

1 Einleitung

1.2 Stand der Forschung

In den letzten Jahren haben fluoreszenzbasierende Techniken für die Untersuchung biologischer Prozesse einen beachtlichen Aufschwung erfahren: Fluoreszenzmethoden sind weitgehend noninvasiv und schnell, gleichzeitig verlässlich, selektiv und hochsensitiv bis hin zur Untersuchung einzelner Moleküle [1,2], was sie für viele (molekular)biologische Anwendungen, zunehmend in der lebenden Zelle, zur Methode der Wahl macht. Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) [3-8] gehört dabei zu den Fluoreszenzmethoden, die sich neben Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer [9,10], zeitaufgelöster Fluoreszenz [11] oder Fluoreszenz-Anisotropie [12], hinsichtlich biologisch-chemischer Fragestellungen auf Einzelmolekülniveau als besonders leistungsfähig herausgestellt und so ein ganz neues Feld biologischer Forschung eröffnet haben [13,14].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Optimierung von optischen Methoden zur Analyse biomolekularer Systeme auf der Basis von FCS in Verbindung mit Zweiphotonenanregung. Besonderes Augenmerk ist dabei auf Techniken zur Aufklärung *enzymatischer* Wechselwirkungen gerichtet, deren Nachweis und Charakterisierung eine Schlüsselrolle beim Verständnis (molekular)biologischer Systeme spielen.

Die Grundidee der FCS besteht darin, spontane Fluktuationen im Emissionssignal einzelner (farbstoffmarkierter) Biomoleküle statistisch zu analysieren, um so Informationen über die zugrunde liegenden Dynamiken zu erhalten. Dabei nutzt man aus, dass emittierte Fluoreszenzphotonen nur dann zeitlich korreliert sind, wenn sie von ein und demselben Molekül ausgesandt werden. Über die Korrelationsanalyse der Photonen können entscheidende Aussagen z.B. über die Mobilität eines Moleküls, die mittlere Anzahl oder die relativen Anteile verschiedener Molekülarten getroffen werden. Das entsprechende Beobachtungsvolumen, ist dabei durch den Einsatz eines Wasser- oder Ölimmersionsobjektivs hoher numerischer Apertur ($\geq 0,9$) und der Laseranregung extrem klein, zwischen 0,1-1 Femtoliter (10^{-16} - 10^{-15} l), was maximal in etwa der Größe eines *E.coli*-Bakteriums entspricht. Die aus der Fokalregion eingesammelten Photonen werden konfokal auf eine hochsensitive Photodiode abgebildet, wobei eine Lochblende in der Bildebene die axiale Auflösung gewährleistet [6].

Varianten der FCS wurden bereits zu Beginn der 70er Jahre etwa gleichzeitig von Elson & Magde [5], sowie Ehrenberg & Rigler [8] zur Untersuchung dynamischer Prozesse auf molekularer Ebene eingesetzt. Jedoch erst durch den Einsatz konfokaler Mikroskopoptik in Kombination mit der Entwicklung hochempfindlicher Photonenzählwerke (Avalanche-Photodioden) und schneller Messtechnik hat sich dieses Verfahren im Laufe der letzten Jahre erfolgreich etabliert. Besonders durch die richtungsweisende Arbeit von Eigen & Rigler [7] in den 90er Jahren wurden eine Vielzahl bedeutender Anwendungsgebiete für die Diagnostik und Entwicklung neuer funktionaler Biomoleküle erschlossen. Heute macht die Kombination von Geschwindigkeit, Genauigkeit und Empfindlichkeit die FCS zu einer der leistungsfähigsten Methoden in der Analyse molekularer Dynamiken und Wechselwirkungen [15-18].

Die ersten FCS-Anwendungen beschäftigten sich hauptsächlich mit der Konzentration und Mobilität von Molekülen, wie dem translatorischen Diffusionsverhalten [3-5, 19-20], bzw. der Rotationsdiffusion [8]. Hinzu kamen Untersuchungen im laminaren Fluß [21], die Rückschlüsse auf Transporteigenschaften von Fluorophoren zulassen [22-23]. In den letzten Jahren stand eher das diagnostische Potential dieser Methode im Vordergrund, wie viele Veröffentlichungen eindrucksvoll belegen [7,17, 24-26]. Allen gemeinsam ist das Ziel, komplexe Abläufe zwischen Biomolekülen zu verstehen und einzuordnen. Dabei versteht man unter ‚Biomolekül‘ all solche Moleküle, die zu funktionalen Abläufen in einem Organismus beitragen. Als Beispiel ist hier vor allem das Erbgutmolekül DNA (Desoxyribonukleinsäure) zu nennen, in dessen Sequenz die gesamte Erbinformation eines Organismus gespeichert ist: Durch das Zusammenspiel von DNA und Ribonukleinsäure (RNA) werden Proteine mit verschiedensten Aufgaben gebildet.

Biologische Systeme sind viel komplexer als die Untersuchungsobjekte der ‚klassischen‘ Physik. Sie lassen sich nicht so einfach in Grundelemente zerlegen und isoliert betrachten: So hängt z.B. die Funktion eines Proteins entscheidend von dessen dreidimensionaler Struktur ab, das Wissen um die Bausteine allein (22 Aminosäuren) liefert keine entsprechende Aufklärung. Im Allgemeinen funktionieren Biomoleküle nur durch einen regen Stoff- und Energieaustausch mit ihrer Umgebung. Schon die Frage, was denn Leben sei, ist auf molekularer Ebene schwer zu beantworten: Eine *lebende* Zelle enthält nämlich die gleichen Moleküle wie kurz nach dem Zelltot. Eine weitere Herausforderung: Lebende Systeme arbeiten weitab von jeglichem thermischen Gleichgewicht. Ihre komplizierten, dynamischen Prozesse organisieren sich von selbst. Charakteristisch für biologische Systeme ist auch, dass sie Informationen in ihrem ‚Genom‘ speichern und in komplexe Lebensfunktionen umsetzen.

Neben Aufbau und Struktur der beteiligten Spezies ist vor allem der detaillierte Mechanismus ihrer Wechselwirkung von großem Interesse. Mittels FCS können solche elementaren Informationen gewonnen werden, insbesondere Assoziations- und Dissoziationsprozesse verschiedenster Art lassen sich mit Hilfe von FCS zuverlässig und schnell analysieren [24-31]. Hier hat sich speziell die Zwei-Farben Kreuzkorrelationsanalyse als leistungsfähige FCS-Variante etabliert [26-30]. Diese Methode erlaubt es, unter Hinzunahme eines zweiten Markierungsfarbstoffs und eines weiteren Detektors zwei Farbstoffsysteme innerhalb desselben Beobachtungsvolumens gleichzeitig zu untersuchen. Durch die Berücksichtigung dieser beiden spektral unterscheidbaren Signale der verschiedenen Spezies innerhalb der Korrelationsvorschrift kann z.B. ein zweifarbiges Reaktionsprodukt hochspezifisch identifiziert werden, ohne dass eine räumliche Trennung von Ausgangsstoffen und Produkten erforderlich ist.

Vorgestellt wurde die Idee der Zwei-Farben-Kreuzkorrelation zur Analyse biologisch-chemischer Systeme in den 90er Jahren von Eigen und Rigler [7]. Die erste experimentelle Umsetzung und detaillierte theoretische Ausarbeitung eines solchen Systems gelang 3 Jahre später Schwille [27-28, 32] anhand Messungen der Hybridisierung zweier unterschiedlich markierter DNA-Oligonukleotide. Andere Anwendungen folgten [17], so wurde z.B. von Rigler et al. das Konzept auf die Detektion amplifizierter PCR-Produkte angewandt [33]. Das Konzept der Kreuzkorrelationsanalyse ist jedoch keinesfalls auf die Untersuchung von DNA-DNA-Wechselwirkungen beschränkt, sondern kann ebenfalls zur Analyse von Protein-

Protein-Wechselwirkungen und anderer relevanter Dissoziations- oder Assoziationsprozesse herangezogen werden. Dazu gehören z.B. Prion-Protein-Aggregationen, wie kürzlich von Bieschke et al. [26] anhand hochsensitiver Messungen gezeigt werden konnte. Insbesondere diese Anwendung verdeutlicht das große Potential des Kreuzkorrelationskonzepts für hochempfindliche Diagnostikverfahren, hier speziell bzgl. Prionerkrankungen wie die momentan ins aktuelle Licht gerückte bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) und ihr Gegenstück im Menschen, die Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung (CJD), sowie die in der Bevölkerung weit verbreitete Alzheimersche Erkrankung. Weitere Anwendungsfelder erschließen sich überall dort, wo maximale Auflösung auch bei kurzen Messzeiten gefordert ist. Hier bieten die hochsensitiven FCS-Konzepte beste Voraussetzungen. So ist z.B. mittels Zwei-Farben-Kreuzkorrelationskonzepten die direkte Beobachtung enzymatischer Prozesse möglich [29,31]. Kettling et al. zeigten dies anhand des Verdaus eines DNA-Substrats durch die Endonuclease *EcoRI*, den sie mittels FCS quasi in Echtzeit verfolgen konnten [29].

Weiter konzentrieren sich aktuelle FCS-Methodenentwicklungen und Anwendungen darauf, oben genannte Fragestellungen nicht nur *in vitro*, sondern auch intrazellulär (*in vivo*) oder auf Zelloberflächen (Membranen) zu untersuchen. Da die Erzeugung eines Laserfokus zunächst einmal als quasi-noninvasiv betrachtet werden kann, stellt die FCS hierfür ein ideales Werkzeug dar. Obwohl die FCS offensichtlich attraktiv ist für *in vivo*-Applikationen, sind bisher nur einige relevante FCS-Analysen in Zellen bekannt. Diese beschäftigen sich vorrangig mit molekularer *Mobilität* von DNA und Proteinen in verschiedenen Bereichen der Zelle, wie im Zellkern, im Cytosol oder in der Zellmembran [24, 34-39]. Insbesondere die *intrazellulären* Messungen verlangen eine extreme Sorgfalt in der Auswahl der optischen Methoden. Neben der hohen Empfindlichkeit der Methode muss eine Schädigung der Zellen oder des Gewebes ausgeschlossen oder zumindest minimiert werden. Oft macht den Experimentatoren die Zellschädigung durch Lichtabsorption und -streuung, die Autofluoreszenz der Zellen, schlechte Signalqualität, sowie irreversibles Photobleichen der Farbstoffvorräte in den Zellkompartimenten stark zu schaffen. Ziel sollte deshalb sein, nicht die gesamte Zelle, sondern nur den unmittelbaren Fokalebereich auszuleuchten. Als mögliche Lösung hat sich in den letzten Jahren die Zwei- oder Mehrphotonenanregung mit IR-Licht erfolgreich etabliert [38, 39-40], die im Imaging-Sektor bereits weit verbreitet ist [34, 40-42]. Hierbei werden durch gepulste Hochleistungslaser starke temporäre Photonendichten erzeugt, die es erlauben, Fluorophore mit zwei simultan (d.h. im Zeitfenster von ca. 10^{-15} s) einfallenden Photonen der halben Energie (der doppelten Wellenlänge) anzuregen. Bei diesem nichtlinearen Anregungsprozess, der durch die quadratische Intensitätsabhängigkeit räumlich hochselektiv ist, entfällt der übliche Anregungslichtkegel, und die Bestrahlungsschädigung (Photodekonstruktion) von Zelle und Farbstoff außerhalb des Messvolumens wird erheblich reduziert. Zudem erzeugt das NIR-Licht, das üblicherweise für die Zweiphotonenanregung eingesetzt wird, weniger Hintergrund durch Streuphänomene und hat größere Eindringtiefen in Gewebe.

Auch außerhalb zellulärer Anwendungen lassen sich die Vorteile der Zweiphotonenanregung TPE (Two-Photon Excitation) im Rahmen von FCS-Anwendungen nutzen: So lässt die durch TPE inhärent erzeugte Tiefenschärfe eine Vereinfachung des experimentellen Aufbaus zu und eröffnet so neue Möglichkeiten bezüglich Flexibilität und Stabilität des Messsystems [41].

Auch die Unterdrückung von Streulicht in der Detektion wird erleichtert, da die Zweiphotonen-Anregungswellenlänge spektral stets weit entfernt von der sichtbaren Fluoreszenz der eingesetzten Farbstoffmoleküle liegt. Besonders attraktiv ist die TPE-kombinierte FCS im Hinblick auf *mehrfarbige* Konzepte, die speziell für die hier thematisierten Untersuchungen komplexer molekularer Wechselwirkungen unverzichtbar sind: So ist es mittel TPE-basierender FCS aufgrund unterschiedlicher Auswahlregeln und Schwingungskopplung möglich, mehrere und bzgl. der Emission spektral separierbare Fluorophore gleichzeitig mit nur *einer* Laserlinie effizient anzuregen und zu detektieren.

2.2 Ziele dieser Arbeit

Die eingehende Charakterisierung solcher mit nur einer Laserlinie anregbaren Farbstoffsysteme unter TPE wird Teil dieser Arbeit sein und in Bezug auf die Vorbereitung der anschließend vorgestellten Anwendungen, die Voraussetzungen für optimale Analyse-Bedingungen schaffen. Als methodische Basis dient die Kreuzkorrelationsanalyse, die mit Zweiphotonenanregung kombiniert wird. Zur experimentellen Realisierung wird zunächst ein flexibler konfokaler Aufbau entwickelt, der die Detektion von bis zu drei Farben ermöglicht. Das neuartige Analysekonzept wird anschließend auf biologisch-biochemische Fragestellungen im Bereich enzymatischer Wechselwirkungen angewandt, schrittweise erprobt, diskutiert und erweitert.

An erster Stelle steht die Entwicklung eines zweifarbigen Konzepts, welches an die bereits etablierte Kreuzkorrelationsanalyse in Kombination mit OPE anknüpft. Als Testexperiment dient eine enzymatische Reaktion, durch die ein Substrat, bestehend aus einem doppelt markierten dsDNA-Doppelstrang, durch die Restriktionsendonuklease *EcoRI* in zwei einfach markierte Produkte gespalten wird. Dieses Assay wurde in der Arbeitsgruppe entwickelt und im Rahmen früherer Studien bereits mittels ‚klassischer‘ Kreuzkorrelationsanalyse untersucht [28-29], so dass hier die direkte Vergleichbarkeit der beiden Kreuzkorrelationskonzepte gegeben ist und die Ergebnisse der neuen Variante zusätzlich abgesichert werden können.

Unter besonderer Berücksichtigung der Analyse schneller (enzymatischer) Reaktionen wird weiterführend ein vereinfachter Algorithmus (Koinzidenzanalyse) [31] erprobt, der die Information der Kreuzkorrelation auf eine Ja/Nein-Entscheidung reduziert und die schnelle Datenanalyse bei maximaler Verlässlichkeit unterstützen kann. Da die statistische Qualität der Daten maßgeblich von der experimentellen Parameterauswahl abhängt, wird hier zusätzlich eine solche für zweiphotonenkombinierte Koinzidenzanalyse erarbeitet und ein potentieller kommerzieller Einsatz dieser Methode im Bereich der Biotechnologie diskutiert.

Anschließend ist ein reines Protein-Assay mit klonierbaren Zielproteinen Gegenstand der Analyse, indem der Verdau eines Fusionsproteins, bestehend aus den autofluoreszierenden Proteinen rsGFP und dsRed, in Lösung verfolgt wird. Dieses Assay wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe entwickelt [43] und ist so konzipiert, dass parallel zu den Kreuzkorrelationsexperimenten noch eine andere hochsensitive Fluoreszenzmethode zu Rate gezogen werden kann, nämlich die Analyse des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET), der die Ergebnisse der FCS-Experimente bekräftigen soll und umgekehrt.

Für die erste intrazelluläre Realisierung der Kreuzkorrelationsanalyse unter TPE wird im Rahmen eines internationalen Kooperationsprojekts ein geeignetes Protein-Assay in HEK-Zellen (Human Emryonic Kidney) entwickelt, welches erlaubt, die Bindungseigenschaften von Calmodulin (CaM) und Ca^{2+} -CaM-abhängiger CaM-Kinase-II, deren Interaktion die Signaltransduktion in Zellen maßgeblich mitbestimmt, unter verschiedenen Bedingungen in der Zelle zu analysieren.

Der vorerst abschließende Schritt der Methodenentwicklung auf der Basis von Kreuzkorrelation und TPE ist die Ausarbeitung einer *dreifarbig* Variante, durch die noch komplexere molekulare Interaktionen Gegenstand der Analyse werden könnten. Im Rahmen dieser Arbeit wird die dreifarbige Detektion und Auswertung zunächst an einem möglichst einfachen Testsystem in Form eines dreifach farbstoffmarkierten DNA-Assays in Lösung erprobt, und zwar anhand einer Hybridisierungsreaktion *drei* verschiedenfarbig markierter DNA-Oligonukleotide an einen gemeinsamen unmarkierten DNA-Strang, sowie des anschließenden enzymatischen Verdau. Im Vordergrund steht die ausführliche Charakterisierung des Systems, besonders die Beurteilung der erreichbaren Signalspezifität bei der Bestimmung des Hybrid-Dreierkomplexes.