

# Das grüne Leuchten

Dem Molekül auf der Spur



## 1. Einleitung: Nachweis einzelner Moleküle in der lebenden Zelle

Der Nachweis einzelner Moleküle in lebenden Zellen stellt das ultimative analytische Instrument in der Zellbiologie dar. Entsprechend vielfältig sind die Forschungsbemühungen in den letzten Jahren, um bestehende Verfahren, wie beispielsweise die Fluoreszenzmikroskopie oder Massenspektroskopie, in ihrer Empfindlichkeit zu verbessern. Dabei ist es bisher allein im

Bereich der optischen Mikroskopie gelungen, verlässlich einzelne Moleküle in lebenden Zellen nachzuweisen. Diese Verfahren ermöglichen teilweise bereits jetzt einen neuen Zugang zu zellbiologischen Prozessen, der auch die Systembiologie befruchtet wird. Im Folgenden sollen die wesentlichen Grundlagen der Technik erläutert und Möglichkeiten sowie Limitierungen beschrieben werden.

Die optische Mikroskopie ist die tragende Säule in der Darstellung zellulärer Pro-

zesse. Die am häufigsten benutzten Formen sind dabei die Transmissions-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie. Aufgrund der Möglichkeit spezifisch einzelne Proteinsorten mittels Farbstoffen anzufärben hat sich die Fluoreszenzmikroskopie als besonders leistungsfähiges Werkzeug erwiesen. In der jüngeren Vergangenheit ist es zudem gelungen, die räumliche Auflösung durch die Konfokalmikroskopie oder die Verwendung einer strukturierten Beleuchtung in der Weitfeldmikroskopie zu verbessern.

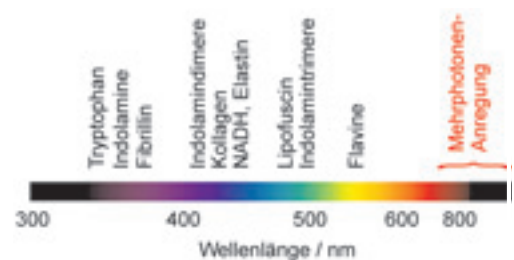
In der Tat ist es auch die Fluoreszenzmikroskopie, die den Nachweis einzelner Moleküle erlaubt. Entscheidend hierfür ist es zunächst, dass es gelingt, genau *ein* Molekül zur Fluoreszenz anzuregen und diese Fluoreszenz auch nachzuweisen. Ein einfaches Rechenbeispiel soll zeigen, dass beides – zumindest unter gewissen Voraussetzungen – technisch realisierbar ist. Ein Fluoreszenzmikroskop besteht aus einer Lichtquelle, in der Regel einem Laser, der in einem Konfokalmikroskop auf ein möglichst kleines Probenvolumen fokussiert wird. Die Abmessung dieses Volumens ist durch die Beugung des Laserstrahls begrenzt und beträgt ca.  $0,025\mu\text{m}^3$ . Nur die in diesem Volumen angeregte Fluoreszenz wird auch nachgewiesen. In diesem Probenvolumen befinden sich ca.  $10^8$  Moleküle der Zelle, von denen nur eines fluoresziert. Erreicht wird diese hohe Selektivität durch eine geeignete Wahl der Laserwellenlänge und eine spezielle Markierung der nachzuweisenden Moleküle mittels geeigneter Farbstoffe. Die meisten in der Zelle vorhandenen niedermolekularen Verbindungen zeigen bei Anregungswellenlängen oberhalb von 550nm keine Fluoreszenz mehr (O1). Auch Proteine lassen sich in diesem Fall nicht mehr effektiv zur Fluoreszenz anregen. Nur eigens in die Zelle eingebrachte Farbstoffe oder von der Zelle synthetisierte Proteine absorbieren bei dieser oder längeren Wellenlängen. Zudem kann eine intensive langwellige Anregung durch die Absorption von zwei Photonen (anstelle eines einzigen Photons bei niedrigen Intensitäten) zu einer weiteren Steigerung der Selektivität in der Anregung führen. Unterstützt wird dies dadurch, dass viele interessante Proteinarten, wie z.B. einige Membranrezeptoren in der Zelle in solch geringen Mengen vorkommen, dass sich in einem Probenvolumen von  $0,025\mu\text{m}^3$  gerade ein Protein befindet.

Durch den Laser wird der an dem Protein befindliche Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt. In einem optimal aufgebauten Mikroskop wird ca. 1 Prozent des Fluoreszenzlichtes nachgewiesen. Ein guter Fluoreszenzfarbstoff emittiert ca.  $10^6$  Photonen pro Sekunde, falls der optische Übergang gesättigt wird. Damit können bis zu  $10^4$  Photonen pro Sekunde zum Detektor gelangen. Da heutzutage die Nachweisempfindlichkeit der Detektoren für Photonen in einem Wellenlängenbereich von 500nm–900nm bis zu 80 Prozent beträgt, bei nahezu keinem Eigenrauschen der Detektoren, werden diese Photonen auch vom Mikroskop nachgewiesen. Ausgewählte Farbstoffmoleküle emittieren also ausreichend Photonen, so dass einzelne Moleküle leicht detektiert werden können. Entscheidend für den erfolgreichen Nachweis einzelner Moleküle in Zellen ist es vielmehr, wie viele unspezifisch emittierte Photonen (Autofluoreszenz der Zelle) gleichzeitig mit dem Fluoreszenzsignal des Moleküls zum Detektor gelangen.

Wie bereits erwähnt, kann mittels geeigneter Auswahl der Zellen und der Wachstumsbedingungen diese Autofluoreszenz minimiert werden. Weiterhin spielt die Wahl der Anregungswellenlänge eine entscheidende Rolle. In der Regel gilt dabei: je langwelliger die Anregungswellenlänge, desto geringer die Autofluoreszenz der Zelle. Daher ist die Zweiphotonenabsorption, bei der zwei langwellige Photonen statt einem kurzwelligeren zur Anregung benutzt werden, eine geeignete Methode zur Unterdrückung der Autofluoreszenz. In der Regel wird unter günstigen Umständen ein

## ZUSAMMENFASSUNG

*In der Systembiologie sind analytische, experimentelle Methoden wichtig, um zuverlässige Daten und Parameter für die Modellierung der biologischen Systeme zu gewinnen. Neben der Fluoreszenzmikroskopie erhält in Stuttgart die Einzelmolekülmikroskopie eine zunehmend wichtige Rolle. Es werden Methoden entwickelt, die eine möglichst genaue Messung der entscheidenden Schlüsselparameter zellulärer Prozesse leisten können. Entscheidend ist dabei, die Fluoreszenz einzelner Moleküle nachzuweisen, um somit den zellulären Prozessen „zusehen“ zu können. Hier macht man sich die Entdeckung zunutze, dass die Fluoreszenz einer Qualle von einem relativ kleinen Protein stammt, dem GFP (green fluorescent protein). Da man die Zelle veranlassen kann, das fluoreszierende GFP an einem bestimmten interessierenden Zielprotein anzuhängen, war der entscheidende Marker gefunden. Mit den Messmethoden der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy) und der Fluoreszenz-Kreuzkorrelationspektroskopie (FCCS, Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy) können die Stuttgarter nun nachweisen, ob ein Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem anderen Protein oder in einen Proteinkomplex gebunden ist oder nicht; eine wichtige Voraussetzung zur Aufklärung der Signalkaskaden in der Zelle, mit denen diese auf ihre Umgebung reagiert und ihre Reproduktion oder auch den Zelltod reguliert.*



*Darstellung der verschiedenen intrazellulären Substanzen, die zur Autofluoreszenz der Zelle beitragen als Funktion ihrer Absorptionswellenlänge. Aus der Abbildung wird sichtbar, dass im langwelligeren roten Bereich praktisch keine Autofluoreszenz angeregt wird. Durch gezielten Einsatz von Mehrphotonenabsorption kann dies ausgenutzt werden, um die Autofluoreszenz bei der Anregung einzelner Moleküle zu unterdrücken.*



Piezo · Nano · Positioning **PI**

Multiachsen Piezo-Nanopositionier-Tisch! PIMars  
**Riesenhub und viele Achsen**

■ nm Auflösung ■ bis 6 DoF ■ Ultra schnell ■ bis 300 µm

[www.pi.ws/martf](http://www.pi.ws/martf)

Wir öffnen Nanowelten | [www.pi.ws](http://www.pi.ws)

Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG · Tel. 0721 4846-0

Signal-zu-Rausch-Verhältnis von ca. 5:1 erreicht. Dieses reicht aus, um einzelne Moleküle in lebenden Zellen nachzuweisen und auch ihre Diffusion oder den Transport zu bestimmen.

Eine weitere Herausforderung besteht in der Photostabilität der verwendeten Farbstoffe. Wie in der klassischen Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie unterliegen die Farbstoffe dem Photobleichen, d.h. durch die optische Anregung werden chemische Modifikationen induziert, die dazu führen, dass der Farbstoff nicht mehr (oder bei einer anderen Wellenlänge) fluoresziert. Die besten Farbstoffe emittieren zwischen  $10^7$  bis  $10^8$  Photonen bevor sie „photobleichen“. Dies führt dazu, dass einzelne Farbstoffe in lebenden Zellen nur einige 10 Sekunden kontinuierlich verfolgt werden können, bevor sie einer irreversiblen photochemischen Reaktion unterliegen. Entsprechend intensiv werden Bemühungen verfolgt, stabilere Farbstoffe zu verwenden. In diesem Zusammenhang kommen Halbleiternanopartikeln eine wichtige Rolle zu, da sie sich als besonders photostabil herausgestellt haben.

## 2. Einzelmolekülmikroskopie und Systembiologie

Ein Forschungsgebiet, das von der Systembiologie bearbeitet wird, sind so genannte Signalkaskaden. Eine einzelne Zelle nimmt ihre Umgebung in der Regel durch chemische Signale wahr. So können etwa Einzeller einen Gradienten einer Molekülsorte, die als Nahrung dient, erkennen, diese Information verarbeiten und darauf reagie-

ren, indem die Zelle sich auf die Nahrungsquelle zu bewegt. Eine weitere Gruppe von chemischen Stoffen signalisiert eine Gefahr, z.B. durch Viren und Bakterien, mechanischen Stress oder eine toxische Umgebung. Bei höheren Organismen kommen die vielfältigen Mechanismen hinzu, die eine Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen innerhalb eines Organs oder auch zwischen verschiedenen Organen ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist der programmierte Zelltod (Apoptose). In einem höheren Organismus ist es essentiell, dass Zellen, die ihre Funktion nicht mehr korrekt erfüllen, durch neue Zellen ersetzt werden. Hierbei ist es entscheidend, dass zum einen keine gesunden Zellen abgebaut werden und andererseits, dass der Prozess wohl definiert abläuft, d.h. keine für benachbarte Zellen schädlichen Substanzen, wie z.B. eiweißspaltende Enzyme, freigesetzt werden. Es gibt verschiedene Signale, die eine Zelle zum programmierten Zelltod veranlassen können, die aber immer auf der Ausschüttung einer Molekülsorte durch das Immunsystem beruhen. Zellen, die mit diesem Signal in Berührung kommen, entscheiden quasi selbstständig, wie auf das Signal reagiert wird, also ob der programmierte Zelltod eingeleitet wird oder nicht. Die Beschreibung der Signalverarbeitung auf das Todesignal, aber auch auf jedes andere Signal, das eine Zelle empfangen kann, ist auf molekularer Ebene komplex und man ist heutzutage weit davon entfernt, eine beliebige Signalkaskade einer Zelle auf molekularer Ebene präzise in ihrem raumzeitlichen Ablauf zu beschreiben.

Wie kann man sich eine solche molekulare Beschreibung vorstellen? Das Signalmolekül bindet an einen bestimmten Rezeptor, da dieser eine Bindungsstelle hat, die z.B. genau entgegengesetzt geladen ist, wie die Bindungsstelle des Signalmoleküls, so dass eine starke anziehende Wechselwirkung entsteht. Durch den Bindungsvorgang wird der Rezeptor auf der Innenseite der Zelle leicht verformt, da dies energetisch etwas günstiger ist. Dadurch werden wiederum zuvor verborgene Bindungsstellen freigelegt, an die Enzyme, die hochspezifisch andere Proteine zerschneiden können, aus dem Zellinneren binden können. Diese Enzyme sind eigentlich inaktiv, können aber nun, da sie sehr dicht beieinander sind, sich gegenseitig modifizieren, so dass aktive Enzyme entstehen. Diese wiederum können dann andere inaktive Proteine aktivieren. Allein diese kurze Sequenz zeigt, dass eine molekulare Beschreibung nicht nur sehr lang, sondern auch kompliziert werden kann, insbesondere, wenn man bedenkt, dass in vielen Signalkaskaden hunderte von verschiedenen Proteinen eine Rolle spielen.

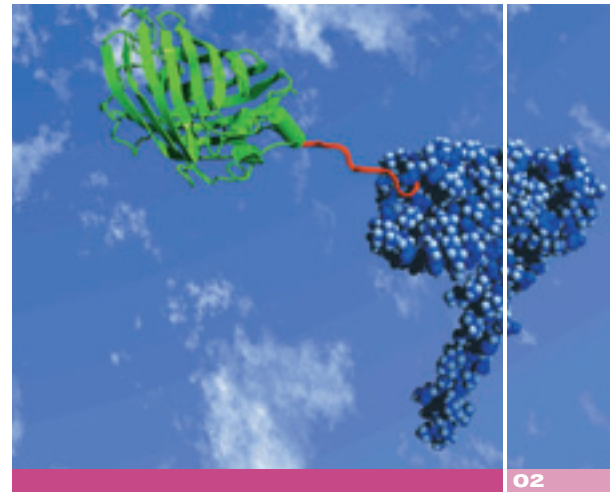
Der Ansatz der Systembiologie, diese Sisyphusarbeit der molekularen Beschreibung auf ein System zu reduzieren, das mit sehr wenigen Parametern auskommt und trotzdem das Ergebnis einer Signalkaskade korrekt beschreibt, ist sehr verlockend. Es ist leicht einzusehen, dass nicht jeder Schritt in der Signalkaskade genau bekannt sein muss. Oft ist nur notwendig, dass wichtige Zwischenschritte erfasst werden. Im zuvor genannten Beispiel ist dies die Aktivierung eines Proteins, das nuklearer Faktor genannt wird und das nach Aktivierung in den Zellkern vordringt, um Gene zu aktivieren, wodurch dann die Produktion von anderen Proteinen veranlasst wird. In diesem Prozess ist der nukleare Faktor das Nadelöhr der Prozessgeschwindigkeit. Wenn man von Stuttgart nach München fährt und auf der A8 im Stau steht, ist es für die Gesamtfahrzeit völlig egal, wie man in Stuttgart auf die Autobahn gefahren ist, sondern nur wie lang der Stau ist. Solche Schlüsselstellen der Signalkaskade sind entscheidend für eine erfolgreiche Simulation der Kaskade. Hier können kleine Abweichungen in der Parametrisierung großen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben. Es ist also entscheidend, dass man Methoden zur Verfügung hat, die eine möglichst genaue Messung der Schlüssel-

parameter liefert. Genau an dieser Stelle spielt die Einzelmolekülmikroskopie eine wichtige Rolle.

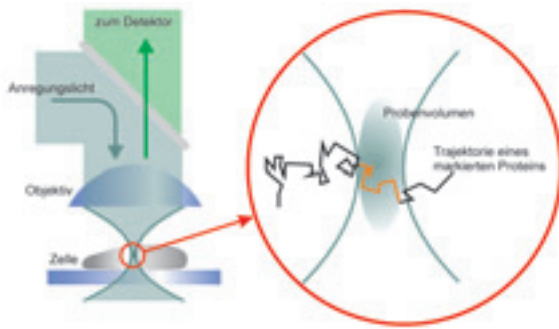
Verschiedene zellbiologische Untersuchungen haben zudem in der jüngsten Vergangenheit gezeigt, dass Fluktuationen selbst den Ort und den Zeitpunkt eines bestimmten biochemischen Prozesses in einer Zelle bzw. einem Organismus bestimmen können. Ein Beispiel ist die Zellteilung, bei der die Orientierung der mitotischen Spindel durch die (räumlich begrenzte) Fluktuation in der Konzentration eines bestimmten Proteins induziert wird. Auch hier vermag räumlich hochauflösende und ultraempfindliche Fluoreszenzmikroskopie neuartige Einblicke zu liefern, indem nämlich diese Fluktuationen direkt anhand der Fluoreszenzintensität nachvollzogen werden können. Im Folgenden soll dargestellt werden, warum hochsensitive Mikroskopietechniken, bis hin zur Einzelmoleküldetektion, das geeignete Werkzeug sind, um Parameter für die Modellierung zu bestimmen.

### 3. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie: Statistische Schwankungen unter dem Mikroskop

Obwohl viele verschiedene Proteinsorten an Signalkaskaden beteiligt sind, ist die Konzentration der einzelnen Sorten teilweise sehr gering, d.h. in der Zellmembran bzw. im Zellinneren (im Zytoplasma) befinden sich lediglich einige Tausend Proteine einer Sorte. Für eine typische Säugerzelle bedeutet dies z.B., dass der mittlere Abstand zwischen zwei Rezeptorproteinen in der Zellmembran im Bereich einiger hundert Nanometer liegt, also im Bereich der Auflösung eines optischen Mikroskops. Wenn pro optisch auflösbarem Bereich aber nur ein Protein vorhanden ist, müssen einzelne Moleküle detektiert werden können, um überhaupt noch ein nachweisbares Signal zu erhalten. Dies ist nur möglich mittels höchstempfindlicher Fluoreszenzmikroskopie. Das Problem ist nun, dass Proteine in der Regel nicht fluoreszieren. Wie schafft man es, dass Proteine, und zwar nur Proteine der Sorte, die von Interesse



Die Abbildung zeigt einen Membranrezeptor, an dem ein Grünfluoreszierendes Protein (GFP) befestigt ist. Bei einer optischen Anregung mit einer Wellenlänge von 500 nm fluoresziert nur das GFP.



03

Schematische Darstellung des konfokalen Strahlenganges. Die Ellipse im unteren Teil der Abbildung symbolisiert das Fokalvolumen der Anordnung und ist rechts in der Abbildung vergrößert dargestellt. Die Linie im Fokalvolumen soll den Diffusionspfad eines einzelnen Moleküls andeuten.

ist, fluoreszieren? Hier macht man sich die Entdeckung zunutze, dass die Fluoreszenz einer Quelle von einem relativ kleinen Protein stammt, dem GFP (*green fluorescent protein*). Es ist möglich, das Erbgut einer Zelle so zu verändern, dass sie anstelle des Proteins von Interesse, z.B. dem TNF-Rezeptor, ein so genanntes Fusionsprotein aus

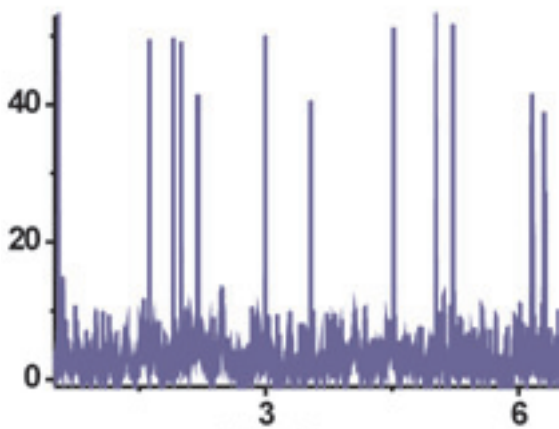
TNF-Rezeptor und GFP produziert, also einen Rezeptor, an dessen Ende ein GFP angehängt wurde (02). Bestrahlt man die Zelle nun mit blauem Licht, so leuchten die GFPs grün, und da sie direkt mit den Rezeptoren verbunden sind, stammt diese grüne Fluoreszenz direkt von den Orten, an denen sich der Rezeptor befindet. Man hat also eine Methode, um Gen-spezifisch Proteine zu markieren.

Es ist leicht einzusehen, dass GFP aus der Zellbiologie mittlerweile nicht mehr wegzudenken ist. Obwohl nicht optimal, sind die Fluoreszenzeigenschaften des GFP glücklicherweise gut genug, um einzelne GFP-Moleküle detektieren zu können. Dies wird in einer Messmethode ausgenutzt, die sich Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie nennt (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*). Mit FCS können Diffusionskonstanten und mit Einschränkungen auch Konzentrationen gemessen werden. Diese Methode soll im Folgenden kurz erläutert werden.

(03) zeigt den schematischen FCS-Aufbau.

Genau wie in der Konfokalmikroskopie wird nicht die gesamte Zelle beleuchtet, sondern vielmehr das Anregungslicht stark fokussiert, so dass nur ein „Punkt“ in der Zelle beleuchtet wird. Aufgrund der Wellennatur des Lichtes kann hier minimal eine Größe von bis zu 200nm in XY-Richtung und bis zu 600nm in Z-Richtung erreicht werden. Den Fokus platziert man nun an die Stelle der Zelle, an der die mit GFP markierten Proteine

untersucht werden sollen, also etwa auf die Zellmembran im Falle der TNF-Rezeptoren. Hat man sehr wenige Rezeptoren in der Membran, so misst man ein stark fluktuierendes Signal: Immer wenn ein mar-



04

Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität. Immer wenn ein einzelnes Molekül durch das Fokalvolumen (03) diffundiert, ergibt sich eine Spitze (Burst) im Fluoreszenzsignal.

## FLUORESZENZ

### Fluoreszenz und fluoreszierende Proteine

Fluoreszenz ist die Eigenschaft von Molekülen, Licht zu absorbieren und mit einer größeren Wellenlänge wieder zu emittieren. Eine intensive Fluoreszenz beobachtet man bei nur verhältnismäßig wenigen Molekülen. Unabhängig davon gibt es viele Anwendungen für fluoreszierende Moleküle, z.B. so genannte Aufheller in Waschmitteln, die im UV absorbieren und im Blauen fluoreszieren und so der Wäsche ein strahlendes Weiß verleihen können. Technische Anwendungen sind z.B. der Farbstofflaser oder die Fluoreszenzmikroskopie. Wie kommt die Verschiebung zu größeren Wellenlängen zustande? Bei der Anregung eines Moleküls in einen höheren elektronischen Zustand werden in der Regel zusätzlich noch Schwingungszustände mit angeregt (06). Die Energie dieser Schwingungszustände wird extrem schnell an die Umgebung abgegeben, so dass das Molekül im rein elektronischen Zustand verbleibt. Von hier relaxiert das Elektron unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand zurück. Die Energie dieses Photons ist nun um die Energie vermindert, die zuvor durch die Schwingungen abgegeben wurde.

In der Fluoreszenzmikroskopie macht man sich die Fluoreszenz zunutze, indem man nicht-fluoreszierende Moleküle (z.B. Proteine in einer Zelle) mit fluoreszierenden Molekülen markiert. Durch Herausfiltern des Anregungslichts sieht man im Mikroskop nur die Fluoreszenz der Marker und damit die Position des interessierenden Moleküls. In der Zellbiologie benutzt man als Marker häufig fluoreszierende Proteine, z.B. GFP. Diese haben den Vorteil, dass die Zelle sie selbst produziert, noch dazu verbunden mit dem Protein, das von Interesse ist. (02) etwa zeigt TRAF2, ein Protein, das in der Signalkaskade des programmierten Zelltods beteiligt ist, das mit GFP markiert ist. Man sieht, dass GFP verhältnismäßig groß ist, so dass durchaus die Gefahr besteht, dass die Funktion des markierten Proteins gestört wird.

kierter Rezeptor in den Fokus diffundiert, steigt das Signal an, diffundiert er wieder hinaus, geht das Signal auf ein Untergrundniveau zurück. Dies ist in (04) zu sehen, wo die Fluoreszenz als Funktion der Zeit aufgetragen ist (Fluoreszenzspur). Die einzelnen Spitzen (*Bursts*) im Signal entsprechen einzelnen markierten Rezeptoren, die durch den Fokus diffundieren. Die Breite der Bursts korreliert mit der Diffusionsgeschwindigkeit. Je langsamer ein

Protein diffundiert, desto länger sind die Bursts. Bildet man die Autokorrelation (**Korrelationen**) der Fluoreszenzspur, so lässt sich mit Hilfe eines analytischen Modells sofort die Diffusionskonstante und die Proteinkonzentration aus der Korrelationsfunktion ableiten. Die Daten in (05) stammen von mit GFP markierten TNF-Rezeptoren. Es zeigt sich, dass die gemessenen Diffusionskonstanten im für Membranproteine typischen Bereich von  $10^{-9}$   $\text{cm}^2/\text{s}$  liegen. Dies ändert sich drastisch, wenn der Rezeptor aktiviert wird, also ein chemisches Signal empfangen wird (Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor), auf das die Zelle reagieren muss und das die Einleitung des programmierten Zelltodes bedeuten kann. (05) zeigt, wie sich die Autokorrelationsfunktion zu großen Zeiten hin verschiebt, d.h. die Diffusion wird deutlich langsamer. Nach einer aktuell diskutierten Theorie liegt dieses Verhalten daran, dass der Rezeptor nach Aktivierung in einen Membranbereich wechselt, der eine höhere Ordnung hat als die übrige Zellmembran. Die gemessene Diffusion entspricht dann der Diffusion des gesamten geordneten Bereichs (einige 10nm Durchmesser) in der Zellmembran.

Dieses einfache Beispiel zeigt verschiedene wichtige Aspekte:

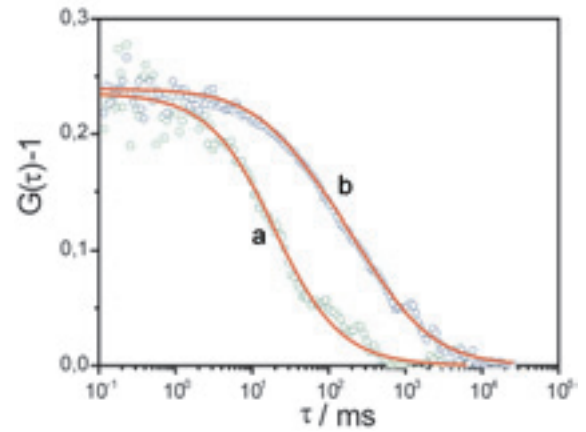
1. Man kann Diffusionskonstanten von molekularen Komponenten kleinster Konzentration in lebenden Zellen leicht messen.
2. Fluktuationen sind ein wesentlicher Bestandteil von zellulären Prozessen, die aber in der Regel in der klassischen Fluoreszenzmikroskopie nicht berücksichtigt werden.
3. Schon der erste Schritt der Signalkaskade, die den programmierten Zelltod vermittelt, ist hoch kompliziert und auf molekularer Ebene bis jetzt nicht verstanden.

**4. Kreuzkorrelation: Nachweis molekularer Bindung durch korrelierte Fluktuationen**

Mit Hilfe von Fluktuationen ist es aber nicht nur möglich, Diffusionskonstanten zu bestimmen, sondern es können ebenfalls Kollokalisierungen auf molekularer Ebene bestimmt werden, d.h. man kann feststellen, ob zwei Proteine aneinander gebunden sind oder nicht. Man kann sich leicht vorstellen, dass gerade diese Fragestellung, ob ein Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem anderen Protein oder

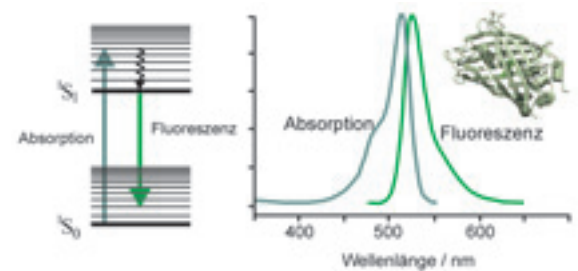
einem Proteinkomplex gebunden ist oder nicht, in Signalkaskaden eine zentrale Rolle einnimmt. Eine elegante Methode, dies direkt in lebenden Zellen zu messen, ist die Fluoreszenz-Kreuzkorrelationspektroskopie (FCCS, *Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy*). Hierbei werden zwei Proteinsorten, von denen man wissen möchte, ob sie innerhalb einer Kaskade aneinander binden, mit unterschiedlichen Markern versehen, d.h. Markern, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Nun muss die Fluoreszenz beider Marker getrennt mittels zweier Detektoren gemessen werden. Detektor 1 weist ausschließlich Fluoreszenz von einem Marker, Detektor 2 ausschließlich vom anderen Marker nach. Bildet man nun die Korrelationsfunktion (**Korrelationen**) zwischen den Signalen von Detektor 1 und 2, so erhält man nur dann eine Korrelation mit einem Betrag größer als eins, wenn die beiden Marker immer zusammen durch den Fokus des Mikroskops diffundieren. In einer Zelle, in der beide Proteine aneinander gebunden sind, ist dies immer der Fall und man erhält eine starke Korrelation. Sind die Proteine hingegen nicht aneinander gebunden, ergibt sich keine Korrelation. Auch ein gleichzeitiges zufälliges Passieren des Fokus von je einer Proteinsorte ist belanglos. Solche zufälligen Koinzidenzen mitteln sich in der Korrelation zu eins heraus.

Für Messungen in lebenden Zellen benötigt man also verschiedenfarbige Marker oder autofluoreszierende Proteine. Durch Mutationen des GFP ist es gelungen, GFP-Mutanten zu erzeugen, die bei unterschiedlichen Farben leuchten. Dementsprechend heißen sie Blaufluoreszierendes Protein (BFP), Cyanfluoreszierendes Protein (CFP) und Gelbfluoreszierendes Protein (YFP). Markiert man zwei verschiedene Proteine mit zwei unterschiedlichen Mutanten sollte FCCS leicht möglich sein. Allerdings ist zu beachten, dass die Fluoreszenzspektren der verschiedenen fluoreszierenden Proteine spektral



05

Korrelationsfunktion  $G^{(2)}(\tau)$  vor a) und nach der Stimulation b) eines Membranrezeptors. Die Kreise stellen Messdaten und die durchgezogene Linie eine numerische Anpassung an die Daten dar.

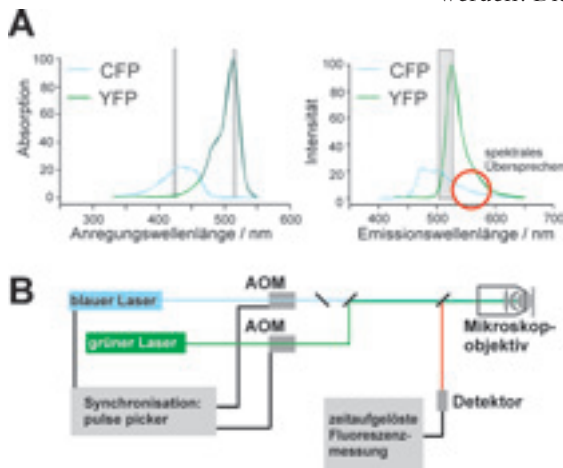


06

Die Abbildung zeigt das vereinfachte Niveauschema eines fluoreszierenden Proteins. Die dicken Linien ( $S_0, S_1$ ) entsprechen rein elektronischen Zuständen, die dünnen Linien stellen Schwingungsniveaus dar. Da Schwingungen sehr schnell abklingen, sind Absorptions- und Fluoreszenzspektren gegeneinander verschoben.

sehr breit sind, so dass es nicht möglich ist, zwei spektrale Bereiche zu finden, in denen jeweils nur ein Protein fluoresziert. Man erhält also immer in beiden Detektoren Fluoreszenzlicht, obwohl nur eine Proteinsorte durch den Fokus diffundiert ist. Dies bedeutet aber, dass man immer eine scheinbare Kreuzkorrelation misst.

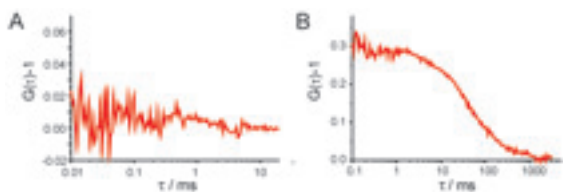
Wie kann dieses Problem nun umgangen werden? Die Fluoreszenzspektren überlappen spektral und sind somit unbrauchbar für Korrelationsmessungen. Auf die Absorptionsspektren trifft dies jedoch nicht zu. Es ist möglich, unterschiedliche fluoreszierende Proteine getrennt anzuregen. **(07)** zeigt dies für CFP und YFP. Bei einer Wellenlänge von 425 nm (blau) lässt sich ausschließlich CFP anregen, bei 514 nm (grün) ausschließlich YFP. In dem am 3. Physikalischen Institut entwickelten Aufbau wird dieser Sachverhalt aus-



07

genutzt: Mit gepulsten Lasern wird abwechselnd CFP, mit einem blauen Laserpuls, und YFP, mit einem grünen Laserpuls, angeregt. Die Fluoreszenz wird dann zeitaufgelöst detektiert. Fluoreszenzphotonen, die unmittelbar nach dem blauen Anregungspuls gemessen werden, müssen vom CFP stammen, da mit Blau ausschließlich CFP angeregt wurde, während Photonen, die unmittelbar nach dem grünen Puls gemessen werden von YFP stammen. **(07)** zeigt diesen Aufbau im Detail: Ein gepulster Titan-Saphir-Laser liefert eine Wellenlänge von 850 nm (nahes Infrarot) und alle 10 ns einen Puls. Mittels eines Kristalls, der die Frequenz der Laserstrahlung verdoppelt, erhält man die benötigten 425 nm. Ein so genannter Pulspicker sorgt dafür, dass nur jeder zehnte Puls durchgelassen wird, so dass nun alle 100 ns ein sehr kurzer

blauer Laserpuls zur Verfügung steht. Synchron hierzu, aber mit 50 ns Verzögerung, wird aus einem kontinuierlichen grünen Laser ein Puls herausgeschnitten. Man erhält also abwechselnd alle 50 ns einen blauen und einen grünen Laserpuls. Durch das zeitaufgelöste Messen der Photonen lassen sich am Ende die Fluoreszenz von CFP und YFP getrennt als Funktion



08

Kreuzkorrelationskurven vor und nach der Bindung von Proteinen.

## KORRELATION

Mit Hilfe von Korrelationsfunktionen kann man allgemein Ähnlichkeiten zwischen Funktionen oder Selbstähnlichkeiten innerhalb einer Funktion aufdecken. Hier werden die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion und die Intensitäts-Kreuzkorrelationsfunktion benutzt, um aus Fluktuationen der Fluoreszenz, d.h. aufgrund von Konzentrationsschwankungen innerhalb eines Fokall Volumens Informationen über Proteine innerhalb einer lebenden Zelle zu erlangen.

Die Autokorrelationsfunktion ist definiert als:

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Hierbei ist  $F$  die Fluoreszenzintensität und die spitzen Klammern bedeuten eine Zeitmittelung. Es wird also die Intensität zur Zeit  $t$  mit der Intensität zu einem späteren Zeitpunkt  $t + \tau$  verglichen. Die Zeit, die ein Protein benötigt, um durch den Fokus zu schwimmen, taucht somit direkt in der Korrelationsfunktion auf. Aus ihr kann dann die Diffusionskonstante des Proteins abgeleitet werden.

Die Kreuzkorrelation für zwei verschiedenen fluoreszierende Spezies, z.B. für CFP und YFP, lautet:

$$G_{\text{cross}}^{(2)}(\tau) = \frac{\langle F_{\text{CFP}}(t)F_{\text{YFP}}(t+\tau) \rangle}{\langle F_{\text{CFP}}(t)F_{\text{YFP}}(t) \rangle}$$

Hier sind  $F_{\text{CFP}}$  und  $F_{\text{YFP}}$  die Intensitäten der fluoreszierenden Proteine CFP und YFP. Sind diese Proteine miteinander verbunden, so ergeben sich für sie identische Fluoreszenzspuren, d.h. die Kreuzkorrelationsfunktion stimmt mit der Autokorrelationsfunktion überein. Sind beide Komponenten unabhängig voneinander, so mitteln sich die Fluoreszenzspuren zu eins.

der Zeit aufnehmen. Aus diesen Fluoreszenzspuren bestimmt man die Kreuzkorrelation.

**(08)** zeigt Beispiele für zwei Proteine, die nicht aneinander gebunden sind **(08A)** bzw. zwei Proteine, bei denen das der Fall ist **(08B)**. Man erkennt leicht, dass im ersten Fall die Kreuzkorrelation flach verläuft, während im zweiten Fall, der aneinander gebundenen Proteine, die Korrelationsfunktion deutlich größer Null ist. Bei genauer Kenntnis des Untergrunds (also geringe Fluoreszenz von anderen Zellkomponenten und Dunkelzählrate des Detektors) ist es sogar möglich, mit Hilfe der Autokorrelationen beider Proteinsorten sowie deren Kreuzkorrelation genau zu bestimmen, wie hoch der Anteil der gebundenen und ungebundenen Proteine ist.

## 5. Videomikroskopie an einzelnen Molekülen

Besonders elegant ist die Abbildung bzw. das Verfolgen einzelner Moleküle mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop. Neuartige, empfindliche CCD-Kameratypen erlauben den Nachweis einzelner Photonen mit einer Quantenausbeute von bis zu 80 Prozent bei gleichzeitigem geringen Eigenrauschen und hoher Ausleserate. Mit einem solchen Gerät gelingt es, einzelne Moleküle in lebenden Zellen mit einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Gleichzeitig kann mit einer Bildwiederholrate von 10 Hz die Diffusion bzw. der Transport einzelner Moleküle verfolgt werden. Auf diese Weise lässt sich direkt, d.h. weitgehend modellfrei, das Diffusionsverhalten der Moleküle erfassen, was Informationen über die Umgebung der Moleküle bzw. über die Assoziation der Moleküle mit Bindungspartnern liefert.

## 6. Fazit

Eine erfolgreiche systembiologische Beschreibung zellulärer Prozesse wird ganz wesentlich auf der Bereitstellung verlässlicher und detaillierter experimenteller Daten basieren. Teilweise, etwa bei der Erhebung des Proteinbestandes einer Zelle, sind diese nur mit erheblichem Aufwand zu beschaffen und es bedarf sicherlich jahrelanger systematischer Bemühungen, um entsprechendes Datenmaterial zur Verfügung zu stellen. Die experimentellen Techniken in diesem Bereich sind jedoch gut entwickelt, so dass „lediglich“ entsprechende Bemühungen unternommen werden müssen. In anderen Bereichen fehlen die entsprechenden experimentellen Techniken noch oder befinden sich im Erprobungsstadium. Dies trifft in diesem Zusammenhang auf die Einzelmolekülmikroskopie zu. Die große Chance besteht darin, in bisher nicht gekanntem Maß detaillierte Einblicke in die Bewegung von Proteinen und Proteininteraktion in Zellen zu erreichen. Gleichzeitig kann mit Zellen gearbeitet werden, bei denen die entsprechenden Proteine nicht überexprimiert werden, so dass entsprechende Artefakte ausgeschlossen werden können. Eine Nutzung für die Systembiologie setzt voraus, dass die Technik an bestimmten Stellen eingesetzt wird, etwa an einem besonders neuralgischen Punkt in einer Signalkette. Eine genaue Quantifi-

zierung von Proteinmengen gehört dabei zu den Stärken der Methode. Weiterhin kann das Bewegungsverhalten von Proteinen weitgehend modellfrei bestimmt werden, d.h. es ist möglich zu bestimmen, ob Proteine transportiert werden, in beschränkten Volumina zwei- oder dreidimensional diffundieren oder gar eine freie unbeschränkte Diffusion durchführen. Hier stellt die Einzelmolekülmikroskopie oder das *Single Particle Tracking* eine sinnvolle Ergänzung zu Standardtechniken wie *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) dar. Eine gänzlich neue Möglichkeit besteht im Nachweis der zeitlichen Fluktuationen von Proteinmengen in Zellen. Bei verschiedenen zellulären Prozessen wird vermutet, dass solche Fluktuationen zur Musterbildung bzw. Asymmetrie führen. Hier hat die hochempfindliche Fluoreszenzmikroskopie sicherlich ein interessantes Einsatzgebiet. Auch der klassische Nachweis von Proteininteraktion in Zellen wird durch die Methode neu beleuchtet. Die Kreuzkorrelationsspektroskopie stellt ein neues Verfahren zum Nachweis der Proteinbindung dar, ohne auf die teilweise kritischen Energietransfermessungen, oder die Kollationsmessungen zurückzugreifen. Alles in allem stellt die Einzelmolekülmikroskopie eine beträchtliche Erweiterung der klassischen Fluoreszenzmikroskopie dar, ohne diese zu verdrängen oder gar zu ersetzen. Aber ein immer genaueres Verständnis zellulärer Prozesse erfordert schließlich doch gelegentlich das Verfolgen einzelner Moleküle in Zellen. •

## SUMMARY

*In systems biology it is important to find reliable input data for key parameters for the model of a biological system. These data can only be found by analytically experimental methods. In addition to standard fluorescence microscopy, single molecule methods became popular nowadays in Stuttgart. Methods are developed to help determine key parameters of cellular processes with highest possible accuracy. The extreme low concentrations of the molecular components of many important processes require methods that allow for the detection of the fluorescence of single molecules. Therefore, the fluorescence of a relatively small protein extracted from a jelly fish named green fluorescent protein (GFP) can be used. It is possible to trigger the cell to fuse the GFP to every target protein under investigation. This makes GFP the most used marker in cell biology. Using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), it is possible to measure the mobility of proteins within living cells. Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) shows whether a protein binds to another protein or protein complex. These data are important to model a signal cascades describing the response of a cell to the manifold signals of the environment.*

Jörg Wrachtrup  
Carsten Tietz  
Margarita Gerken  
Elmar Thews



## DIE AUTOREN

**PROF. DR. JÖRG WRACHTRUP** (im Bild rechts)

Leiter des 3. Physikalischen Instituts, studierte und promovierte an der Freien Universität Berlin und habilitierte an der Technischen Universität Chemnitz. Sein Hauptinteresse gilt der Spektroskopie an einzelnen Molekülen und Quantensystemen. Diese methodische Klammer umschließt so unterschiedliche Forschungsgebiete wie Untersuchungen zu Quantencomputern mittels einzelner Spins im Festkörper bis zur Erforschung von Signalkaskaden in lebenden Zellen, also von der „harten“ Quantenphysik bis zur „weichen“ Biophysik.

**DIE BIOPHYSIKGRUPPE**

wurde am Dritten Physikalischen Institut mit der Berufung von Prof. Wrachtrup in Jahr 2000 eingerichtet und seit 2002 geleitet von **Dr. Carsten Tietz** (Mitte, Physikstudium in Düsseldorf, Promotion in Chemnitz und Stuttgart). Das Hauptinteresse liegt in der Untersuchung von einzelnen Proteinen, wobei zu Anfang ein Schwerpunkt auf Proteinen der Photosynthese lag. Schon kurze Zeit später mit dem Eintritt des Instituts in den Stuttgarter Sonderforschungsbereich, der sich die Untersuchung von Signalkaskaden zum Ziel gesetzt hat, wurden Methoden zur Untersuchung einzelner Proteine in lebenden Zellen entwickelt, wie z.B. Verfahren der Korrelationspektroskopie. Diese Verfahren wurden im wesentlichen von den Doktoranden **Margarita Gerken** (rechts vorne, Physikstudium in Eriwan, Armenien) und **Elmar Thews** (links, Physikstudium in Aachen und Stuttgart) aufgebaut, die beide zur Zeit ihre Promotionen abschließen.

**Kontakt**

Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart

Tel. 0711/685-5231, Fax 0711/685-5281

E-Mail: [c.tietz@physik.uni-stuttgart.de](mailto:c.tietz@physik.uni-stuttgart.de)