

1 Einleitung

Die Aufklärung von Wechselwirkungen zwischen einzelnen Molekülen spielt in vielen naturwissenschaftlichen Arbeitsgebieten eine wichtige Rolle. Die zurzeit dominierenden Methoden auf diesem Gebiet, wie z.B. der Radiorezeptor Assay (RRA) oder Mikrotitermethoden, stoßen allerdings in vielen Fällen an ihre Grenzen. Sind Prozesse mit sehr schnellem An- und Abbindeverhalten zu beobachten oder sind die Affinitätsverhältnisse sehr schwach, so fallen diese intermolekularen Wechselwirkungen häufig aus dem Detektionsbereich heraus. Diese Methoden präsentieren aufgrund der oft notwendigen Trennungsschritte und der Verwendung von standardisierten Membran- oder Rezeptorpräparationen meist statische Daten, welche selten eine Differenzierung innerhalb des detektierten Signals ermöglichen. Auch ist das räumliche Auflösungsvermögen oft zu gering, als dass neben einer Quantifizierung auch eine Lokalisation der ablaufenden molekularen Prozesse möglich wäre. Daher konzentriert sich die Entwicklung von Methoden u.a. auf die Überwindung dieser Limitierungen. Im Bereich der bildgebenden Verfahren ist man durch Techniken, wie die Bildinterferenzmikroskopie in Kombination mit inkohärenter Interferenzlicht Mikroskopie bereits in die Größenordnung makromolekularer Strukturen vorgestoßen und versucht, die in der belebten Natur ablaufenden intermolekularen Prozesse aufzuklären (Gustafsson, 1999). Parallel wächst die Erkenntnis über sich selbst organisierende Systeme und funktionelle Einheiten an der Schwelle zur belebten Materie, was in der Entwicklung von funktionellen Strukturen in den Materialwissenschaften Anwendung findet (Whitesides und Grzybowski, 2002). Die räumliche Auflösung der Detektionsmethoden hat mit dem Vorstoß in den Subångströmbereich durch die Etablierung einer fehlerkorrigierten Elektronenoptik selbst die Darstellbarkeit auf atomarer Ebene erreicht (Batson *et al.*, 2002). Trotz eines immensen Auflösungsvermögens haben viele Methoden den Nachteil, dass sie einen großen Einfluss auf das beobachtete Geschehen nehmen. In Ergänzung dazu stehen fluoreszenzbasierte analytische Methoden bereit, die eine Auflösung biologischer, chemischer und auch physikalischer Prozesse in der Größenordnung einzelner Moleküle ermöglichen. Sie erlauben Untersuchungen, die mit nur geringer Beeinflussung des beobachteten Systems sehr exakte Abbilder der dynamischen Prozesse in biologischen Systemen wiedergeben (Nie *et al.*, 1994; Seisenberger *et al.*, 2001).

Verbesserungen in der Empfindlichkeit fluoreszenzbasierter Methoden erschließen Untersuchungen von Biomolekülen in ihrem nativen Umfeld hinsichtlich ihrer Funktion, ihrer Lokalisation und ihrer Wechselwirkungen untereinander. Besonders Methoden, die sich der konfokalen Mikroskopie bedienen, zeichnen sich durch eine Sensitivität bis hin zur Einzelmoleküldetektion selbst in komplexen Systemen aus. Im Vordergrund stehen hier die konfokale Laser Scanning Mikroskopie (cLSM) und die Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS).

Die Bezeichnung konfokal beschreibt die gleichzeitige Beleuchtung und Abbildung eines Objektes über ein und dieselbe optische Einrichtung, wie z.B. das Objektiv eines Mikroskops. Im Prinzip wird eine punktförmige Lichtquelle durch ein Objektiv, auf eine Objektebene projiziert und das Abbild des so beleuchteten, begrenzten Objektes durch das gleiche Objektiv über eine meist variable Lochblende wieder abgebildet. Wird diese Technik mit der Fluoreszenzmikroskopie verbunden, so bezieht sich der Begriff konfokal auf die epiaxiale Ausleuchtung bzw. Anregung und die Detektion des Fluoreszenzsignals durch die gleiche Optik.

Die großen Vorteile dieses Prinzips bestehen in einer maximalen Reduktion des störenden Hintergrunds und in einem homogenen Anregungsenergiefeld auf kleinstem Raum, unter Einsatz eines Lasers als Lichtquelle. Die maximale Leistungsfähigkeit konfokaler Techniken ergibt sich besonders bei stark verdünnten Proben. Denn für den Fall, dass der mittlere Abstand zweier Moleküle einer Probe größer ist, als der Durchmesser des Anregungs- und Detektionsvolumens, bildet sich im zeitlichen Mittel das Signal eines einzelnen Moleküls in diesem Messaufbau ab (Edman *et al.*, 1996; Eigen und Rigler, 1994; Nie *et al.*, 1994; Rigler und Mets, 1992; Rigler *et al.*, 1992).

Unter Einsatz entsprechender Objektive und sehr kleiner Lochblendeneinrichtungen lassen sich konfokale Beobachtungsvolumina mit Radien kleiner $0,2 \mu\text{m}$ erzeugen. Ein weiterer großer Vorzug der konfokalen Fluoreszenzmethoden ist die geringe Störung des beobachteten Systems während der Messungen. Es lassen sich einzelne Moleküle frei von mechanischen Störungen selbst in komplexer Umgebung, wie es meist für das natürliche Umfeld von Biomolekülen der Fall ist (Hoppert und Meyer, 1999), bei geeignet niedrigem Hintergrund detektieren (Dittrich *et al.*, 2001; Kues *et al.*, 2001; Widengren und Rigler, 1998). Durch die Weiterentwicklung von hochauflösenden Einzelphotonendetektoren und durch die Entwicklung stabiler Fluoreszenzfarbstoffe ist eine zeitliche Auflösung möglich, die auch dynamische

Prozesse im Bereich der Diffusion selbst kleiner Moleküle in Echtzeit erfasst (Cullander, 1999; Gustafsson, 1999; Seisenberger *et al.*, 2001). Diese sowohl räumlich als auch zeitlich hochauflösende Einzelmoleküldetektion lässt sich nun auch *ex-vivo* an der lebenden Zelle einsetzen (Brock und Jovin, 1998; Byassee *et al.*, 2000; Schwille *et al.*, 1999). Dadurch sind ein Abbilden und eine direkte Quantifizierung von dynamischen molekularen Vorgängen, wie z.B. spezifische Wechselwirkungen, Aufenthaltsort und Geschwindigkeit oder Synthese bzw. Abbau von Molekülen in biologischen Systemen, möglich – nun auch an der lebenden Zelle. Im Folgenden wird die Technik der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie und ihr Einsatz in Lebendzellmessungen näher beschrieben.

1.1 Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie

Die FCS ist eine leistungsfähige Methode zur Messung dynamischer Prozesse, unter Beteiligung fluoreszierender Strukturen. Sie basiert auf der Detektion von Fluoreszenzfluktuationen einer durch Laserlicht angeregten Probe, die sich innerhalb eines offenen konfokalen Volumenelements befindet. Diese Fluktuationen werden durch die Diffusion eines Fluorophors hervorgerufen. Geschieht dies im Zustand des thermodynamischen Gleichgewichts, so lässt sich aus der zeitlich korrelierbaren Fluktuationendauer das Diffusionsprofil eines Fluorophors durch das konfokale Volumenelement bestimmen. Handelt es sich dabei um eine hinsichtlich ihres Diffusionsverhaltens und ihrer Fluoreszenzeigenschaften gleichförmigen Population an Fluorophoren, so ergibt sich aus den gaußverteilten Diffusionszeiten eine Diffusionszeitkonstante als substanzspezifische Eigenschaft. Gleichzeitig gibt die Intensität des Signals Aufschluss über die mittlere Anzahl der zeitgleich im Beobachtungsvolumen anwesenden Moleküle. Die sehr kleinen Beobachtungsvolumina, die schnelle störungsfreie Datenaufzeichnung und die hohe Empfindlichkeit, die selbst einzelne Moleküle erfasst, zeichnen diese Methode aus. Auch die zeitgleiche und separationsfreie Bestimmung unterschiedlicher Populationen des gleichen Fluorophors ist mittels FCS möglich, wenn sie sich in ihrem Diffusionsverhalten hinreichend unterscheiden.

Durch das beobachtete Diffusionsverhalten lässt sich eine Molekülpopulation unter gleich bleibenden Umgebungsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Viskosität und stoffliche Zusammensetzung der Lösung einwandfrei identifizieren. Ändert sich aber das spezifische Diffusionsverhalten unter Beibehaltung dieser Parameter, so lassen

sich Rückschlüsse auf eine physiko-chemische Veränderung des untersuchten Moleküls ziehen. Veränderungen dieser Art sind beispielsweise chemische Reaktionen, Assoziationsreaktionen, Dissoziationen, Wechselwirkungen mit Oberflächen oder enzymatische Reaktionen. Eine ganze Reihe solcher Prozesse laufen im Rahmen zellphysiologischer Vorgänge ab. Hier findet man neben kontinuierlichem Auf- und Abbau verschiedener Strukturen ebenso Integrationen in Membranstrukturen, Übergänge in verschiedene Zellkompartimente, Molekül-Molekül Erkennungen, wie Protein-Protein Wechselwirkungen, DNA-DNA bzw. DNA-RNA Interaktionen oder Antikörper-Antigen-Erkennung (Berland, 1997; Bjorling *et al.*, 1998; Dittrich *et al.*, 2001; Hegener *et al.*, 2002; Schurer *et al.*, 2001; Trier *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2001). Zusammengefasst lässt sich ein Großteil der ablaufenden Prozesse mit spezifischer Ligand-Target Interaktion beschreiben. Hier findet sich ein weites Anwendungsfeld der FCS. (Hovius *et al.*, 2000). Bereits in den 1970er Jahren wurde die theoretische Grundlage der FCS erarbeitet (Ehrenberg und Rigler, 1974; Magde *et al.*, 1974; Magde *et al.*, 1972). Durch die Entwicklung hochwertiger Mikroskope und hochsensitiven Photodetektoren –bis zu den modernen Avalanche Einzelphotonendetektoren– wurde diese Methode in den vergangenen Jahren in ihrer Empfindlichkeit stark verbessert (Eigen und Rigler, 1994; Rigler und Widengren, 1990). Auch das Spektrum der zur Verfügung stehenden Anregungswellenlängen erweiterte sich durch neuartige Laserquellen ebenfalls kontinuierlich, so dass viele wellenlängenabhängige Probleme, z.B. störende Hintergrundfluoreszenzen, vermindert werden können. Zusammen mit der parallelen Entwicklung von immer photostabileren und hinsichtlich ihrer Quantenausbeute effizienteren Fluorophoren ist eine Beobachtung dynamischer Prozesse in kleinsten Volumina selbst in komplex aufgebauten Matrices nun möglich geworden (Kinjo und Rigler, 1995; Rauer *et al.*, 1996; Rigler *et al.*, 1992; Webb, 1976). Der heutige Stand der Technik erlaubt durch leistungsfähige Objektive die Beobachtung der Diffusion einzelner Moleküle innerhalb eines Volumens in der Größenordnung von 10^{-15} l. Dies entspricht in etwa dem Volumen eines *Escherichia coli* Bakteriums oder dem tausendsten Raumanteil einer durchschnittlichen Säugerzelle. Die Größenordnung des Beobachtungsvolumens macht so eine messtechnische Auflösung der Zelle in ihre Kompartimente möglich.