Die approbierte Originalversion dieser Diplom-/Masterarbeit ist in der Hauptbibliothek der Technischen Universität Wien aufgestellt und zugänglich.
http://www.ub.tuwien.ac.at

The approved original version of this diploma or master thesis is available at the main library of the Vienna University of Technology.
http://www.ub.tuwien.ac.at/eng

TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
Vienna University of Technology

DIPLOMARBEIT

Einzelmolekulare Analyse des MDR 1 - mediierten Substrattransportes

Ausgeführt am
Institut für Angewandte Physik
der
Technischen Universität Wien

unter Anleitung von
Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Gerhard Schütz

durch
Alexander Reismann
Küniglberggasse 10
1130, Wien

Datum Unterschrift (Student)

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG 1

B. HINTERGRUND 3

1. FLUORESZENZMIKROSKOPIE 3

1.1. Fluorophore 5

1.1.1. Rhodamin 123 8

1.2. Optische Auflösung 9

1.3. Totalreflexion Fluoreszenz Mikroskopie (TIRF) 10

1.4. Hochauflösende Fluoreszenz Mikroskopie 11

1.4.1. Stochastische Optische Rekonstruktionmikroskopie (STORM) und Photoaktivierungs Lokalisations Mikroskopie (PALM) 13

1.4.2. Thinning Out Clusters while Conserving Stoichiometry of Labeling (TOCCSL) 14

1.5. Einzel Molekül Partikel Tracking 15

1.5.1. Diffusion 16

1.5.2. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 18

1.6. Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) 19

1.6.1. Berechnung des Försterradius 20

1.6.2. Methoden zur FRET-Bestimmung 21

2. LIPID BILAYER 23

3. ABC TRANSPORTER 25

3.1. Struktur 26

3.2. Funktionsweise 29

C. EXPERIMENTE 31

1. EXPERIMENTELLER AUFBAU 31

2. EFFLUX MESSUNGEN 33

2.1. Messverfahren *33*

2.2. Ergebnisse *35*

3. SOFTWAREENTWICKLUNG FÜR TRACKINGEXPERIMENTE 37

3.1. Aufbau und Bedienung *38*

3.1.1. Anzeige 39

3.1.2. Lokalisierung 40

3.1.3. Tracking 43

3.1.4. ROI 45

3.2. Funktionsweise *46*

3.2.1. Lokalisierung 46

3.2.2. Tracking 48

4. BILAYER MESSUNGEN 50

4.1. Messverfahren *51*

4.2. Ergebnisse *52*

5. FRET MESSUNGEN 54

5.1. Messverfahren *55*

5.2. Ergebnisse *56*

D. CONCLUSIO 58

E. ANHANG 60

1. LITERATURVERZEICHNIS 60

2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 63

A. Einleitung

Multi-Drug-Resistance Transporter (MDR) haben die Aufgabe, eine große Gruppe an Schadstoffen aus der Zelle zu transportieren. Diese Aktivität wird in der modernen Krebsforschung immer mehr zu einem Problem, da auch Medikamente gegen Krebs von dem Transporter aus der Zelle transportiert werden. Daher ist es eine große Herausforderung für die pharmazeutische Forschung, Medikamente zu entwickeln, die auch in Krebszellen verweilen und somit genug Zeit haben ihre Wirkung zu entfalten. Um diese Forschung voranzutreiben ist der erste notwendige Schritt, MDR und deren Transportverhalten besser zu verstehen.

Derzeit wird die Forschung von molekularbiologischen Analysemethoden dominiert. Ausgehend von der Pharmakologie verlagert sich die Forschung nun immer stärker in Richtung Grundlagenforschung. Für in vivo Beobachtungen von komplexen aber flexiblen Proteinen – Konformationsänderungen der MDR – sind molekularbiologische Methoden alleine aber zu wenig. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine elegante Erweiterung, die sich gut kombinieren lässt und einige Methoden beinhaltet, die sich für die Messung von dynamischen Prozessen in lebenden Zellen eignen.

Wir interessieren uns speziell für den Transportmechanismus und die Bindungsdynamik. Für ersteren verwenden wir Förster Resonanz Energie Transfer (FRET). Dazu wird Rhodamin 123 ausgenützt, das sowohl Substrat zum Transporter ist, als auch der Donor des FRET-Paars. Der Akzeptor mCherry wird an den N-Terminus des Transportes fusioniert.

Speziell waren wir an MDR 1 interessiert; es besitzt zwei Kanäle, durch die der Transport stattfinden kann. Mit Hilfe des FRETs kann festgestellt werden, wann und durch welchen der beiden Kanäle ein Substrat geht. Das liefert wichtige Einsichten in die Transportdynamik, die bisher nicht genau bekannt ist. Außerdem kann die Bindungsrate zwischen MDR 1 und Rhodamin 123 bestimmt werden, indem der Transport an sich verhindert wird ohne die Bindungsstelle zu beeinflussen. Auch in diesem Fall stellt FRET eine gute Möglichkeit dar, da sich die Bindungsstelle in der Nähe der Akzeptorposition befindet.

An diesem Projekt wurde in Kooperation mit Peter Chiba von der medizinischen Universität Wien gearbeitet. Seine Arbeitsgruppe übernahm die molekularbiologischen Arbeitsschritte, wie zum Beispiel die Klonierung von mCherry an MDR 1.

B. Hintergrund

1. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie ist gegenwärtig die einzige Methode, um Informationen auf Einzelmolekülbasis aus lebenden Zellen zu gewinnen. Man kann einen Fluorophor sehr spezifisch an ein Protein oder ein Lipid binden, welches von Zellen endogen, oder aber auch ektopisch exprimiert wird. Mit Hilfe von Lasern angeregt, geben Fluorophore ein rotverschobenes Fluoreszenzsignal zurück, das detektiert und lokalisiert werden kann. Auf diese Weise kann die Position des markierten Proteins innerhalb der Zelle sehr genau bestimmt werden.

Fluorophore sind Moleküle, die ein einfallendes Photon absorbieren und nach einer Zeit von etwa einer Nanosekunde ein – im Allgemeinen rotverschobenes - Photon emittieren.[1] Das kann dazu verwendet werden bestimmte Objekte für eine Kamera sichtbar zu machen. Da man meistens Wellenlängen in der Nähe des optischen Spektrums verwendet, zählt die Methode zur optischen Mikroskopie.

Fluorophore können von der Zelle selbst produziert werden, oder künstlich erzeugt und nachträglich eingebracht werden. Sobald die Proteine markiert sind, kann man die Farbstoffe mit Hilfe des richtigen Anregungslasers zum fluoreszieren bringen und deren Signale mittels eines Objektivs auf eine CCD Kamera abbilden. Es gibt eine große Auswahl an Farbstoffen, die jeweils in einem gewissen Bereich des Spektrums Fluoreszenz aufweisen. Verwendet man mehrere Fluorophore, die farblich voneinander getrennt sind, kann man auch unterschiedliche Proteine parallel betrachten.

Die Probe wird mit einem Laser beschienen, der möglichst gut im Absorptionsspektrum des Fluorophors liegt. Danach wird mit Hilfe von Filtern und Strahlteilern das reflektierte Laserlicht vom rotverschobenen Fluoreszenzlicht getrennt und mit einer sensitiven Kamera aufgenommen.

Im Mikroskop gibt es die Möglichkeit eine zusätzliche Weißlichtbeleuchtung zuzuschalten, um das Navigieren einfacher zu machen. Der Strahlengang innerhalb des Mikroskops ist in Abbildung 1 zu sehen. Um den Laser einzukoppeln kann die HBO

Lampe (13) an der Rückseite entfernt werden. Mit Hilfe eines optischen Systems vor dem Mikroskop, können auch mehrere Laserlinien gleichzeitig verwendet werden. Der Reflektorwürfel (9) muss dann dementsprechend an den Spektralbereich der Laser angepasst werden. Auch alle Linsen innerhalb des Mikroskops sollten achromatisch korrigiert sein, damit alle Laser dieselben Fokusse haben.

Verwendet man verschiedene Fluorophore mit unterschiedlichen Emissions- und Absorptionsspektren, kann man in einem Bild mehrere Proteine auf einmal untersuchen. Verwendet man einen Optosplit, so kann man die Emission spektral trennen. Im Optosplit befinden sich je nach Bauart ein oder zwei dichroitische Spiegel, die jeweils nur einen bestimmten Teil des Spektrums reflektieren und den Rest transmittieren. Mit Hilfe dieser Spiegel kann man also die verschiedenen Farben zueinander parallel verschieben.

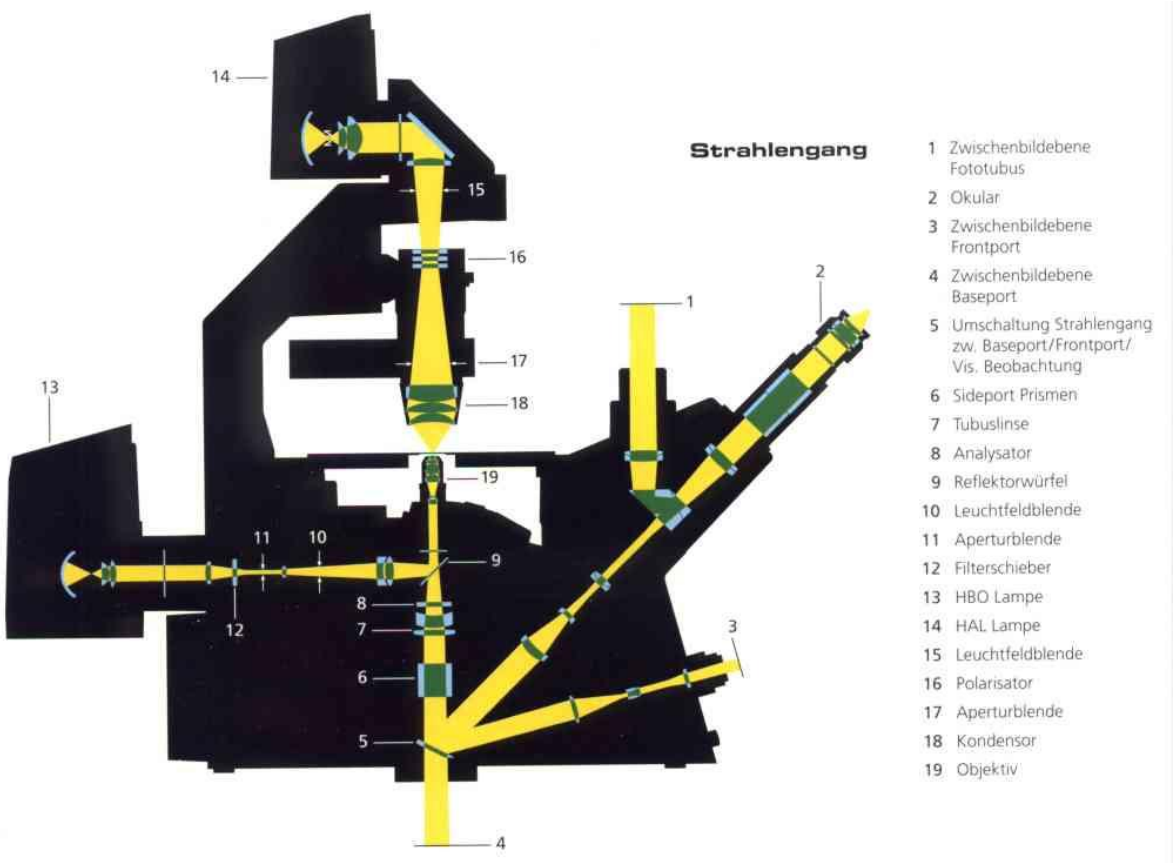

Abbildung 1 Strahlengang in einem Mikroskop: Im Mikroskop gibt es mehrere Ein-und Ausgänge, die je nach Anwendung angesteuert werden können. Statt der Quecksilberdampflampe (13) können zum Beispiel auch Laser eingekoppelt werden. Das Okular (2) und die Halogenlampe (14) dienen der Grobausrichtung der Probe. Das eigentlich abbildende System, das zur Messung verwendet wird, besteht aus Objektiv (19) und Tubuslinse (7).[2]

1.1. Fluorophore

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Fluorophore, die zu unterschiedlichen Aufgaben verwendet werden können. Sie lassen sich in drei große Gruppen aufteilen. Es gibt organische Farbstoffe, von denen manche auch natürlich vorkommen, Quantenpunkte, die aus halbleitenden Materialien bestehen und fluoreszierende Proteine, die oft für Mikroskopie in lebenden Zellen verwendet werden.

In Abbildung 2 ist ein typisches Fluoreszenzspektrum eines organischen Farbstoffs dargestellt. Die Werte sind relativ zu den jeweiligen Maxima gegeben. Die absolute Absorptionsintensität wird durch den Extinktionskoeffizienten gegeben und hängt vom jeweiligen Fluorophor ab. Die Umwandlungswahrscheinlichkeit von einem aufgenommenen Photon in ein emittiertes Photon ist durch die Quantenausbeute gegeben und wird stark durch das Termschema beeinflusst.

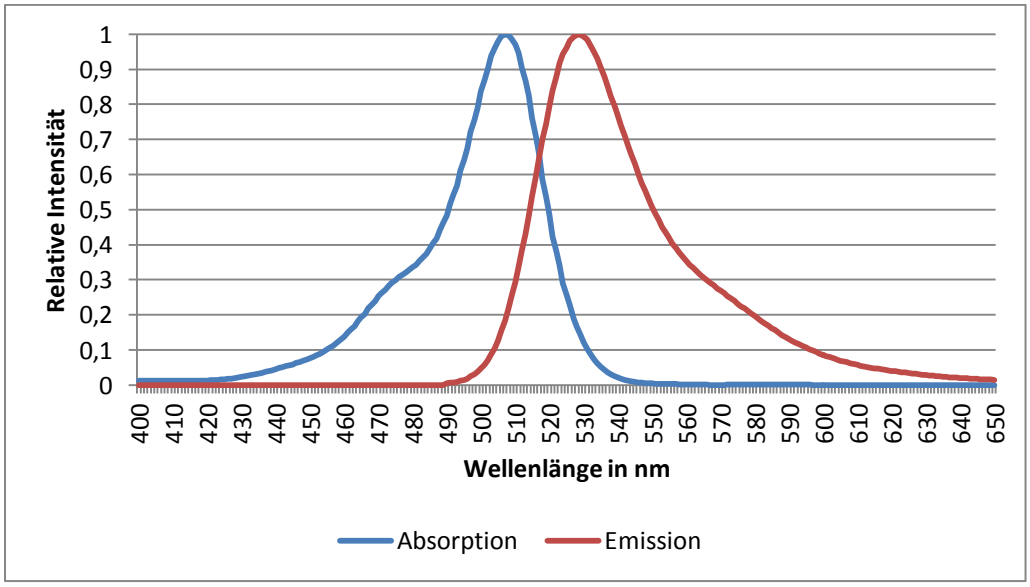

Abbildung 2 Spektrum von Rhodamin 123: Die blaue Kurve stellt das Absorptionsvermögen in Abhängigkeit von der Wellenlänge dar und die rote Kurve gibt die Emissionsintensität an. Beide Kurven sind auf das jeweilige Maximum normiert.

Die Fluoreszenz an sich ist ein dreistufiger Prozess.

- Ein Photon trifft den Fluorophor und regt ihn an. Er befindet sich dann in einem hochenergetischen Zustand.

- Von diesem folgt eine strahlenlose Relaxation in einen Zustand niedrigerer Schwingungsenergie wobei Energie an die Umgebung in Form von Wärme abgegeben wird.
- Danach folgt der strahlende Übergang zurück in den Grundzustand, der das eigentliche Signal liefert.

Gibt es einen passenden Triplett-Zustand, kommt es zu einem konkurrierenden Prozess. Dabei gibt es zwei strahlungslose Übergänge, einen vom angeregten Zustand in den Triplett Zustand und einen von dort zurück in den Grundzustand. Da die Triplett-Zustände metastabil sind, dauert es bis zu einigen Mikrosekunden, bis die Fluorophore wieder angeregt werden können.

Mit Hilfe eines Jablonski-Diagramms kann eine einfache Zusammenfassung des Fluoreszenzprinzips gegeben werden. Ein solches ist in Abbildung 3 zu sehen. Innerhalb eines Moleküls sind alle elektronischen Zustände überlagert von einem Kontinuum an vibronischen Zuständen, welche Molekülschwingungen sowie -rotationen umfassen. Das führt zu einer Aufspaltung und in weiterer Folge zu den Breiten der Absorptions-und Emissionsverteilungen.

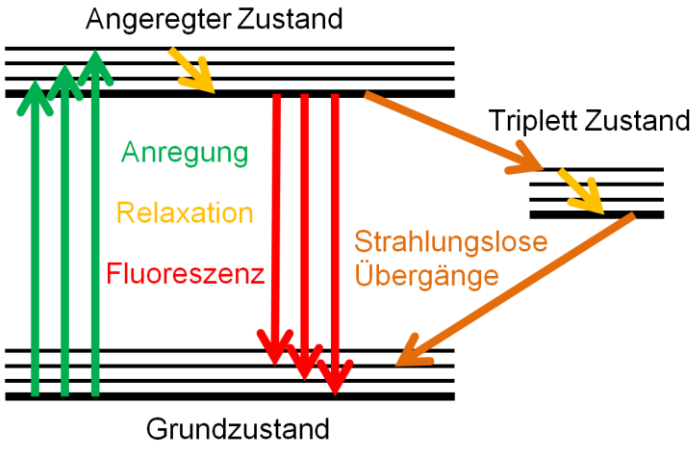

Abbildung 3 Jablonski-Diagramm des Termschemas für fluoreszente Übergänge: Der gesamte Prozess besteht aus drei Teilschritten: (1 grün) Die Anregung findet durch ein Photon mit geeigneter Wellenlänge statt und hebt das System aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand. (2 gelb) Das System geht durch Relaxation in einen schwingungsarmen angeregten Zustand. (3 rot) Ein Photon mit etwas geringerer Energie als bei der Anregung wird abgegeben und das System geht in den Grundzustand über. (braun) Dazu gibt es auch den alternativen Weg über den Triplett Zustand, der länger dauert und strahlungslos stattfindet.

Die Energie (E), die in Schritt zwei abgegeben worden ist, fehlt jetzt dem emittierten Photon, das somit eine größere Wellenlänge (λ) hat, da gilt

$$E = \frac{hc}{\lambda}, \tag{1}$$

wobei c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und h das plancksche Wirkungsquantum ist. Diese Verschiebung zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum nennt man Stokesverschiebung.

Es besteht auch die Möglichkeit einen Fluorophor zu bleichen. Dabei kommt es zu einer Änderung der chemischen Struktur, sodass das Farbstoffmolekül keine Photonen mehr aufnehmen und somit auch nicht mehr fluoreszieren kann. In den meisten Fällen ist das Bleichen ein unerwünschter Nebeneffekt einer zu hohen oder langen Anregung. In manchen Fällen kann es aber auch genutzt werden, um bestimmte Signale zu entfernen.

In allen Zellen gibt es autofluoreszente Stoffe, die bei der Betrachtung im Mikroskop und entsprechender Anregung durch einen Laser zu einem diffusen Signal führen. Die prominentesten Vertreter sind NADH und FADH, die beide in vor allem metabolitischen aber auch anderen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Während NADH am Rand des optischen Spektrums im Violetten emittiert, liegt die Emission des FADHs im gelbem Spektralbereich, der oft für Fluoreszenzmikroskopie verwendet wird. Viele Zellen enthalten große Mengen von diesen und ähnlichen Stoffen, daher entsteht bei jeder Messung eine Hintergrundstrahlung, die sich mit den Messsignalen überlagert.

1961 fand Osamu Shimomura ein Protein, das ohne künstliche Modifikation Fluoreszenz aufweist. Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) wurde in der Qualle Aequorea Victoria entdeckt. Es hat zwei Absorptionsmaxima bei 395 nm und 475 nm und die Emission liegt bei 509 nm. GFP besteht aus 238 Aminosäuren und hat eine Masse von 26,9 kDa. In Abbildung 4 ist die Struktur von GFP dargestellt. Nach seiner Entdeckung wurde viel damit experimentiert, mit dem Erfolg, dass verbesserte Versionen entstanden, teilweise dann auch in anderen Farben.

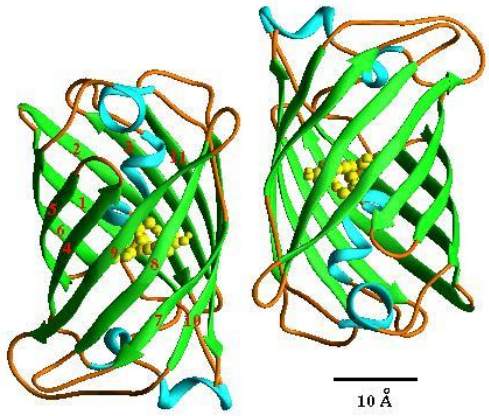

Abbildung 4 Struktur von GFP: Die grünen Linien bilden ein Fassähnliches Gebilde in dessen Mitte sich der fluoreszierende Teil befindet.

In den letzten Jahrzehnten ist viel in die Entwicklung neuer Farbstoffe investiert worden. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Werte einiger typischer Fluorophore aufgelistet. Es gibt aber hunderte andere Farbstoffe, die das komplette sichtbare Spektrum abdecken.

Name	Absorptions maximum in nm	Emissions maximum in nm	Quanten ausbeute. in %	Extinktions koeffizient. in $M^{-1}cm^{-1}$
GFP [3]	389/475	508	0,79	25000
Fluorescein [4]	490	513	0,92	88000
ATTO 532[5]	532	553	0,90	115000
Rhodamin 123 [6]	505	525	0,90[7]	85200[7]
Alexa 546 [8]	556	573	0,79	104000
mCherry [9]	587	610	0,22	72000
DiD [10]	650	670	≈0,35 [11]	247000

Tabelle 1 Eine Auflistung einiger typischer Fluorophore

1.1.1. Rhodamin 123

Die Anwendungsgebiete der Fluorophore unterscheiden sich stark je nach Eigenschaften der Farbstoffe. Zum Beispiel ist DiD lipophil und kann daher als Membran-

marker eingesetzt werden. Um zytosolische Proteine zu markieren, sollte man auf hydrophile Farbstoffe zurückgreifen, wie zum Beispiel GFP.

In unserem Projekt haben wir uns für Rhodamin 123 entschieden, da es die sehr spezielle Voraussetzung erfüllt, ein Substrat von MDR 1 zu sein. Es ist das einzige bekannte Fluorophor, das an den Transporter bindet. Diese Tatsache hat das Projekt erst möglich gemacht, da auch kein anderes Substrat bekannt ist, das transportiert werden kann, wenn ein zusätzlicher Fluorophor daran gebunden ist.

Unter physiologischen Bedingungen sammelt sich Rhodamin 123 in den Membranen der Mitochondrien. Obwohl es zwar prinzipiell wasserlöslich ist, kann es an Lipidmembranen binden. Die Bindung an die Membran hängt stark von dem Transmembranpotential ab. Unter Laborbedingungen können mehr als 60 % des Rhodamins 123 in der Zelle an Membranen binden. [12][13] Die Tatsache, dass sich Rhodamin 123 in einem Bilayer aufhalten kann, ist damit gekoppelt, dass es von MDR 1 transportiert wird. Nicht nur das Verhältnis zwischen freien und in der Membran gebundenen Rhodamin-Molekülen, sondern auch deren Verweildauer haben einen Einfluss auf die Bindungswahrscheinlichkeit. Wie lange sich Rhodamin 123 im Mittel in einem Bilayer aufhält ist bis jetzt allerdings noch nicht näher untersucht worden.

1.2. Optische Auflösung

Die erzielte Auflösung eines Mikroskops hängt von der gewählten Wellenlänge und der numerischen Apertur des Objektivs ab und liegt im optischen Spektralbereich bei höchstens 300 nm. Zur Berechnung wird das Rayleighkriterium

$$A = 1{,}22\,\frac{\lambda}{NA} \tag{2}$$

verwendet, das die Auflösung (A), die Wellenlänge (λ) und die numerische Apertur (NA) des Mikroskops verknüpft. Ist der Abstand zweier benachbarter Fluorophore geringer als die minimale Auflösung, können sie nicht mehr separat wahrgenommen werden.

Eine Möglichkeit, die Auflösung zu verbessern, ist auf kürzere Wellenlängen auszuweichen. Allerdings stehen im UV und darunter kaum mehr geeignete Spiegel und

Linsen zur Verfügung, weshalb sich die meisten Forscher auf das sichtbare Spektrum beschränken.

Die numerische Apertur wird durch den Versuchsaufbau festgelegt. Im Fall der Mikroskopie an lebenden Zellen ist es durchaus üblich Objektive mit hohen numerischen Aperturen, die in etwa bei 1,46 liegen, zu verwenden. Dabei handelt es sich um Öl-Immersion-Objektive, bei denen der Abstand zwischen Glasplättchen und Objektiv mit einem Immersionsöl überbrückt wird, das einen ähnlichen Brechungsindex aufweist wie Glas, um bis zur Probe einen einheitlichen Brechungsindex zu halten. Für wässrige Proben muss man etwas genauer differenzieren, woher das Signal kommt, um eine genaue Aussage über die NA treffen zu können. Da Signale, die aus der Probe stammen, an der Grenzfläche zwischen Wasser und Glas zum Lot gebrochen werden, liegt das Limit der zur Messung verwendbaren numerischen Apertur bei 1,33. Hohe NA kann aber dafür verwendet werden, Licht unter einem sehr hohen Winkel auf die Probe zu lenken. Ist der Wert der NA hoch genug, kann man so einen Winkel erreichen, unter dem Totalreflexion möglich ist.

1.3. Totalreflexion Fluoreszenz Mikroskopie (TIRF)

Eine wichtige Möglichkeit die Hintergrundfluoreszenz einer Probe zu minimieren heißt TIRF. Dabei macht man sich den Effekt der Totalreflexion zu Nutze, um nur jenen Teil auszuleuchten, der von Interesse ist. Das geht nur für oberflächennahe Objekte, so wie es auch die Zellmembran ist.

Obwohl bei der Totalreflexion normalerweise keine Energie in das optisch dünnere Medium transportiert wird, gibt es ein exponentiell abklingendes Feld auf der sonst dunklen Seite der reflektierenden Schicht, mit dem Fluorophore angeregt werden können. [14] Für Licht im optischen Spektrum und einer Grenzschicht zwischen Glas und Wasser ergibt das in etwa eine Eindringtiefe von 100 nm. Fluoreszente Stoffe, die weiter weg liegen, werden somit nicht mehr angeregt und dadurch die Hintergrundstrahlung gesenkt.

Direkt an der Grenzfläche kommt es aufgrund der Totalreflexion zu einer Intensitätserhöhung, wodurch Signale direkt an der Grenzfläche deutlich heller werden. Somit wird das Signal-zu-Hintergrund Verhältnis noch einmal verstärkt.

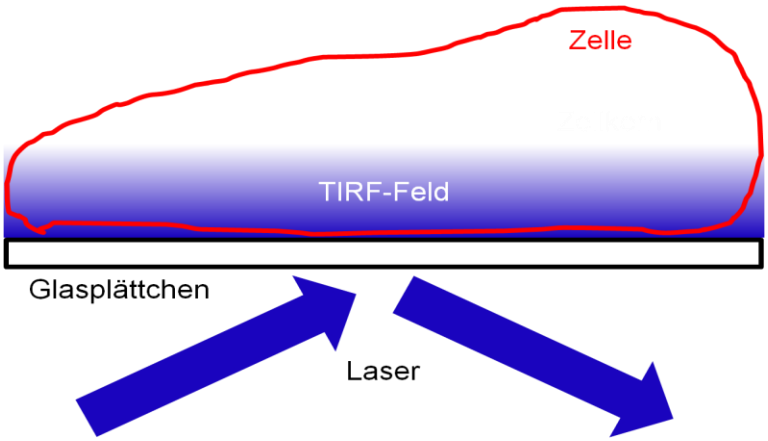

Abbildung 5 TIRF-Feld: Der Laser trifft unter einem großen Winkel auf die Probe und wird an der Grenzfläche zwischen Glasplättchen und Zelle total reflektiert. Dadurch entsteht ein evaneszentes Feld, das etwa 100 nm in die Probe eindringt.

Für die experimentelle Umsetzung verwendet man Immersionsöl mit einem ähnlichen Brechungsindex wie Glas um den Anregungslaser nach dem Objektiv ohne Brechung zum Objektträger zu leiten, der auch aus Glas ist. Die Zellen befinden sich in einer wässrigen Lösung, die einen Brechungsindex von 1,33 hat. Das bedeutet, dass die Grenzfläche, bei der es zur Totalreflexion kommt, zwischen Glasplättchen und Puffermedium ist.

Um die Justierung möglichst einfach zu halten, werden sowohl der Laser als auch das Objektiv mit der optischen Achse der Abbildungseinrichtung überlagert. Der Laser geht dann gerade und mittig durch das Objektiv und trifft die Probe mittig und ist der Fokalebene fokussiert. Für TIRF wird der Laser parallel zur optischen Achse verschoben. Das ändert den Winkel unter dem der Laser den Fokus trifft, nicht aber seine Position in der Fokalebene. Um den Winkel zu erlangen, der zu einer Totalreflexion führt, ist eine hohe numerische Apertur des Objektivs notwendig.

TIRF ist eine Modifikation der Anregungsmethode und ist daher mit allen anderen Methoden kombinierbar, die auf Eigenschaften der Fluorophore, Kamera oder Auswertungstechnik beruhen.

1.4. Hochauflösende Fluoreszenz Mikroskopie

Ein möglicher Weg, um dem Problem der begrenzten Auflösung aus dem Weg zu gehen, ist jeweils nur einzelne, gut separierte Fluorophore zu messen. Es gibt viele

hochauflösende Techniken, die sich das zu Nutze machen und die Anzahl an gleichzeitig in einem kleinen Gebiet aktiven Fluorophore minimieren.

Solange nur das Signal eines Fluoreszenzmoleküls auf den Detektor kommt, hat dieses die Form einer Airy-Scheibe (Abbildung 6), die einen Peak in der Mitte aufweist und dann von konzentrischen Ringen umgeben ist.

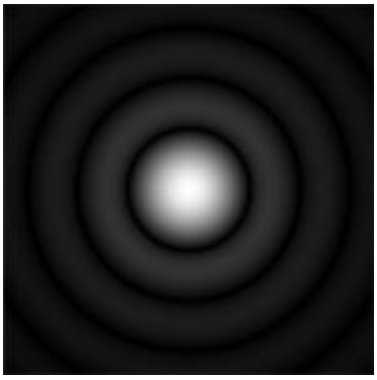

Abbildung 6 Airy-Scheibe: Der zentrale Kreis entspricht näherungsweise einer Gaußverteilung, die konzentrischen Ringe können meist vernachlässigt werden.

Der Hauptpeak lässt sich gut durch eine Gaußverteilung fitten. Daraus lässt sich dann die Position des Fluorophores sehr präzise berechnen: man kommt auf Lokalisationsgenauigkeiten von etwa 10 nm.

Diese Positionsgenauigkeit gilt für die Farbstoffmoleküle an sich. Da die Fluorophore meistens mit Hilfe von Linkern an die zu untersuchenden Proteine gehängt werden, ist die Positionsgenauigkeit des Proteins selber weniger präzise. Je länger das Verbindungsstück zwischen dem Fluorophor und dem Protein ist, desto ungenauer kann auf dessen Position geschlossen werden. Bei sehr großen Molekülen liegt der Fluorophor meistens weit außerhalb des Schwerpunkts. Da die üblichen Fluoreszenzmethoden keine Aussage über die räumliche Orientierung treffen können, beziehungsweise auch die Orientierung zwischen Fluorophor und Protein sich ändern kann, wird die Messgenauigkeit noch einmal um den Abstand zwischen Schwerpunkt des Moleküls und dem Fluorophor verschlechtert. Das kann besonders bei langen Proteinen zu Problemen führen.

Der oben genannte Wert gilt nur für sehr helle Signale – also viele Photonen, die auf den Detektor gelangen – da dann der Fitfehler sehr klein ist. Signale, die aus leben-

den Zellen kommen, sind schwächer als die von Fluorophoren die direkt am Glas liegen, da die Grenzfläche zwischen Wasser und Glas zu einer positiven Interferenz des Emissionslichts mit sich selbst führt.[15] Außerdem gibt es immer ein Mindestmaß an Bewegung im Inneren der Zelle – auch in fixierten – so dass es zu einem leicht verschmierten Signal kommen kann. Diese beiden Einschränkungen führen dazu, dass der Fit schlechter ist und somit die Positionsungenauigkeit weiter steigt.

1.4.1. Stochastische Optische Rekonstruktionmikroskopie (STORM) und Photoaktivierungs Lokalisations Mikroskopie (PALM)

Bei STORM benutzt man photoschaltbare und bei PALM photoaktivierbare Fluorophore. Das sind Farbstoffe die erst mithilfe eines Aktivierungslasers aus einem nicht anregbaren Zustand gehoben werden. Das bedeutet, dass sie vor der Aktivierung nicht mit dem Anregungslaser wechselwirken. Danach verhalten sie sich wie normale Fluorophore.

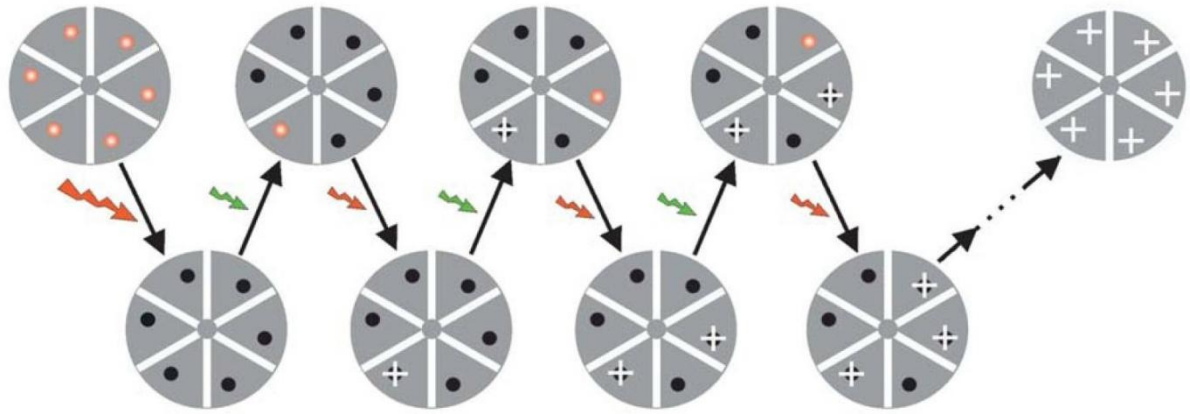

Abbildung 7 Messablauf bei STORM:[16] Zuerst werden alle Farbstoffe deaktiviert. Danach werden die vorhandenen Fluorophore zu einem kleinen Teil durch einen Aktivierungslaser in einen fluoreszenten Zustand gebracht. Dann werden sie gemessen und geblichen. Den Prozess – Aktivieren, Belichten, Bleichen – wiederholt man, bis die meisten vorhandenen Farbstoffe gemessen wurden.

Beim Messen verwendet man einen Aktivierungspuls, um einen kleinen Teil der Fluorophore zu aktivieren. Danach nimmt man ein Bild mit einer Belichtungszeit von einigen zehn Millisekunden und hoher Anregungsintensität auf. Das führt einerseits zu guten Signalen und andererseits bleicht es alle aktiven Farbstoffe nach wenigen Beobachtungen. Das Bleichen dient einerseits dazu die Dichte der aktiven Fluorophore gering zu halten und andererseits hilft es Doppelzählungen zu vermeiden, die die

Zählstatistik stören würden. Diesen Prozess wiederholt man, bis alle vorhanden Fluorophore zumindest einmal aktiviert wurden.

Durch das kontinuierliche Bleichen und die Tatsache, dass immer nur wenige Farbstoffe gleichzeitig aktiviert werden, überlagern sich auf einem Bild die einzelnen Signale nicht. Deshalb kann man, wie oben erwähnt, an jedes Signal einen einzelnen Fit legen, um die Position zu bestimmen. In Abbildung 7 ist dieser Prozess dargestellt.

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass es sehr lange dauert um ein hochaufgelöstes Bild zu erstellen, da es sich aus vielen einzelnen Messungen zusammensetzt. Das bedeutet, dass nur fixierte Proben gemessen werden können, da sonst ein verschwommenes Bild entsteht.

1.4.2. Thinning Out Clusters while Conserving Stoichiometry of Labeling (TOCCSL)

TOCCSL ist darauf ausgelegt Clustergrößen in der Zellmembran zu bestimmen. Um die Anzahl an Signalen zu reduzieren, werden zu Beginn der Messung alle Signale in einem bestimmten Gebiet gebleicht, indem man die Probe mit einem sehr intensiven Bleichpuls über eine Blende belichtet. Jeder Cluster, der sich in diesem Gebiet befindet, wird vollständig gebleicht.

Nach einer kurzen Wartezeit, der Recovery Time, die von der Diffusionsgeschwindigkeit der zu untersuchenden Cluster abhängt, kommen vom Rand des geblichenen Areals einige wenige Cluster zurück. Die Wartezeit kann von einigen zig Millisekunden bis hin zu einigen Sekunden eingestellt werden. Diese Cluster waren außerhalb des gebleichten Bereiches, tragen also die unveränderte Menge an aktiven Fluoreszenzmolekülen. Je länger man wartet, desto vollständiger wird der gebleichte Bereich mit neuen Fluorophoren gefüllt. Nach etwa zehn bis zwanzig Sekunden ist die Fläche wieder vollständig bedeckt.

Solange die Dichte der in die Bleichfläche diffundierenden Signale gering ist, misst man also einzelne Cluster. Führt man danach eine Helligkeitsanalyse der einzelnen Signale durch, erkennt man eine Intensitätsverteilung, an die man mit Hilfe der Intensitätsverteilung eines einzelnen Fluorophores einen Fit legen kann. Daraus ergeben

sich dann die Häufigkeiten für Mono-, Di-, und weitere Multimere, die der Verteilung der Clustergrößen entspricht.

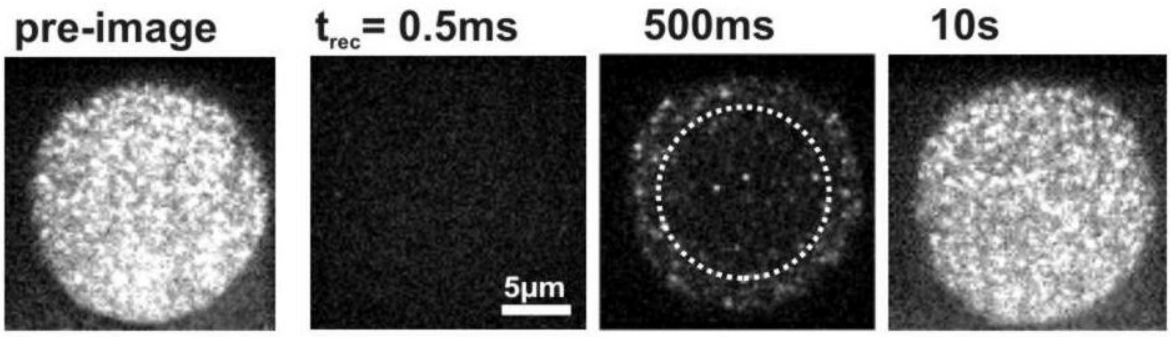

Abbildung 8 Messablauf eines TOCCSL Experiments: Mit mehreren FITC-Molekülen markierte Anti-DNP Antikörper wurden verwendet, um stabile Cluster zu imitieren. Eine fluide Lipidmembran mit geringer Menge and DNP-Lipid wurde auf einem Glasplättchen aufgezogen. Ganz links ist die Ausgangssituation abgebildet: Die Konzentration von FITC-Antikörper ist so hoch, dass einzelne Moleküle nicht beobachtet werden können. Nach dem Bleichpuls sind alle Moleküle verschwunden. Nach weiteren 500ms erscheinen vom Rand her einzelne FITC Antikörper Moleküle, mit einigen wenigen, die bereits ins Zentrum des gebleichten Areals vorgedrungen sind. In diesem Bild kann eine einzelmolekulare Clusteranalyse durchgeführt werden. Nach weiteren 10s ist der Gleichgewichtszustand wieder erreicht.[17]

1.5. Einzel Molekül Partikel Tracking

In lebenden Zellen gibt es kaum statische Situationen. Es bewegen sich immer Proteine durch das Zellplasma oder Lipide durch die Membran. Ist man in der Lage, nicht nur Bilder – sondern auch Videos – aufzunehmen, kann man aus der Bewegung der einzelnen Moleküle viele neue Informationen gewinnen wie zum Beispiel Diffusionskonstanten, Bindungsraten, Transportpfade und vieles mehr.

Es gibt zwei Arten der Fortbewegung in der Zelle. Die eine ist eine gerichtete Bewegung, die meistens durch Proteine vermittelt wird und Energie verbraucht. So ein Beispiel wäre der Transport von Rhodamin 123 über die Zellmembran, welcher durch MDR 1 vermittelt wird. Die andere Variante ist Diffusion.

1.5.1. Diffusion

Diffusion ist ein stochastischer Prozess, der die Bewegung eines Teilchens durch Stöße mit vielen anderen Teilchen beschreibt. Dennoch folgt der Mittelwert gewissen Gesetzmäßigkeiten und es ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Zeit (t) und der mittleren quadratischen Auslenkung ($\langle x^2 \rangle$) des Teilchens,

$$\langle x^2 \rangle = 2nDt \tag{3}$$

Der Proportionalitätsfaktor besteht aus der Diffusionskonstante (D) und Dimension (n). Die Dimension hängt von der Geometrie des Problems ab und kann normalerweise sehr einfach bestimmt werden. Dadurch bleibt als einziger Parameter, um die Diffusion eindeutig zu charakterisieren, die Diffusionskonstante.

Im Zytoplasma gibt es aber viele Objekte, die eine normale Diffusionsbewegung verhindern. Große sperrige Proteine können zu Beispiel durch das Zytoskelett so behindert werden, dass sie nur noch in einem kleinen Bereich diffundieren können. In diesem Fall entsteht begrenzte Diffusion, die daran zu erkennen ist, dass die mittlere quadratische Auslenkung nicht linear mit der Beobachtungszeit steigt, sondern sich an einen Grenzwert annähert, der der Begrenzungsgröße entspricht.[18]

Eine andere Möglichkeit stellt die anomale Diffusion dar. Dabei wird anstatt des linearen Zusammenhangs zwischen Diffusionskonstante und Zeit ein Potenzgesetz verwendet, das einen weiteren Parameter α einführt.

$$\langle x^2 \rangle = 2nDt^{\alpha} \tag{4}$$

Für $\alpha < 1$ spricht man von Subdiffusion, für $\alpha = 1$ von normaler Diffusion und im Falle von $\alpha > 1$ von Superdiffusion. Subdiffusion kann zum Beispiel auftreten, wenn dichte Konglomerate aus Proteinen in der Zelle vorkommen, die die Diffusion für andere verlangsamen.[19] Gerichtete Bewegungen sind in die Kategorie Superdiffusion einzuordnen.

In Abbildung 9 sind drei unterschiedlichen Arten der Diffusion graphisch dargestellt.

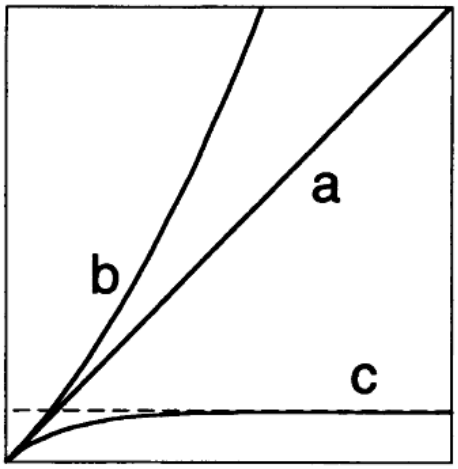

Abbildung 9 Theoretische Kurven für unterschiedliche Diffusionsverhalten: Auf der x-Achse ist die Zeit aufgetragen und auf der y-Achse die mittlere quadratische Auslenkung. a zeigt normale Diffusion, b eine gerichtete Diffusion beziehungsweise Superdiffusion und c eine begrenzte Diffusion.[18]

Um eine Bewegung experimentell zu charakterisieren muss man ein Signal mehrmals hintereinander aufnehmen und bestimmen, wie weit sich das Signal in der Zeit zwischen den Bildern bewegt hat. Durch die Verknüpfung der unterschiedlichen Positionen eines Signals in aufeinanderfolgenden Bildern erhält man Trajektorien. Da es sich bei der Diffusion um einen stochastischen Prozess handelt, können wir nur über Mittelwerte gültige Aussagen treffen. Daher ist es wichtig, genügend Bilder aufzunehmen, um den Fehler zu minimieren. Hat man eine genügend große Anzahl an Trajektorien gemessen, kann man zum Beispiel die Diffusionskonstante mit (3) berechnen.

Bei Messungen kommt es immer zu Ungenauigkeiten bei der Positionsbestimmung der einzelnen Signale. Bei einer Diffusionsanalyse wirkt sich das durch eine Parallelverschiebung der Fitgerade nach oben aus. Der neue Schnittpunkt mit der y-Achse entspricht dann genau der Positionsgenauigkeit. Man muss daher (3) um einen weiteren Term ergänzen und erhält

$$\langle x^2 \rangle = 2nDt + PA^2, \tag{5}$$

wobei PA der Positionsgenauigkeit entspricht.[20]

Wenn mehrere unterschiedlich schnell diffundierende Fraktionen in einer Probe sind, ist es nicht möglich aus den Mean-Squared-Displacement-Werten (MSD) der Trajek-

torien eine Unterscheidung zu treffen. Um das Problem zu lösen kann man den Diffusionsprozess mit Hilfe des zweiten Fick'schen Gesetzes

$$\frac{d}{dt}p(r,t) = D \cdot \Delta p(r,t) \tag{6}$$

als Differentialgleichung definieren, wobei $p(r,t)$ die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Teilchens am Ort r und zur Zeit t ist und Δ der Laplaceoperator ist. Die Lösung ist eine Exponentialfunktion, die durch Integration in eine Wahrscheinlichkeitsverteilung für die einzelnen Trajektorienschritte gebracht werden kann.[21] Diese Variante wird auch im Kapitel C.4 eingesetzt um Abbildung 29 zu erhalten.

1.5.2. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

FRAP bietet eine weitere Möglichkeit um die Mobilität von Molekülen zu bestimmen. FRAP funktioniert in seinen Grundzügen ähnlich wie das oben beschriebene TOCCSL. Der Unterschied ist, dass FRAP keine Recovery Time hat, sondern gleich nach dem Bleichen mit der Messung begonnen wird. In jedem Bild werden die Signale, die von außen in das gebleichte Areal zurückkommen, aufsummiert und somit die Gesamtintensität bestimmt. So wie bei TOCCSL ist nach einigen Sekunden die Fläche wieder vollständig mit aktiven Farbstoffen gefüllt. Aus einem Vergleich dieser Intensitäten mit der entsprechenden Intensität im Bild vor dem Bleichen kann man Rückschlüsse auf die Mobilität ziehen. Je mobiler die Signale sind, desto eher können sie in das Beobachtungsfeld zurückkehren.

In Abbildung 10 ist eine typische Intensitätskurve abgebildet. Am Anfang ist der Bleichpuls klar zu erkennen, gleich danach fängt ein exponentieller Anstieg der Kurve an, der unter idealen Bedingungen wieder bis zum Ausgangswert zurückführt, sofern die Probe auch eine 100 % Mobilität aufweist. Handelt es sich um heterogene Proben, können die unterschiedlichen Fraktionen mit Hilfe von Fittingalgorithmen aufgespalten werden.

So wie bei allen Messungen, die sich über einen längeren Zeitraum erstrecken, muss das Bleichen von zurückdiffundierenden Signalen berücksichtigt werden, das dazu führt, dass die Gesamtintensität nicht mehr den Ausgangswert erreicht. Die Intensitätskurve nähert sich dann einem Wert an, der unter dem erstem Wert liegt. Densel-

ben Effekt hat auch eine nicht mobile Fraktion in der Probe. Es empfiehlt sich daher, möglichst kurze Belichtungszeiten zu verwenden.

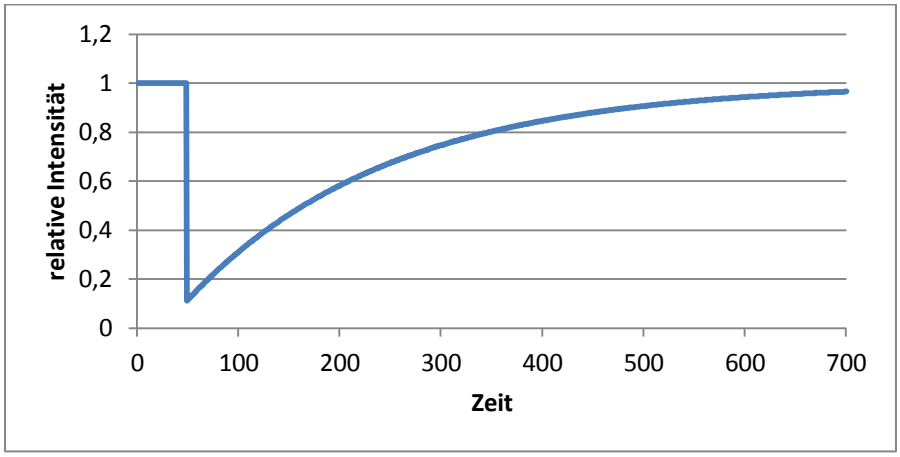

Abbildung 10 Intensitätskurve bei einer FRAP-Messung: Die Kurve zeigt den ungefähren Verlauf der Intensität bei einem FRAP-Experiment.

1.6. Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)

Wenn zwei Fluorophore einander nahe genug kommen, kann zwischen diesen eine Dipolkopplung entstehen. Das bedeutet, dass einer der Fluorophore die Energie direkt an den anderen überträgt, anstatt sie als Photon zu emittieren. Danach erst wird die Energie vom anderen Farbstoff in einem strahlenden Abregungsprozess abgegeben.

Damit dieser Effekt zu Stande kommt, müssen drei Kriterien erfüllt sein:

1. Der spektrale Emissionsbereich des zuerst angeregten Fluorophors (Donor) muss sich mit dem Absorptionsbereich des zweiten (Akzeptor) überschneiden.
2. Der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen darf nicht zu groß sein, da die Effizienz für den Energieübertrag stark davon abhängt.
3. Die relative Ausrichtung der beiden Dipole darf nicht orthogonal sein.

Eine wichtige Größe für diesen Prozess ist der Försterradius (R_0), der sich mit Hilfe der grundlegenden Eigenschaften der zwei Farbstoffe berechnen lässt. Dieser gibt den Abstand an, bei dem die Effizienz (E) des Energieübertrags bei 50 % liegt. Außerdem ist der Effizienzverlauf mit wachsendem Abstand (r) voneinander durch den Försterradius festgelegt mit

$$E = \frac{1}{1+\left(\frac{r}{R_0}\right)^6}. \quad (7)$$

Diese Funktion ist in Abbildung 11 dargestellt. Es gibt zwei Bereiche, die zum Messen verwendet werden können und unterschiedliche Vor- und Nachteile haben. Solange sich die Fluorophore nahe bei einander befinden, also bis hin zu einem Abstand von fast dem halben Försterradius, ist die Effizienz fast eins und die Intensität der Messsignale wird sehr hoch sein. Dafür kann keine Aussage mehr über den genauen Abstand getroffen werden, da die Kurve zu flach ist. Im Bereich zwischen dem halben und dem eineinhalbfachen Försterradius nimmt die Intensität zwar rasch ab, dafür ist das System sehr sensitiv auf kleine Abstandsänderungen.

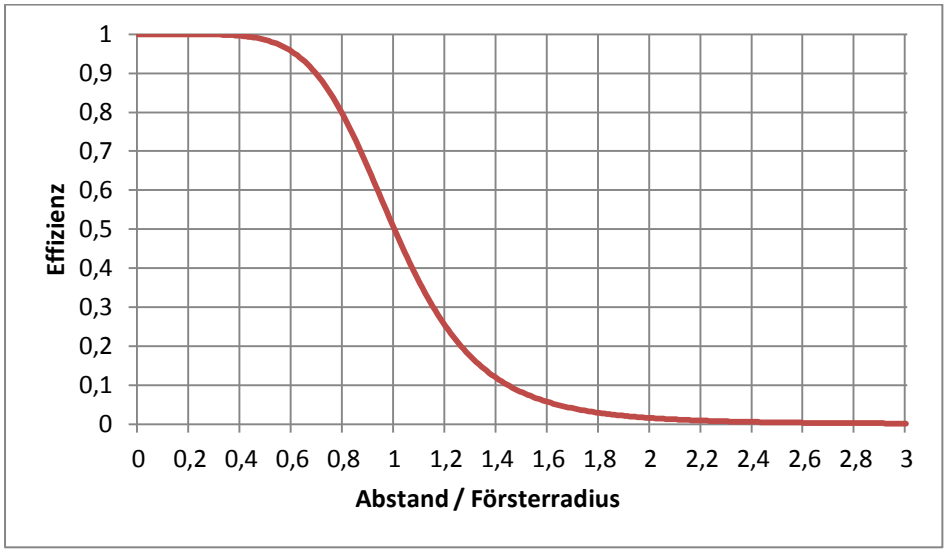

Abbildung 11 Effizienz des Energieübertrags in Abhängigkeit des Abstandes: An der Stelle, an der die Effizienz 50 % beträgt, befindet sich der Försterradius.

1.6.1. Berechnung des Försterradius

Die Eigenschaften der Fluorophore, die eine Rolle spielen, sind die Quantenausbeute des Donors (Q_D), der das Verhältnis zwischen emittierten und absorbierten Photonen angibt, und der Extinktionskoeffizient des Akzeptors (ϵ_A), der die Absorptionswahrscheinlichkeit bei einer bestimmten Wellenlänge beschreibt.

Um die Überschneidung im Spektralbereich (Wellenlänge (λ)) zu berechnen, wird das Produkt des normierten Emissionsspektrums des Donors ($f_D(\lambda)$) und des Ab-

sorptionsspektrums des Akzeptors ($\epsilon_A(\lambda)$) im relevanten Wellenlängenbereich integriert. Im Letzteren ist bereits der Extinktionskoeffizient multiplikativ enthalten.

Die Orientierung geht mit dem Faktor (κ) in die Gleichung ein. Dabei werden alle Winkel vom einfallenden Photon über die räumliche Orientierung der Farbstoffe bis hin zum abgegebenen Photon berücksichtigt. Da die Farbstoffe, die mittels Linker an ein Protein geheftet werden meistens sehr schnell rotieren beziehungsweise keine genauen Informationen über die Orientierung vorliegen, wird in der Biologie häufig der Mittelwert für κ verwendet. Die Mittelung über alle möglichen Winkel ergibt ein Wert von $\kappa = \frac{2}{3}$.[22]

Damit ergibt sich mit der Avogadrokonstante (N_A) und dem Brechungsindex in der Probe (n) der Försterradius zu

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000 \ln(10)\, \kappa^2 Q_D}{128\, \pi^5\, N_A\, n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda)\, \varepsilon_A(\lambda)\, \lambda^4\, d\lambda}. \quad (8)$$

Für typische Fluorophore ergibt das eine Größenordnung von einigen Nanometern. Für Rhodamin 123 und mCherry liegt der Försterradius bei 6,11 nm. Andere typische Försterradien sind in Tabelle 2 enthalten.

Donor	**Akzeptor**	**Försterradius in nm**
Tryptophan	Dansyl	2,1
BFP	DsRFP	3,1 – 3,3
CFP	GFP	4,7 – 4,9
GFP	YFP	5,5 – 5,7
Rhodamin 123	mCherry	6,11
Cy5	Cy5.5	>8,0

Tabelle 2 Einige typische Donor- und Akzeptorpaare und ihre Försterradien.[23]

1.6.2. Methoden zur FRET-Bestimmung

Es haben sich in den letzten Jahren verschiedene Methoden durchgesetzt, um FRET im Ensemble oder auf einzelnen Molekülen qualitativ oder quantitativ zu

bestimmen. [24] Im Folgenden beschreibe ich eine kurze Auswahl davon, die für meine Experimente relevant war:

Akzeptor-Photobleaching: Diese Methode kann mittels Bulkmessung in Epifluoreszenzmikroskopie gemessen werden, oder auch auf Einzelmolekülebene. Das Donorsignal (I_{pre}) wird gemessen, dann der Akzeptor gebleicht und unmittelbar danach wieder der Donor (I_{post}) gemessen. Wenn die beiden Farbstoffe einander nahe genug sind, führt das Bleichen der Akzeptoren zu einer Erhöhung im Donorsignal, weil keine Energie mehr an die Akzeptoren abgegeben werden kann. Sind sie zu weit voneinander entfernt, wird sich das Donorsignal nicht ändern, da der Bleichpuls nur mit den Akzeptoren wechselwirkt. Diese Methode misst direkt die FRET-Effizienz über

$$E = \frac{I_{post} - I_{pre}}{I_{post}}. \tag{9}$$

Einzelmolekül-Messung: Durch Beobachtung eines Fluorophorpaars über einen längeren Zeitraum, kann man aufgrund der Intensitätsänderung im Messsignal feststellen, wie nahe zu einander sich die beiden befinden. Sind die beiden weit voneinander entfernt wird das Donorsignal hoch und das Akzeptorsignal sehr schwach oder nicht vorhanden sein. Kommen sich die beiden sehr nahe wird sich das Intensitätsverhältnis umkehren. Aufgrund der genau durch den Försterradius festgelegten Effizienzkurve, lassen sich aus diesen Intensitäten sehr präzise die Abstände bestimmen. [25] Darüber hinaus kann man damit Kinetiken in der Konformationsänderung bestimmen – wie bei Taekjip et al. [26].

Sensitized Emission: [27] Dafür erstellt man zwei Referenzproben, wobei eine nur den Donor und die andere nur den Akzeptor enthält. Die eigentliche Probe ist mit beiden Fluorophoren ausgestattet. Wenn man die Probe mit dem Anregungslaser des Donors bestrahlt und die Emission des Akzeptors misst, erhält man in erster Linie das gewünschte FRET-Signal, aber es gibt auch zwei Verunreinigungen. Eine ist die Kreuzanregung des Akzeptors durch den Anregungslaser. Das heißt, dass auch ohne FRET einige Akzeptormoleküle angeregt werden und fluoreszieren. Dadurch wird das FRET-Signal fälschlicher Weise vermehrt. Die andere Störquelle ist die strahlende Emission des Donors, die spektral nicht zu 100 % aus dem Akzeptorkanal geblendet werden kann. Auch diese Signale erhöhen das gemessene FRET-Signal.

Mit Hilfe der beiden oben erwähnten reinen Proben, können diese Signale allerdings sehr genau bestimmt werden und somit wird es möglich auf das echte Signal rückzuschließen, indem man für diese Fehler korrigiert.

2. Lipid Bilayer

Lipide sind eine große Gruppe an Molekülen, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen, aber nicht wasserlöslich sind. Einige wichtige Vertreter in der Biologie sind Phospholipide, Shingolipide, Sterole, Mono-, Di-, und Triglyceride, Glycolipide sowie Fettsäuren. Die meisten von ihnen haben einen hydrophilen und einen lipophilen Anteil. In wässrigen Lösungsmitteln ist es daher energetisch am günstigsten, einen Bilayer zu bilden, in der die hydrophilen Teile nach außen zeigen und somit in der Mitte eine lipophile Umgebung entsteht. In fettigen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Öl, verhält es sich genau anders herum. Ein typischer Bilayer, wie er als Plasmamembran vorliegt ist in Abbildung 12 dargestellt.

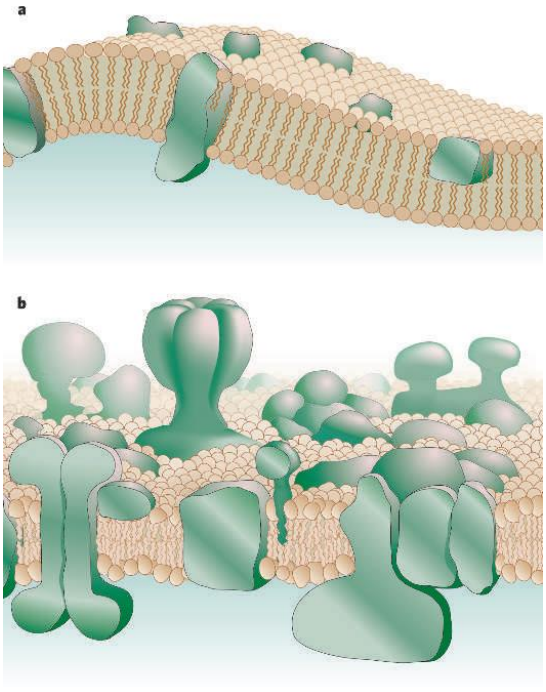

Abbildung 12 Plasmamembran: a und b zeigen Plasmamembranen mit unterschiedlich vielen eingelagerten Proteinen. Die Lipide sind in beige und die Proteine in grün eingezeichnet. [28]

Die häufigsten Bausteine der biologischen Bilayer sind Phospholipide. Sie haben ein Glycerin als Grundbaustein und jeweils eine Kopfgruppe und zwei Fettsäuren, die

daran binden. Die Kopfgruppen unterscheiden sich in vielen Eigenschaften, wie Größe, pH-Wert, Ladung, Polarität und bestimmen somit auch das Verhalten der Lipide mit. Die Fettsäuren sind langkettige Kohlenwasserstoffe und unterscheiden sich daher in der Anzahl an Kohlenstoffatomen und der Menge an Doppelbindungen zwischen diesen. In Abbildung 13 sieht man ein die Struktur eines DOPC (1, 2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholine) Moleküls.

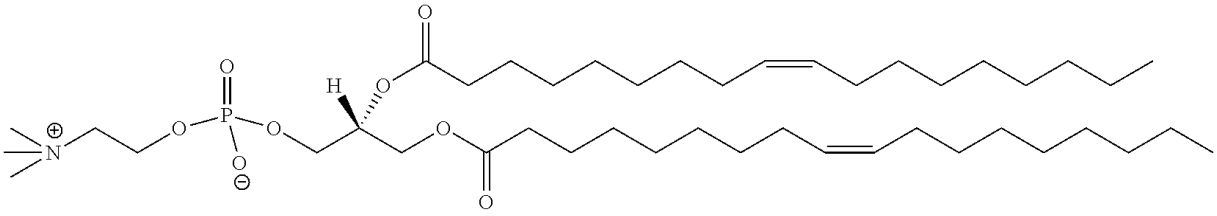

Abbildung 13 Struktur von DOPC: Die zwei langkettigen Fettsäuren auf der rechten Seite sind beides Dioleoylsäuren und auf der linken Seite ist die Cholinekopfgruppe.

Eine wichtige Charakteristik eines Bilayers ist seine Viskosität. Diese hängt stark von der Temperatur und der molekularen Zusammensetzung ab. Bei niedrigen Temperaturen sind die einzelnen Lipide geordnet und dicht gepackt, daher ist der Bilayer auch steif. Bei steigender Temperatur nimmt die kinetische Energie zu und die Schwanzgruppen brauchen, mehr Platz um sich bewegen zu können. Dadurch ist mehr Platz vorhanden um durch den Bilayer zu diffundieren und die Viskosität sinkt.

Bei der Zusammensetzung der Lipide ist vor allem der Sättigungsgrad der Fettsäuren wichtig. Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen können durch Einzelbindungen und ein Wasserstoffatom ersetzt werden. Je weniger Doppelbindungen vorhanden sind, desto höher ist der Sättigungsgrad. Bei vollständig gesättigten Lipiden sind die Schwanzgruppen gerade und lassen eine örtliche Ordnung leicht zu. Bilayer aus solchen Lipiden sind daher sehr viskos. Für jede hinzukommende Doppelbindung bildet sich ein Knick in den Fettsäuren aus, der eine geordnete Ausrichtung schwerer macht. Bei konstanter Temperatur und sinkendem Sättigungsgrad wird der Bilayer viskoser.

Bilayer können künstlich hergestellt werden. In diesem Fall bestehen sie aus einer genau definierten Zusammensetzung an Lipiden. In den meisten Fällen beschränkt man sich auf eine oder zwei Lipidsorten, um das System möglichst einfach zu halten. Diese Bilayer eignen sich gut als Modellsysteme, da die Anzahl an freien Parametern

überschaubar bleibt. In Zellmembranen sind Hunderte bis Tausende verschiedene Lipide vorhanden, deren genaue Zusammensetzung nicht genau bekannt ist.

Unter physiologischen Bedingungen herrschen im Bilayer hohe Drücke von bis zu circa 1 kbar.[29] Diese entstehen hauptsächlich durch die Oberflächenspannung, die die Wechselwirkungen zwischen der hydrophilen Umgebung und den hydrophoben Teilen der Lipide minimiert. Dadurch und durch die lipophile Umgebung in der Mitte des Bilayers ist es sehr schwierig für hydrophile Substanzen die Membran zu durchqueren.

Um zum Beispiel Wasser in eine Zelle aufnehmen zu können, müssen geeignete Verbindungen zwischen dem Zellinneren und der Umgebung hergestellt werden. Dazu werden spezielle Proteine in die Membran eingelagert, die einen Tunnel bilden, durch den Diffusion möglich ist. Sie gehören zu der Gruppe der Transmembranproteine. Es gibt eine Reihe an unterschiedlichen Funktionen, die diese Proteine erfüllen können, wie zum Beispiel Transport oder Signalübertragung durch die Membran. Die Anwesenheit der Proteine verändert auch den Bilayer selbst. Bei langen Transmembranproteinen wird die Membran eher Lipide mit langen Kohlenwasserstoffketten sammeln und somit selber dicker werden.

3. ABC Transporter

Eine Gruppe von Membrantransportern heißt ATP-Binding-Cassette (ABC) Transporter und dient der Aufnahme und Abgabe von Substanzen durch die Zellmembran. Einen guten Überblick liefern sowohl [30] als auch [31]. Die Familie der ABC Transporter umfasst viele Transmembrantransporter, die eine Nukleotid Bindungs Domäne (NBD) als Merkmal haben. Sie gehört zu den größten Proteinfamilien und ist in mehrere Unterfamilien – nummeriert von ABCA bis ABCG – unterteilt, die sich hauptsächlich in der Substratspezifität unterscheiden. Im menschlichen Organismus kommen ABC Transporter sowohl innerhalb der Zelle – im Endoplasmatisches Retikulum (ER) – zum Einsatz – zum Beispiel in metabolischen Prozessen – oder sie befinden sich in der Plasmamembran und dienen der Ausscheidung von Schadstoffen.

Ein Vertreter dieser Familie, MDR 1, ist für diesen Transport von Schadstoffen verantwortlich. Da es viele verschiedene Stoffe gibt, die der Zelle schaden können, weist MDR 1 im Vergleich zu anderen ABC Transportern keine hohe Substrat-Spezifizität auf. Dieser überlebenswichtige Mechanismus ist leider auch in Krebszellen funktionstüchtig und sorgt oft dafür, dass Medikamente, die die Krebszelle töten sollen, von MDR 1 erkannt, wieder ausgeschieden und somit wirkungslos werden. Dazu zählen zum Beispiel Cholchicin oder Etoposid.[32]

Im menschlichen Körper kommt MDR 1 vor allem in der Leber und den Nieren vor, wo es der Schadstoffbeseitigung dient. Es ist aber auch in der Blut-Hirn-Schranke zu finden. Dort ist seine Funktion noch nicht vollständig geklärt, es wird aber vermutet, dass es dazu dient, Substrate aus dem Blut in das Hirn zu befördern, die dort nicht durch Diffusion hingelangen können.[31]

Bei dem Transport der unterschiedlichen Substrate – wie zum Beispiel der oben genannten Medikamente, aber auch von Lipiden, Steroiden oder Peptiden – kommt es oft zu elektrischen oder chemischen Gradienten, gegen die die Transporter arbeiten müssen. Daher handelt es sich bei ABC Transportern um aktive Transporter, das heißt, dass sie Energie für den Transport aufwenden. Die Energie für diesen Transport kommt, wie fast immer innerhalb der Zelle, aus einer Adenosintriphosphat (ATP) Hydrolyse. ATP ist in der Zelle immer vorhanden und kann unter Auflösung einer hochenergetischen Bindung in eine Phosphatgruppe und Adenosindiphosphat (ADP) umgewandelt werden. Dabei werden abhängig von pH Wert der Umgebung in etwa 60 kJ/mol freigesetzt, das entspricht in etwa einer Energie von 10^{-19} J pro Hydrolyse.[33]

3.1. Struktur

Alle ABC Transporter sind ähnlich aufgebaut und besitzen eine NBD und normalerweise 6 α-Helices.[34] Die NBD ist Teil der ATP Binding Cassette. Diese ist hydrophil und befindet sich vollständig im Zytosol. Sie dient als Bindungsstelle für die ATPs, und beherbergt die gesamte Hydrolysemaschinerie. An sie binden die α-Helices, die den transmembranen Teil bilden und wesentlich für die Substratspezifität sind, da sie die Substratbindungsstelle enthalten. Die α-Helices sind hydrophob und verankern

das Protein in der Membran. Zusätzlich bilden sie einen Kanal durch den gesamten Bilayer, durch den der Transport stattfinden kann.

Die ABC Transporter treten in menschlichen Zellen für gewöhnlich als Dimere auf. Dabei kann es sich um Homo- oder Heterodimere handeln. Ihre Abmessungen liegen in der Größenordnung von einigen Nanometern im Durchmesser und haben eine Länge – Transmembrandomäne und NBD – von etwa 20 nm. [35]

In der genauen Struktur gibt es einige Unterschiede, die daher rühren, dass die ABC Transporter evolutionär stark beteiligt sind und sich daher schnell Mutationen bilden können. Als Beispiel erläutere ich die genaue Struktur von MDR 1 als Richtwert für andere Transporter.

MDR 1 ist ein Homodimer, das als ein großes Polypeptid im Genom vorliegt. Es besitzt daher zwei NBDs und zwei Transmembrandomänen (TMD) zu je sechs α-Helices. Die NBDs enthalten die für die Zuordnung zu ABC Transportern wichtigen Motive Walker A und B und das charakteristische ABC Motiv (oder einfach nur C Motiv). Außerdem beinhalten sie noch ein paar für die Substratbindung wichtige Schleifen.[36]

In MDR 1 bilden jeweils zwei der sechs α-Helices der einen TMD mit vier Helices der anderen TMD eine strukturelle Untereinheit. Das führt zu einer sehr starken Kopplung zwischen den beiden TMDs, die sich auch in ihrer engen Verwobenheit zeigt. Eine weitere interessante Eigenschaft ist die Überlänge der α-Helices, die dazu führt, dass der Transmembranteil bis ins Zytosol ragt und die NBDs einen ungefähren Abstand von 2,5 nm von der inneren Schicht der Plasmamembran haben.

Die NBDs selber bilden zu zweit zwei Bindungsstellen für ATP, allerdings so, dass jeweils der vordere Teil von einer und der hintere Teil von der anderen NBD beigesteuert wird. Dadurch wird das ATP wie in einem Sandwich eingekapselt. Beide Bindungsstellen bleiben weiterhin funktionstüchtig.

Die Struktur von MDR 1 ist in Abbildung 14 gezeigt.

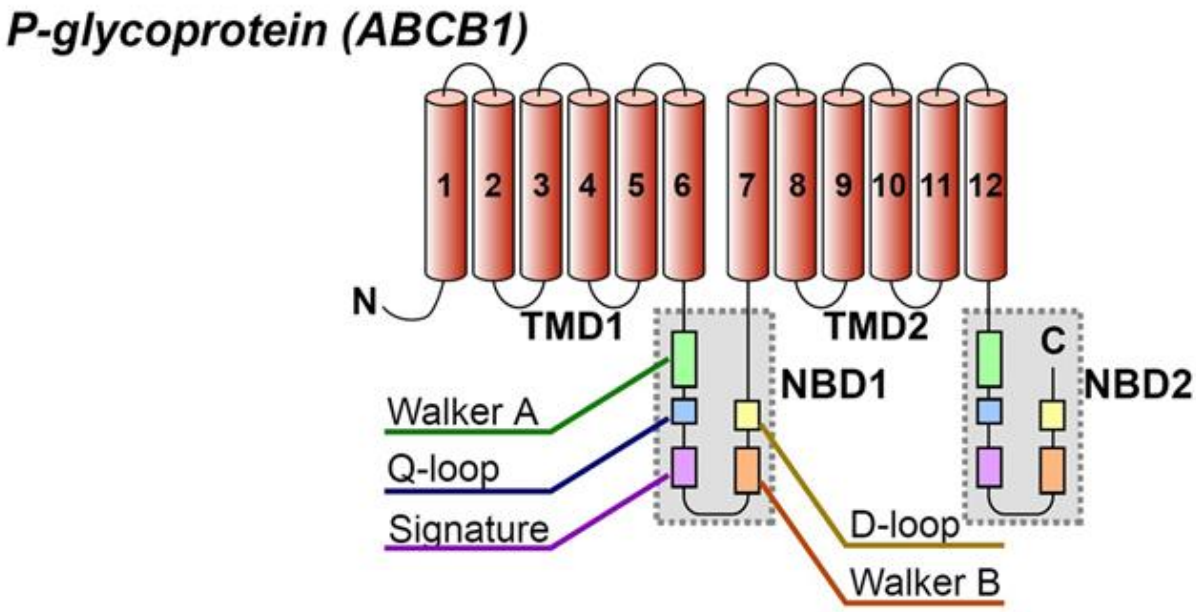

Abbildung 14 Die Struktur von MDR 1: Die roten Zylinder sind die α-Helices. In den zwei grau hinterlegten Feldern, die die NBDs darstellen, sind die einzelnen charakteristischen Motive und Schleifen eingezeichnet.[36]

Es gibt zwei Konformationen, in denen sich das Protein befinden kann. Die nach innen offene und die nach außen offene Position. Bei der ersten sind sowohl die ATP als auch die Substratbindungsstellen in Richtung Zytosol hin verfügbar. In der zweiten Konformation liegen die beiden NBDs aneinander und somit kann kein ATP binden. Die Substratbindungsstelle ist von außerhalb der Zelle zugänglich, ist aber in einem niedrigen Affinitätszustand.

Zwischen diesen zwei Zuständen kommt es zu Konformationsänderungen. Diesen Prozess kann man sich so vorstellen, dass sich das gesamte Protein verformt, um sich dem neuen chemischen Umfeld anzupassen. Die Projektion der Bewegungslinien der NBDs und der Enden der TMDs auf die Membran bilden ein Kreuz mit einem rechten Winkel. Die beiden Konformationen sind in Abbildung 15 zu sehen.

In unserem Fall verwenden wir eine Mutante von MDR 1, die von unserem Kooperationspartner Peter Chiba zur Verfügung gestellt wurde. Dabei wurde nahe des N-Terminus an V36 stellenspezifisch ein mCherry angehängt. Die Verbindung erfolgte über einen Linker aus 10 Aminosäuren. Die Mutante wurde danach auf Funktionalität geprüft.

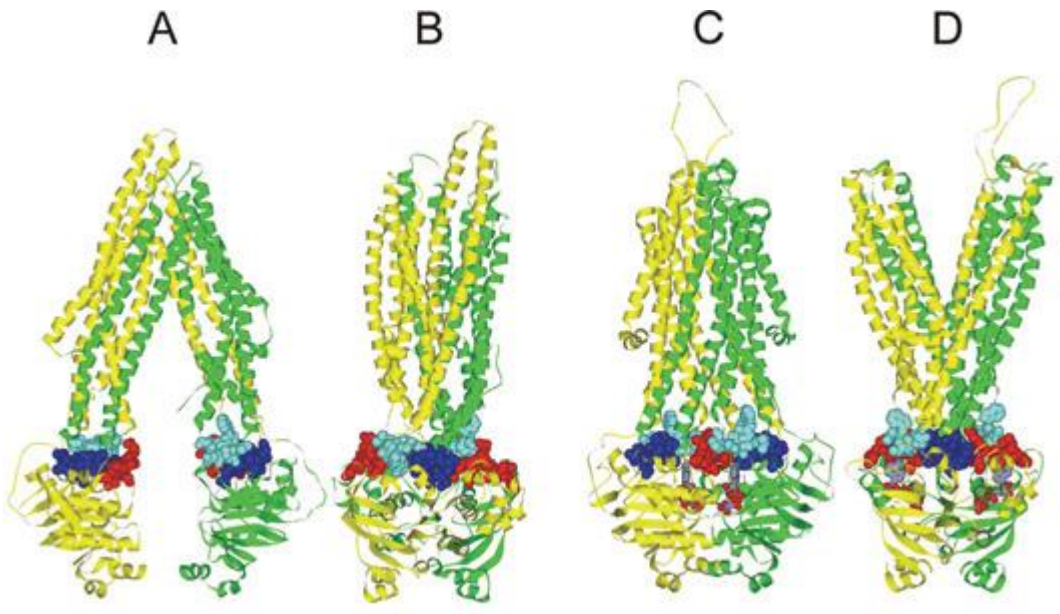

Abbildung 15 Konformationen von MDR 1: In A und B ist die nach innen offene und in C und D die nach außen offene Konformation abgebildet. Alle vier sind ohne Substrat oder ATP gezeichnet. B beziehungsweise D sind jeweils die zu A und C um 90° gedrehten Ansichten. Die N-terminale Hälfte ist jeweils in Gelb und die C-terminale in Grün dargestellt.[36]

3.2. Funktionsweise

Der genaue Ablauf des Transportprozesses ist noch nicht ganz verstanden. Es gibt mehrere Modelle, die sich in einigen Details – Symmetrie, Timing oder der genauen Kopplung zwischen ATPase und Transport – unterscheiden, aber nicht im generellen Ablauf.

Vor dem Transport ist das Protein in der nach innen offenen Konformation. Aus dem Zellinneren können also sowohl die Substrate als auch die ATP-Moleküle zu den jeweiligen Bindungsstellen gelangen. Wenn ein passendes Substrat bindet, findet eine Änderung des chemischen Umfelds innerhalb des Transporters statt. Auf Grund der sehr hohen Konzentration von ATP in der Zelle – etwa 1 mM – ist immer gleichzeitig auch zumindest ein ATP in der NBD gebunden, das dann durch die Hydrolyse die nötige Energie für eine Konformationsänderung bereitstellt. Es wird, unabhängig von der Anzahl der gebundenen ATPs immer nur ein Molekül hydrolysiert, um den Transport zu ermöglichen.

Nach der Konformationsänderung hat das Protein die nach außen offene Position eingenommen und somit befindet sich die bevorzugte Position des Substrates nun auf der anderen Seite der Membran. Dabei wird das Substrat durch einen der beiden Kanäle geschoben. Welcher von beiden, oder ob beide genutzt werden, steht bis jetzt noch nicht fest und ist auch Teil dieser Forschung. Die neue Position ändert auch die Affinität der Bindungsstelle, so dass das Substrat freigesetzt werden kann. In dieser Konformation ist die ATP Binding Cassette auf der Innenseite der Zelle geschlossen.

Inzwischen ist die Hydrolyse abgeschlossen und es ist eine zusätzliche negative Ladung innerhalb der NBD entstanden. Dadurch wird wieder eine Konformationsänderung initiiert, die dann wieder auf die Ausgangslage zurückführt; das ADP und der Phosphatrest können nun freigesetzt werden. Danach sind wieder beide Bindungsstellen frei zugänglich und der Prozess startet von neuem.

Eine kurze Zusammenfassung dieses Prozesses ist in Abbildung 16 zu sehen. Auf der linken Seite wird das Substrat durch den Kanal in der Nähe des Fluorophores transportiert und auf der rechten Seite geht es durch den weiter entfernten. Darunter ist die zu erwartende FRET-Effizienz schematisch dargestellt.

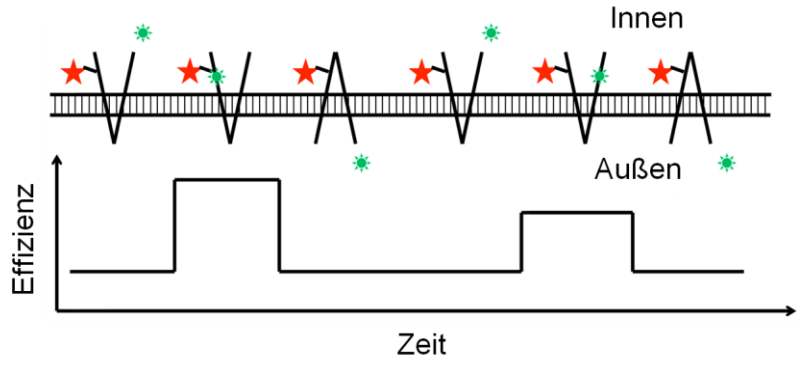

Abbildung 16 Schematischer Transport eines Substrates: Der rote Stern steht für das mCherry, das am N-Terminus sitzt. Die V- beziehungsweise die verkehrte V-Stellungen geben die aktuelle Konformation an, in der sich MDR 1 befindet. Der grüne Stern ist das Rhodamin 123. Die Kurve darunter ist eine schematische Darstellung der erwarteten FRET-Effizienz.

Um ein Rhodamin 123 zu transportieren, braucht MDR 1 in etwa 250 ms. Die genaue Aufteilung dieser Zeit auf die einzelnen Schritte ist bis jetzt nicht messbar gewesen und ist somit auch eines der Hauptziele dieses Projekts.

C. Experimente

1. Experimenteller Aufbau

Die meisten Experimente in diesem Kapitel sind am selben Setup – Setup 2 – gemacht worden. Um ein besseres Verständnis für den generellen Aufbau zu geben, ist hier eine kurze Beschreibung.

Als Laser stehen ein blauer Laser (SAPPHIRE HP, Coherent Inc.) mit einer Wellenlänge von 488 nm, ein grüner Laser (Millennia X, Spectra Physics) mit 532 nm und ein roter Laser (Diodenlaser, Toptica Photonics) mit 647 nm zur Verfügung. Zum schnellen Schalten im Millisekundenbereich wird ein Akusto-optischer-Modulator (model 1205, Isomet) verwendet, dessen erste Ordnung als Hauptstrahl verwendet wird. Alle Laserlinien werden danach mittels eines Teleskops auf dieselbe Größe gebracht und mit Hilfe eines Pinholes in der Fokalebene des Teleskops auf die TEM 00 Mode gefiltert. Der Strahlengang ist in Abbildung 17 dargestellt.

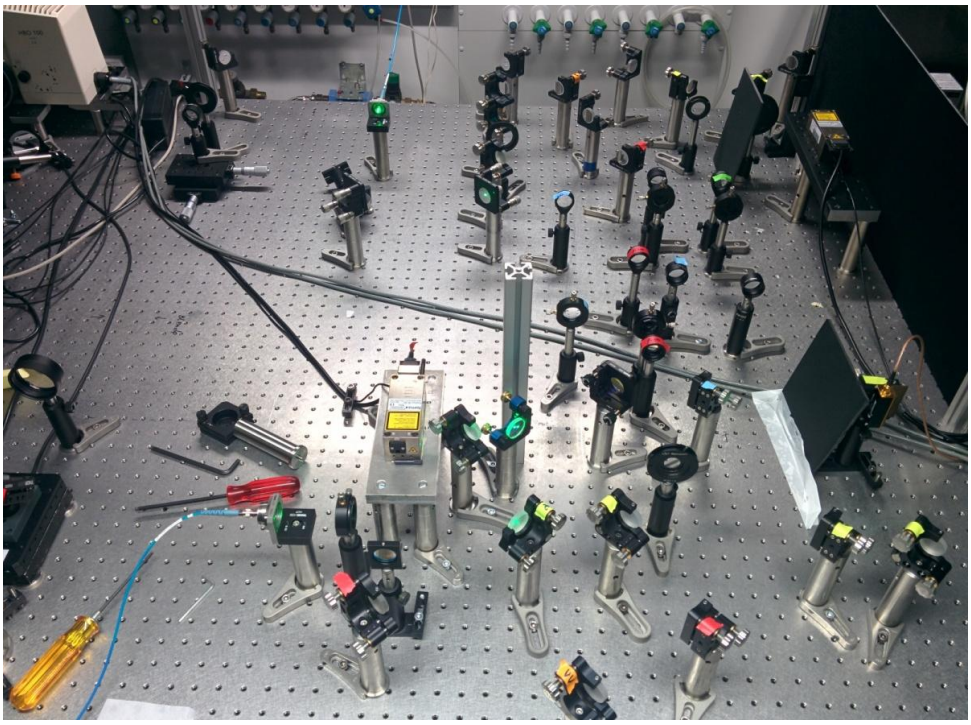

Abbildung 17 Aufbau von Setup 2: Das Mikroskop befindet links außerhalb des Bildes. Die drei Teleskope sind auf der rechten Seite im Bild zu sehen und der rote Laser (Diodenlaser, Toptica Photonics) liegt zentral.

Als Mikroskop steht das inverse Axiovert 200 (Zeiss) zur Verfügung in dem ein Objektiv (NA 1.46, 100x α Plan APOCHROMAT, Zeiss) verbaut ist. Daran angeschlossen ist eine CCD-Kamera (IXON DU 897 – DV, Andor) mit davor geschaltetem Optosplit (Optosplit III, Cairn Research).

Die Probe liegt in einer beheizbaren Halterung (POCmini, Zeiss) und ist in xy-Richtung elektrisch verfahrbar. Die Halterung ist in Abbildung 18 zu sehen.

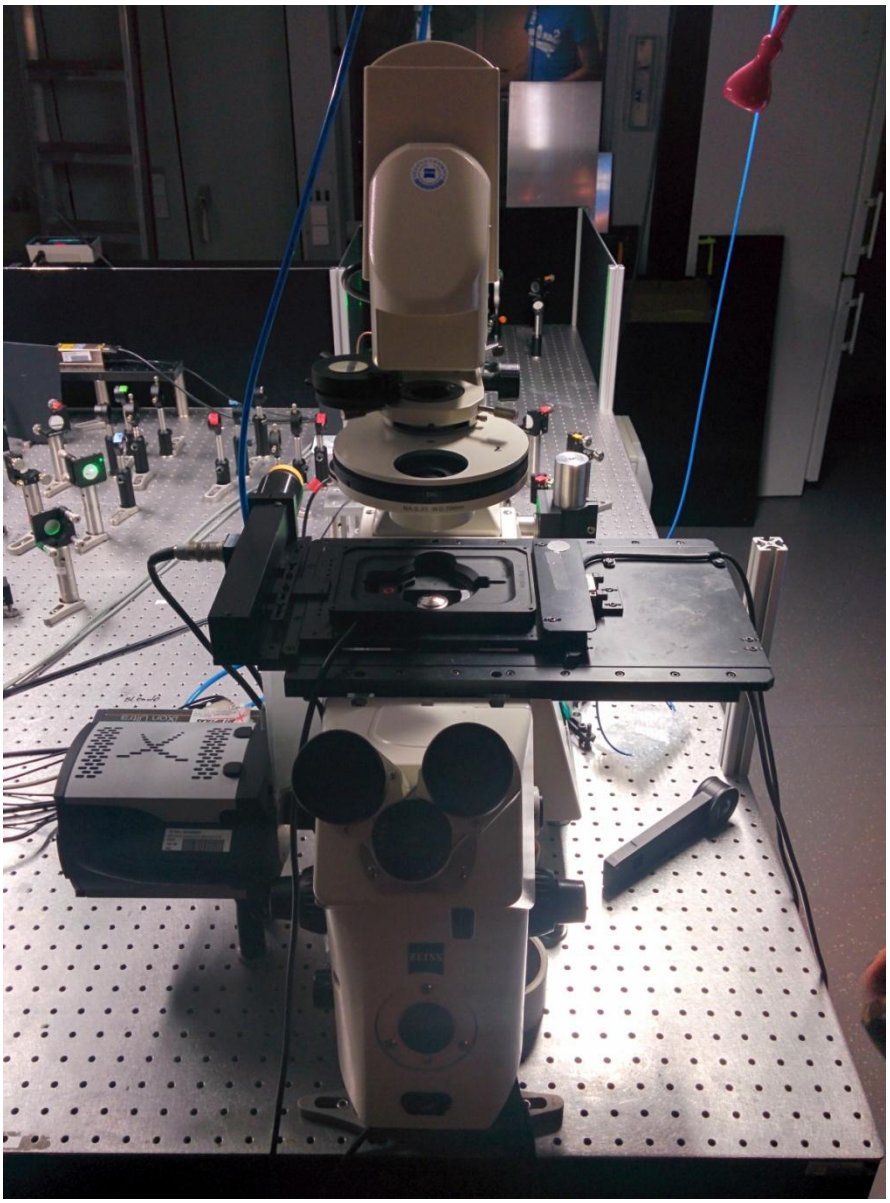

Abbildung 18 Mikroskop und POCmini: Im Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) ist die POCmini Halterung (Zeiss) eingespannt. Auf der linken Seite sieht man noch die CCD-Kamera (IXON DU 897 – DV, Andor).

2. Efflux Messungen

Erste Untersuchungen haben eine Abschätzung für die Dauer eines Transportereignisses von etwa 250 ms nahegelegt. Diese Ergebnisse sind aus Effluxmessungen hervorgegangen, und sind daher Mittelungen über viele Zellen. Bei einer solchen Messung werden die Zellen zuerst mit Substrat beladen, das heißt sie befinden sich im Medium, das sehr reichhaltig am jeweiligen Substrat ist, in diesem Fall Rhodamin 123. Danach beginnt man die Umgebung zu spülen, was dazu führt, dass nur noch im Inneren der Zelle Farbstoffe übrigbleiben. Misst man dann die Abnahme des Fluoreszenzsignals, erhält man eine Intensitätskurve, die sich zu einer Transportrate abschätzen lässt.

Ein analoges Experiment kann auch am Lichtmikroskop durchgeführt werden. Ein großer Unterschied ist die Anzahl an Zellen, die gleichzeitig untersucht werden können. Die Tatsache, dass jede Zelle den Transporter unterschiedlich stark exprimiert, fällt natürlich bei einem hochauflösenden Mikroskop stärker ins Gewicht, da dadurch individuelle Zellen erst unterschieden werden können. Die Mittelwerte über mehrere Zellen – in unserem Fall etwa 30 – sind aber durchaus vergleichbar.

2.1. Messverfahren

Dünne Glasplättchen werden mit Hilfe von Fibronektin vorbehandelt, damit die Zellen anhaften können. Fibronektin ist ein Glykoprotein, das sowohl an Glas haftet, als auch mit den Zellen wechselwirkt. Dazu wird das Fibronektin in Lösung auf die Glasblättchen gebracht. Danach wird das Lösungsmittel verdampft und es verbleibt eine homogene Schicht Fibronektin.

Für diese Versuchsreihe werden Wildtyp HEK Zellen, die den natürlichen Transporter enthalten, RNAi Zellen, deren natürlicher MDR 1 Level niedergehalten wird, und transfizierte RNAi Zellen, die auch noch die gewünschte Mutante des Transporters in großer Zahl produzieren, verwendet.

Nachdem sich die Zellen an das Glasplättchen angeheftet haben, wird dem Nährmedium eine hohe Konzentration von 0,5 µM Rhodamin 123 beigesetzt. Es entsteht eine natürliche Diffusion durch die Membran in die Zelle auf Grund des Konzentrati-

onsgradienten. Zusätzlich gibt es den aktiven Transport aus den Zellen, der gegen den Konzentrationsgradienten arbeitet. Nach frühestens einer halben Stunde stellt sich ein Gleichgewichtzustand ein. In dieser Zeit befinden sich die Zellen im Inkubator bei 5 % CO_2. Solange sie beladen werden, ist es wichtig sie unter physiologischen Bedingungen zu halten, damit sie sich nicht vom Glasplättchen ablösen.

Am Mikroskop wird das gesamte Medium durch „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS) mit 2 % fetal bovine serum (FBS) ersetzt, das ist eine Salzlösung, die den pH-Wert während der Messung reguliert und die Zelle mit den wichtigsten Nährstoffen versorgt. Somit stehen von außen keine Farbstoffe mehr zur Verfügung. Dieser Waschvorgang wird drei Mal wiederholt. In Abbildung 19 ist der Prozess graphisch dargestellt.

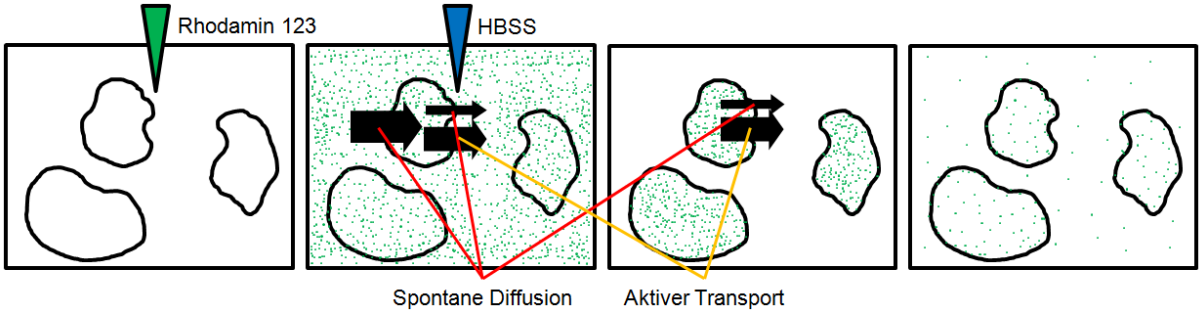

Abbildung 19 Ablauf einer Effluxmessung: (Bild 1): Der erste Schritt ist die Zugabe von Rhodamin 123. (Bild 2): Danach entsteht ein hoher chemischer Gradient in die Zelle. So entstehen drei miteinander konkurrierende Prozesse: Diffusion von Rhodamin in die beziehungsweise aus der Zelle und der aktive Transport durch MDR 1. Sobald der Gleichgewichtszustand erreicht ist, wird das überschüssige Rhodamin weggespült. (Bild 3): Es bleiben nur noch der aktive Transport und die Diffusion aus der Zelle übrig. Während dieser Zeit finden die Messungen statt. (Bild 4): Irgendwann ist ein neuer Gleichgewichtszustand erreicht.

Mit Hilfe von TIRF wird eine Sequenz von Bildern aufgenommen. Die Intensitätsabnahme innerhalb der Zellen, die ja sukzessive Farbstoffe an die Lösung abgeben, definiert die Transportrate.

Im Fall der HEK und RNAi Zellen, können alle Zellen verwendet werden, die am Glasplättchen festsitzen. Für die transfizierten Zellen muss noch eine weitere Auswahl erfolgen. Das geschieht über den roten Kanal des Optosplits, in dem die transfizierten Zellen aufgrund des mCherry aufscheinen. Im roten Farbkanal wird der Region of Interest (ROI) definiert und mittels ImageJ auf den anderen Kanal übertragen.

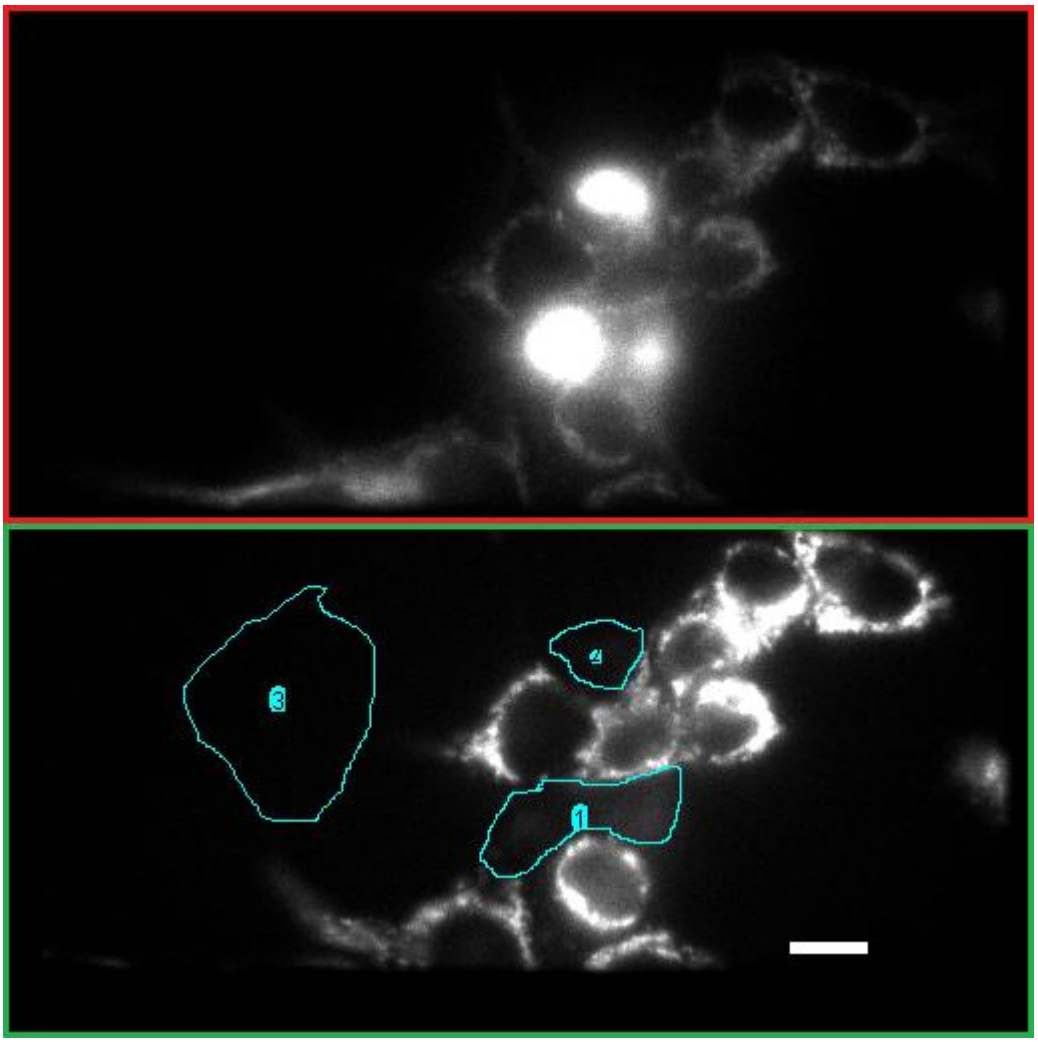

Abbildung 20 ROI-Auswahl mittels Optosplit: Die untere Hälfte des Bildes ist der grüne Kanal und zeigt die Emission von Rhodamin 123. In blau eingezeichnet sind hier drei verschiedene ROIs – drei Zellen und ein Bereich für die Hintergrundkorrektur – deren Position in der oberen Hälfte bestimmt wurde, die den roten Kanal zeigt und wo klar die Zellen zu erkennen sind, bei denen genügend Transporter expremiert werden. Der weiße Balken entspricht 30 µm.

Um die Halbwertszeit zu ermitteln, wurden die kurven logarithmisch geplottet und mit einer Geraden gefittet. Die Steigung dieser Geraden ist direkt zur Halbwertszeit.

2.2. Ergebnisse

An die Intensitätskurve kann eine exponentielle Funktion gefittet werden, aus der die Halbwertszeit bestimmt werden kann.

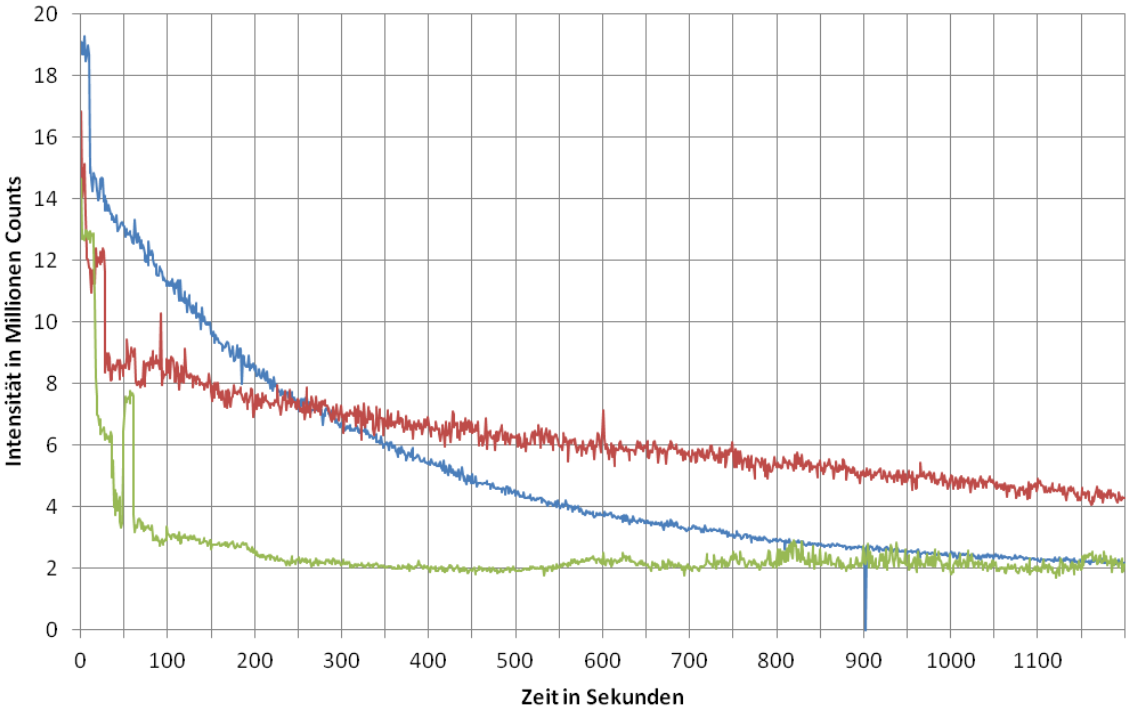

Abbildung 21 Intensitätskurven einer Effluxmessung: Die drei Kurven entsprechen den integrierten Intensitäten von Rhodamin 123 in der Zelle. Die blaue Linie steht für die Wildtyp, die rote für RNAi und die grüne noch einmal für die RNAi Zellen, diesmal aber mit einem zusätzlichen transient transfizierten Transporter, der mCherry trägt. Die Statistik für diese Messungen umfasst jeweils etwa 20 bis 30 Zellen.

In Abbildung 21 sind die Intensitätskurven aus drei verschiedenen Experimenten überlagert. Bei den transfizierten RNAi-Zellen erkennt man noch die drei Waschschritte, die direkt vor der Messung erfolgen. Danach beginnt die eigentliche Messung, wobei sofort ersichtlich ist, dass für die transporterlosen Zellen die Halbwertszeit sehr lange ist (rote Kurve).

Speziell für die transfizierten RNAi Zellen gilt, dass die Anzahl der vorhandenen Transporter stark schwanken kann, da bei der Transfektion jede individuelle Zelle anders reagiert. Um Fehler zu vermeiden, ist eine untere Schranke für die Intensität bei der Auswahl der transfizierten Zellen gesetzt worden, unter der Zellen nicht gewertet werden. Das führt dazu, dass schwach transfizierte Zellen mit wenigen Transportern oft nicht in die Analyse aufgenommen werden. Das erklärt auch die sehr kurze Halbwertszeit für diese Messung. Die Auflistung für die unterschiedlichen Zellsorten befindet sich in Tabelle 3.

HEK-Zellen mit natürlichen Transportern	**RNAi-Zellen** ohne Transporter	**Transfizierte RNAi-Zellen** mit mutierten Transportern
34 Minuten	82 Minuten	20 Minuten

Tabelle 3 Halbwertszeiten aus den Effluxmessungen

Peter Chiba hat mit Hilfe von Durchflusszytometrie die gleichen Zellen untersucht. Bei ihm sind für die HEK-Zellen mit natürlichem Transporter (29 Minuten) und für die RNAi-Zellen (42 Minuten) ähnliche Ergebnisse herausgekommen. Die Unterschiede können in den verschiedenen Messmethoden oder Messparametern liegen. Obwohl wir versucht haben, möglichst viele Parameter ident zu wählen, sind die Messmethoden zu unterschiedlich, um exakt gleiche Bedingungen zu erreichen. Bei den transfizierten RNAi-Zellen hat Peter Chiba eine Halbwertszeit von 2 Minuten erhalten, die deutlich unterhalb der von uns gemessenen liegt. Wie bereits oben erwähnt, hängt dieser Wert sehr stark von der Transfektionsrate und den Parametern der Transfektion zusammen und lässt sich daher nicht genau vergleichen.

Bei beiden Messmethoden zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Zelltypen, der durchaus vergleichbar ist. Die Senkung der Halbwertszeit von RNAi-Zellen auf transfizierte Zellen zeigt, dass ein Großteil des Rhodamins 123 durch die mCherry markierten Transporter befördert wird und somit für die FRET-Messungen verwendet werden kann.

3. Softwareentwicklung für Trackingexperimente

In Kapitel 4 verwenden wir Trackingexperimente. Um diese schnell und effizient auswerten zu können, habe ich ein einfach zu bedienendes und schnelles Programm mit Benutzeroberflache in Matlab geschrieben. Das Programm übernimmt die Rohdaten und liefert die Positionen und Trajektorien der Signale. Der dem Programm zugrunde liegende Algorithmus wurde von Yongxiang Gao und Maria L. Kilfoil entwickelt und zum Download zur Verfügung gestellt. [37]

3.1. Aufbau und Bedienung

Das Kernstück des Programms ist die Benutzeroberfläche, von der aus sich alle Funktionen steuern lassen. Alle auf ihr befindlichen Knöpfe, Schieber oder Checkboxes sind in funktionellen Gruppen zusammengefasst. Die drei großen Gruppen sind Anzeige-, Lokalisierungs- und Trackingoptionen. Zwischen diesen Gruppen gibt es keine direkte Wechselwirkung, der Trackingalgorithmus zum Beispiel läuft vollkommen unabhängig von den im Lokalisierungsmenü eingestellten Optionen und umgekehrt. Eine weitere Gruppe sind die ROI-Optionen, deren Einstellung sich auf die Anzeige- und die Lokalisierungseigenschaften auswirkt.

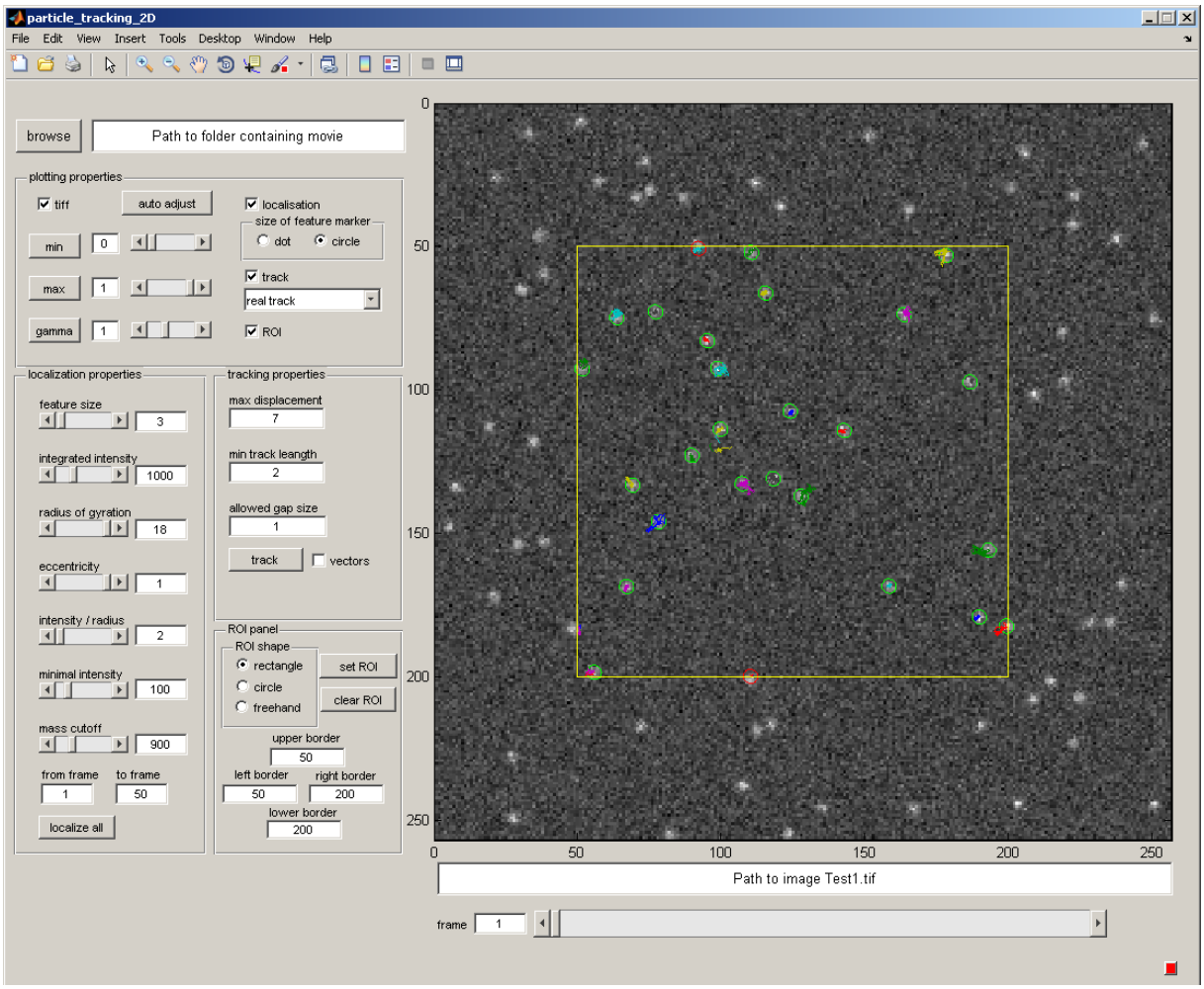

Abbildung 22 Benutzeroberfläche des Programms "particle_tracking_2D": Die Benutzeroberfläche ist in funktionelle Gruppen eingeteilt. Ganz oben links wählt man die Daten aus. Direkt darunter befinden sich alle Anzeigeeinstellungen für das Bild auf der rechten Seite. Auf der linken Seite gibt es außerdem noch je ein Panel für Lokalisierungs-, Tracking- und ROI-Optionen. Unter dem Bild steht

der Pfad zu den Daten. Darunter befindet sich der Schieber mit dem man durch den Film navigieren kann.

Bei Betätigung des „browse“ Knopfes erscheint ein weiteres Menü, in dem man den Datentyp auswählen muss. Zugelassene Dateitypen sind die aktuellste Version von SPE-Dateien und einzelne TIF-Dateien. Bei TIF-Dateien müssen alle Bilder der Serie richtig – auf Reihenfolge achten– beschriftet sein und sich im selben Ordner befinden, den man dann auch auswählen kann.

Sowohl für TIF- als auch für SPE-Dateien ist eine Mehrfachauswahl möglich. Bei SPE markiert man dazu einfach alle gewünschten Dateien. Für TIF muss man den übergeordneten Ordner auswählen. Zu beachten ist, dass sich in diesem Ordner keine weiteren TIF-Dateien befinden, außer den zu analysierenden.

3.1.1. Anzeige

Auf der Benutzeroberfläche werden zu jeder Zeit alle zur Orientierung notwendigen Informationen angezeigt. Dazu gehören das aktuelle Bild der aktuellen Serie, der Speicherort der Bilderserie und der Speicherort des aktuellen Bildes. Die Speicherorte werden in zwei separaten Textfeldern angezeigt: oben links der Pfad zum Ordner, der die Serie enthält, und unterhalb des Bildes der Pfad zum Bild.

In der Gruppe mit den Anzeigeeinstellungen kann man außerdem die Helligkeit und den Gammawert zur Bildanzeige ändern. Der Gammawert bestimmt ob die Helligkeitswerte linear oder mittels eines Potenzgesetzes skaliert werden. Zur Anpassung der unteren Grenze der auf eins normierten Grauskala kann man entweder den Schieber rechts vom Knopf mit der Aufschrift: „min“ verwenden oder in das Textfeld zwischen diesen direkt den Wert eingeben. Die obere Grenze und der Gammawert werden analog gesetzt.

Die Checkbox oberhalb dieser Knöpfe steuert ob die Daten selber im Bild rechts angezeigt werden sollen, oder nicht. Nimmt man das Häkchen weg, bleibt ein schwarzer Hintergrund, auf dem nur die Lokalisierungen und Trajektorien angezeigt werden.

In den Anzeigeeinstellungen auf der rechten Seite ganz oben ist die entsprechende Checkbox für die Signalmarkierungen. Direkt darunter gibt es die Auswahl mittels

Radio-Buttons, die festlegt, ob entweder ein Punkt in die Mitte oder ein Kreis um ein gefundenes Signal gezeichnet werden soll.

Unterhalb geht es analog für die Trajektorien weiter, nur dass diesmal die Auswahl über eine Auswahlliste erfolgt. Man kann zwischen den eigentlichen Trajektorien, Pfeilen von der ersten zur letzten Position und skalierten Pfeilen wählen. Die letztgenannten sind nur zur Veranschaulichung der Richtung und Länge gedacht und korrelieren nicht direkt mit dem darunter abgebildeten Bild.

Die letzte Checkbox dient dazu den ROI ein- und auszublenden.

Um die Daten durchzuschauen gibt es noch ein oder zwei Schieber unterhalb der Bildfläche. Mit dem oberen wählt man das aktuelle Bild innerhalb der Serie aus. Alternativ kann auch eine direkte Eingabe über das Textfeld links vom Schieber erfolgen. Wenn man mehrere Bilderserien auf einmal bearbeitet, taucht darunter ein weiterer Schieber und noch ein Textfeld auf, die zum Navigieren zwischen den einzelnen Bilderserien dienen.

3.1.2. Lokalisierung

Auf der linken Seite befinden sich die Lokalisierungseinstellungen. Sie enthalten sieben Schieber mit jeweils dazugehörigen Textfeldern, die von oben nach unten aufgelistet folgende Eigenschaften kontrollieren: Signalgröße, integrierte Intensität, Streumassenradius, Exzentrizität, Verhältnis von integrierter Intensität und Streumassenradius, minimale Intensität und den Massenabbruch. Die genauen Bedeutungen der einzelnen Werte folgen weiter unten in diesem Kapitel. Darunter befinden sich zwei Textfelder in denen man die Anfangs- und Endbilder für die Analyse auswählen kann und ein Knopf mit dem die Lokalisierung gestartet wird.

Im Bild auf der rechten Seite werden immer die Lokalisierungen, die mit den aktuellen Einstellungen gefunden werden, angezeigt. Klickt man durch die Bilderserie durch kann man sich versichern, ob die aktuellen Werte zu den Daten passen, bevor man die Lokalisierung startet.

Signalgröße: Das Programm verwendet eine Maximum-Likelihood-Methode um die Signale zu fitten. Die verwendete Fitting-Maske muss mit der Größe der Signale kor-

relieren, damit der Fit sinnvolle Ergebnisse liefert. Der Wert entspricht dem Radius der Maske in Pixel und sollte daher genau so groß gewählt werden, wie der halbe Signaldurchmesser. Der Mittelpunkt der Maske wird deckungsgleich mit dem hellsten Pixel im Signal ausgerichtet und verschiebt sich im weiteren Verlauf des Algorithmus. Ist der Wert zu groß eingestellt, kann es passieren, dass zwei nahe beieinander liegende Signale zusammengefasst werden zu einem. Das erkennt man daran, dass auf der Anzeigefläche die grünen Signalmarkierungen genau zwischen den Signalen liegen. Einen zu kleinen Wert merkt man nicht so schnell, da er nur zu einer allgemeinen Verschlechterung des Fits führt und somit in weiterer Folge eine genaue Auswahl der Signale erschwert.

Integrierte Intensität: Dieser Wert gibt die untere Grenze für die summierte Intensität des Signals an. Dazu tragen alle Pixel unterhalb der Maske bei. Ist ein Pixel nicht zur Gänze innerhalb der Maske, wird interpoliert. Je größer die Maskengröße gewählt wird, desto höher muss auch die integrierte Intensität gewählt werden, da auch die Fläche, über die summiert wird, wächst. Liegt bei einem Signal der tatsächliche Wert unterhalb der Grenze, wird in den Anzeigeeinstellungen ein roter statt eines grünen Markers verwendet. Dieses Signal wird nach der vollständigen Lokalisierung aus der Liste entfernt und scheint nicht in der Liste mit den Funden auf. Je höher der Wert für die untere Grenze gelegt wird, desto unwahrscheinlicher wird es, dass einzelne helle Pixel fälschlicherweise als Signale interpretiert werden. Ist er zu hoch gewählt werden auch schwache Signal, die aber echt sind, ausgesiebt.

Streumassenradius: Der Streumassenradius ist ein weiter Parameter mit dem die Auswahl an gefundenen Signalen eingeschränkt werden kann. Er gibt Aufschluss über die Kompaktheit von ausgedehnten Signalen. Befindet sich der Großteil des Signals in der Nähe des Mittelpunkts ist der Streumassenradius klein, wird hingegen die Verteilung flacher und breiter wächst auch der Radius. Als Standardeinstellung werden alle Werte zugelassen. Setzt man die Grenze weiter herab werden alle Signale herausgefiltert, deren Wert darüber liegt. In den meisten Fällen braucht man diesen Parameter nicht zu variieren, da die Signale sehr klein sind und eine ähnliche Intensitätsverteilung haben. Der Parameter wird beim Einladen der Daten bereits so gesetzt, dass alle Daten verwendet werden, wenn man ihn nicht verändert.

Exzentrizität: Eine andere Möglichkeit, die Signale zu filtern, führt über die relative Exzentrizität. Ihre Werte liegen zwischen null und eins, wobei ersteres für runde und zweiteres für strichartige Objekte steht. Auch hier gibt das Programm automatisch eine auf die Daten abgestimmte Standardeinstellung vor, sodass alle Signale verwendet werden. Der angegebene Wert legt die obere Grenze fest, über der die Signale ausgefiltert werden.

Verhältnis von integrierter Intensität und Streumassenradius: Sehr intensive Signale können einen zu hohen Streumassenradius aufweisen, obwohl sie kompakt sind. Mit Hilfe dieses Parameters kann eine feinere Unterscheidung getroffen werden, indem der Streumassenradius ins Verhältnis zur Gesamtintensität gesetzt wird. Da meistens die richtige Wahl der anderen Parameter ausreicht um zwischen Signalen und Hintergrund zu differenzieren, akzeptieren auch hier die Standardeinstellungen nahezu alle Signale. Der Wert bildet eine untere Schranke, unter der keine Signale zugelassen werden. Da die integrierte Intensität, bei der wir eine untere Schranke definieren, im Zähler und der Streumassenradius, der eine obere Schranke bildet, im Nenner steht, widersprechen die Grenzwerte einander nicht, sondern führen zu einer verfeinerten Auswahl.

Minimale Intensität: Mit diesem Parameter legt man die minimale Intensität des hellsten Pixels in einem Signal fest. Da die Fitting-Maske am hellsten Pixel ausgerichtet wird, greift dieser Filter sehr früh in den Algorithmus ein. Ist der Pixel nicht hell genug oder nicht das lokale Maximum, wird keine Maske gelegt und es findet kein Fitting statt. Es wird daher auch kein anderer Parameter überprüft, da diese alle erst nachträglich filtern. Der Vorteil dieser frühen Erkennung ist, dass dadurch der Algorithmus schneller wird, was sich bei vielen Signalen deutlich bemerkbar machen kann. Ist der Wert allerdings zu hoch, kann es vorkommen, dass schwache Signale verloren gehen. Da das Fitting nicht ausgeführt wird, gibt es auch keine roten Markierungen in der Anzeige.

Massenabbruch: Dieser Parameter kann statt des Integrierte Intensität Parameters verwendet werden. Der Vorteil vom Massenabbruch ist, dass er ähnlich wie die minimale Intensität bereits vor dem Fitting greift und daher den Prozess beschleunigt. Signale die hier gefiltert werden, werden nicht rot markiert, sondern gar nicht angezeigt. Ansonsten gibt es keinen Unterschied zur Integrierten Intensität.

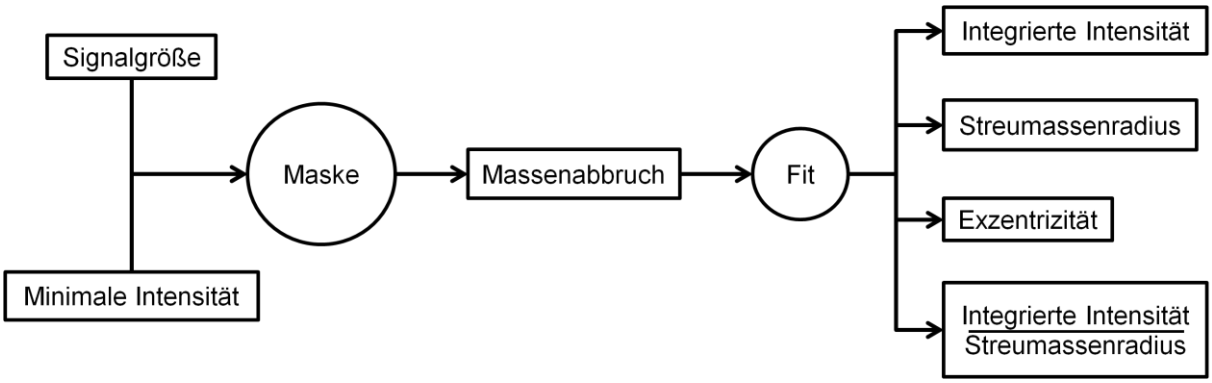

Abbildung 23 Ablauf einer Lokalisierung: Die Signalgröße wirkt sich auf die Maskengröße aus und die Minimale Intensität auf deren Startpositionen. Nachdem für jedes Signal die Maske gelegt worden ist, wird geprüft ob die integrierte Intensität oberhalb des Massenabbruchs liegt. Für alle Signale, die dieses Kriterium erfüllen wird ein Fit durchgeführt und ein Punkt im Bild angezeigt. Die Ergebnisse des Fits werden dann mit den Parametern: Integrierte Intensität, Streumassenradius, Exzentrizität und Verhältnis von integrierter Intensität und Streumassenradius verglichen. Signale, die alle Bedingungen erfüllen, werden als grüne Punkte angezeigt, alle anderen werden rot eingefärbt. In der endgültigen Liste, die zur Weiterverwendung gedacht ist, stehen nur die grünen Signale.

Die gefundenen Signale werden in einen Unterordner mit dem Namen „Feature_finding“ zu der Bilderserie gespeichert. In ihm befinden sich zwei MAT-Dateien, dem Standarddateityp für Matlabvariablen. Eine davon endet auf „_positions“ und enthält eine Matrix mit den Positionen und Eigenschaften von allen gefundenen und akzeptierten Signalen. Die zweite endet auf „_protocol“ und enthält alle Einstellungen, die zum Zeitpunkt der Lokalisierung ausgewählt waren. Diese beiden Dateien werden nur erstellt, wenn man auf den „localize all“ Knopf drückt. Verändert man die Einstellungen nach dem Lokalisierungsprozess wird das zwar für die aktuelle Anzeige übernommen, aber nicht gespeichert.

Die Positionsmatrix besitzt sieben Spalten, die von links nach rechts folgende Einträge enthalten: Position auf der x-Achse in Pixel, Position auf der y-Achse in Pixel, integrierte Intensität, Streumassenradius, Exzentrizität, Bildnummer und einen Zeitstempel, der die Zeit zwischen zwei Bildern als eins annimmt.

3.1.3. Tracking

Das Tracking ist ähnlich aufgebaut, wie die Lokalisierung. Die drei Textfelder sind die Parameter, die man einstellen kann und der Knopf startet den Algorithmus. Die Checkbox ist ausschließlich für spezielle Anwendungen geeignet; wenn sie aktiviert

ist, liefert das Programm keine Trajektorien mehr, sondern zeigt nur an in welche Richtung sich die Signale bewegen. Als Parameter gibt es folgende zur Auswahl: maximaler Abstand, minimale Trajektorienlänge und erlaubte Lückengröße.

Maximaler Abstand: Das ist der Parameter, der die größte Auswirkung auf die Trajektorien hat. Er gibt den Abstand in Pixel an, den ein Signal von einem Bild zum nächsten zurücklegen kann. Er legt somit die obere Grenze für den Suchradius um die Signale fest. Ist er zu klein eingestellt, findet der Algorithmus keine Trajektorien oder unterbricht sie bei zu großen Schritten. Das führt dazu, dass die Diffusionskonstante einen zu niedrigen Wert anzeigen wird, da alle zu großen Schritte ignoriert werden. In die andere Richtung kommt es früher oder später zu einem enorm hohen Rechenaufwand, da immer mehr Signale im Suchradius vorkommen. In diesem Fall gibt das Programm eine Warnung aus. Es empfiehlt sich aber, die Ergebnisse sehr kritisch zu betrachten und zu kontrollieren, ob die Verbindung der einzelnen Signale noch sinnvoll ausschaut. Steigert man den Suchradius weiter, kann es vorkommen, dass Matlab im Hintergrund abstürzt; man muss in diesem Fall im Hauptfenster die aktuelle Berechnung stoppen – das geschieht durch Eingabe von Strg + c – danach kann man das Programm aber ohne Einschränkungen weiter verwenden.

Minimale Trajektorienlänge: Sie gibt die untere Grenze an, die eine Trajektorie haben muss, um durch den Filter zu kommen. Der niedrigste sinnvolle Wert beträgt zwei und wird auch als Standardeinstellung vorgeschlagen.

Maximale Lückengröße: Das Programm kann Trajektorien über mehrere Bilder hinweg fortsetzten, obwohl in diesen keine Signale im Suchradius gefunden wurden. Dazu erhöht es in jedem weiteren Bild den Suchradius um eine Einheit, solange bis wieder ein Signal gefunden wird. Mit dem Parameter kann man eine obere Grenze definieren, bei dem die Suche abgebrochen wird. Diese Grenze ist mit eins vordefiniert, da es für die reine Diffusionsanalyse nicht notwendig ist Lücken zuzulassen, da die einzelnen Schritte innerhalb der Trajektorie und nicht die Trajektorien im gesamten eingehen. Bei fixierten Proben und blinkenden Fluorophoren kann es aber sehr wohl Sinn machen höhere Werte zu wählen.

Die Ergebnisse werden auf zwei unterschiedliche Arten abgespeichert, um die weitere Analyse mit den vorhandenen Methoden möglichst einfach zu gestalten. Einerseits

wieder als MAT-Datei mit dem Namen „_tracks“, die genau so aufgebaut ist wie die „_positions“-Dateien. Sie enthalten allerdings eine achte Spalte, die die Trajektoriennummer angibt. Die zweite Datei ist eine Textdatei mit demselben Informationsgehalt. Der Namen endet auch auf „_tracks“, nur ist die Dateiendung „.trc“. Sie hat sechs Spalten mit den Inhalten von rechts nach links: Trajektoriennummer, Bildnummer, Position auf der x-Achse, Position auf der y-Achse, integrierte Intensität und fortlaufende Nummer, die als ID fungiert.

Die Trajektorien werden erst nach Abschluss des Algorithmus in der Anzeige rechts dargestellt, da es keinen Sinn macht, sie separat für das aktuelle Bild zu berechnen. Sie werden auch nicht aktualisiert, wenn man die Tracking-Einstellungen ändert. Erst nach einem weiteren abgeschlossen Tracking werden die neuen Trajektorien geladen.

Zu beachten ist, dass vor dem Tracking die Lokalisation abgeschlossen sein muss, da der Trackingalgorithmus die Daten aus der „_positions“-Datei bezieht. Die Lokalisation und das Tracking müssen nicht in derselben Sitzung durchgeführt werden, solange die „-positions“-Datei noch vorhanden ist, kann nach dem Einladen der Daten über den „browse“-Knopf sofort der Trackingalgorithmus gestartet werden. Es müssen die Lokalisationseinstellungen auch nicht verändert werden, da diese nur nach einer neuen Lokalisation – Verwendung des „localize all“-Knopfes – in die „_positions“-Datei übernommen werden.

3.1.4. ROI

Das letzte Feld beinhaltet alle Funktionen, die man benötigt, um einen ROI auszuwählen. Der ROI bestimmt, in welchem Bereich die Lokalisation stattfindet. Da das Tracking die gefundenen Signale verknüpft, besteht ein indirekter Zusammenhang zum ROI. Es ist daher auch nicht möglich, in einem anderen Bereich das tracking durchzuführen, als die Lokalisation stattgefunden hat. Der ROI wir im Bild rechts durch eine gelbe Linie veranschaulicht.

Um einen ROI festzulegen muss man auf den „set ROI“-Knopf drücken; auch wenn bereits ein ROI festgelegt ist und nur eine der Einstellungen geändert werden soll, muss man „set ROI“ erneut drücken. Es gibt drei Radio-Buttons, bei denen man die

Form des ROI festlegt. Für den rechteckigen beziehungsweise den elliptischen ROI werden die in den vier Textfeldern definierten Grenzen direkt übernommen und der ROI kann sofort erstellt werden. Für die Freihandoption verschwinden die Grenzen, da die Eingabe direkt im Bild erfolgt. Nach dem „set ROI“-Knopf verwandelt sich der Cursor in ein Zielkreuz und durch Linksklick ins Bild kann Klick für Klick ein weiterer Eckpunkt des entstehenden Polygons hinzugefügt werden. Schon während des Zeichnens werden die bereits bestehenden Kanten als gelbe Striche angezeigt. Um den ROI abzuschließen, muss der letzte Eckpunkt mit einem Rechtsklick hinzugefügt werden. Danach schließt sich das Polygon durch die direkte Verbindung von dem Endpunkt und dem Startpunkt. Zum Entfernen verwendet man den „clear ROI“-Knopf, der die Einstellungen alle gleich lässt, aber den ROI aufhebt.

3.2. Funktionsweise

Sowohl der Lokalisierungs- als auch der Trackingalgorithmus funktionieren analog in drei Dimensionen, werden aber hier nur für zwei-dimensionale Daten verwendet. Sie liegen separat als Unterprogramme vor und sind von der Benutzeroberfläche entkoppelt, alle anderen Unterfunktionen sind in den Hauptcode integriert.

3.2.1. Lokalisierung

Die Lokalisierung wird mit Hilfe eines Maximum-Likelihood-Fits realisiert. Dazu benötigt man eine Fitting-Maske und eine Startposition. Danach geht man iterativ vor, um die Position immer weiter zu verbessern. Als Qualitätskontrolle wird ein χ^2-Test verwendet.

Als Startposition werden lokale Maxima in der Intensität verwendet. Jedes lokale Maximum ist der Startpunkt für einen Fit. Für den Fall, dass ein Signal zwei lokale Maxima aufweist, werden sie im späteren Verlauf näher zueinander rücken oder gar konvergieren. Sobald sie näher zusammen sind, als die zu erwartende Signalgröße, werden sie zusammengelegt.

Der Mittelpunkt des hellsten Pixels wird als Mittelpunkt für die Maske verwendet, deren Profil eine Gaußverteilung ist. Als Maskengröße eignen sich ungerade ganzzahlige Vielfache eines Pixels. In diesem Fall stimmen die Pixel der Maske mit denen der

Daten überein. Mit jeder weiteren Iteration wird die Maske um einen kleinen Teil eines Pixels verschoben und der nächste χ^2-Wert wird durch Interpolation ermittelt. Dabei werden die Pixel des Bildes so gewichtet, wie sie sich mit denen der Maske überschneiden. Zur Verdeutlichung ist das Pixelmuster in Abbildung 24 dargestellt. Die Pixelränder des Bildes sind grau und ein Signal in hellgrau hinterlegt. Die Pixelränder der Maske sind schwarz und das Profil ist durch eine dunkelgraue Schraffierung gekennzeichnet.

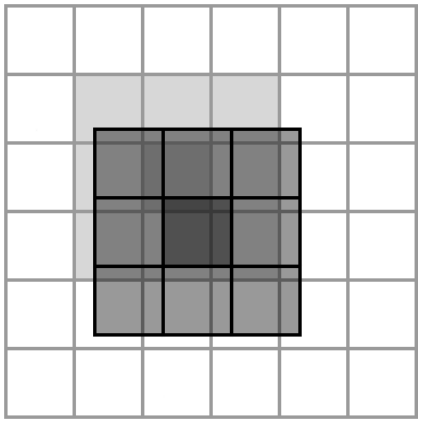

Abbildung 24 Fitting-Maske auf Pixelraster: Der graue Raster entspricht den Pixelrändern der Daten und die grau hinterlegten Felder stehen für ein Signal. Die Maske ist darübergelegt und leicht verschoben gegenüber dem Raster. Ihre Pixelränder sind schwarz und die Färbung gibt das Intensitätsprofil an.[37]

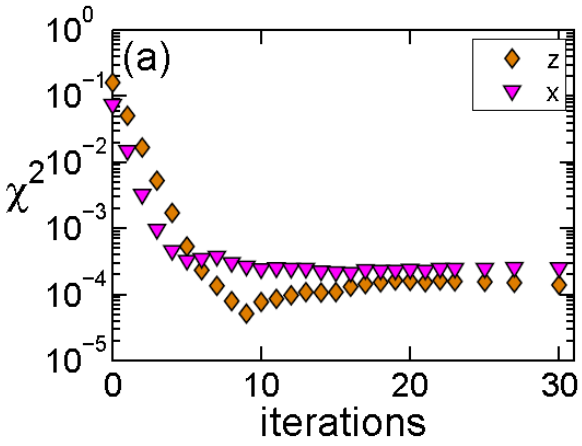

Abbildung 25 Grenzwertfindung bei der Lokalisierung: Die χ^2-Tests konvergieren mit zunehmender Iterationsanzahl zu einem Grenzwert, der die optimale Fitgenauigkeit angibt.[37]

Gao et al. konnten auch zeigen, dass nach etwa zehn Wiederholungen bereits die bestmögliche Position gefunden ist und sich die Werte der χ^2-Tests einem Grenzwert

annähern. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse für einen zwei- und einen dreidimensionalen Fit dargestellt.

3.2.2. Tracking

Wie in Abschnitt über Tracking bereits erwähnt, ist der wichtigste Parameter für das Tracking der Suchradius. Um die ursprüngliche Position jedes Signals im Bild davor wird im vordefinierten Radius nach einer Lokalisation im aktuellen Bild gesucht. Dieser Algorithmus geht aber einen Schritt weiter, um eine möglichst hohe Anzahl an Trajektorien zu erhalten. Der gesamte Prozess ist in Abbildung 26 dargestellt.

Der erste Schritt ist in Abbildung 26 in (a) und (b) dargestellt. Die Positionen im vorhergehenden Bild sind durch grüne Kreise markiert und rundherum ist der Suchradius durch schwarz strichlierte Kreise angedeutet. Die roten Kreise geben die aktuelle Position der Signale an. In (a) sind alle Signale weit genug auseinander und können daher eindeutig verknüpft werden. In (b) liegen die Signale dichter beieinander und es kommt bei einigen Verknüpfungen zu Problemen. Das Vergrößern des Suchradius würde dazu führen, dass mehrere Signale gleichzeitig miteinander verknüpft werden können. Um diesen Problem aus dem Weg zu gehen, fängt der Algorithmus mit einem kleinerem Suchradius an und verknüpft alle eindeutigen Trajektorien. Danach werden alle Positionen, die bereits in einer Trajektorie eingebettet sind, aus dem Pool der verfügbaren Positionen gestrichen. Das sind all jene, die in (c) blau umrahmt sind. Übrig bleiben eine deutlich geringere Anzahl an Positionen. Nun kann der Suchradius ohne Überschneidungsprobleme vergrößert werden und somit die vorher nicht auffindbaren Trajektorien verknüpfen. (d) schaut nun ähnlich wie (a) aus und es gibt nur mehr eindeutige Verknüpfungen. Dieser Prozess kann so oft wiederholt werden, bis der maximale Suchradius erreicht ist, der als Parameter eingestellt werden kann.

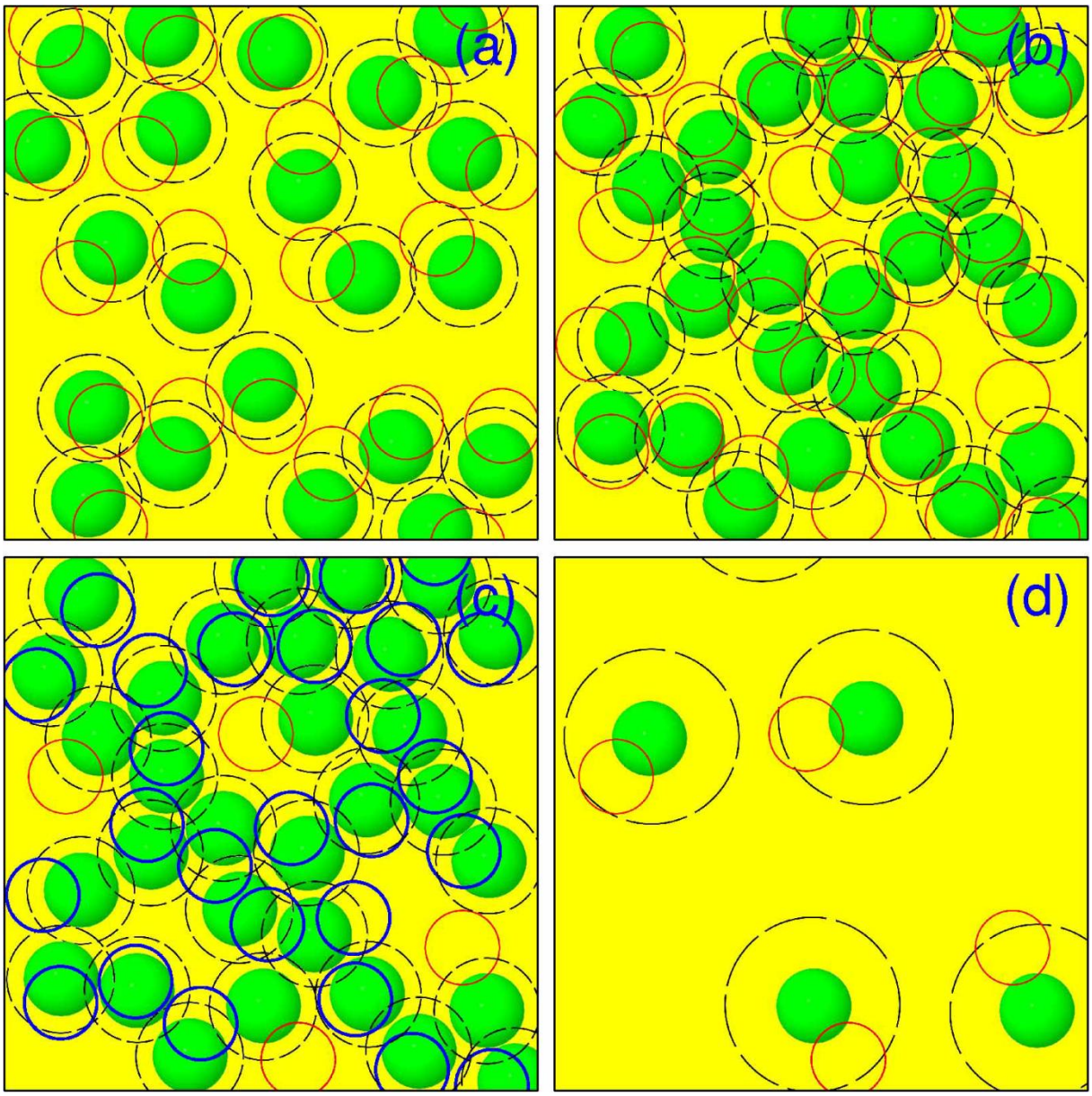

Abbildung 26 Der Tracking Prozess in drei Schritten: In (a) und (b) wird der erste Schritt dargestellt, in dem rund um die ursprünglichen Positionen (grüne Kreise) der Suchradius gelegt wird (schwarz strichlierte Kreise). Die aktuellen Positionen (rote Kreise) liegen in (a) alle im Suchradius, nicht hingegen bei (b). Außerdem ist die Flächendichte an Lokalisationen in (b) zu dicht, um den Suchradius zu erhöhen. Deswegen werden alle eindeutigen Verknüpfungen mit einem geringeren Suchradius durchgeführt. Der zweite Schritt ist in (c) angedeutet: alle bereits verknüpften Positionen (hier in blau) werden für die weitere Analyse entfernt. In (d) wird dann als letzter Schritt mit einem größeren Suchradius weitergesucht. Dieser Prozess kann öfter wiederholt werden, um möglichst alle Signale zu berücksichtigen. [37]

Eine weitere Schwierigkeit, die berücksichtigt wird, ist das teilweise Fehlen von Signalen, die bei der Lokalisierung übersehen wurden, wodurch die Trajektorie unterbrochen wird. Die Lösung dafür bietet der Lückenparameter, der den Algorithmus

dazu bringt, sich alle Positionen nicht nur über einen, sondern über mehrere Bilder hinweg zu merken, sofern diese noch nicht in eine Trajektorie eingebettet wurden. Bleibt also ein Signal über, das keine Entsprechung im nächsten Bild findet, wird die Position an das darauffolgende Bild weitergegeben und der Suchradius verdoppelt. Kann er auch dort nicht zu einer Trajektorie verbunden werden, wird der Suchradius wieder um eine Einheit erhöht und die Position weitergegeben. Das wird so oft wiederholt bis eine Trajektorie gebildet wird oder die maximale Lückengröße erreicht ist.

Um eine gute Analyse zu ermögliche sollte man beim Aufnehmen der Daten aber trotzdem auf einige Punkte achtgeben:

- Der Zeitabstand bei der Aufnahme sollte möglichst kurz gewählt werden. Das wird umso wichtiger, je schneller sich die Signale bewegen.
- Der Bildausschnitt muss groß genug sein, sodass nicht bereits nach zwei Zeitschritten alle Trajektorien im Randbereich enden.
- Die Beleuchtungsdauer beziehungsweise -intensität müssen so gewählt werden, dass die Fluorophore nicht zu schnell bleichen.
- Die Dichte der Signale sollte so gering sein, dass sie problemlos auseinander gehalten werden können und sich die Trajektorien nicht zu oft überschneiden.

4. Bilayer Messungen

Bis jetzt ist noch nichts über das Bindungsverhalten zwischen Rhodamin 123 und MDR 1 bekannt. Die Transportrate wird stark davon beeinflusst, wie diese Bindung zustande kommt. Die Bindungsstelle wird von den α-Helices gebildet und befindet sich daher in der Nähe der Membran. Daher ist es zunächst wichtig, das Verhalten von Rhodamin in Kontakt mit Membranen zu untersuchen.

Da in einer Zellmembran viele unterschiedliche Proteine vorhanden sind, die an einer Vielzahl von nicht relevanten Prozessen teilnehmen, wurde in meiner Studie stattdessen ein Modellsystem verwendet. Ein künstlich hergestellter Bilayer ist eine Doppelschicht aus Lipiden und kann in beliebiger Lipidzusammensetzung – im vorliegenden Fall aus nur einer – hergestellt werden.

Rhodamin 123 ist ein Fluorophor, welches mit hinreichender Affinität in den Kopfgruppenbereich des Bilayer partitioniert. Sowohl die Rate an Rhodamin, das aus der Lösung in den Bilayer übergeht als auch die Verweildauer sind von Interesse für die Forschung. Eine weitere wichtige Variable ist die Diffusionskonstante. Letztere ist experimentell am leichtesten zu bestimmen.

4.1. Messverfahren

Die Grundzüge des Einzelmolekültrackings sind bereits in einem früheren Abschnitt beschrieben. Da in diesem Fall nur die Diffusion in der Membran beobachtet werden soll, die auf einem Glasträger aufliegt, kann wieder TIRF verwendet werden.

Am leichtesten lässt sich ein Bilayer mittels der Fusion von Vesikeln herstellen. In dieser Form sind die Lipide auch relativ stabil lagerbar. Während der Produktion eines Bilayers ist es wichtig darauf zu achten, dass er stets von Wasser oder Puffer umgeben ist, da er sich nur bildet, wenn auf beiden angrenzenden Seiten eine polare Umgebung herrscht. Dann richten sich die hydrophilen Kopfgruppen in Richtung Außengrenze aus und schirmen die hydrophoben Ketten davon gänzlich ab. Für dieses Experiment wird ein DOPC Bilayer verwendet.

Die Konzentration des Farbstoffes ist ein sehr wichtiger Parameter, da bei einer zu hohen Dichte die Trajektorien nicht mehr eindeutig bestimmbar sind. Die richtige Dosierung ist mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt worden. In Abbildung 27 sind von links nach rechts immer höhere Verdünnungen abgebildet. Für die Messungen haben wir die höchste Verdünnung verwendet.

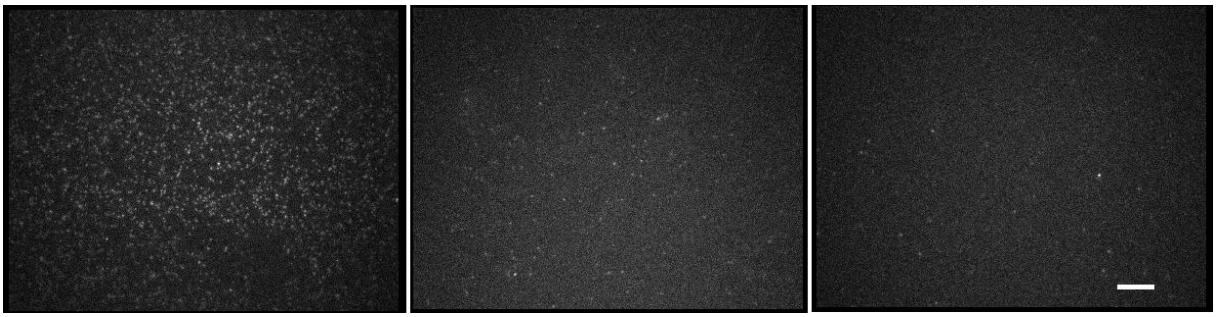

Abbildung 27 Verdünnungsreihe von Rhodamin 123: Ausgehend von der Stocklösung von 0,5 mM sind wir in Zehnerpotenzen fortgeschritten. Von links nach rechts sieht man $1:10^6, 1:10^7$ und $1:10^8$. Der weiße Balken entspricht 6 µm.

4.2. Ergebnisse

Die Diffusionskonstante im Bilayer beträgt in etwa 0,8 µm²/s. Das entspricht typischen Werten für kleine Proteine in Modellsystemen [38], ist aber deutlich langsamer als andere lipophile Farbstoffe wie zum Beispiel DiI, dessen Diffusionskonstante um einen Faktor fünf bis zehn größer sind. [39] In der Zelle selber herrscht reges Treiben von unterschiedlichen Lipiden und Proteinen, so dass die Diffusionskonstante dort um einen Faktor zehn geringer ist.

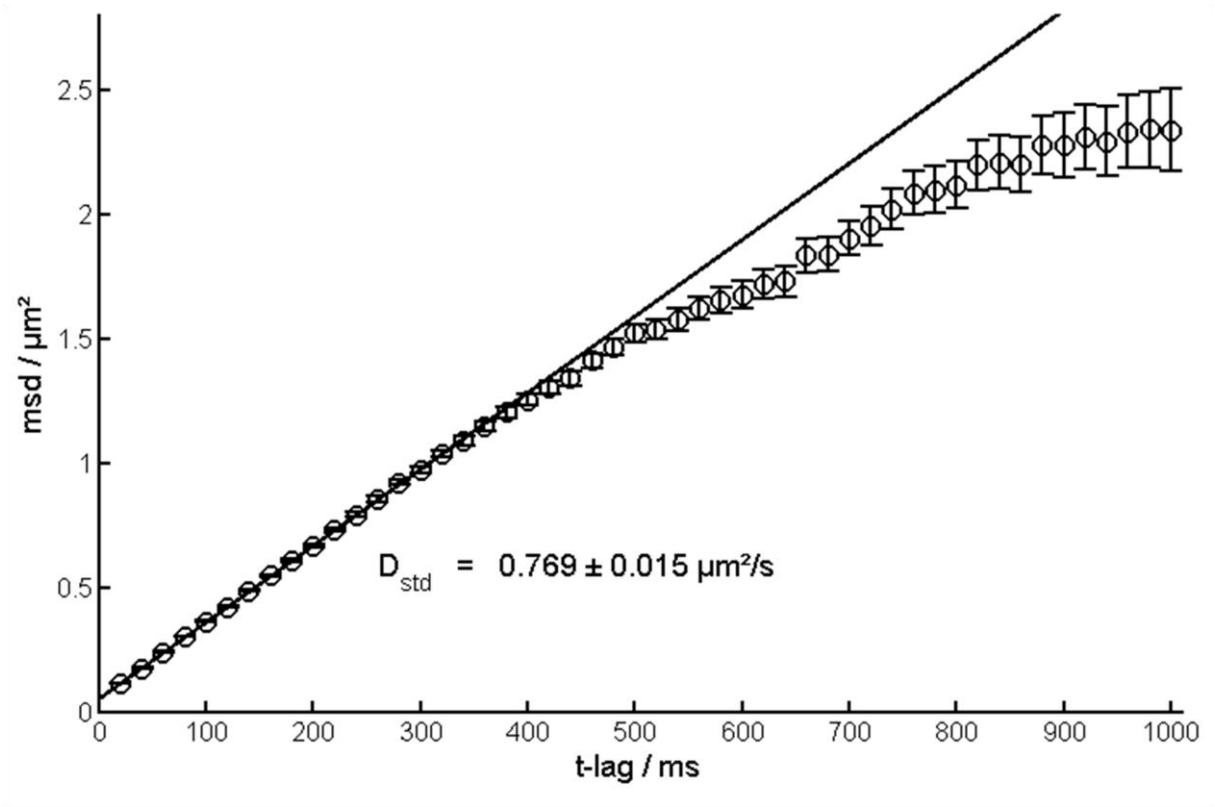

Abbildung 28 Diffusionskonstante im Bilayer: Die Diffusionskonstante liegt bei etwa 0,8 µm²/s. Die Abweichungen im oberen Teil der Kurve ergeben sich aus der geringen Anzahl von langen Trajektorien.

Die zurückgelegte mittlere quadratische Distanz, die in Abbildung 28 auf der y-Achse zu sehen ist, sollte linear mit der Zeit ansteigen. Als Diffusionskonstante wird die Steigung zwischen erstem und zweitem Messwert hergenommen, da dieser Bereich besonders verlässlich ist. Im hinteren Teil kommen jene Signale immer mehr zu tragen, die unspezifisch an das Glasplättchen gebunden haben und somit die Diffusionskonstante herabsetzen. Diese Signale sind oft bleichresistent woraus sich der Schluss ziehen lässt, dass das ein Konglomerat mehrerer Fluorophore ist, der knapp

oberhalb des Bilayers aufliegt. Da wir nicht einfach unterscheiden können, aus wie vielen Fluorophoren ein Signal besteht, bleibt ein Konglomerat so lange als Signal erhalten, bis auch der letzte Fluorophor in ihm gebleicht wurde.

Eine andere Möglichkeit die Trajektorien auszuwerten, verwendet einen biexponentiellen Fit, der versucht eine mobile und eine immobile Fraktion an die Daten zu fitten. Wir verwenden dabei einen Least-Square-Fit an die Funktion

$$p(r^2, t) = 1 - \left[\alpha \cdot e^{-\frac{r^2}{{r_1}^2}} + (1-\alpha) \cdot e^{-\frac{r^2}{{r_2}^2}}\right], \tag{10}$$

wobei α die relative Fraktion angibt und ${r_i}^2 = 4D_i t$. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 dargestellt und bestätigt alle oben genannten Aussagen. Zusätzlich erhält man eine Information über das Verhältnis zwischen mobilen und immobilen Daten und sieht, dass die mobile Fraktion rapide abnimmt und nach dem fünften Zeitschritt fast nur noch immobile oder sehr langsame Trajektorien vorhanden sind.

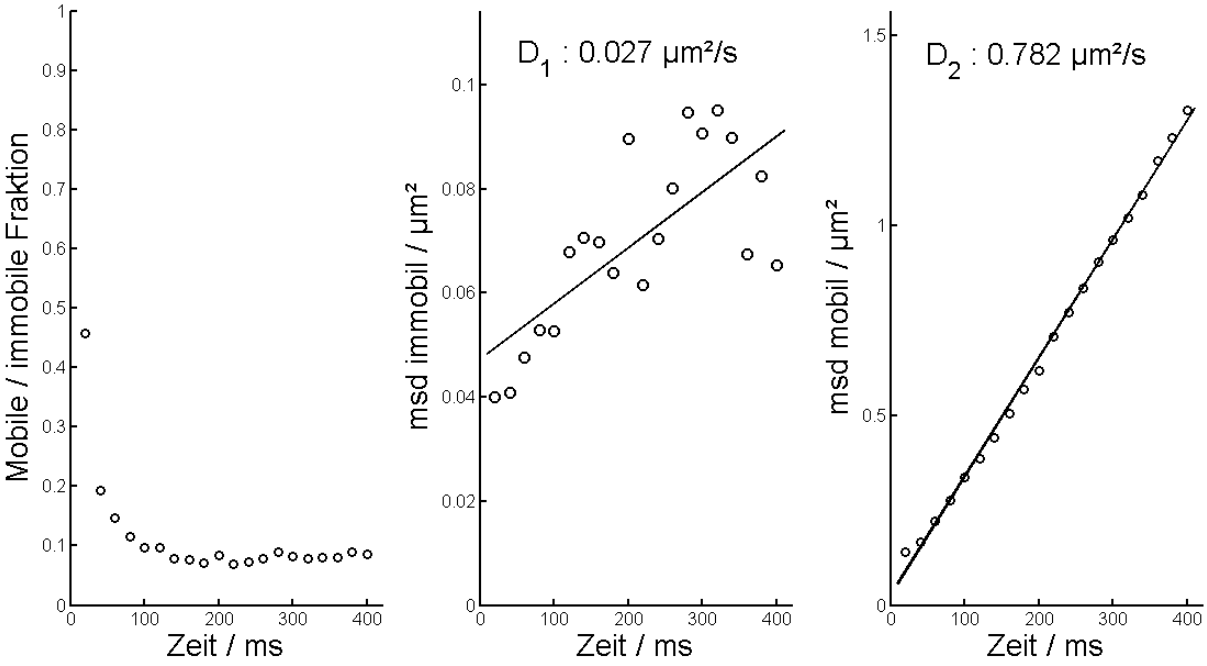

Abbildung 29 Biexponentieller Fit: Links: Die Anteile der mobilen beziehungsweise immobilen Fraktion. Mitte: Das Diffusionsverhalten der immobilen Fraktion. Rechts: Das Diffusionsverhalten der mobilen Fraktion.

Die mittlere Trajektorienlänge liegt etwa bei fünf Aufnahmen, das entspricht 100 ms. Das Ende der Trajektorie kann viele unterschiedliche Gründe haben, die nur sehr schwer voneinander zu unterscheiden sind:

- Die Fluorophore haben den Bilayer verlassen und diffundieren aus dem TIRF-Feld hinaus. In diesem Fall korreliert die Trajektorienlänge mit der Aufenthaltsdauer in der Membran.
- Das Ende der Trajektorie entsteht durch einen Bleichvorgang.
- Der sichtbare Bereich ist begrenzt durch die Ausleuchtung des Lasers oder die Chipgröße der Kamera. Am Rand können also auch viele kurze Abschnitte einer Trajektorie gemessen werden.
- Zwei Signale sind in einem Bild zu nahe bei einander, so dass sie auf Grund des Rayleighlimits nicht mehr getrennt werden können. In so einem Fall wird eine Trajektorie unterbrochen, kann aber nicht fortgeführt werden, da die Signale ununterscheidbar sind.

In der Membran gebundenes Rhodamin 123 diffundiert frei durch den Bilayer. Die Ergebnisse können jedoch nicht direkt auf die Diffusion in der Zelle umgelegt werden, da, wie oben bereits erwähnt, die Diffusion in Plasmamembranen deutlich langsamer als in artifiziellen Bilayern ist.

5. FRET Messungen

Das an den ABC Transporter gebundene mCherry dient als Signal, wenn ein Rhodamin transportiert wird und deshalb nah genug an den Akzeptor herankommt. Mit einer zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich lässt sich an Hand der Anzahl an Bildern, bei denen FRET auftritt, die Zeit ablesen, die ein Rhodamin benötigt, um transportiert zu werden. Des Weiteren lässt sich aus der Intensität des Signals feststellen, ob ein oder zwei Rhodamine in der Nähe sind. Der Ablauf ist graphisch bereits in Abbildung 15 dargestellt worden.

5.1. Messverfahren

Während der FRET Messungen wird das gesamte optische Spektrum überstrichen. Die niedrigste Wellenlänge liegt bei 488 nm, die der Anregungslaser verwendet und die höchste entsteht durch die Emission von mCherry und reicht bis etwa 750 nm.

Um die Emissionen von Rhodamin 123 und mCherry gleichzeitig betrachten zu können, wird ein Optosplit verwendet, der Lichtstrahlen je nach Spektralbereich parallelverschieben und auf zwei getrennten Kamerabereichen gleichzeitig abbilden kann.

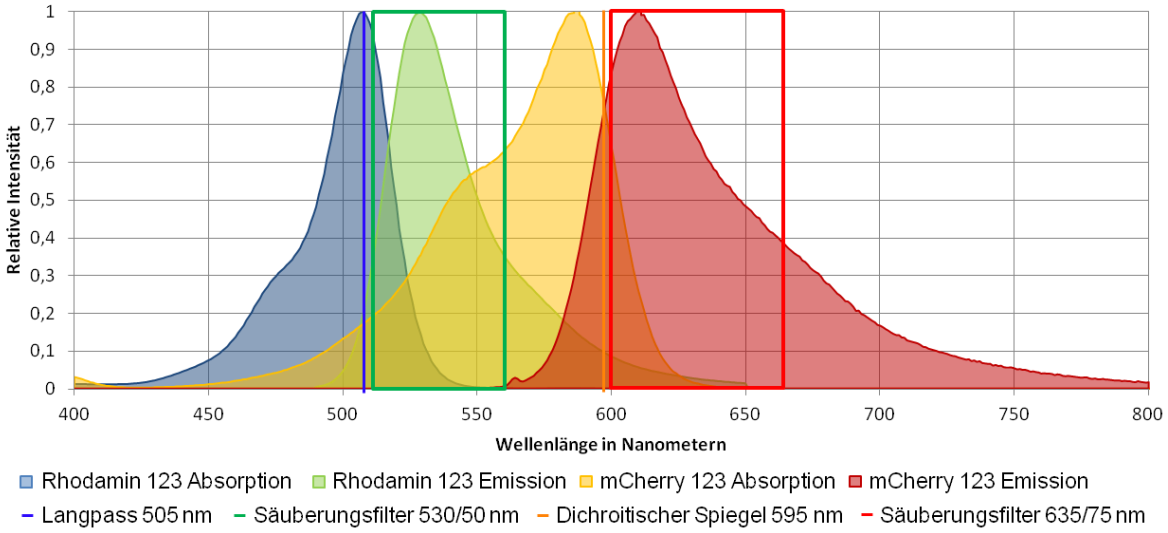

Abbildung 30 Filteraufbau: Die Cleanup Filter so wie der dichroitische Spiegel befinden sich im Optosplit. Der Langpass verbleibt im Filtercube des Mikroskops.

In Abbildung 30 ist die vollständige Filterkonstellation abgebildet und direkt über die Spektren der Farbstoffe gelegt. Die blaue Linie bei 505 nm steht für den im Mikroskop eingebauten Langpass, der den Bereich unterhalb der Rhodamin 123 Emission blockiert. Der orange Strich bei 595 nm gibt an, wo die Trennung in die zwei optischen Kanäle stattfindet. Diese wird mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels im Optosplit erzielt. Das grüne und das rote Rechteck sind Filter, die dazu dienen, ihren jeweiligen Spektralbereich zu säubern: der grüne wird für Rhodamin 123 und der rote für mCherry verwendet.

Der beste Beweis für FRET ist eine Erhöhung der Intensität des Donorsignals, nachdem der Akzeptor geblichen wurde. Die Energie, die der Donor normalerweise an den Akzeptor abgeben kann, wird im geblichenen Zustand nicht mehr aufgenommen

und muss somit in Form eines strahlenden Überganges abgegeben werden. Auf diese Weise ist eindeutig festgestellt, dass das FRET-Paar miteinander wechselwirkt.

Für diesen Test ist eine Betrachtung auf Einzelmolekülniveau nicht geeignet, da nicht gewährleistet werden kann, dass für genau die wenigen Fluorophore, die im Sichtfeld liegen, alle verfügbaren Akzeptoren geblichen worden sind. Daher wird diese Messung als Ensembleexperiment durchgeführt.

Die eigentlichen Messungen werden dann in TIRF durchgeführt, damit Einzelmolekülmessungen möglich sind. In diesem Modus wird die Probe nicht geblichen, sondern nur mit dem Anregungslaser des Donors beschienen. Dann leuchten im Akzeptorkanal nur jene Transporter auf, durch die ein Rhodamin transportiert wird.

5.2. Ergebnisse

Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, besitzt das Anregungsspektrum von mCherry eine langgezogene Schulter bis in den tiefblauen Bereich. Das führt dazu, dass der blaue Laser, der nur Rhodamin 123 anregen soll, zu einem guten Teil auch mCherry anregt. Diese zusätzliche Anregung von mCherry macht es extrem schwer, zwischen einem FRET-Signal und der Direktanregung von mCherry zu unterscheiden. Außerdem bleicht ein Teil des Rhodamins 123 bei dem Bleichprozess von mCherry und macht somit eine sinnvolle Auswertung unmöglich.

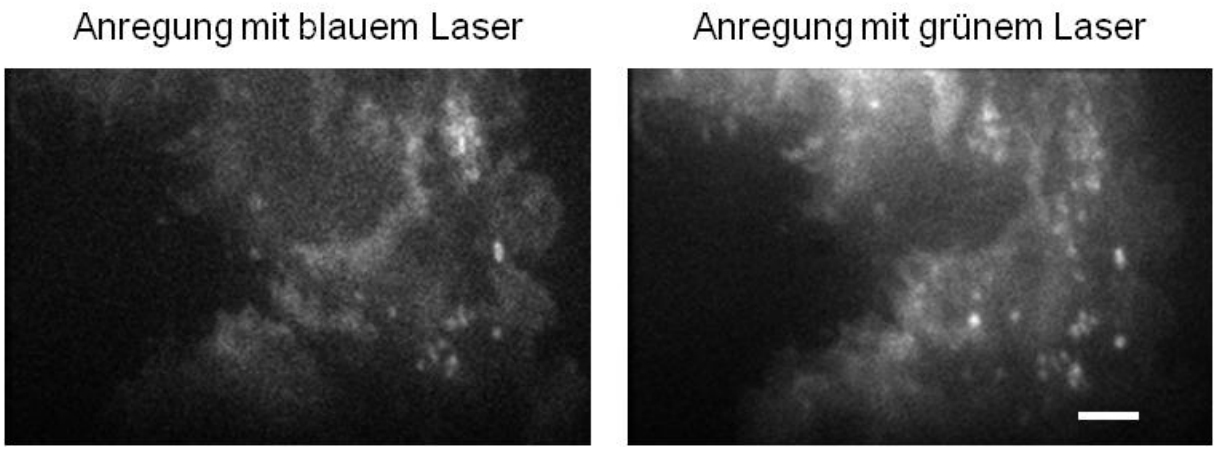

Abbildung 31 mCherry mit blauem und grünem Laser angeregt: Bei Anregung mit blauem beziehungsweise grünem Laserlicht, kommt es zu starken Kreuzanregungen. Der weiße Balken entspricht 6 µm.

Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre die Verwendung eines anderen Akzeptors. Rhodamin 123 kann nicht ersetzt werden, da es sowohl die Rolle des Donors als auch die Rolle des Substrates einnimmt und kein anderer Fluorophor bekannt ist, den MDR 1 transportiert. Um das Bleichen des Donors zu verhindern müsste man den Bleichlaser durch einen mit einer höheren Wellenlänge ersetzten. Auch das kann mit der Wahl eines neuen Akzeptors berücksichtigt werden.

D. Conclusio

Die hier gefundenen Ergebnisse zeigen, dass eine weiterführende Studie für MDR 1 mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie im Allgemeinen und FRET im Speziellen sinnvoll ist.

Der grundlegende Versuchsaufbau dafür ist bereits durch dieses Projekt festgelegt. Durch die Verbindung von MDR 1 mit dem Akzeptor ändert sich nichts an seiner Funktionstüchtigkeit. Rhodamin 123, das gleichzeitig die Rolle des Substrates und des Donors übernimmt, ist ein essentieller Bestandteil der Grundidee.

mCherry hat sich als etwas problematisch erwiesen, da die breite Schulter, die anregungsseitig bis in den Bereich des blauen Lasers bei 488 nm reicht, zu einer sehr hohen ungewollten Hintergrundstrahlung führt. Der Försterradius für Rhodamin 123 und mCherry ist mit 6,1 nm im optimalen Bereich für sensitive Abstandsmessungen in MDR 1, da die beiden Kanäle, durch die das Substrat transportiert werden kann, in etwa den selben Abstand zu mCherry aufweisen. Das bedeutet, dass die Effizienz noch hoch genug ist für Einzelmolekülmessungen und die Sensitivität für Abstandsmessungen am höchsten ist.

Es ist also empfehlenswert nach einem neuen Akzeptor zu suchen, der einen ähnlichen Försterradius mit Rhodamin 123 aufweist, aber dessen linke Flanke des Anregungsspektrums steiler abfällt. Einige gute Kandidaten dafür sind zum Beispiel Alexa 546 oder ATTO 532. Bei diesen beiden Farbstoffen liegt das Emissionsmaximum näher an dem von Rhodamin, was nicht wünschenswert ist, da dadurch die Ansprüche an die Filter größer werden, dafür ist an der Stelle des blauen Lasers die Absorption auf die Hälfte reduziert.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, Fluorophore, die einen anderen Försterradius besitzen, zu verwenden und dafür die Linkerlänge am N-Terminus zu variieren. Aber speziell bei einer Verkürzung des Linkers muss die Funktionalität wieder kontrolliert werden.

Die Bilayer Experimente können auch noch weitergeführt werden, indem andere Modellsysteme verwendet werden. Entweder man bleibt bei einer einzelnen Lipidsorte oder man mischt mehrere Lipide zum Beispiel mit Cholesterol. Eine andere Möglich-

keit ist das Hinzufügen von elektrischen Ladungen zum Bilayer, um eine zusätzliche Anziehung oder Abstoßung zum Rhodamin 123 herzustellen. Dadurch sollte sich die Aufenthaltsdauer im Bilayer deutlich ändern.

Um die Bindungsraten zu MDR 1 in der Zelle weiter zu untersuchen, muss man die Raten quantifizieren, mit der Rhodamin 123 aus der Lösung in den Bilayer eintritt. Dafür benötigt man aber einen anderen Versuchsaufbau oder zumindest eine Erweiterung des bestehenden Systems.

E. Anhang

1. Literaturverzeichnis

[1]. **Berezin, Mikhail Y. und Achilefu, Samuel.** Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews.* 2010, 110 (5), S. 2641–2684.

[2]. **Zeiss, Carl.** Axiovert 200. *Mikroskopie.* S. 29.

[3]. **Zimmer, Marc.** Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. *Chemical Reviews.* 2002, 102, S. 759.

[4]. **TU Graz.** Fluorophores.org Fluorescein. [Online] http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/674.

[5]. **ATTO TEC.** ATTO-TEC. [Online] https://www.atto-tec.com/attotecshop/product_info.php?info=p102_atto-532.html.

[6]. **Forster, Samantha et al.** Characterization of Rhodamine-123 as a Tracer Dye for Use In In vitro Drug Transport Assays. *Plosone.* 2012, 7 (3).

[7]. **TU Graz.** Fluorophoers.org Rhodamine 123. [Online] http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/499.

[8]. **Life Technologies.** Alexa Fluor 546 dye. [Online] http://www.lifetechnologies.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-546.html?icid=fr-af546-main%20http://www.lifetechnologies.com/at/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-546.html?icid=fr-af546-main.

[9]. **Dean, Kevin M. und Palmer, Amy E.** Advances in fluorescene labeling strategies for dynamic cellular imaging. *Nature Chemical Biology.* 2014, 10, S. 512-523.

[10]. **Life Technologies.** DiI Derivatives for Long-Term Cellular Labeling. [Online] http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp06999.pdf.

[11]. **Mobitec.** Dialkylcarbocyanine and Dialkylaminostyryl Probes. [Online] http://www.mobitec.de/probes/docs/sections/1304.pdf.

[12]. **Emaus, Ronald K. et al.** Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1986, 850 (3), S. 436–448.

[13]. **Huang, M. et al.** Mitochondrial Inner Membrane Electrophysiology Assessed by Rhodamine-123 Transport and Fluorescence. *Annals of Biomedical Engineering.* 2007, 35 (7), S. 1276-85.

[14]. **Pollack, Gerald L. und Stump, Daniel R.** *Electromagnetism.* San Francisco : Pearson Education Inc., 2002. S. 493.

[15]. **Enderlein, Jörg et al.** Highly efficient optical detection of surface-generated fluorescence. *Applied Optics.* 1999, 38 (4), S. 724-732.

[16]. **Rust, MJ. et al.** Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods.* 2006, 3 (10), S. 793-5.

[17]. **Moertelmaier, M. et al.** Thinning out clusters while conserving stoichiometry of labeling. *Applied Physics Letters.* 2005, 87.

[18]. **Kusumi, Akihiro et al.** Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal.* 1993, 65 (5), S. 2021-40.

[19]. **Weiss, Matthias et al.** Anomalous Subdiffusion Is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells. *Biophysical Journal.* 2004, 87 (5), S. 3518–3524.

[20]. **Wieser, Stefan et al.** (Un)Confined Diffusion of CD59 in the Plasma Membrane Determined by High-Resolution Single Molecule Microscopy. *Biophysical Journal.* 2007, 92, S. 3719–3728.

[21]. **Schütz, G.J. et al.** Single-Molecule Microscopy on Model Membranes Reveals Anomalous Diffusion. *Biophysical Journal.* 1997, 73, S. 1073-1080.

[22]. **dos Remedios, C.G. und Moens, P.D.J.** Fluorescence resonance energy transfer spectroscopy is a reliable “ruler” for measuring structural changes in proteins - Dispelling the problem of the unknown orientation factor. *Journal of Structural Biology.* 1995, 115, S. 175-185.

[23]. **Olympus.** Microcopy Resource Center. [Online] http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fret/fretintro.html.

[24]. **Jares-Erijman, EA. et al.** FRET imaging. *Nature Biotechnology.* 2003, 21 (11), S. 1387-1395.

[25]. **Muschielok, A. et al.** A nano-positioning system for macromolecular. *Nature Methods.* 2008, 5 (11), S. 965-971.

[26]. **Myong, S. et al.** Repetitive shuttling of a motor protein. *Nature.* 2005, 437, S. 1321-1325.

[27]. **Zal, T. et al.** Photobleaching-Corrected FRET Efficiency Imaging of Live Cells. *Biophysical Journal.* 2004, 86, S. 3923–3939.

[28]. **Engelman, DM.** Membranes are more mosaic than fluid. *Nature.* 2005, 438, S. 578-580.

[29]. **Bagatolli, Luis A.et al.** An outlook on organization of lipids in membranes: Searching for a realistic connection with the organization of biological membranes. *Progress in Lipid Research.* 2010, 49 (4), S. 378–389.

[30]. **Sharom, FJ.** ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* 2008, 9 (1), S. 105-127.

[31]. **Dean, M.** *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily.* [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3/?partid=31] s.l. : Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2002.

[32]. **Gottesman, MM et al.** Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews. Cancer.* 2002, 2 (1), S. 48-58.

[33]. **Alberts, Bruce.** *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.* New York : Garland Science, 2002.

[34]. **Locher, K.P. et al.** The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. 2002, 296, S. 1091–1098.

[35]. **Parveen, Z et al.** Molecular dissection of dual pseudosymmetric solute translocation pathways in human P-glycoprotein. *Molecular Pharmacology.* 2011, 79 (3), S. 443-452.

[36]. **Al-Shawi, M.K.** Catalytic and transport cycles of ABC exporters. *Essays in Biochemistry.* 2011, 50, S. 63–83.

[37]. **Gao, Yongxiang und Kilfoil, Maria L.** Accurate detection and complete tracking of large populations of features in three dimensions. *Optics Express.* 2009, 17 (6), S. 4685-4704.

[38]. **Kusumi, Akihiro et al.** Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 2005, 34, S. 351-378.

[39]. **Plochberger, B. et al.** Cholesterol Slows down the Lateral Mobility of an Oxidized Phospholipid in a Supported Lipid Bilayer. *Langmuir.* 2010, 26 (22), S. 17322–17329.

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Strahlengang in einem Mikroskop:..... 4

Abbildung 2 Spektrum von Rhodamin 123: 5

Abbildung 3 Jablonski-Diagramm des Termschemas für fluoreszente Übergänge: ... 6

Abbildung 4 Struktur von GFP: 8

Abbildung 5 TIRF-Feld:..... 11

Abbildung 6 Airy-Scheibe: 12

Abbildung 7 Messablauf bei STORM:[16]..... 13

Abbildung 8 Messablauf eines TOCCSL Experiments: 15

Abbildung 9 Theoretische Kurven für unterschiedliche Diffusionsverhalten: 17

Abbildung 10 Intensitätskurve bei einer FRAP-Messung:..... 19

Abbildung 11 Effizienz des Energieübertrags in Abhängigkeit des Abstandes:..... 20

Abbildung 12 Plasmamembran:..... 23

Abbildung 13 Struktur von DOPC: 24

Abbildung 14 Die Struktur von MDR 1: 28

Abbildung 15 Konformationen von MDR 1:..... 29

Abbildung 16 Schematischer Transport eines Substrates: 30

Abbildung 17 Aufbau von Setup 2: 31

Abbildung 18 Mikroskop und POCmini: 32

Abbildung 19 Ablauf einer Effluxmessung: 34

Abbildung 20 ROI-Auswahl mittels Optosplit: 35

Abbildung 21 Intensitätskurven einer Effluxmessung: 36

Abbildung 22 Benutzeroberfläche des Programms "particle_tracking_2D": 38

Abbildung 23 Ablauf einer Lokalisierung:..... 43

Abbildung 24 Fitting-Maske auf Pixelraster: 47

Abbildung 25 Grenzwertfindung bei der Lokalisierung: 47

Abbildung 26 Der Tracking Prozess in drei Schritten: 49

Abbildung 27 Verdünnungsreihe von Rhodamin 123: 51

Abbildung 28 Diffusionskonstante im Bilayer:..... 52

Abbildung 29 Biexponentieller Fit: 53

Abbildung 30 Filteraufbau:..... 55

Abbildung 31 mCherry mit blauem und grünem Laser angeregt: 56