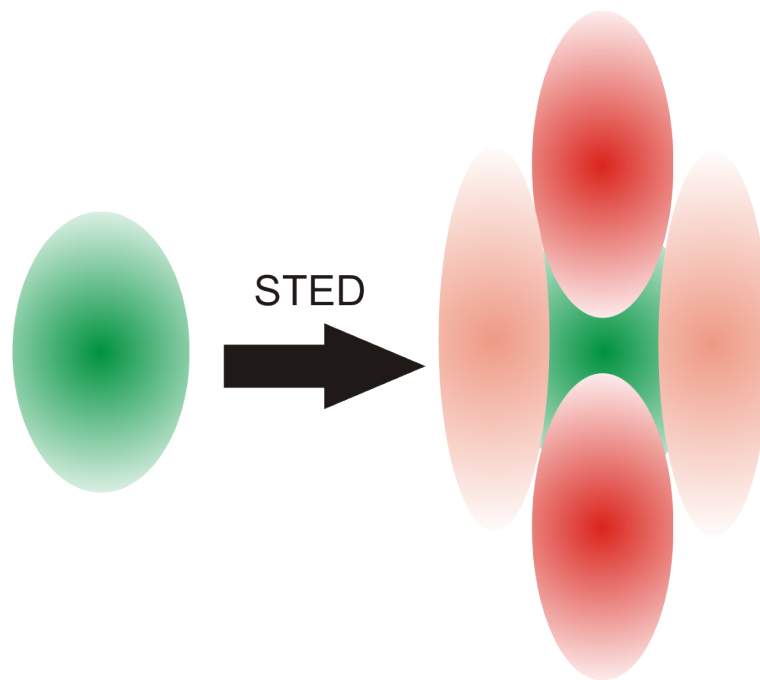


Abbildung 1.23.: Strahlprofil eines STED-Mikroskops. Zunächst wird ein fokales Volumen bei dem Absorptionsmaximum des Farbstoffes angeregt, innerhalb der Fluoreszenzlebensdauer wird ein STED-Laserpuls in Donut-Form über den fokalen Spot gelegt.

1.6. Lokalisationsmikroskopie

Neben der STED-Mikroskopie haben sich eine weitere Klasse von Hochauflösungsmikroskopiemethoden etabliert, die sich unter dem Oberbegriff der Lokalisationsmikroskopie zusammenfassen lässt. Anders als bei STED basieren die Ansätze der Lokalisationsmikroskopie nicht auf einem konfokalen Mikroskop, sondern auf Verfahren wie der Weitfeld- oder der TIRF-Mikroskopie. Alle Methoden, die sich der Lokalisationsmikroskopie bedienen, basieren auf dem Konzept, dass die Punktabbildungsfunktion (Point-Spread Function, PSF) eines Fluorophores eine große Halbwertsbreite besitzt, das Maximum dieser Funktion jedoch sehr genau lokalisiert werden kann (vgl. Formel 1.9) [22, 96, 97]. Eine Punktabbildungsfunktion kann, obwohl sie durch eine Bessel-Funktion dargestellt werden kann, durch andere Funktionen angenähert werden. So ist es meist einfacher und schneller die PSF durch ein Gauß-Kurve anzunähern (vgl. Abbildung 1.24). Obwohl andere Ansätze denkbar sind, ist die Annäherung durch einen 2D-Gauß-Fit am sinnvollsten, um das Zentrum der PSF zu bestimmen (vgl. Formel 1.57) [98, 99].

$$g_{\sigma}(x, y) := A_1 e^{-\frac{x^2+y^2}{2s^2}} \quad (1.57)$$

A_1 gibt die Amplitude der Gauß-Glocke an und s die Standardabweichung vom Maximum, die Halbwertsbreite (Full Width at Half Maximum, FWHM) der Normalverteilung ergibt sich somit zu $\text{FWHM} = 2s\sqrt{2} \cdot \ln 2$. Da die Punktabbildungsfunktion jedoch in anderen Worten ausgedrückt das Summenbild vieler einzelner Ereignisse ist, spricht die Summe vieler Photonen die auf dem Detektor wechselwirken, muss auch in Betracht gezogen werden, wie die Lokalisationsgenauigkeit des Fluoreszenzmaximums und die Anzahl der detektierten Photonen korrespondieren. Ein anderer wichtiger Parameter, der zu beachten ist, um eine PSF mathematisch anzunähern, ist die Pixelgröße. Nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem muss ein Signal mindestens mit der doppelten Frequenz abgetastet werden, um das zu Grunde liegende Signal zu rekonstruieren. In der Praxis hat sich allerdings statt dem Faktor 2, wie er von Shannon vorgeschlagen wurde [100], ein Faktor 2,2 als Multiplikator für die Abtastrate durchgesetzt. Dadurch, dass der Multiplikator über dem von Shannon als notwendig bewiesenem Wert liegt, ist es möglich, Signale, die einem stärkeren Rauschen unterliegen, überabzutasten und somit besser zu rekonstruieren. Wendet man das gleiche Prinzip an, um zu berechnen, wie die Pixelgröße d_{Pixel} einer CCD-Kamera gewählt werden muss, um eine PSF korrekt abzutasten, ergibt sich:

$$d_{\text{Pixel}} \leq \frac{d_{\min}}{2,2} = \frac{\lambda}{2,2 \cdot 2\text{NA}} \approx \frac{\lambda}{4,5 \cdot \text{NA}} \quad (1.58)$$

Um also eine Auflösung zu erreichen, die es ermöglicht PSFs korrekt anzunähern, muss für ein Mikroskop mit einem modernen Ölimmersionsobjektiv und Licht im sichtbaren Spektrum eine Pixelgröße von 70 – 110 nm gewählt werden.

Das zweite Kriterium, welches die Güte angibt, mit der eine PSF angenähert werden kann, ist die Anzahl der detektierten Photonen. Der Standardfehler des Mittelwerts der Maxima einer Gauß-Glocke in einer Dimension, $\langle(\Delta x)^2\rangle$, ist gegeben durch:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2}{N} \quad (1.59)$$

s gibt die Standardabweichung der Gauß-Kurve und N die Anzahl der detektierten Photonen an. Da die Pixel des Detektors eine gewisse Größe a haben, lässt sich nicht feststellen, wo genau in einem Pixel ein Photon detektiert wurde, dadurch wird diese Formel um einen Fehler für die Pixelgröße erweitert zu:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} \quad (1.60)$$

Der Faktor $a^2/12$ stammt dabei aus der Annahme, dass auf der Fläche eines Pixels die Detektionswahrscheinlichkeit konstant verteilt ist und $a^2/12$ ist die Varianz einer Rechtecksfunktion mit einer Breite a . Dieser Effekt wird als *Mosaik-Effekt* bezeichnet. Um auf Grund dieser Basis eine Gaußkurve an eine Photonenverteilung anzunähern, eignet sich die Methode der kleinsten Quadrate, d. h. dass Formel 1.61 minimiert werden soll.

$$\chi^2(x) = \sum \frac{(y_i - N_i(x))^2}{\sigma_i^2} \quad (1.61)$$

Hier gibt y_i die Photonenzahl am Pixel i an und N_i gibt den Erwartungswert der detektierten Photonen einer Leuchtquelle, die sich bei x befindet, an.

$$\sigma_i^2 = N_i(x) + b^2 \quad (1.62)$$

Die Varianz σ_i^2 berechnet sich aus der Summe des Photonendetektionsrauschens b und der Anzahl der erwarteten Anzahl an Photonen N_i . Der Rauschparameter b fasst dabei alle Rauschquellen zusammen: Das Detektorrauschen, auf Grund der elektronischen Schaltkreise im Detektor und das Hintergrundrauschen, welches auf statistisch verteilten Photonen, die nicht von der Lichtquelle emittiert werden, basiert. Da die Methode der kleinsten Quadrate verwendet werden soll, gilt: $d\chi^2/dx = 0$. Es wird Formel 1.61 differenziert und gleich 0 gesetzt. Mit $\Delta x = x - x_0$ folgt:

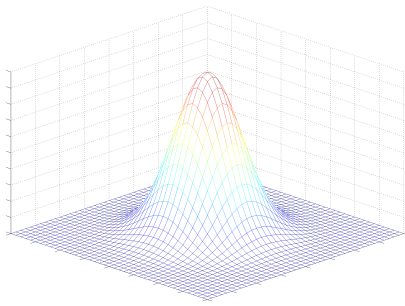
$$\Delta x = - \frac{\sum \frac{\Delta y_i N'_i}{\sigma_i^2} \overbrace{\left(1 - \frac{\Delta y_i}{2\sigma_i^2}\right)}^{\Delta y_i \rightarrow 0 \quad 1}}{\sum \frac{N_i'^2}{\sigma_i^2} \underbrace{\left(1 - \frac{\Delta y_i}{\sigma_i^2}\right)}_{\Delta y_i \rightarrow 0 \quad 1}} \quad (1.63)$$

Der Fehler an detektierten Photonen kann als relativ klein angenommen werden, wodurch der letzte Term aus Zähler und Nenner herausfällt. N'_i ist die Ableitung von N_i bei x_0 und $\Delta y_i = N_i(x_0) - y_i$. Daraus folgt die mittlere quadratische Abweichung zu:

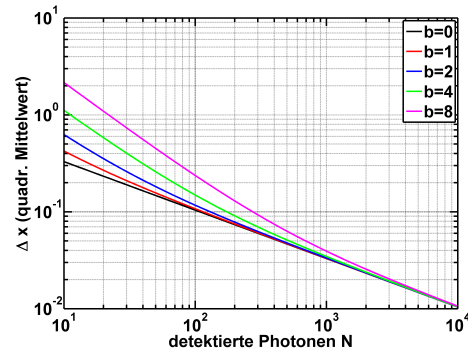
$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{1}{\sum(N_i'^2/\sigma_i^2)} \quad (1.64)$$

Nähert man die Anzahl der zu erwartenden Photonen im Pixel i über eine Gaußverteilung an (vgl. Formel 1.57), lässt sich diese mit Formel 1.65 schreiben:

$$N_i = \frac{N}{\sqrt{2\pi}s} e^{-i^2/2s^2} \quad (1.65)$$



(a) Die Gauß-Glocke bietet eine gute Näherung für eine PSF.



(b) Abhängigkeit der Lokalisationsgenauigkeit von der Anzahl detektierter Photonen für unterschiedliche Rauschstärken b .

Abbildung 1.24.: Gauß-Kurve und Lokalisationsgenauigkeit

Als Gesamtausdruck für die mittlere quadratische Abweichung folgt durch Einsetzen von Formel 1.65 in Gleichung 1.62 und dem weiteren Einsetzen des Gesamtausdrucks in Gleichung 1.64:

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \underbrace{\frac{s^2 + a^2/12}{N}}_{\text{Mosaikeffekt}} + \underbrace{\frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}}_{\text{Photonenrauschen}} \quad (1.66)$$

Der zweite Term folgt dabei durch das Ersetzen der Summe in Gleichung 1.64 durch ein Integral. Die Berechnung für den zwei-dimensionalen Fall führt lediglich zu einer leichten Modifikation von Formel 1.66:

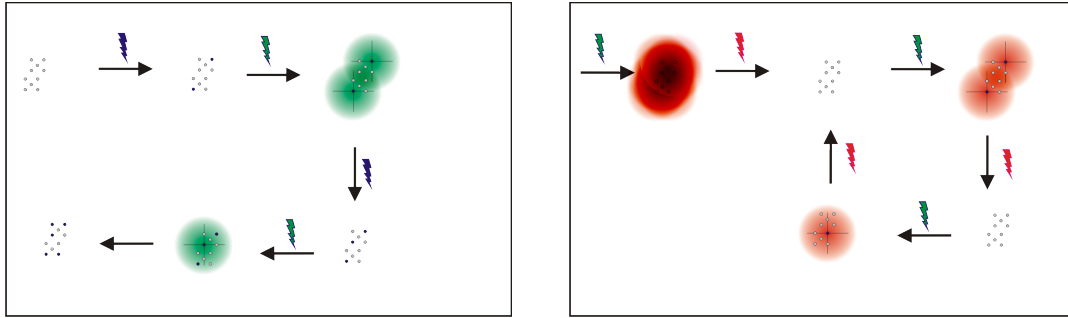
$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \underbrace{\frac{s^2 + a^2/12}{N}}_{\text{Mosaikeffekt}} + \underbrace{\frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2}}_{\text{Photonenrauschen}} \quad (1.67)$$

Bei hohen Photonenzahlen N wird also der erste Term dominant und die Lokalisationsgenauigkeit ist proportional zu $1/\sqrt{N}$. Sind die Photonenzahlen aber niedrig, ist der zweite Term dominant und die Genauigkeit ist umgekehrt proportional zu N (vgl. Abbildung 1.24) [97]. Ein Fluorophor kann also bei ausreichend emittierten Photonen genau genug lokalisiert werden, um Auflösungen im Bereich einiger Nanometer zu erreichen. In der Mikroskopie von biologischen Proben ist es jedoch selten der Fall, dass einzeln lokalisierte Farbstoffe vorliegen. Zumeist handelt es sich um mehrere 10 bis hin zu einigen 100 Farbstoffen, deren PSFs sich superpositionieren und im Gesamtbild zur Fluoreszenz beitragen. In einem solchen Fall bieten verschiedene Methoden Ansätze, um trotzdem das beschriebene Prinzip benutzen zu können.

1.6.1. Lichtgetrieben

Zwei Methoden der Lokalisationsmikroskopie, die auf lichtgetriebenen Mechanismen beruhen, sind besonders verbreitet - die Lokalisationsmikroskopie durch Photoaktivierung (Photo-Activated Localization Microscopy, PALM) und die stochastische Rekonstruktionsmikroskopie (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM).

Beide Methoden wurden nahezu zeitgleich entwickelt und obwohl sie sich sehr ähnlicher mathematischer Verfahren bedienen, ist die Grundidee unterschiedlich. So basieren beide Methoden darauf, dass mit Hilfe eines Mikroskops Farbstoffe auf eine CCD-Kamera abgebildet werden. Über einen den Methoden eigenen Mechanismus wird dabei erreicht, dass jeweils nur einige wenige Farbstoffe Fluoreszenz emittieren können, deren Position über die PSF sehr genau bestimmt werden kann. Das Zentrum der Fluoreszenz wird anschließend in ein rekonstruiertes Bild eingetragen. Sequentiell werden anschließend andere Farbstoffe abgebildet, bis die Position von genügend Fluoreszenzemittern lokalisiert wurde. Schließlich werden in dem rekonstruierten Bild die Häufigkeiten gezählt, wobei die *Pixel*-Anzahl des rekonstruierten Bildes zumeist um einen Faktor 10 höher ist als die Ursprungsdaten. PALM basiert auf der Photoaktivierung von photoaktivierbaren fluoreszenten Proteinen (pa-FP). Einer der ersten Vertreter dieser Gruppe Farbstoffe und auch eines der am häufigsten verwendeten Proteine ist *Dronpa*. Dieser Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass er mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon = 95000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und einer Quanteneffizienz von $\Phi = 0,85$ für ein Protein extrem hell ist. Dronpa lässt sich durch Einstrahlen von Licht mit einer Wellenlänge von 390 nm aus einem nicht-fluoreszenten Zustand in einen fluoreszenten Zustand anregen. Sobald sich Dronpa in einem fluoreszenten Zustand befindet, kann das Protein in seinem Absorptionsmaximum Licht mit $\lambda_{Ab} = 503 \text{ nm}$ absorbieren mit einem Emissionsmaximum von $\lambda_{Fl} = 517 \text{ nm}$. Neben Dronpa wurden inzwischen mehrere andere pa-FPs entwickelt, die alle eine Absorption zwischen 500 und 580 nm aufweisen. Die Emissionsbanden weisen eine Stokes-Verschiebung von ca. 20 nm zu den Absorptionsspektren auf [62, 101–104]. PALM nutzt diese Photoaktivierbarkeit der Proteine aus, indem aus einem Anfangszustand, in dem alle Proteine ausgeschaltet sind, durch Bestrahlung mit UV-Licht einer geringen Intensität eine kleine Subpopulation an Molekülen in den fluoreszenten Zustand gebracht wird. Die Moleküle sind stochastisch verteilt und wenn die Intensität des Laserpulses gering genug gewählt ist, sollten so wenig Farbstoffe fluoreszieren, dass die einzelnen PSFs nicht überlappen. Durch Bestrahlen mit einer Laserwellenlänge bei λ_{Ab} werden die Farbstoffe angeregt und die Fluoreszenzmaxima können lokalisiert werden. Die Proteine werden so lange bestrahlt, bis alle aktiven Proteine photozerstört sind. Anschließend werden weitere neue Aktivierungs-/Abbildungszyklen durchlaufen. Diese Zyklen werden so oft wiederholt, bis die Auftragung der Fluoreszenzmaxima die Struktur der Probe ausreichend genau wiedergibt, oder bis alle Proteine photozerstört sind (vgl. Abb. 1.25) [105, 106]. Der andere photoinduzierte Mechanismus, STORM, basiert nicht auf der Aktivierung und der anschließenden Photozerstörung der Farbstoffe, sondern vielmehr auf dem reversiblen Schalten der Farbstoffe zwischen einem hellen und einem dunklen Zustand. Bei STORM wird ein Konstrukt bestehend aus zwei Fluorophoren, beispielsweise aus Cy 5 und Cy 3, benutzt, um den geeigneten Farbstoff, in diesem Beispiel Cy 5, zwischen einem fluoreszenten und einem nicht-fluoreszenten Zustand zu schalten. Der Schaltvorgang des Farbstoffes in den gelöschten Zustand geschieht mit der gleichen Wellenlänge, die auch benutzt wird, um den Farbstoff anzuregen, lediglich die Laserintensität ist geringfügig höher. Die Reaktivierung des Farbstoffes geschieht über Anregung der Probe mit einem grünen Laser, der Farbstoff Cy 3 dient als Aktivierungsunterstützung für Cy 5 [107–109]. Parallel zu STORM wurde eine sehr ähnliche Methode entwickelt bei der das gleiche Prinzip verwendet wird, direct STORM (dSTORM). Bei dSTORM wird, anders als bei STORM, auf die Aktivierungsunterstützung durch einen zweiten



(a) Bei PALM werden der Reihe nach alle pa-FPs aktiviert und dann abgebildet und photozerstört. Der Prozess ist nicht reversibel, so dass jedes Protein nur einmal abgebildet wird.

(b) Bei STORM werden die Farbstoffe stochastisch und reversibel zwischen den beiden Zuständen geschaltet. Der Vorgang lässt sich sehr oft wiederholen.

Abbildung 1.25.: PALM und STORM Schemata im Überblick.

Farbstoff verzichtet, stattdessen wird Licht sehr hoher Intensität verwendet, um den Farbstoff zu reaktivieren (200x höher als bei STORM) (vgl. Abb. 1.25) [110, 111]. Es gibt sehr viele Farbstoffe, die sich für STORM und dSTORM eignen [112–115]. Ihre photophysikalischen Eigenschaften sind besser als die der pa-FPs und sie sind um ca. einen Faktor 5 kleiner als die größeren Proteine. Die Proteine hingegen bieten stattdessen den Vorteil, dass sie direkt in Zellen exprimiert werden können und nur einmal gemessen werden, bevor sie photozerstört werden. Dies ermöglicht nicht nur die Lokalisation von Proteinen, sondern auch das Zählen dieser Proteine [101–103]. Wie bereits mehrfach erwähnt, basieren diese Methoden auf der Verwendung von zusätzlichen Laserlinien und erhöhten Laserintensitäten (vgl. Tab. 1.3). Dies vergrößert den technischen Aufwand, um nanoskopische Bilder zu erzeugen und erschwert von vornherein die Anwendung der Methoden an lebenden Organismen, da hohe Lichtdosen toxisch auf Zellen wirken [116]. Die Phototoxizität kann dazu führen, dass Zellen bei der Mikroskopie, auf Grund des durch die Strahlung induzierten Zelltods, unnatürliche Reaktionen zeigen und somit zur Messung von Artefakten beitragen. Unabhängig

Methode	Farbstoff	λ_1	I_1	λ_2	I_2
STORM	Cy3 & Cy 5	633 nm	30 W/cm ²	532 nm	1 W/cm ²
dSTORM	Alexa647 & Cy 5	647 nm	15 mW	514 nm	0,25 mW
PALM	Kaede	561 nm	0,2 – 2 mW	405 nm	0,04 – 4 mW

Tabelle 1.3.: Gegenüberstellung typischer Laserlinien und Intensitäten in photogetriebenen Lokalisationsmikroskopiemethoden [105, 108, 110]

von dem Mechanismus des Schaltens ist es offensichtlich, dass ein kritischer Parameter bei der Abbildung von dichten Strukturen das Verhältnis zwischen der Länge des fluoreszenten Status τ_{an} und der Länge des dunklen Zustandes τ_{aus} ist. Je größer man $\frac{\tau_{aus}}{\tau_{an}}$ wählt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einzelne fluoreszierende Farbstoffe innerhalb der Ausdehnung einer PSF zu haben und desto höher ist die Qualität einer hochauflösenden Rekonstruktion der Fluoreszenzzentren. Simulationen und Vergleiche zwischen Aufnahmen mit unterschiedlichen Markierungsdichten zeigen, dass ein Ver-

hältnis zwischen 100 und 500, je nach Struktur, einen sehr guten Wert für $\frac{\tau_{aus}}{\tau_{an}}$ darstellt [117].

Für die Lokalisation der Punktabbildungsfunktionen wurden während der letzten Jahre verschiedene Computeralgorithmen entwickelt, die unabhängig von der Methode sind [106, 118, 119]. Eine besondere Herausforderung an die Algorithmen besteht darin, Punktabbildungsfunktionen zu lokalisieren, wenn die Daten verrauscht sind oder zwei PSFs sehr dicht beieinander liegen. Durch Modifikationen der Mikroskope ist es auch möglich Informationen über die axiale Position von Farbstoffen zu erhalten. Die Information über die z-Position des Fluorophores ist dabei in der Verzerrung der Punktabbildungsfunktion enthalten. Wird das Fluoreszenzlicht eines Moleküls auf einem Chip gesammelt, zeigt sich die Defokussierung in einer Erhöhung des Durchmessers der PSF. Anhand des Durchmessers eines Moleküls lässt sich zwar der Abstand von der fokalen Ebene abschätzen, aber die Richtung, in der sich das Molekül befindet, ist unklar. Wird eine zylindrische Linse in den Detektionsstrahlengang eines Mikroskops zwischen Objektiv und Detektor eingebracht, führt dies zu einer Verzerrung der PSF in eine Ellipse (vgl. Abb. 1.26).

Um die Asymmetrie der Punktabbildungsfunktion in die Lokalisation mit einzubeziehen, wird eine asymmetrische Gaußkurve zur Beschreibung der PSF verwendet:

$$g(x, y) = A_1 e^{-2\frac{(x-x_0)^2}{d_x^2} - 2\frac{(y-y_0)^2}{d_y^2}} + b \quad (1.68)$$

A_1 beschreibt die Amplitude des Maximums bei (x_0, y_0) und b einen linearen Versatz auf Grund des Rauschens. Die Ausdehnung der Punktabbildungsfunktion kann über eine Defokussierungs-Funktion beschrieben werden [109]:

$$d_{x,y}(z) = d_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{\text{dof}}\right)^2 + A \left(\frac{z-c}{\text{dof}}\right)^3 + B \left(\frac{z-c}{\text{dof}}\right)^4} \quad (1.69)$$

Die Tiefenschärfe (Depth of Focus, dof) gibt die Lokalisationsgenauigkeit in axialer Richtung an, c gibt die Distanz zu der als zentral definierten Fokalebene an. d_0 beschreibt die Breite der Gaußkurve in der Fokalebene, also wenn $d_x = d_y$ gilt. Die beiden hinteren Terme unter dem Bruch dienen dazu, Artefakte, die durch hohes Rauschen und ungewollte Verzerrungen der PSF entstehen, zu korrigieren.

Die Ausdehnung der Ellipse im Sinne von $\frac{d_x}{d_y}$, dem Verhältnis des Durchmessers in x-Richtung zu dem des Durchmessers in y-Richtung, ist abhängig von der Richtung, in der die Fokalebene liegt. So gilt für die Ausdehnung der verzerrten PSF zweier Fluorophore die äquidistant über und unter der Fokalebene liegen (vgl. Abb. 1.26) [87, 109, 120, 121]:

$$\frac{d_x}{d_y}(\text{PSF}_{+z}) = \frac{d_y}{d_x}(\text{PSF}_{-z}) \quad (1.70)$$

1.6.2. Alternative Mechanismen

Wie bereits am Beispiel von STORM und PALM deutlich wird, handelt es sich bei der Gruppe der Lokalisationsmikroskopiemethoden, um die Aneinanderreihung von zwei unabhängigen Prozessen. Der erste zu Grunde liegende Mechanismus ist das *Schalten*

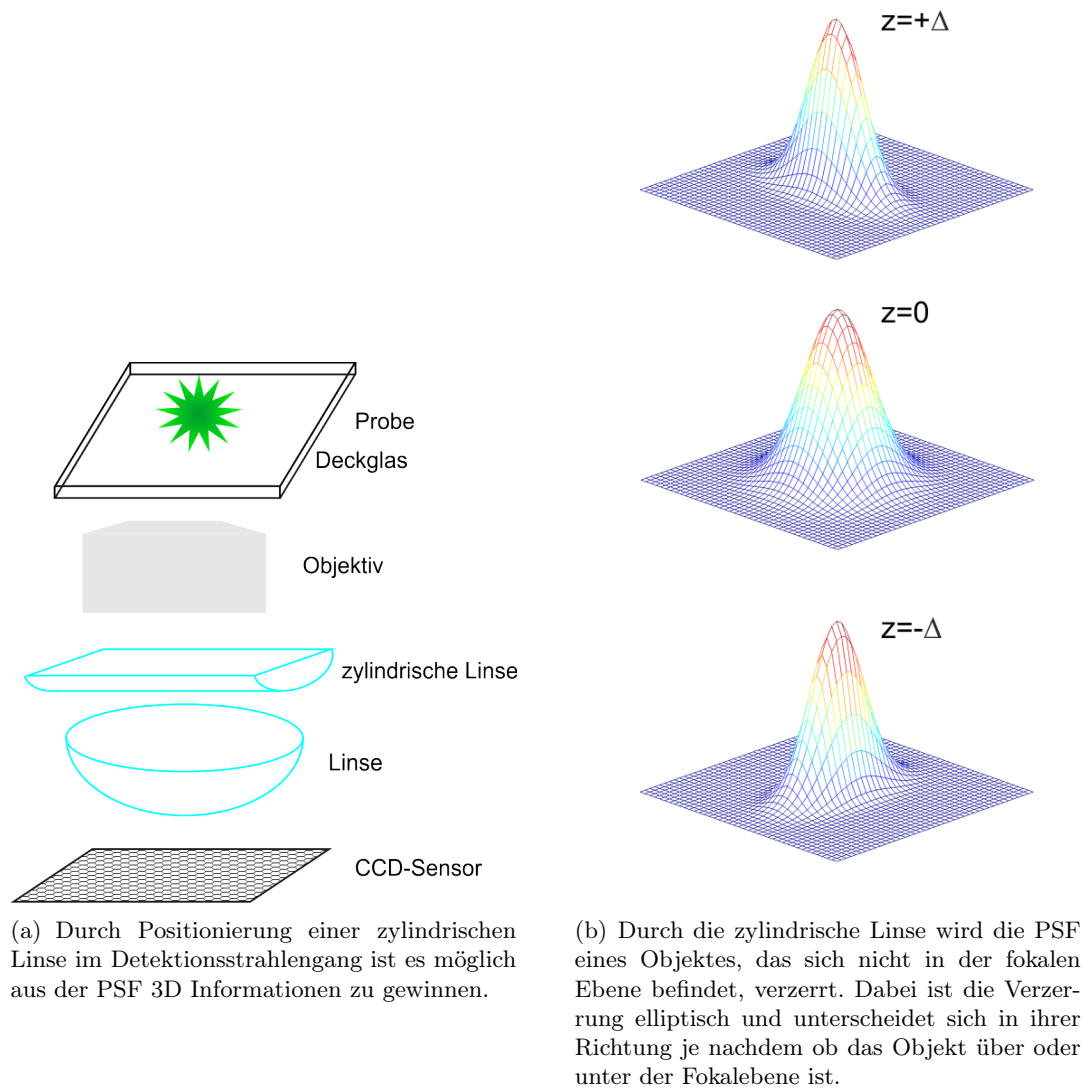


Abbildung 1.26.: 3D Mikroskopie in Verbindung mit Lokalisationsmikroskopie.

der Probe zwischen einem hellen und einem dunklen Zustand, der zweite, unabhängig von diesem Prozess, eine Rekonstruktion des Mikroskopiebildes. Da oftmals die Nutzung von zusätzlichen Laserlinien und/oder hohen Intensitäten besondere Anforderungen an das Mikroskop stellt, ist es interessant Mechanismen zum Schalten von Fluoreszenzemittern zu entwickeln, die unabhängig von der Einstrahlung von Licht sind. Da sowohl bei STORM als auch bei PALM Intensitäten benutzt werden, die über der notwendigen Leistung liegen, um einzelne Moleküle abzubilden, führt die Erhöhung der eingestrahlenen Photonen zu einer Zunahme der Hintergrundfluoreszenz. Das wiederum hat Einfluss auf die Genauigkeit mit der die PSFs lokalisiert werden können (vgl. Abb. 1.24). In den letzten Jahren wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, um die Problematik des Photoschaltens zu umgehen. So wurde beispielsweise im Jahr 2005 versucht die intrinsischen photophysikalischen Eigenschaften der Quantendots zu benutzen. Viele Quantendots haben die Eigenschaft, dass sie nicht konstant Photonen emittieren, sondern eine zeitliche Verteilung an hellen und dunklen Zuständen besitzen [122–124]. Dieses Verhalten wird gemeinhin als *Blinken* bezeichnet. Mit Hilfe dieser interessanten Eigenschaft wurde versucht eine Lokalisationsmikroskopiemethode zu etablieren, die unabhängig von der eingestrahlenen Leistung ist [125]. Obwohl Quantendots im *An*-Zustand sehr hell sind und sich somit sehr gut lokalisieren lassen, ist es schwierig die Kinetik zwischen den beiden Zuständen so zu beeinflussen, dass es möglich ist, dichte Strukturen zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurden noch weitere Mechanismen vorgeschlagen, die denkbar sind. Ein Ansatz beruht auf Ausnutzung des Photoinduzierten Elektronentransfers, der zwischen einem Farbstoff und der Nukleinsäure Guanin stattfinden kann. Dieser Mechanismus wird beispielsweise für die Entwicklung von *Smart Probes* ausgenutzt, kurzen DNA Strängen, die eine Haarnadel-Struktur ausbilden und dadurch PET zwischen Farbstoff und Guanin ermöglichen [126, 127]. In diesem Fall muss jedoch das System, an dem Farbstoff und Base untergebracht sind, sehr sorgfältig gewählt werden, da die End-zu-End Kontaktformationskinetik von der Sequenz und Länge der DNA, und damit der Schmelztemperatur, der Umgebungstemperatur, Ionenkonzentration und der Viskosität des Lösungsmittels abhängt. Die zu Grunde liegende Kinetik ist jedoch zu schnell für lokalisationsmikroskopische Analysemethoden. Durch Modifikation des Systems, um statt einer Haarnadel eine *Holliday-Junction* zu benutzen und anstatt dem PET den FRET Mechanismus, ließe sich die Zeitskala der Kinetiken in brauchbare Zeitbereiche portieren [49, 128]. Das Konstrukt der Holliday-Junction ist jedoch recht groß und die Unterdrückung von Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Junctions bei dicht markierten Proben - auf Grund der hohen Reichweite von FRET - problematisch.

Eine andere Herangehensweise basiert nicht auf der Ausnutzung eines intrinsischen Blinkverhaltens, sondern darauf, dass ein fluoreszentes Molekül an ein Zielprotein bindet und somit zu einer einzelnen Fluoreszenzquelle wird, die das Ziel markiert. Dieses Fluorophor wird dann, im Fall einer irreversiblen Bindung so lange abgebildet, bis es photozerstört ist, oder bei einer reversiblen Bindung, bis es wieder wegdiffundiert. Bei diesem Ansatz kann es jedoch zu Artefakten auf Grund unspezifischer Wechselwirkungen der diffundierenden Fluorophoren in dem Beobachtungsvolumen kommen. Zusätzlich besteht die Problematik, dass durch die vielen freien Farbstoffe die Hintergrundfluoreszenz stark erhöht ist.

Eine andere Möglichkeit basiert auf dem chemischen Schalten von Farbstoffen. So

können hell fluoreszierende Cyanin-Farbstoffe beispielsweise in Hydrocyanine umgewandelt werden, welche keine Fluoreszenz mehr zeigen. Dieser Vorgang kann durch Oxidation wieder rückgängig gemacht werden. Bringt man also die nicht-fluoreszenten Hydrocyanine in Zellen, wäre es möglich, mit Hilfe des natürlichen Metabolismus der Zellen, die Oxidation respektive der Fluoreszenzwiederherstellung, einzelner Cyanine zu beobachten [112].

Denkbar wäre auch die Ausnutzung einer chemischen Reaktion im thermischen Gleichgewicht, die einen Farbstoff zwischen einem hellen und einem dunklen Zustand schaltet. Als ein Modellsystem können chemische Ionen-Sonden betrachtet werden. Dabei wird durch die Bindung eines sondenspezifischen Ions entweder die Fluoreszenz der Sonde hergestellt oder gelöscht. Die Bindungsenergie hängt dabei vom pH-Wert der Lösung und der Temperatur sowie vom Chelat und dem zugehörigen Ion ab. Es wurden in den letzten Jahren mehrere Sonden entwickelt, die sensitiv auf die Anwesenheit von Ionen reagieren [129, 130]. Es wurde gezeigt, dass eine Sonde, deren chromophores System ein Tetramethylrhodamin ist (TMR) und ein Bipyridin (BiPy) als Chelat funktioniert, sehr sensitiv auf die Anwesenheit von Kupfer-Ionen reagiert. Durch Zugabe von Kupfersulfat in einer Größenordnung von 0,1 μM ist es möglich eine Fluoreszenzlöschung zu beobachten. Bei der Untersuchung der Fluoreszenz auf Einzelmolekülebene wurde anschließend festgestellt, dass die Fluoreszenz einer einzelnen Sonde nicht komplett gelöscht ist, sondern dass Fluoreszenzfluktuationen auf einer Zeitskala von Millisekunden bis hin zu Sekunden auftreten [131, 132]. Basierend auf der Kenntnis der Zeitskala der Kinetik dieser Sonde wurde im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit evaluiert, chemisch getriebene Sonden zur Lokalisationsmikroskopie einzusetzen. Als Ausgangsgerüst diente dabei die bekannte Sonde aus BiPy und TMR, die unter Kupferzugabe reversibel gelöscht wird.

Die Mechanismen, die bei dieser Sonde die Zustände kontrollieren, sind zum einen die Bindungsenergie zwischen Chelaten und Ion, die Diffusionsrate und Konzentration der freien Ionen, und damit einhergehend die Stoßwahrscheinlichkeit, und die Wechselwirkung zwischen Farbstoff und dem Komplex aus Chelat und Ion. Allgemein lässt sich das Prinzip der chemischen Sonden für die Lokalisationsmikroskopie stark verallgemeinern, so dass sowohl Farbstoff als auch Ligand und Ion durch andere Komponenten substituiert werden können. Die Effizienz der Fluoreszenzlöschung und die Zeitskala der Fluktuationen sind jedoch sehr anfällig gegenüber Veränderungen an der Sonde.

2. Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Limitierungen der Lokalisationsmikroskopie sollte in dieser Arbeit die Möglichkeit der Anwendung von chemisch schaltbaren Sonden evaluiert werden. Der erste Schritt, um Sonden für eine solche Art der Hochauflösungsmikroskopie zu entwickeln, besteht in der Charakterisierung der Sonde bezüglich des Fluoreszenzverhaltens. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sonde, basiert dabei auf einem von Dr. A. Kiel entwickelten Design und reagiert mit einer Löschung der Fluoreszenz auf die Zugabe von Kupfersulfat [131, 132]. Deshalb sollte zunächst anhand von Ensemblesmessungen die Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der Kupferkonzentration bestimmt werden. Da in Ensembledaten keine Informationen über das Verhalten von einzelnen Farbstoffen zugänglich sind, sollte, basierend auf den Ergebnissen aus den Ensembledaten, mit Hilfe von Einzelmolekülspektroskopischen Methoden, ein Verständnis über die Fluoreszenzfluktuation, die mit der Löschung einhergeht, gewonnen werden. Die Grundvoraussetzung, um solche Messungen durchführen zu können, ist ein Einzelmolekülsensitives Mikroskop. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit ein TIRF-Mikroskop so erweitert werden, dass es für die Lokalisationsmikroskopie geeignet ist. Dazu zählt, aufbauend auf der Theorie aus Kapitel 1.6, die Definition einer bestimmten Pixel-Größe, das Bestimmen der charakteristischen Eindringtiefe des evaneszenten Feldes für die TIRF-Mikroskopie und die Berechnung der theoretischen Lokalisationsgenauigkeit sowie die experimentelle Validierung dieser Genauigkeit. Um die Eignung der chemisch schaltbaren Sonde im Rahmen der Lokalisationsmikroskopie zu bestätigen, sollte schließlich ein biologisches Ziel markiert und durch eine Lokalisationsanalyse hoch aufgelöst werden. Voraussetzungen für die Möglichkeit die Sonde in einer biologischen Probe zur Anwendung zu bringen, ist die Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Markierung. Deswegen sollten zusätzlich in dieser Arbeit Simulationen und Messungen durchgeführt werden, um ein geeignetes Markierungsprotokoll zu entwickeln.

Des Weiteren war es Ziel eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Sonde für die optische Fernfeldmikroskopie zu evaluieren, die aberrationsfreie Zwei-Kanal Mikroskopie. Dazu sollten zwei unterschiedliche Proben, die aber mit dem gleichen Farbstoff markiert sind, über die Ausnutzung der chemischen Schaltung, zeitlich voneinander getrennt, abgebildet werden. Dies sollte über die gezielte Zugabe von Kupfer und anschließende Zugabe eines stärkeren Komplexbildners, um das Kupfer zu entfernen, erreicht werden.

3. Experimente & Ergebnisse

Im Folgenden gehe ich zunächst auf Fragen der Charakterisierung der Sonde, in Bezug auf die photophysikalischen Eigenschaften, ein. Die erste Charakterisierung erfolgt anhand von Daten, die mit Ensemblemessungen gewonnen werden können. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Bestimmung der Fluoreszenzlöschung wichtig. Anschließend werde ich auf den Aufbau eines Einzelmolekülsensitiven Mikroskops eingehen, mit dessen Hilfe Messungen durchgeführt wurden, um tiefere Informationen über die Fluoreszenzlöschung der Sonde zu gewinnen. Hierbei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, die Fluoreszenzfluktuationen, die durch die Komplexierung von Kupfer auftreten, zu charakterisieren. Im nächsten Schritt wird gezeigt, dass die Sonde geeignet ist, um Lokalisationsmikroskopie an biologischen Proben zu betreiben. Unabhängig von der Lokalisationsmikroskopie, wird die Anwendung der Sonde zur aberrationsfreien Mikroskopie, ebenfalls in biologischen Proben, gezeigt. Abschließend wird noch gezeigt, dass der Einfluss von Kupfersulfat für die Überlebensfähigkeit von in Kultur gehaltenen Zellen keine negative Rolle spielt.

3.1. Der Aufbau der chemisch schaltbaren Sonde

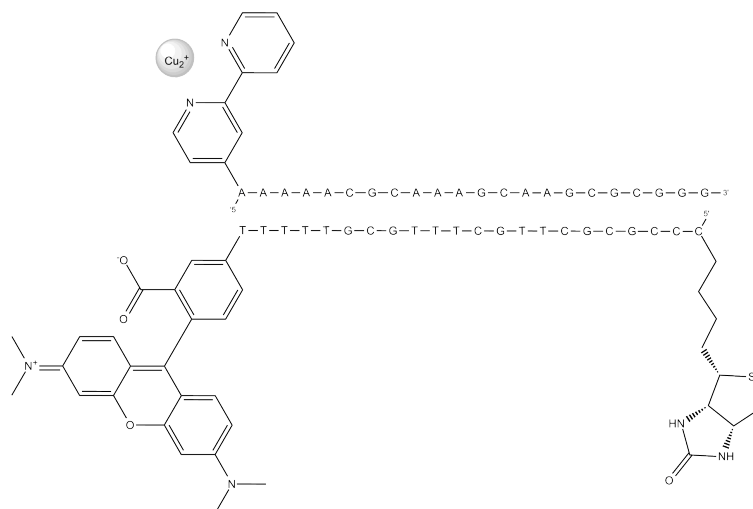


Abbildung 3.1.: Schema des Sondendesigns. Die Sonde basiert auf einer doppelsträngigen DNA. Der obere Strang trägt ein Bipyridin am 5'-Ende, der komplementäre ein Tetramethylrhodamin am 3'-Ende und zusätzlich ein Biotin am 5'-Ende.

Die Sonde ist wie folgt aufgebaut: Als Grundgerüst dient eine doppelsträngige DNA, bestehend aus 22 Basenpaaren. Die Schmelztemperatur der vollständig hybridisierten

DNA liegt laut theoretischen Berechnungen bei 64 °C [133]. Die Sequenz wurde so gewählt, dass eine möglichst hohe Schmelztemperatur erreicht wird und es wurde darauf geachtet, dass kein Guanin in den ersten fünf Basenpaaren vom Farbstoff enthalten ist, um mögliche Interaktionen zwischen Farbstoff und Aminosäure auszuschließen [30]. In Abbildung 3.1 ist der Aufbau der Sonde detailliert dargestellt. Der obere Strang trägt am 5'-Ende einen 4,4'-Dicarboxy-2,2'-Bipyridin (BiPy) Liganden, der in der Lage ist, Cu^{2+} -Ionen zu komplexieren (ssO-L, einzelsträngiges Oligonukleotid mit Ligand). Der untere Strang ist am 3'-Ende mit einem Tetramethylrhodamin (TMR) markiert, der über eine Änderung der Fluoreszenz auf die Komplexbildung eines Kupfer-Ions durch den Chelaten reagiert (ssO-F, einzelsträngiges Oligo mit Farbstoff). Zusätzlich trägt dieses Oligonukleotid ein Biotin am 5'-Ende, um eine Immobilisierung der Sonde an ein Streptavidin zu ermöglichen. Sind beide Stränge hybridisiert, werden sie im Folgenden als dsO-FL (doppelsträngiges Oligonukleotid mit Farbstoff und Ligand) bezeichnet.

Der Löschmechanismus

Da als Ziel dieser Arbeit die Anwendung der Sonde für die Lokalisationsmikroskopie im Vordergrund steht, ist es wichtig, ein Grundverständnis über die vorliegende Fluoreszenzlöschung durch die Bindung von Kupfer zu erhalten. Dabei eignen sich verschiedene Methoden, um Informationen über die Fluoreszenzlöschung zu erhalten. So wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten mithilfe von Lebensdauermessungen gezeigt, dass sich die Fluoreszenzlebensdauer der Sonde bei Erhöhung der Kupferkonzentration nicht verändert [134]. Dieses Verhalten kann mithilfe der Stern-Volmer-Plots aus Abbildung 1.17 analysiert werden und bedeutet, dass es sich bei der Löschung, um eine statische Löschung handelt.

Eine andere Möglichkeit, um den Löschmechanismus zu untersuchen, wurde im Rahmen der gleichen Arbeit verwendet. So wurde gezeigt, dass die Absorptionsspektren nicht von der Komplexbildung von Kupfer beeinflusst werden. Dieses Verhalten belegt, dass die Absorption nicht vom Kupfer beeinflusst wird und somit das TMR ein Photon absorbiert, bevor der Löschmechanismus auftritt. Also erfolgt eine Löschung des Komplexes aus dem angeregten Zustand.

Eine weitere Möglichkeit, den zu Grunde liegenden Löschmechanismus zu analysieren, bieten Computersimulationen. Dazu wurden in Kollaboration mit dem AK Perpointner (Univ. Heidelberg) molekulare Simulationen durchgeführt [154]. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere energetisch günstige Strukturen für den BiPy-TMR-Komplex gefunden werden. Die Struktur aus Abb. 3.2 zeigt das energetisch günstigste Konstrukt unter der Annahme, dass beim Chelaten die beiden Stickstoffatome so ausgerichtet sind, dass sie ein Kupfer-Ion binden können. Der Abstand zwischen beiden Ringsystemen würde bei dieser Struktur etwa 4 – 6 Å betragen. Der geringe Abstand zwischen den Ringsystemen lässt verschiedene Möglichkeiten der Fluoreszenzlöschung zu, so unter anderem auch den photoinduzierten Elektronentransfer. Neben den energetisch sehr günstigen Strukturen im Bereich von unter 10 Å, gibt es auch andere Strukturen bei größeren Abständen, die lokale Energieminima annehmen können. Damit lässt sich das Auftreten von hellen und dunklen Zuständen, wie sie mit zeitkorrelierten Einzelphotonen-Messungen beobachtet werden können, erklären [132].

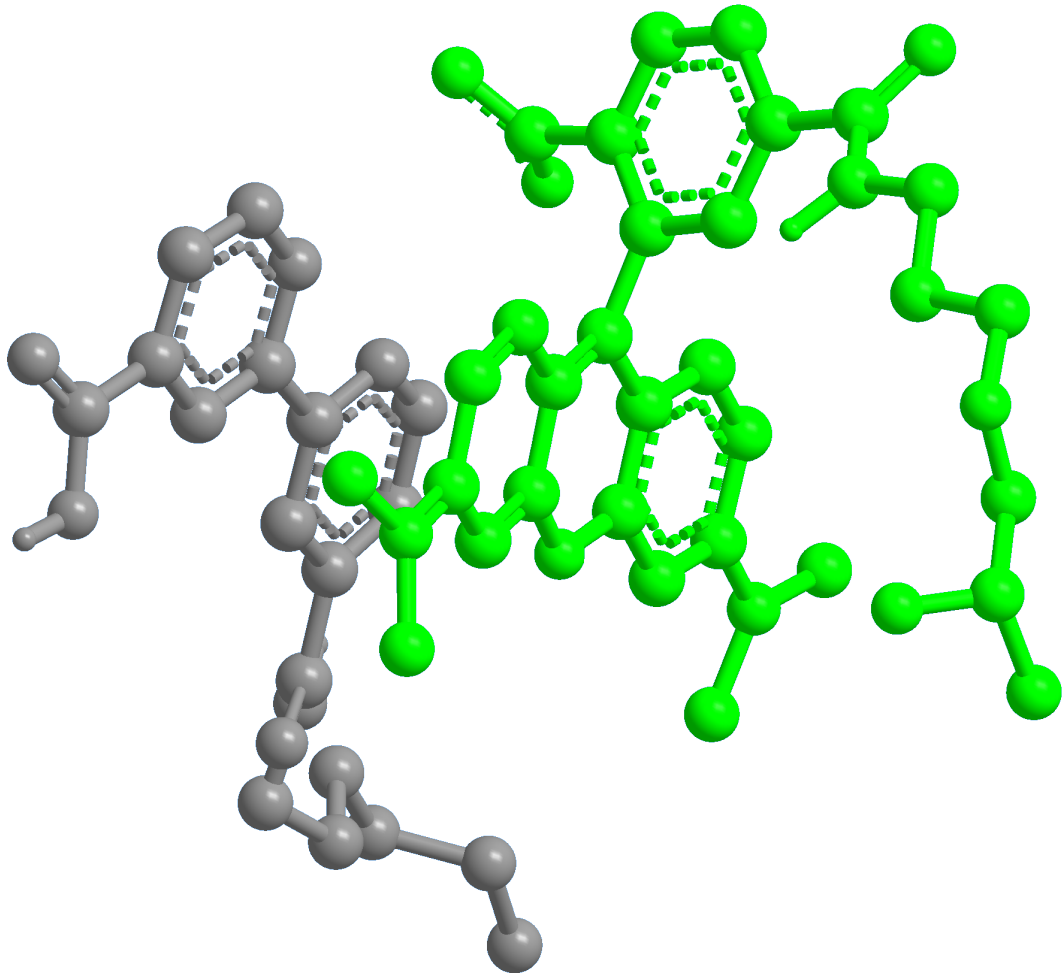


Abbildung 3.2.: Eine günstige Struktur der molekularen Simulationen: Der Abstand zwischen den Ringsystemen des Tetramethylrhodamin (grün) und des Bipyridin (grau) beträgt etwa 6 Å

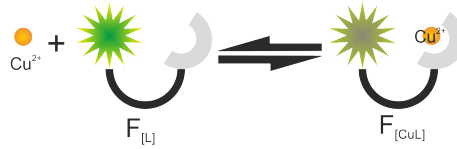


Abbildung 3.3.: Die Fluoreszenz der Sonde kann in guter Näherung durch ein Zweizustandssystem beschrieben werden, das zwischen einem hell-fluoreszierendem Zustand $F_{[L]}$ und einem schwach-fluoreszierendem Zustand $F_{[CuL]}$, der durch die Bindung eines Kupfer-Ions eingenommen wird, wechselt.

3.2. Ensemble-Messungen zur Quantisierung der Fluoreszenzlöschung

Da neben dem Mechanismus der Löschung vor allem die quantitativen Parameter der Fluoreszenzlöschung wichtig sind, wurden verschiedene Ensemble-Experimente durchgeführt. Besonderer Wert wurde in den Ensemble-Messungen auf die Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von der Konzentration an zugegebenem Kupfersulfat gelegt. Bevor jedoch die Fluoreszenzlöschung gemessen wurde, musste ein theoretisches Konstrukt entwickelt werden, das die Fluoreszenzlöschung gut beschreibt. Basierend auf der Stern-Volmer-Theorie (vgl. Kap. 1.3) und anderen Arbeiten [131, 132, 134, 135], musste die bekannte Formel für den Fall des Systems, bestehend aus der BiPy-TMR-Sonde, die durch Kupfer(II)-Ionen gelöscht wird, erweitert werden. Ziel der Herleitung dieser Theorie ist es, einen Ausdruck für die inverse relative Fluoreszenzlöschung $F_0/F([Cu])$ zu erhalten, welche sich aus der Stern-Volmer-Theorie ergibt, wobei F_0 die Fluoreszenz ohne Anwesenheit von Löschmolekülen, in diesem Fall Kupfersulfat, und F die Fluoreszenz in Abhängigkeit der Kupferkonzentration beschreibt.

Eine Grundannahme, die bei der Formulierung dieser theoretischen Beschreibung vorausgesetzt wird, ist, dass es sich um ein Zweizustandssystem handelt. Das heißt, dass die Sonde, wenn kein Kupfer komplexiert ist, auch keine Wechselwirkung mit freien Kupfer-Ionen aufweist und mit der Helligkeit F_L Licht emittiert. Bei Komplexierung eines Ions wird die Fluoreszenz nahezu komplett gelöscht, so dass nur noch eine Fluoreszenzhelligkeit von $F_{CuL} \ll F_L$ gegeben ist (vgl. Abb. 3.3). Weiterhin liegt ein thermisches Gleichgewicht vor, das heißt, dass folgende Bedingung erfüllt ist:



Unter diesen Voraussetzungen lassen sich die Kupferkonzentration der ungebundenen Ionen $[Cu]$ und die Konzentration der freien Sonde $[L]$ schreiben als:

$$[Cu] = [Cu]_0 - [CuL] \quad (3.2)$$

$$[L] = [L]_0 - [CuL] \quad (3.3)$$

Dabei ist $[Cu]_0$ die eingestellte Kupferkonzentration, $[L]_0$ gibt die Gesamtkonzentration der Sonde an und $[CuL]$ ist die Konzentration von dem Komplex, bestehend aus Kupfer und Sonde. Unter Berücksichtigung der Definition der Gleichgewichtskonstanten, die

das Verhältnis zwischen den Konzentrationen von dem Komplex und den Einzelspezies der Komplexbilder beschreibt, lässt sich die Konstante schreiben als:

$$K = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}] \cdot [\text{L}]} = \frac{[\text{CuL}]}{([\text{Cu}]_0 - [\text{CuL}])([\text{L}]_0 - [\text{CuL}])} \quad (3.4)$$

Auflösen der Gleichung nach $[\text{CuL}]$, mit dem Programm Maple, liefert:

$$[\text{CuL}] = \frac{1 + K[\text{Cu}]_0 + K[\text{L}]_0}{2K} - \frac{\sqrt{(1+K([\text{Cu}]_0+[\text{L}]_0))^2 - 4K^2[\text{Cu}]_0[\text{L}]_0}}{\sqrt{1 + 2K[\text{Cu}]_0 + 2K[\text{L}]_0 + K^2[\text{Cu}]_0^2 - 2K^2[\text{Cu}]_0[\text{L}]_0 + K^2[\text{L}]_0^2}} \quad (3.5)$$

Wird berücksichtigt, dass ein Zweizustandssystem vorliegt, dessen Gesamtfluoreszenz F das Produkt der Fluoreszenz des gelöschten Zustands F_{CuL} mit der Helligkeit Φ_{CuL} und der Fluoreszenz des hellen Zustands F_{L} mit Φ_{L} ist, folgt:

$$\begin{aligned} F &= \underbrace{\Phi_{\text{L}}[\text{L}]}_{F_{\text{L}}} + \underbrace{\Phi_{\text{CuL}}[\text{CuL}]}_{F_{\text{CuL}}} \\ &= \Phi_{\text{L}}([\text{L}]_0 - [\text{CuL}]) + \Phi_{\text{CuL}}[\text{CuL}] \\ &= \Phi_{\text{L}}[\text{L}]_0 + (\Phi_{\text{CuL}} - \Phi_{\text{L}})[\text{CuL}] \end{aligned} \quad (3.6)$$

Mit Einsetzen von Gleichung 3.6, unter Berücksichtigung von (3.5), folgt für den Verlauf der inversen relativen Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit der Kupferkonzentration $\frac{F_0}{F}([\text{Cu}]_0)$:

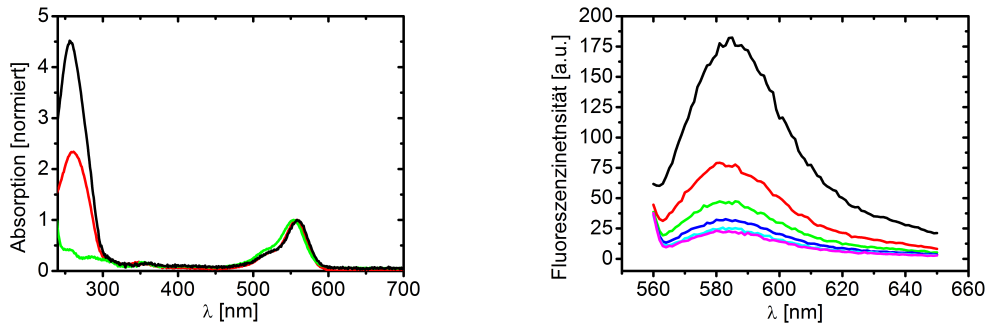
$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Phi_{\text{L}}[\text{L}]_0}{\Phi_{\text{L}}[\text{L}]_0 + (\Phi_{\text{CuL}} - \Phi_{\text{L}}) \frac{1+K[\text{Cu}]_0+K[\text{L}]_0}{2K} - \frac{\sqrt{(1+K([\text{Cu}]_0+[\text{L}]_0))^2 - 4K^2[\text{Cu}]_0[\text{L}]_0}}{2K}} \quad (3.7)$$

Die Gleichung lässt sich vereinfachen zu:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{2K[\text{L}]_0}{2K[\text{L}]_0 + \left(\frac{\Phi_{\text{L}}}{\Phi_{\text{CuL}}} - 1\right) \cdot \left(1 + K([\text{L}]_0 + [\text{Cu}]_0) - \sqrt{(1 + K([\text{L}]_0 + [\text{Cu}]_0))^2 - 4K^2[\text{L}]_0[\text{Cu}]_0}\right)} \quad (3.8)$$

Mit dieser Gleichung lässt sich für ein allgemeines System, wie es zu Anfang beschrieben wurde, eine Stern-Volmer-Auftragung $F_0/F([\text{Cu}]_0)$, anpassen. Bei gewissen Bedingungen lässt sich die Gleichung jedoch stark vereinfachen. Unter der Annahme, dass das Reservoir an Kupfer-Ionen nicht merklich durch die Komplexbildung verringert wird, $[\text{Cu}]_0 = [\text{Cu}]$, also wenn mehr freie Ionen vorliegen als Komplexe, $[\text{CuL}] \ll [\text{Cu}]$, lässt sich das Verhalten der Fluoreszenzlöschung über eine vereinfachte Formel beschreiben [134]:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + K[\text{Cu}]_0}{1 + K[\text{Cu}]_0 \frac{\Phi_{\text{CuL}}}{\Phi_{\text{L}}}} \quad (3.9)$$



(a) Normierte Absorptionsspektren von der Sonde (dsO-FL, schwarz), dem farbstoffmarkierten Oligonukleotid (ssO-F, rot) und dem freiem Farbstoff TMR (grün).

(b) Die Fluoreszenzabnahme der TMR-BiPy Sonde ohne Kupfer (schwarz) und bei Zugabe von Kupfersulfat: 1 μM (rot); 2 μM (grün); 4 μM (blau); 6 μM (türkis); 8 μM (magenta) .

Abbildung 3.4.: Ensemble-Messungen von TMR Konstrukten.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Nutzung von Gleichung 3.9 eine gute Beschreibung der Fluoreszenzabnahme in Abhängigkeit der Kupferkonzentration für den Fall liefert, dass das beobachtete System die Sonde, bestehend aus Bipyridin und Tetramethylrhodamin, ist.

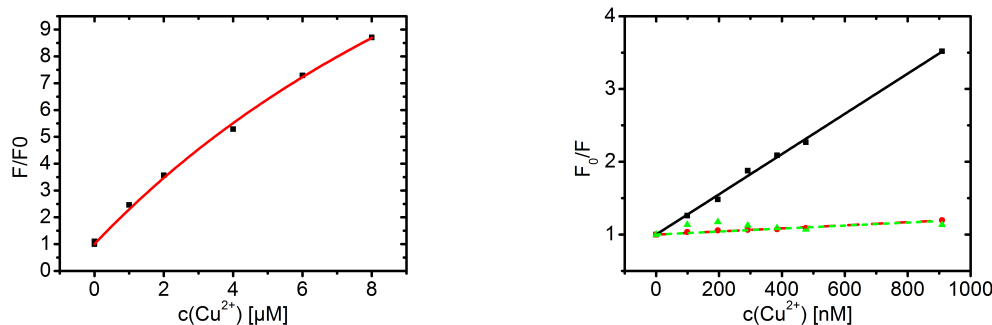
Aufbauend auf dieser theoretischen Beschreibung wurden Ensemble-Messungen durchgeführt, um eine quantitative Beschreibung der Fluoreszenzlöschung zu ermöglichen. Dazu wurden drei tetramethylrhodaminbasierte Proben untersucht. Zum einen wurden von der kompletten Sonde, bestehend aus der doppelsträngigen DNA mit dem Bipyridin und dem TMR, zum anderen von der einzelsträngigen DNA, die nur das TMR trägt und zusätzlich vom ungekoppelten Farbstoff Absorptionsspektren aufgenommen (vgl. Abb. 3.4 (a)). In den Spektren wird deutlich, dass die Oligonukleotide zu der Absorption bei 260 nm beitragen, der Farbstoff im Wesentlichen nur zu der Absorption um 560 nm. Durch Vergleichen der Absorption am Maximum des DNA-Peaks und des Farbstoff-Peaks lassen sich, bei Kenntnis der Extinktionskoeffizienten, Informationen über die Effizienz der Farbstoffmarkierung (Degree of Labeling, DOL) gewinnen sowie über die Konzentration der einzelnen Proben. Dazu müssen die relativen Konzentrationen von Farbstoff C_F und Oligonukleotid C_O durch einander geteilt werden.

$$\text{DOL} = \frac{C_F}{C_O} = \frac{A_F \epsilon_{KF} + \epsilon_{260}}{\epsilon_F A_{260}} \quad (3.10)$$

Bei dieser Formel gibt A_F die relative Absorption bei dem Maximum des Farbstoffes

Sonde	A_{260}	$\epsilon_{260} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	A_F	$\epsilon_F [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	DOL
dsO-FL	39, 13	412000	8, 75	89000	1, 0
ssO-F	50, 35	182800	20, 98	89000	1, 0
TMR	6, 85	32300	17, 26	89000	\emptyset

Tabelle 3.1.: Bestimmung des Markierungsverhältnisses von Farbstoff zu Oligo und des Verhältnisses zwischen den Einzelsträngen nach der Hybridisierung.



(a) Stern-Volmer-Plot der TMR Sonde mit Anpassung durch Gleichung 3.9. Die Konstante beträgt $K = (1,42 \pm 0,08) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$, $\Phi_{an} = 1$ und $\Phi_{aus} = 0,04 \pm 0,01$.

(b) Stern-Volmer-Plots vom doppelsträngigen Komplex (dsO-FL, schwarz), dem farbstoffmarkierten Oligonukleotid (ssO-F, rot) und freiem Farbstoff TMR (grün). Die Stern-Volmer-Konstanten wurden bestimmt zu: dsO-FL: $K_{SV} = (2,76 \pm 0,04) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$; ssO-F: $K_{SV} = (0,21 \pm 0,01) \cdot 10^9 \text{M}^{-1}$; TMR: $K_{SV} = (0,2 \pm 0,01) \cdot 10^9 \text{M}^{-1}$.

Abbildung 3.5.: Ensemble-Messungen von TMR-Konstrukten.

an und ϵ_F den zugehörigen Extinktionskoeffizienten. ϵ_{KF} gibt den Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes bei 260 nm an, ϵ_{260} den Extinktionskoeffizienten des Oligonukleotids und A_{260} die relative Gesamtabsorption bei 260 nm. In Tabelle 3.1 sind die Extinktionskoeffizienten der unterschiedlichen Proben sowie die Absorptionswerte mit den zugehörigen Kopplungsverhältnissen aufgetragen. Der Extinktionskoeffizient bei 260 nm für den Farbstoff TMR beträgt laut Hersteller $32300 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Wie an den Werten zu sehen, sind die Markierungsverhältnisse des ssO-F und das Verhältnis der Einzelstränge für die Hybridisierung sehr nah bei 1.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers wurde anschließend über die Abnahme der Fluoreszenz, bei Zugabe von Kupfersulfat, (vgl. Abb. 3.4 (b)), anhand der Fluoreszenzintensität der Maxima ein Stern-Volmer-Plot erstellt und entweder durch eine lineare Annäherung (vgl. Gleichung 1.35), oder mit Gleichung 3.9 angepasst. Bei der Auftragung von $\frac{F_0}{F}$ in Abb. 3.5 (a) wird direkt deutlich, dass der Graph über eine hohe Kupferkonzentration besser durch Gleichung 3.9 beschrieben wird, während bei geringen Kupferkonzentration eine lineare Annäherung möglich ist. Mit Hilfe dieser linearen Anpassung wurden die Messwerte angenähert und die Fluoreszenzlöschung der unterschiedlichen Proben, über die erhaltene Stern-Volmer-Konstante, miteinander verglichen (vgl. Abb. 3.5 (b)).

Durch Vergleich der Stern-Volmer-Konstanten aus Tabelle 3.2 wird deutlich, dass die Fluoreszenzlöschung der doppelsträngigen Sonde (dsO-FL) um einen Faktor 14 stärker ist, als die Fluoreszenzlöschung des Einzelstranges (ssO-F) und des freien Farbstoffes, die sich in sehr ähnlichen Bereichen bewegen. Anhand dieser Daten ist klar, dass es zwischen TMR und freien Kupfer-Ionen nahezu keine Wechselwirkung gibt und auch der Einfluss der DNA auf die Fluoreszenzlöschung vernachlässigbar ist. Diese Daten bestätigen die Annahme, dass es zwei Zustände der Sonde gibt. Zum einen existiert ein heller Zustand, wenn kein Ion komplexiert ist - wäre dies nicht der Fall, würden freier

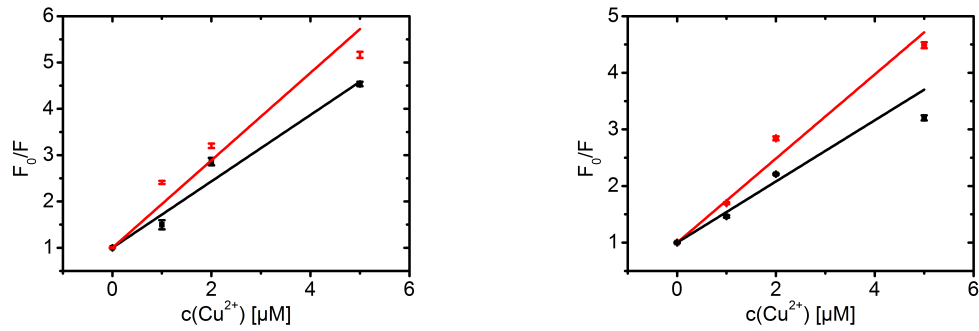
Farbstoff und/oder das einzelsträngige Oligonukleotid eine ausgeprägte Fluoreszenzlöschung bei Zugabe von Kupfersulfat aufweisen. Zum anderen gibt es einen gelöschten Zustand, der nur auftritt, wenn ein Chelat in der Nähe des Farbstoffes ist. Dieser Zustand weist eine starke Fluoreszenzlöschung bei Anwesenheit von Kupfersulfat auf.

Da Tetramethylrhodamin sein Emissionsmaximum zwischen 580 und 590 nm hat, verkompliziert dies die Anwendung der Sonde in biologischen Proben, da Proteine in vielen Fällen eine Autofluoreszenz in ähnlichen Wellenlängenbereichen besitzen [71]. Um dieses Problem zu umgehen, bietet es sich an, die Wellenlänge des Fluorophors zu ändern. Da es sich bei der Markierung des Amino-modifizierten Oligonukleotids um ein Standardverfahren handelt, lässt sich leicht ein Strang mit gleicher Sequenz durch einen beliebigen NHS-modifizierten Farbstoff markieren (vgl. Kap. 5.2). Die Farbstoffe, die auf ihre Anwendbarkeit getestet wurden, weisen eine Verschiebung des Emissionsspektrums in den roten Wellenlängenbereich auf. Für die Kopplung wurden die zwei Farbstoffe Atto 620 und Atto 633 ausgewählt. Analog zu dem Vorgehen bei der Sonde mit dem TMR, wurde ebenfalls die Fluoreszenzlöschung des freien Farbstoffes durch Kupfer untersucht. So zeigt die Auftragung der Stern-Volmer-Plots in Abb. 3.6 keine ausgeprägten Unterschiede zwischen der Fluoreszenzlöschung der hybridisierten Sonde mit dem BiPy-Liganden (Abb. 3.6(a)) und der Fluoreszenzlöschung der freien Farbstoffe (Abb. 3.6 (b)). Dieses Verhalten wird auch bei der linearen Anpassung deutlich, mit der die Stern-Volmer-Konstanten aus Tabelle 3.3 bestimmt werden konnten. So steigt die Konstante für die doppelsträngige Sonde, gegenüber dem Farbstoff, lediglich auf den Faktor 1,3 an, im Vergleich zu einem Anstieg um den Faktor 14 für die Sonde mit dem TMR. Auffällig ist dabei, dass die Löschung der freien Farbstoffe gegenüber der Löschung des TMR geringfügig erhöht ist. Dies ist auf eine etwas stärker ausgeprägte dynamische Löschung zurückzuführen. Da jedoch die Fluoreszenzlöschung des Bipyridins mit dem komplexierten Kupfer nicht zu einer so starken Löschung der beiden roten Fluorophore führt, wie bei dem TMR, ist die Problematik gegeben, die Zustände $[L]$ und $[CuL]$ voneinander zu unterscheiden.

Um zu verstehen, weshalb das Verhalten der Fluoreszenzlöschung der Sonden mit einem roten Farbstoff so stark von der Löschung des TMR abweicht, wurde eine Messreihe mit freiem Farbstoff, dem fluoreszenzmarkierten Einzelstrang (ssO-F) und der hybridisierten Sonde (dsO-FL) durchgeführt. Mit Hilfe der Absorptionsspektren wurde zunächst sichergestellt, dass die Sonde korrekt markiert und anschließend hybridisiert wurde (vgl. Abb. 3.7 (a) und 3.8 (a)). Anschließend wurde erneut Kupfersulfat zu den unterschiedlichen Proben pipettiert und die Löschung der Fluoreszenz über Auftragung von $\frac{F_0}{F}([Cu])$ analysiert. Vor allem die Sonde, die auf Atto 620 basiert (vgl. Abb. 3.7 (b)), weist eine Fluoreszenzlöschung auf, die stark von der Stern-Volmer-Theorie und der Gleichung 3.9 abweicht. Interessanterweise gibt es auch Unterschiede bei der

Sonde	$K_{SV} [10^6 M^{-1}]$
dsO-FL	$2,76 \pm 0,04$
ssO-F	$0,21 \pm 0,01$
TMR	$0,2 \pm 0,01$

Tabelle 3.2.: Fitparameter (Stern-Volmer-Konstante) der Anpassung einer linearen Steigung an die Graphen aus Abb. 3.5.



(a) Die Fluoreszenzlöschung einer Sonde mit einem Bipyridin Liganden und Atto 620 (schwarz), Atto 633 (rot) als Farbstoff. Der Stern-Volmer-Plot zeigt eine Steigung von $K_{620} = (0,72 \pm 0,03) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$ und $K_{633} = (0,94 \pm 0,11) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$.

(b) Die Fluoreszenzlöschung von freiem Farbstoff Atto 620 (schwarz) und Atto 633 (rot). Die Steigung der linearen Anpassung beträgt $K_{620} = (0,54 \pm 0,05) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$ und $K_{633} = (0,74 \pm 0,05) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$.

Abbildung 3.6.: Stern-Volmer Plots von roten Farbstoffen im Bipyridin-Komplex und als freiem Farbstoff

Fluoreszenzlöschung zwischen den einzelsträngigen Proben und dem freien Farbstoff, was ein Indiz dafür ist, dass die DNA in der Lage ist, mit den Kupfer-Ionen wechselzuwirken.

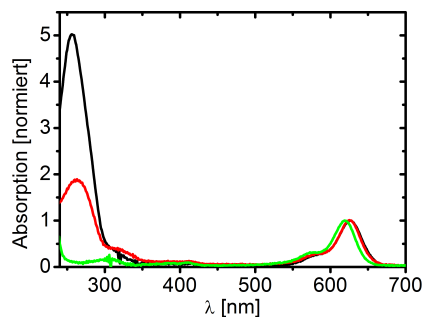
Die Wechselwirkung von Ionen mit DNA ist bekannt [136–138] und erklärt die unterschiedliche Fluoreszenzlöschung. Nichtsdestotrotz konnte keine effiziente Fluoreszenzlöschung der beiden Sonden erreicht werden, so dass eine Anwendung des Kupfersensors, basierend auf Atto 620 oder Atto 633, für die Lokalisationsmikroskopie zunächst nicht in Frage kommt.

Die einfache Kinetik der TMR-basierten Sonde, die als das Schalten zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen aufgefasst werden kann, ist eine Grundvoraussetzung dafür, dass das intrinsische Fluoreszenzverhalten für die Lokalisationsmikroskopie benutzt werden kann (vgl. Kap. 1.6). Fluorophorsysteme, die auf mehr als zwei Zuständen basieren, oder bei denen die Helligkeit der Zustände nicht deutlich trennbar ist, können unter Umständen auch benutzt werden, um in der Lokalisationsmikroskopie Anwendung zu finden. Es ist jedoch sehr schwierig, einzelne PSFs zu visualisieren, wenn keine deutliche Trennung der Zustände möglich ist.

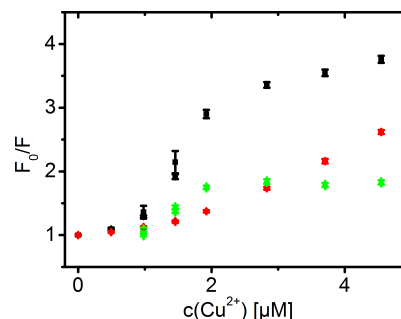
Neben der Stärke der Fluoreszenzlöschung, gibt es weitere kritische Punkte, um eine geeignete Sonde zu entwickeln, deren intrinsisches Verhalten zur Lokalisationsmikroskopie verwendet werden soll. Zum einen sind das die Stabilität der Sonde in Bezug

Farbstoff	$K_{SV} [10^6 \text{M}^{-1}]$ (dsO-FL)	$K_{SV} [10^6 \text{M}^{-1}]$ (Farbstoff)
Atto 620	$0,72 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,05$
Atto 633	$0,94 \pm 0,11$	$0,74 \pm 0,05$

Tabelle 3.3.: Fitparameter (Stern-Volmer-Konstante) der Anpassung an die Graphen aus Abb. 3.6.

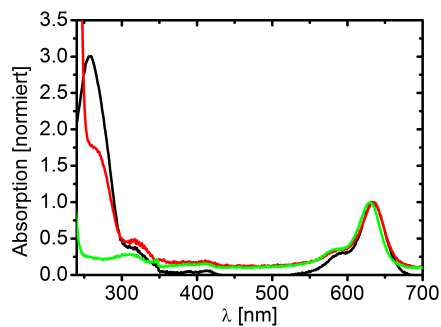


(a) Normierte Absorptionsspektren von dem BiPy-Atto 620 Komplex (dsO-FL, schwarz), dem farbstoffmarkierten Oligonukleotid (ssO-F, rot) und freiem Farbstoff Atto 620 (grün).

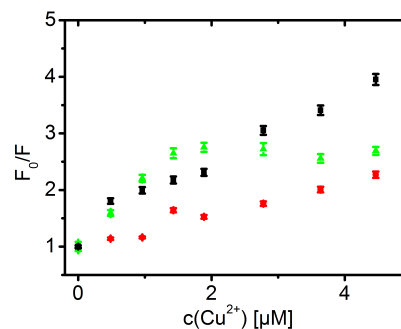


(b) Stern-Volmer-Plots von dem BiPy-Atto 620 Komplex (dsO-FL, schwarz), dem farbstoffmarkierten Oligonukleotid (ssO-F, rot) und freiem Farbstoff Atto 620 (grün).

Abbildung 3.7.: Ensemble Messungen von Atto 620 Konstrukten

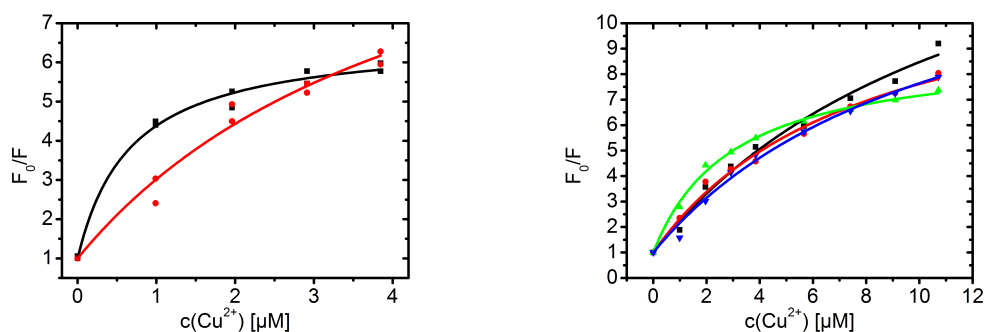


(a) Normierte Absorptionsspektren von dem BiPy-Atto 633 Komplex (dsO-FL, schwarz), dem farbstoffmarkierten Oligonukleotid (ssO-F, rot) und freiem Farbstoff Atto 633 (grün).



(b) Stern-Volmer-Plots von dem BiPy-Atto 633 Komplex (schwarz), dem farbstoffmarkierten Oligonukleotid (rot) und freiem Farbstoff Atto 633 (grün).

Abbildung 3.8.: Ensemble Messungen von Atto 633 Konstrukten



(a) Die Sonde, bestehend aus BiPy und TMR zeigt keine Veränderung der Kinetik. Die Einzelstränge der Sonden wurden an unterschiedlichen Tagen hybridisiert. Dabei ist in rot die frisch hybridisierte Sonde zu sehen. Die Fitparameter sind in Tabelle 3.4 zu finden.

(b) Die Stern-Volmer Plots der Kupfer-Löschung von der TMR-BiPy Sonde in unterschiedlichen Umgebungen mit $\text{pH} = 7,0$. Schwarz: MOPS; rot: Wasser; grün: PBS; blau: MOPS+Chelex. Die Fitparameter sind in Tabelle 3.5 zu finden.

Abbildung 3.9.: Stern-Volmer-Analyse von Messungen mit TMR-BiPy-Sonden

auf eine längere Aufbewahrung und zum anderen der Puffer, oder das Lösungsmittel, in dem die Sonde eingesetzt werden kann.

Die Stabilität der Sonde ist insoweit kritisch, als dass Wechselwirkungen zwischen Bipyridin und Oligonukleotiden auftreten können [139]. Um zu überprüfen, ob die Lagerung der Sonde im gefrorenen Zustand einen Einfluss auf die Fluoreszenzlöschung hat, wurde dazu die Sonde hybridisiert und anschließend bei -20°C eingefroren. Einen Monat später wurde eine Sonde unter gleichen Bedingungen hybridisiert. Diese beiden Sonden wurden anschließend in einem Fluoreszenzspektrometer auf ihr Löschverhalten untersucht. In Abbildung 3.9 (a) ist deutlich sichtbar, dass es eine Abweichung der Fluoreszenzlöschung bei Zugabe einer geringen Kupferkonzentration gibt, die beiden Kurven sich aber einem ähnlichen Maximum nähern. Interessanterweise ist zu sehen, dass gerade der Verlauf zu Beginn der Kurve einen Einfluss auf die Löschkonstante hat (vgl. Tab. 3.4). Ob diese Schwankungen auf die Aufbewahrung der Sonde zurückzuführen sind, oder ob es sich lediglich um statistische Schwankungen handelt, konnte allerdings nicht geklärt werden. Dies spielt aber auch für die Anwendung der Sonde in der Lokalisationsmikroskopie keine Rolle, da die Messungen in Bereichen mit einer höheren Fluoreszenzlöschung, bei Kupferkonzentrationen von über $2\ \mu\text{M}$, durchgeführt wurden.

Für den anderen Gesichtspunkt, die Abhängigkeit der Löschung von der lokalen Umgebung, wurde das Fluoreszenzverhalten der Sonde in unterschiedlichen Puffern mit einem pH -Wert von $7,0$ untersucht. Als Lösung wurden der etablierte MOPS-Puffer

Sonde	$K [10^6\ \text{M}^{-1}]$	Φ_{an}	Φ_{aus}
schwarz, 1 Monat gefroren	$9,90 \pm 1,32$	1	$0,15 \pm 0,01$
rot, frisch hybridisiert	$2,67 \pm 0,41$	1	$0,08 \pm 0,02$

Tabelle 3.4.: Fitparameter der Anpassung an die Graphen aus Abb. 3.9 (a).

gewählt, ein mit Chelex, von kleinsten Mengen an eventuell vorkommenden Ionen, aufgereinigter MOPS-Puffer, PBS und MilliQ Wasser, welches nachträglich auf pH 7,0 eingestellt wurde. Bei der Auftragung von F_0/F in Abb. 3.9 (b) konnte keine signifikante Abhängigkeit der Fluoreszenzlöschung von dem verwendeten Puffer beobachtet werden. Auch bei der Auswertung der Stern-Volmer-Plots mithilfe von Glg. 3.9 wird deutlich, dass die Streuung der Löschkonstanten relativ hoch ist, obwohl die Graphen sehr ähnlich verlaufen.

Da im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls die Möglichkeit der aberrationsfreien Zwei-Kanal-Mikroskopie evaluiert werden sollte, wurde mithilfe des Fluoreszenzspektrometers zusätzlich die Möglichkeit des gezielten reversiblen Schaltens untersucht. Dazu wurde, wie in Abb. 3.10 dargestellt, eine Lösung der Sonde (schwarz) in MOPS-Puffer durch Zufügen von $4\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat gezielt ausgeschaltet (rot) und anschließend durch Zugabe eines Überschusses an EDTA wiederhergestellt (grün). Dass die Reaktivierung der Sonden durch EDTA nur zu einer Fluoreszenzaktivierung von 90 % führt, ist vor allem auf Verdünnungseffekte durch Zugabe von Kupfersulfat und das EDTA sowie auf Photozerstörung zurückzuführen. Der Grund für die Restauration der Fluoreszenz liegt darin, dass EDTA eine sehr viel höhere Bindungsaffinität gegenüber Cu^{2+} -Ionen aufweist, als das BiPy [140, 141].

Zusammenfassung der Ensemble-Daten in Hinsicht auf die Charakterisierung der Probe

Beruhend auf den Daten aus den Ensemble-Messungen lässt sich festhalten, dass die Fluoreszenzlöschung für die Sonde, basierend auf Tetramethylrhodamin als Farbstoff, am effizientesten ist. Die Löschung ist so stark ausgeprägt, dass bei einer Kupferkonzentration von $1\ \mu\text{M}$ schon 60–80 % der Fluoreszenz gelöscht ist. Zwei weitere getestete Farbstoffe wiesen eine weitaus schwächere Löschung auf. Für die TMR-basierte Sonde konnte des Weiteren festgestellt werden, dass der Bipyridin-Ligand auch bei einer längeren Aufbewahrung nicht zu einer Einschränkung der Fluoreszenzlöschung führt. Eine wichtige Charakterisierung der Sonde, bezüglich der Anwendung in biologischen Proben, besteht darin, dass der Messpuffer keinen Einfluss auf die Löscheffizienz nimmt - solange der pH-Wert konstant bei 7,0 gehalten wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass EDTA ein geeigneter Chelator ist, um Kupfer effizient zu binden und sich die Fluoreszenz der Sonde somit nahezu komplett wiederherstellen lässt.

Da in den Ensemble-Experimenten lediglich Mittelwerte über die Fluoreszenz vieler Moleküle gewonnen werden können, sind Details der Fluoreszenzlöschung nicht zugänglich. Da aber gerade die zeitliche Fluktuation der Fluoreszenz von einzelnen Farbstoffen wichtig ist, wurden im Folgenden, mithilfe eines Mikroskops, Einzelmolekül-

Puffer	$K [10^6 \text{ M}^{-1}]$	Φ_{an}	Φ_{aus}
MOPS	$1,41 \pm 0,14$	1	$0,06 \pm 0,01$
Wasser	$1,61 \pm 0,14$	1	$0,08 \pm 0,01$
PBS	$3 \pm 0,17$	1	$0,11 \pm 0,01$
MOPS+Chelex	$1,36 \pm 0,12$	1	$0,07 \pm 0,01$

Tabelle 3.5.: Fitparameter der Anpassung an die Graphen aus Abb. 3.9 (b).

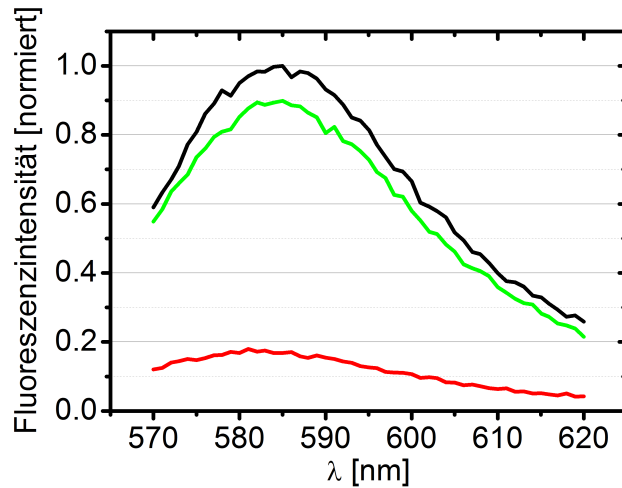


Abbildung 3.10.: Durch Zugabe von EDTA lässt sich die Fluoreszenz der Sonde wiederherstellen. Schwarz: Sonde ohne Zugabe von Kupfer; rot: Sonde nach Zugabe von $4\ \mu\text{M}$ Kupfer; grün: nach Zugabe von einem fünf-fachen Überschuss an EDTA.

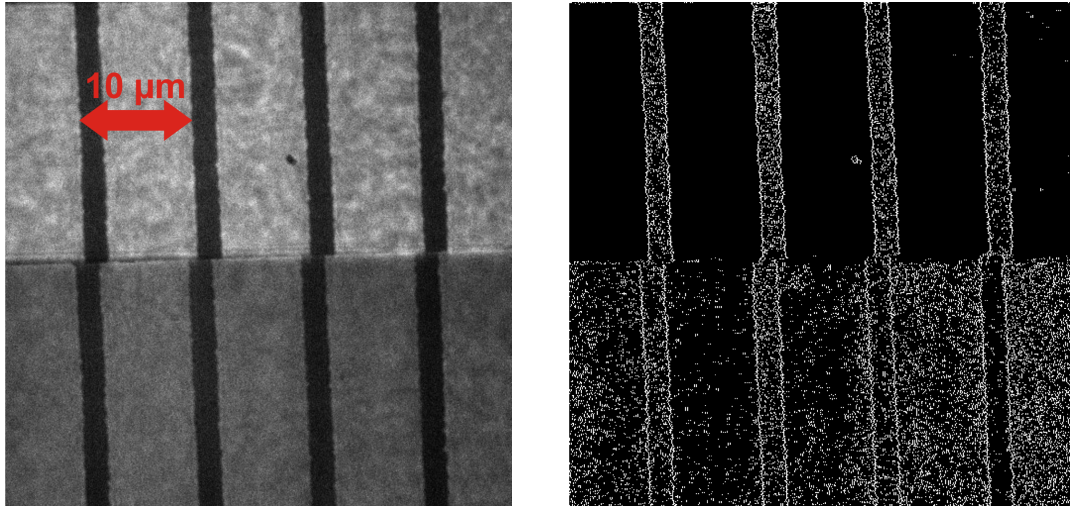
Untersuchungen durchgeführt. Deswegen wird zunächst auf den Aufbau der Einzelmolekül-sensitiven Anlage eingegangen und anschließend auf die Datenakquise.

3.3. Charakterisierung des Mikroskop-Setups bezüglich der Lokalisationsmikroskopie

Da die Anwendbarkeit eines Mikroskops für die Lokalisationsmikroskopie nicht von vornherein gegeben ist, muss zunächst die Erfüllung der theoretischen Parameter gewährleistet werden. Die Parameter, die anzupassen sind, sind zum einen die Pixelgröße und die Messdauer. Wie in Kapitel 1.6 gezeigt, muss die Auflösung für einen CCD-Sensor, der in der Lokalisationsmikroskopie verwendet werden soll, nach dem Nyquist-Shannon-Theorem (vgl. Gleichung 1.58) so gewählt werden, dass die abzubildende Struktur um den Faktor 2,2 höher abgetastet wird. Laut der Abbildungstheorie von Ernst Abbe (Kap. 1.1), ergibt sich für die Halbwertsbreite einer Punktabbildungsfunktion (vgl. Formel 1.11) ein Durchmesser von:

$$d_{\text{FWHM}} \approx \frac{\lambda}{2 \cdot \text{NA}} \quad (3.11)$$

Für die in dieser Arbeit verwendeten Objektive mit einer numerischen Apertur von $\text{NA}_{\text{Zeiss}} = 1,45$ und $\text{NA}_{\text{Nikon}} = 1,49$, ergibt sich unter Berücksichtigung des Fluoreszenzmaximums von Tetramethylrhodamin bei $\lambda = 580\ \text{nm}$ eine Breite der Punktabbildungsfunktion von ca. $200\ \text{nm}$. Dadurch folgt mit dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem eine notwendige Pixelgröße von etwa $\frac{d_{\text{FWHM}}}{2,2} = 90\ \text{nm}$. Um diese Pixelgröße zu erreichen, wurden in den Detektionsstrahlengang des Mikroskops zwei Linsen eingebracht, die den Effekt eines Teleskops erfüllen (vgl. Abb. 5.2). Auf Grund einer groben Ab-



(a) Die Abbildung eines Mikrometerlineals auf den CCD-Chip. Oben: Grüner Kanal, unten: Roter Kanal

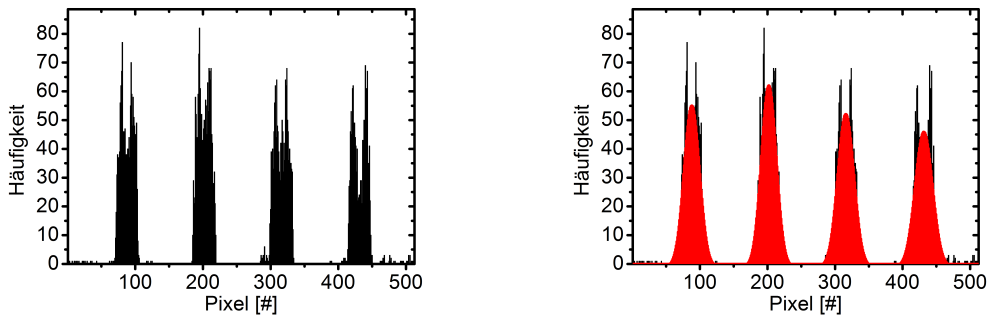
(b) Gefiltertes Bild der Mikrometerlinie.

Abbildung 3.11.: Bestimmung der Pixelgröße über ein Mikrometerlineal

schätzung, wurden in den Detektionsstrahlengang zwei Linsen mit einer Brennweite von 140 mm und 300 mm eingebracht. Um die Pixelgröße experimentell zu bestimmen, wurde eine bekannte Struktur mit dem Mikroskop bei Durchlichtbeleuchtung abgebildet. Dazu wurde ein Mikrometerlineal mit einer Skala von $10\ \mu\text{m}$ verwendet. Das Bild wurde im Detektionsstrahlengang über zwei Dichroiden bei $640\ \text{nm}$ aufgetrennt und nach dem Passieren von Bandpassfiltern auf zwei unterschiedliche Bereiche der CCD-Kamera projiziert. Auf der oberen Hälfte der CCD-Kamera wurde, wie in Abb. 3.11 (a) zu sehen, der „grüne“ Anteil des Lichtes mit einer Wellenlänge von $555 - 615\ \text{nm}$ abgebildet. Auf den „roten“ Kanal wurde Licht mit Wellenlängen zwischen $640 - 710\ \text{nm}$ projiziert. Das erhaltene Bild wurde mithilfe eines Kantenfilters nachbearbeitet und anschließend die Position der gefundenen Kanten binär gespeichert (vgl. Abb. 3.11 (b)).

Um eine statistische Analyse der Pixelgröße zu erzielen, wurden jeweils 200 Pixelreihen, aus jedem Kanal des binären Bildes, aus Abb. 3.11 (b) aufsummiert. Dies ist in Abb. 3.12 (a) für den oberen Kanal gezeigt. Danach wurden, wie in Abb. 3.12 (b) veranschaulicht, mit einer Signalsuche, unter der Voraussetzung, dass vier Signale vorliegen, die Verteilung der Kanten angenähert. Der Abstand zweier Maxima entspricht dabei dem Abstand zweier Mittelpunkte zweier Striche auf dem Lineal. Anhand der über diese Methode gemessenen Positionen der Spitzen der Signale, wie sie in Tabelle 3.6 aufgetragen sind, wurde anschließend der mittlere Abstand zwischen den Peaks zu $114,4 \pm 0,7$ Pixeln bestimmt. Unter Berücksichtigung des Strichabstandes auf dem Mikrometerlineal von $10\ \mu\text{m}$ führt dies zu einer Kantenlänge der Pixel von $87,4 \pm 0,5\ \text{nm}$.

Mit Hilfe der definierten Pixelgröße kann sich, basierend auf der Theorie von Thompson, über Gleichung 1.67 die theoretische Lokalisationsgenauigkeit eines unbeweglichen



(a) Die Häufigkeit von gefundenen Kanten in jeder Zeile im grünen Kanal.

(b) Annäherung der Verteilung der Kanten im grünen Kanal durch eine Signalanpassung mit vier Maxima.

Abbildung 3.12.: Anpassung der experimentellen Daten mit einer Signalsuche.

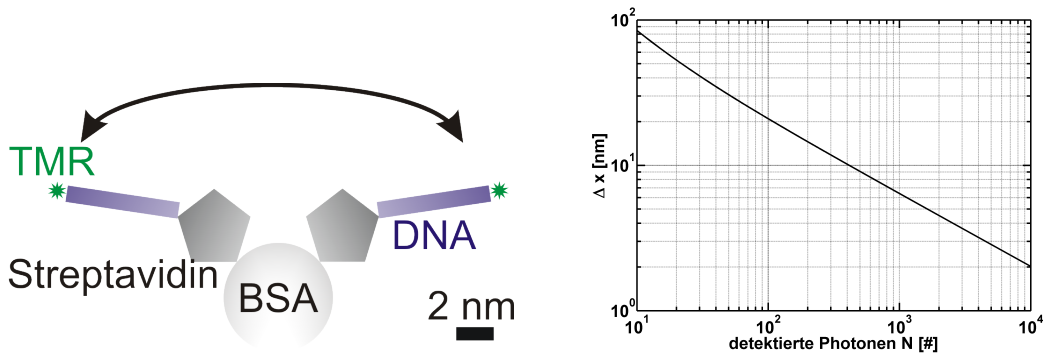
Punktemitters bestimmen lassen:

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{s^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \quad (3.12)$$

a gibt bei dieser Formel die Kantenlänge eines Pixels an, also in diesem Fall: $a \approx 87,5$ nm. s gibt die Breite der Punktabbildungsfunktion an. Für den Fall von TMR sind das etwa 200 nm und N ist die Anzahl der detektierten Photonen. Bei einer theoretischen Rauschstärke von $b = 0,7$, was einem realistischen Wert entspricht, ergibt sich der in Abb. 3.13 (b) dargestellte Zusammenhang zwischen Lokalisationsgenauigkeit und detektierten Photonen [97]. Im Fall der Sonde ist es nicht sinnvoll von einem unbeweglichen Punktemitter auszugehen, da das Streptavidin - mit einem Durchmesser von 5,8 nm - nur über ein Biotin auf ein an der Oberfläche immobilisiertes BSA-Molekül mit einem Durchmesser von mehr als 8 nm gebunden ist und somit durchaus in einem gewissen Bereich rotieren kann. An das Streptavidin ist die Sonde, bestehend aus einer doppelsträngigen DNA, gekoppelt. Auch hier findet die Kopplung über eine Biotin-Streptavidin-Bindung statt, so dass Potential zur Rotation vorhanden ist. Des Weiteren besitzt DNA eine gewisse Flexibilität, wodurch sich das ungebundene Ende des Doppelstrangs etwas bewegen kann. Geht man von den extremsten Positionen aus, die der Farbstoff, der am äußersten Ende der DNA befestigt ist, einnehmen kann - wie in Abb. 3.13 (a) dargestellt - lässt sich abschätzen, dass sich der Farbstoff in einem Bereich mit einem Durchmesser von 24 nm befinden kann. Diese Abschätzung ist relativ realitätsnah, da zwischen BSA und DNA abstoßende Kräfte

Spitze	Position [Pixel]	Fehler
1	88	$\pm 0,6$
2	202	$\pm 0,5$
3	316	$\pm 0,6$
4	431,4	$\pm 0,7$

Tabelle 3.6.: Fitparameter der Anpassung an die Spitzen aus Abb. 3.12



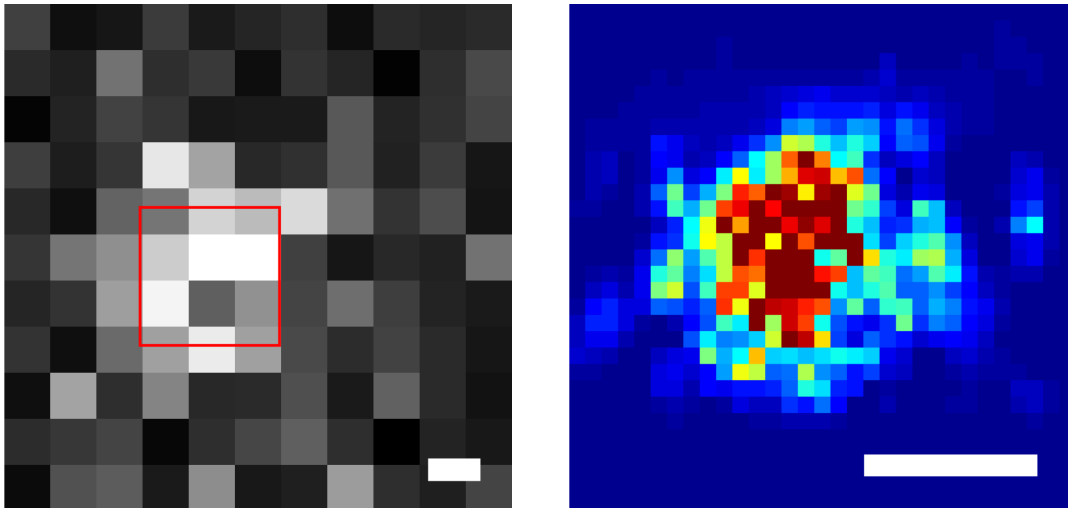
(a) Maßstabsgetreue Skizze der Sonde an einer Glasoberfläche. Bei hoher Flexibilität kann ein Farbstoff in einem Bereich von 24 nm lokalisiert sein.

(b) Die erwartete Lokalisationsgenauigkeit des TIRF-Mikroskops bei einer Rauschstärke von $b = 0,7$.

Abbildung 3.13.: Theoretische Lokalisationsgenauigkeit der Farbstoffe auf dem TIRF-Mikroskop.

wirken (vgl. Kap. 3.4) und die Position des Farbstoffes somit durch diese Kräfte bestimmt wird. Die Anzahl der detektierten Photonen hängt dabei sowohl stark von der Anzahl und der Qualität der verwendeten optischen Bauteile im Mikroskop ab als auch von der Fluoreszenzlebensdauer und der daraus resultierenden Photonenemissionsrate des Farbstoffes. Da ein Dauerstrich-Laser verwendet wird, kann der Farbstoff, sobald er in den Grundzustand relaxiert ist, wieder angeregt werden. Bei einer Lebensdauer von 2,4 ns für Tetramethylrhodamin (vgl. Abb. B.4) können höchstens $400000 \frac{\text{Photonen}}{\text{ms}}$ emittiert werden, vorausgesetzt, dass ein Farbstoff nach Relaxation sofort wieder angeregt wird. Über die Quantenausbeute, sprich das Verhältnis von emittierten Photonen pro absorbierten Photonen, mit $QY_{\text{TMR}} = 0,7$, wird noch ein Korrekturfaktor eingeführt sowie über die Detektionseffizienz der CCD-Kamera, die bei 95% für den entsprechenden Wellenlängenbereich liegt. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoffes gibt des Weiteren an, wie wahrscheinlich die Absorption eines Photons ist. Da die Emission der Photonen in alle Raumrichtungen geschieht, das Beobachtungsfeld des Objektivs aber durch den Öffnungswinkel (vgl. Kap. 1.1) $\alpha = \sin^{-1} \left(\frac{NA}{n} \right) \approx 80^\circ$ begrenzt ist, wird auch nur ein Bruchteil der Photonen vom Objektiv gesammelt. Bezieht man noch die Verluste an Photonen durch die optischen Bauelemente mit ein, erreicht man pro Farbstoff 20 – 40 detektierte Photonen je Millisekunde. Mit einer Messdauer von 1 ms ließen sich also die Positionen von unbeweglichen Farbstoffzentren zu einer Genauigkeit von 25 – 50 nm lokalisieren. Typische Messzeiten liegen jedoch meist in der Größenordnung von 30 – 50 ms Belichtungszeit pro Bild, so dass die rechnerisch, maximal erreichbare Lokalisationsgenauigkeit bei ca. 8 – 10 nm liegt.

Basierend auf diesen theoretischen Überlegungen, lassen sich mit der Messung der Streuung der Position der gefundenen Farbstoffzentren, Rückschlüsse über die Stabilität des Mikroskops ziehen. Dazu wurden einzelne Sonden, über die angesprochene Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung, auf einer Glasoberfläche immobilisiert und die Position der PSFs bestimmt (vgl. Abb. 3.14 (a)). Auf dem Bild ist die Verteilung der Fluoreszenzphotonen bei einer Messdauer von 30 ms aufgetragen. Auf 200 aufeinander-



(a) Eine typische PSF eines auf der Oberfläche immobilisierten TMR. Der Maßstab entspricht 100 nm.

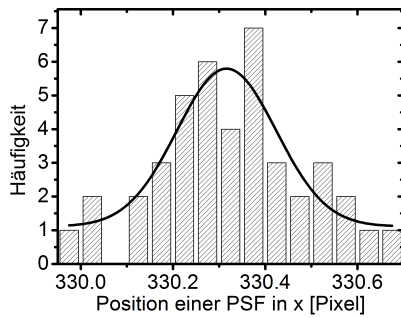
(b) Die zugehörigen Lokalisierungen des Fluorophors in 200 Bildern durch die Lokalisationsanalyse-Software [119] verarbeitet (vgl. Abb. B.5). Der Maßstab entspricht 100 nm.

Abbildung 3.14.: Experimentelle Bestimmung der Schwingungsstabilität des Mikroskops.

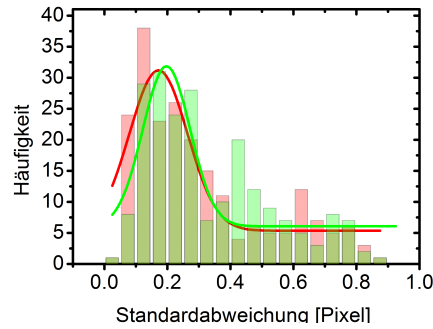
folgende Bilder wurde eine Lokalisationsanalyse angewendet und die gefundenen Fluoreszenzzentren in ein Bild mit zehnfach höherer Auflösung eingetragen, wie in Abb. 3.14 (b) dargestellt. Hierbei gibt die Farbskala aber keine Informationen mehr über die Helligkeit an, sondern über die Häufigkeit der gefundenen Lokalisationszentren. In diesem neuen Bild wurden für jede Ansammlung von gefundenen Lokalisierungen, die Verteilung der Positionen betrachtet und die Standardabweichung vom Mittelwert bestimmt (Abb. 3.15 (a)).

Dabei wurden bewusst die x- und y-Koordinaten der Abweichungen der Lokalisierungen getrennt voneinander betrachtet. Bei einer hinreichend großen Statistik an Fluorophoren, lassen sich über die Abweichung der zwei unterschiedlichen Richtungen Rückschlüsse ziehen. So sind die zwei wahrscheinlichsten Fehlerquellen in dem Aufbau des Mikroskops gegeben - da der optische Tisch, auf dem das Mikroskop aufgebaut ist, schwingungsfrei gelagert ist. Die einzigen mechanischen und beweglichen Teile des Aufbaus sind der Mikroskoptisch, auf dem die Probe liegt und der über das Objektiv bewegt werden kann und die CCD-Kamera, die aktiv gekühlt werden muss und bei der es auf Grund der Rotation des Lüfters zu einer Vibration des CCD-Sensors kommen kann. Beide Fehlerquellen haben aber unterschiedliche Auswirkungen auf die Verteilung der Streuung. So führt eine Vibration des Sensors zu einer symmetrischen Erhöhung der Streuung, während eine Fehlerquelle des Mikroskoptisches eher zu einem systematischen Drift in eine Vorzugsrichtung führen würde.

Durch Histogrammieren der Standardabweichungen ergeben sich zwei unterschiedliche Maxima bei der Verteilung (vgl. Abb. 3.15 (b)). Das erste Maximum gibt die Lokalisationsgenauigkeit der Probe an. Das zweite Maximum ist wahrscheinlich auf Fehler zurückzuführen, die auftreten, wenn zwei oder mehr Farbstoffe zu nah beieinander



(a) 1D-Verteilung der Lokalisationen von einer PSF in x-Richtung.



(b) Die Standardabweichungen der Lokalisationen in x- (grün) und y-Richtung (rot) für 212 separat betrachtete Farbstoffe.

Abbildung 3.15.: Experimentelle Bestimmung der Schwingungsstabilität des Mikroskops.

liegen, um von der Lokalisationssoftware als getrennte PSFs betrachtet zu werden. Das Maximum der Verteilung liegt bei 0,17 Pixeln in y-Richtung und 0,2 Pixeln in x-Richtung, was eine sehr symmetrische Streuung ist. Es liegen also keine systematischen Drifts durch den Mikroskopisch vor. Unter Berücksichtigung der Pixelgröße von etwa 88 nm, erhält man für die Lokalisationsgenauigkeit: $\Delta x = 15 - 18$ nm. Damit stimmt die Lokalisationsgenauigkeit der Sonde sehr gut mit der von R. Thompson vorhergesagten Genauigkeit [97], die für das Mikroskop mit ca. 10nm berechnet wurde, überein. Ob die Lokalisationsgenauigkeit etwas unter der Beweglichkeit der Probe leidet, oder eine Vibration des CCD-Sensors dafür verantwortlich ist, bleibt unklar, ist aber bei der guten Lokalisationsgenauigkeit vernachlässigbar.

Zusammenfassung Charakteristika des TIRF-Mikroskops für die Lokalisationsmikroskopie

Das TIRF-Mikroskop wurde so aufgebaut, dass die Pixel der CCD-Kamera eine Kantenlänge von ca. 88 nm aufweisen. Des Weiteren ist die Detektionseffizienz von $20 - 40 \frac{\text{Photonen}}{\text{ms}}$ des Mikroskops mit anderen, ähnlich aufgebauten, Mikroskopen vergleichbar [118]. Die Lokalisationsgenauigkeit von einzelnen Farbstoffen von 15 – 18 nm befindet sich in guter Übereinstimmung mit der theoretischen Berechnung von Thompson [97], die sich für den verwendeten Aufbau bei etwa 10 nm, bei einer Belichtungszeit von 30 ms, befindet. Durch Bestätigung der theoretischen Werte, lässt sich die Messdauer pro Bild abschätzen, die benötigt wird, um einen Fluorophor ausreichend genau für nanoskopische Ansätze zu lokalisieren (vgl Abb. 3.13 (a)). Um eine Lokalisationsgenauigkeit von unter 20 nm zu erreichen, sollte die Belichtungszeit der Kamera bei über 20 ms gewählt werden.

Ein weiterer Parameter, der bei der Mikroskopie bedacht werden muss, ist die Auswahl des Objektivs. So ist es für die Messung von einzelnen Farbstoffen, die auf der Oberfläche immobilisiert sind, sinnvoll, eine möglichst geringe Eindringtiefe des evaneszenten Feldes zu erreichen. Für die Messung von fluoreszenzmarkierten Proteinen in Zellen hingegen, ist es sinnvoll, die Eindringtiefe nicht zu gering zu wählen, da die Zelle sich

im Allgemeinen in einem größeren Abstand von der Glas/Puffer-Grenzfläche befindet als die immobilisierten Farbstoffe. Dazu wurde die charakteristische Eindringtiefe der verwendeten Objektive für das Anregungslicht mit $\lambda_{\text{Laser}} = 532 \text{ nm}$ berechnet. Nach der Formel 1.52 lässt sich die charakteristische Eindringtiefe berechnen:

$$d = \frac{\lambda_{\text{Laser}}}{4\pi n_t} \left(\frac{\sin^2 \Theta_e}{\sin^2 \alpha_c} - 1 \right)^{-1/2} \quad (3.13)$$

Der kritische Winkel für die Glas/Puffer-Grenzschicht beträgt $\alpha_c = \arcsin \frac{n_t}{n_e} = 65^\circ$ und Abschätzen des Einfallswinkels Θ_e mithilfe der Numerischen Apertur ($78,6,^\circ$ für das Nikon-Objektiv, und $72,7^\circ$ für das Zeiss-Objektiv mit $\text{NA} = 1,45$) folgt für die charakteristische Eindringtiefe $88,6 \text{ nm}$ für das Nikon-Objektiv und 112 nm für das Zeiss-Objektiv.

Auf Grund dieser Eindringtiefen wurde für die Einzelmolekül-Oberflächen das Objektiv mit $\text{NA} = 1,49$ verwendet, für die Zellmessungen das Objektiv mit $\text{NA} = 1,45$.

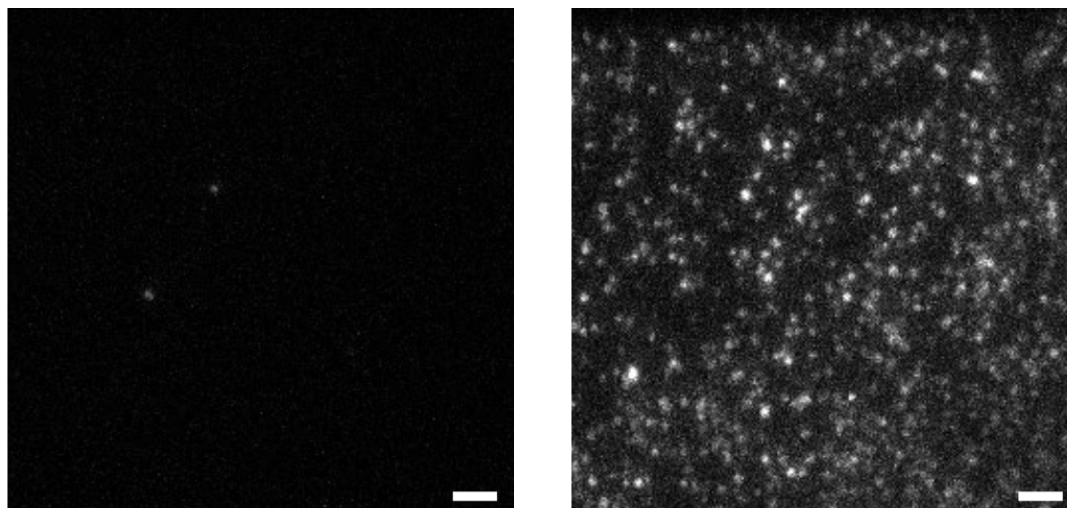
3.4. Einzelmolekülmessungen zur Charakterisierung der Sonde

Wie in Kapitel 3.2 bereits erwähnt, wurde die relative Fluoreszenzlöschung bestimmt. Wie die Länge der zwei Zustände, die die Sonde annehmen kann, aber aussieht, bleibt unklar. Da aber gerade die Zeiten der Zustände darüber entscheiden, ob eine Fluoreszenzkinetik zur Lokalisationsmikroskopie genutzt werden kann, sollten vor dem Hintergrund, der aus der Literatur bekannten Kinetik der Sonde, mithilfe des TIRF-Mikroskops, qualitativ die Längen der Zustände bei der Fluoreszenzfluktuation betrachtet werden.

Vor der Datenakquise musste aber zunächst das Immobilisierungsprotokoll für die Sonde verifiziert werden. Dabei wurde die Sonde folgendermaßen auf einem Kammerdeckglas immobilisiert:

1. Reinigung der Oberfläche mit Flußsäure
2. Belegung der Oberfläche mit einer Mischung aus BSA und biotinyliertem BSA durch Adsorption
3. Waschen zum Entfernen von überschüssigem BSA
4. Markierung des biotinyliertem BSA durch Neutravidin
5. Waschen zum Entfernen von überschüssigem Neutravidin
6. Markierung des Neutravidins mit der Sonde
7. Waschen zum Entfernen von überschüssiger Sonde

Für die Mischung aus BSA und biotinyliertem BSA wurde ein Verhältnis von $\frac{\text{BSA}}{\text{bio. BSA}} = \frac{19}{1}$ gewählt. Treten bei dem Protokoll keine unspezifischen Wechselwirkungen auf, sollte Neutravidin lediglich an die biotinylierten BSA-Moleküle binden und die Sonde lediglich an das Neutravidin. Dafür ist es wichtig, dass die Glasoberfläche



(a) Negativ-Kontrolle für die Oberflächenbehandlung. Der Schritt der Inkubation mit Streptavidin wurde übersprungen, um auf unspezifische Adsorption der Probe zu testen. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm .

(b) Positiv-Kontrolle: Die Oberfläche zeigt eine dichte Belegung mit der Sonde bei dem normalen Protokoll. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm .

Abbildung 3.16.: Überprüfung der Oberfläche auf unspezifische Adsorption. Die Grauskala reicht von 0 – 60000.

komplett mit BSA belegt ist, um Wechselwirkungen zwischen Glas und Neutravidin oder Sonde zu verhindern. Um zu testen, ob die Belegungsdichte unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen ist, wurde also die Menge an Neutravidin und BSA/bio. BSA-Gemisch variiert. Zusätzlich wurde durch Weglassen des Markierungsschrittes mit Neutravidin, die unspezifische Adsorption der Sonde an die Glas/BSA Oberfläche getestet. Durch Überspringen des Markierungsschrittes mit der Sonde, wurde auf das Auftreten unspezifischer Hintergrundfluoreszenz durch Verunreinigungen getestet (vgl. Abb. 3.16 (a)). Auf der Aufnahme sind lediglich zwei schwache Fluoreszenzverteilungen erkennbar, die auf Verunreinigungen zurückzuführen sind. Auf Teilbild (b) ist eine Oberfläche gezeigt, die eine dichte Belegung mit Farbstoffen aufweist. Besonders helle Spots sind auf die Bindung zweier Farbstoffe an ein Neutravidin zurückzuführen. Wie in Tabelle 3.7 gezeigt, sind bei den beiden Negativ-Kontrollen keine Fluoreszenzmitter auf der Oberfläche vorhanden. Daraus folgt, dass weder unspezifische Fluoreszenz beim Auslassen der Sonde auftritt noch dass es beim Überspringen des Neutravidin-Schrittes eine unspezifische Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Sonde gibt.

Die Markierungsdichte innerhalb der einzelnen Kammern auf dem Kammerdeckglas schwankt sehr stark mit dem Abstand von der Mitte. Dies wird auch in der Tabelle an den starken Schwankungen der Belegungsdichte innerhalb der gleichen Kammer deutlich. Im Rahmen dieser Schwankungen kann die Anzahl der Lokalisationen - bis auf die beiden Negativ-Kontrollen - bei allen Proben als gleich ähnlich betrachtet werden. Da die beobachtete Grundfläche etwa $520 \mu\text{m}^2$ groß ist, ergeben sich Belegungsdichten zwischen 0,1 und 0,3 Farbstoffen pro Quadratmicrometer. Dies ist ein guter Wert, um in der Lage zu sein, einzelne Farbstoffe räumlich voneinander zu trennen. Aus

$c_{\text{BSA}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]$	$c_{\text{Neutravidin}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]$	$c_{\text{Sonde}} [\text{M}]$	Lokalisationen
5	0,01	$5 \cdot 10^{-11}$	82
5	0,01	$5 \cdot 10^{-11}$	69
5	0,001	$5 \cdot 10^{-11}$	163
5	0,001	$5 \cdot 10^{-11}$	101
5	0	$5 \cdot 10^{-11}$	4
5	0	$5 \cdot 10^{-11}$	1
0,05	0,01	$5 \cdot 10^{-11}$	92
0,05	0,01	$5 \cdot 10^{-11}$	60
5	0,01	0	0
5	0,01	0	4

Tabelle 3.7.: Charakterisierung des Protokolls zur Herstellung von Einzelmoleküloberflächen. Gezählt wurde die Anzahl der Lokalisationen in einem einzelnen Bild, bei unterschiedlichen Konzentrationen von BSA, Neutravidin und der Sonde.

den gemessenen Belegungsdichten folgt weiterhin, dass das Immobilisierungsprotokoll spezifisch ist und die Oberfläche vollständig mit BSA belegt ist.

Die Oberflächenbelegung des validierten Protokolls (vgl. Abb. 3.16 (b)) führt zu einer Dichte, die dünn genug ist, so dass einzelne Farbstoffe voneinander unterscheidbar sind und gleichzeitig dazu, dass genug Farbstoffe in der beobachteten Fläche immobilisiert sind, um eine statistische Aussage treffen zu können.

Mit diesen Voraussetzungen ist es möglich, eine quantitative Analyse der Fluktuationen von vielen einzelnen Sonden durchzuführen und aus diesen Daten auf die Fluoreszenzfluktuationen schließen zu können. Aus vorangegangenen Daten ist bekannt, dass die Fluoreszenzfluktuationen, die durch die Bindung von Kupfer an das Bipyridin ausgelöst werden, langsam genug sind, um mithilfe eines einzelmolekülempfindlichen konfokalen Mikroskops untersucht zu werden [131, 132, 134]. Die Zeitauflösung, die mit Lawinendiioden erreicht werden kann, ist jedoch höher. So wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit, die unabhängig von der Kupferkonzentration ist, zu $v_{\text{Dis}} = 1,2 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ bestimmt, die Assoziationsgeschwindigkeit wurde zu $v_{\text{As}} = 3,3 \pm 0,3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Die sehr genaue Bestimmung dieser Werte basiert darauf, dass mit der hohen Zeitauflösung auch ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis vorliegt, mit dessen Hilfe die Länge der einzelnen Zustände gemessen werden kann. Auf dem TIRF-Mikroskop wurde stattdessen eine andere Methode der Datenanalyse verwendet. So wurden keine einzelnen Spuren manuell ausgewählt und per Schwellwertanalyse ausgewertet, stattdessen wurde über alle gefundenen Fluorophore mithilfe einer Lokalisationsanalyse die Verteilung der Fluoreszenz analysiert. Die Methode birgt den Vorteil, dass es bei Fluoreszenzhelligkeiten, die bei der Schwellwertanalyse sowohl als An-Zustand als auch als Aus-Zustand gemessen werden könnten, ein unabhängiges Kriterium von der Helligkeit gibt. Die Eigenschaft der Beugung wird dazu ausgenutzt, um die Fluoreszenzverteilung eines Farbstoffes mit einer symmetrischen, zweidimensionalen Gauß-Kurve anzunähern. Dadurch lässt sich jedes Bild auf Punktabbildungsfunktionen absuchen. Untersucht man die Einzelbilder eines Videos, kann mithilfe der Orts- und Zeitkoordinaten der gefundenen Lokalisationen für jeden

Fluorophor eine Fluoreszenzspur rekonstruiert werden, die nur auf zwei Zuständen basiert, gaußverteilte Fluoreszenz und nicht-gaußverteilte Fluoreszenz. Anhand dieser „binären“ Fluoreszenzspuren kann leicht die Länge der einzelnen Zustände bestimmt werden und in ein Histogramm aufgetragen werden.

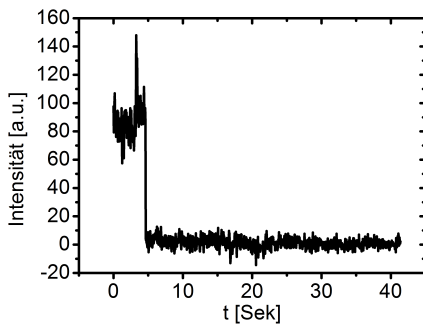
Um Fluoreszenzspuren von einzelnen Sonden zu erhalten, wurde, wie bereits zuvor beschrieben, die Sonde immobilisiert und vor jeder Messung die Kupferkonzentration erhöht.

Basierend auf dem Ansatz der vorgestellten Auswertung wurden, wie in Abb. 3.17 dargestellt, Fluoreszenzspuren von Farbstoffen aufgenommen und analysiert. So ist in Abb. 3.17 (a) die Fluoreszenzspur einer Sonde ohne Zugabe von Kupfer dargestellt. Es treten nur statistische Schwankungen der Fluoreszenz auf und es sind lediglich zwei Zustände zu erkennen. Bis zu einem Zeitpunkt von etwa 5 Sekunden zeigt die Sonde eine konstante Fluoreszenzemission, dann kommt es zur irreversiblen Photozerstörung. Für Teilbild (b) wurde eine Kupferkonzentration von 200 nM zugegeben, so dass schon deutliche Fluktuationen zwischen zwei Zuständen zu erkennen sind. Die Fluktuationen sind sehr statistisch verteilt und es gibt sehr kurze helle Zustände, wie etwa bei 20 – 25 s und relativ lange An-Zustände, wie bei etwa 16 s. Durch Erhöhung der Kupferkonzentration lassen sich die An-Zustände beeinflussen. So ist schon bei 400 nM CuSO₄ die Länge der Zustände verkürzt. Vor allem in Teilbild (d) wird die Problematik der Schwellwertanalyse an den Fluoreszenzfluktuationen zwischen 10 und 15 Sekunden deutlich. Hier führen die sehr kurzen An-Zustände zu einer Überlappung von den beiden Zuständen, so dass eine Trennung der Zustände über die Intensität nicht mehr funktioniert. Nach der Fluoreszenzanalyse mit der vorgestellten Methode, wurde in Analogie zu den Messungen am konfokalen Mikroskop, die Verteilung der Zeiten über die lokale Dichte mithilfe der folgenden Gleichung gewichtet:

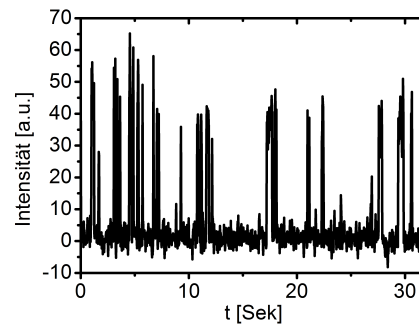
$$P(\Delta t_i) = \frac{H(\Delta t_i)}{0,5 \cdot (\Delta t_{i+1} - \Delta t_{i-1})} \quad (3.14)$$

Die Gewichtung der Häufigkeit eines Zustandes, mit der Dauer Δt_i , geschieht dabei durch den Abstand zu den nächsten benachbarten Zeiten Δt_{i-1} und Δt_{i+1} . Die daraus resultierende, gewichtete Häufigkeit wurde normiert und gegen die Dauern der Zustände aufgetragen. Die resultierende Verteilung aus Abbildung 3.18, lässt sich über einen bi-exponentiellen Fit beschreiben. Die hell-fluoreszierenden Zustände werden durch die Zugabe von Kupfersulfat immer kürzer, da die Stoßwahrscheinlichkeit proportional zu der Anzahl an Löschmolekülen ist und somit auch die Wahrscheinlichkeit ein Kupfer-Ion zu binden (vgl. Abb. 3.18 (a)). Die Länge der gelöschten Zustände ist unabhängig von der Kupferkonzentration und basiert lediglich auf der Bindungsstärke zwischen Ion und Chelat [131]. Dass trotzdem ein Trend in der Statistik zu längeren, nicht-fluoreszenten Zuständen zu erkennen ist, lässt sich damit begründen, dass die Bindung zweier Ionen mit erhöhter Konzentration so schnell hintereinander geschieht, dass der kurze fluoreszente Zwischenzustand nicht beobachtet werden kann (vgl. Abb. 3.18 (b)).

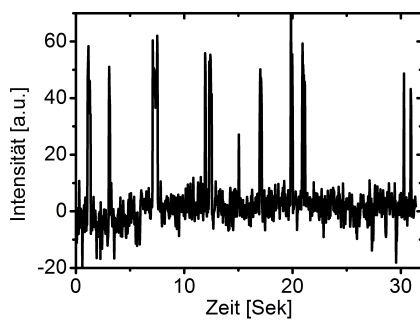
Eine Problematik, die durch eine vollständig automatisierte Analyse der Fluoreszenzspuren auftreten kann, ist, dass Fluoreszenzspuren, die auf Grund von zwei Sonden, die an ein Neutravidin gebunden haben, oder Spuren, die auf unspezifische Fluoreszenz zurückzuführen sind, analysiert werden und zu der Statistik bei der Zeitabhängigkeit der Zustände beitragen. Die Tendenz bei der Analyse über die gaußförmige Verteilung



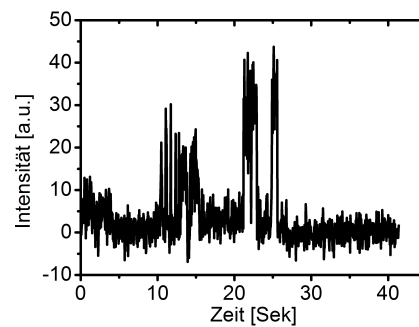
(a) Fluoreszenzspur einer Sonde ohne Zugabe von Kupfersulfat.



(b) Fluoreszenzspur einer Sonde nach Zugabe von 200 nM Kupfersulfat.



(c) Fluoreszenzspur einer Sonde nach Zugabe von 400 nM Kupfersulfat.

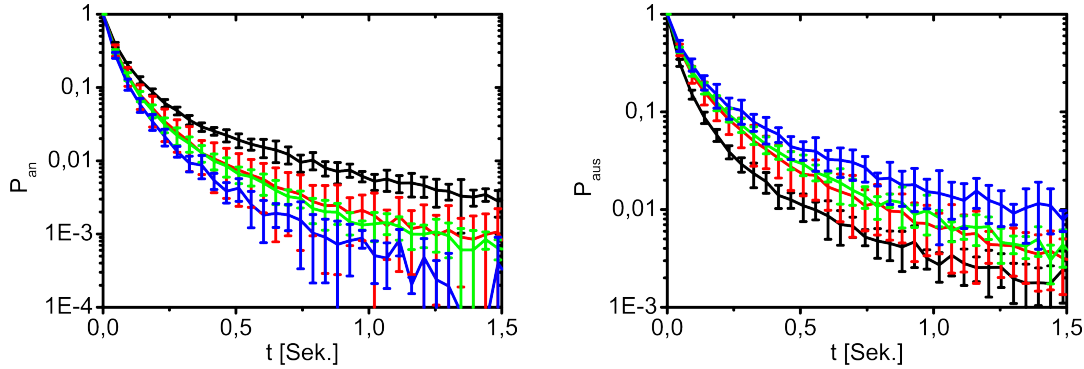


(d) Fluoreszenzspur einer Sonde nach Zugabe von 2 µM Kupfersulfat.

Abbildung 3.17.: Analyse der Fluoreszenzfluktuationen einzelner Sonden bei einer Belichtungszeit von 10 ms pro Bild.

der Fluoreszenz neigt allerdings dazu, dass eine Fluoreszenzverteilung eher als nicht-fluoreszent gemessen wird. Davon ausgehend, zeigen die Auftragungen in Abbildung 3.18 einen systematischen Fehler in Richtung kürzerer An-Zustände als es in Wirklichkeit der Fall ist. Dieser systematische Fehler ist bei der Interpretation der Messdaten zu beachten.

Die amplitudengewichteten Fitparameter der Zeiten sind in Tabelle 3.8 aufgetragen. Diese können durch den systematischen Fehler aber nicht als absolute Werte betrachtet werden und dienen lediglich dazu, den aus den konfokalen bekannten Trend qualitativ zu reproduzieren und eine qualitative Abhängigkeit von der Kupferkonzentration zu zeigen. Basierend auf den Grundlagen dieser Analyse, mit der es möglich war, unterschiedliche Fluoreszenzfluktuationen auf Grund von Unterschieden bei der Kupferkonzentration zu visualisieren, wurde im Folgenden bewiesen, dass die Fluoreszenzfluktuationen lediglich von der Kupferkonzentration und nicht von der eingestrahlten Laserleistung abhängen.



(a) Wahrscheinlichkeit der Länge der fluoreszenten Zustände ohne Kupfer (schwarz), mit 500 nM (rot), 2 μM (grün) und 10 μM Kupfersulfat (blau).

(b) Wahrscheinlichkeit der Länge der nicht-fluoreszenten Zustände ohne Kupfer (schwarz), mit 500 nM (rot), 2 μM (grün) und 10 μM Kupfersulfat (blau).

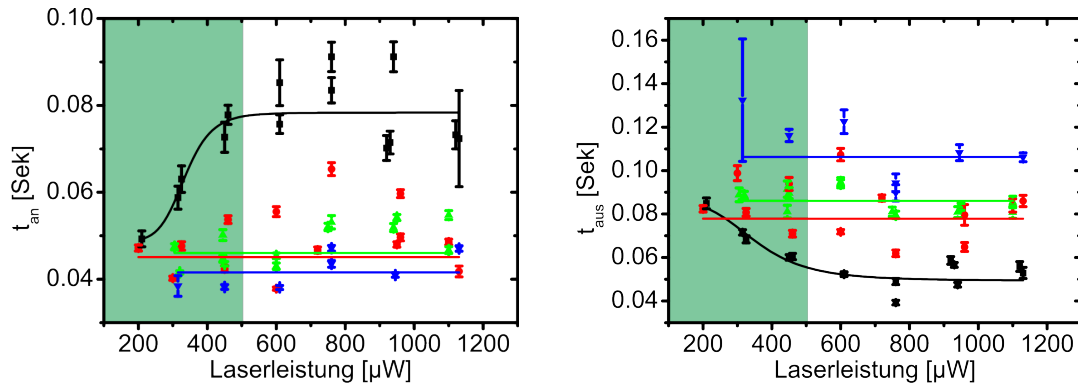
Abbildung 3.18.: Gewichtete Wahrscheinlichkeit der zwei Zustände

Kupferkonzentration [μM]	τ_{An} [s]	τ_{Aus} [s]
0	0,08	0,05
0,5	0,05	0,08
2	0,05	0,09
10	0,04	0,11

Tabelle 3.8.: Amplitudengewichtete Fitparameter an den bi-exponentiellen Abfall aus Abb. 3.18.

Leistungsunabhängigkeit der Fluktuationen

Die grundlegende Motivation dieser Arbeit ist die Entkopplung der Übergänge zwischen fluoreszente und nicht-fluoreszente Zustand von der Lichteinstrahlung. Um zu zeigen, dass die Bindung von Kupfer der zu Grunde liegende Mechanismus hinter den Fluktuationen ist, wurden, analog zu Kapitel 3.4, Messreihen bei verschiedenen Laserintensitäten und unterschiedlichen Kupferkonzentrationen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte wiederum über die Gewichtung der Zustände und einen anschließenden bi-exponentiellen Fit. Um die Abhängigkeit der Fluktuationen von der Laserintensität zu testen, wurde die Dauer der Zustände gegen die eingestrahlte Leistung aufgetragen (vgl. Abb. 3.19). Wie in Abbildung 3.19 (a) zu sehen ist, nimmt die Länge der An-Zustände stark mit ansteigender Kupferkonzentration ab. Die Laserintensität spielt ab einer Schwelle von etwa 500 μW keine Rolle mehr. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Farbstoffe bei 500 – 600 μW ihre Sättigung erreichen. Vor Erreichen der Sättigung ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis so schlecht, dass die detektierten Fluoreszenzphotonen nicht durch eine Gauß-Kurve annäherbar sind. Dadurch ist es mit der Analyse nicht möglich, sinnvolle Fluoreszenzspuren zu rekonstruieren. Die Länge der An-Zeiten ist unabhängig von der Kupferkonzentration und gibt keine Aussage über die wirklichen Fluktuationen. Nach Erreichen der Sättigung ist keine systematische Abhängigkeit der An-Zustände in Abhängigkeit der Laserleistung zu erkennen, lediglich die Abhängigkeit von der Kupferkonzentration wird deutlich.



(a) Länge der An-Zustände in Abhängigkeit der eingestrahnten Laserleistung und bei verschiedenen Kupferkonzentrationen: ohne Kupfer: Schwarz; 500 nM: Rot; 2 μ M: Grün und 10 μ M Kupfersulfat.

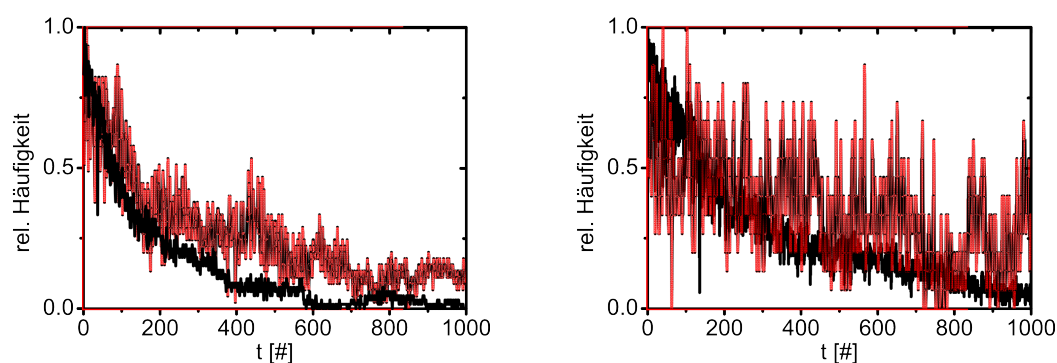
(b) Länge der Aus-Zustände in Abhängigkeit der eingestrahnten Laserleistung und bei verschiedenen Kupferkonzentrationen: ohne Kupfer: Schwarz; 500 nM: Rot; 2 μ M: Grün und 10 μ M Kupfersulfat.

Abbildung 3.19.: Unabhängigkeit der Fluktuationen von der Laserleistung

Bei der Analyse der Länge der Aus-Zeiten verhält es sich ähnlich (vgl. Abb. 3.19 (b)). Sobald die Sättigungsleistung von 500 μ W erreicht ist, bleiben die Aus-Zeiten konstant, während es bis zum Erreichen der Sättigung auf Grund der Analysemethode zu statistischen Schwankungen kommt. Im Gegensatz zur Unabhängigkeit von der Laserleistung existiert aber, wie bei den An-Zeiten, eine Abhängigkeit von der Kupferkonzentration. Anhand der Daten aus den leistungsabhängigen Messungen lässt sich festhalten, dass es sich bei der Fluoreszenzlöschung nicht um einen lichtgetriebenen Prozess handelt, was darauf schließen lässt, dass die Löschung der Fluoreszenz nur auf die Komplexierung des Kupfer-Ions zurückzuführen ist.

Photostabilität

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Lokalisationsmikroskopie ist die Photostabilität. Da die Lokalisationsmikroskopie darauf basiert, über eine sehr lange Zeit unterschiedliche Fluorophore abzubilden, müssen die Fluorophore lange genug in der Lage sein, Photonen zu emittieren. Dies wird bei den lichtgetriebenen Methoden, wie etwa STORM (vgl. Kap. 1.6.1) dadurch erreicht, dass die Messungen in einem photostabilisierendem Puffer-System durchgeführt werden [42, 142]. Um einen Einblick in die Photostabilität des Tetramethylrhodamins zu gewinnen, wurden verschiedene Proben auf ihre Lebensdauer vor der Photozerstörung untersucht. Dazu wurde sowohl ein TMR, der an ein biotinyliertes Polyethylenglycol gekoppelt wurde, um eine Bindung an Neutravidin zu ermöglichen als auch die hybridisierte Sonde über das beschriebene Protokoll immobilisiert und bei Abwesenheit von Kupfersulfat und bei Anwesenheit von Kupfer-Ionen vermessen. Dazu wurden mithilfe der Lokalisationsanalyse die Fluoreszenzemitter in jedem Bild gefunden und ihre Anzahl in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. In Abbildung 3.20 (a) ist die relative Häufigkeit der Lokalisationen von beiden Proben in reinem Puffer dargestellt. Während bei dem TMR (schwarz) nach ca. 400 Bildern nur noch etwa 10% der Emmitter vorhanden sind, und nach etwa 550 Bildern nahezu keiner mehr, ist die Stabilität der Sonde erhöht. Die Sonde weist



(a) Normierter Verlauf der gefundenen Lokalisationen pro Frame über die Zeit für einen immobilisierten TMR Farbstoff (schwarz) und die Sonde (rot). Nach 400 Bildern ist fast kein Farbstoff mehr aktiv (vgl. Filme C.1 (c)), während bei der Messung mit der Sonde selbst noch nach 1000 Bildern Lokalisationen gefunden werden (vgl. Filme C.1 (d)).

(b) Normierter Verlauf der gefundenen Lokalisationen pro Frame über die Zeit für einen immobilisierten Farbstoff bei einer Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat (schwarz) und für die Sonden bei einer Kupfersulfatkonzentration von $6\ \mu\text{M}$. Der Farbstoff zeigt eine deutlich höhere Photostabilität, während bei der Sonde kaum eine Abnahme der Lokalisationen über die Zeit zu erkennen ist (vgl. Filme C.1 (e)).

Abbildung 3.20.: Photostabilität von TMR und der Sonde. Zur besseren Darstellung sind die Graphen in Abbildung B.10 nochmal einzeln dargestellt.

selbst nach 1000 Bildern noch mehr als 10 % aktive Fluoreszenzemitter auf. Wird den beiden Proben Kupfersulfat zugegeben, ist das Verhalten leicht verändert (vgl. Abb. 3.20 (b)). Die fluoreszierende Fraktion an TMR sinkt bei einer Kupferkonzentration von $6\ \mu\text{M}$ nach 400 Bildern auf knapp 20 % und nach 1000 Bildern auf etwa 10 % ab, ist also deutlich photostabiler als bei Abwesenheit von Kupfer. Bei der Sonde tritt nun allerdings die Fluoreszenzkinetik in den Vordergrund, so ist nicht, wie bei der Photozerstörung, ein exponentieller Abfall vorhanden, stattdessen sind über die 1000 Bilder verteilt, durchgängig etwa 50 % der maximal gefundenen Lokalisationen aktiv. Die Abnahme an Fluoreszenzemittern durch Photozerstörung über diesen Bereich von 1000 Bildern ist also sehr gering. Um diese erhöhte Photostabilität bei Zugabe von Kupfer zu verstehen, spielt der Mechanismus der Photozerstörung eine wichtige Rolle. Photozerstörung geschieht zumeist aus dem angeregten Zustand eines Fluorophors. Dadurch, dass der Farbstoff mit dem Kupfer-Ion wechselwirken kann, geschieht die Depopulation aus dem angeregten Zustand viel schneller als die eigentliche Länge der Fluoreszenzlebensdauer. Mit der verkürzten Verweilzeit im angeregten Zustand sinkt auch die Wahrscheinlichkeit der Photozerstörung aus dem angeregten Zustand [36]. Der Unterschied in der Photostabilität bei Abwesenheit des Kupfersulfat ist eventuell auf eine Reaktion des BiPy mit Sauerstoff zurückzuführen, aber dies lässt sich mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen nicht beweisen.

Zusammenfassung der Eigenschaften der Sonde auf Einzelmolekülebene

Mit Hilfe des einzelmolekülsensitiven Mikroskops konnte gezeigt werden, dass Fluoreszenzfluktuationen der Sonde beobachtet werden können. Die Zeitauflösung des Mi-

roskopos reicht aus, um fluoreszente An-Zustände und gelöschte Aus-Zustände zu unterscheiden (vgl. Abb. B.9). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die zu Grunde liegende Kinetik weitgehend unabhängig von der eingestrahlten Laserleistung ist und es sich somit um eine Löschung der Fluoreszenz aus dem S_1 Zustand des Fluorophors handelt. Mit diesen Parametern erfüllt die Sonde die Grundvoraussetzungen, um für die Lokalisationsmikroskopie verwendet werden zu können. Eine zusätzliche Eigenschaft der Sonde ist eine intrinsische Erhöhung der Photostabilität. Im Gegensatz zu den Farbstoffen, wie sie bei lichtgetriebenen Methoden verwendet werden, ist die Lebensdauer der Farbstoffe allein durch die Anwesenheit des Liganden so stark erhöht, dass bei 25 Hz über einen Zeitraum von 1000 Bildern, was einer Gesamtzeit von etwa 40 Sekunden entspricht, noch etwa 25 % der Farbstoffe aktiv sind. Durch Zugabe von Kupfer ist die Stabilität der Sonde sogar noch stärker erhöht, so dass keine wirkliche Abnahme an Fluoreszenzemittern sichtbar ist. Ein kritischer Parameter für die Anwendbarkeit der Sonde ist nichtsdestotrotz, ob das Verhältnis der Länge von An- und Aus-Zuständen gering genug ist, so dass einzelne Farbstoffe unter biologischen Bedingungen getrennt visualisierbar sind [117]. Dies wird im folgenden Kapitel untersucht.

3.5. Lokalisationsmikroskopie in biologischen Proben

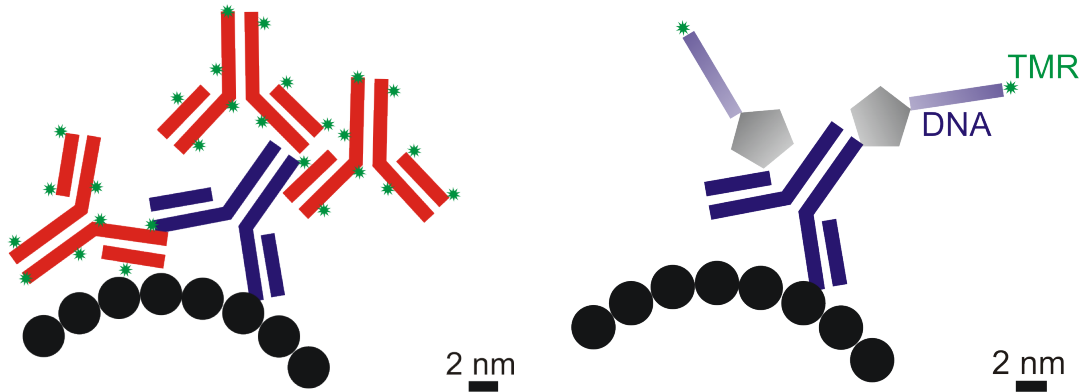
Um die Applikation der Sonde in biologischen Proben zu testen, wurde eine bekannte Struktur gewählt. Besonders interessante Untersuchungsobjekte für Lokalisationsmikroskopiemethoden sind die Elemente des Zytoskeletts (vgl. Kap. 1). Aus dieser Familie wurde das Tubulinskelett als Ziel ausgewählt. Die Markierung des Zytoskeletts fand nach einem abgewandelten Standardprotokoll statt. Dazu wurde ein biotinylierter Primärantikörper gegen Tubulin mit Streptavidin und anschließend mit der Sonde markiert (vgl. Kapitel 5.6). Im Gegensatz zu der Standardmarkierung über farbstoffmarkierte Sekundärantikörper, die darauf abzielt, eine möglichst große Signalverstärkung zu erreichen, ist bei der Markierung über die verwendete Methode das Verhältnis zwischen Zielprotein und Farbstoff geringer. Abbildung 3.21 zeigt zwei maßstabsgetreue Skizzen, um die Unterschiede der Markierungen darzustellen [143, 144]. Ausgehend von einem einzelnen Zielprotein, an das ein Primärantikörper bindet, erhält man als Signalamplifikation für die gebräuchliche Markierung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern:

$$1 \text{ Primärantikörper} \rightarrow \frac{3 \text{ Sekundärantikörper}}{\text{Primärantikörper}} \rightarrow \frac{2 - 8 \text{ Farbstoffe}}{\text{Sekundärantikörper}} \quad (3.15)$$

Für einen realistischen Wert von sechs Farbstoffen pro Sekundärantikörper folgt also ein Verhältnis von 18 Fluorophoren pro Primärantikörper. Für das verwendete Protokoll hingegen ergibt sich ein Markierungsverhältnis von:

$$1 \text{ Primärantikörper} \rightarrow \frac{2 - 8 \text{ Biotin}}{\text{Primärantikörper}} \rightarrow \frac{0 - 1 \text{ Avidin}}{\text{Biotin}} \rightarrow \frac{0 - 3 \text{ Sonden}}{\text{Avidin}} \quad (3.16)$$

Bei der Markierung über die verwendete Methode mit Biotin und Streptavidin ist zu beachten, dass die angegebenen Werte lediglich die Grenzen angeben, die erreicht werden können. Auf Grund der statistischen Natur sind jedoch geringere Werte zu erwarten. So wurde bei der Herstellung der Einzelmoleküloberflächen (vgl. Kap. 5.5)



(a) Maßstabsgetreue Skizze einer Standardmarkierung vom Tubulinskelett mit Sekundärantikörpern.

(b) Maßstabsgetreue Skizze der verwendeten Markierung mit der Sonde (vgl. Kap. 5.6).

Abbildung 3.21.: Skizze der Markierung von Proteinen mit Antikörpern.

beobachtet, dass es selten mehr als eine Bindung mehrerer Sonden an ein Avidin gibt. Daraus folgt, dass das Verhältnis von Fluorophoren pro Primärantikörper eine Größenordnung unter der Markierungsmethode mit den Sekundärantikörpern liegt. Um den Einfluss der verschiedenen Stöchiometrien zu simulieren, wurden für die beiden Protokolle, anhand von realitätsnahen Zufallszahlen, Verteilungen der zu erwartenden Markierungsdichte durchgeführt (vgl. Abb. B.11). In Abbildung B.11 (a) ergibt sich für die zu erwartende Anzahl an Fluorophoren eine Verteilung um einen Erwartungswert mit etwa 14 Fluorophoren / Antikörper. Teilbild (b) stellt die zu erwartende Verteilung, bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Markierung, dar. Neben der höchsten Wahrscheinlichkeit für keine Markierung pro Antikörper, ergibt sich ein Erwartungswert von 4 Fluorophoren / Antikörper. An diesen Verteilungen wird deutlich, wie stark die Markierungsdichte bei den beiden Methoden voneinander abweicht. Um sterische Einflüsse bei der Färbung des Tubulinskeletts auszuschließen, wurde die Größe der Markierung, die durch die unterschiedlichen Methoden entsteht, abgeschätzt. Die Größe der Komplexe ist bei beiden Methoden recht ähnlich (vgl. Abb. 3.21). Durch die verwendete Markierungsmethode ergeben sich sowohl ein Vorteil als auch ein Nachteil für die Lokalisationsmikroskopie-Messungen:

- (–) Die rekonstruierte Struktur wird nicht so dicht sein wie in einem Fall, in dem durch die Verwendung von farbstoffmarkierten Sekundärantikörpern eine dichtere Markierung erreicht wird.
- (+) Das notwendige Verhältnis $\frac{\tau_{\text{aus}}}{\tau_{\text{an}}}$ ist proportional zu der Farbstoffdichte [117]. Daraus folgt, dass bei einer geringeren Dichte an Fluorophoren die Fluktuationen nicht so stark in einen Aus-Zustand getrieben werden müssen, was die Anforderungen an den zu Grunde liegenden Mechanismus vereinfacht. Dies verringert außerdem die Gesamtzeit, die für die Messung notwendig wird.

Die Messung

Die Messung der Proben erfolgte bei unterschiedlichen Kupferkonzentrationen, um den Einfluss des Kupfers zu untersuchen. Um unspezifische Fluktuationen und Hintergrundeffekte auszuschließen, wurde zunächst eine Messung in MOPS-Puffer durchgeführt, jedoch ohne Zugabe von Kupfersulfat. In der Bildserie von Abb. 3.22 ist das markierte Tubulinskelett einer Zelle ohne Zugabe von Kupfer zu sehen. Es sind über den gesamten beobachteten Zeitraum kaum Fluoreszenzfluktuationen wahrnehmbar, lediglich die Photozerstörung findet statt. Der Film aus Tabelle C.2 (a) zeigt die Photozerstörung zu Beginn der Messung, der Film aus Eintrag (b) zeigt, dass auch nach andauernder Photozerstörung, keine Fluoreszenzfluktuationen der verbleibenden Farbstoffe beobachtet werden können. Nach ca. 4000 Bildern war keine Fluoreszenz mehr vorhanden, die Probe war komplett ausgebleicht.

Durch die Zugabe von $12\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat lässt sich ein Blinken der Sonden induzieren (vgl. Abb. 3.23). Ein Problem bei der Messung ist allerdings, dass zu Beginn, wie in dem Film aus Tab. C.2 (c) gezeigt, keine Fluktuationen zu erkennen sind. Dies ist auf die Autofluoreszenz der Zellen, die zu Beginn der Messung noch präsent ist, und auf defekte Proben, bei denen entweder der Ligand oder der komplette Gegenstrang fehlt, zurückzuführen. Nach einer durchgehenden Anregung der Probe über 1,5 Minuten sind aber die Fluktuationen der Sonden dominant (vgl. Film aus Tab. C.2 (d)) und können für einen Zeitraum von bis zu 20 Minuten beobachtet werden.

Auswertung der Daten

Um zu testen, ob die Fluktuationen der Fluoreszenz geeignet sind, um ein hochaufgelöstes Bild der zu Grunde liegenden Struktur zu reproduzieren, wurden mehrere Zellen, die ein markiertes Zytoskelett besaßen, gemessen und die Daten mit einer Lokalisationssoftware analysiert (vgl. Kap 5.6). Kritische Parameter für die Lokalisationsanalyse sind zum einen die Markierungsdichte der Proben in Verbindung mit dem Verhältnis von $\frac{\tau_{\text{aus}}}{\tau_{\text{an}}}$ und zum anderen die Anzahl der detektierten PSFs, bevor der Farbstoff einer Photozerstörung unterläuft. Um den Einfluss der Blinkkinetik und der Markierungsdichte zu untersuchen, wurden unterschiedliche Strukturen, bei unterschiedlichen Kupferkonzentrationen untersucht. Für eine Struktur mit geeigneter Markierungsdichte, bei der die Fluktuationen der Sonden die Lokalisation einzelner Fluorophore zulassen, ergibt sich schon nach der Untersuchung weniger Bilder eine Rekonstruktion der Struktur (vgl. Film aus Tab. C.2 (e)). Für diesen Fall ist in Abb. 3.24 (a) das Summenbild über 1000 Einzelaufnahmen gezeigt und in (b) das zugehörige rekonstruierte Lokalisationsbild.

Wird die Menge an Kupfer stark erhöht, in dem Fall von den Daten, die in dem Film aus Tab. C.2 (f) gezeigt werden, beträgt die Kupferkonzentration $40\ \mu\text{M}$, so dass kaum noch Fluktuationen, die sich mit der CCD-Kamera messen lassen, auftreten, ist es zwar weiterhin möglich einzelne PSFs zu lokalisieren, das rekonstruierte Bild weist jedoch nach der gleichen Anzahl analysierter Bilder wie in Abb. 3.24 deutlich weniger Strukturinformationen auf (vgl. Abb. 3.25). Bei einer Analyse von Daten, bei denen keine Fluoreszenzfluktuationen auftreten wie in dem Film aus Tabelle C.2 (b), können Artefakte in dem Lokalisationsbild auf Grund von einer heterogenen Farbstoffdichte entstehen. Dies geschieht z. B. wenn sich Filamente kreuzen und somit ein regionales

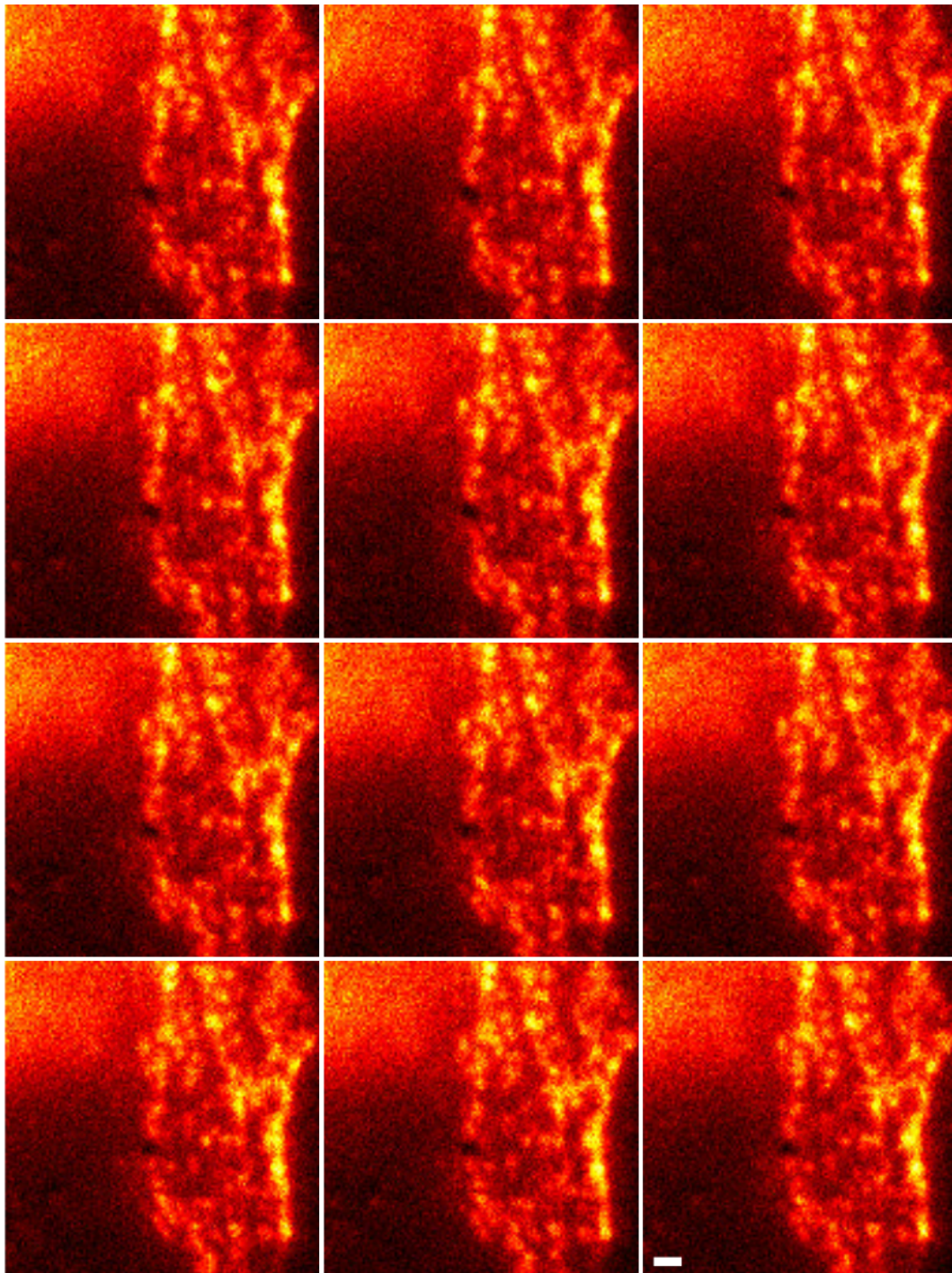


Abbildung 3.22.: Eine Probe ohne Zugabe von Kupfer. Man kann lediglich ein sukzessives Bleichen der Probe beobachten, bis kein Farbstoff mehr aktiv ist. Hier sind die Bilder 1480 – 1491 einer Aufnahme gezeigt (vgl. Filme (a) und (b) aus Tabelle C.2). Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

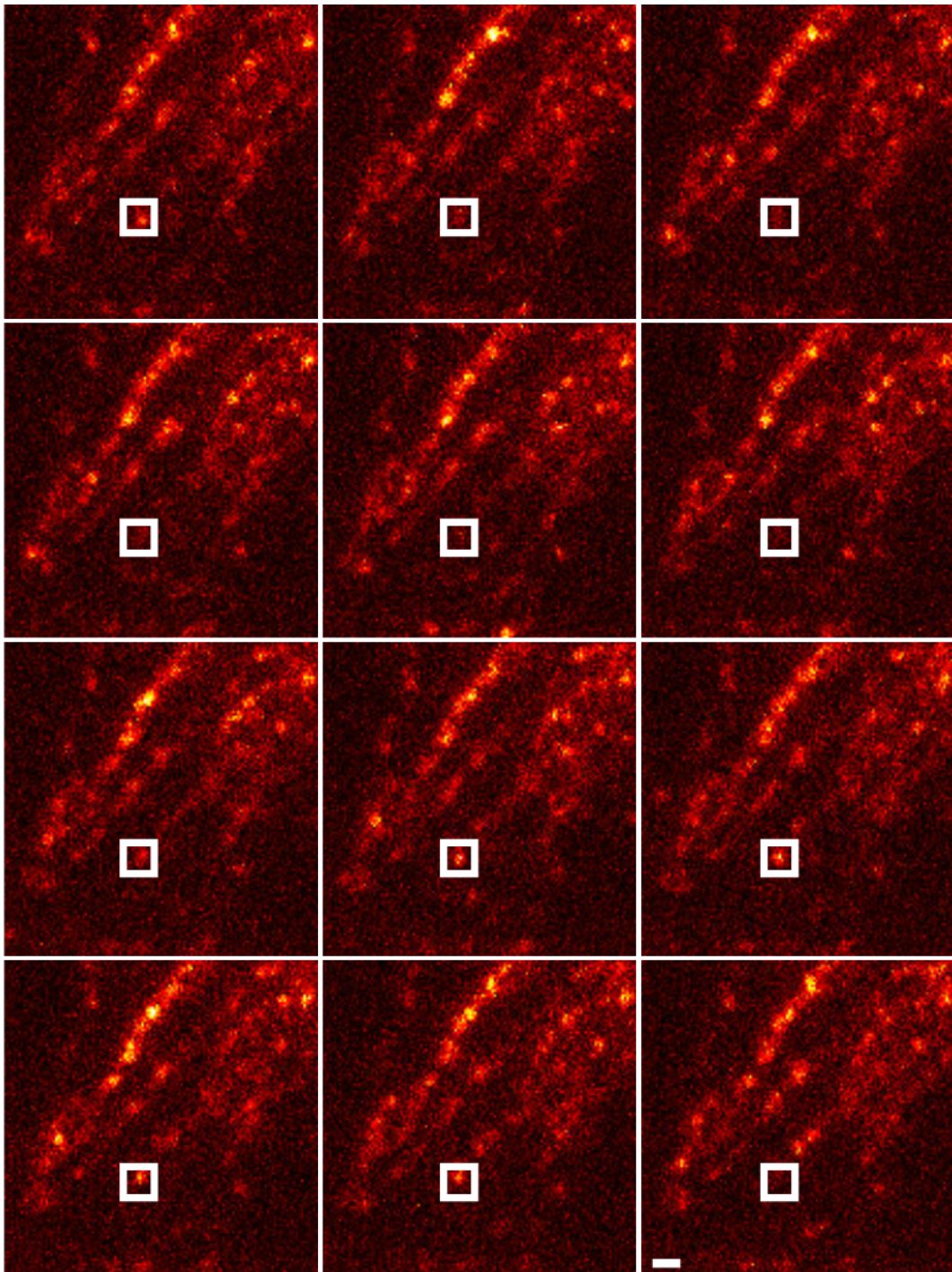
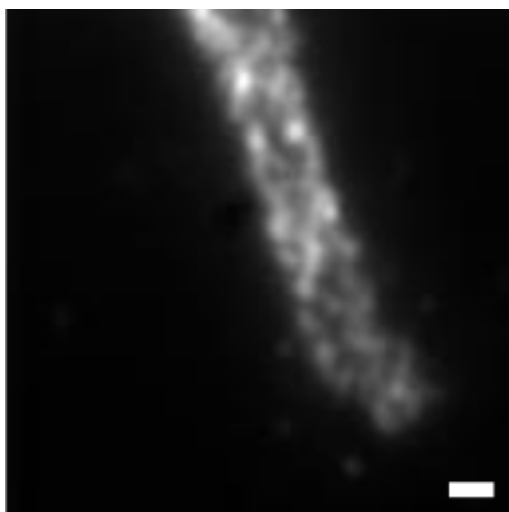
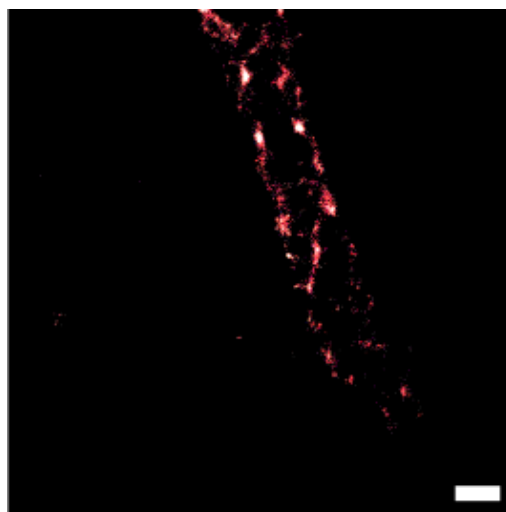


Abbildung 3.23.: Eine Probe nach Zugabe von $12\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat. Man kann anhand der Einzelbilder getrennte Blinkevents wahrnehmen (vgl. den eingerahmten Bereich). Hier sind die Bilder 5900 – 5911 einer Aufnahme gezeigt (vgl. Filme (c) und (d) aus Tabelle C.2). Der Maßstabsbalken entspricht $1\ \mu\text{m}$.

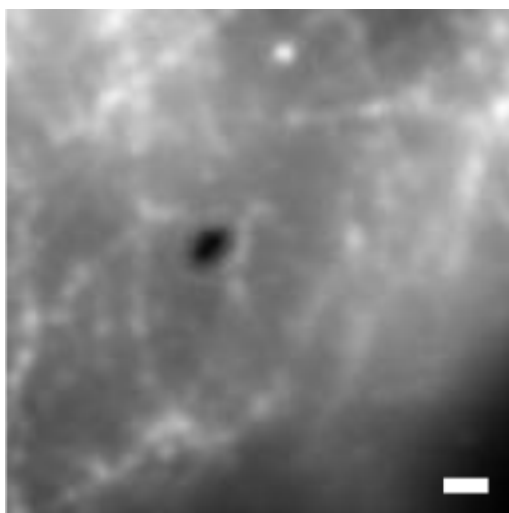


(a) Summenbild über 1000 Bilder von einem Tubulinskelett (vgl. Film aus Tab. C.2 (e)). Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

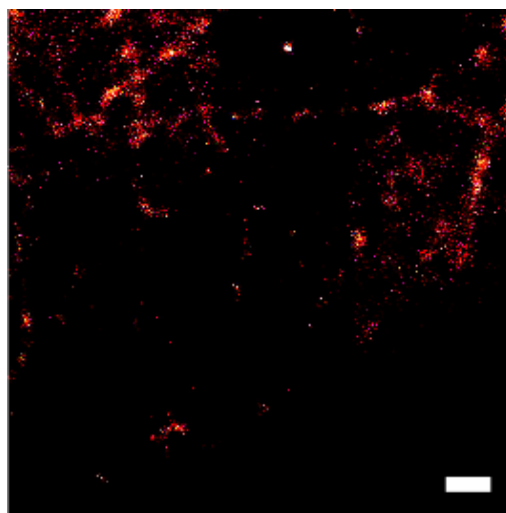


(b) Rekonstruktion der Lokalisationen der 1000 Einzelbilder in einem Bild mit 10 \times höherer Auflösung (vgl. Film aus Tab. C.2 (e)). Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

Abbildung 3.24.: Auflösungsverbesserung durch Lokalisationsmikroskopie mithilfe der Sonde bei einer Kupferkonzentration von 12 μM .

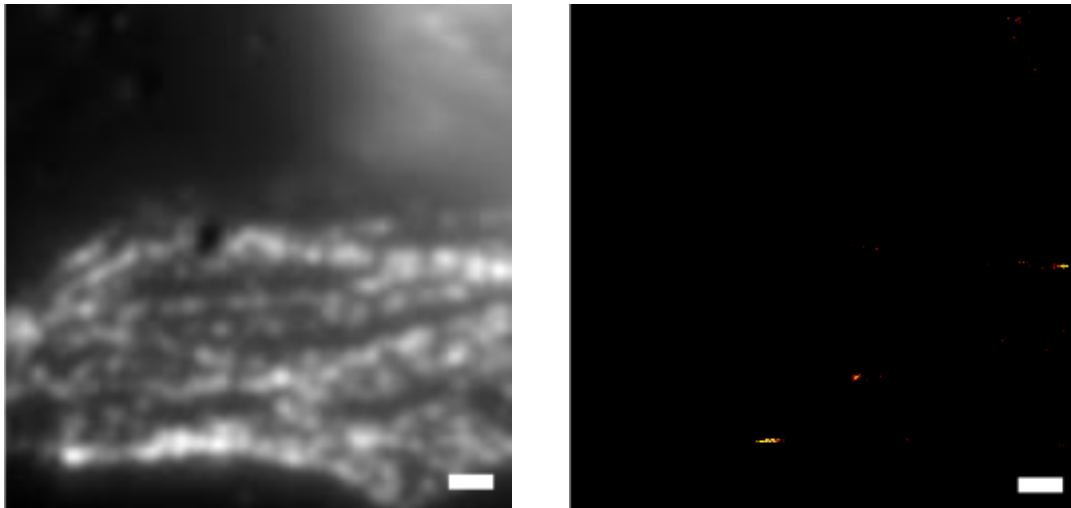


(a) Summenbild über 1000 Bilder eines Tubulinskeletts bei einer Kupferkonzentration von 40 μM (vgl. Film aus Tab. C.2 (f)). Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .



(b) Rekonstruktion der Lokalisationen der 1000 Einzelbilder in einem Bild mit 10 \times höherer Auflösung (vgl. Film aus Tab. C.2 (f)). Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

Abbildung 3.25.: Artefakte durch die Lokalisationsmikroskopie mit der Sonde bei einer hohen Kupferkonzentration.



(a) Summenbild über 1000 Bilder eines Tubulinskeletts ohne Zugabe von Kupfer (vgl. Filme C.2 (b)). Der Maßstabsbalken entspricht $1\ \mu\text{m}$.

(b) Rekonstruktion der Lokalisationen der 1000 Einzelbilder in einem Bild mit $10\times$ höherer Auflösung (vgl. Filme C.2 (b)). Der Maßstabsbalken entspricht $1\ \mu\text{m}$.

Abbildung 3.26.: Artefakte durch die Lokalisationsanalyse wenn keine Fluoreszenzfluktuationen vorliegen.

Intensitätsmaximum zu sehen ist. Solche Bereiche werden in der Analyse als PSF behandelt und führen zu Artefakten bei einem ansonsten leeren Bild (vgl. Abb. 3.26).

Ein weiterer Parameter, der bei der Lokalisationsmikroskopie eine Rolle spielt, ist die zeitliche Verteilung der Fluktuationen.

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Lokalisationen eine zeitliche Abhängigkeit aufweisen [145], wurde eine Lokalisationsanalyse über 14500 Einzelbilder einer Datenaufnahme und zusätzlich zu der Häufigkeit der Lokalisationen (vgl. Abb. 3.27 (a)) eine zeitliche Auftragung der gefundenen PSFs durchgeführt (vgl. Abb. 3.27 (b)). Die meisten Stellen des rekonstruierten Bildes weisen dabei keine zeitliche Abhängigkeit auf, was ein Indiz für eine zeitlich unabhängige Fluktuation ist.

Zusammenfassung der Daten aus den Lokalisationsmikroskopiemessungen auf dem TIRF-Mikroskop

Es konnte gezeigt werden, dass die Probenpräparation mit dem entwickelten Markierungsprotokoll (vgl. Kap. 5.6) geeignet ist, um das Tubulinskelett von Zellen zu markieren. Die Markierungsmethode führt zu einer dünneren Dichte an Farbstoffen als die typischen Markierungen über Sekundärantikörper, die in der Immunohistochemie verwendet werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass fixierte Zellen die Mechanismen der Kupferkomplexierung nicht beeinflussen, da bei der Negativ-Kontrolle ohne Kupfersulfat keine Fluktuationen zu beobachten waren. Durch Zugabe von Kupfersulfat, mit einer Konzentration von $12\ \mu\text{M}$, konnten Fluoreszenzfluktuationen induziert werden, deren Kinetik zu Zwecken der Lokalisationsmikroskopie genutzt werden kann. Unter Einbezug der Photostabilität lässt sich festhalten, dass sich über einen Zeitraum von 20 Minuten die herbeigeführten Intensitätsfluktuationen der Kupfersonde ausnutzen

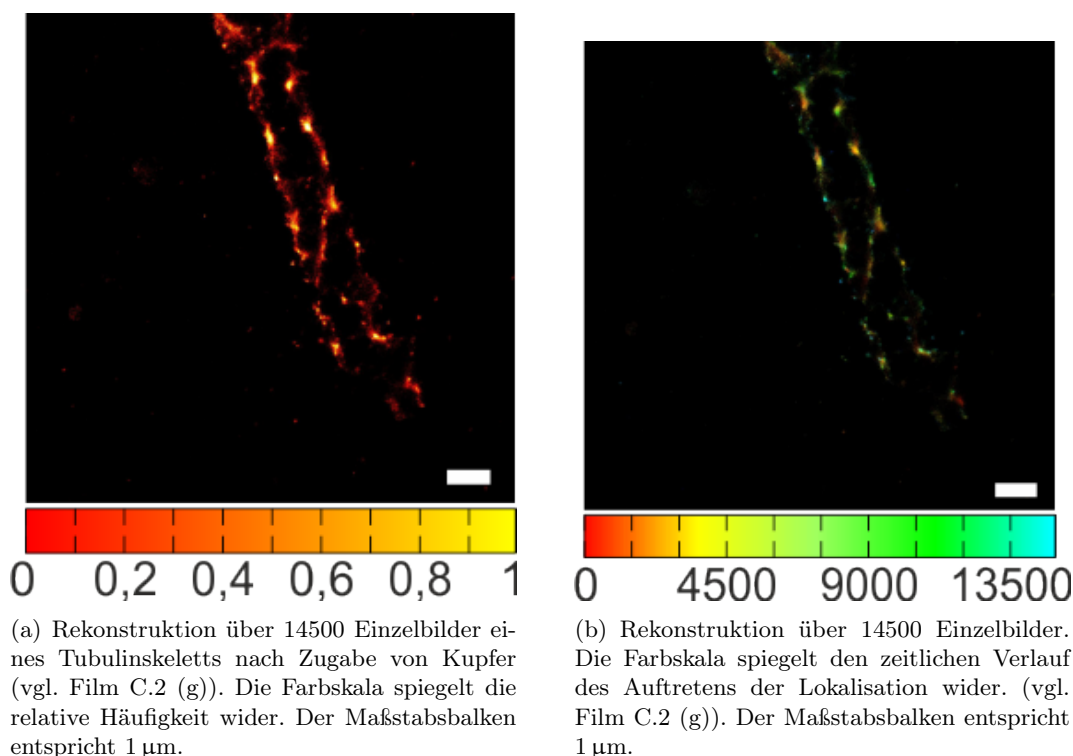


Abbildung 3.27.: Analyse der zeitlichen Verteilung der Fluktuationen.

lassen, um Hochauflösungsmikroskopie zu betreiben. Weitere Beispiele für die Anwendung der Lokalisationsanalyse, um ein hochaufgelöstes Bild der zu Grunde liegenden Struktur zu erhalten, sind in den Abbildungen 3.28 und B.12, B.13, B.14, B.15, B.16 im Anhang gezeigt. Um zu veranschaulichen, dass mehrere Farbstoffe, die sich unter der Beugungsgrenze befinden, voneinander getrennt werden können, ist in Abb. 3.29 der Querschnitt durch die Zelle aus Abb. B.17 gezeigt. Es lassen sich mindestens drei Fasern voneinander unterscheiden, die im Summenbild durch die Superposition der einzelnen PSFs nicht auflösbar sind.

3.6. Chemisches Multiplexing

Neben der Umgehung der Beugungsgrenze, um Strukturen besser auflösen zu können, spielt in der Biologie besonders die Interaktion zwischen zwei wechselwirkenden Proteinen eine Rolle. Nahezu jeder Mechanismus in Zellen beruht auf der Interaktion von Proteinen. Um zu bestimmen, wie die Wechselwirkungen stattfinden können, ist es deshalb interessant, mehrere Ziele gleichzeitig zu markieren und auf Kolokalisation zu testen. Die Untersuchung von mehreren Zielen erfolgt in den meisten Fällen durch Nutzung von unterschiedlichen Farbkanälen. Dadurch entstehen jedoch Abweichungen auf Grund chromatischer Aberrationen (vgl. Kap. 1.2). Diese Aberrationen fallen besonders bei Methoden der Hochauflösungsmikroskopie ins Gewicht. Eine Lösung dieser Problematik besteht darin, zweimal den gleichen Farbstoff zu benutzen und die Unterscheidung der beiden markierten Ziele auf andere Weise zu erreichen. Da bei der

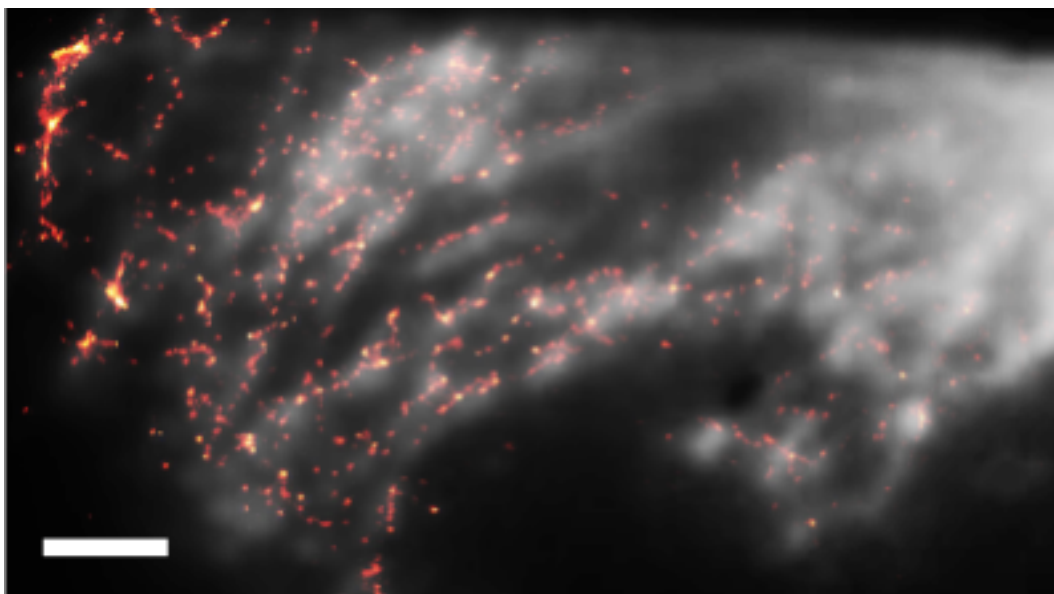


Abbildung 3.28.: Durch den Einsatz der Lokalisationsmikroskopie in Verbindung mit intrinsisch blinkenden Proben lässt sich die Auflösung signifikant verbessern (vgl. Abb. B.17). Der Maßstabsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$.

Sonde eine chemisch reversible Reaktion vorliegt, besteht eine Möglichkeit das chemische Schalten als zusätzlichen Parameter zu den photophysikalischen Eigenschaften zu nutzen.

Um die Anwendung der Sonde für diese Art des Multiplexing zu testen, wurde eine Zelle mit einer doppelten Färbung hergestellt. Zum einen wurde ein mit Tetramethylrhodamin markierter Sekundärantikörper gegen alle Fragmente des biotinylierten Primärantikörpers (vgl. Kap. 5.6) verwendet, zum anderen wurde die etablierte Markierung über Streptavidin und die Sonde verwendet. Zu Beginn der Messung wurde die Fluoreszenz der Sonde durch die Zugabe einer Kupferkonzentration von $25\ \mu\text{M}$ so weit ausgeschaltet, dass keine Fluktuationen mehr zu beobachten waren. Dann wurde die Fluoreszenz der Sekundärantikörper so lange angeregt, bis diese komplett geblincht war (vgl. Abb. 3.30 (a)). Anschließend wurde, wie in Abb. 3.30 (b) skizziert, die Fluoreszenz der Sonde durch die Zugabe von EDTA wieder hergestellt. Da, wie bereits bei den Messungen im Ensemble aus Kapitel 3.2 gezeigt, die Bindung von Kupfer-Ionen an EDTA stärker ist als die Bindung des Kupfers durch den Bipyridin-Liganden, geschieht dieser Vorgang quasi instantan.

Um Wechselwirkungen zwischen EDTA und dem Tetramethylrhodamin auszuschließen, wurden, wie in Abb. 3.31 gezeigt, über die TMR-modifizierten Sekundärantikörper einfach gefärbte Zellen angeregt und nach ca. 440 Sekunden andauernder Photozerstörung wurde EDTA zugegeben. Wie in Teilbild (b) zu sehen, führt das Zupipettieren von $50\ \mu\text{M}$ EDTA zu keiner Veränderung der Fluoreszenzintensität. Als Positivkontrolle wurde, um die Reaktivierbarkeit der Fluoreszenz der Sonde durch EDTA zu zeigen, eine Messkammer nach dem Protokoll der Markierung über biotinyliertem Primärantikörper, Streptavidin und Sonde vorbereitet. Vor der Messung wurde mit $25\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat die Fluoreszenz gelöscht (vgl. Abb. 3.32). Durch die Zugabe von

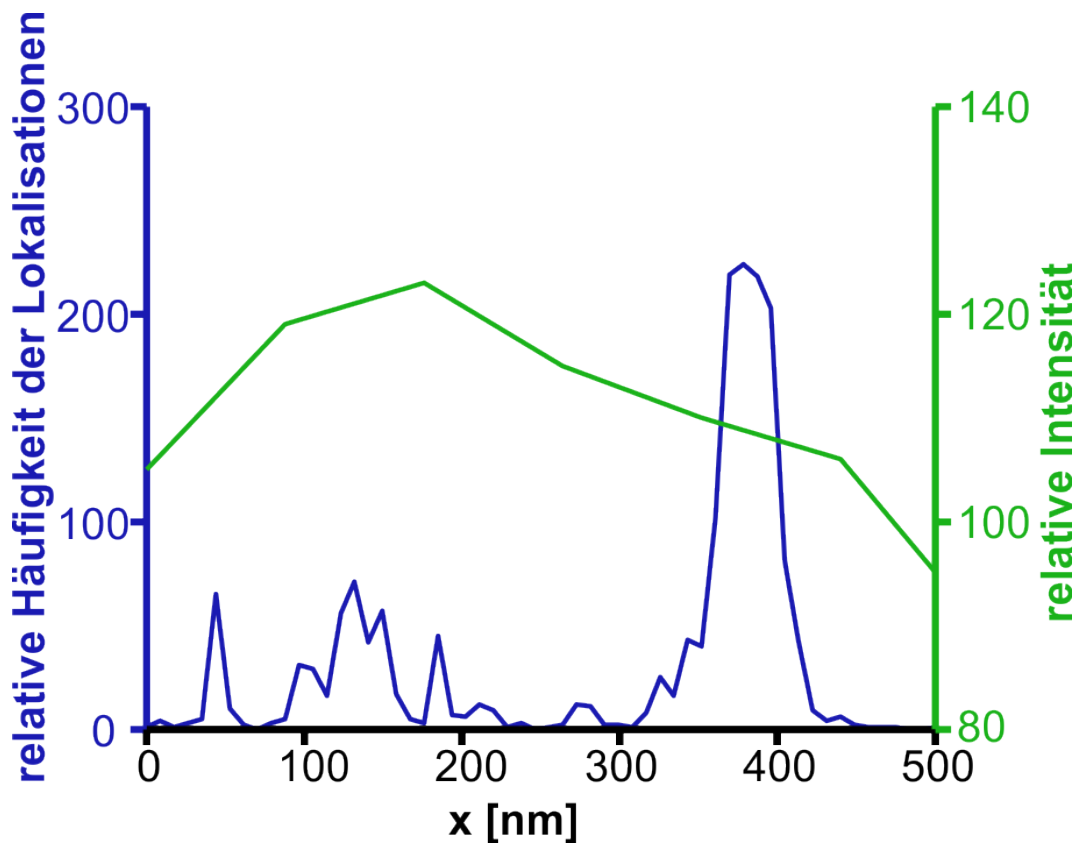
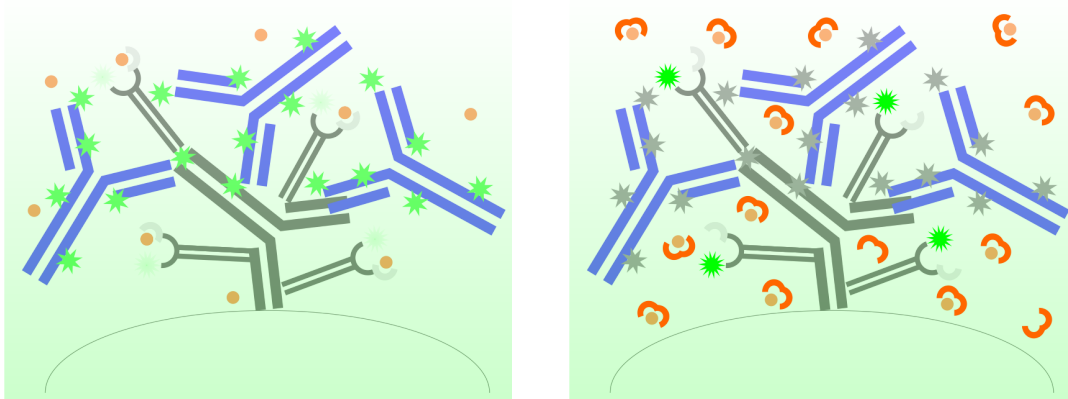


Abbildung 3.29.: Der Querschnitt über einen kleinen Bereich in einer Zelle zeigt deutlich, wie durch die Lokalisationsmikroskopie, aus der Superposition mehrerer Farbstoffe, die zu Grunde liegende Struktur aufgelöst werden kann (vgl. Abb. B.17). Bei dem Summenbild (schwarz) ist lediglich die Superposition der Fluoreszenz von unter der Beugungsgrenze befindlichen Farbstoffen sichtbar, während im Lokalisationsbild (rot) die Farbstoffe deutlich getrennt werden können.



(a) Das Zielprotein wird mit zwei Methoden markiert, beide Methoden benutzen dabei den gleichen Farbstoff (TMR). Durch Zugabe von Kupfer (orangefarbene Kreise) lassen sich die Sonden ausschalten, während die TMR-markierten Sekundärantikörper zur Fluoreszenz angeregt werden.

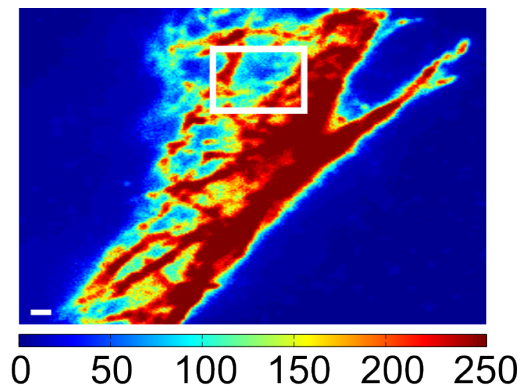
(b) Nach der Photozerstörung der Farbstoffe am Antikörper, wird das Kupfer durch die Zugabe von EDTA gebunden, so dass die Sonde nicht mehr gelöscht ist und fluoreszieren kann.

Abbildung 3.30.: Skizze des Prinzips der chemisch induzierten Multi-Kanal Messungen.

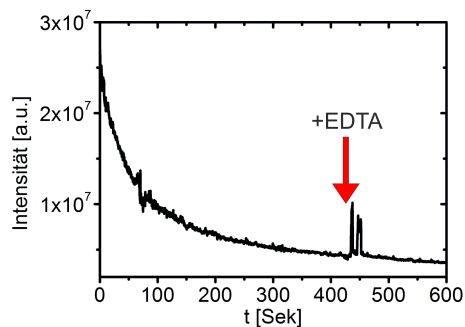
EDTA nach etwa 35 Sekunden wurde die Fluoreszenzintensität, wie in Abb. 3.32 (b) zu sehen, um den Faktor 2,5 erhöht. Neben der Zunahme der Fluoreszenz wird auch deutlich, dass trotz der nahezu komplett gelöschten Probe, eine Photozerstörung zu beobachten ist. Dieser Fakt ist zum einen auf die Autofluoreszenz der Zelle zurückzuführen, zum anderen auf unvollständig hybridisierte oder fehlerhafte Sonden. Auffällig ist auch, dass die Fluoreszenz bei den beiden einfach markierten Proben aus Abb. 3.31 und 3.32 durch die Photozerstörung auf fast die gleiche Intensität ($3,5 \cdot 10^6$) abfällt, obwohl die Anfangsfluoreszenz der Antikörper-Probe viel höher ist. Dies lässt sich auf die höhere Fluorophordichte zurückführen (vgl. Formeln 3.15 und 3.16). Die Spitze, die bei Abbildung 3.32 (b) - und später auch bei Abb. 3.34 - zu sehen ist, ist darauf zurückzuführen, dass die Spitze der Pipette bei der Zugabe von EDTA zu einer Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz beigetragen hat. Bei der Zugabe des EDTA in Abb. 3.31 (b) wurde dieses auf die Lösung getropft, sodass die Pipette nicht in den Messpuffer eingetaucht ist.

In Abb. B.18 (a) ist das Tubulinskelett gezeigt, das durch die Kombination von beiden Markierungsmethoden markiert wurde. Nach 450 Sekunden kontinuierlicher Anregung und daraus resultierender Photozerstörung, ist nahezu keine Fluoreszenz mehr zu beobachten (vgl. Abb. 3.33 (b)). Erst nach Zugabe von EDTA wird die Fluoreszenz der Sonde wiederhergestellt, sodass sich das Tubulinskelett, wie in Teilbild (c) gezeigt, erneut beobachten lässt.

Durch Analysieren des zeitlichen Intensitätsverlaufs der doppelt markierten Probe lässt sich feststellen, dass die Initialintensität der TMR-markierten (Abb. 3.31 (b)) und der doppelt-markierten Probe 3.34 (a) mit etwa $2,4 \cdot 10^7$ sehr ähnlich ist und dass die Fluoreszenzintensität der doppelt-markierten Probe nach Zugabe von EDTA ähnlich stark ansteigt, wie in Abb. 3.32 (b), bei der mit der Sonde einfach-markierten

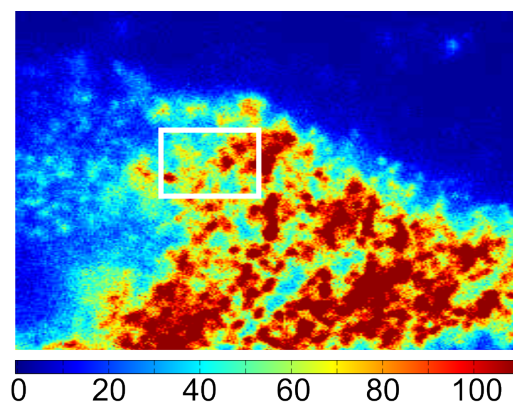


(a) Um auszuschließen, dass EDTA einen Einfluss auf die Fluoreszenz von TMR hat, wurde eine mit TMR markierte Probe zur Kontrolle bei $50 \mu\text{M}$ Kupfersulfat in MOPS-Puffer kontinuierlich geblichen und dann EDTA zugegeben. Der Maßstab entspricht $1 \mu\text{m}$.

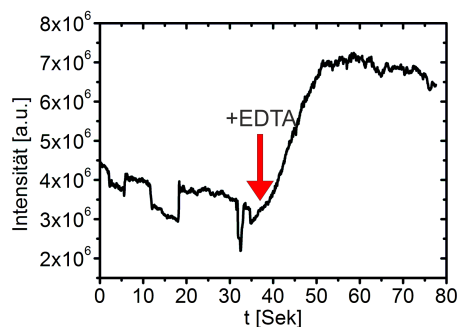


(b) Die Photozerstörung führt dazu, dass kaum noch Fluoreszenz in einem Bereich innerhalb der Zelle (50×50 Pixel) auftritt. Die Zugabe von Kupfersulfat nach etwa 440 s hat keinen Einfluss.

Abbildung 3.31.: Einfluss von EDTA auf die TMR markierte Proben.



(a) Die Fluoreszenz von einem Tubulinskelett bei einer Kupferkonzentration von $50 \mu\text{M}$ ist stark gelöscht, bei Zugabe von EDTA wird jedoch ein Großteil der Fluoreszenz wiederhergestellt. Der Maßstab entspricht $1 \mu\text{m}$.



(b) Eine Abnahme der Fluoreszenz trotz der Anwesenheit von Kupfer-Ionen ist auf die Photozerstörung von Autofluoreszenz-Verursachern und defekten Sonden zurückzuführen. Durch Zugabe von EDTA wird ein drastischer Anstieg in der Fluoreszenz-Intensität sichtbar.

Abbildung 3.32.: Einfluss von EDTA auf die mit der Sonde markierte Probe.

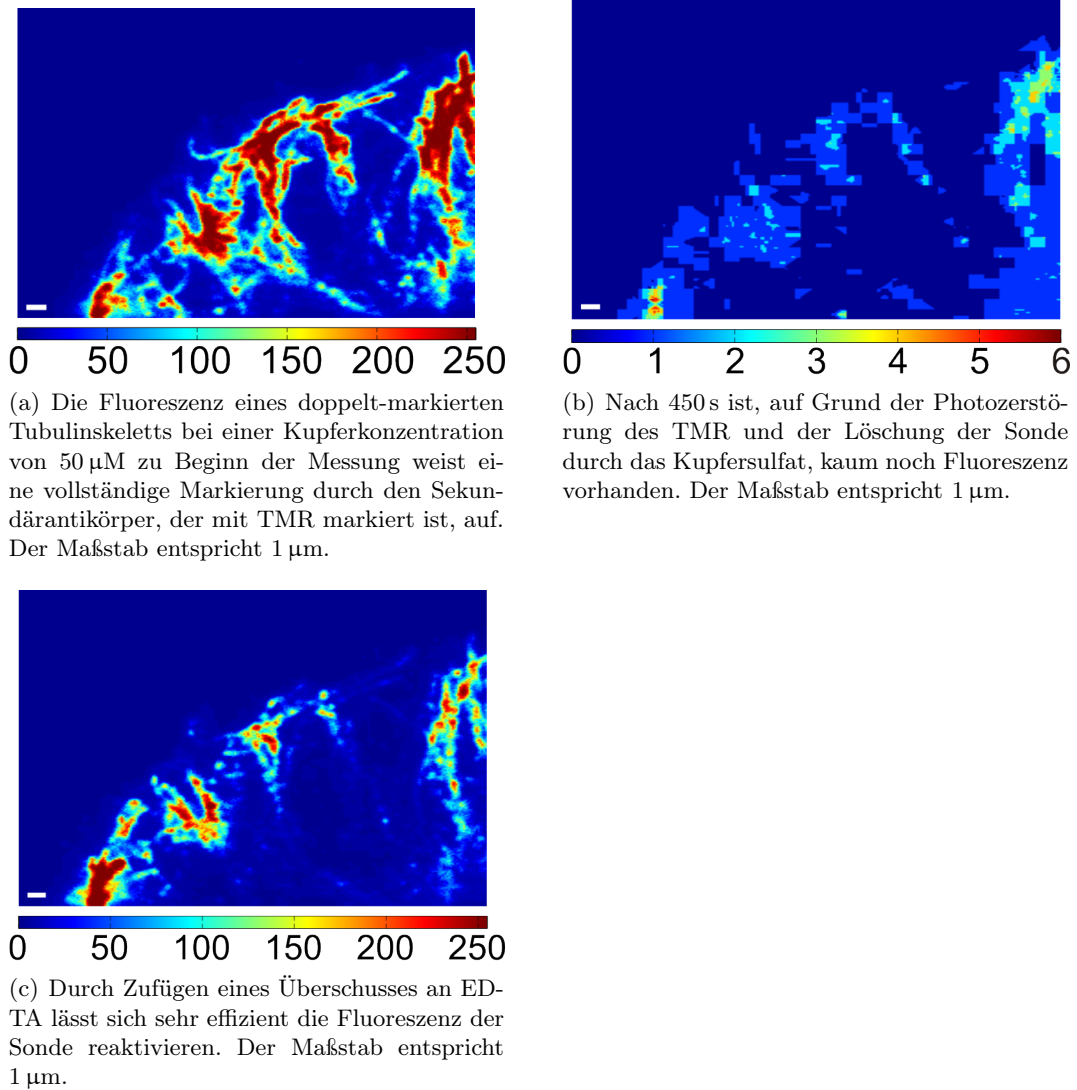
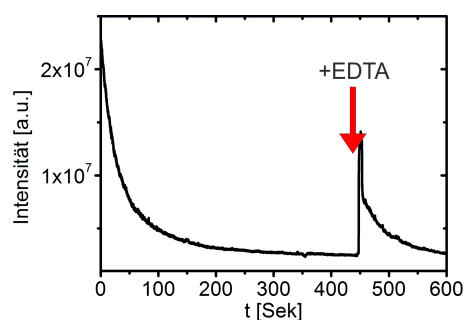
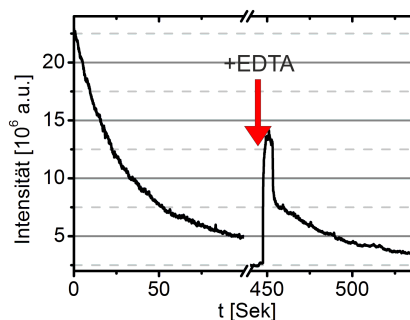


Abbildung 3.33.: Einfluss von EDTA auf eine zweifach markierte Probe.



(a) Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz von der mit Antikörper und mit Sonde markierten Zelle.



(b) Durch Zugabe von Kupfer steigt die Fluoreszenz von ca. $2,5 \cdot 10^6$ auf $7,5 \cdot 10^6$ während die Anfangsintensität bei $2,5 \cdot 10^7$ liegt.

Abbildung 3.34.: Einfluss von EDTA auf eine zweifach markierte Probe.

Probe von etwa $2,5 \cdot 10^6$ auf $7,5 \cdot 10^6$.

Durch das Anpassen von Fluoreszenzintensitäten in Bereichen bei denen eine Abnahme der Fluoreszenz sichtbar ist, kann man des Weiteren auf die Photostabilität der beiden Markierungen schließen. So führt eine exponentielle Anpassung an die ersten 990 Werte aus Abb. 3.34 (b) zu einer Zeitkonstante von $25 \pm 0,1$ s, während der Bereich nach Reaktivierung eine Zeitkonstante von $50,4 \pm 1$ s (für 990 Einzelbilder) aufweist. Verwendet man diese exponentielle Anpassung auch, um die Photostabilität der beiden einfach markierten Proben zu analysieren, erhält man die Werte aus Tabelle 3.9. Dazu wurden zwei Regions of Interest bei jeder Probe gewählt und die Fluoreszenzabnahme exponentiell angenähert. Dabei ist auffällig, dass der mit TMR

Messung	t [s]	Δt
TMR	35	$\pm 0,8$
TMR	23,6	$\pm 0,5$
Sonde (ohne Kupfer)	38,7	$\pm 1,4$
Sonde (ohne Kupfer)	116,2	± 15
dop. markiert, Bilder 1 – 990	25	$\pm 0,1$
dop. markiert, Bilder 1 – 990	27,2	$\pm 0,2$
dop. markiert, Bilder 8860 – 9850	41	$\pm 0,7$
dop. markiert, Bilder 8860 – 9850	53,6	± 2

Tabelle 3.9.: Exponentielle Anpassung an die Fluoreszenzabnahme über 990 Messpunkte (vgl. Abb. B.20 und B.21).

markierte Antikörper mit Halbwertszeiten von 23 s & 35 s deutlich weniger photostabil ist als die Sonde, 38 s & 116 s, selbst wenn bei dieser kein Kupfer vorhanden ist. Dies ist mit den Ergebnissen aus den Einzelmolekülmessungen konsistent (vgl. Kap. 3.4). Das gleiche Verhalten der beiden Markierungen lässt sich auch in den beiden zeitlich getrennten Bereichen der doppelt markierten Probe beobachten. So weist der, von der Fluoreszenz des TMR markierte Zeitbereich zu Beginn der Messung mit 25 s & 27 s eine, zu der Messung mit TMR, vergleichbare Photostabilität auf, die Lebensdauer des

von der Fluoreszenz der Sonde dominierten Bereichs nimmt mit 41 s & 53 s um einiges größere Werte an, was auf die hohe Photostabilität der Sonde zurückzuführen ist.

Um die Kollokalisierung der beiden Methoden zu testen und um die Markierungsdichte von beiden Methoden zu vergleichen, wurden die Daten mithilfe der Manders-Koeffizienten analysiert (vgl. Kap. 5.7.1). Die Analyse der Manders-Koeffizienten gibt Aufschluss über die Kollokalisierung von zwei Bildern, auch wenn die kollokaliserten Objekte eine unterschiedliche Helligkeit aufweisen. Um die Ergebnisse interpretieren zu können, wurden das erste Bild der Aufnahme, das einhundertste (mit Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Photozerstörung) und das 8.749ste Bild (nach Zugabe von EDTA) miteinander verglichen. Die Auftragung der Manders-Koeffizienten ist im Anhang in den Abbildungen B.22 und 3.35 zu finden. Als Negativ-Kontrolle diente der Vergleich zweier unterschiedlicher Aufnahmen (vgl. Abb. B.18 und B.22 (a)). Während der Pearson-Koeffizient r_p , der Werte zwischen -1 und 1 annehmen kann, auf Grund seiner Abhängigkeit von der Intensität zu Fehlern führen kann, ist der Überlappungs-Koeffizient r , der sich aus der Manders-Analyse ergibt und zwischen 0 und 1 liegt, besser zur Analyse geeignet. Um auf Kollokalisierung der doppelt markierten Probe zu testen, wurden aus dem Video aus Tabelle C.3 (a) und (b) unterschiedliche Einzelbilder zur Analyse verwendet.

Als Beispiele für die Färbung mithilfe der Sekundärantikörper wurde das erste Bild verwendet, bei dem durch Zugabe von Kupfersulfat die Sonde in den Aus-Zustand getrieben wurde, und das einhundertste Bild, um den Einfluss der Überbelichtung, der im ersten Bild herrscht, zu korrigieren. Als Test für die mit der Sonde markierte Probe, nach Photozerstörung der Antikörperfluoreszenz und Zufügen von EDTA, wurde das Bild Nummer 8.749 genutzt. Als Negativ-Kontrolle diente die Aufnahme einer anderen Zelle (vgl. Abb. B.22 (a)).

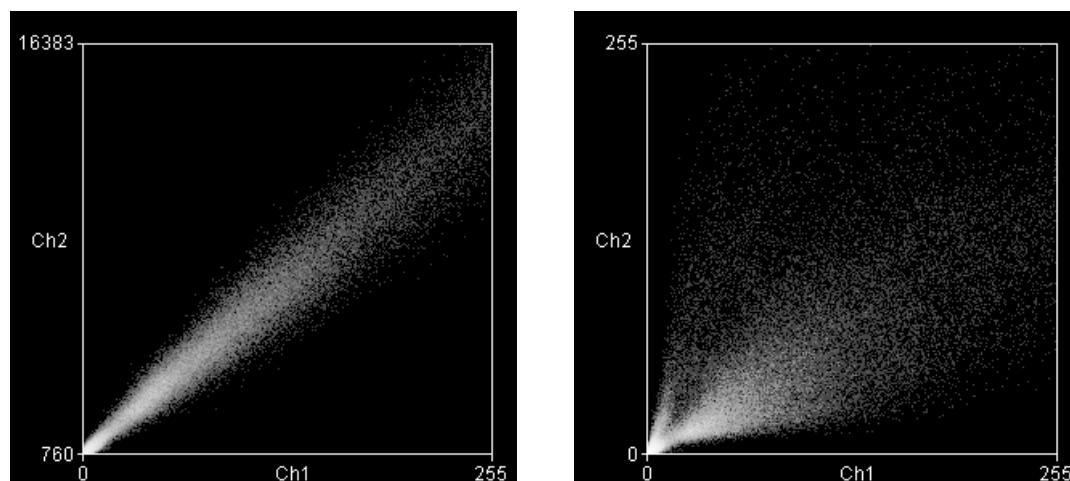
Zur vereinfachten Darstellung der Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 der Pearson-Koeffizient

Vergleich zwischen	r_p	r
1 & 100	0,986	0,993
1 & 8749	0,764	0,888
1 & Neg.	0,011	0,536
100 & 8749	0,796	0,901
8749 & Neg.	-0,069	0,612

Tabelle 3.10.: Pearson-Koeffizient und Überlappungs-Koeffizient

r_p und der Überlappungs-Koeffizient r angegeben. An den Werten wird deutlich, dass die Färbung des Tubulinskelettes, wie zu erwarten, eine hohe Kollokalisierung aufweist. Selbst für die Positiv-Kontrolle ist die Streuung der Überlappungs-Koeffizienten der Aufnahmen zwischen dem ersten Bild und nach 100 Bildern beträchtlich, so dass ein Überlappungs-Koeffizient von $0,9$ eine sehr gute Kollokalisierung angibt. Die gute Kollokalisierung wird bei der Auftragung der Manders-Koeffizienten in Abb. 3.35 noch deutlicher. Ein Teil der Abweichungen aus Abb. 3.35 (b) ist auf das Problem der Überbelichtung zurückzuführen, das am Anfang auftritt, jedoch unvermeidlich war, um auch die schwache Fluoreszenz bei der Photozerstörung beobachten zu können (vgl. Abb. 3.33 (b)). Dass in der Negativ-Kontrolle der Überlappungs-Koeffizient r Werte zwischen $0,53$ und $0,61$ annimmt, obwohl die verglichenen Bilder komplett un-

terschiedlich sind, ist darauf zurückzuführen, dass auf Grund der über das gesamte Bild betrachteten, hohen Markierungsdichte, einige Intensitäten dennoch kolokalisiert sind. Die Auftragung der Manders-Koeffizienten in Abbildung B.22 (b) zeigt aber eine deutlich andere Verteilung als für die Bilder mit hoher Kolokalisation.



(a) Auftragung der Manders-Koeffizienten für die Kolokalisationsanalyse zwischen dem 1sten und dem 100sten Bild (Sekundärantikörper-Färbung) als Positiv-Kontrolle und um den Einfluss der Photozerstörung zu visualisieren.

(b) Auftragung der Manders-Koeffizienten für die Kolokalisationsanalyse zwischen dem 100sten Bild (Sekundärantikörper-Färbung) und dem 8749sten Bild, nach der Zugabe von EDTA (Sondenmarkiertes Tubulinskelett).

Abbildung 3.35.: Manders Kolokalisationsanalyse der Positiv-Kontrolle und zwischen den beiden Färbungen vor Photozerstörung und nach EDTA Zugabe.

Interessanterweise fällt bei der objektiven Betrachtung von Abb. 3.36 auf, dass die beiden Markierungsmethoden zu unterschiedlichen relativen Verteilungen der Farbstoffe innerhalb einer Zelle führen. Die Markierung der Sekundärantikörper scheint vor allem innerhalb der Zelle zu einer gleichmäßigeren Verteilung zu führen, während die Sonde vor allem in Nähe der Zellmembran eine gute Markierung erzielt. Ob dieser Effekt auf die Markierungsmethode zurückzuführen ist, oder ob es sich dabei um ein Artefakt handelt, lässt sich jedoch nicht ohne Weiteres sagen.

3.7. Toxizität von Kupfersulfat

Eine der Hauptmotivationen von lichtunabhängiger Lokalisationsmikroskopie besteht darin, die Phototoxizität, die durch hohe Laserleistungen induziert wird, zu vermeiden.

Da es Untersuchungen gibt, die einen Einfluss von Kupfersulfat auf den Metabolismus von Zellen untersuchen [146], jedoch keine Untersuchungen mit so geringen Kupfermengen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit benutzt werden, wurden die Zellen auf ihre Viabilität nach einer Inkubation mit einer Kupfersulfatlösung untersucht. Dazu wurden Zellen für eine halbe Stunde, was in etwa der Messzeit der Lokalisationsmikroskopie entspricht, mit unterschiedlichen Puffern inkubiert. Um die Überlebensrate zu testen wurden ebenfalls Zellen in der natürlichen Zellumgebung mit DMEM gehalten.

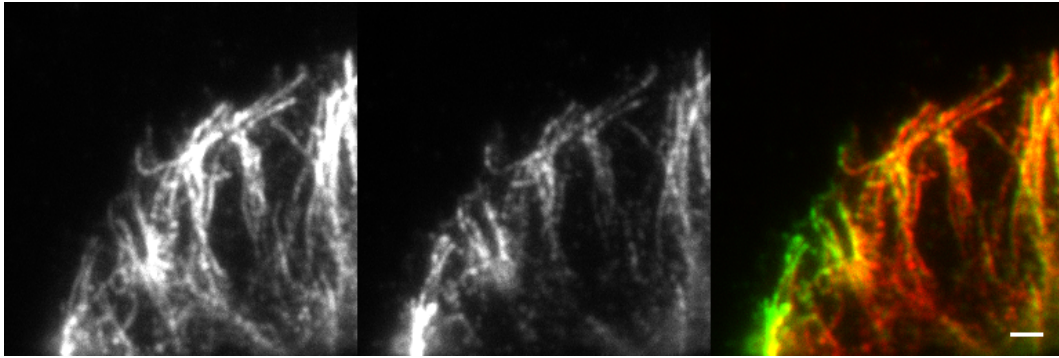


Abbildung 3.36.: Vergleich des Tubulinskeletts nach Zugabe von Kupfer (links) und nach Photozerstörung der Fluoreszenz des Sekundärantikörpers mit anschließender Zugabe von EDTA (mitte). Rechts ist eine Überlagerung beider Bilder zu sehen wobei Gelb eine gute Kolo-kalisation angibt. Der Maßstabsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$.

Der Einfluss von Kupfer wurde über ein DMEM Medium mit $12\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat und über PBS mit $12\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat getestet. Zusätzlich wurden Zellen unter gleichen Bedingungen in MOPS-Puffer mit und ohne Kupfer inkubiert. Nach dreißig Minuten wurden mithilfe von Trypan Blau die toten Zellen angefärbt und das Verhältnis der überlebenden Zellen berechnet und in Abbildung 3.37 aufgetragen. Interessanterweise führte das Kupfer nicht zu einer erhöhten Toxizität, die Zellüberlebensrate wird hauptsächlich durch das Medium bestimmt. In DMEM, dem natürlichen Medium für die Zellen, induziert das Kupfer keine toten Zellen, in PBS mit Kupfer ist lediglich ein kleiner Teil der Zellen tot, in MOPS-Puffer hingegen sterben alle Zellen innerhalb kürzester Zeit (vgl. Abb. 5.6), unabhängig von der Präsenz von Kupfer. Für die Anwendung der Sonde für *in vivo* Experimente muss also das Medium von MOPS zu PBS gewechselt werden und es sind Untersuchungen notwendig, um zu testen, ob das Kupfer den Zellmetabolismus anderweitig beeinflusst.

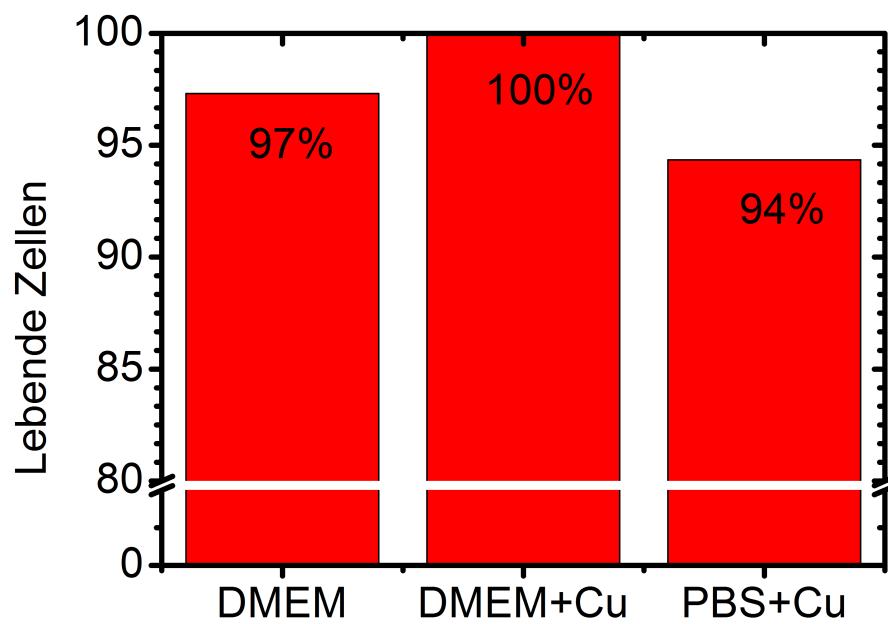


Abbildung 3.37.: Histogramm über die Anzahl an überlebenden Zellen in mit Kupfersulfat versetzten Medien (vgl. Abb. 5.6 & 5.7).

4. Diskussion & Ausblick

Zur Durchführung der Arbeit wurden drei Voraussetzungen postuliert, die erfüllt werden müssen, um Lokalisationsmikroskopie betreiben zu können:

1. Ein Farbstoffkonstrukt, das für die Lokalisationsmikroskopie geeignet ist, muss über einen hellen An-Zustand verfügen (Quanteneffizienz und Extinktionskoeffizient müssen hoch sein) und über einen dunklen Aus-Zustand (niedrige Quanteneffizienz im gelöschten Zustand).
2. Der fluoreszente An-Zustand des Konstrukts muss deutlich länger sein als die Belichtungszeit eines Bildes, um eine möglichst deutliche Photonverteilung pro Punktabbildungsfunktion zu erreichen, die für die Lokalisationsgenauigkeit essentiell ist [97].
3. Die Dauer des gelöschten Zustands der Sonde hängt von der Markierungsdichte des untersuchten Objektes ab. Es ist erstrebenswert, dass die Länge des Aus-Zustandes zwei Größenordnungen größer ist als die des An-Zustandes [117].

Um zu bestimmen, ob eine Sonde diese Eigenschaften erfüllt, um für die Lokalisationsmikroskopie geeignet zu sein, lassen sich notwendige und hinreichende Bedingungen aufstellen. Eine notwendige Bedingung ist, dass die Sonde spezifisch gelöscht wird. Dies lässt sich in Ensemble-Experimenten anhand der Fluoreszenzlöschung der Sonde im Vergleich zu einer Kontrollsonde ohne Chelaten bestimmen.

Da diese Aussage jedoch lediglich Aufschluss über die Effizienz der Löschung gibt, also über das Verhältnis von Fluoreszenz, die im gelöschten Zustand auftritt und Fluoreszenz im ungelöschten Zustand, lassen sich keine Aussagen über die Eigenschaften der Zustände einer einzelnen Sonde treffen. Mit Hilfe der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie lassen sich diese Informationen über einzelne Sonden gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden so die Dauern der An- und Aus-Zustände einzelner Sonden bestimmt sowie ihre Abhängigkeit von Kupferkonzentration und Laserleistung. Die so erhaltenen Daten geben Aufschluss darüber, ob die hinreichenden Eigenschaften zur Anwendung in der Lokalisationsmikroskopie erfüllt sind.

Basierend auf den Voraussetzungen wurde eine intrinsisch fluktuierende Sonde auf ihre Anwendbarkeit in der Hochauflösungsmikroskopie von biologischen Proben getestet. Als Sonde diente hierfür eine doppelsträngige DNA mit einem Farbstoff (TMR) und einem Chelaten (BiPy), der ein Kupfer komplexieren kann. Auf Grund der chemischen Natur dieser Reaktion, wurde diese Methode *CHIRON* (Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy) getauft.

Ensemble-Daten über die Fluoreszenzlöschung der Sonde

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Sonde mit Hilfe von Ensemble-Messungen. Basierend auf den Daten von Dr. A. Kiel wurden zunächst die Löschemperimente reproduziert und anschließend in Kollaboration mit Dominic Riedel (AK Hashmi, Univ. Heidelberg) ein Syntheseprotokoll für die Sonde etabliert, das auf der Benutzung vorgefertigter Oligonukleotide basiert. Dabei wurde festgestellt, dass die so synthetisierte Sonde eine starke Fluoreszenzlöschung im Bereich von unter $1 \mu\text{M}$ Kupfersulfat zeigt, weshalb hier auch die größten statistischen Schwankungen auftreten. Insgesamt lässt sich festhalten, dass für die Sonden, im Rahmen der schon

Sonde	Löscheffizienz $[\frac{\Phi_{CuL}}{\Phi_L}]$	$K_{SV}[10^3 \text{ M}^{-1}]$
Kiel / AK Krämer	92 %	8500
Schwering / AK Hashmi (1)	85 %	9900
Schwering / AK Hashmi (2)	92 %	2670

Tabelle 4.1.: Vergleich der Parameter der Anpassung der unterschiedlich hergestellten Sonden mit dem Modell aus Gl. 3.9 (vgl. Tab. 3.4 und [134]).

von Dr. Kiel beobachteten Schwankungen, eine gute Übereinstimmung der Fluoreszenzlöschung, trotz unterschiedlicher Herstellungsprotokolle, herrscht (vgl. Tab. 4.1). Um die Erfüllung der notwendigen Voraussetzungen für die Lokalisationsmikroskopie zu testen, musste die Fluoreszenzlöschung der Sonde im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle getestet werden. Die Sonde wurde so konzipiert, dass sie durch Bindung eines Kupfer-Ions gelöscht wird (vgl. Abb. 4.1 (a)). Dadurch kann die Sonde mindestens in zwei Zuständen vorliegen - in einem hellen und einem dunklen Zustand. Als Gesamtfluoreszenzintensität ergibt sich somit $I_{\text{gesamt}} = I_{\text{dunkel}} + I_{\text{hell}}$. Da davon ausgegangen werden kann, dass sich bei einer geeigneten Kontrollsonde keine getrennten Zustände beobachten lassen, ist die Fluoreszenzintensität der Negativ-Kontrolle mit I_{hell} vergleichbar. Um bei einer Sonde für die Lokalisationsmikroskopie eine möglichst deutliche Unterscheidung von hellen und dunklen Zuständen zu erreichen, darf der helle Zustand nicht von unspezifischer Löschung beeinflusst werden. Um dies zu überprüfen, wurden sowohl freie Farbstoffe als auch einzelsträngige Oligonukleotide auf ihre Fluoreszenzlöschung untersucht. Dabei war TMR der einzige Farbstoff, der dabei vom Kupfer nahezu unbeeinflusst blieb. Generell ist für die Fluoreszenzmikroskopie in biologischen Anwendungen, auf Grund der Autofluoreszenz, ein rot-emittierender Farbstoff vorzuziehen, jedoch weist der am besten geeignete Kandidat aus diesem Wellenlängenbereich deutlich schlechtere notwendige Grundvoraussetzungen auf als die grünen Rhodaminderivate (vgl. Tab. 4.2).

Um zu verstehen, ob die Fluoreszenzlöschung stark von der Struktur des Farbstoffes abhängt, wurden zusätzlich zu der Fluoreszenz des Tetramethylrhodamins noch drei andere Farbstoffe auf ihr Löscherhalten durch Kupfer untersucht. Die gewählten Farbstoffe Rho 11, Rho 12 und Rho 13 sind allesamt Rhodaminderivate und haben ähnliche Absorptions- und Fluoreszenzspektren, was vermuten lässt, dass ihre Struktur sehr ähnlich ist. Auffällig an dem Verlauf der Stern-Volmer-Löschung aus Abb. B.3 ist hierbei, dass die Effizienz der Fluoreszenzlöschung mit Zunahme der Rotverschiebung der Farbstoffe zunimmt. TMR weist allerdings im direkten Vergleich dennoch die

Farbstoff	freier Farbstoff $K_{SV}[10^3 M^{-1}]$	Sonde $K_{SV}[10^3 M^{-1}]$
Atto 620	$0,54 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,03$
TMR	$0,20 \pm 0,01$	$2,76 \pm 0,04$

Tabelle 4.2.: Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von TMR und Atto 620 als freier Farbstoff und als Sonde mit Bipyridin

geringste Fluoreszenzlöschung auf (vgl. Tab. 4.3). Um zu überprüfen, ob die Anwendung von Fluoreszenzsonden, basierend auf Rho 11, sinnvoll ist, sind allerdings noch zusätzliche Experimente mit der hybridisierten Probe notwendig.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der in dieser Arbeit untersucht wurde, ist die Ab-

Farbstoff	λ_{Abs} [nm]	λ_F [nm]	K_{SV} [$10^6 M^{-1}$]
TMR	556	580	$0,03 \pm 0,00$
Rho 11	571	595	$0,05 \pm 0,00$
Rho 12	576	601	$0,17 \pm 0,02$
Rho 13	600	625	$0,21 \pm 0,02$

Tabelle 4.3.: Fitparameter der Anpassung an die Graphen aus Abb. B.3

hängigkeit der Fluoreszenzlöschung in unterschiedlichen Puffern, da im Idealfall die Fluoreszenzlöschung nicht von dem verwendeten Puffer abhängt. Bei einem pH-Wert von 7,0 wurde für unterschiedliche Puffer keine nennenswerte Abweichung der Fluoreszenzlöschung voneinander beobachtet (vgl. Tab. 3.4). Anhand der effizienten Löschung und der Tatsache, dass die Fluoreszenz bei Abwesenheit des Bipyridin-Liganden nicht nennenswert beeinflusst wird, lässt sich festhalten, dass die Sonde die notwendigen Eigenschaften besitzt, um für die Lokalisationsmikroskopie verwendet zu werden. Da bei den Ensemble-Messungen jedoch nicht die Dauer der Zustände bestimmt werden kann, sind die gewonnenen Parameter noch nicht hinreichend für die Charakterisierung. Diese Werte können nur in Einzelmolekülexperimenten bestimmt werden.

Ein weiterer Parameter, der mit Hilfe der Ensemble-Messungen untersucht wurde, war die Reversibilität der Kupferbindung an den Chelaten. So wurde festgestellt, dass die effiziente Fluoreszenzlöschung durch Zugabe von EDTA wieder rückgängig gemacht werden kann, so dass diese Fluoreszenzwiederherstellung für Multi-Kanal-Messungen genutzt werden kann. Dabei geschieht die Restauration der Anfangsfluoreszenz zu fast 100% und quasi instantan (vgl. Abb. 4.1 (b)).

Der Lösmechanismus der Sonde

Anhand der Simulationsdaten, die in Kooperation mit Svenja Wörner (AK Pernpointner) entstanden sind, lässt sich eine kurzfristig stabile Konformation zwischen dem Bipyridin und dem TMR bei einer Entfernung von ca. 6 Å ableiten. Wird diese Konformation bei Komplexierung von Kupfer-Ionen wirklich angenommen, wäre dies ein starker Indikator dafür, dass der zu Grunde liegende Mechanismus der Fluoreszenzlöschung der Photoinduzierte Elektronentransfer (PET) ist. In den Simulationen wurde

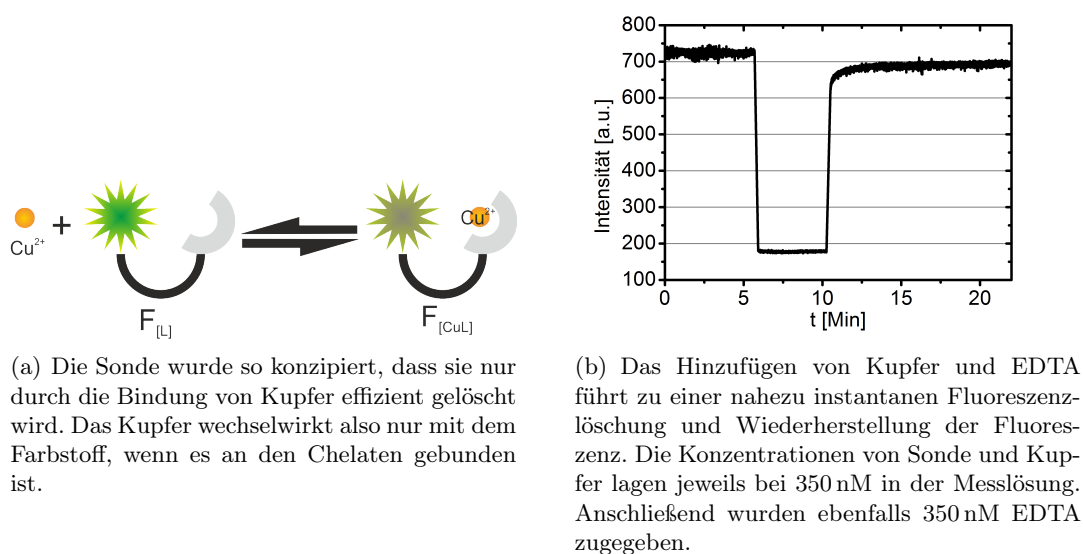
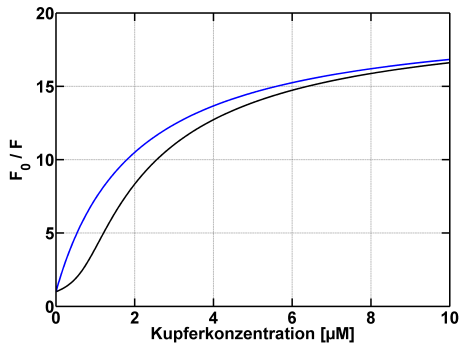


Abbildung 4.1.: Ensemble-Messungen zur Charakterisierung der Sonde.

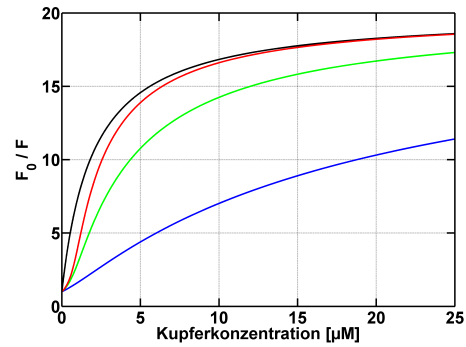
außerdem berechnet, dass es mehrere metastabile Zustände mit einer größeren Distanz zwischen den Ringsystemen von Farbstoff und Chelat gibt. Auf Basis dieser Ergebnisse lassen sich Fluoreszenzfluktuationen, die auf einer schnelleren Zeitskala geschehen, erklären. Aus den Ensemble-Daten lassen sich auch Rückschlüsse über das Komplettsystem ziehen. So fällt vor allem bei den Messungen von den Sonden die auf Atto 620 und Atto 633 basieren auf, dass die von Dr. Kiel verwendete Formel, um die Fluoreszenzlöschung zu beschreiben, nicht ausreichend ist (vgl. Formel 3.9). Der sigmoidale Verlauf, der in den Abbildungen 3.8 und 3.7 zu erkennen ist, lässt sich durch die vollständige Funktion sehr gut annähern (vgl. Formel 3.6). Der Grund dafür, dass sich die Kinetik des TMR-BiPy-Konstrukts trotzdem gut mit der Formel von Dr. A. Kiel beschreiben lässt, liegt darin, dass die Stern-Volmer-Konstante im Vergleich zu den anderen getesteten Farbstoffen sehr hoch ist. Der Einfluss der Konstante ist in Abb. 4.2 (b) dargestellt.

Einzelmolekül-Daten zur Charakterisierung der Fluoreszenzfluktuationen

Aus den Ensemble-Daten können Rückschlüsse über die Fluoreszenzlöschung der Sonde gewonnen werden. Die effiziente Fluoreszenzlöschung ist eine notwendige Voraussetzung, die erfüllt sein muss, um eine geeignete Probe für die Lokalisationsmikroskopie zu besitzen. Durch den Vergleich der Fluoreszenz der Sonde mit einer Kontrollsonde, bei schrittweiser Erhöhung der Kupferkonzentration, lässt sich auf den Unterschied der Fluoreszenz von gelöscht und hellem Zustand schließen. Eine Frage, die in Ensemble-Messungen jedoch nicht beantwortet werden kann, ist die absolute Länge der fluoreszenten und gelöschten Zustände, da über viele Moleküle und einen lan-



(a) Simulation des Stern-Volmer-Plots nach den Formeln 3.9 (blau) und 3.6 (schwarz) für eine Sondenkonzentration von 800 nM und eine Stern-Volmer-Konstante von $K_{SV} = 10 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und einer relativen Quanteneffizienz des gelöschten Zustandes $\frac{\Phi_{\text{aus}}}{\Phi_{\text{an}}} = 0.05$



(b) Simulation des Stern-Volmer-Plots nach den Formeln 3.9 (schwarz) für $K_{SV} = 10 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ und 3.6 für eine Sondenkonzentration von 800 nM und eine Stern-Volmer-Konstante von $K_{SV} = 10 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (rot), $K_{SV} = 5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (grün) und $K_{SV} = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (blau), bei einer relativen Quanteneffizienz des gelöschten Zustandes $\frac{\Phi_{\text{aus}}}{\Phi_{\text{an}}} = 0.05$

Abbildung 4.2.: Simulation der Ensemble-Daten mit den unterschiedlichen Formeln zur Beschreibung der Kinetik.

gen Zeitraum gemittelt wird. Um zu testen, auf welcher Zeitskala die Fluktuationen der einzelnen Sonden stattfinden, wurden einzelmolekülsensitive Messungen auf einem TIRF-Mikroskop durchgeführt (vgl. Abb. 4.3). Von vorangegangenen Arbeiten auf einem konfokalen Mikroskop waren die Zeitskalen der zu erwartenden Fluoreszenzfluktuationen schon bekannt [131]. Eine Problematik bei der Analyse von Fluoreszenzfluktuationen mit einem TIRF-Mikroskop besteht in der niedrigen zeitlichen Auflösung im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie. Eine Fluktuationsanalyse, um auf die Länge der Zustände zu schließen, wie dies bei der Untersuchung von chemischen Reaktionen eine Rolle spielt [131, 132], ist daher sehr ungenau.

Um die Problematik der für solche Analysen verwendeten Schwellwertanalyse zu umgehen, wurde eine neue Methode der Datenanalyse benutzt. Dabei wird ausgenutzt, dass die Fluoreszenz, die ein Farbstoff emittiert, der Beugung unterliegt und somit nicht in einem scharfen Punkt abgebildet wird, sondern in einer Punktabbildungsfunktion. Da die Punktabbildungsfunktion in erster Näherung der Gaußverteilung ähnelt, ist es möglich die Daten zu filtern. Dazu werden die Daten nach gaußverteilten Intensitäten untersucht und die Orts- und Zeit-Koordinaten der Maxima gespeichert. Ist die Markierung der Oberfläche nicht zu hoch, können Ansammlungen von solchen Intensitätsmaxima als ein und derselbe Emittor angesehen werden. Durch Auftragung der Zeitkoordinaten, die zu einem Punktemittor gehören, konnten neue, binäre Fluoreszenzspuren rekonstruiert werden.

Mit Hilfe der entwickelten Analysemethode konnten Fluktuationen beobachtet (vgl. Abb. 4.3 (b)) und eine Abhängigkeit von der Kupfersulfatkonzentration nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.4).

Um genauere Informationen über Fluoreszenzfluktuationen zu gewinnen, und eventuell schnellere Kinetiken, als sie mit der Bildwiederholrate einer CCD-Kamera beobachtet

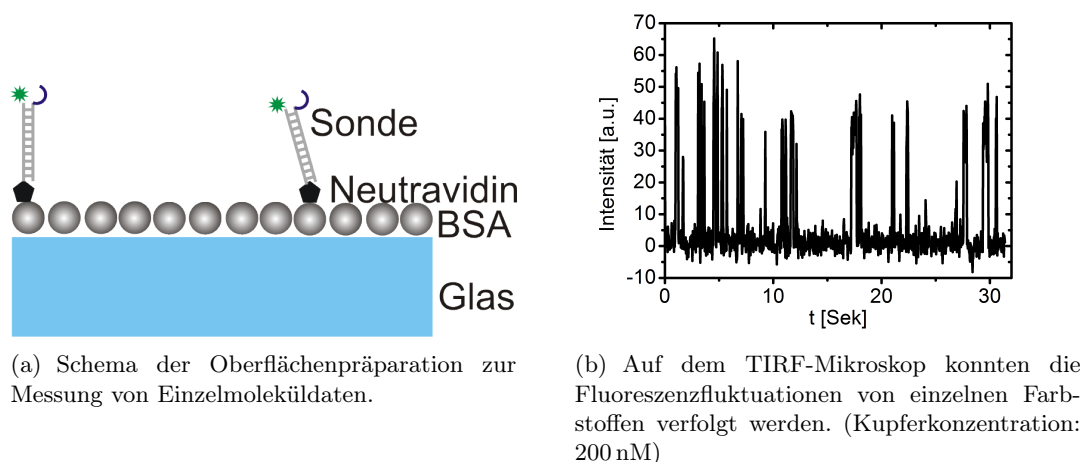


Abbildung 4.3.: Einzelmolekül-Messungen der Sonde auf einem TIRF-Mikroskop.

werden können, zu bestimmen, ist es sinnvoll, eine konfokale Anlage zu verwenden und einzelne Fluoreszenzspuren zu analysieren. Der Grund dafür, dass im Rahmen dieser Arbeit das TIRF-Mikroskop verwendet wurde, liegt darin, dass die Lokalisationsmikroskopiemessungen auch auf diesem Mikroskop durchgeführt wurden und somit die Kinetik der Sonde auch auf dem TIRFM messbar sein muss, wobei es jedoch nicht notwendig ist, die Kinetik genau zu messen. Die vom Mikroskop nicht messbare schnelle Fluoreszenzkinetik [132] sowie die großen Unsicherheiten bei der Bestimmung einer Fluoreszenzkinetik (vgl. Abb. 3.18), spielen für diese Arbeit somit keine wesentliche Rolle.

Ein wichtiger Punkt bei der Entwicklung einer Probe, die nicht durch Einstrahlung von Licht geschaltet wird, sondern deren Kinetik von der Anregung völlig unbeeinflusst bleibt, ist der Nachweis dafür, dass keine zusätzliche Kinetik durch die Laserintensität erzeugt wird. Ein Hinweis dafür, dass die Fluoreszenzlöschung lediglich den angeregten Zustand betrifft, wurde von Dr. A. Kiel mit Hilfe der Absorptionsspektren der Sonde mit und ohne Kupfer erbracht. So konnte er nachweisen, dass es keine Veränderung in der Absorption durch das Binden von Kupfer-Ionen gibt [134]. Ein weiterer Beweis dafür, dass die Löschung aus dem angeregten Zustand - und somit unabhängig von der eingestrahlten Leistung - geschieht, wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der Messungen bei unterschiedlichen Laserleistungen erbracht (vgl. Abb. 3.19). Dadurch wurde bewiesen, dass eine lichtunabhängige Fluoreszenzfluktuation der Sonde vorliegt, wodurch die Entkopplung des Schaltmechanismus in der Lokalisationsmikroskopie von der Datenaufnahme möglich ist.

Die Charakterisierung des Mikroskop-Setups hinsichtlich der Lokalisationsmikroskopie

Neben der Entwicklung und Charakterisierung der Sonde ist ein anderer Parameter, der zur Etablierung einer Lokalisationsmikroskopiemethode unerlässlich ist, der Aufbau eines geeigneten Mikroskops. Da die Lokalisationsgenauigkeit einer PSF nicht nur

mit der Helligkeit der Probe und der Belichtungszeit einhergeht, sondern auch mit der Pixelgröße, muss diese für die verwendeten Wellenlängen und das benutzte Objektiv auf einen definierten Wert eingestellt werden. Durch Einbringen einer geeigneten Linsenkomination wurde zunächst die Pixelgröße der CCD Kamera angepasst. Als Bezugswert für die Vergrößerung wurde das Nyquist-Shannon-Theorem verwendet. Anhand der Berechnungen wurde die zu wählende Pixelgröße auf $d_{\text{theoretisch}} = 89 - 91$ nm für Licht mit $\lambda = 600$ nm und eine numerische Apertur von $NA = 1,45$ & $1,49$ bestimmt (vgl. Kap. 1.6). In Anlehnung an den theoretischen Wert wurde anschließend mit Hilfe zweier Linsen die Vergrößerung so eingestellt, dass eine Pixelgröße von $d_{\text{experimentell}} \approx 88$ nm erreicht wurde.

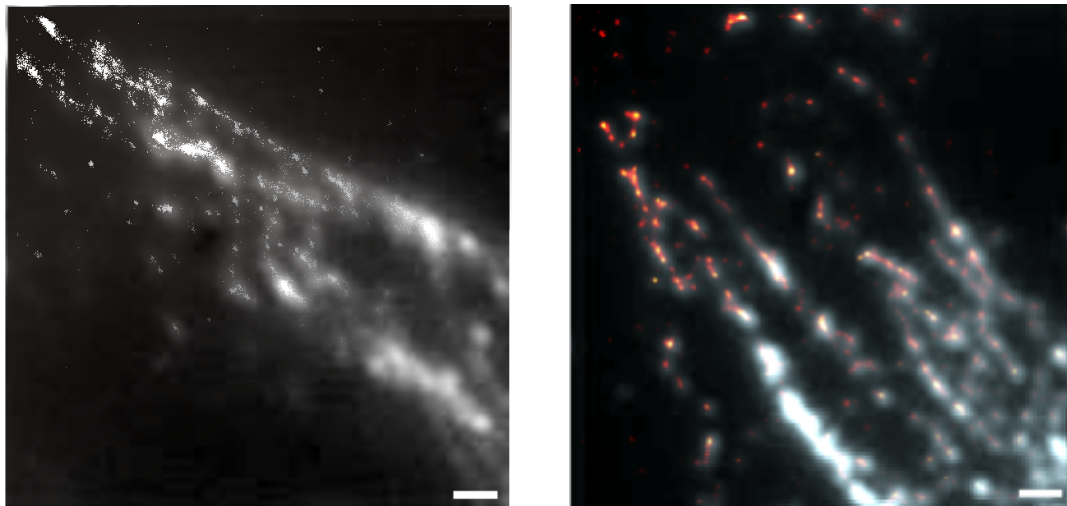
Der zweite theoretische Parameter, von dem die Lokalisationsgenauigkeit abhängt, ist die Helligkeit der PSF. Da dieser Parameter farbstoffspezifisch ist, kann er nicht angepasst werden. Allerdings lässt sich anhand des Vergleiches zwischen der theoretisch erreichbaren Lokalisationsgenauigkeit und der experimentell erreichten Genauigkeit die Stabilität des Mikroskops abschätzen. Mit Hilfe der von Thompson entwickelten Theorie zur Genauigkeitsabschätzung für die Lokalisation von Punktabbildungsfunktionen wurde, für die Rahmenbedingungen die im benutzten Mikroskop gelten, die Belichtungszeiten abgeleitet, die notwendig sind, um einzelne Farbstoffe mit einer Genauigkeit im Bereich einiger Nanometer zu lokalisieren. Die so errechneten theoretischen Werte wurden mit der erreichten experimentellen Lokalisationsgenauigkeit verglichen und befinden sich in guter Übereinstimmung. Um eine möglichst gute Abschätzung der Lokalisationsgenauigkeit zu erreichen wurde davon ausgegangen, dass sich der immobilisierte Farbstoff im Rahmen der Größe des Konstrukts, das zur Immobilisierung verwendet wurde, flexibel bewegen kann. Durch Abschätzung der Größen der einzelnen Bausteine, die für die Immobilisierung verwendet wurden, konnte die maximale Bewegungsfreiheit eines einzelnen Fluorophors auf 24 nm bestimmt werden. Da die Lokalisationsgenauigkeit unter dieser Größe liegt, ist die Sonde nicht so beweglich, wie sie es theoretisch sein könnte und die Lokalisationsgenauigkeit, die über die Beweglichkeit des Fluoreszenzemitters und die Anzahl der detektierten Photonen gegeben ist, befindet sich im theoretisch beschriebenen Rahmen (vgl. Tab. 4.4).

	theoretisch	experimentell
Pixelgröße	89 – 91 nm	88 nm
Lokalisationsgenauigkeit	10 nm	15 – 18 nm
Beweglichkeit vom Fluoreszenzemitter	fester Punktemitter	24 nm

Tabelle 4.4.: Vergleich der Parameter des Mikroskop-Setups.

Lokalisationsmikroskopie mit chemisch schaltbaren Sonden auf einem TIRF-Mikroskop

Aufbauend auf der Charakterisierung der Sonde - sowohl mit den Ensemble-Messungen, die Aufschluss über die notwendigen Eigenschaften der Sonde bieten als auch mit den einzelmolekülspektroskopischen Untersuchungen, die Informationen über die absolute



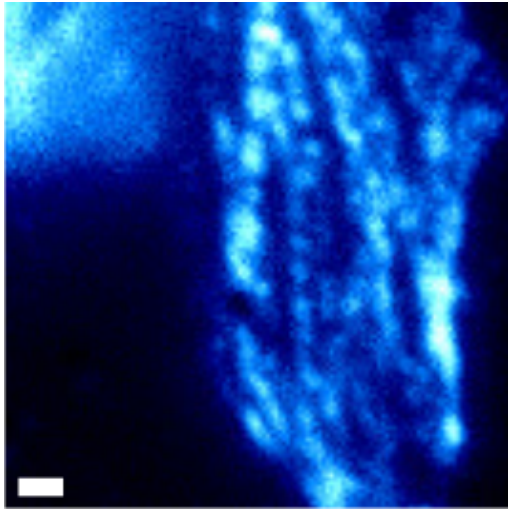
(a) Durch den Einsatz der Lokalisationsmikroskopie werden mehr Details der untersuchten Strukturen offenbart. Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

(b) Durch den Einsatz von chemisch getriebenen Sonden lassen sich Fluoreszenzfluktuationen zu solchen Zwecken ausnutzen. Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .

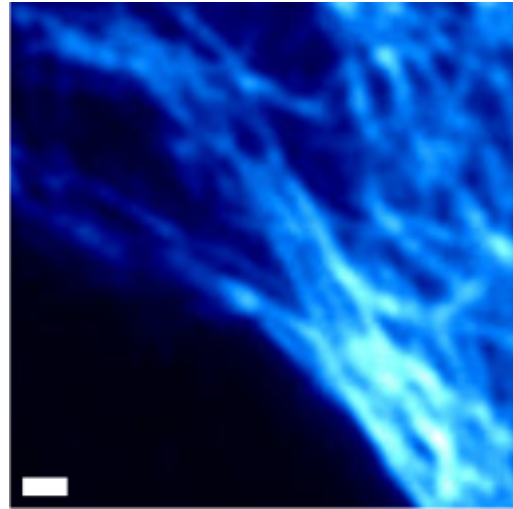
Abbildung 4.4.: Hochauflösungsmikroskopische Aufnahmen vom Tubulinskelett.

Länge der Zustände tragen - und dem Aufbau eines für die Hochauflösungsmikroskopie geeigneten Mikroskops, wurden Messungen an biologischen Proben durchgeführt. So wurde als erster Schritt zur Lokalisationsmikroskopie ein Markierungsprotokoll für tierische Zellen erarbeitet. Das Protokoll wurde so entwickelt, dass die Markierungsdichte der Fluorophore nicht zu hoch ist, um Artefakte zu vermeiden. Zur Anwendung der Lokalisationsmikroskopie in der Biologie bieten sich Strukturen des Tubulinskelettes an. Um diesen neuen Ansatz für die Lokalisationsmikroskopie zu testen, wurde das Tubulinskelett von Mäusefibroblasten markiert und nach Zugabe von Kupfersulfat untersucht (vgl. Abb. 4.4).

Anhand der Messungen wurde eine Einschränkung der Sonde deutlich. So führt die verwendete Markierungsmethode zu einer Fluorophordichte, die einige Lücken bei der Abbildung mit dem Mikroskop aufweist (vgl. Abb. 4.5 (a)), da meistens nur 4–6 Fluorophore pro Primärantikörper vorhanden sind, es aber auch viele unmarkierte Antikörper gibt (vgl. Abb. B.11 (b)). Die in Abbildung 4.5 (b) gezeigte Markierungsdichte, die mit Hilfe der in der Immunohistochemie standardmäßig verwendeten Sekundärantikörperfärbung erreicht werden kann, ist mit 12–18 Fluorophoren pro Primärantikörper (vgl. Abb. B.11 (a)) deutlich dichter. Mit der hohen Anzahl an Fluoreszenzemittern geht in der Fluoreszenzmikroskopie eine höhere Helligkeit einher. Eine markierte Struktur erscheint dadurch deutlich dichter. In der Lokalisationsmikroskopie, wie etwa bei STORM, bedeutet dies, dass mehr Farbstoffe ausgeschaltet werden müssen, um eine Visualisierung einzelner Emittter zu ermöglichen. Eine andere Problematik, die mit der Messung der Fluoreszenzfluktuationen der einzelnen Moleküle einhergeht, ist das Auftreten von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz. Dieser Effekt setzt sich zum einen aus der biologischen Autofluoreszenz und zum anderen aus dem Vorhandensein von unvollständig hybridisierten oder defekten Sonden zusammen. Um trotz der Autofluo-



(a) Die Markierung über einen Primärantikörper, Streptavidin und die Sonde führt zu einer sehr dünnen Markierungsdichte, bei der Löcher auftreten. Die Größenskala entspricht 1 μm .



(b) Die Verwendung des Standardverfahrens mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (Atto 633) führt zu deutlich dichter markierten Strukturen. Die Größenskala entspricht 1 μm .

Abbildung 4.5.: Aufnahmen von unterschiedlich markierten Tubulin-Skeletten.

reszenz Hochauflösungsbilder zu erhalten, wurde die erhöhte Photostabilität der mit Kupfer wechselwirkenden Sonden ausgenutzt (vgl. Abb. 3.20 und B.10). Dazu wurden die Proben zu Beginn der Messungen für einige Minuten mit dem Laserlicht bestrahlt, was zu einer Photozerstörung der weniger photostabilen Fluoreszenzmitter führt. So konnten anschließend die Fluoreszenzfluktuationen der Sonde gemessen werden.

Lokalisationsmikroskopie mit anderen Mikroskopen

Auf Grund der Unabhängigkeit von der Laserleistung für das Schalten zwischen den unterschiedlichen Zuständen, lässt sich die Sonde prinzipiell auf jedem Mikroskop anwenden, das einen einzelmolekülempfindlichen 2D-Sensor besitzt. Um dies zu testen, wurden, in Kooperation mit Tim Kaminski (AK Kubitscheck, Univ. Bonn), einige Vorexperimente auf einem SPIM gemacht. Trotz der prinzipiellen Kompatibilität, ist die Methode des chemischen Schaltens dennoch auf einige Probleme gestoßen. Aus schutzrechtlichen Gründen ist die Darstellung der Daten leider nicht möglich, jedoch sollen hier die prinzipiellen Einschränkungen und Lösungsansätze beschrieben werden. Verbunden mit der flächigen Anregung ist das $25\times$ größere Anregungsvolumen in z -Richtung, verglichen mit dem Anregungsvolumen bei der TIRF-Mikroskopie, ein Problem, da dadurch die Hintergrundfluoreszenz erhöht wird. Dabei spielt nicht nur die biologische Autofluoreszenz eine Rolle, sondern auch die Funktionsweise der Sonde. Durch die Kupferkonzentration kann lediglich die Länge der An-Zustände verringert werden; befindet sich die Länge der An-Zustände unter der Belichtungszeit, wird keine scharfe PSF mehr detektiert, sondern lediglich einige stochastisch verteilte Photonen, die als Hintergrundrauschen gewertet werden. Zwar ist es auf Grund der Wahrscheinlichkeitsverteilung möglich, dass einige PSFs detektiert und angepasst werden, die

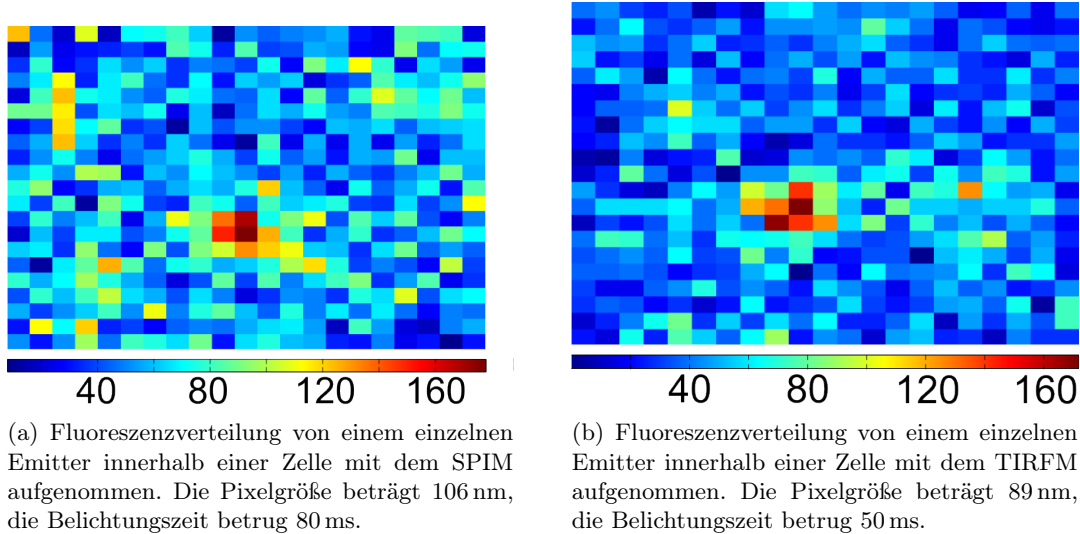


Abbildung 4.6.: Fluoreszenzverteilung durch einzelne Farbstoffe in Zellen.

Hintergrundfluoreszenz ist jedoch auf Grund der zu kurzen An-Zustände drastisch erhöht, so dass das Signal-zu-Rausch-Verhältnis leidet.

Durch den Einsatz eines Spezial-Objektives mit einem besonders hohen Arbeitsabstand, wie es bei der Mikroskopie mit flächiger Anregung notwendig ist, und der daraus resultierenden niedrigen numerischen Apertur, ist des Weiteren die Wahrscheinlichkeit, Fluoreszenzphotonen zu detektieren, eingeschränkt. Dies vermindert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis der Messung weiter und erschwert die Lokalisation einzelner Punktabbildungsfunktionen.

Eine weitere Problematik ist in der Probenpräparation gegeben. Da es auf Grund von Interferenzen nicht möglich ist, auf der Oberfläche der Probenkammer zu messen, müssen die Proben auf kleinen Kugeln, mit einem Durchmesser von ca. $100\ \mu\text{m}$, immobilisiert und anschließend in die Probenkammer gelegt werden. Da sich die Fluoreszenzemitter nun in einem Abstand von $20 - 100\ \mu\text{m}$ von der Oberfläche des Deckglases befinden, ist die Streuung der Fluoreszenzphotonen im Medium und Zytosol deutlich höher als bei einer direkt auf dem Deckglas immobilisierten Sonde. Da die Kugeln mit den Zellen nicht befestigt werden können, kann es zusätzlich zu kleinen Bewegungen der Kugeln kommen, was die Lokalisation der Fluorophore verändert.

Betrachtet man als grobe Abschätzung ein sphärisches Partikel mit einem Radius von $50\ \mu\text{m}$ in Wasser mit einer Viskosität von $\eta = 0,9\ \text{mPa}\cdot\text{s}$ bei $T = 293\ \text{K}$, so ergibt sich eine Diffusionskonstante (vgl. Kapitel 1.3) von:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \approx 500 \frac{\text{nm}^2}{\text{s}} \quad (4.1)$$

Bei Messungen über eine Länge von ca. $20 - 30$ Minuten können also deutliche Verschiebungen der Glaskugel auftreten, wodurch die Lokalisationsmikroskopie deutlich erschwert wird.

In der Summe aller Fehlerquellen erfolgt eine deutliche Verschlechterung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses einer PSF. Dies ist in Abb. 4.6, am Beispiel von Punktabbil-

Parameter	SPIM	TIRFM
Amplitude	112,3 ± 14,7	133,6 ± 11,9
Offset	57,2 ± 1,2	39,3 ± 0,9
Standardabweichung in x [Pixel]	0,64 ± 0,08	0,57 ± 0,05
Standardabweichung in y [Pixel]	0,51 ± 0,07	0,54 ± 0,05
Belichtungszeit	80 ms	50 ms

Tabelle 4.5.: Parameter der 2D-Gauß-Anpassung an die PSFs aus Abbildung 4.6.

dungsfunktionen einer TMR-BiPy Sonde innerhalb einer Zelle, gezeigt. Zur Analyse der Fluoreszenzverteilung wurde ein 2D-Gauß an diese Daten angefitet.

$$z = z_0 + A \cdot e^{-0,5 \cdot \left(\frac{x-x_c}{w_x}\right)^2 - 0,5 \cdot \left(\frac{y-y_c}{w_y}\right)^2} \quad (4.2)$$

Die Fitparameter, die sich durch die Annäherung ergeben, sind in Tabelle 4.5 aufgetragen. So fällt neben dem deutlich schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf, dass die Form der PSF bei der SPIM-Messung deutlich asymmetrischer ist, als bei der PSF die mit dem TIRFM detektiert wurde. Dies ist auf eine schlechtere Photonenstatistik zurückzuführen.

Um die Problematiken von SPIM zu umgehen sind verschiedene Schritte notwendig. Zum einen ist eine effizientere Methode zur Immobilisierung der Proben von Nöten, zum anderen muss die Messdauer erhöht werden um eine bessere Lokalisation der Farbstoffe zu ermöglichen. Mit der Erhöhung der Belichtungszeit wird allerdings auch die Anwendung der BiPy-TMR basierten Sonde komplizierter, da die An-Zustände, bei der nötigen Kupferkonzentration, kürzer sind als die Belichtungszeit und somit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis leidet. Auf mögliche Modifikationen der Sonde, um die Zustands-Dauern zu manipulieren wird später eingegangen.

Vergleich der unterschiedlichen Lokalisationsmikroskopie-Methoden

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, konnte gezeigt werden, dass eine chemisch schaltbare Sonde durchaus geeignet ist, um Anwendung in der Lokalisationsmikroskopie zu finden. Im Folgenden soll nun die entwickelte Methode *CHIRON* mit den bestehenden Methoden *STORM* und *PALM*, unter Berücksichtigung verschiedener Gesichtspunkte, diskutiert werden.

Markierung der Zielproteine

Bei der Markierung der interessanten Proteine, bietet *PALM* den direktesten Ansatz. Durch Modifikation der DNA exprimiert die Zelle die Zielproteine direkt mit dem Farbstoffkonstrukt. Bei der *STORM*-Methode sind viele farbstoffmarkierte Sekundärantikörper erhältlich, die zum lichtgetriebenen Schalten geeignet sind. Die Markierung von Proteinen mit der *CHIRON*-Sonde ist die komplexeste Methode, da ein zusätzlicher Markierungsschritt notwendig ist.

Stöchiometrie der Markierung

Bei der Stöchiometrie der Markierung ist ebenfalls PALM die Methode, die den besten Ansatz bietet, da jedes Protein, vorausgesetzt es wird korrekt gefaltet, eine genau definierte Anzahl von Fluorophoren trägt. Bei CHIRON ist das erreichte Markierungsverhältnis der Proteine, mit einem Verhältnis von ca. 4-6 Farbstoffen pro Primärantikörper, deutlich geringer als bei STORM (ca. 14-16 Farbstoffe pro Primärantikörper) aber dafür sind die statistischen Schwankungen auch deutlich höher (vgl. Abb. B.11).

Messdauer

Bei allen Methoden hängt die Messdauer stark von der Fluorophordichte ab. Die Gesamtmessdauer ist bei PALM tendenziell am höchsten, da die Farbstoffe der Reihe nach zerstört werden müssen, was in der Regel mehr Zeit in Anspruch nimmt, als das photoinduzierte Schalten oder stochastische Fluktuationen. Es lässt sich unter diesem Gesichtspunkt aber keine generelle Methode hervorheben.

Voraussetzungen an das Mikroskop

Da bei CHIRON weder hohe Lichtintensitäten noch mehrere unterschiedliche Wellenlängen benötigt werden, ist der zu betreibende Aufwand am geringsten. Die einzige Voraussetzung, die für die Verwendung der Sonden zur Hochauflösungsmikroskopie erfüllt sein muss, ist ein empfindlicher Detektor und ein schwingungsarmes Mikroskop. Sind diese Bedingungen erfüllt, lässt sich die Sonde auf jedem mit einem 2D-Detektor ausgestatteten Mikroskop einsetzen. Bei STORM müssen neben den gleichen Anforderungen an Stabilität und Sensitivität noch zusätzliche Laser und/oder Laser mit einer hohen Leistungsdichte verwendet werden. PALM benötigt einen Laser mit einer sehr hohen Energie ($\lambda_{\text{Anregung}} < 500 \text{ nm}$), um die Farbstoffe zu aktivieren, und ein schwingungsarmes und sensitives Mikroskop.

Biologische Verträglichkeit

Neben der Markierung der Zellen, die bei der Anfärbung über Antikörper, wie im Fall von STORM und CHIRON, in den meisten Fällen nur bei fixierten Zellen funktioniert, bietet die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Methode die größte Verträglichkeit für die biologischen Proben. Bei STORM ist ein photostabilisierender Puffer nötig, um genug Schaltzyklen vor der Photozerstörung der Farbstoffe zu erlauben. Des Weiteren werden bei PALM und STORM hohe Laserintensitäten benötigt, welche eine phototoxische Reaktion der Zellen verursachen können [116]. Zwar wurden mittlerweile *in vivo* Experimente in Zellen mit beiden Methoden durchgeführt [111, 121], dafür wurde aber statt der Markierung über Antikörper, ein Protein verwendet, das in der Lage ist Farbstoffkonjugate kovalent an sich zu binden (SNAP-tag). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Leistungsdichten der Laser zu Artefakten bei dem Zellmetabolismus führen. Die für die Sonde notwendigen Kupferkonzentrationen zeigten, bei der für die Messung notwendigen Dauer, zumindest keine toxischen Eigenschaften, da Kupfer auch in den Puffern vorkommt, in denen Zellen in Kultur gehalten werden. Daher ist es auch zweifelhaft, ob geringe Kupferkonzentrationen (im mikromolaren Bereich) einen Einfluss auf den Zellmetabolismus haben.

Einstellen der Fluoreszenzkinetik

Alle Methoden basieren darauf, dass der Anwender aktiv Einfluss auf die Kinetik des Schaltens nehmen kann. Dies ist ein essentieller Parameter, um das nötige Verhältnis $\frac{\tau_{\text{aus}}}{\tau_{\text{an}}}$, das von der Markierungsdichte abhängt, anpassen zu können. In den lichtgetriebenen Methoden wird dies über die Manipulation der Laserintensitäten erreicht, wodurch beide Parameter unabhängig voneinander angepasst werden können. Bei CHIRON wird lediglich die Länge der fluoreszenten Zustände durch die Kupferkonzentration beeinflusst, wodurch das Einstellen der Dauern der Zustände nur begrenzt möglich ist. Dafür ist der Schaltmechanismus aber von den Lasern unabhängig und die eingestrahlte Laserintensität kann so gewählt werden, dass das bestmögliche Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht wird.

Zusammenfassung von CHIRON

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit gezeigt, dass chemisch getriebene Reaktionen für die Lokalisationsmikroskopie genutzt werden können. Als Sonde diente hier eine doppelsträngige DNA mit zwei Liganden, einem Bipyridin, das in der Lage ist Kupfer zu komplexieren und einem Tetramethylrhodamin, das bei Komplexierung des Kupfers an das BiPy gelöscht wird. Da diese chemische Reaktion reversibel ist und sich in Zeitbereichen von mehreren hundert Mikrosekunden bis hin zu Sekunden abspielt, ist die Sonde für die Lokalisationsmikroskopie geeignet. Anhand von Einzelmolekülmessungen wurde gezeigt, dass die Lokalisationsgenauigkeit von Fluorophoren, wie zu erwarten, in ähnlichen Größenbereichen liegt, wie bei anderen Lokalisationsmikroskopiemethoden.

Um die Anwendbarkeit von CHIRON in biologischen Proben zu zeigen, wurde ein Markierungsprotokoll entwickelt das es ermöglicht das Tubulinskelett von Zellen anzufärben. Hierbei ergab sich aber die Einschränkung, dass die verwendete Markierung zu einer inhomogenen Markierungsdichte führt, wodurch bei der Abbildung von Filamenten Löcher auftreten. Eine weitere Problematik liegt darin, dass TMR ein Farbstoff ist, der Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von unter 630 nm aussendet. Damit fällt die detektierte Fluoreszenz mit der Autofluoreszenz von biologischen Proben zusammen. Ein weiterer Faktor, der bei der Abbildung von den Kupfersonden zu einem erhöhten Hintergrundsignal führt, ist, auf Grund der Komplexität des Aufbaus der Sonde im Vergleich zu einem einfachen Farbstoff, die hohe Anfälligkeit der Sonde gegenüber unvollständiger Hybridisierung und defekten/unvollständig markierten Strängen. Diese Effekte konnten dadurch minimiert werden, dass über eine gezielte Photozerstörung die Hintergrundfluoreszenz minimiert wurde, während die funktionalen Sonden mit einer hohen Photostabilität davon nur wenig beeinträchtigt wurden. Nichtsdestotrotz liegen gerade im Aufbau/Design der Sonde, die größten Möglichkeiten um CHIRON weiterzuentwickeln.

Weiterentwicklung der Sonde

Die Sonde wurde so entwickelt, dass sie eine hohe Flexibilität gegenüber Modifikationen aufweist. Somit ist es möglich, die Sonde hinsichtlich ihrer Liganden zu verändern.

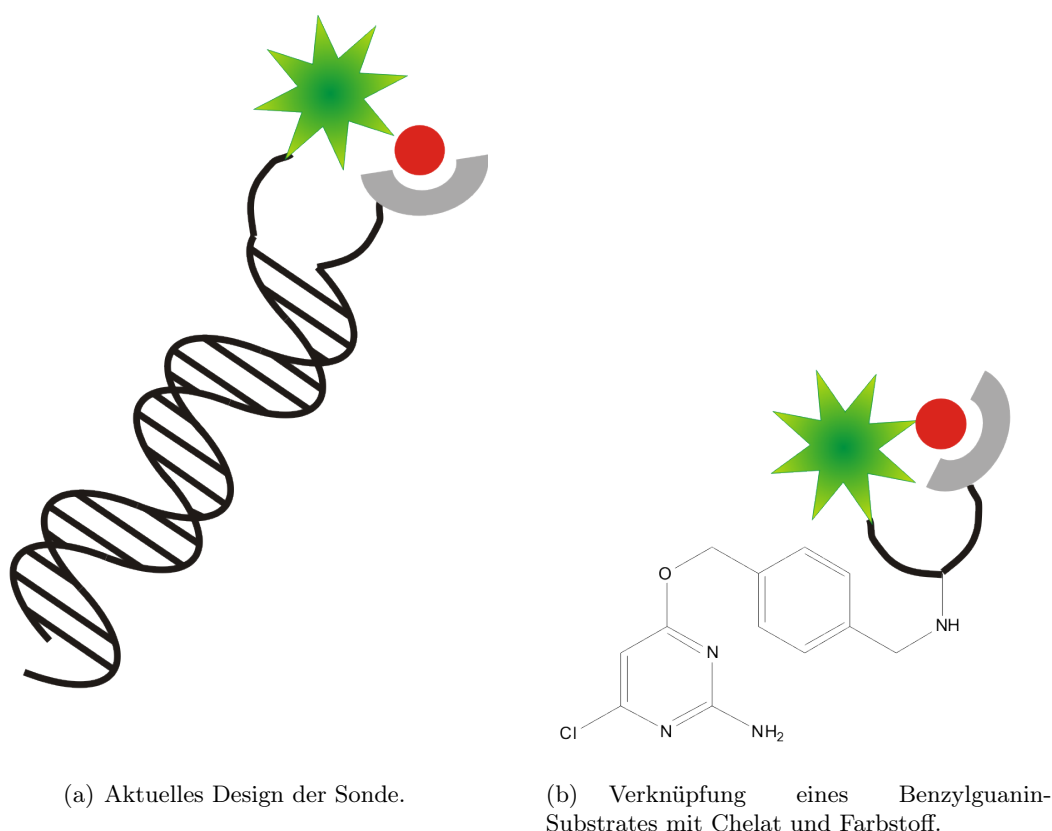


Abbildung 4.7.: Aufbau der Sonde

Als Grundvoraussetzung ist lediglich gegeben, dass der Farbstoff, zur Kopplung an eine aminomodifizierte DNA, als NHS-Ester vorliegt, und der Chelat über eine Carbonsäure an das Oligonukleotid gekoppelt werden kann. Im Hinblick auf die Verbesserung der Sonde zum Einsatz in der Hochauflösungsmikroskopie birgt vor allem die Substitution des BiPy durch einen anderen Chelaten Potential. Ein Kandidat zur Substitution ist beispielsweise Dipicolylamin ein vielversprechender Kandidat. Dieser Chelat weist eine höhere Bindungsenergie gegenüber Cu^{2+} -Ionen auf als BiPy. Dadurch steht zu erwarten, dass die Dauer des gelöschten Zustands einer entsprechenden Sonde länger ist und somit eine niedrigere Kupferkonzentration für die Lokalisationsmikroskopie-Messung benötigt wird, bzw. Strukturen mit einer hohen Farbstoffdichte aufgelöst werden können. Ein weiterer Ansatzpunkt, der im Rahmen des Einsatzes der Sonde in Zellen geprüft werden wird, ist die Bindung von anderen zweiwertigen Ionen an den Chelaten und die daraus veränderte Effizienz der Fluoreszenzlöschung. Wenn die Sonde dahingehend verändert werden kann, dass die Fluoreszenzlöschung auch bei Ionen wie Magnesium auftritt, wäre das Hinzufügen von Ionen in biologischen Proben nicht mehr nötig, da diese auch in der natürlichen Umgebung von Zellen in entsprechenden Konzentrationen vorhanden sind. Durch das Ersetzen des Tetramethylrhodamins in der Sonde durch einen rot fluoreszierenden Farbstoff, kann des Weiteren die Problematik der Autofluoreszenz verringert werden. Ein anderer Ansatzpunkt zur

Weiterentwicklung der Sonde, besteht in der Änderung der Grundstruktur der Sonde. Da die doppelsträngige DNA mit Ionen wechselwirken kann, was beispielsweise zur unspezifischen Löschung der Fluoreszenz beitragen kann, ist eine Änderung des Sondendesigns für die Anwendung in biologischen Proben sinnvoll. Ein Ansatzpunkt, der zudem eine effizientere und stöchiometrische Markierung von biologischen Proben ermöglicht, ist die Verknüpfung von einem kommerziell erhältlichen Benzylguanin (New-England Biolabs) mit der Sonde (vgl. Abb. 4.7). Durch Einbringen eines genetisch modifizierten Proteins (Snap26m, New-England Biolabs) ist es möglich das Benzylguanin-modifizierte Substrat direkt an ein modifiziertes Protein zu binden, was die Artefakte durch die komplizierte, antikörperbasierte Färbung eliminiert [147, 148]. Der Einsatz von einem SNAP-tag zur Markierung von Proteinen verbindet somit die Stärken der PALM Mikroskopie hinsichtlich der Probenpräparation mit den besseren Fluorophoreigenschaften der Proben, wie sie bei CHIRON und STORM genutzt werden. Eben dieser SNAP-tag hat es auch ermöglicht, die ersten *in vivo* Messungen von Zellen mit Hilfe von STORM durchzuführen, da nicht länger die Verwendung von Antikörpern nötig ist, sondern, analog zu fluoreszenten Proteinen, die Information der DNA über die Proteinsequenz, modifiziert werden kann [111, 121].

Aberrationsfreie Mikroskopie

Neben der Anwendung der Sonde für die Hochauflösungsmikroskopie, konnte gezeigt werden, dass die Möglichkeit besteht, aberrationsfreie Zwei-Kanal-Messungen durchzuführen. Dazu wird eine Probe, die parallel mit einem mit Tetramethylrhodamin modifizierten Antikörper und der CHIRON-Sonde markiert wird, benötigt. Zunächst wird die Sonde durch die Zugabe einer hohen Konzentration an Kupfersulfat ausgeschaltet und das TMR der anderen Markierung abgebildet. Nach der Photozerstörung des TMR kann die Fluoreszenz der Sonde durch EDTA wiederhergestellt werden, was die Aufnahme einer weiteren Farbstoffmarkierung derselben Wellenlänge erlaubt. Im Gegensatz zu alternativen Methoden der aberrationsfreien Mikroskopie ist der hier verwendete Ansatz sehr praktikabel.

Bei Messungen, die auf der Fluoreszenzlebensdauer basieren, treten oft auf Grund der Umgebung der Fluorophore starke Schwankungen auf, was die Unterscheidung zweier Farbstoffe erschwert. Sind unterschiedliche Farbstoffe dicht beieinander, ergibt sich für die Überlappung der Lebensdauern ein multi-exponentieller Zusammenhang, der sehr schwer anzupassen ist.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zwei Fluorophorsysteme aus Donor und Akzeptor zu entwerfen, wobei die Donorfarbstoffe unterschiedliche Absorptionsspektren haben, aber ihre Energie auf den gleichen Akzeptor übertragen. Der Nachteil bei dieser Methode liegt darin, dass mehrere Anregungswellenlängen benötigt werden und entsprechende Sonden so entwickelt werden müssen, dass zwei unterschiedliche Donore für das gleiche Akzeptormolekül hohe Übertragungseffizienzen aufweisen. Für diese Art der Methode wurden bisher auch noch keine biologischen Messungen durchgeführt. Lediglich anhand von Einzelmoleküloberflächen konnte hier ein Proof-of-Principle erarbeitet werden.

Die CHIRON-Sonde ist, nach bestem Wissen, der erste Ansatz, um eine direkte, aberrationsfreie Zwei-Kanal-Mikroskopie in biologischen Proben zu ermöglichen. Dabei

wird nicht der Umweg über die Messung der Fluoreszenz-Lebensdauer gegangen, statt dessen werden zwei ähnliche Farbstoffe, die durch chemisches Schalten zeitlich voneinander getrennt werden, abgebildet. Die Anwendbarkeit auf biologische Proben konnte erneut mit Hilfe des Tubulins von Zellen nachgewiesen werden, wobei hier noch Messungen ausstehen, um die Trennbarkeit von unterschiedlichen Strukturen zu zeigen. Dazu wird eine zweite Struktur benötigt, die sich über eine Methode markieren lässt, bei der die Markierungsschritte nicht miteinander wechselwirken.

Kombination der aberrationsfreien Mikroskopie mit STED

Die Ausnutzung der Fluoreszenzlöschung durch Kupfer und Restauration durch EDTA bietet des Weiteren die Möglichkeit, die STED-Mikroskopie weiter zu entwickeln. Gerade in der STED-Mikroskopie ist die Messung von mehreren, unterschiedlich markierten Zielproteinen problematisch. Zum einen benötigen die Farbstoffe sowohl einen Anregungslaser als auch einen STED-Laser mit sehr hoher Energiedichte, so dass je nach Probe drei bis vier Laserlinien benötigt werden; zum anderen treten die chromatischen Aberrationen, die bei Verwendung mehrerer Farben eine Rolle spielen, im Verhältnis zu beugungsbegrenzter Mikroskopie, stärker ausgeprägt auf. Eine Anwendung von der CHIRON-Sonde in der STED-Mikroskopie kann an dieser Stelle einen Ansatzpunkt bieten, um nacheinander unterschiedliche Zielproteine mit Hilfe einer aberrationsfreien nanoskopischen Methode abzubilden.

5. Materialien & Methoden

5.1. Material & Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien hatten eine p. a. Qualität. Die Lösungsmittel der HPLC-Anlage (Acetonitril, Methanol und Isopropanol) wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Das verwendete Wasser wurde in einer hauseigenen Milli-Q Anlage aufbereitet. Der MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) wurde ebenfalls bei Sigma-Aldrich gekauft und in Wasser gelöst. Der MOPS-Puffer wurde bei einer Konzentration von 10 mM mit Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Der PBS-Puffer wurde von Sigma-Aldrich als fertig gelöster Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 bestellt (enthält 130 mM Natriumchlorid und 2,7 mM Kaliumchlorid). Das Kupfersulfat und das EDTA wurde ebenfalls bei Sigma-Aldrich erstanden, genauso wie die 0,1 M Flusssäure. Zur Herstellung der MOPS-Puffer wurde der Puffer zusätzlich mit Chelex 100 versetzt, um eventuelle Spuren an freien Ionen zu entfernen, und anschließend gefiltert. Das Chelex 100 wurde bei Bio-Rad (München) gekauft und der pH-Wert des Puffers vor Benutzung noch einmal angepasst. Für die Einstellung des pH-Wertes der Kopplung, sowie der Einstellung des pH-Wertes für die Messpuffer, wurde Natronlauge und Flusssäure verwendet.

Für die Messungen auf der Einzelmolekülanlage wurden spezielle 8-Kammer-Deckgläser (Lab-TekTM) der Firma Nunc (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Die Deckgläser bestehen aus einem 0,17mm dicken Deckglas, auf das ein Kunststoff-Kammersystem gesetzt ist (Brechungsindex des Deckglases ist $n = 1,517$). Für die Präparation der Oberfläche wurden folgende Chemikalien benutzt:

- biotinyliertes BSA (Bovines Serumalbumin) von Sigma-Aldrich
- BSA (Reinheit $\geq 98\%$) von Sigma-Aldrich
- rekombinantes Streptavidin von Roche Diagnostics
- Neutravidin von Pierce

Die benutzten Farbstoffe wurden von unterschiedlichen Herstellern bezogen:

- 5-Carboxy-tetramethylrhodamine N-succinimidyl ester von Sigma-Aldrich
- Atto 620, Atto 633, Rho 11, Rho 12, Rho 13 als NHS-Ester von Atto-Tec (Berlin)

Für die Sonde wurden die benötigten Einzelstränge, aus denen das Grundgerüst besteht, bei Sigma-Aldrich bestellt.

- Biotin-5'-CCC GCG CTT GCT TTG CGT TTT T-3'-C7-Amino
- Biotin-5'-CCC GCG CTT GCT TTG CGT TTT T-3'-C6-TMR

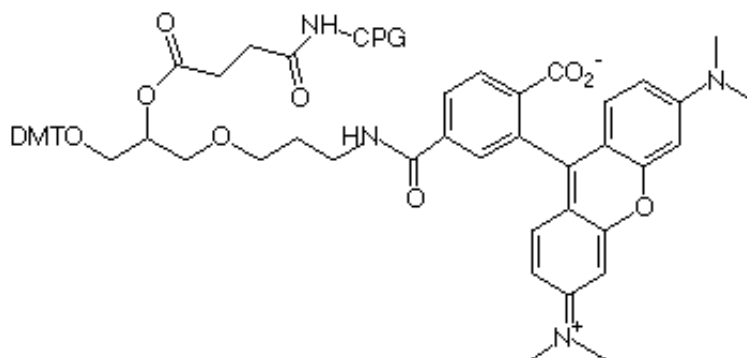


Abbildung 5.1.: Der von Sigma-Aldrich verwendete Tetramethylrhodamin-Farbstoff [149].

Sigma verwendete als Farbstoff für die Oligonukleotidsynthese das in Abbildung 5.1 gezeigte Tetramethylrhodamin von Glen-Research. Der zugehörige Gegenstrang mit dem BiPy-Liganden wurde von Dominic Riedel (AK Hashmi) gekoppelt und zur Verfügung gestellt. Als Grundgerüst für den 4,4'-Dicarboxy-2,2'-Bipyridin Liganden (Sigma-Aldrich) diente hierzu ein von Sigma-Aldrich bezogener, festphasengekoppelter Einzelstrang:

- MMT-Amino-5'-AAA AAC GCA AAG CAA GCG CGG G-3'

Dabei wurde die MMT-Schutzgruppe nach der Synthese des Oligonukleotids mit Trichloressigsäure abgespalten. Dadurch wird eine Aminogruppe freigelegt, die über einen C6-Spacer durch eine Phosphodiesterbindung an das 5'-Ende des DNA-Strangs gekoppelt ist.

Für die Experimente, die in Zellen durchgeführt wurden, sind folgende Zelllinien verwendet worden:

- Mäusefibroblasten (NIH 3T3) von der DMSZ in Braunschweig
- menschliche Epithelzellen (HeLa) von der DMSZ in Braunschweig

Zusätzlich wurden folgende Materialien verwendet:

- Kulturmedium (DMEM) von Sigma-Aldrich
- Paraformaldehyd (PFA) von Sigma-Aldrich
- TritonX-100 von Sigma-Aldrich
- Fetales Kälberserum (NCS) von der Biochrom AG (Berlin)
- biotinylierter α -Tubulin Antikörper (IgG, monoklonal, Maus) von Invitrogen
- Maus-IgG (H+L) Antikörper mit TMR (IgG, monoklonal, Ziege) von Invitrogen
- TrypLE™ von Gibco / Invitrogen
- Trypan Blau (0,4 %) von Gibco / Invitrogen

5.2. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) & Sondenherstellung

Die Kopplung der Sonden ohne Tetramethylrhodamin erfolgte nach Standardvorschriften. Je nach Farbstoff wurden dabei unterschiedliche Kopplungsverfahren benutzt, um möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen. Zur Kopplung wurden Oligonukleotide und ein 2 – 5facher Überschuss an Farbstoff mit NHS-Estern in einem Carbonatpuffer mit pH=9,0 (bestehend aus Natrium-Bicarbonat bei einer Konzentration von 0,2 M) verwendet. Alternativ wurde die Kopplung in einem Boratpuffer, mit einem pH-Wert von 8,5 bei einer Konzentration von 0,1 M durchgeführt. Die Kopplung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur in einem Schüttler. Nach der Kopplung wurden sämtliche Proben über die HPLC (Agilent 1100) aufgereinigt, um die Probe von freiem Farbstoff und Salzen zu befreien. Die Aufreinigung per HPLC erfolgte über einen Flüssigkeitsgradienten von 95 % Wasser und 5 % TEAA nach 75 % Acetonitril, 20 % Wasser und 5 % TEAA. Nach der Aufreinigung der Proben, wurden sie über Nacht unter Vakuum trocken gezogen um Acetonitril-Rückstände zu eliminieren und anschließend in Wasser resuspendiert.

Zur Markierung des komplementären Bipyridin-Strangs, wurde eine Mischung aus der Dicarbonsäure (BiPy) mit 100 Äquivalenten HBTU und HOBt vereint und im Vakuum trockengezogen. Die Carbonsäure wurde anschließend in 1 ml DMSO und 220 µl DIPEA resuspendiert und zu dem festphasengekoppelten Oligonukleotid gegeben. Die Spritze, in der die Reaktion stattfindet, wurde luftdicht mit Parafilm umwickelt und für 1 Stunde geschüttelt. Die Lösung wurde anschließend dreimal mit DMSO und Acetonitril gewaschen und dann trockengezogen. Anschließend wurden die Rückstände für 2 Stunden bei 55 °C in einer Ammoniak-Lösung (25 % wässrig) resuspendiert. Das Ammoniak wurde danach unter Stickstoff entfernt und die Probe mit flüssigem Stickstoff und unter Anlegen eines Vakuums gefriergetrocknet. Zur Aufreinigung per HPLC, wurde das markierte Oligo in Wasser gelöst.

Die Unterscheidung der Fraktionen für die Aufreinigung in der HPLC, geschah über die Detektion der Absorptionsmaxima der Farbstoffe und der Detektion der Absorption der Aminosäuren bei 260 nm.

Die Hybridisierung der Proben erfolgte durch das Erhitzen einer Mischung der beiden komplementären Stränge im äquimolaren Verhältnis. Diese Mischung wurde langsam auf 70 °C erhitzt, um mögliche Sekundärstrukturen der Proben zu lösen und danach mit $-1^\circ/\text{min}$ auf eine Temperatur von 4 °C gekühlt, um eine möglichst effiziente Hybridisierung zu erreichen. Die hybridisierten Stränge wurden bei -20°C eingefroren und gelagert. Die Konzentration der gefrorenen Stocklösungen liegt bei ca. 10^{-5} M , um eine möglichst lange Haltbarkeit zu erreichen.

5.3. Ensemble-Messungen

Die Messungen der Absorption wurden an einem „Cary 500 Scan“ Spektrometer der Firma Varian (Agilent Technologies, Böblingen) durchgeführt. Die verwendeten Küvetten bestehen aus Quarzglas (Suprasil, Hellma, Müllheim) und wurden mit einem Probenvolumen von 60 – 100 µl befüllt. Als Anregungslichtquelle dient in dem Spektrometer eine Xenon-Blitzlampe, die lichtempfindliche Proben schützt. Die Absorpti-

onsspektren der Probe werden von niederenergetischer Strahlung in hochenergetische Wellenlängen durchgefahen. Über die Messung einer lediglich mit Puffer gefüllten Küvette wird automatisch eine Hintergrundkorrektur durchgeföhrt. Die Fluoreszenz wurde in den gleichen Küvetten mit Hilfe eines „Cary Eclipse 500“ Spektrometers der Firma Varian (Agilent Technologies, Böblingen) gemessen. Dazu wurden feste Anregungswellenlängen eingestellt und das Absorptionsspektrum der Probe vom hochenergetischen Wellenlängenbereich in den niederenergetischen Bereich gemessen. Die Anregungswellenlänge wurde gewählt, um die Probe über das Absorptionsmaximum anzuregen. Die Detektion der Fluoreszenz geschieht über eine PMT, deren Spannung reguliert und somit die Detektionsempfindlichkeit für die Fluoreszenz angepasst werden kann. Die Intensität des eingestrahlteten und des detektierten Lichts kann zusätzlich auch über je eine Lochblende im Anregungsstrahlengang und Detektionsstrahlengang nachjustiert werden.

Absorptions-Messungen

Zur Bestimmung der Konzentration der Proben und um die Effizienz der Markierung zu Überprüfen wurden die Proben in dem Absorptionsspektrometer gemessen. Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten ϵ , lässt sich die Konzentration C der gemessenen Probe dann über das Lambert-Beersche-Gesetz (vgl. Formel 1.13) bestimmen:

$$C = \frac{A}{\epsilon \cdot d} \quad (5.1)$$

Hierbei gibt A den auf den Hintergrund korrigierten Absorptionswert an, der direkt gemessen werden kann und d die Weglänge in der benutzten Küvette. Um das Markierungsverhältnis eines Oligonukleotids zu bestimmen, kann einfach das Verhältnis der Absorption bei dem Absorptionsmaximum von Aminosäuren, $\lambda = 260$ nm, und dem Maximum des Farbstoffes betrachtet werden. Der Markierungsgrad DOL ergibt sich dann zu:

$$\text{DOL} = \frac{A_F}{\epsilon_F} \frac{\epsilon_{KF} + \epsilon_{260}}{A_{260}} \quad (5.2)$$

ϵ_{KF} ist bei dieser Formel ein Korrekturfaktor, der eine mögliche Absorption der Farbstoffe bei 260 nm miteinbezieht.

Fluoreszenz-Messungen

Die Messung der Fluoreszenz wurde an Proben mit einer Konzentration von 0,3 – 1 μM durchgeföhrt. Die Größe des Probenvolumens betrug 60 – 100 μl . Für die Untersuchung der Fluoreszenzlöschung wurden Kupferlösungen mit einer Kupfersulfatkonzentration von 10 – 100 μM in Wasser vorbereitet, um ein Ausflocken des Kupfers zu verhindern. Zur Messung der Fluoreszenzlöschung wurden 0,5 – 2 μl der Kupfersulfatlösung zu der Farbstofflösung pipettiert und mit einer 100 μl Pipette durchmischet, um eine möglichst hohe Homogenität zu erreichen. Die Konzentration des Kupfers wurde im Nachhinein auf das Gesamtvolumen umgerechnet, um die Stern-Volmer-Plots auf Verdünnungseffekte zu korrigieren.

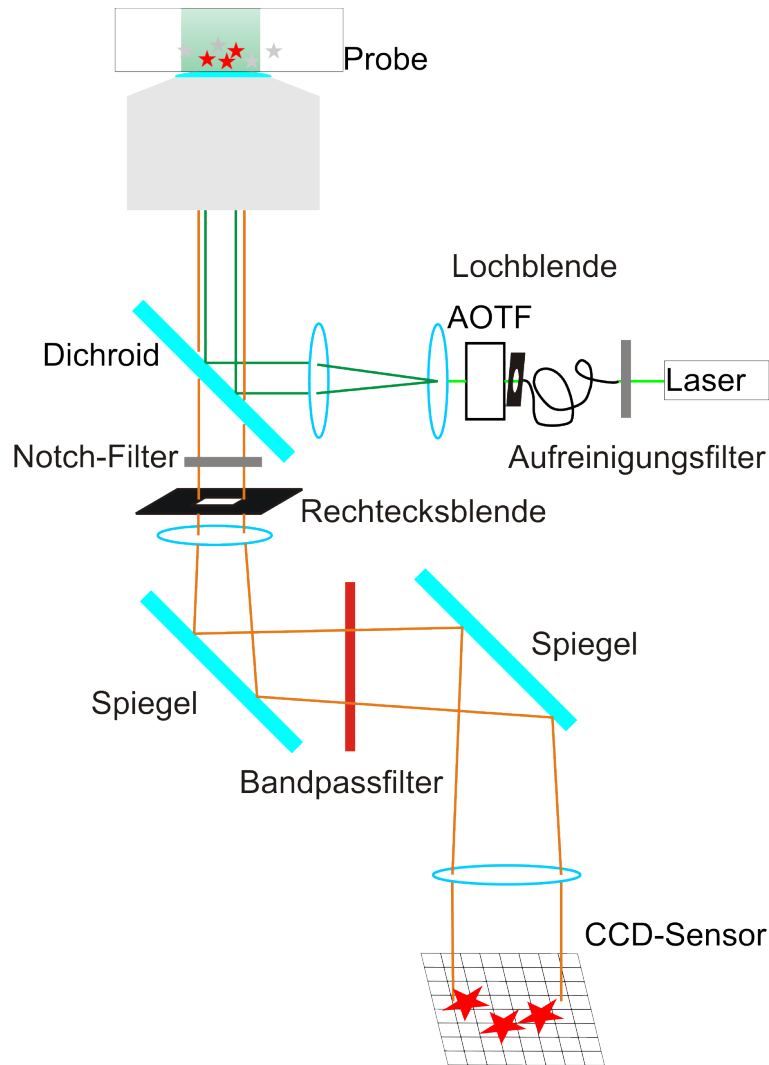


Abbildung 5.2.: Das selbstgebaute TIRF-Mikroskop

Lebensdauer-Messungen

Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern erfolgte über die FluoTim100 (PicoQuant, Berlin). Zur Anregung wurde eine auf 40 MHz gepulste 500 nm LED verwendet (Sub-nanoLED, PicoQuant, Berlin). Die Pulsdauer der Diode beträgt 300 ps. Durch Messung des Zeitversatzes zwischen Anregungslichtpuls und der Detektion der Fluoreszenzphotonen durch eine PMT, die über eine zeitkorrelierte Einzelphotonenzählkarte (TCSPC, TimeHarp 200, PicoQuant, Berlin) ausgelesen wird, kann eine Verteilung der Photonenankunftszeiten aufgetragen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte durch exponentielle Anpassung der Daten mit der Software FluoFit (PicoQuant, Berlin).

5.4. Aufbau des TIRF-Mikroskops

Das verwendete TIRF-Mikroskop, ist in der Arbeitsgruppe aufgebaut und ein vereinfachtes Schema des benutzten Strahlenganges ist in Abb. 5.2 gezeigt. Neben dem grünen 532 nm Laser (World Star Tech TECGL-30: 30mW Dauerstrich) besteht auch die Möglichkeit weitere Laserlinien in das Mikroskop einzukoppeln, zur Vereinfachung wurden diese jedoch nicht miteingezeichnet. Der Laserstrahl wird über einen Aufreinigungsfilter von Nebenlinien befreit, bevor er über eine Glasfaser in einen AOTF (AOTF.nC-VIS, AA Optoelectronic, Orsay Cedex, Frankreich) gekoppelt wird. Vor dem AOTF befindet sich zusätzlich eine manuell einstellbare Lochblende, über die der Laserstrahl soweit eingeschränkt wird, dass der AOTF nicht überstrahlt wird. Der AOTF wird über eine externe Steuerung so eingestellt, dass nur Licht der gewünschten Wellenlänge transmittiert wird, die Intensität kann ebenfalls manuell geregelt werden. Anschließend wird der transmittierte Laserstrahl über zwei Linsen - um den Strahl auf den beabsichtigten Durchmesser aufzuweiten - und drei Spiegel in ein inverses Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M) eingekoppelt. Im Mikroskop selbst wird das Licht über einen Dichroiden (Dual Line BeamSplitter z 532/633, AHF Analysentechnik), der nur das Licht mit den Wellenlängen von 532 und 633 nm reflektiert, in das Objektiv eingekoppelt. Als Objektiv diente für die Einzelmolekülmessungen ein Nikon-Objektiv mit der Numerischen Apertur von 1,49 (Nikon, CFI Apochromat TIRF 100× Öl). Als Immersionsmedium diente ein Nikon-Immersionsöl mit dem Brechungsindex $n = 1,515$. Für die Messungen von Zellen wurde entweder ein Olympus-Objektiv (PlanApochromat TIRF 100x, Numerische Apertur: 1,45) oder ein Zeiss-Objektiv (α -Plan-Fluar 100×, 1,45 Öl) mit einem Immersionsöl mit $n = 1,518$ (Zeiss, Jena) verwendet. Das Mikroskop wurde so aufgebaut, dass es möglich ist, über paralleles Verschieben des letzten Spiegels vor dem Mikroskop, den Laserstrahl ebenfalls parallel zu verschieben. Dadurch kann der Einfallswinkel des Anregungslichtes verändert werden um so zwischen Weitfeld- und TIRF-Mikroskopie zu wechseln.

Das Fluoreszenzlicht der angeregten Farbstoffmoleküle ist durch die Stokes-Verschiebung rotverschoben und kann den Dichroiden verlustfrei passieren (vgl. Kap. 1.3). Die Objektebene wird durch das Mikroskop auf die Bildebene projiziert, in der sich eine rechteckige Blende befindet. Diese Bildebene wird anschließend über zwei Linsen, die in der Art eines Teleskops angeordnet sind, vergrößert auf den Sensor projiziert. Vor der ersten Linse befindet sich ein Notch-Filter (Triple-Notch Filter 488/532/631 – 640 nm (AHF)), der Streulicht vom Laser, das innerhalb des Mikroskops durch Reflektionseffekte in den Detektionsstrahlengang geleitet wird, unterdrückt. Zwischen den Linsen des Teleskopes befindet sich ein Bandpassfilter, der das Fluoreszenzlicht von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz und Wärmestrahlung im nahen infraroten Bereich separiert. Der verwendete Bandpassfilter (Sperrfilter HQ 585/60 (AHF)) hat eine schmale Transmissionsbande die auf das Fluoreszenzspektrum von Tetramethylrhodamin ausgelegt ist (vgl. Abb. B.6). Als Detektor dient eine CCD-Kamera mit 512×512 Pixeln (Andor iXon^{EM}+ 897 CCD, Andor, Dublin), bei der durch eine spezielle Sensortechnologie (Rückbelichtete Pixel) die Sensitivität der Pixel erhöht ist. Durch Elektronenvervielfachung kann das Signal von einzelnen Photonen noch weiter verstärkt werden.

Pixelgröße

Zur Bestimmung der Pixelgröße wurde ein Mikrometerlineal der Firma Präzisionsoptik Gera GmbH (Objektmikrometer 1) verwendet. Bei dem Lineal entspricht der Abstand zweier Messbalken $10\ \mu\text{m}$ (vgl. Abb. 3.11). Als Filter zur Bestimmung der abgebildeten Kanten wurden mit Matlab[®] (Mathworks) ein Kantenfilter (Sobelfilter) eingesetzt und anschließend wurde, durch Suchen nach Strukturelementen, das gefilterte Binärbild nachbearbeitet.

Oberflächenmessungen zur Messung der Stabilität des Setups

Die Charakterisierung der Stabilität des Setups erfolgte über eine einzelmolekülpräparierte Oberfläche. Dazu wurden die Kammern von einem Lab-Tek[™] zweimal für fünf Minuten mit $0,1\ \text{M}$ Flusssäure gereinigt. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Kammern dreimal mit PBS gespült. Im nächsten Schritt wurden die Kammern für eine halbe Stunde mit $200\ \mu\text{l}$ einer Lösung aus BSA und biotinyliertem BSA inkubiert. Die BSA-Lösung wurde aus einer BSA-Stocklösung mit $5\ \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ und einer Stocklösung an biotinyliertem BSA mit $2\ \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ so gemischt, dass im Verhältnis ein biotinyliertes Molekül auf 20-BSA Moleküle kommt. Nach der Inkubation mit dieser Mischung wurde das Lab-Tek[™] dreimal mit PBS gewaschen bevor es mit $200\ \mu\text{l}$ von $10\ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Neutravidin erneut für 30 Minuten inkubiert wurde. Nach einem erneuten dreifachen Waschzyklus mit PBS wurden die Messkammern mit $200\ \mu\text{l}$ des einzelsträngigen Oligonukleotids mit der Biotin- und der TMR-Modifizierung für 10 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Lösungen vorsichtig mit einer Pipette von den Oberflächen abgezogen und die Kammern mit PBS aufgefüllt.

Die Messungen zur Bestimmung der Lokalisationsgenauigkeit fanden bei einer Belichtungszeit von $30\ \text{ms}$ statt. Es wurden 200 Bilder, bei einer elektronischen Verstärkung (Gain) von 800, aufgenommen. Eine Vorverstärkung (Pre-Amp Gain) der detektierten Signale fand um den Faktor 4,9 statt.

Die Lokalisation der PSFs erfolgte über die RapidStorm Software von Steve Wolter (Univ. Würzburg) [119]. Anschließend wurden die Koordinaten der Analyse in einer Tabelle sortiert und Häufungen von Punkten, innerhalb eines bestimmten Radius, wurden als ein Fluorophor betrachtet. Über die Standardabweichung der Lokalisationen von ihrem jeweiligen Mittelwert wurde für alle Punkte eine Statistik erstellt (vgl. Abb. 3.15 und B.7). Diese Statistik kann durch eine Gaußkurve angepasst werden, wobei das Zentrum der Verteilung die mittlere Standardabweichung angibt.

Abschätzung der Probengröße

Zur Abschätzung der Probengröße wurden in der Protein Data Bank [66] die Größen der Proteine gemessen. Das $66,766\ \text{kDa}$ schwere, nahezu globuläre, BSA (RCSB Code: 1E7I) ist ca. $8,7\ \text{nm}$ im Durchmesser. Das Zufügen eines Biotins mit $244\ \text{Da}$ spielt bei diesen Größenverhältnissen also keine Rolle. Streptavidin, respektive Neutravidin, wiegt etwa $60\ \text{kDa}$ und hat damit einen Durchmesser von ca. $5,8\ \text{nm}$ (RCSB Code: 3RY1). Für doppelsträngige DNA kann die Länge der DNA mit $2,9 - 3,4\ \text{Å}$ angenähert werden. Benutzt man den gleichen Wert auch für einzelsträngige Oligonukleotide, ergibt sich die Länge eines 22-mers zu $7\ \text{nm}$. Der C6-Linker, über den der Farbstoff an der DNA befestigt ist, genauso der Linker über den das Biotin befestigt ist, hat

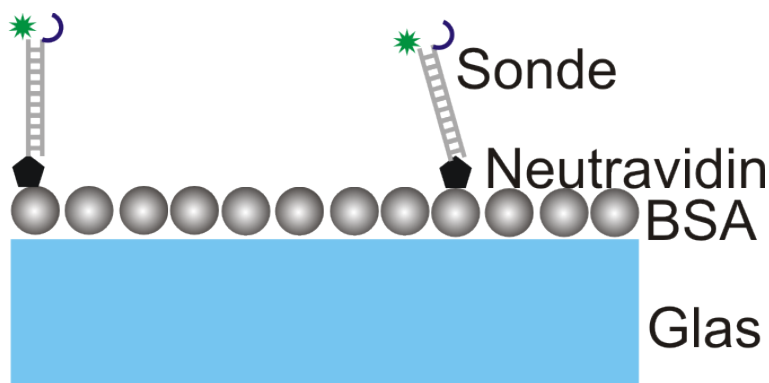


Abbildung 5.3.: Skizze der Oberfläche zur Bestimmung von Einzelmolekülfluoreszenzdaten.

zusätzlich jeweils eine Länge von ca. 1 nm (154 pm/Bindung).

5.5. Einzelmolekül-Oberflächen Messungen

Zur Charakterisierung der Proben wurden einzelne TMR-BiPy-Komplexe auf der Oberfläche von Lab-TeksTM immobilisiert. Dazu wurden die Deckgläser analog zu den Proben für die Messung der Stabilität des Mikroskops vorbereitet. Die Glasoberfläche wurde mit Flusssäure (0,1 M) für zweimal fünf Minuten gereinigt. Nach jeder Reinigung wurde das Deckglas mit PBS gewaschen. Das BSA wurde zur Immobilisierung für 30 Minuten auf der Oberfläche inkubiert. Der Inkubation folgten drei Waschschrte mit PBS, bevor Neutravidin für eine halbe Stunde auf der Oberfläche inkubiert wurde. Nach drei erneuten Waschschrten wurde die biotinylierte doppelsträngige DNA mit BiPy und TMR ($5 \cdot 10^{-11}$ M) für 10 – 20 Minuten in die Kammern des Deckglases gegeben. Nach der Inkubation mit der Probe wurde der Überstand abgezogen und durch den MOPS-Puffer (pH = 7,0; 10 mM) ersetzt (vgl. Abb. 5.3). Um die Fluoreszenzfluktuationen bei der Präsenz von Kupfer zu messen, wurden, je nach gewünschter Endkonzentration, 1 – 2 μ l einer Kupferstocklösung zugegeben und die Probe anschließend mit einer Pipette durchmischt, um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen. Die Aufnahme der Daten erfolgte bei Bildraten von 10 – 30 Hz. Der Pre-Amp Gain wurde bei einem Wert von 4,9 konstant gehalten, der Gain variierte zwischen 200 und 800, was lediglich einen linearen Effekt auf die detektierte Signalstärke hat. Bei allen Messungen wurde, wenn nicht anders angegeben, eine Laserleistung von 600 μ W verwendet.

Messungen zur Dichte der Probenoberfläche

Für die Messungen zur Bestimmung der Probenoberfläche wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen an BSA/biotinyliertem BSA (19:1) Gemisch und unterschiedlichen Neutravidin Konzentrationen mit Hilfe der RapidStorm Software die Anzahl PSFs bestimmt. Die Messungen wurden mit einer Belichtungszeit von 50 ms und für

ein einzelnes Bild durchgeführt. Der Gain betrug für die Messungen 700 und der Messbereich wurde auf 256×256 Pixel eingeschränkt.

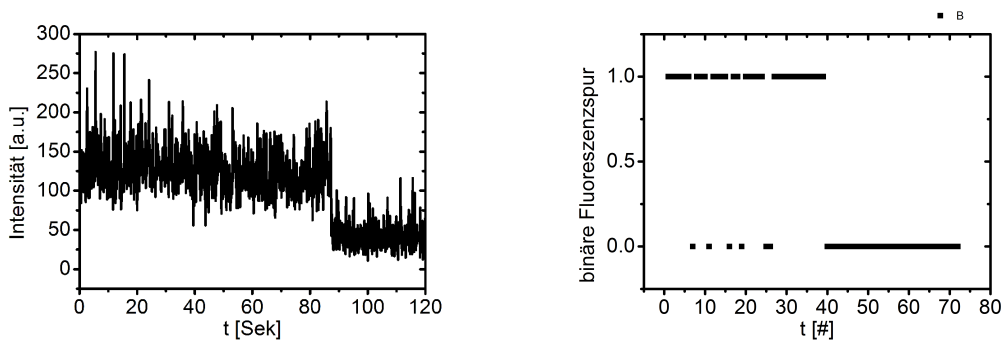
Messung zur Darstellung der Fluoreszenzfluktuationen

Um zu messen, ob die Fluoreszenzfluktuationen der Sonde mit der CCD-Kamera des TIRF-Mikroskops auflösbar sind, wurden mit dem oben beschriebenen Protokoll mehrere Oberflächen vorbereitet. Es wurden bei einem Gain von 200, bei einer Bildwiederholrate von 30 Hz und einer Belichtungszeit pro Bild von 10 ms, 1000 Aufnahmen pro Messung gemacht. Um die Abhängigkeit von der Kupferkonzentration zu untersuchen, wurde den Proben eine Konzentration von 200 nM, 400 nM und $2 \mu\text{M}$ Kupfersulfat zugesetzt. Die Analyse der Filme geschah über eine MatLab Routine. Dazu wurde von den Filmen das Summenbild gebildet. Im Summenbild wurden lokale Maxima als Punkte ausgewählt. Um die lokalen Maxima wurde ein Kreis mit einem Radius von drei Pixeln gewählt, über den der Mittelwert gebildet wurde. Anschließend wurde der Hintergrund durch den Mittelwert von drei zufällig im Bild gewählten Punkten, die keine lokalen Maxima enthalten, gewählt und von den Punkten abgezogen. Die Daten dieser Messungen sind in Abb. 3.17 dargestellt.

Messungen zur Leistungsunabhängigkeit der Fluoreszenzfluktuationen

Die Messungen zur Bestimmung der Fluoreszenzfluktuationen wurden erneut an Proben durchgeführt, die nach oben beschriebenen Protokoll vorbereitet wurden. Für die Messung selbst wurde ein Gain von 200, eine Belichtungszeit von 25 ms und eine Länge pro Datenaufnahme von 1000 Bildern gewählt. Die Größe des gewählten Messbereichs auf der CCD-Kamera lag bei 256×256 Pixeln.

Um die Filme zu analysieren, wurde entsprechend Kap. 3.2 ein Zweizustandssystem als Ausgangspunkt gewählt. Zur Zerlegung der in einem 14 Bit Format gespeicherten Daten in eine binäre Datenreihe, die Aussagen über die Art des Zustandes macht, müssen die Fluoreszenzspuren gefiltert werden. Da sich die Einführung eines Thresholds [122, 123, 131] auf Grund der hohen Schwankungen der Intensität, v. a. nach Zugabe von Kupfer (vgl. Abb. 3.17), als nicht praktikabel erwiesen hat, wurde für die Analyse die RapidStorm Software von S. Wolter (Univ. Würzburg) verwendet. Dazu wurden die Filme mit der Software auf gaußförmige Intensitätsverteilungen untersucht und die Koordinaten (x , y und t) in einer Tabelle gespeichert. Durch Rekonstruktion eines Bildes, in dem die Koordinaten der gefundenen Lokalisationen eingetragen werden, erhält man eine Art gefiltertes Bild. In dem Rekonstruktionsbild wurden Anhäufungen von Punkten in einem kleinen Radius als einzelner Farbstoff behandelt. Aus den Punkten, die zu einer solchen Anhäufung beitragen, wurden die Zeitkoordinaten extrahiert und aus diesen Informationen eine binäre Fluoreszenzspur rekonstruiert (vgl. Abb. 5.4). Für diese Art der Datenanalyse spielt die Fluoreszenzintensität keine Rolle mehr, sondern lediglich die Form der Fluoreszenzverteilung in den einzelnen Punkten. Dadurch werden Artefakte, die durch Intensitätsfluktuationen oder durch zwei Farbstoffe, die zu dicht aneinander sind, vermieden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Auswertung unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität ist und kein Threshold gewählt werden muss. Dadurch lässt sich diese Auswertung leicht automatisieren. Für jede Datenaufnahme wurden über 1000 Einzelbilder etwa



(a) Fluoreszenzspur einer Sonde ohne Zugabe von Kupfersulfat. Die Intensitätsfluktuationen beider Zustände überlappen sich.

(b) Binäre Fluoreszenzspur einer Sonde ohne Zugabe von Kupfersulfat. Die Art des Zustandes (An / Aus) ist gegen den zugehörigen Bildindex aufgetragen.

Abbildung 5.4.: Erzeugung einer binären Fluoreszenzspur.

500 Fluoreszenzspuren rekonstruiert.

Aus den binären Spuren lässt sich schnell die Länge der einzelnen Zustände bestimmen. Basierend auf diesen Daten, wurden Histogramme über die Dauer der Zustände des fluoreszenten und des nicht-fluoreszenten Zustands gebildet. Um die Wahrscheinlichkeit der Zustände zu gewichten, wurde eine Dichte-Analyse, basierend auf der Dichte der Häufungen von Ereignissen, durchgeführt. Das heißt, die Häufigkeit mit der ein Ereignis mit einer bestimmten Länge $H(\Delta t)$ detektiert wurde, wird mit den Zeitdifferenzen zu den benachbarten Ereignissen gewichtet [134]:

$$P(\Delta t_i) = \frac{H(\Delta t_i)}{0,5 \cdot (\Delta t_{i+1} - \Delta t_{i-1})} \quad (5.3)$$

Zur Analyse der Leistungsabhängigkeit der Fluoreszenzfluktuationen, wurden die Wahrscheinlichkeitsdichten mit einer bi-exponentiellen Funktion angenähert und die resultierenden Zeiten - amplitudengewichtet - gegen die Laserintensität aufgetragen. Die Messung der Laserintensität erfolgte über ein Powermeter der Firma Ophir mit Photomesskopf (Ophir Orion-PD, Ahrensberg), bevor der Laserstrahl in das Mikroskop eingekoppelt wird.

Bestimmung der Photostabilität

Zur Bestimmung der Photostabilität wurden drei Einzelmoleküloberflächen vorbereitet - davon zwei nach dem Standardprotokoll. Als Messpuffer diente in einem Fall reiner MOPS-Puffer, für die andere Probe wurde ein MOPS-Puffer mit 200 nM Kupfersulfat verwendet. Für die Messung des Tetramethylrhodamins ohne den Liganden, wurde ein PEG₂ Linker der Firma Thermo Scientific (EZ-Link[®] Amine-PEG-Biotin), der eine Aminomodifikation und ein Biotin trägt, mit dem TMR-NHS Farbstoff markiert und analog zu Kap. 5.2 aufgereinigt. Die Oberflächenimmobilisierung erfolgte analog zu der Immobilisierung der Sonde.

Zur Analyse der Photostabilität wurden Filme mit 1000 Einzelbildern aufgenommen und mit der RapidStorm Software analysiert. Basierend auf den Daten, wurden die

Lokalisationen pro Bild gezählt und der zeitliche Verlauf, auf die Gesamtzahl normiert, dargestellt.

5.6. Lokalisationsmikroskopie-Messungen

Zur Vorbereitung für die Lokalisationsmikroskopie basierenden Messungen wurden Mäusefibroblasten (NIH, 3T3) in Kultur gehalten. Die Zellen wurden einen Tag vor der Probenpräparation auf LabTeksTM gegeben, die zweimal für fünf Minuten mit Flusssäure gereinigt worden sind, und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid in einem Brutschrank inkubiert. Als Kulturmedium diente phenolrotfreies DMEM.

Nachdem die Zellen auf eine geeignete Dichte gewachsen waren, wurde das Medium über einen fünfminütigen Waschschrift mit PBS ausgetauscht. Darauf folgte für 20 Minuten eine Fixierung der Zellen in einer 4 %-igen Paraformaldehyd- (PFA-) lösung. Nach der Fixierung wurden die Zellen mit einem Waschschrift, bestehend aus fünf Inkubationen mit PBS für je fünf Minuten, von der Fixierungslösung befreit. Die Zellmembranen wurden über eine dreißigminütige Inkubation mit einem PBST-Puffer (PBS mit 5% NCS und 0,5% TritonX-100) permeabilisiert. Der Puffer wurde wieder mit einem fünffachen Waschschrift je fünf Minuten entfernt. Anschließend wurden die α -Tubulin-Proteine des Zytoskeletts durch eine einstündige Inkubation mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ biotinylierten, monoklonalen, bovinen α -Tubulin-Antikörpern (Maus IgG1, Invitrogen, Darmstadt) markiert. Es folgte wieder eine Waschphase, bestehend aus fünf einzelnen Schritten, bevor die Zellen erneut für 30 Minuten mit Streptavidin (100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ in PBS gelöst) inkubiert wurden. Nach der Streptavidin-Markierung erfolgten erneut fünf Waschschriffe, um überschüssiges Protein zu entfernen. Der letzte Schritt bestand aus einer 30-Minuten-Inkubation mit der DNA-Sonde (200 μM in PBS). Nach der kompletten Markierung wurden die Kammern fünfmal gründlich mit PBS gewaschen und anschließend der Messpuffer (MOPS, 10 mM) hinzugefügt.

Das komplette Konstrukt ist im Vergleich zur Größe des Primärantikörpers klein, was ein wichtiges Kriterium für die Lokalisationsgenauigkeit darstellt (vgl. Abb. 3.21 (b)). Die Größenabschätzung für die Antikörper und das Tubulin erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Protein-Datenbank [66] (Codes: 1IGY (IgG-Antikörper), 1TUB (α -Tubulin)).

Die Datenaufnahme erfolgte auf dem TIRF-Mikroskop bei einer Bildwiederholrate von 19,237 Hz und einer Belichtungszeit von 50 ms. Um den Zeitversatz zwischen einzelnen Messungen zu minimieren, wurde für die Messung ein Bildausschnitt von 128×128 Pixeln gewählt. Die Signalverstärkung (Gain) wurde auf 200 festgesetzt und Filme mit einer Gesamtlänge zwischen 12000 und 20000 Bildern aufgenommen.

Für die Auswertung der Daten wurde die RapidStorm Software von S. Wolter (Univ. Würzburg) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden, um Artefakte auf Grund der Autofluoreszenz biologischer Proben zu vermeiden, für die Auswertung lediglich die Bildfolgen verwendet, bei denen die Fluoreszenzfluktuationen einzelner Moleküle beobachtbar waren. Zur Rekonstruktion des Lokalisationsbildes wurde ein leeres Bild mit der zehnfachen Pixelanzahl pro Seite erzeugt, in das dann die Lokalisationsorte der PSFs eingetragen wurden. Die Farbskala des rekonstruierten Bildes spiegelt somit keine Intensität wider, sondern ein Histogramm über die Häufigkeiten von PSFs.

5.7. Messungen zum Chemischen Multiplexing

Zum Abbilden von mehreren Kanälen, ohne dabei durch chromatische Aberrationen behindert zu werden, wurde zunächst das Tubulinskelett über zwei verschiedene Methoden markiert. Eine Markierung bestand aus der Nutzung von Sekundärantikörpern, die andere geschah über die Markierung mit der Sonde. Um die Methode zu testen, wurden die Proben parallel auf drei unterschiedliche Arten präpariert: Zunächst wurden die menschlichen Epithelzellen (HeLa, DMSZ Braunschweig) auf LabTeks™ gesetzt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von etwa 18 Stunden wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen (für jeweils fünf Minuten) und anschließend mit einer 4 %-igen PFA Lösung für 20 Minuten fixiert. Nach der Fixierung wurden die Kammern für 5 × 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie mit PBST für zehn Minuten permeabilisiert wurden. Alle Kammern wurden für eine Stunde mit dem biotinylierten α -Tubulin Antikörper (Invitrogen) inkubiert ($3 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) bevor sie erneut für 5 × 5 Minuten mit PBS gewaschen wurden.

Die reine Sekundärantikörper-markierte Probe wurde nach diesem Waschschrift für eine weitere Stunde mit $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ von dem TMR-markierten Antikörper gegen IgG (schwere und leichte Kette) markiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen.

Zur Präparation der Probe, die nur mit der Sonde markiert wurde, wurde analog zu Kapitel 5.6 vorgegangen. Nach dem Entfernen des überschüssigen Primärantikörpers durch Waschen, wurde die Probe für 60 Minuten mit $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Streptavidin inkubiert, erneut 5 × 5 Minuten gewaschen und dann für 30 Minuten mit der Sonde (100 nM) markiert. Nach der Markierung wurde die überschüssige Sonde mit drei Waschsritten zu je fünf Minuten entfernt.

Zur doppelten Markierung wurde die Probe anstatt mit Streptavidin, für eine Stunde mit einer 1:1 Mischung aus Streptavidin und Sekundärantikörper inkubiert, gewaschen und mit der Sonde markiert (30 Minuten und 100 nM).

Die Messung der Proben fand in MOPS-Puffer statt. Um die Sonde effizient in den dunklen Zustand zu schalten, wurde ein Überschuss an Kupfersulfat verwendet und zur Reaktivierung die doppelte bis fünffache Menge an EDTA zugegeben.

Zur Analyse des zeitlichen Verlaufs wurden innerhalb der Zellen Regions of Interest (ROI) mit 50 × 50 Pixeln gesetzt und die Gesamtintensität in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

5.7.1. Manders-Koeffizient

Der Manders-Koeffizient basiert auf dem Pearson-Koeffizienten:

$$r_p = \frac{\sum_i (R_i - R_{\text{Mittel}}) \cdot (G_i - G_{\text{Mittel}})}{\sqrt{\sum_i (R_i - R_{\text{Mittel}})^2 \cdot \sum_i (G_i - G_{\text{Mittel}})^2}} \quad (5.4)$$

Hierbei geben G_i und R_i die Grauwerte der beiden zu vergleichenden Bilder an, G_{Mittel} und R_{Mittel} geben die zugehörigen Mittelwerte der beiden Kanäle an. Da die Summanden auch negative Werte annehmen können, ist die Interpretation dieser Werte schwierig. Auf Grundlage dieser Basis wurde der Manders-Koeffizient entwickelt [150].

So lässt sich analog zu Gleichung 5.4 ein Überlappungs-Koeffizient definieren.

$$r = \frac{\sum_i R_i \cdot G_i}{\sqrt{\sum_i R_i^2 \cdot \sum_i G_i^2}} \quad (5.5)$$

Dieser Überlappungs-Koeffizient kann nur Werte zwischen 0 und 1 annehmen und weist somit nicht die Problematik der Interpretation negativer Werte auf. Des Weiteren ist dieser Koeffizient unabhängig von der Intensität der Aufnahmen, die durch Photostabilität und Helligkeit des Farbstoffes stark beeinflusst werden kann. Bei einer hohen Anzahl an kolokalisierenden Objekten ist dieser Koeffizient jedoch nicht mehr eindeutig. Dies kann durch Einführung von $r^2 = k_1 \cdot k_2$ umgangen werden, wobei gilt:

$$k_1 = \frac{\sum_i R_i G_i}{\sum_i R_i^2} \quad (5.6)$$

und

$$k_2 = \frac{\sum_i R_i G_i}{\sum_i G_i^2} \quad (5.7)$$

Hierbei hängt k_1 linear von der Intensität des G-Kanals ab (G_i), k_2 hängt linear von R_i ab. Durch diese Zerlegung des Überlappungs-Koeffizienten aus Gleichung 5.5 treten keine Probleme mehr bei hohen Farbstoffdichten auf. Wendet man die Zerlegung an, können analog die Manders-Koeffizienten definiert werden.

$$M_1 = \frac{\sum_i R_{i,\text{kolok}}}{\sum_i R_i} \quad (5.8)$$

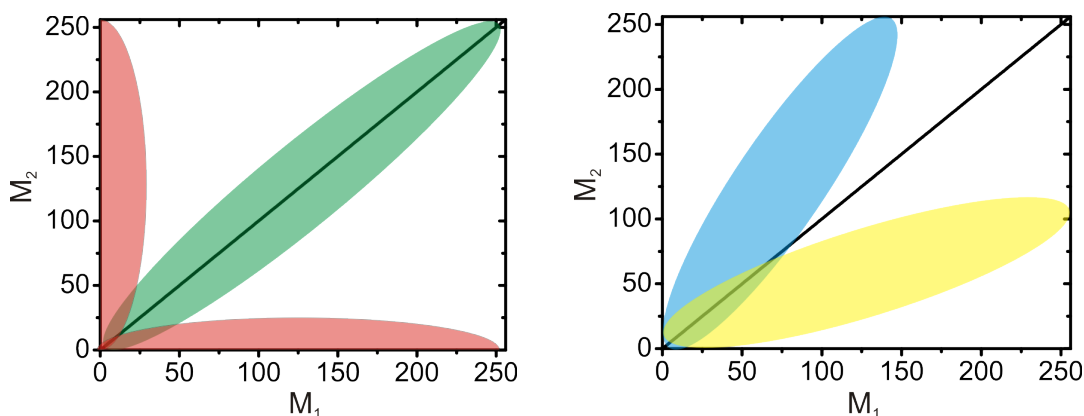
und

$$M_2 = \frac{\sum_i G_{i,\text{kolok}}}{\sum_i G_i} \quad (5.9)$$

Bei den beiden Manders-Koeffizienten gilt: $G_{i,\text{kolok}} = G_i$ für $R_i > 0$ und $G_{i,\text{kolok}} = 0$ für $R_i = 0$. Anders ausgedrückt gibt M_1 die Summe der Intensitäten von Pixeln aus dem R-Kanal an, die ein Komplement im G-Kanal haben, geteilt durch die Summe aller R-Intensitäten.

Der Nachteil am Manders-Koeffizienten ist die hohe Anfälligkeit gegenüber einem hohen Hintergrund. Deswegen ist das Setzen eines Grenzwertes notwendig. Um die Kolokalisation zu bestimmen wird für jeden Pixel i R_i gegen G_i aufgetragen. Anhand der Form des Plots lassen sich Rückschlüsse auf die Verteilung der unterschiedlichen Markierungen ziehen (vgl. Abb. 5.5).

Die Analyse der Kolokalisation mit Hilfe der Überlappungs- und der Manders-Koeffizienten erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ und einem Kolokalisations-Plugin [151, 152]. Um einen Vergleich für die Parameter aus der Analyse zu haben, wurden, zusätzlich zu den Kolokalisationsanalysen zwischen Antikörper und Sonden-markierter Probe, Negativ- und Positiv-Kontrollen durchgeführt (vgl. Tabelle 3.10, Abb. 3.35 (a) und Abb. B.22 (b)).



(a) Eine Auftragung von möglichen Verteilungen von Manders-Koeffizienten: In grün sind die Koeffizienten für eine gute Kollokalisierung zu finden, rot repräsentiert die Verteilung für sich ausschließende Markierungen.

(b) Bei einer linearen Verteilung der Manders Koeffizienten, wobei die Steigung $\neq 1$ ist, liegt eine Kollokalisierung vor, bei der aber Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen beiden Bildern gegeben sind.

Abbildung 5.5.: Schemata für Verteilungen von Manders-Koeffizienten.

5.8. Zytotoxizität von Kupfer

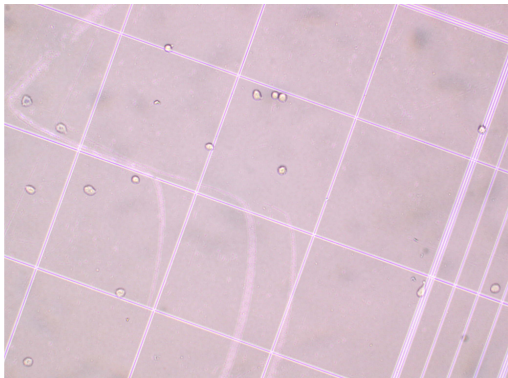
Um die Toxizität von Kupfer(II) für Zellen zu messen, wurden Zellen in verschiedenen Medien inkubiert und die Überlebensrate anhand des Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen festgestellt.

$$\text{Überlebensrate} = \frac{\text{lebende Zellen} - \text{tote Zellen}}{\text{alle Zellen}} \quad (5.10)$$

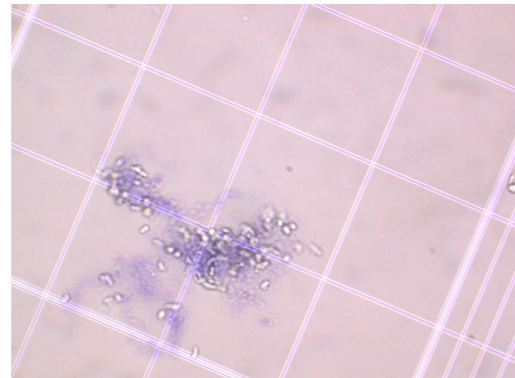
Um die Zellen zählen zu können, wurden die Zellen unter verschiedenen Bedingungen für 30 Minuten inkubiert. Danach wurde das Medium abgezogen und durch 1 ml TrypLE™ ersetzt. Nach fünf Minuten wurden 100 μl der Suspension mit den abgelösten Zellen zusammen mit 100 μl Trypan Blau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops wurden die toten, mit Trypan Blau angefärbten Zellen, gezählt (vgl. Abb. 5.6 und 5.7).

Inkubationsmedium	lebende Zellen	tote Zellen
DMEM	108	3
DMEM + CuSO ₄	158	0
PBS + CuSO ₄	167	10

Tabelle 5.1.: Gesamtzahl an lebenden und toten Zellen nach Inkubation in verschiedenen Medien.

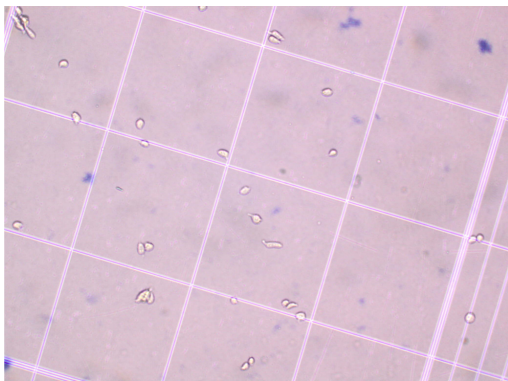


(a) Aufnahme von, für dreißig Minuten in DMEM inkubierten und mit Trypan Blau angefärbten, Zellen.

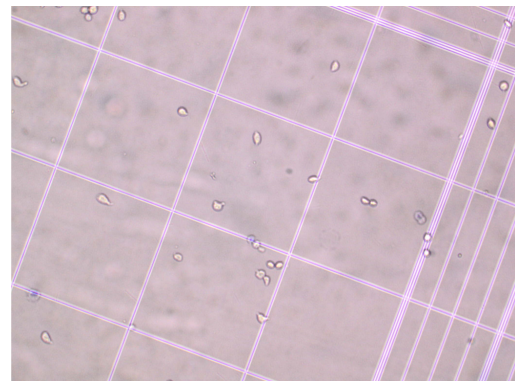


(b) Aufnahme von, für dreißig Minuten in MOPS inkubierten und mit Trypan Blau angefärbten, Zellen.

Abbildung 5.6.: Untersuchung der Toxizität von Kupfersulfat für Zellen.



(a) Aufnahme von, für dreißig Minuten in DMEM und $10\ \mu\text{M}$ Kupfersulfat inkubierten und mit Trypan Blau angefärbten, Zellen.



(b) Aufnahme von, für dreißig Minuten in PBS und $10\ \mu\text{M}$ inkubierten und mit Trypan Blau angefärbten, Zellen.

Abbildung 5.7.: Untersuchung der Toxizität von Kupfersulfat für Zellen.

A. Abkürzungen

CHIRON	Chemically Improved Resolution for Optical Nanoscopy
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
REM	Rasterelektronenmikroskop
EM	Elektronenmikroskop
AFM	Atomic-Force Microscope, Rasterkraftmikroskop
SNOM	Scanning Nearfield Optical Microscope, optisches Rasternahfeldmikroskop
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy, Fluoreszenzkorrelationspektroskopie
NA	Numerische Apertur
PSF	Point-Spread Function, Punktabbildungsfunktion
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital, höchstes besetztes Orbital eines Moleküls
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital, kleinstes unbesetztes Orbital eines Moleküls
VR	Vibrationsrelaxation
IC	Internal Conversion, Innere Konversion
ISC	Inter-System Crossing
NRR	Non-Radiative Relaxation, Strahlungsloser Übergang
RET	Resonanzenergietransfer
FRET	Förster Energietransfer
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
APD	Avalanche Photodiode, Lawinenphotodiode
TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
SIM	Structured Illumination Microscopy, Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie
SPIM	Selective-Plane Illumination Microscopy, Mikroskopie mit flächiger Anregung
STED	Stimulated Emission Depletion, Stimulierte Emission
PALM	Photo-Activated Localization Microscopy, Lokalisationsmikroskopie durch Photoaktivierung
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, Stochastische Rekonstruktionsmikroskopie
FWHM	Full Width at Half Maximum, Halbwertsbreite
pa-FP	photoaktivierbares fluoreszentes Protein
dof	Depth of Focus, Tiefenschärfe
TMR	Tetramethylrhodamin
ssO-L	das einzelsträngige Oligonukleotid mit dem Chelaten
ssO-F	das einzelsträngige Oligonukleotid mit dem Fluorophor

dsO-FL	das doppelsträngige Oligonukleotid mit dem Fluorophor und dem Chelaten
DOL	Degree of Labeling, Markierungsverhältnis
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinder Albumin Serum
NHS	N-Hydroxysuccinimid
MMT	Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl, (Methylcyclopentadienyl)mangantricarbonyl
PFA	Paraformaldehyd
NCS	Newborn Calf Serum, Fetales Kälberserum
IgG	Immunglobulin G
TEAA	Triethylammonium acetate
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate
HOBt	1-Hydroxybenzotrizol
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
PMT	Photomultiplier Tube, Photovervielfacher
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AOTF	Acousto-Optical Tunable Filter, Akustooptischer Filter
TCSPC	Time-Correlated Single Photon Counting, zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
LED	Light-Emitting Diode, Leuchtdiode
PEG	Polyethylenglycol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
ROI	Region of Interest

B. Zusätzliche Grafiken

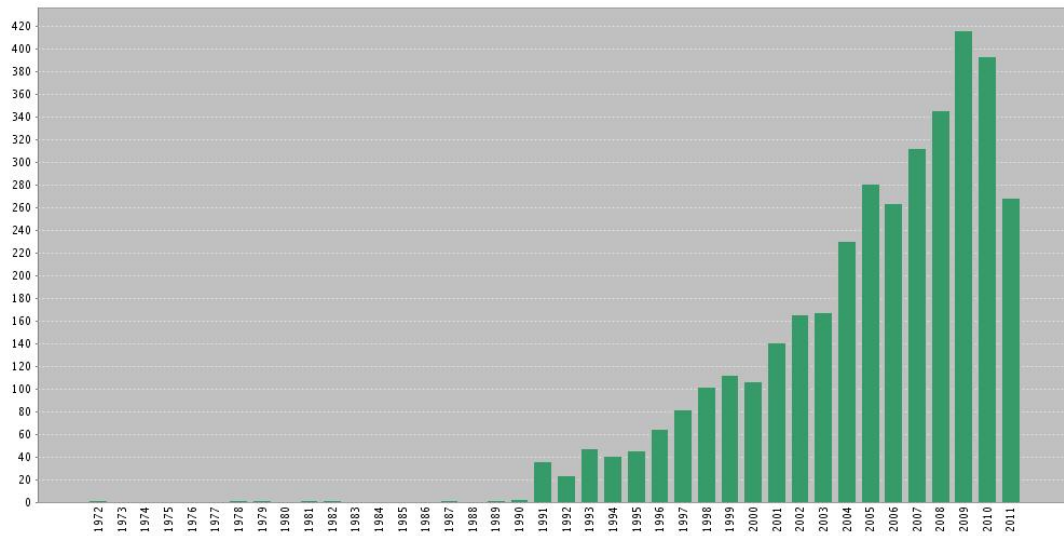


Abbildung B.1.: Zeitliche Entwicklung der Publikationen mit *Single Molecule Spectroscopy* auf den Gebieten der Chemie und Physik [155].

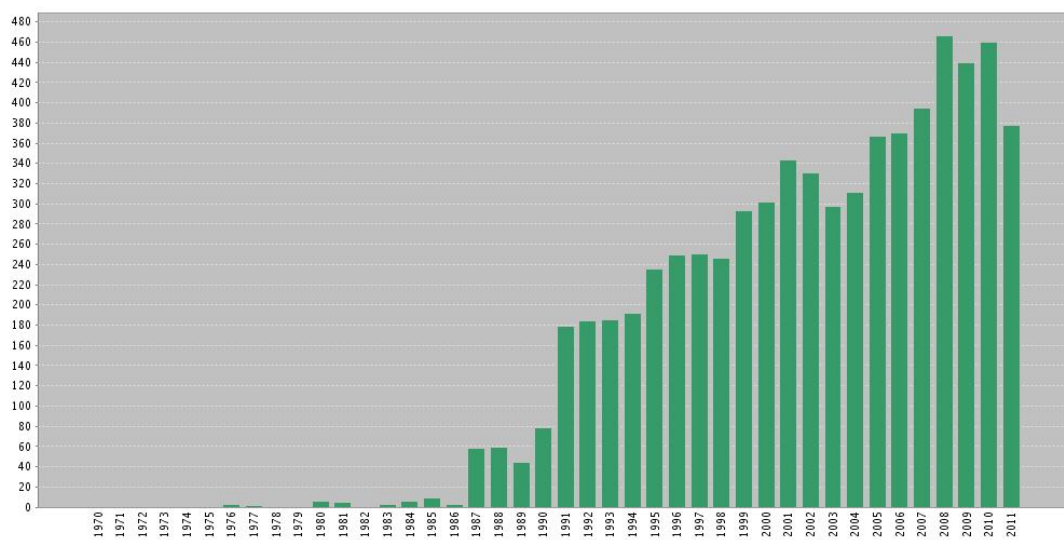


Abbildung B.2.: Zeitliche Entwicklung der Publikationen mit *photophysics* im Titel [155].

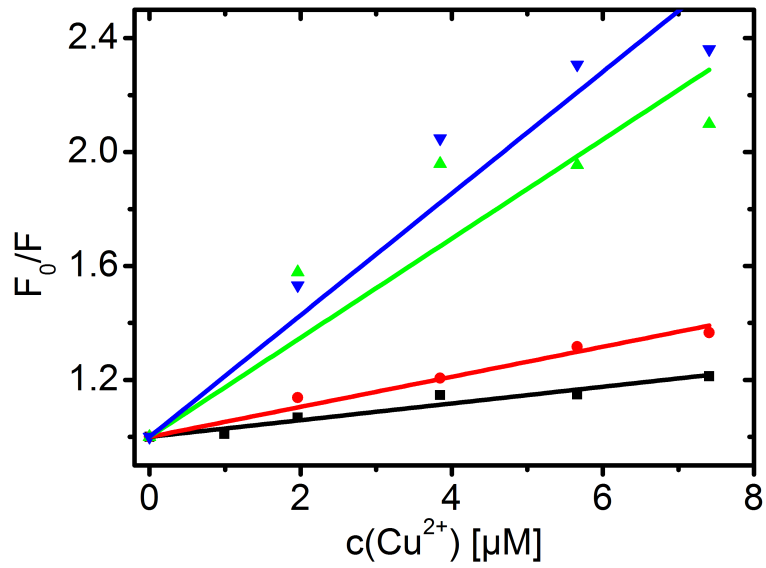


Abbildung B.3.: Stern-Volmer-Plots von verschiedenen Rhodamin-Farbstoffen bei Zugabe von Kupfersulfat. Schwarz: TMR; rot: Rhodamin11; grün: Rhodamin12; blau: Rhodamin13.

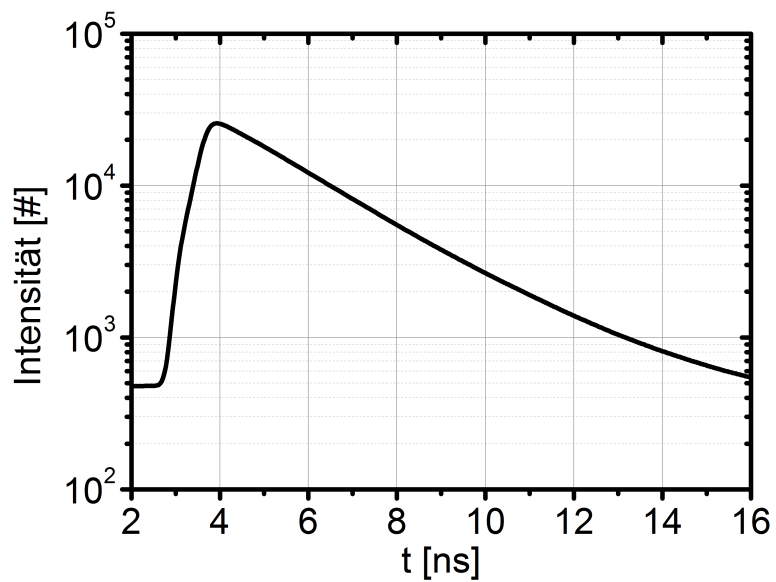


Abbildung B.4.: Die Fluoreszenzlebensdauer des Tetramethylrhodamin in PBS beträgt etwa 2,4 ns.

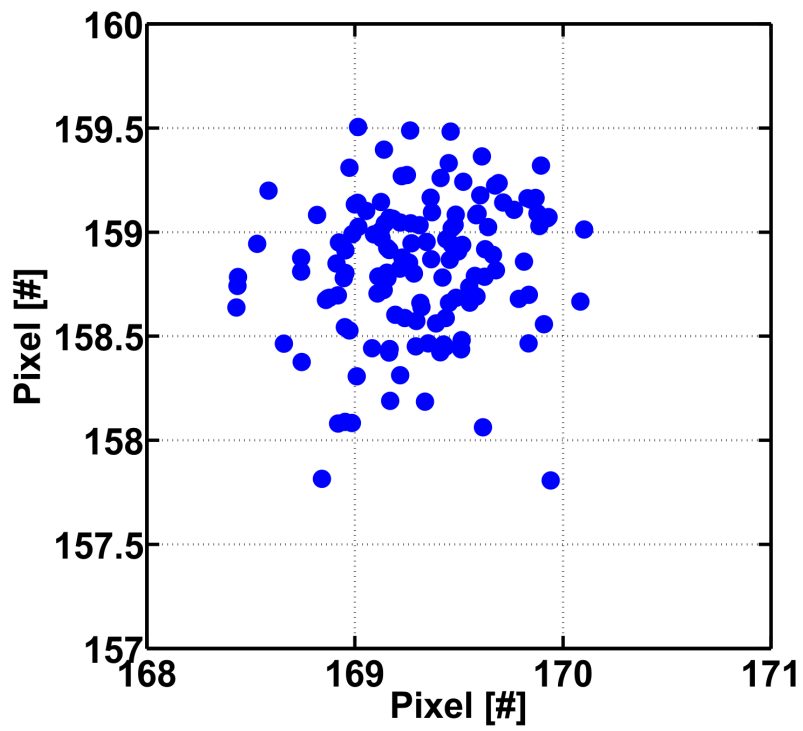


Abbildung B.5.: Experimentelle Bestimmung der Schwingungsstabilität des Mikroskops (vgl. Abb. 3.14).

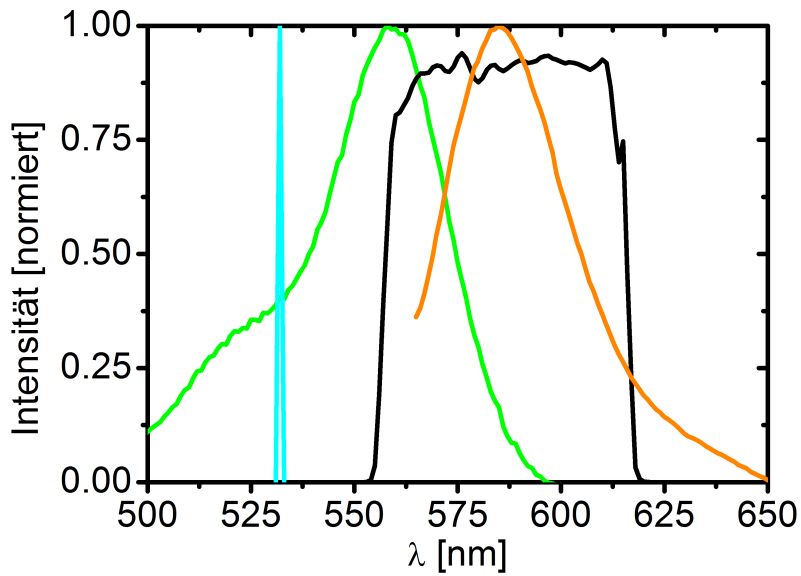


Abbildung B.6.: Charakterisierung des TIRF-Mikroskops: Für die Anregung wird ein Laser mit 532 nm verwendet (cyan). Der Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm regt den Farbstoff TMR an (Absorptionsspektrum von TMR in grün). Das Fluoreszenzlicht (orange) wird durch einen Bandpassfilter (schwarz) von Hintergrundfluoreszenz befreit.

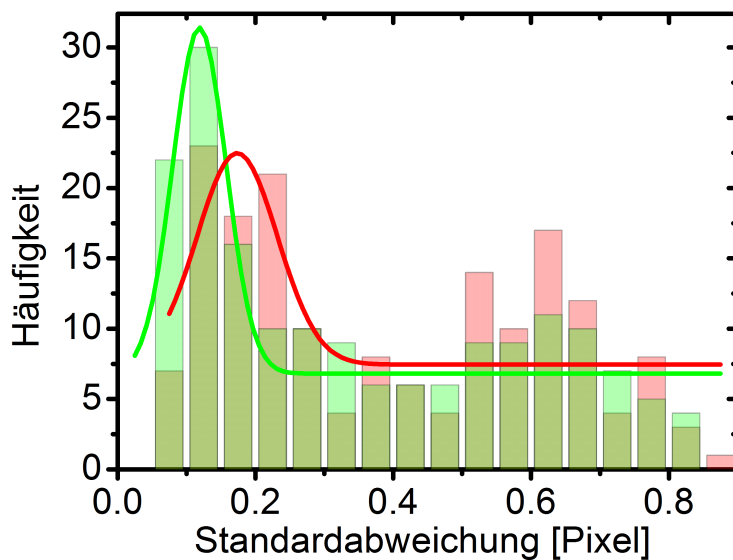


Abbildung B.7.: Verteilung der Standardabweichungen für die Lokalisation einzelner Fluorophore ($N = 177$). Rot: 0,17 Pixel in y-Richtung, grün: 0,12 Pixel in x-Richtung

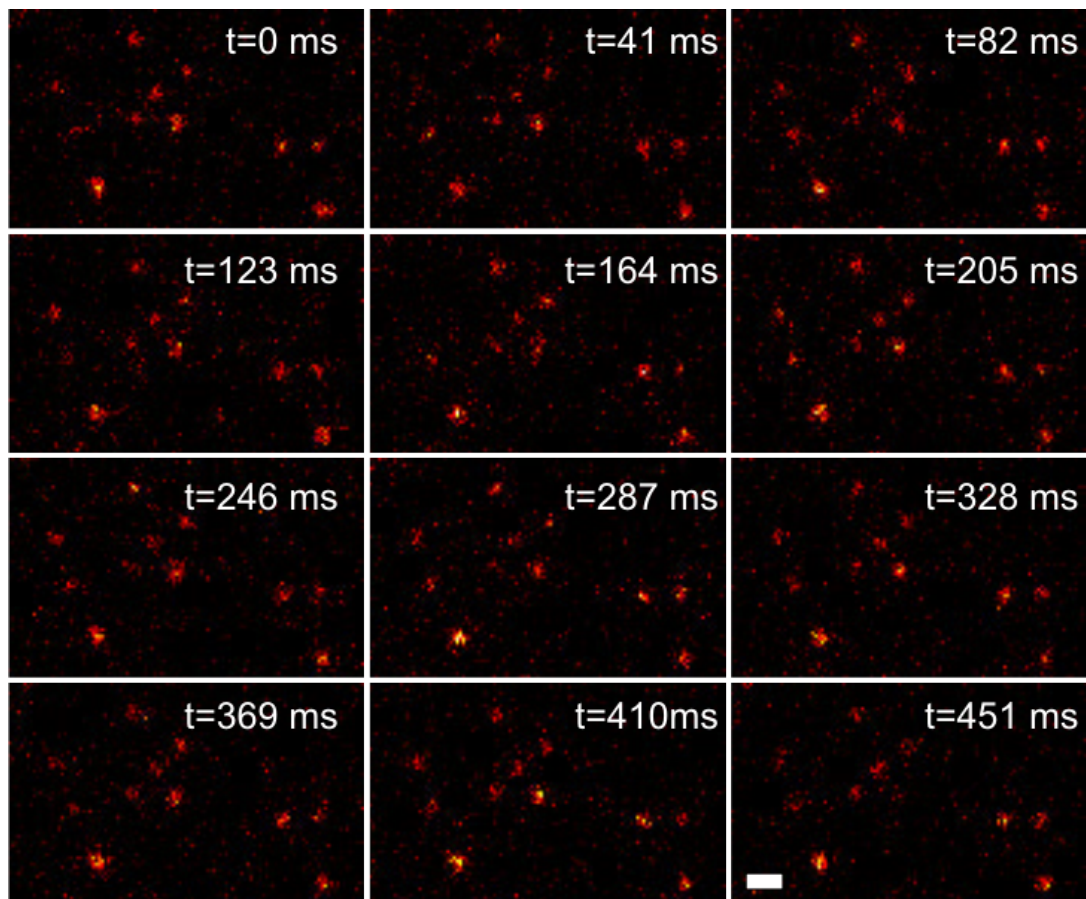


Abbildung B.8.: Für eine Einzelmoleküloberfläche zeigen die Farbstoffe keine Fluoreszenzfluktuationen bis sie photozerstört werden (vgl. Filme C.1 (a)). Der Maßstabsbalken entspricht $1\ \mu\text{m}$.

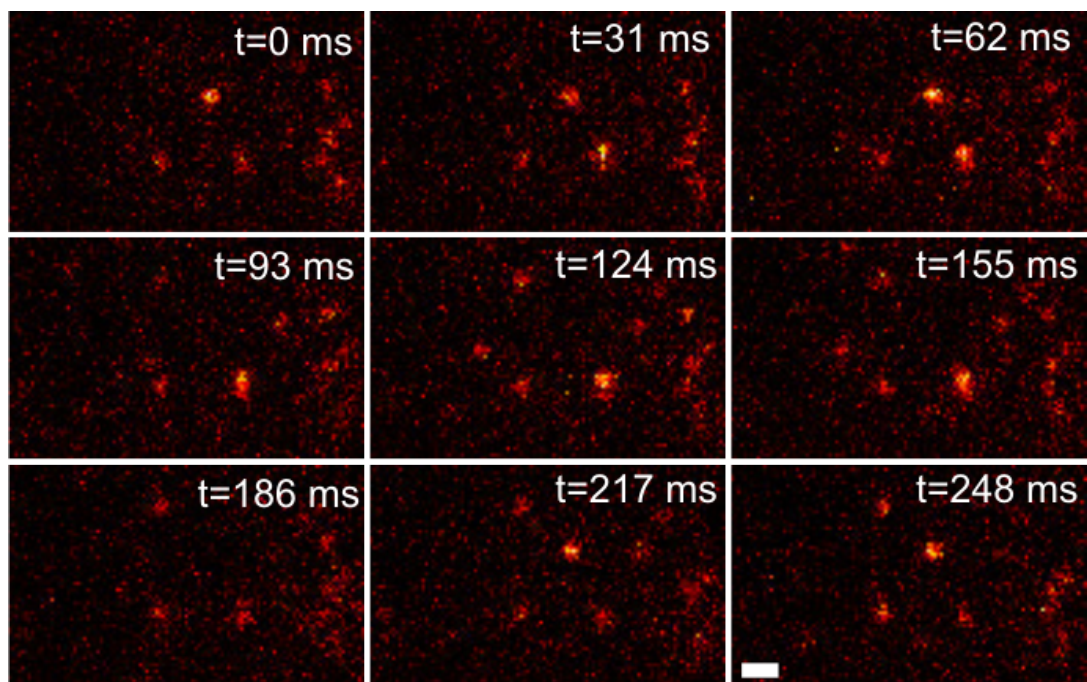
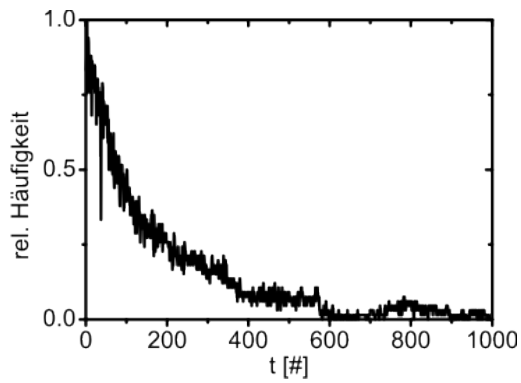
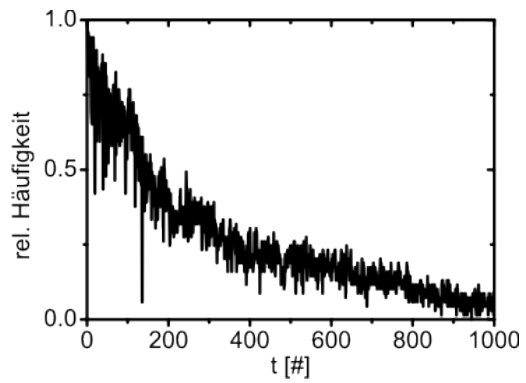


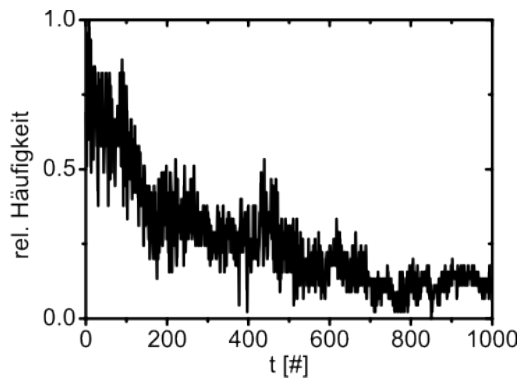
Abbildung B.9.: Durch Zugabe von 200 nM Kupfersulfat lassen sich Fluoreszenzfluktuationen induzieren die auf einer Zeitskala stattfinden die sich messen lässt (vgl. Filme C.1 (b)). Der Maßstabsbalken entspricht 1 μm .



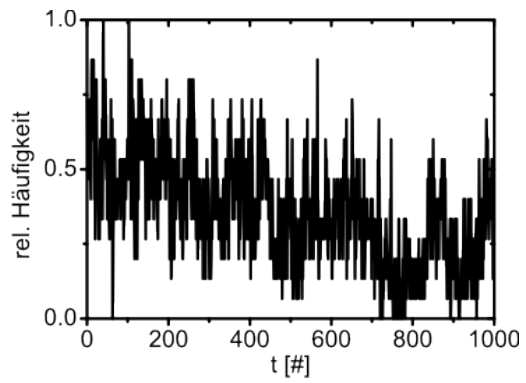
(a) Gefundene Lokalisationen von TMR in MOPS-Puffer.



(b) Gefundene Lokalisationen von TMR in MOPS-Puffer und bei 6 μM Kupfersulfat.

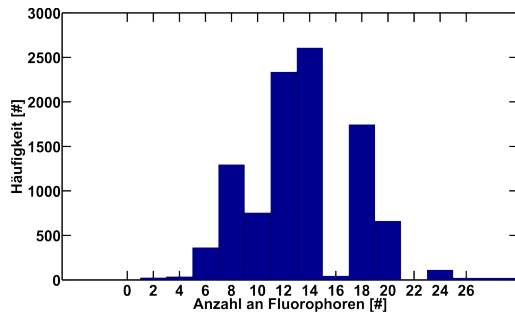


(c) Gefundene Lokalisationen von der Sonde in MOPS-Puffer.

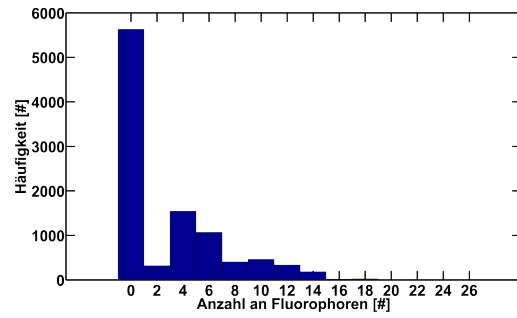


(d) Gefundene Lokalisationen von der in MOPS-Puffer und bei 200 nM Kupfersulfat.

Abbildung B.10.: Relative Häufigkeit der gefundenen Lokalisationen von Farbstoff und Sonde in Puffer und bei Zugabe von Kupfersulfat.

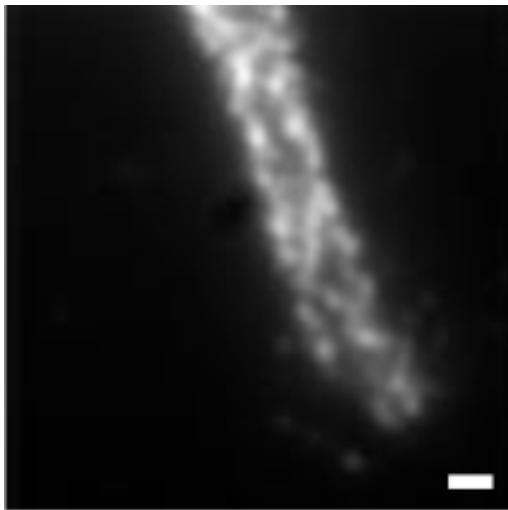


(a) Anzahl Fluorophore pro Primärantikörper bei dem Standardprotokoll zur Markierung.

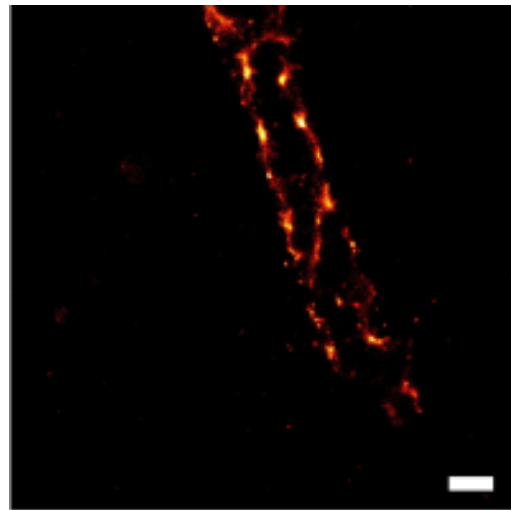


(b) Anzahl Fluorophore pro Primärantikörper bei dem verwendeten Protokoll zur Markierung.

Abbildung B.11.: Für die Abschätzung wurde die Anzahl von Biotin/Farbstoff pro IgG Antikörper als normalverteilte Zufallszahlen um 5 und mit $\sigma = 1,5$ angenommen, die Anzahl der Sekundär AK pro Primär AK wurde als normalverteilt um 2,8 mit $\sigma = 0,2$ angenommen. Die Bindung von Avidin an Biotin wurde als gleichverteilte Zufallszahl (0 oder 1) angenähert, die Anzahl der Sonden, die an ein Avidin binden, wurde als normalverteilt um 1,2 mit $\sigma = 0,4$ geschätzt.

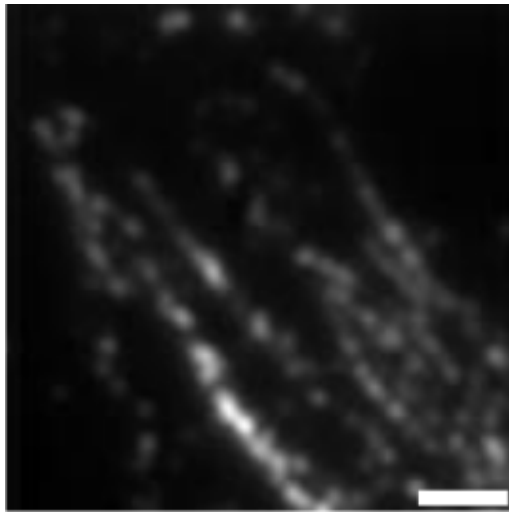


(a) Summenbild über 14500 Einzelbilder von einem Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfer (vgl. Film C.2 (g)). Der Maßstabsbalken entspricht $1\ \mu\text{m}$.

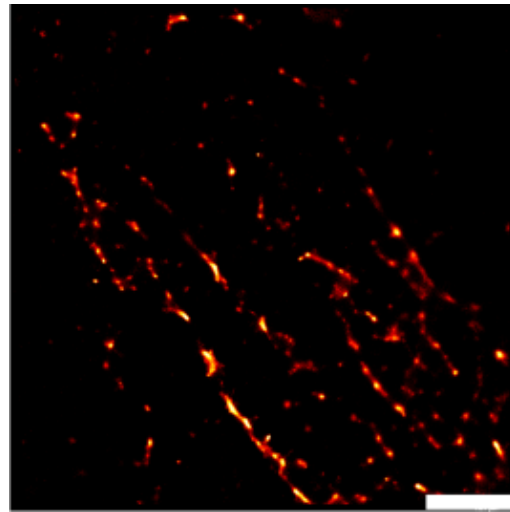


(b) Rekonstruktion über die 14500 Einzelbilder. Die Farbskala spiegelt die Häufigkeit der Lokalisationen wider (vgl. Film C.2 (g)). Der Maßstabsbalken entspricht $1\ \mu\text{m}$.

Abbildung B.12.: Hochaufflösung des Tubulinskeletts.

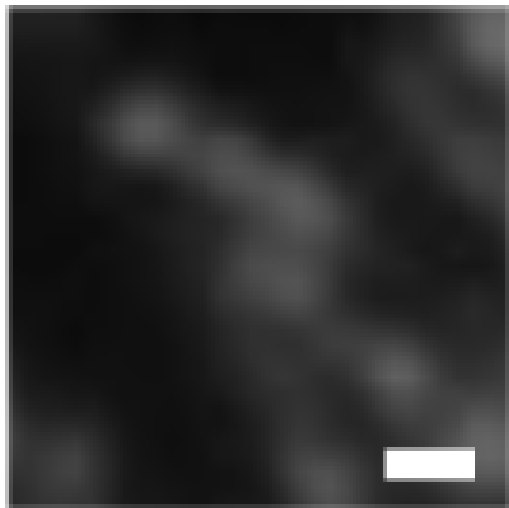


(a) Summenbild über 10000 Einzelbilder von einem Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfer (vgl. Filme C.3 (a)). Der Maßstabsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$.

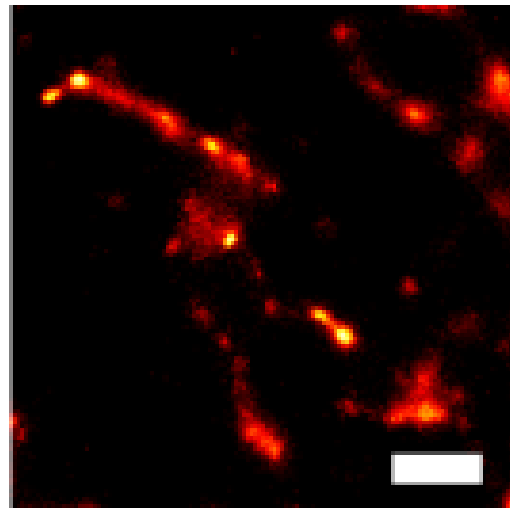


(b) Rekonstruktion über die 10000 Einzelbilder. Die Farbskala spiegelt die Häufigkeit der Lokalisationen wider (vgl. Film C.3 (a)). Der Maßstabsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$.

Abbildung B.13.: Hochauflösung des Tubulinskeletts.

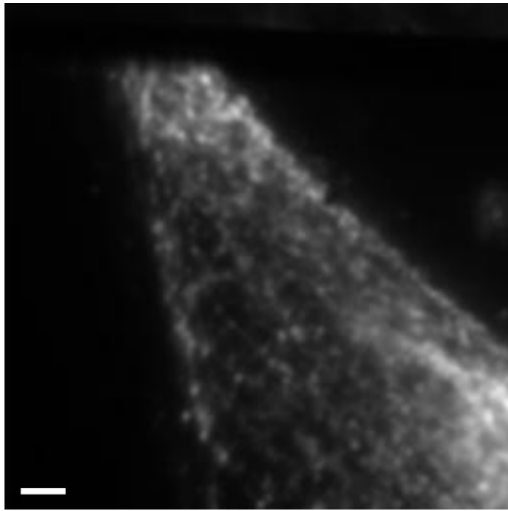


(a) Vergrößerung eines Summenbildes (vgl. Abb. B.12 (a)). Der Maßstabsbalken entspricht $500\ \text{nm}$.

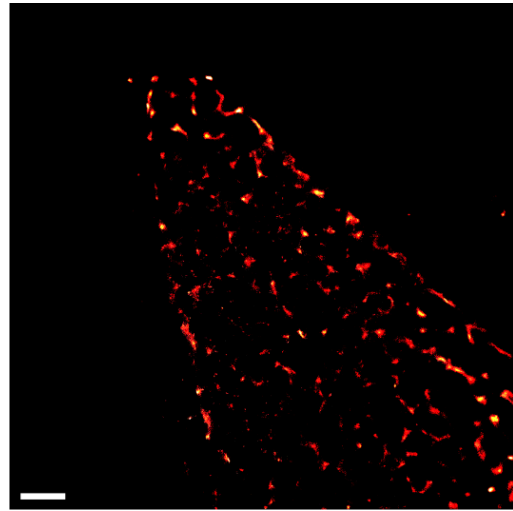


(b) Vergrößerung eines Lokalisationsbildes (vgl. Abb. B.12 (b)). Der Maßstabsbalken entspricht $500\ \text{nm}$.

Abbildung B.14.: Hochauflösung des Tubulinskeletts.

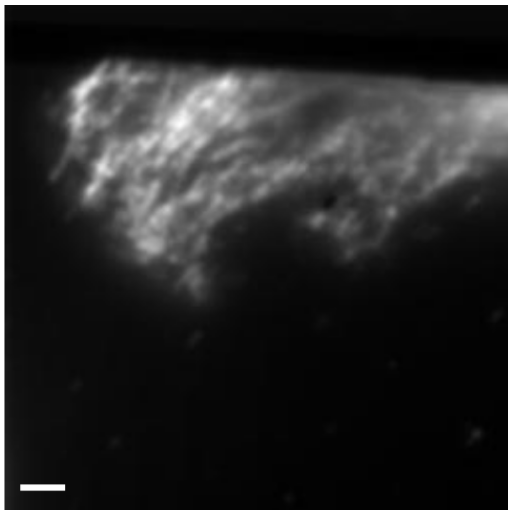


(a) Summenbild über 5000 Einzelbilder von einem Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfer. Der Maßstabsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$.

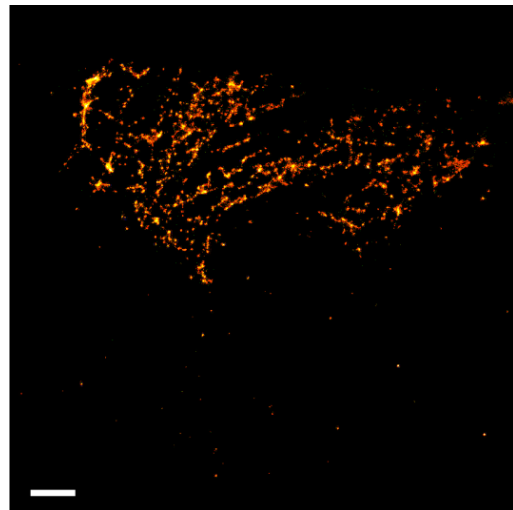


(b) Rekonstruktion über die 5000 Einzelbilder. Die Farbskala spiegelt die Häufigkeit der Lokalisationen wider. Der Maßstabsbalken entspricht $500\ \text{nm}$.

Abbildung B.15.: Hochaufföschung des Tubulinskeletts.



(a) Summenbild über 5000 Einzelbilder von einem Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfer (vgl. Film C.3 (c)). Der Maßstabsbalken entspricht $2\ \mu\text{m}$.

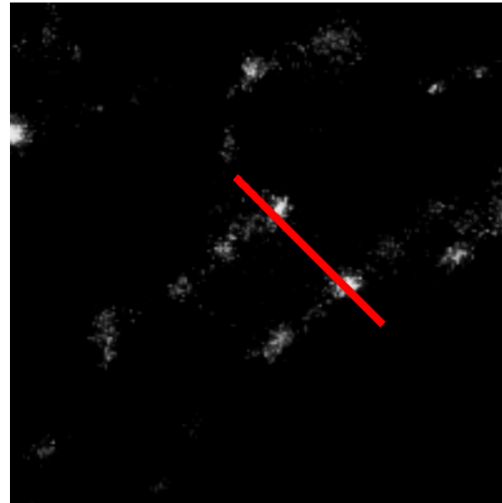


(b) Rekonstruktion über die 5000 Einzelbilder. Die Farbskala spiegelt die Häufigkeit der Lokalisationen wider (vgl. Film C.3 (c)). Der Maßstabsbalken entspricht $500\ \text{nm}$.

Abbildung B.16.: Hochaufföschung des Tubulinskeletts.

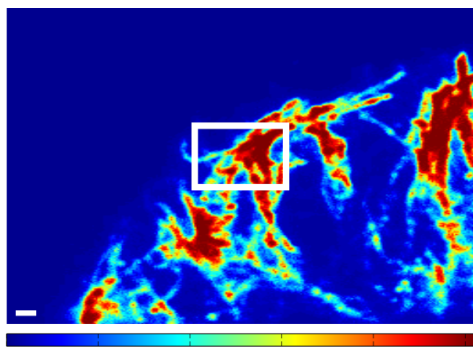


(a) Vergrößerung eines kleinen Bereichs in dem Summenbild einer Zelle. Der rote Strich gibt den Querschnitt des Intensitätsbildes aus Abb. 3.29 an.

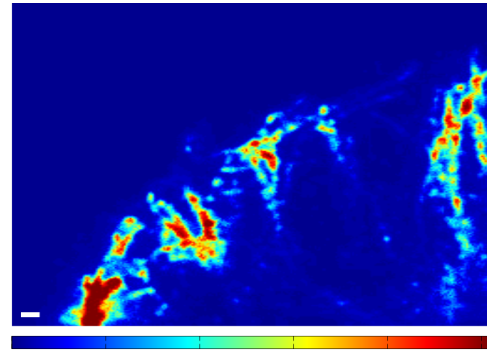


(b) Vergrößerung eines kleinen Bereichs in dem zugehörigen Lokalisationsbild. Der rote Strich gibt den Querschnitt der Auftragung der Lokalisationshäufigkeiten aus Abb. 3.29 an.

Abbildung B.17.: Querschnitt über einen kleinen Bereich im markierten Skelett der Zelle aus Abb. B.16



(a) Aufnahme einer Zelle, die mit einem TMR-modifizierten Sekundärantikörper und der Sonde markiert wurde. In dem Messpuffer sind $50 \mu\text{M}$ Kupfersulfat vorhanden. Der Maßstab entspricht $1 \mu\text{m}$.



(b) Aufnahme nach der Photozerstörung sämtlicher Fluoreszenzemitter und der Aktivierung der gelöschten Sonden mit EDTA. Der Maßstab entspricht $1 \mu\text{m}$.

Abbildung B.18.: Markierung von Zellen mit Sekundärantikörpern und über Streptavidin in Verbindung mit der Sonde.

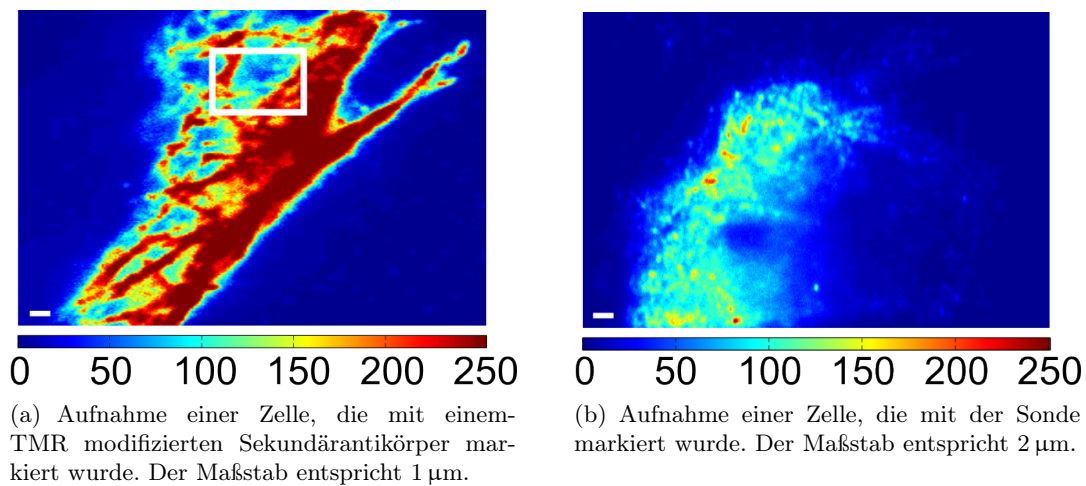


Abbildung B.19.: Markierung von Zellen mit Sekundärantikörpern und über die Sonde vor der Photozerstörung und nach der Reaktivierung gelöschter Sonden mit EDTA

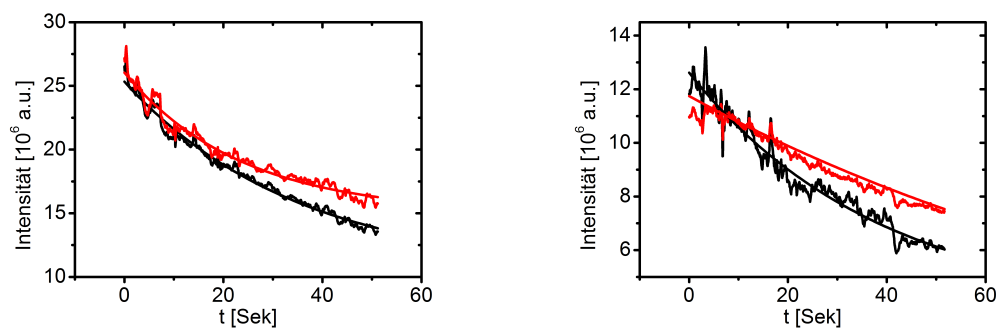
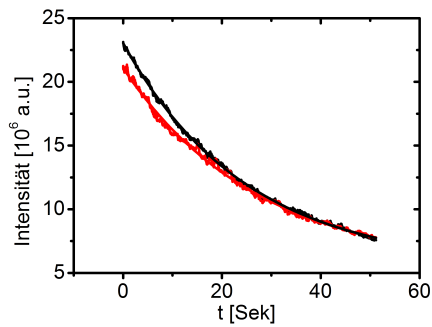
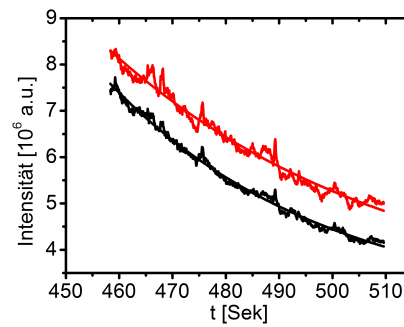


Abbildung B.20.: Analyse der Photostabilität der unterschiedlichen Markierungen.

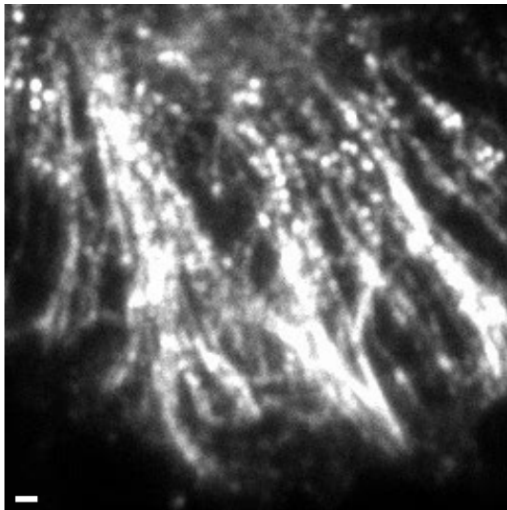


(a) Fluoreszenzabnahme einer 50×50 großen ROI bei einer mit beiden Methoden markierten Probe (vgl. Tab. 3.9). Die Messung fand in MOPS bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ Kupfersulfat statt.

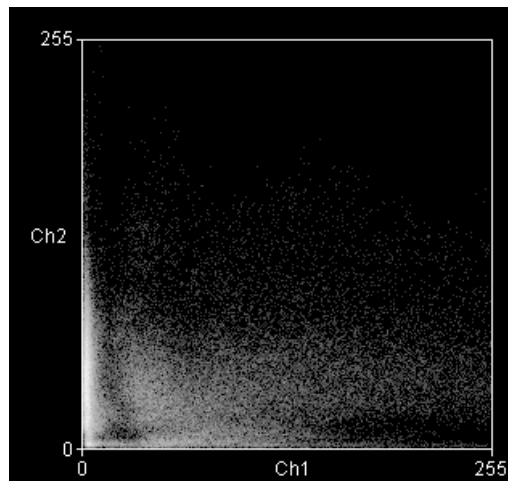


(b) Fluoreszenzabnahme einer 50×50 großen ROI bei einer mit beiden Methoden markierten Probe (vgl. Tab. 3.9). Die Messung fand in MOPS bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ Kupfersulfat und direkt nach Zugabe von $250 \mu\text{M}$ EDTA statt.

Abbildung B.21.: Analyse der Photostabilität der unterschiedlichen Markierungen.



(a) Als Negativ-Kontrolle diente eine, mit beiden Methoden, markierte Probe. Die Messung fand in MOPS bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ Kupfersulfat statt. Der Maßstab entspricht $1 \mu\text{m}$.



(b) Auftragung der Manders-Koeffizienten für die Kolokalisationsanalyse zwischen dem ersten Bild und der Negativ-Kontrolle.

Abbildung B.22.: Negativkontrolle und die zugehörige Manders Kolokalisationsanalyse.

C. Filme auf DVD

(a)	Dateiname: /C.1/a_BiPy_TMR_00Cu.avi Einzelmoleküloberfläche der Sonde ohne Zugabe von Kupfersulfat. Parameter: kein Kupfersulfat, Belichtungszeit: 15 ms, $\Delta t = 41,42$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm , 100 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel
(b)	Dateiname: /C.1/b_BiPy_TMR_200nMCu.avi Einzelmoleküloberfläche der Sonde nach Zugabe von Kupfersulfat. Parameter: 200 nM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 10 ms, $\Delta t = 31,42$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm , 100 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel
(c)	Dateiname: /C.1/c_PEG_TMR_00Cu.avi Einzelmoleküloberfläche eines über PEG immobilisierten Farbstoffes. Parameter: Belichtungszeit: 10 ms, $\Delta t = 71,42$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm , 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel
(d)	Dateiname: /C.1/d_BiPy_TMR_00Cu.avi Einzelmoleküloberfläche einer Sonde ohne Zugabe von Kupfersulfat. Parameter: Belichtungszeit: 20 ms, $\Delta t = 41,42$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm , 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel
(e)	Dateiname: /C.1/e_BiPy_TMR_200nMCu.avi Einzelmoleküloberfläche einer Sonde nach Zugabe von Kupfersulfat. Parameter: 200 nM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 20 ms, $\Delta t = 31,42$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm , 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel
(f)	Dateiname: /C.1/f_PEG_TMR_6uMCu.avi Einzelmoleküloberfläche einer Sonde nach Zugabe von Kupfersulfat. Parameter: 6 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 20 ms, $\Delta t = 31,42$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm , 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel

Tabelle C.1.: Übersicht über die Filme auf der CD/DVD im Anhang

(a)	<p>Dateiname: /C.2/a_TMR_10uM_0Cu_frames0-400.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett ohne Zugabe von Kupfersulfat, die ersten 20 Sekunden. Parameter: Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 400 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(b)	<p>Dateiname: /C.2/b_TMR_10uM_0Cu_frames1000-4000.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett ohne Zugabe von Kupfersulfat, nach ca. 50 Sekunden. Parameter: Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 3000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(c)	<p>Dateiname: /C.2/c_TMR_4uM_12Cu_frames0-1000.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat, die ersten 50 Sekunden. Parameter: 12 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(d)	<p>Dateiname: /C.2/d_TMR_4uM_12Cu_frames5000-6000.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat, nach ca. 100 Sekunden. Parameter: 12 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(e)	<p>Dateiname: /C.2/e_TMR_4uM_12Cu_7500-8500.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat, nach ca. 6 Minuten. Parameter: 12 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 1000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(f)	<p>Dateiname: /C.2/f_TMR_2uM_40Cu_7k-7,5k.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat, nach ca. 6 Minuten. Parameter: 40 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 500 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(g)	<p>Dateiname: /C.2/g_TMR_4uM_12Cu.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von CuSO_4. Parameter: 12 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 14500 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(h)	<p>Dateiname: /C.2/h_TMR_4uM_12Cu_11-13k.avi Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von CuSO_4. Parameter: 12 μM CuSO_4, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 2000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>

Tabelle C.2.: Übersicht über die Filme auf der CD/DVD im Anhang

(a)	<p>Dateiname: /C.3/a_TMR_4uM_12Cu_5-15.avi</p> <p>Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat.</p> <p>Parameter: 12 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 10000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(b)	<p>Dateiname: /C.3/TMR_4uM_6Cu_6-15.avi</p> <p>Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat.</p> <p>Parameter: 6 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 9000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>
(c)	<p>Dateiname: /Movies/c_BiPy_TMR_2Cu.avi</p> <p>Ein mit der Sonde markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat.</p> <p>Parameter: 2 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 6000 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel</p>

Tabelle C.3.: Übersicht über die Filme auf der CD/DVD im Anhang

(a)	<p>Dateiname: /C.4/a_Chemplex_50uMCu_500uMEDTA_f1-100.avi</p> <p>Ein doppelt markiertes Tubulinskelett nach Zugabe von Kupfersulfat.</p> <p>Parameter: 50 μM Kupfersulfat, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 100 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 256 \times 256 Pixel</p>
(b)	<p>Dateiname: /C.4/b_Chemplex_50uMCu_500uMEDTA_f8500-9000.avi</p> <p>Ein doppelt markiertes Tubulinskelett in einer Kupferlösung nach 450 Sekunden Photozerstörung und während der Zugabe von EDTA.</p> <p>Parameter: 50 μM Kupfersulfat, 500 μM EDTA, Belichtungszeit: 50 ms, $\Delta t = 51,74$ ms, Maßstabsbalken: 4 μm, 500 Einzelbilder, Gain 200, Bildgröße: 128 \times 128 Pixel</p>

Tabelle C.4.: Übersicht über die Filme auf der CD/DVD im Anhang

Literaturverzeichnis

- [1] Nobel Media AB 2011. „Timeline of Microscopes“. In: (2011). URL: <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/timeline/index.html>.
- [2] Institute and Museum of the History of Science in Florence. *Galileo 's microscope*. Techn. Ber.
- [3] Samuel Hoole. *The select works of Antony van Leeuwenhoek*. Bibliobazaar, 2009.
- [4] Robert Hooke. *Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses: with observations and inquiries thereupon*. London: Martin, Jo., 1665.
- [5] Henry Harris. *The Birth of the Cell*. New Haven: Yale University Press, 1999, S. 76–81.
- [6] Bruce Alberts u. a. *Molecular Biology of The Cell*. 5th. Garland Science, 2008.
- [7] Weilun Chao u. a. „Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm.“ In: *Nature* 435.7046 (Juni 2005), S. 1210–3. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature03719. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988520>.
- [8] Jianwei Miao u. a. „Imaging whole Escherichia coli bacteria by using single-particle x-ray diffraction.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.1 (Jan. 2003), S. 110–2. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.232691299. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=140897&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [9] Peter W. Hawkes und John C.H. Spence. *Science of Microscopy*. Springer-Verlag, 2007.
- [10] C Kisielowski u. a. „Detection of single atoms and buried defects in three dimensions by aberration-corrected electron microscope with 0.5-Å information limit.“ In: *Microscopy and microanalysis* 14.5 (Okt. 2008), S. 469–77. ISSN: 1431-9276. DOI: 10.1017/S1431927608080902. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793491>.
- [11] G. Binnig und C. F. Quate. „Atomic Force Microscope“. In: *Physical Review Letters* 56.9 (1986), S. 930–934.
- [12] F. J. Giessibl. „Subatomic Features on the Silicon (111)-(7x7) Surface Observed by Atomic Force Microscopy“. In: *Science* 289.5478 (Juli 2000), S. 422–425. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.289.5478.422. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.289.5478.422>.

- [13] Luciano Paulino. „ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND PROTEINS Diode laser Mirror Laser beam Position-sensitive detector Topography signal Computer Probe Integrator Piezoelectric crystal Cantilever Sample“. In: *Science* 9.2 (2002), S. 117–125.
- [14] Norman R Pallas und Brian a Pethica. „Intermolecular forces in lipid monolayers. Two-dimensional virial coefficients for pentadecanoic acid from micro-manometry on spread monolayers at the air/water interface.“ In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 11.25 (Juli 2009), S. 5028–34. ISSN: 1463-9076. DOI: 10.1039/b820460h. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843592>.
- [15] Gil U Lee, David A Kidwell und Richard J Colton. „Sensing Discrete Streptavidin-Bio tin Interactions with Atomic Force Microscopy“. In: *Langmuir* 10.9 (1994), S. 354–357.
- [16] Bert Hecht u. a. „Scanning near-field optical microscopy with aperture probes: Fundamentals and applications“. In: *The Journal of Chemical Physics* 112.18 (2000), S. 7761–7774.
- [17] Cecil H. Fox u. a. „Formaldehyde fixation“. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33.8 (Juli 1985), S. 845–853. ISSN: 1096-0309.
- [18] M Tewinkel u. a. „Visualization of actin filament pattern in plant cells without pre-fixation A comparison of differently modified phallotoxins“. In: *Protoplasma* 149 (1989), S. 178–182.
- [19] Wolfgang Piersig. *Mikroskop und Mikroskopie - Ein wichtiger Helfer auf vielen Gebieten*. first. GRIN Verlag, 2009. ISBN: 978-3640482009.
- [20] Douglas Magde, Elliot L Elson und Watt W Webb. „Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization“. In: *Biopolymers* 13 (1974), S. 29–61.
- [21] R. Rigler Widengren und J. „Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *BioScience*. Hrsg. von C. Owman B. Klinge. Lund, Sweden: Lund University Press, 1990, S. 180–183.
- [22] Th. Schmidt u. a. „Imaging of single molecule diffusion“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93.7 (Apr. 1996), S. 2926–2929. URL: <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=8610144>.
- [23] Eugene Hecht. *Optics*. fourth. Addison Wesley, 2002.
- [24] Bergmann und Schäfer. *Lehrbuch der Experimentalphysik 3: Optik*. Hrsg. von Ludwig Bergmann und Clemens Schäfer. 10th. 2004.
- [25] Ariel Lipson, Stephen G. Lipson und Henry Lipson. *Optical Physics*. fourth. 2009.
- [26] E. Abbe. „Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung“. In: *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 9.1 (Dez. 1873), S. 413–418. ISSN: 0176-7364. DOI: 10.1007/BF02956173. URL: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02956173>.
- [27] George H. Seward. *Optical Design of Microscopes*. SPIE Press, 2010.

- [28] Osamu Shimomura, Frank H. Johnson und Yo Saiga. „Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea“. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59.3 (Juni 1962), S. 223–239. ISSN: 0095-9898. DOI: 10.1002/jcp.1030590302. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.1030590302>.
- [29] O Shimomura. „The discovery of aequorin and green fluorescent protein.“ In: *Journal of microscopy* 217.Pt 1 (Jan. 2005), S. 1–15. ISSN: 0022-2720. DOI: 10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655058>.
- [30] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd. Bd. 13. 2. Springer, 2006, S. 954. ISBN: 0-387-31278-1.
- [31] Wolfgang Demtröder. *Experimentalphysik 3*. Springer-Verlag, 2004.
- [32] Peter Atkins und Julio de Paula. *Physical Chemistry for the Life Sciences*. 2nd. Oxford University Press, 2011.
- [33] Theo Mayer-Kuckuck. *Atomphysik*. 5th. Teubner Studienbücher, 1997.
- [34] J R Lakowicz u. a. „Fluorescence lifetime imaging.“ In: *Analytical biochemistry* 202.2 (Mai 1992), S. 316–30. ISSN: 0003-2697. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1519759>.
- [35] Mike Heilemann u. a. „High-Resolution Colocalization of Single Dye Molecules by Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy“. In: *Analytical Chemistry* 74.14 (Juli 2002), S. 3511–3517. ISSN: 0003-2700. DOI: 10.1021/ac025576g. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac025576g>.
- [36] Jerker Widengren und Rudolf Rigler. „Mechanisms of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy“. In: *Bioimaging* 4.3 (Sep. 1996), S. 149–157. ISSN: 09669051. DOI: 10.1002/1361-6374(199609)4:3<149::AID-BI05>3.3.CO;2-4. URL: [http://doi.wiley.com/10.1002/1361-6374\(199609\)4:3<149::AID-BI05>3.3.CO;2-4](http://doi.wiley.com/10.1002/1361-6374(199609)4:3<149::AID-BI05>3.3.CO;2-4).
- [37] C Eggeling u. a. „Photostability of Fluorescent Dyes for Single-Molecule Spectroscopy“. In: Hrsg. von Wolfgang Rettig u. a. Springer-Verlag, 1998. Kap. 10, S. 193–240.
- [38] Jerker Widengren u. a. „Strategies to Improve Photostabilities in Ultrasensitive Fluorescence Spectroscopy“. In: *The Journal of Physical Chemistry A* 111.3 (2007), S. 429–440. DOI: 10.1021/jp0646325.
- [39] Wataru Tomosugi u. a. „An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity.“ In: *Nature methods* 6.5 (Mai 2009), S. 351–3. ISSN: 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth.1317. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19349978>.
- [40] Marc Tramier u. a. „Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells.“ In: *Microscopy research and technique* 69.11 (Nov. 2006), S. 933–9. ISSN: 1059-910X. DOI: 10.1002/jemt.20370. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16941642>.

- [41] Ivan Rasnik, Sean A McKinney und Taekjip Ha. „Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging“. In: *Nature Methods* 3.11 (2006), S. 891–893. DOI: 10.1038/nmeth934.
- [42] Thorben Cordes, Jan Vogelsang und Philip Tinnefeld. „On the Mechanism of Trolox as Antiblinking and Antibleaching Reagent“. In: *Journal of the American Chemical Society* 131.14 (2009), S. 5018–5019. DOI: 10.1021/ja809117z.
- [43] Jan Vogelsang, Thorben Cordes und Philip Tinnefeld. „Single-molecule photophysics of oxazines on DNA and its application in a FRET switch“. In: *Photochemical & Photobiological Sciences* 8.4 (2009), S. 486. DOI: 10.1039/b822318c.
- [44] Th. Förster. „Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz“. In: *Annalen der Physik* 6.2 (1948), S. 55–75.
- [45] Helen Hwang, Hajin Kim und Sua Myong. „Protein induced fluorescence enhancement as a single molecule assay with short distance sensitivity“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.18 (2011), S. 7414. DOI: 10.1073/pnas.1017672108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017672108. URL: <http://www.pnas.org/content/108/18/7414.short>.
- [46] Yuansheng Sun u. a. „FRET Microscopy in 2010: The Legacy of Theodor Förster on the 100th Anniversary of his Birth.“ In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* (Dez. 2010), S. 1–14. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.201000664. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191946>.
- [47] Hernán E Grecco und Peter J Verveer. „FRET in Cell Biology: Still Shining in the Age of Super-Resolution?“ In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* (Dez. 2010), S. 1–8. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.201000795. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191951>.
- [48] Seamus J Holden u. a. „Defining the limits of single-molecule FRET resolution in TIRF microscopy.“ In: *Biophysical journal* 99.9 (Nov. 2010), S. 3102–11. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.09.005. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2965953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [49] Rahul Roy, Sungchul Hohng und Taekjip Ha. „A practical guide to single-molecule FRET“. In: *Nature Methods* 5.6 (2008), S. 507–516. DOI: 10.1038/nmeth.1208.
- [50] T Ha u. a. „Probing the interaction between two single molecules: Fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996), S. 6264–6268.
- [51] D. F. Evans. „Perturbation of Singlet-Triplet Transitions of Aromatic Molecules by Oxygen under Pressure.“ In: *J Chem Soc* (1957), S. 1351–1357.

- [52] Kenji Kawaoka, A. U. Khan und David R. Kearns. „Role of Singlet Excited States of Molecular Oxygen in the Quenching of Organic Triplet States“. In: *The Journal of Chemical Physics* 46.5 (1967), S. 1842. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.1840943. URL: <http://link.aip.org/link/?JCP/46/1842/1&Agg=doi>.
- [53] David R. Kearns und A. J. Stone. „Excited-State Intermolecular Interactions Involving Paramagnetic Molecules: Effect of Spin Spin and Spin Orbit Interactions on the Quenching of Triplets“. In: *The Journal of Chemical Physics* 55.7 (1971), S. 3383. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.1676589. URL: <http://link.aip.org/link/?JCP/55/3383/1&Agg=doi>.
- [54] D. L. Dexter. „A Theory of Sensitized Luminescence in Solids“. In: *The Journal of Chemical Physics* 21.5 (1953), S. 836. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.1699044. URL: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v21/i5/p836/s1&Agg=doi>.
- [55] Salah Hassoon u. a. „The Mechanism of Short-Range Intramolecular Electronic Energy Transfer in Bichromophoric Molecules“. In: *J Phys Chem* 88.25 (1984), S. 6367–6374.
- [56] Author M Kumbhakar u. a. „Electron Transfer Interaction of Dihydroxyquinones with Amine Quenchers : Dependence of the Quenching Kinetics on the Aliphatic and Aromatic Nature of the Amine Donors Electron Transfer Interaction of Dihydroxyquinones with Amine Quenchers : Dependence of“. In: *Photochemistry* 79.1 (2004), S. 1–10. DOI: 10.1562/0031-8655(2004)79<1.
- [57] Hirendra N. Ghosh u. a. „Interaction of the excited singlet state of disubstituted anthraquinones with aliphatic and aromatic amines: a fluorescence quenching study“. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 73.1 (Juni 1993), S. 17–22. ISSN: 10106030. DOI: 10.1016/1010-6030(93)80028-8. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1010603093800288>.
- [58] S K Pal u. a. „Photophysics of Some Disubstituted Indoles and Their Involvements in Photoinduced Electron Transfer Reactions“. In: *J. Phys. Chem. A* 107 (2003), S. 10243–10249.
- [59] Sören Doose, Hannes Neuweiler und Markus Sauer. „Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules“. In: *ChemPhysChem* 10.9-10 (2009), S. 1389–1398. DOI: 10.1002/cphc.200900238.
- [60] Nicole Marmé u. a. „Highly Sensitive Protease Assay Using Fluorescence Quenching of Peptide Probes Based on Photoinduced Electron Transfer“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 43.29 (2004), S. 3798–3801. DOI: 10.1002/anie.200453835.
- [61] Dieter Rehm und Albert Weller. „Kinetics of fluorescence quenching by electron and H-atom transfer“. In: *Israel Journal of Chemistry* 8 (1970), S. 259–271.
- [62] Nathan C Shaner, Paul A Steinbach und Roger Y Tsien. „A guide to choosing fluorescent proteins.“ In: *Nature methods* 2.12 (Dez. 2005), S. 905–9. ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth819. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299475>.

- [63] X Michalet u. a. „Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 307.5709 (Jan. 2005), S. 538–44. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1104274. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1201471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [64] Greg T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*. Second. Elsevier, 2008.
- [65] Britta Seefeldt u. a. „Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications.“ In: *Journal of biophotonics* 1.1 (März 2008), S. 74–82. ISSN: 1864-0648. DOI: 10.1002/jbio.200710024. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343637>.
- [66] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). *Protein Data Bank*. URL: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>.
- [67] C C Fu u. a. „Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.3 (2007), S. 727–732. DOI: 10.1073/pnas.0605409104.
- [68] Shu-Jung Yu u. a. „Bright Fluorescent Nanodiamonds: No Photobleaching and Low Cytotoxicity“. In: *Journal of the American Chemical Society* 127.50 (2005), S. 17604–17605. DOI: 10.1021/ja0567081.
- [69] Ph. Tamarat u. a. „Stark shift control of single optical centers in diamond“. In: *Phys. Rev. Lett.* 97 (2006), S. 83002.
- [70] V S Bondar und A P Puzyr. „Nanodiamonds for Biological Investigations“. In: *Physics of th Solid State* 46.4 (2004), S. 716–719.
- [71] N Billinton. „Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence“. In: *Analytical Biochemistry* 291.2 (2001), S. 175–197. DOI: 10.1006/abio.2000.5006.
- [72] Emmanuel G Reynaud u. a. „Light sheet-based fluorescence microscopy: more dimensions, more photons, and less photodamage.“ In: *HFSP journal* 2.5 (Okt. 2008), S. 266–75. ISSN: 1955-2068. DOI: 10.2976/1.2974980. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19404438>.
- [73] Julian Borejdo u. a. „Reduction of photobleaching and photodamage in single molecule detection: observing single actin monomer in skeletal myofibrils.“ In: *Journal of biomedical optics* 13.3 (2008), S. 34021. ISSN: 1083-3668. DOI: 10.1117/1.2938689. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601566>.
- [74] M Minsky. „Confocal scanning microscope“. In: *Rapport technique Patent* 3 (1955).
- [75] M Minsky. „Memoir on inventing the confocal microscope“. In: *Scanning* 10.4 (1988), S. 128–138.
- [76] F Kajiya und C Tokuda. „Confocal laser scanning microscope“. In: *Tanpakushitsu Kakusan Koso Protein Nucleic Acid Enzyme* 39.11 (1994), S. 1911–1919. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003039929782703X>.

- [77] N L Thompson, T P Burghardt und D Axelrod. „Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy.“ In: *Biophysical journal* 33.3 (März 1981), S. 435–54. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(81)84905-3. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1327440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [78] D Axelrod. „Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence.“ In: *The Journal of cell biology* 89.1 (Apr. 1981), S. 141–5. ISSN: 0021-9525. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2111781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [79] S E Sund, J a Swanson und D Axelrod. „Cell membrane orientation visualized by polarized total internal reflection fluorescence.“ In: *Biophysical journal* 77.4 (Okt. 1999), S. 2266–83. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77066-9. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1300506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [80] William A Wells. „Man the nanoscopes.“ In: *The Journal of cell biology* 164.3 (Feb. 2004), S. 337–40. ISSN: 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.200401065. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757748>.
- [81] Peter Kner u. a. „Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination“. In: *Nature Methods* 6.5 (2009), S. 339–342. DOI: 10.1038/nmeth.1324.
- [82] L H Schaefer, D Schuster und J Schaffer. „Structured illumination microscopy: artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach.“ In: *Journal of microscopy* 216.Pt 2 (Nov. 2004), S. 165–74. ISSN: 0022-2720. DOI: 10.1111/j.0022-2720.2004.01411.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516228>.
- [83] Mats G L Gustafsson u. a. „Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination.“ In: *Biophysical journal* 94.12 (Juni 2008), S. 4957–70. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1529/biophysj.107.120345. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326650>.
- [84] Maria Göppert-Mayer. „Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“. In: *Annalen der Physik* 401.3 (1931), S. 273–294. ISSN: 00033804. DOI: 10.1002/andp.19314010303. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.19314010303>.
- [85] W Denk, J. Strickler und W. Webb. „Two-photon laser scanning fluorescence microscopy“. In: *Science* 248.4951 (Apr. 1990), S. 73–76. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.2321027. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2321027>.
- [86] Stefan Hell und Ernst H K Stelzer. „Fundamental improvement of resolution with a 4Pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation“. In: *Optics Communications* 93 (1992), S. 277–282.

- [87] Jörg G Ritter u. a. „A cylindrical zoom lens unit for adjustable optical sectioning in light sheet microscopy.“ In: *Biomedical optics express* 2.1 (Jan. 2010), S. 185–93. ISSN: 2156-7085. DOI: 10.1364/B0E.2.000185. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3028493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [88] Joachim Kappler u. a. „Single-molecule imaging of hyaluronan in human synovial fluid.“ In: *Journal of biomedical optics* 15.6 (2010), S. 060504. ISSN: 1560-2281. DOI: 10.1117/1.3514639. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21198145>.
- [89] Albert Einstein. „Zur Quantentheorie der Strahlung“. In: *Mitteilungen der Physikalischen Gesellschaft Zürich* 16 (1916), S. 47–62. URL: http://nausikaa2.rz-berlin.mpg.de/digitallibrary/digilib.jsp?fn=permanent/einstein/cw/082_1916/pageimg/\&pn=2\&ws=1.5.
- [90] Max Planck. *The theory of heat radiation*. P. Blakiston’s Son & Co., 1914.
- [91] Thomas A Klar u. a. „Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97.15 (2000), S. 8206–8210.
- [92] Marcus Dyba und Stefan W Hell. „Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission“. In: *Applied Optics* 42.25 (2003), S. 5123–5129.
- [93] Stefan W Hell, Marcus Dyba und Stefan Jakobs. „Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy“. In: *Current Opinion in Neurobiology* 14.5 (2004), S. 599–609. DOI: 10.1016/j.conb.2004.08.015.
- [94] Benjamin Harke u. a. „Resolution scaling in STED microscopy“. In: *Optics Express* 16.6 (2008), S. 4154–4162.
- [95] Eva Rittweger u. a. „STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution“. In: *Nature Photonics* 3.3 (2009), S. 144–147. DOI: 10.1038/nphoton.2009.2.
- [96] Norman Bobroff. „Position measurement with a resolution and noise-limited instrument“. In: *Review of Scientific Instruments* 57.6 (1986), S. 1152. ISSN: 00346748. DOI: 10.1063/1.1138619. URL: <http://link.aip.org/link/RSINAK/v57/i6/p1152/s1\&Agg=doi>.
- [97] Russell E Thompson, Daniel R Larson und Watt W Webb. „Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes.“ In: *Biophysical journal* 82.5 (Mai 2002), S. 2775–83. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75618-X. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1302065&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [98] Sjoerd Stallinga und Bernd Rieger. „Accuracy of the gaussian point spread function model in 2D localization microscopy.“ In: *Optics express* 18.24 (Nov. 2010), S. 24461–76. ISSN: 1094-4087. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164793>.
- [99] Bo Zhang und Josiane Zerubia. „point-spread function models“. In: *Applied Optics* 46.10 (2007), S. 1819–1829.

- [100] C.E. Shannon. „Communication In The Presence Of Noise“. In: *Proceedings of the IEEE* 86.2 (Feb. 1998), S. 447–457. ISSN: 0018-9219. DOI: 10.1109/JPROC.1998.659497. URL: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=659497>.
- [101] M Heilemann u. a. „Photoswitches: Key molecules for subdiffraction resolution fluorescence imaging and molecular quantification“. In: *Laser & Photonics Review* 3.1-2 (2009), S. 180–202. DOI: 10.1002/lpor.200810043.
- [102] Marta Fernández-Suárez und Alice Y Ting. „Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells“. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9.12 (2008), S. 929–943. DOI: 10.1038/nrm2531.
- [103] Martin Andresen u. a. „Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy“. In: *Nature Biotechnology* 26.9 (2008), S. 1035–1040. DOI: 10.1038/nbt.1493.
- [104] A Stiel u. a. „Generation of Monomeric Reversibly Switchable Red Fluorescent Proteins for Far-Field Fluorescence Nanoscopy“. In: *Biophysical Journal* 95.6 (2008), S. 2989–2997. DOI: 10.1529/biophysj.108.130146.
- [105] Eric Betzig u. a. „Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution“. In: *Science* 313 (2006), S. 1642–1645.
- [106] Ricardo Henriques u. a. „QuickPALM: 3D real-time photoactivation nanoscopy image processing in ImageJ“. In: *Nature Methods* 7.5 (Mai 2010), S. 339–340. ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth0510-339. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth0510-339>.
- [107] Mark Bates, Timothy Blosser und Xiaowei Zhuang. „Short-Range Spectroscopic Ruler Based on a Single-Molecule Optical Switch“. In: *Physical Review Letters* 94.10 (2005). DOI: 10.1103/PhysRevLett.94.108101.
- [108] Michael J Rust, Mark Bates und Xiaowei Zhuang. „Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM).“ In: *Nature methods* 3.10 (Okt. 2006), S. 793–5. ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth929. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2700296&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [109] Bo Huang u. a. „Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy.“ In: *Science (New York, N.Y.)* 319.5864 (Feb. 2008), S. 810–3. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1153529. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18174397>.
- [110] Mike Heilemann u. a. „Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes“. In: *Angewandte Chemie International Edition* 47.33 (2008), S. 6172–6176. DOI: 10.1002/anie.200802376.
- [111] Teresa Klein u. a. „Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins.“ In: *Nature methods* 8.1 (Jan. 2011), S. 7–9. ISSN: 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth0111-7b. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21191367>.

- [112] Jan Vogelsang u. a. „Make them Blink: Probes for Super-Resolution Microscopy.“ In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 11.12 (Aug. 2010), S. 2475–90. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.201000189. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20632356>.
- [113] Cristina Flors. „Photoswitching of monomeric and dimeric DNA-intercalating cyanine dyes for super-resolution microscopy applications.“ In: *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 9.5 (Mai 2010), S. 643–8. ISSN: 1474-9092. DOI: 10.1039/b9pp00119k. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20442922>.
- [114] S Linde u. a. „Photoswitching microscopy with standard fluorophores“. In: *Applied Physics B* 93.4 (2008), S. 725–731. DOI: 10.1007/s00340-008-3250-9.
- [115] Mike Heilemann u. a. „Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch“. In: *Journal of the American Chemical Society* 127.11 (2005), S. 3801–3806. DOI: 10.1021/ja044686x.
- [116] Michael Wagner u. a. „Light dose is a limiting factor to maintain cell viability in fluorescence microscopy and single molecule detection.“ In: *International journal of molecular sciences* 11.3 (Jan. 2010), S. 956–66. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms11030956. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2869222&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [117] Sebastian van de Linde u. a. „Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact on super-resolution imaging.“ In: *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 10.4 (Dez. 2010), S. 499–506. ISSN: 1474-9092. DOI: 10.1039/c0pp00317d. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21152594>.
- [118] Seamus J Holden, Stephan Uphoff und Achillefs N Kapanidis. „DAOSTORM: an algorithm for high- density super-resolution microscopy“. In: *Nature Methods* 8.4 (Apr. 2011), S. 279–280. ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth0411-279. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth0411-279>.
- [119] S Wolter u. a. „Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images“. In: *Journal of Microscopy* 237.1 (2010), S. 12–22. DOI: 10.1111/j.1365-2818.2009.03287.x.
- [120] Bo Huang u. a. „Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution“. In: *Nature Methods* 5.12 (2008), S. 1047–1052. DOI: 10.1038/NMETH.1274.
- [121] Sara a Jones u. a. „Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells“. In: *Nature Methods* 8.6 (Mai 2011). ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth.1605. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nmeth.1605>.
- [122] M. Kuno u. a. „On/off fluorescence intermittency of single semiconductor quantum dots“. In: *The Journal of Chemical Physics* 115.2 (2001), S. 1028. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.1377883. URL: <http://link.aip.org/link/JCPSA6/v115/i2/p1028/s1&Agg=doi>.

- [123] M Kuno u. a. „Nonexponential blinking kinetics of single CdSe quantum dots : A universal power law behavior“. In: *Chemical Physics* 112.7 (2000), S. 3117–3120.
- [124] Catherine H Crouch u. a. „Facts and Artifacts in the Blinking Statistics of Semiconductor Nanocrystals.“ In: *Nano letters* (Apr. 2010), S. 1692–1698. ISSN: 1530-6992. DOI: 10.1021/nl100030e. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20364845>.
- [125] Keith A Lidke u. a. „Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics“. In: *Optics Express* 13.18 (2005), S. 7052–7062.
- [126] Jens-Peter Knemeyer, Nicole Marmé und Markus Sauer. „Probes for Detection of Specific DNA Sequences at the Single-Molecule Level“. In: *Anal. Chem.* 72 (2000), S. 3717–3724.
- [127] Nicole Marmé und Jens-Peter Knemeyer. „Sensitive bioanalysis - combining single-molecule spectroscopy with mono-labeled self-quenching probes“. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388.5-6 (2007), S. 1075–1085. DOI: 10.1007/s00216-007-1365-1.
- [128] Stephan Uphoff u. a. „Monitoring multiple distances within a single molecule using switchable FRET.“ In: *Nature methods* 7.10 (Sep. 2010). ISSN: 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth.1502. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20818380>.
- [129] Anthony W. Czarnik. *Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition*. ACS Symposium Series, 1992.
- [130] Chris D. Geddes und Joseph R. Lakowicz. *Advanced Concepts in Fluorescence Spectroscopy: Small Molecule Sensing*. Springer-Verlag, 2005.
- [131] Alexander Kiel u. a. „Direct monitoring of formation and dissociation of individual metal complexes by single-molecule fluorescence spectroscopy.“ In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 46.18 (Jan. 2007), S. 3363–6. ISSN: 1433-7851. DOI: 10.1002/anie.200604965. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397126>.
- [132] Mark Jäger u. a. „Analysis of single-molecule fluorescence spectroscopic data with a Markov-modulated Poisson process.“ In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 10.14 (Okt. 2009), S. 2486–95. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.200900331. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644999>.
- [133] Richard Owczarzy. „Predictions of short DNA Duplex Thermodynamics and evaluation of next nearest neighbor interactions“. Diss. University of Illinois, 1999, S. 188.
- [134] Alexander Kiel. „Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie zur Untersuchung von Metallkomplex-Reaktionen im thermodynamischen Gleichgewicht“. Diss. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2008.

- [135] Wolfgang Naumann. „Reversible fluorescence quenching: Generalized Stern-Volmer equations on the basis of self-consistent quenching constant relations“. In: *The Journal of Chemical Physics* 112.16 (2000), S. 7152. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.481325. URL: <http://link.aip.org/link/JCPA6/v112/i16/p7152/s1\&Agg=doi>.
- [136] G L Eichhorn und Y a Shin. „Interaction of metal ions with polynucleotides and related compounds. XII. The relative effect of various metal ions on DNA helicity.“ In: *Journal of the American Chemical Society* 90.26 (Dez. 1968), S. 7323–8. ISSN: 0002-7863. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5725551>.
- [137] Donald Hamelberg u. a. „Flexible Structure of DNA:Â Ion Dependence of Minor-Groove Structure and Dynamics“. In: *Journal of the American Chemical Society* 122.43 (Nov. 2000), S. 10513–10520. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja0007071. URL: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja0007071>.
- [138] C Zimmer u. a. „DNA-copper (II) complex and the DNA conformation.“ In: *Biopolymers* 10.3 (Jan. 1971), S. 441–63. ISSN: 0006-3525. DOI: 10.1002/bip.360100303. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=342925\&tool=pmcentrez\&rendertype=abstract>.
- [139] Archika Barve u. a. „Mixed-ligand copper(II) maltolate complexes: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, and cytotoxicity.“ In: *Inorganic chemistry* 48.19 (Okt. 2009), S. 9120–32. ISSN: 1520-510X. DOI: 10.1021/ic9004642. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19780613>.
- [140] O.P. Morris und G. Russell. „Effect of chelation on toxicity of copper“. In: *Marine Pollution Bulletin* 4.10 (Okt. 1973), S. 159–160. ISSN: 0025326X. DOI: 10.1016/0025-326X(73)90256-7. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0025326X73902567>.
- [141] T. D. Rae. „Undetectable Intracellular Free Copper: The Requirement of a Copper Chaperone for Superoxide Dismutase“. In: *Science* 284.5415 (Apr. 1999), S. 805–808. ISSN: 00368075. DOI: 10.1126/science.284.5415.805. URL: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5415.805>.
- [142] Jan Vogelsang u. a. „Ein System aus Reduktions- und Oxidationsmittel verringert Photobleichen und Blinken von Fluoreszenzfarbstoffen“. In: *Angewandte Chemie* 120.29 (2008), S. 5545–5550. DOI: 10.1002/ange.200801518.
- [143] IHC WORLD. *Introduction to Immunohistochemistry*. URL: http://www.ihcworld.com/_intro/ihc-methods.htm.
- [144] Invitrogen. *A Practical Guide to Immunocytochemistry*. URL: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Newsletters-and-Journals/BioProbes-Journal-of-Cell-Biology-Applications/BioProbes-Issues-2011/BioProbes-66-October-2011/Guide-To-Immunocytochemistry.html>.
- [145] Matthew P Gordon, Taekjip Ha und Paul R Selvin. „with photobleaching“. In: *DNA Sequence* 2004 (2004), S. 15–18.

- [146] Paul Hochstein, K. Sree Kumar und Stephen J. Forman. „Lipid Peroxidation and the Cytotoxicity of Copper“. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 355.1 Micronutrient (Dez. 1980), S. 240–248. ISSN: 0077-8923. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1980.tb21342.x. URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1980.tb21342.x>.
- [147] Konstantinos Lympieropoulos u. a. „Fluorescent probes and delivery methods for single-molecule experiments.“ In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 11.1 (Jan. 2010), S. 43–53. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.200900359. URL: http://apps.isiknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=X2D8E9KDKBb8ML2E7gM&page=1&doc=5&colname=WOS.
- [148] Katharina Stöhr u. a. „Quenched substrates for live-cell labeling of SNAP-tagged fusion proteins with improved fluorescent background.“ In: *Analytical chemistry* 82.19 (Okt. 2010), S. 8186–93. ISSN: 1520-6882. DOI: 10.1021/ac101521y. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20815338>.
- [149] GlenResearch. *Glen Research Tetramethylrhodamin*. 2010. URL: <http://www.glenresearch.com/ProductFiles/20-5910.html>.
- [150] E. M. M. Manders, F. J. Verbeek und J. A. Aten. „Measurement of co-localisation of objects in dual-colour confocal images“. In: *Journal of microscopy* 169.3 (1993), S. 375–382.
- [151] W.S Rasband. *ImageJ*. Bethesda, Maryland, USA. URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- [152] Tony Collins und Wayne Rasband. *Manders Coefficients*. 2009.
- [153] Schrödinger. *Maestro*. New York, 2011.
- [154] Svenja Wörner. „Metallinduzierte Lösprozesse in der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie“. Bachelorarbeit. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2011, S. 60.
- [155] Thomson Reuters. *Web of Knowledge*. URL: <http://apps.webofknowledge.com/>.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Dr. D.-P. Hertzen für die Themenstellung und Förderung meiner Arbeit bedanken. Dr. Hertzen stand jederzeit für hilfreiche Diskussionen zur Verfügung und gab gute Vorschläge zur Weiterführung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. B. Jähne danke ich für die formelle Erstbetreuung meiner Promotion. Insbesondere möchte ich Dominic Riedel und Prof. Dr. Hashmi für die Synthese von Sonden danken. Dr. Johann Engelhardt gab mir hilfreiche Ideen zur Anwendung des chemischen Multi-Plexing und Steve Wolter und Dr. Markus Sauer unterstützten mich mit der Lokalisationsanalyse Software RapidStorm. Des Weiteren möchte ich mich bei Dominik Brox bedanken, der im Rahmen seiner Masterarbeit in der Chemie wertvolle Messungen zu dieser Arbeit beigetragen hat und Svenja Wörner, die im Rahmen ihrer Bachelorarbeit bei Prof. Dr. M. Pernpointner mit ihrer Arbeit zur Simulation der Sonde dazu beigetragen hat, den unterliegenden Mechanismus zu verstehen. Ein großer Dank gebührt meinen Arbeitskollegen aus dem Arbeitskreis der „Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie“, die mit ihrer netten Art und Weise sowie ihrem wissenschaftlichen Input geholfen haben. Anton Kurz möchte ich besonders für seine Hilfe bei der Programmierung mit MatLab sowie für seine Korrekturvorschläge zu dieser Arbeit danken. Vielen Dank an Dr. Alexander Kiel für die Einführung in die Arbeit mit der chemischen Sonde und viele hilfreiche Diskussionen. Dr. Konstantinos Lympieropoulos hat mit seiner Kreativität die Abkürzung CHIRON ins Leben gerufen und mir bei biologischen Problemen mit Rat zur Seite gestanden. Ein weiterer großer Dank geht an meine Arbeitskollegen Anne Seefeld, Christina Spassova, Daniel Barzan und Dominik Brox dafür, dass sie mir viel Arbeit in der Zellkultur abgenommen haben. Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Freundin Ines Ludwig und meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken sowie der ganzen Familie Ludwig für die immer währende Suche nach Rechtschreibfehlern.

Veröffentlichungen

Publikationen

Schwering, M., Kiel, A. et al., „Far-Field Nanoscopy with Reversible Chemical Reactions“, *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, 2940-2945.
doi:10.1002/anie.201006013

Schwering, M., Lympieropoulos, K. et al., „New Ways to Super-Resolution: Reversible Chemical Reactions Control Fluorescent States“, *Imaging & Microscopy*, **2011**, 2, 43-45

Posterveröffentlichungen

„Stochastic Chemical Switching of Spectroscopic States - A Novel Route to Super Resolution Microscopy“, *Single Molecule Biophysics Winter Workshop 2011*, Aspen(CO) **2011**

„Covalent and Highly Specific Method for in vivo Markers by use of Virions as Shuttle for Dyes“, *German Symposium on Systems Biology*, Heidelberg **2009**

„Nano-Particles for Probe Delivery“, *15th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences*, Berlin(Picoquant) **2009**

„Diffusion Imaging Microscopy as approach to measure Dynamics of Virus-Cell interactions (WP C.7)“, *ViroQuant-Retreat*, Asselheim/Grünstadt **2009**

„Diffusion Measurements in Living Cells using Novel Labeling Approaches“, *Viroquant-Meeting of Scientific Advisory Board*, Heidelberg **2009**

Vorträge

„Super-Resolution by Localization Microscopy Simplified“, *17th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences*, Berlin(Picoquant) **2011**

„Stochastic Chemical Switching of Spectroscopic States: A Novel Route to Super-Resolution Microscopy“, *Bunsentagung - 110th annual german conference on physical chemistry*, Berlin **2011**

„Stochastic Chemical Switching of Spectroscopic States - A Novel Route to Super Resolution Microscopy“, *16th International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Sciences*, Berlin(Picoquant) **2010**