

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Membran- und Neurophysik

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie an Lipidvesikeln auf oxidiertem Silizium

Karsten Kottig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. S. Fischer
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. P. Fromherz
2. Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

Die Dissertation wurde am 17.01.2000 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 02.03.2000 angenommen.

Zusammenfassung

Die vorgestellte Arbeit zeigt die erfolgreiche Entwicklung und Anwendung eines Proben- und Meßsystems zur Untersuchung der fluiden Eigenschaften von Lipidmembranen im engen Kontakt zu einem Substrat.

Die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Membranbausteinen wird in der Lipidmembran von stark adhären Riesenvesikeln mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie quantitativ untersucht. Der direkte Vergleich der *Kontaktmembran* zur *Freien Membran* gestattet Aussagen über das Diffusionsmodell auf Einzelmolekülniveau und die Zahl der beweglichen Teilchen.

Die Herstellung der unilamellaren Riesenvesikel erfolgt über ein optimiertes Verfahren, welches bei Verwendung von strukturierten planaren ITO/Quarz-Elektroden eine große Ausbeute gewährleistet. In den Herstellungsprozeß integriert ist der Einbau der farbstoffmarkierten Membranbausteine.

Die Grundlagen der Diffusion in Membranen werden dargestellt und deren Repräsentation in der Korrelationsanalyse erläutert. Die Auswirkungen von reflektierendem Substrat, wie dem verwendeten oxidierten Silizium, werden in Hinblick auf das konfokale Abbildungssystem des Meßaufbaus entwickelt.

Das entwickelte Meßsystem für niedrige Farbstoffkonzentrationen gestattet die Anwendung bei unterschiedlichen Problemstellungen. Die Diffusionsuntersuchung auf Einzelmolekülniveau kann dabei sowohl in einer Standard- als auch in einer Long-Distance-Konfiguration durchgeführt werden. Die Auslegung für reflektierende oxidierte Siliziumsubstrate gestattet in Verbindung mit einer Probenrasterfunktion eine geometrische Adhäsionscharakterisierung.

Die Diffusionsuntersuchung im konfokalen Volumen erlaubt die separierte Messung in der *Freien Membran* und in der *Kontaktmembran*. Die Modelle der *Normalen Diffusion* in der freien und verlangsamt *Anomalen Diffusion* in der gestützten POPC:DOPME-Membran beschreiben die Bewegungseigenschaften der untersuchten Lipidfarbstoffe: TRITC-DHPE, DiI₁₈, Di-8-ANEPPS sowie des Antibiotikums Gramicidin C und des lageändernden Flip-Flop-Peptids LAH₄. Das verwendete Substrat: Standard-Deckglas und oxidierte Siliziumchips mit 100nm und 2,37µm Oxiddicke sowie die Lipidzusammensetzung zeigen Auswirkungen auf das Diffusionsverhalten.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Membransystem und Meßidee | 1 |
| 1.2 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) als Meßmethode | 2 |
| 2. DIFFUSION UND DRIFT IN MEMBRANEN | 5 |
| 2.1 Diffusion in ein- und mehrdimensionalen Einphasensystemen | 5 |
| 2.1.1 Einstein-Relation | 5 |
| 2.1.2 Ficksche Gesetze | 5 |
| 2.2 Drift einer Komponente | 7 |
| 2.3 Anomale Diffusion | 7 |
| 2.3.1 "Random walk" zur Beschreibung der Molekülbewegung | 7 |
| 2.3.2 Übergang zur Anomalen Diffusion | 8 |
| 2.4 Translationsdiffusion in Membranen | 9 |
| 2.4.1 Diffusion in freien Membranen | 9 |
| 2.4.2 Diffusion in gestützten Membranen | 11 |
| 3. FLUORESZENZ-KORRELATIONS-SPEKTROSKOPIE (FCS) | 14 |
| 3.1 Grundprinzip der FCS | 14 |
| 3.2 Diffusion einer Komponente | 16 |
| 3.3 Drift einer Komponente | 19 |
| 3.4 Triplet und andere konkurrierende Anteile | 19 |
| 3.4.1 Triplet | 20 |
| 3.4.2 Hintergrund | 21 |
| 3.4.3 Weitere konkurrierende Anteile | 21 |
| 3.5 Normale und Anomale Diffusion in 2D-Systemen | 22 |
| 3.6 Mehrkomponentensysteme | 22 |
| 3.7 Beschreibung des konfokalen Volumens in der FCS | 24 |
| 3.7.1 Standardbeschreibung für ideale Objektiv-Proben-Systeme | 24 |
| 3.7.2 Erweiterte Betrachtung von idealen Objektiv-Proben-Systemen | 28 |
| 3.7.3 Fokusbeschreibung vor spiegelnden Flächen | 34 |
| 3.7.4 Modifikationen für nichtideale optische Schichtsysteme | 36 |
| 3.7.5 Numerik der Berechnung | 37 |
| 4. EXPERIMENTELLER AUFBAU | 39 |
| 4.1 Fluoreszenzfarbstoffe | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.1 Farbstoffe für Messungen in wäßriger Lösung | 39 |
| 4.1.2 Lipidartige und lipidgebundene Farbstoffe | 40 |
| 4.1.3 Proteingebundene Farbstoffe | 41 |
| 4.2 Erster Meßaufbau für optimierte Long-Distance-Messungen | 43 |
| 4.3 Zweiter Meßaufbau für optimierte Probenvisualisierung | 44 |
| 4.4 Vorstellung der optischen Einzelkomponenten | 46 |
| 4.4.1 Argon-Ionen-Laser als Lichtquelle und weiterer Lichtweg | 46 |
| 4.4.2 Filtercharakterisierung | 47 |
| 4.4.3 Objektive zur Beobachtung und Messung | 48 |
| 4.4.4 Schrittmotoren zur Positionierung | 49 |
| 4.4.5 Temperaturregelung mit Peltierelement | 50 |
| 4.4.6 CCD-Kamera und Framegrabber zur Beobachtung | 50 |
| 4.4.7 Einheit zur Pinhole- und Detektorjustage | 50 |
| 4.4.8 Avalanche Photodiode (APD) als Einzelphotonendetektor | 51 |
| 4.5 Verarbeitung der Meßdaten | 52 |
| 4.5.1 Computer Hard- und Software | 52 |
| 4.5.2 Korrelatorkarte als Aufnahmeeinheit | 52 |
| 4.5.3 Software zur Steuerung und Messung | 53 |
| 4.5.4 Software zur Meßdatenanalyse | 54 |
| 4.6 Meßvorbereitungen und -ablauf | 56 |
| 5. HERSTELLUNG VON RIESENVESIKELN | 58 |
| 5.1 Herstellung der ITO/Quarz-Objektträger | 58 |
| 5.2 Schwellen der Riesenvesikel | 59 |
| 5.2.1 Lipidmischung | 59 |
| 5.2.2 Schwellen und Ablösen mittels Wechselspannung | 60 |
| 5.2.3 Umsetzen der Riesenvesikel | 60 |
| 5.2.4 Reinigung und Beschichtung der Deckgläser und Siliziumchips | 61 |
| 5.3 Eigenschaften der Riesenvesikel | 62 |
| 5.3.1 Kontaktbeschreibung (Adhäsion) | 62 |
| 5.3.2 Elektrische Eigenschaften als Nachweis der Funktionsfähigkeit | 64 |
| 5.3.3 Erste Test-Diffusionsmessungen mittels Fluorescence-Recovery-After- Photobleaching (FRAP) | 67 |
| 6. FCS-CHARAKTERISIERUNG UND DURCHFÜHRUNG | 71 |
| 6.1 Warum FCS? | 71 |
| 6.2 Freier Farbstoff in wäßriger Lösung | 72 |

| | |
|---|------------|
| 6.3 Latexkugeln als Testsystem | 76 |
| 6.4 Überprüfung der Lipidvesikeleigenschaften auf Einzelmolekülniveau | 78 |
| 6.4.1 Durchführung der Vesikelmessungen | 78 |
| 6.4.2 "Slowest"-Laserscan-Mikroskop | 79 |
| 6.4.3 Form- und Kontaktbeschreibung | 80 |
| 6.4.4 FLIC-Abstandsmessung | 81 |
| 6.4.5 Meßablauf für FCS-Messungen an Vesikeln | 84 |
| 7. FCS AN VESIKELN - MESSUNG UND DISKUSSION | 86 |
| 7.1 Farbstoffträger in der <i>Freien Lipidmembran</i> | 86 |
| 7.2 Direkter Vergleich der <i>Freien Membran</i> zur <i>Kontaktmembran</i> | 88 |
| 7.2.1 Beispielauswertung für TRITC-DHPE auf Chip mit 100nm Oxiddicke | 88 |
| 7.2.2 Beispielauswertung für TRITC-DHPE auf Chip mit 2,73µm Oxiddicke | 94 |
| 7.2.3 Auswirkungen der Substratoberfläche | 95 |
| 7.2.4 Auswirkungen der Lipidzusammensetzung | 96 |
| 7.2.5 Membranflecken geplatzter Vesikel | 98 |
| 7.3 Sulforhodamin G-Gramicidin C | 99 |
| 7.3.1 Beispielauswertung für SRh-GramC auf Chip mit 100nm Oxiddicke | 99 |
| 7.3.2 Vergleich Ober- und Unterseite für SRh-GramC | 102 |
| 7.3.3 Problem der Positionierung | 103 |
| 7.4 Funktionsuntersuchung am Flip-Flop-Designerprotein LAH₄ | 105 |
| 8. AUSBLICK | 107 |
| Anhang A Messungen an HEK293-Zellen | 109 |
| Anhang B Nicht gängige Abkürzungen | 111 |
| Literaturverzeichnis | 112 |

Kapitel 1

Einleitung

Die Untersuchungen von Membranen bezüglich ihrer fluiden und elektrischen Eigenschaften in Verbindung mit Membranproteinen und Ionenkanälen erbringen, begünstigt durch einen anhaltenden technischen Fortschritt und die Entwicklung von empfindlichen Meßsystemen, eine Vielzahl an Erkenntnissen, welche für das Verständnis von Zellsystemen unabdingbar sind. Speziell Membranen im engen Kontakt zu einem Substrat oder zu einer anderen Membran bieten interessante theoretische und experimentelle Ansätze, welche sich zu untersuchen lohnen. Bei kleinem Abstand zwischen Membran und Substrat treten in einer Elektrolytumgebung, bei Anlegen eines elektrischen Potentials, Spannungsgradienten entlang der Membran auf, welches zur Selbstfokussierung von Ionenkanälen und zu einer Musterbildung führen können [18][19]. Der Zell-Substrat-Kontakt stellt auch bei der elektrischen Kopplung von Nervenzellen einen entscheidenden Parameter dar [21]. Aktuelle Studien [57] [25] [64] zeigen dabei Anreicherungen und Verarmungen von Ionenkanälen in der Kontaktzone. Die Untersuchung und Interpretation dieser Vorgänge ist eng mit der Frage der Diffusion von Membranbausteinen und mit deren Verteilung verknüpft.

Ziel: Aufbau eines Proben- und Meßsystems zur Untersuchung der fluiden Eigenschaften von Lipidmembranen im engen Kontakt zu einem Substrat!

1.1 Membransystem und Meßidee

Die Zellmembran stellt eine Vielzahl von funktionalen Mechanismen bereit: Sie dient als trennende Wand, als elektrischer Kondensator sowie als Matrix für eingebettete Ionenkanäle oder andere Proteine. Die Vielfalt an unterschiedlichen Aufgaben geht einher mit einer riesigen Zahl von wirkenden Funktionszentren, die unüberschaubar die Aufklärung einzelner Prinzipien erschweren. Dies führt zu der Forderung nach handhabbaren Modellsystemen, in denen definierte Bedingungen zur Untersuchung geschaffen werden können. Künstliche Lipidmembranen erfüllen viele Ansprüche an ein derartiges System, kranken jedoch bei den klassischen Methoden an bestimmten Stellen. Die Gruppe der gestützten Membranen *”supported membranes”* haben ein vorgegebenes Substrat, welches bei der Betrachtung berücksichtigt werden muß [53]. Für elektrische Messungen sind sie kaum zu verwenden, da sich Defekte störend auswirken. Eine weitere Membranform, die *”black-lipid-membrane”* (BLM) [44], ist zwar elektrisch dicht [31], das verwendete Lösungsmittel zeigt aber einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß, der mühsam begrenzt werden muß. Diese klassischen Herstellungsverfahren von künstlichen Lipidmembranen sind im Laufe ihrer Entwicklung ständig optimiert worden, so daß ihre nachteiligen Eigenschaften teilweise eliminiert wurden [22][62].

Eine weitere Methode gewinnt indes immer mehr an Bedeutung. Die Herstellung von Riesenvesikeln mit

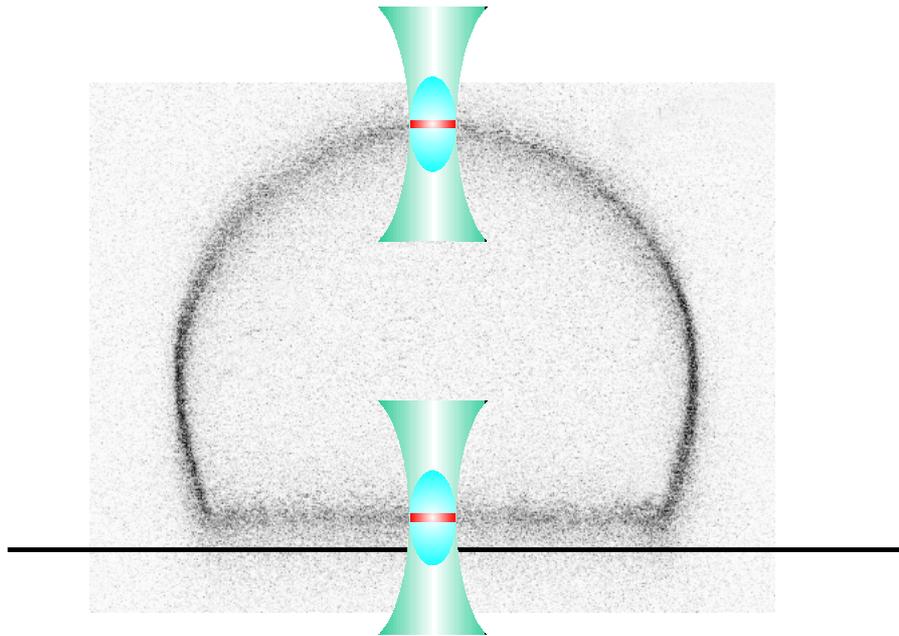


Abbildung 1.1: Skizze der Meßidee. Ein auf dem Substrat anhaftendes Riesenslipidvesikel mit einem Durchmesser von $10 - 150\mu\text{m}$ dient als Studienobjekt für das Diffusionsverhalten von fluoreszenzmarkierten, membrangebundenen Molekülen. Der fokussierte Laserstrahl und eine konfokale Begrenzung in der Detektion erzeugen einen Meßbereich mit einem Durchmesser von $0,6\mu\text{m}$ und einer Tiefe entlang der optischen Achse von $3\mu\text{m}$. Dieser Fokusbereich kann im Probenvolumen positioniert und damit gezielt in der oberen freien Membran und der unteren Kontaktmembran plaziert werden. Über die Fluktuationsanalyse einzelner Moleküle mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie läßt sich das Diffusionsverhalten der Membranmoleküle bestimmen.

einem Durchmesser in der Größenordnung von $10 - 150\mu\text{m}$ kommt ohne störendes Lösungsmittel aus und ist einfach durchzuführen. Die Adhäsion dieser Riesenslipidvesikel gestattet den direkten Vergleich einer *Freien Membran* an der Vesikeloberseite zur *Kontaktmembran* in der Unterseite. Der direkte Vergleich des Diffusionsverhaltens in der freien und der gestützten Lipidmembran, stellt die Meßidee dieser Arbeit dar (Abb. 1.1).

Meßidee: Lokale Diffusionsmessung in der Freien Membran und der Kontaktmembran!

Für die Verwirklichung dieser Idee muß eine Methode gefunden werden, die lokal zur Diffusionsmessung verwendet werden kann und gleichzeitig das Lipidsystem nicht beeinflusst.

1.2 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) als Meßmethode

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie beruht auf der Analyse fluktuierender Fluoreszenzsignale. Aus einem kleinen Beobachtungsvolumen wird das emittierte Licht von Farbstoffen auf einen empfindlichen Detektor abgebildet. Bei kleinem Volumen und niedrigen Farbstoffkonzentrationen lassen sich, bei sich bewegenden Molekülen, aus der Varianz der Signalfunktion die Partikelzahl und die mittlere Aufenthaltsdauer als typische Größen bestimmen. Der Begriff "Einzelmolekülspektroskopie" rechtfertigt sich bei dieser

Meßmethode durch die sehr kleine mittlere Partikelzahl ca. 0,001 – 1000. Bei einer Messung fließen eine Vielzahl von Einzelsignalen in die Korrelationsfunktion ein, so daß das Resultat eine statistische Betrachtung darstellt.

Die Grundlagen zur FCS wurden zu Beginn der 70er Jahre von Elson, Madge und Webb geschaffen [37][12] [38] [39]. Ein andere Gruppe um Ehrenberg und Rigler [10][11] entwickelte im gleichen Zeitraum eine eigene Betrachtungen der Fluktuationsanalyse. Die ersten Messungen an künstlichen Lipidmembranen fallen ebenfalls in diesen Zeitraum [14][15]. Ein erster Innovationssprung ist durch die Abkehr von Parabolspiegeln hin zu konfokaler Mikroskopie (Abb. 1.2) zur Fokussierung und Detektion zu bemerken [30][71]. Nach diesen Anfangsanwendungen folgte erst in den 90er Jahren ein weiterer Publikationsschub, der sich auf die Möglichkeit der Einzelmoleküldetektion in Lösung bezieht. Dies war insbesondere durch verbesserte Technik: stabilere Laser, Hardwarekorrelatoren, Einzelphotonendetektoren möglich [51][52][42].

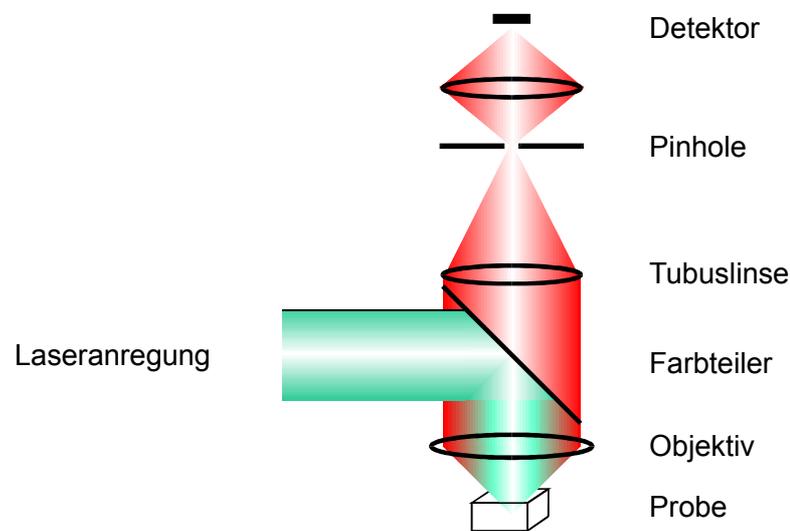


Abbildung 1.2: Konfokales Prinzip auf Mikroskopbasis. Der Anregungslaserstrahl wird über einen Farbteiler auf das Objektiv gelenkt, von diesem wird er in die fluoreszierende Probe fokussiert. Das emittierte Licht abweichender Wellenlänge kann auf dem umgekehrten Weg den Farbteiler passieren und wird durch die Tubuslinse auf das konfokal angebrachte Pinhole gelenkt. Diese Beschneidung in der Bildebene bewirkt eine zusätzliche optische Gewichtung, die als Result ein kleines effektives Volumenelement bedingt. Typische Abmessungen des wirkenden Fokus in der Probe sind eine Länge in der Richtung der optischen Achse von $3\mu\text{m}$ und ein Durchmesser senkrecht dazu von $0,6\mu\text{m}$. Dies entspricht einem Volumen von $0,6\text{fl}$ (femtoliter).

Die Analyse fluktuierender Fluoreszenzsignale in zwei- und dreidimensionalen Systemen gestattet die Bestimmung des Diffusionsverhaltens der Moleküle. Die hierbei gewonnenen Daten stehen direkt in Konkurrenz zu etablierten Verfahren. In Lösungen ist die Konzentration und die Molekülgröße ermittelbar. Dies gestattet Anwendungen, die bisher durch die Analyse mittels Lichtstreuung dominiert wurden. Der Vorteil des kleinen Mengeneinsatzes von Substanz wird erkaufte durch die zusätzliche Notwendigkeit der Fluoreszenzmarkierung. In zweidimensionalen Systemen, wie Lipidmembranen und Flüssigkristalle, wird zur Diffusionsanalyse die Fluorescence Recovery (Redistribution) after Photobleaching (FRAP) als klassische Methode eingesetzt. Auch gegenüber dieser Technik sind die Farbstoffmengen bei der FCS deutlich

geringer und zudem ist bei beiden Verfahren eine Notwendigkeit zur Fluoreszenzmarkierung vorhanden. Schnelle und empfindliche Photonendetektoren erweitern bei der Detektion die Zeitbasis und die Korrelationsanalyse bei "quasi-"logarithmischer Datenberechnung gestattet neben der Bewegungsbeschreibung die Überprüfung der Farbstoffeigenschaften.

Meßmethode: FCS zur lokalen Diffusions- und Partikelzählmessung!

Neben der FCS sind zwei alternative Meßmethoden für die Membrandiffusion interessant. Die Zwei-Photonen-FCS käme ohne konfokal auszurichtendes Pinhole aus. Zudem sind die Ausbleicheffekte fern des Fokuspunktes bei geeigneter Wellenlängenwahl zu vernachlässigen. Diese Vorteile sind bei dem System der Riesenvesikel durch den großen Membranabstand und durch die im Vergleich einfachere Laseranregung nicht ausschlaggebend. Die Einschränkung der Emission durch das Pinhole vereinfacht insbesondere bei reflektierenden Substraten das Gesamtsystem. Die zweite alternative Meßmethode stellt die bildgebende Beobachtung mittels einer empfindlichen Halbleiterkamera dar. Der derzeitige Stand der Technik bedingt bei dieser Detektionsart noch sehr große Anregungsleistungen und die Beschränkung auf wenige Einzelmolekülbahnen.

Kapitel 2

Diffusion und Drift in Membranen

In diesem einführenden Theoriekapitel zur Diffusion und Drift werden die Grundlagen der Bewegung von Molekülen in einer viskosen Umgebung vorgestellt. Von besonderem Interesse ist die Diffusion in zweidimensionalen Systemen und die Beschreibung der Membrandiffusion in freien und gestützten Systemen.

2.1 Diffusion in ein- und mehrdimensionalen Einphasensystemen

Ein- und mehrdimensionale Einphasensysteme stellen die Standardbeispiele bei der Behandlung der Diffusion dar. Der Begriff "Phase" bezieht sich dabei nicht auf die Gibbssche Definition eines homogenen Materiebereiches, sondern auf Bereiche von Zusammensetzungen, in denen bei stetiger Konzentrationsänderungen keine Phasenumwandlung stattfindet oder innerhalb denen Mischbarkeit besteht [26].

2.1.1 Einstein-Relation

Die *Einstein-Relation* 2.1 beschreibt den Zusammenhang zwischen der ursächlichen thermischen Energie $k_B T$ und der Diffusionskonstante D . Die thermische Energie wird über die Boltzmann-Konstante k_B mit der absoluten Temperatur T verknüpft. Zur Beschreibung wird der Reibungskoeffizient λ definiert, in welchen material- und formspezifische Parameter eingehen.

$$D = \frac{k_B T}{\lambda} \quad (2.1)$$

Im Spezialfall einer harten Kugel mit Radius a in einer inkompressiblen Flüssigkeit der Viskosität η ist der Reibungskoeffizient durch die Beziehung $\lambda = 6\pi\eta a$ darstellbar.

2.1.2 Ficksche Gesetze

"Diffusion ist ein Prozeß, der zum Konzentrationsausgleich innerhalb einer einzelnen Phase führt" [26]. Zur Beschreibung des Diffusionsverhaltens werden makroskopische Größen, wie die Konzentration c und der Teilchenfluß \vec{j} , eingesetzt. Das *Erste Ficksche Gesetz* 2.2 beschreibt dabei den Zusammenhang dieser Größen und nennt als verknüpfende Variable die Diffusionskonstante D .

$$\vec{j} = -D \nabla c \quad (2.2)$$

Bei konstantem Wert von D läßt sich über die Teilchenzahlerhaltung hieraus direkt das *Zweite Ficksche Gesetz* (2.3) finden. Diese Differentialgleichung für die Teilchenkonzentration beschreibt die Regeneration

des Systems bei Auftreten einer Störung, wobei die Diffusionskonstante D die örtliche Ausbreitung mit dem Zeitverhalten verbindet.

$$\frac{\partial}{\partial t} c = D \Delta c \quad (2.3)$$

Je nach Dimension und Symmetrie lassen sich spezielle Lösungen der Diffusionsgleichung finden. In einem Einphasensystem vereinfacht sich die Beschreibung der Diffusion deutlich. Die allgemeine Lösung für ein δ -Anfangwertproblem $c(r, t) = \delta(r, t)$ für $r = 0$ und $t = 0$, bei höchster Symmetrie, führt zu einer *Greenschen Funktion* des Problems, in welcher die klassische Dimension d_k eingeht.

$$c(r, t) = \frac{1}{\left(\sqrt{\pi 4Dt}\right)^{d_k}} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right)$$

Der Konzentrationsausgleich wird über eine Gaußfunktion beschrieben, in welcher die Dimension des Problems sowohl in den Vorfaktor als auch in die Symmetriebedingungen eingeht. Über die *Verschiebungswahrscheinlichkeit*

$$p(r, t) d^{d_k} r = \frac{\frac{1}{\left(\sqrt{\pi 4Dt}\right)^{d_k}} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) d^{d_k} r}{\int_{\mathbb{R}^{d_k}} \frac{1}{\left(\sqrt{\pi 4Dt}\right)^{d_k}} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) d^{d_k} r}$$

kann das *Mittlere Quadrat der Verschiebung* direkt bestimmt werden.

$$\overline{\Delta r^2} = \int_{\mathbb{R}^{d_k}} r^2 p(r, t) d^{d_k} r = \int_{\mathbb{R}^{d_k}} r^2 \frac{1}{\left(\sqrt{\pi 4Dt}\right)^{d_k}} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) d^{d_k} r = 2d_k Dt$$

Diese Berechnung führt unabhängig von der Dimension des Problems zu einem linearen Zusammenhang zwischen dem mittleren Verschiebungsquadrat und der Zeit.

Diffusion in einem zweidimensionalen System

Im folgenden soll der für diese Arbeit wichtige Fall der 2D-Diffusion ($d_k = 2$) mit axialer Symmetrie näher erklärt und an diesem Beispiel die oben beschriebenen Beziehungen dargestellt werden.

$$\frac{\partial}{\partial t} c(x, y, t) = D \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \right) c(x, y, t) \quad (2.4)$$

Das *Zweite Ficksche Gesetz* in kartesischen Koordinaten (2.4) und einer orts- und zeitunabhängigen Diffusionskonstanten kann bei axialer Symmetrie reduziert werden auf eine partielle Differentialgleichung, die nur von dem axialen Abstand r und der Zeit t abhängt. Durch Verwendung des entsprechenden Laplace-Operators läßt sich die Gleichung reduzieren.

$$\frac{\partial}{\partial t} c(r, t) = D \left(\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \right) c(r, t) = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r D \frac{\partial}{\partial r} c(r, t) \right)$$

Die normierte Lösung dieser DGL ergibt sich bei Vorgabe eines δ -Anfangwertproblems in Ort und Zeit zu

$$c(r, t)_{2D_axial} = \frac{1}{\pi 4Dt} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right)$$

und wird durch eine Gaußfunktion beschrieben. Sie stellt die *Greensche Funktion* für abweichende Anfangwertprobleme dar. Über die den Symmetrieüberlegungen angepaßte Verschiebungswahrscheinlichkeit

$$p(r, t) 2\pi r dr = \frac{\frac{1}{\pi 4Dt} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) 2\pi r dr}{\int_0^\infty \frac{1}{\pi 4Dt} e\left(-\frac{r^2}{4Dt}\right) 2\pi r dr}$$

läßt sich nach einer weiteren Integration über das zweite Moment für das *Mittlere Quadrat der Verschiebung* die Beziehung ableiten.

$$\overline{\Delta r^2}_{2D_axial} = \int_0^\infty r^2 p(r, t) 2\pi r dr = \int_0^\infty r^3 \frac{1}{\pi 4Dt} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} 2\pi dr = 4Dt$$

Dieser Spezialfall auf Grundlage der makroskopischen Größen konkretisiert das Vorgehen beim Umgang mit der Diffusionsgleichung.

2.2 Drift einer Komponente

Drift kann durch eine Vielzahl von Phänomenen verursacht werden: Sedimentation, Konvektion, elektrische und magnetische Felder, um nur ein paar zu nennen. Die Drift im elektrischen Feld ist für diese Arbeit davon das Wichtigste. Zur Beschreibung wird die Differentialgleichung 2.3 um den Driftterm $\vec{v} c$ erweitert.

$$\frac{\partial}{\partial t} c = \nabla (D \nabla c - \vec{v} c)$$

Die Driftgeschwindigkeit \vec{v} wird durch eine Kraft \vec{F} hervorgerufen. Die Proportionalitätskonstante ist dabei der Reibungskoeffizient λ der schon in der *Einstein-Relation* 2.1 Verwendung findet. Im Fall der Drift im homogenen elektrischen Feld \vec{E} kann die wirkende Kraft näher spezifiziert werden. Mit der Ladungszahl z und der Elementarladung e lautet der Gesamtausdruck

$$\vec{v} = \frac{1}{\lambda} \vec{F} = \frac{1}{\lambda} z e \vec{E}$$

Die normierte Lösung der Differentialgleichung für ein δ -Anfangswertproblem entspricht einer mit zunehmenden Zeiten τ verschobenen Gaußfunktion in d_k -Dimensionen.

$$c(\vec{r}, t) = \frac{1}{\left(\sqrt{\pi 4D\tau}\right)^{d_k}} e^{-\left(\frac{|\vec{r} + \vec{v}\tau|^2}{4D\tau}\right)} \quad (2.5)$$

2.3 Anomale Diffusion

Bevor die Grundzüge der *Anomalen Diffusion* näher erläutert werden kann, muß zuerst die molekulare Vorstellung hinter der normalen Diffusion erläutert werden.

2.3.1 "Random walk" zur Beschreibung der Molekülbewegung

Die Darstellung der Diffusionsgleichungen durch die makroskopischen Größen der Konzentration und des Teilchenstroms weicht bei der Beobachtung von Einzelmolekülexperimenten von der zugehörigen Vorstellung ab. Die Diffusion kann auf dieser Ebene anschaulicher durch zufällige Einzelbahnen, "random walks", beschrieben werden. Die Interpretation der oben gefundenen Zusammenhänge erfolgt dabei über Aufenthaltswahrscheinlichkeiten. Bei diesem Übergang zu mikroskopischen Größen muß gewährleistet sein, daß sich an der Physik der Diffusion nichts verändert. Dies wird durch das von Lévy und Kintchin präzisierete *Central Limit Theorem* (CLT, Zentraler Grenzwertsatz) definiert. Zwei anschauliche Forderungen an ein System sind dabei:

- Es dürfen keine langreichweitigen Zustände oder Zuordnungen auftreten.

- Die Verteilungen der integrierten Wahrscheinlichkeiten dürfen nicht zu "breitbandig" sein. Als Beispiel ist die oben beschriebene Integration zur Ermittlung des Mittleren Verschiebungsquadrats anzuführen. Die dabei verwendete Verschiebungswahrscheinlichkeit darf bei der Integration über das zweite Moment nicht als Resultat einen unendlichen Wert hervorrufen.

Diese Forderungen des CLT werden bei der *Anomalen Diffusion* nicht oder nur teilweise erfüllt. Hieraus resultiert ein Übergang von der Mikrobeschreibung der Bewegung hin zu einer Makrobeschreibung, die nicht mehr durch eine einfache Gaußverteilung repräsentiert werden kann, sondern bei komplexen Systemen nur näherungsweise an diese Beschreibungsform angeglichen wird.

2.3.2 Übergang zur Anomalen Diffusion

Als *Anomale Diffusion* wird ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen dem *Mittleren Verschiebungsquadrat* und der *Zeit* bezeichnet [7][23]. Ein üblicher Ansatz des funktionalen Zusammenhangs wird durch eine Potenzfunktion in der Zeit vorgegeben.

$$\overline{\Delta r^2} \sim t^\alpha$$

Der Exponent α wird dabei in drei Wertebereiche unterteilt: $\alpha = 1$ beschreibt den normalen Diffusionszusammenhang für die Brownsche Bewegung, $\alpha > 1$ zeigt eine verstärkte Diffusion bis hin zu einem turbulenten Verhalten, $\alpha < 1$ beschreibt die Diffusion in Subregionen. Die mathematische Beschreibung erfolgt zum Teil auf Grundlage fraktaler Gleichungen. Der Parameter $\alpha = \frac{d_k}{d_f}$ wird als Verhältnis der klassischen Dimension d_k zu einer fraktalen Dimension d_f angegeben, wobei $d_f \geq d_k$ gilt. Diese neue Dimensionsgröße tritt dabei nicht automatisch an die Stelle der klassischen Größe, sondern muß bei jeder Verteilungsberechnung, wie z.B. dem *Mittleren Verschiebungsquadrat*, auch in der Integrationsvorschrift behandelt werden. Eine entsprechende fraktale Ableitung führt zu einer Neuformulierung der Diffusionsdifferentialgleichung [43] und damit auch deren Lösung.

Die *Anomale Diffusion* mit $\alpha < 1$ dient in den unterschiedlichsten Anwendungsgebieten zur Beschreibung von Transportvorgängen, so findet man sie u.a. beim Ladungstransport in amorphen Halbleitern, bei der Dynamikbeschreibung von Teilchen in Polymernetzwerken und der NMR-Diffusionsbestimmung in unregelmäßigen Materialien[28]. Allen diesen Systemen gemein ist die breite Verteilung des störenden Einflusses auf jeder Größen- und Zeitskala. Als ursächlich für dieses Verhalten gelten drei Modellklassen: Verweilpunkte (Traps), Barrieren und zufällig auftretende Kräftefluktuationen [7]. Die einzelnen Partikelbahnen, *Lévy-Flights*, variieren in ihrem mittleren Sprungweite hierdurch sehr stark, so daß sich eine breite mittlere Verteilung ergibt.

Auch bei Membransystemen kann *Anomale Diffusion* sowohl theoretisch als auch experimentell gefunden werden. Die Theorie von Saffmann und Delbrück [55][54] beinhaltet bereits Ansätze, welche unweigerlich zur Beschreibung mittels zeitabhängigen Reibungskoeffizienten und damit *Anomaler Diffusion* führen.

Experimentell wird für das *Mittlere Verschiebungsquadrat* der Ansatz

$$\overline{\Delta r^2}_{2D_axial} = 4D_\alpha t^\alpha$$

favorisiert. Alternativ kann eine zeitabhängige Diffusionsfunktion $D(t) = \frac{D_\alpha}{t^{1-\alpha}}$ definiert werden. Die verwendete Konstante D_α stimmt nicht mehr mit der gewohnten Diffusionskonstante überein und beschreibt nur als Wertepaar mit dem Exponenten α die Bewegungseigenschaften. Da von 1 abweichende α -Werte das anomale Verhalten bestimmen kann dieser Parameter als Grad der Anomalie verstanden werden. Für die normierte Konzentrationsverteilung bei einem δ -Anfangswertproblem ergibt sich die nur leicht modifizierte genäherte Gleichung (2.6), welche in dieser Form nicht mehr aus dem *Fickschen Gesetz* abgeleitet werden kann.

$$c(r, t)_{2D_axial} = \frac{1}{\pi 4 D_\alpha t^\alpha} e\left(-\frac{r^2}{4 D_\alpha t^\alpha}\right) \quad (2.6)$$

Die Meßdaten aus FRAP-Experimenten zeigten schon früh eine Abweichung vom normalen Diffusionsverhalten, diese wurden aber durch eine zweite immobile Fraktion interpretiert. Mit steigender Meßpräzision zeigen sich weitergehende funktionale Abweichungen, die nicht durch ein Zwei-Fraktionen-Modell beschrieben werden können, sondern eine quasi-kontinuierliche Kompartimentverteilung fordern. [56][16].

Die Ursachen für die *Anomale Diffusion* in Membranen sind nicht eindeutig einem der oben genannten Stichpunkte zuzuordnen. „*domain-hopping*“ und „*corrals diffusion*“ beziehen sich zumeist auf Entmischungspänomene oder äußere Einflüsse durch ein Substrat. Zeitlich begrenzte Verweilpunkte („*traps*“) sind ebenfalls auf Substrateinflüsse zurückzuführen, die eine örtliche Immobilisierung hervorrufen. Eine bisher nicht berücksichtigte Ursachenklasse sind in einem Platzwechselmodell begründet, welches eine natürliche Begrenzung darzustellen scheint. Es ist zu bezweifeln, daß der zuletzt genannte Punkt bereits Auswirkungen auf die Diffusionsbeobachtung im $100\text{nm} - 1\mu\text{m}$ -Maßstab zeigt, aber derartige Interpretationen sind gerade bei Einzelmolekülbeschreibungen sehr verbreitet [58].

Der interessanteste Einfluß ist indes die Auswirkung von fluktuierenden Kräften auf das Membransystem. Diese Fluktuationen sind bei schwach adhäranten Riesenvesikeln offensichtlich [50][76]. Bei starker Adhäsion sind diese großflächigen Veränderungen bei normaler Beobachtung nicht mehr wahrzunehmen. Membrandichtefluktuationen oder die Auswirkung von äußeren Kräften auf die lokale Beweglichkeit der Membranbausteine bedingen ein anomales Diffusionsverhalten.

2.4 Translationsdiffusion in Membranen

Die Beschreibung der Translationsdiffusion in Membranen stellt ein schwieriges Problem der Hydrodynamik dar. Für einfache Geometrien und Problemstellungen sind Lösungen dieser Problematik dennoch verfügbar und werden kurz vorgestellt. Auf die Abhandlung der Rotation wird hier verzichtet, da sie in dieser Arbeit eine nur unwesentliche Rolle spielt.

2.4.1 Diffusion in freien Membranen

Für die Diffusion in Membranen wird zunächst ein einfaches Modell herangezogen: Ein Zylinder mit Radius a und einer Höhe h entsprechend der Membrandicke bewegt sich in einem zweidimensionalen System mit der Viskosität η_m (Abb. 2.1). Da für die Membranschicht zumeist kein Geschwindigkeitsgradient be-

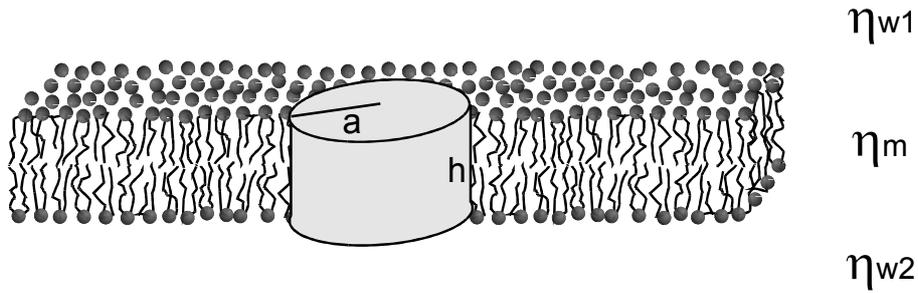


Abbildung 2.1: Diffusion in der freien Membran. Ein Membranbaustein wird als Zylinder mit Radius a und Höhe h in einer unendlichen Membranschicht abstrahiert. Für die jeweiligen Bereiche werden die Viskositäten η_m für die Membran, η_{w1} und η_{w2} für die Flüssigkeit oben und unten verwendet.

rücksichtigt wird, kann eine zweidimensionale Viskosität $\mu_m = \eta_m \cdot h$ definiert werden. Es zeigt sich, daß unter diesen einfachen Annahmen keine Lösung der linearen *Navier-Stokes-Gleichung* zu finden ist, die gleichzeitig die Randbedingung an der Oberfläche des Zylinders und im Unendlichen befriedigt. Dieser Effekt, der als *Stokes-Paradoxon* bekannt ist, wird durch die Berücksichtigung der Bulkviskosität η_w auf ein dreidimensionales System erweitert, für welches sich zunächst genäherte Lösungen des Problems finden lassen [55].

Die system- und materialspezifische Größe in der Diffusionskonstanten D wird in der *Einsteinbeziehung* 2.1 dem Reibungskoeffizienten λ zugeordnet, er ist gleichzeitig die Proportionalitätskonstante zwischen an einem Körper anliegende Kraft F und seiner Geschwindigkeit v . Bei der Ableitung der Membrandiffusion wird stets ein linearer Zusammenhang $F(v) \sim v$ zwischen diesen Größen und damit ein geschwindigkeitsunabhängiger Reibungskoeffizient vorausgesetzt, da nur so der normale Diffusionsprozeß beschrieben werden kann.

Bevor die verschiedenen Formeln zur Beschreibung der Membrandiffusion vorgestellt werden, folgt nun noch die Definition der dimensionslosen Größe ϵ als doppelter, mit der entsprechenden Viskosität gewichteter Flächenanteil. Diese Größe dient dazu, den Effekt der unterschiedlichen Fluiditäten, η_m als Membranviskosität, η_{w1} als obere und η_{w2} als untere Bulkviskosität, auf den Zylinder mit Höhe h und Radius a zu charakterisieren.

$$\epsilon = 2 \left(\frac{\pi a^2 \eta_{w1} + \pi a^2 \eta_{w2}}{2\pi a h \eta_m} \right) = \frac{a}{h} \left(\frac{\eta_{w1} + \eta_{w2}}{\eta_m} \right)$$

Die erste Lösung für die Diffusion in freien Membranen gelang Saffmann und Delbrück [55]. Die von ihnen abgeleitete genäherte Formel (2.7) für den lateralen Reibungskoeffizienten λ_T beschreibt für $\epsilon \leq 0,1$ das Diffusionsverhalten eines die Membran durchspannenden Zylinders, wobei für die Bulkviskosität $\eta_w = \eta_{w1} = \eta_{w2}$ gilt. Die Formel weist jedoch oberhalb der vorgegebenen Grenze deutliche Mängel auf, da bei $\epsilon \approx 1,12$ der Reibungskoeffizient gegen unendlich strebt. Der Wert $\gamma = 0,5772..$ ist hierbei die Eulerkonstante.

$$\lambda_T = \frac{4\pi\eta_m h}{\left(\ln \frac{2}{\epsilon} - \gamma\right)} \quad (2.7)$$

Eine kleine Abschätzung des Wertebereichs liefert mit $\eta_w \approx 1 \times 10^{-3} \text{ sPa}$, $\eta_m \approx 2 \times 10^{-1} \text{ sPa}$ (Werte aus

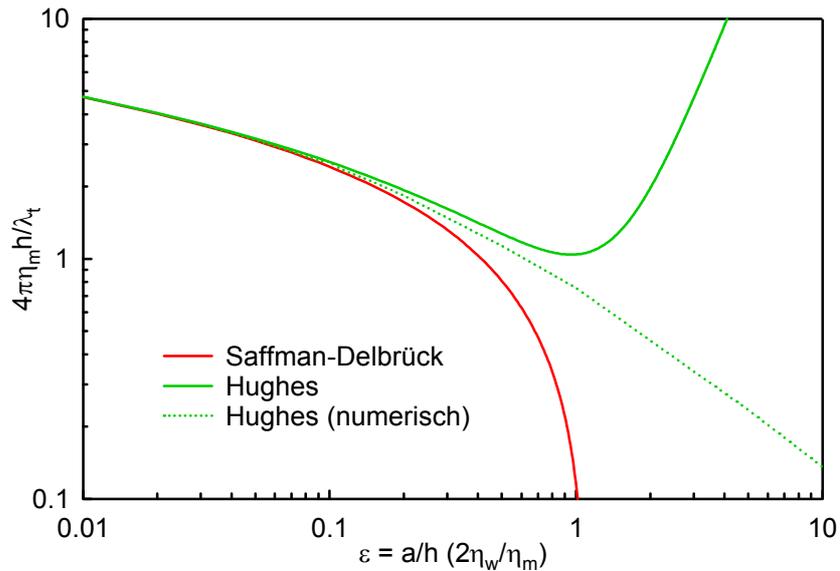


Abbildung 2.2: Vergleich der Formeln für die Beschreibung der Membrandiffusions-Modelle. Die Formel von Saffman-Delbrück ist nur für kleine Werte gültig ($\epsilon < 0,1$) und explodiert sogar bei $\epsilon \approx 1,12$. Die Gleichung von Hughes beschreibt das Verhalten für $\epsilon < 1,0$; numerische Berechnungen führen zu einer exakten Lösung. Als Beispiel kann der Wert für Bacteriorhodopsin mit $\epsilon = 0,006$ angesehen werden, der experimentell bestätigt wurde [47].

[65]) und einer Membrandicke $h = 4nm$ als oberste Grenze für den Zylinderradius a den Wert $a_{\text{Grenze}} = \frac{\epsilon_{\text{Grenze}}}{\left(\frac{2 \cdot \eta_w}{\eta_m}\right)} h = \frac{0,1}{\left(\frac{2 \times 10^{-3} \text{ sPa}}{2 \times 10^{-1} \text{ sPa}}\right)} 4nm = 40nm$ und umfaßt damit einen Großteil der bekannten Membranproteine. Für Bacteriorhodopsin finden Peters und Cherry [47] mit $\epsilon = 0,006$ einen Wert, der die Verwendbarkeit dieser Formel an Experimenten überprüft und bei $24,5^\circ C$ zu einer Diffusionskonstante $D = 1,4 \frac{\mu m^2}{s}$ für das Protein führt.

In realen Zellen wird durch das Cytoplasma auf der Innenseite und die Glykokalix auf der Außenseite die Viskosität der Bulkflüssigkeit heraufgesetzt und es wird schon bei kleinen Membranproteinen der Gültigkeitsbereich überschritten. Eine Erweiterung wurde durch Hughes, Pailthorpe und White [24] vorgenommen und beinhaltet keine grundsätzlich neuen Modellannahmen, sondern ist das Resultat einer erweiterten Berechnung. Die genäherte Formel (2.8) vermeidet die Unstetigkeit der *Saffmann-Delbrück-Formel*.

$$\lambda_T = \frac{4\pi\eta_m h}{\left(\ln \frac{2}{\epsilon} - \gamma + \frac{4}{\pi}\epsilon - \frac{\epsilon^2}{2} \ln \frac{2}{\epsilon}\right)} \quad (2.8)$$

Interessant ist hierbei neben der angegebenen Näherungsformel für $\epsilon < 1$ noch die exakte numerische Berechnung der Integralgleichung, welche hier in Abbildung 2.2 berücksichtigt wird.

2.4.2 Diffusion in gestützten Membranen

Für die Beschreibung der Diffusion in einer gestützten Membran wird das vorher verwendete Modell modifiziert. Die einseitig wirkende Beeinflussung des Geschwindigkeitsfeldes in der Membran durch eine direkt verbundene Substratoberfläche oder durch einen nur schmalen Spalt zwischen dem Substrat und der Membranebene findet in der erweiterten Betrachtung von Evans und Sackmann [13] Berücksichtigung.

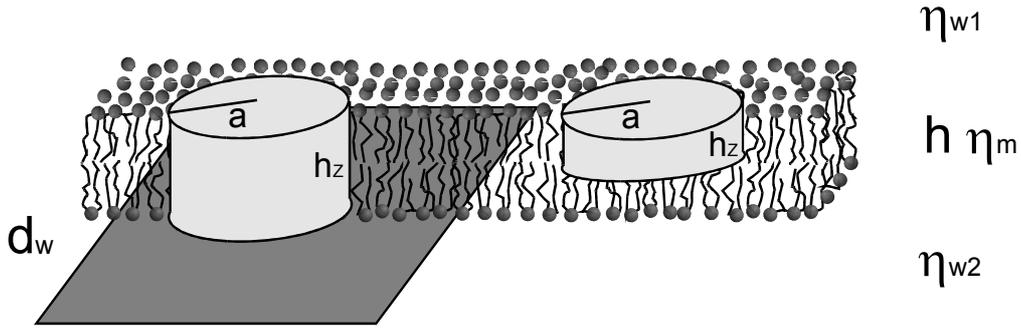


Abbildung 2.3: Diffusion in der gestützten Membran. Die Diffusion eines die Membran durchspannenden Zylinders mit Radius a wird durch eine Substrat im Abstand d_w beeinflusst. Neben dem Standardmodell der Membrandiffusion im engen Kontakt zum Substrat beinhaltet dieses Modell die Diffusion von Membranbausteinen mit von der Membrandicke h abweichender Höhe h_z .

Über die Definition einer charakteristischen Länge $\delta = \frac{\mu_m}{\eta_w} = \frac{h\eta_m}{\eta_w}$ läßt sich ein Bereich eingrenzen, indem eine Beeinflussung des Geschwindigkeitsfeldes beachtet werden muß. Für die obigen Beispielwerte ergibt sich mit der groben Abschätzung $\delta \approx \frac{2 \times 10^{-1} \text{ sPa}}{1 \times 10^{-3} \text{ sPa}} \cdot h \approx 200 \cdot h \approx 800 \text{ nm}$ ein auf die Membrandicke bezogen sehr großer Wirkungsbereich. Der spezielle Reibungskoeffizient zwischen der Membran und dem Substrat b_{ms} dient hier für die Definition des dimensionslosen Parameters ϵ' . Für einen Membran-Substrat-Abstand d_w , mit $d_w \ll \delta$ ergibt sich der Wert von b_{ms} über den Zusammenhang $b_{ms} = \frac{\eta_w}{d_w}$, also anschaulich über das Beschneiden des in die Bulkflüssigkeit wirkenden Geschwindigkeitsfeldes durch das feste Substrat.

$$\epsilon' = a \sqrt{\frac{b_{ms}}{h\eta_m}}$$

Der zusätzlich bei Beachtung der geschwindigkeitsabhängigen Kraft auf den Zylinderboden $F_{ps} = \pi a^2 b_{ps} v_o$ auftretende Reibungsanteil b_{ps} wird oft vernachlässigt. Der gesamte Reibungskoeffizient ergibt mit den modifizierten Besselfunktionen K_0 und K_1 zweiter Gattung nullter und erster Ordnung den Ausdruck

$$\lambda_T = 4\pi\eta_m h \left[\frac{\epsilon'^2}{4} \left(1 + \frac{b_{ps}}{b_{ms}} \right) + \frac{\epsilon' K_1(\epsilon')}{K_0(\epsilon')} \right] \quad (2.9)$$

Für eine Schichtdicke $d_w \simeq \frac{\delta}{2}$ und $\eta_w = \eta_{w1} = \eta_{w2}$ wird $\epsilon' = \epsilon$ und beschreibt damit eine zwischen zwei Substratplatten eingebettete Membranschicht, bei der sich die Reibungsanteile b_{ms} addieren. Es gilt in diesem Fall $\epsilon' = a \sqrt{\frac{2b_{ms}}{h\eta_m}} = a \sqrt{\frac{2\eta_w}{h\eta_m d_w}} = \frac{a}{h} \left(\frac{2\eta_w}{\eta_m} \right)$ und es ergibt sich eine zum oben beschriebenen Fall der freien Membran mit großer Bulkviskosität (2.8) vergleichbare Situation. Durch eine Vernachlässigung der direkten Partikel-Substrat-Wechselwirkung und ihrem rückwirkenden Einfluß auf die Membran, d.h. eine Vernachlässigung des ϵ'^2 -Terms, kann die Übereinstimmung der Lösungen noch gesteigert werden (Abb. 2.4).

Diese Formel 2.9 mit den modifizierten Besselfunktionen K_0 und K_1 zweiter Gattung nullter und erster Ordnung ist eng verwandt mit einer von Saffman [54] berechneten Beziehung und dieser zeigt über eine Entwicklung für kleine ϵ -Werte und $\epsilon' = \epsilon$ den Zusammenhang zur Formel (2.7)

$$\frac{\epsilon^2}{4} + \frac{\epsilon K_1(\epsilon)}{K_0(\epsilon)} \sim \frac{\epsilon^2}{4} + \frac{1 + \frac{1}{2}\epsilon^2 (\ln \epsilon - \frac{1}{4} + \frac{1}{2}\gamma) + \dots}{-(\ln \frac{\epsilon}{2} + \gamma) + \frac{1}{4}\epsilon^2 (-\ln \frac{\epsilon}{2} - \gamma + 1) + \dots} \stackrel{\epsilon \rightarrow 0}{\sim} \frac{1}{(\ln \frac{2}{\epsilon} - \gamma)}$$

Die in den Graphen erkennbare Übereinstimmung läßt sich hierüber auch formal bestätigen.

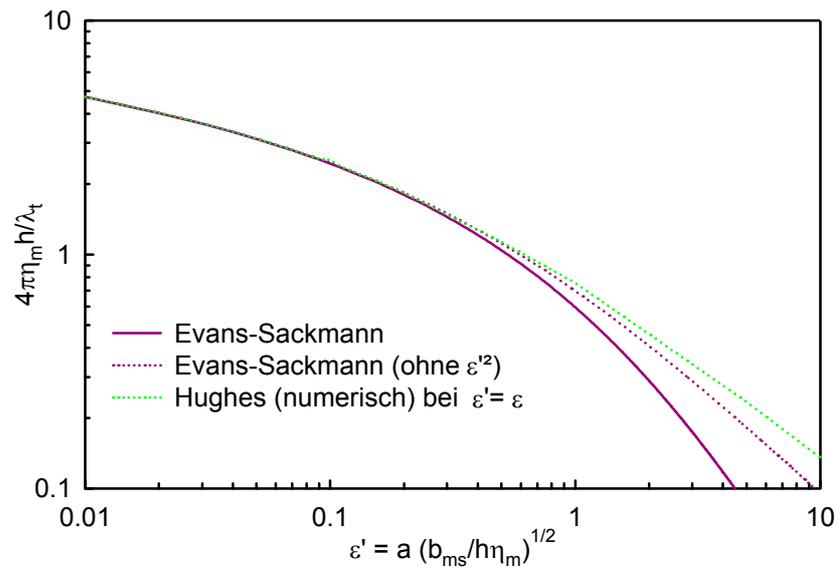


Abbildung 2.4: Diffusionsmodell von Evans-Sackmann. Ein festes Substrat in unmittelbarer Nähe zur Membran wird bei dieser Berechnung des Reibungskoeffizienten mit berücksichtigt. Der prinzipielle Verlauf der Funktion stimmt im Spezialfall $\epsilon' = \epsilon$ mit der numerischen Lösung von Hughes näherungsweise überein. Die Modellansätze sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar.

Eine experimentelle Abschätzung für ein gestütztes Membransystem sowie ein Membranprotein mit von der Membrandicke h abweichender Höhe h_z wird in einer Arbeit von Tamm [17] vorgestellt. Das Problem bei dieser Art der Beschreibung liegt vor allem in den spezifischen Reibungsanteilen für die nur grobe Abschätzungen vorliegen. Für kleine Proteine reicht zumeist die Behandlung mittels der für kleine ϵ -Werte gültige Näherungsformel (2.7).

Kapitel 3

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

In diesem Kapitel werden die grundlegenden Prinzipien der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) dargestellt. Im ersten Teil wird zunächst eine Theorie zur Diffusions- und Driftmessung auf Basis von gauß- und zylinderförmiger Fokusbeschreibung entworfen und erst danach auf die technischen Aspekte zur Realisierung näher eingegangen. Die in dieser Arbeit verwendeten Meßapparaturen beruhen auf dem Prinzip der optischen Eingrenzung des Meßvolumens durch einen konfokalen Mikroskopaufbau (Abb. 1.2) für den die entsprechenden Zusammenhänge dargestellt werden.

3.1 Grundprinzip der FCS

Die FCS beruht auf dem Prinzip der Fluktuationsanalyse. Die gemessenen Signale werden dabei bezüglich ihres Mittelwerts bewertet und Abweichungen verstärkt. Als mathematisches Hilfsmittel dient die Autokorrelation, da durch sie die Änderungen gewichtet nach ihrem Energiespektrum in die resultierende Funktion eingehen. Dieses zunächst sehr abstrakt wirkende Vorgehen läßt sich durch den realen Meßvorgang etwas verständlicher beschreiben.

Als Basis für die Beschreibung der Diffusion dient ein "random-walk"-Modell, d.h. einzelne beobachtbare Teilchen bewegen sich statistisch unabhängig in einem Volumen. Bei der Beobachtung eines Teilvolumens erhält man einzelne "Flugbahnen" der punktförmigen Teilchen. Diese Teilchenbahnen werden nicht als Ortskurven notiert, sondern es wird eine Signalfunktion generiert die proportional zur aktuellen Partikelzahl ist. Durch die Diffusion werden kurzzeitig die Anzahl der im Teilvolumen vorhandenen Partikel variieren. Für sehr niedrige Partikelzahlen ist diese Variation im Verhältnis zum Mittelwert größer als für hohe. Durch die Bewertung der Variation des Einzelereignisses gegenüber dem Mittelwert ist damit die Möglichkeit geschaffen die mittlere Partikelzahl im Teilvolumen zu bestimmen.

Einen weiteren Aspekt stellt die mittlere Aufenthaltsdauer dar. Bei frei diffundierenden Teilchen wird, bei genügend langer Beobachtungszeit, jeder Punkt im Volumen gleich häufig "besucht". Bei definierter Volumengeometrie kann aus der Signalfunktion eine mittlere Aufenthaltsdauer bestimmt werden, welche direkt von der Diffusionskonstante abhängt.

Bei einem reales System wird die Signalfunktion mit der emittierten Fluoreszenzintensität $F(t)$ der beob-

achteten Moleküle gleichgesetzt. Sie setzt sich zusammen aus der mittleren Intensität \overline{F} und dem Fluktuationsanteil $\delta F(t)$.

$$F(t) = \overline{F} + \delta F(t)$$

Für den zeitlichen Mittelwert der Fluktuationen gilt $\langle \delta F(t) \rangle = 0$ und allgemein wird die Konvention verwendet $\langle \rangle = \int dt$. Das Fluoreszenzsignal wird aus dem gesamten Volumen zusammengefaßt. Es setzt sich zusammen aus der Konzentration der fluoreszierenden Moleküle C , der anregenden Intensität I und einem Geräteparameter S . Dieser Geräteparameter beschreibt wieviel des emittierten Fluoreszenzlichts den Detektor erreicht und wahrgenommen wird.

$$F(t) = \iiint_{\mathbb{R}^3} S(\vec{r}) I(\vec{r}) C(\vec{r}, t) d^3r$$

Vereinfacht wird die anregende Intensität und der Geräteparameter in einer zeitunabhängigen Funktion zusammengefaßt, die als *Molecule Detection Efficiency* (MDE) bezeichnet wird und das effektiv wirkende Detektionsvolumen $W(\vec{r}) = S(\vec{r}) I(\vec{r})$ beschreibt. Ein gebräuchlicher Ansatz für dieses Volumen ist die Beschreibung durch eine dreidimensionale Gaußfunktion mit einheitlichem $1/e^2$ -Radius ω_o senkrecht zur optischen Achse und separat zu behandelndem Radius z_o entlang der optischen Achse.

$$W(\vec{r}) = W_o e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{\omega_o^2}\right)} e^{-2\left(\frac{z}{z_o}\right)^2} \quad (3.1)$$

Diese Vorgaben werden in einem realen System durch einen fokussierten gaußförmigen Laserstrahl für die (x, y) -Ebenen und für die z -Richtung durch die konfokale Geometrie und die damit gewichtete Detektierbarkeit erfüllt.

Die Aufbereitung der Signalfunktion geschieht über die normierte Autokorrelation.

$$g(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Sie kann durch die beschriebenen Definitionen auf eine Konzentrationsfluktuation δC zurückgeführt werden. Der zugehörige Fluktuationsterm $\Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ wird durch die betrachtete physikalische Situation vorgegeben und muß der jeweiligen Problemstellung angepaßt werden.

$$\Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle \quad (3.2)$$

Zusammengefaßt folgt der Ausdruck für die normierte Autokorrelationsfunktion in welcher \overline{C} die mittlere Konzentration an fluoreszierenden Teilchen darstellt.

$$g(\tau) - 1 = \frac{\iiint_{\mathbb{R}^3} \iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r}) W(\vec{r}') \Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) d^3r d^3r'}{\overline{C}^2 \left[\iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r}) d^3r \right]^2} \quad (3.3)$$

Die Konzentration an fluoreszierenden Partikeln im beobachteten Volumen kann durch verschiedene Effekte beeinflusst werden (Abb. 3.1). Die Translationsdiffusion stellt einen Standardfall dar. Die Beobachtungsdauer ist in diesem Fall gleich der Aufenthaltsdauer im Detektionsvolumen, welche durch die Diffusion vorgegeben wird. Durch eine Reaktion des Farbstoffträgers mit anderen Molekülen verändert sich im einfachsten Fall die Diffusionskonstante des fluoreszierenden Produkts oder die Fluoreszenzfähigkeit wird verändert. Eine Zerstörung des Moleküls oder ein zeitweise wirkender nichtfluoreszierender Zustand, wie

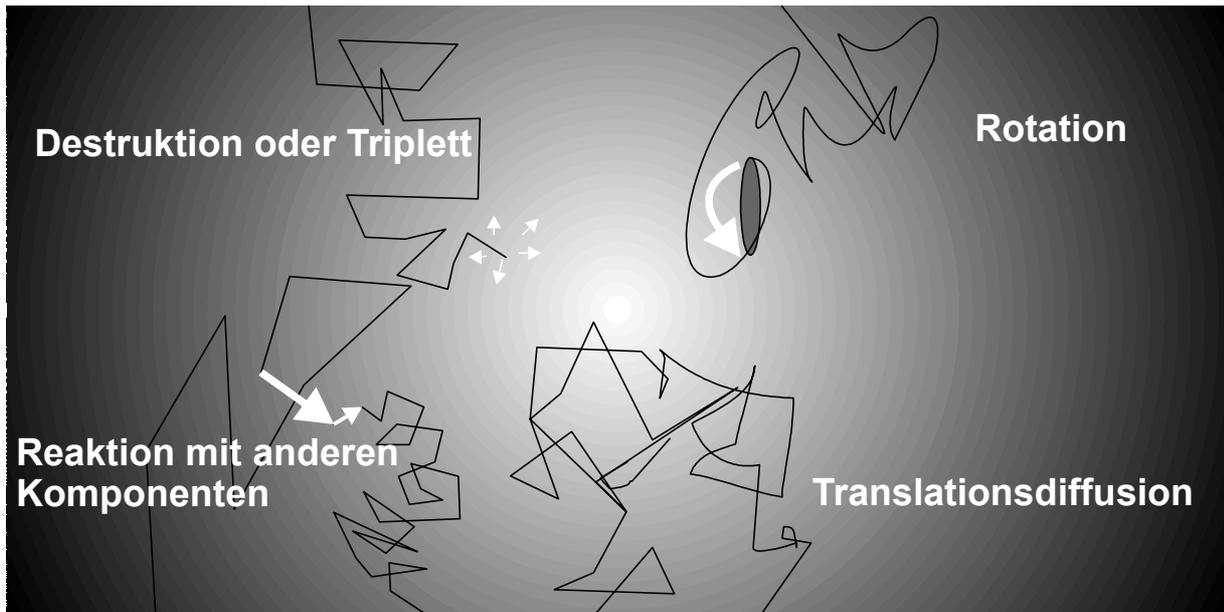


Abbildung 3.1: Verschiedene Effekte beeinflussen das beobachtete Signal einer Einzelmolekülbahn. Die Translationsdiffusion stellt einen Standardfall dar. Eine zusätzliche Rotation gewinnt erst mit der Molekülgröße an Bedeutung. Eine Reaktion mit anderen Komponenten verändert das Diffusionsverhalten. Die Destruktion oder der Tripletzustand beenden während eines einzelnen Fokusdurchtritts temporär oder permanent das Fluoreszenzverhalten. Weitere Effekte wie Sättigung, Lichtstreuung und reale Detektoreigenschaften beeinflussen das Detektionssignal zusätzlich.

der Triplet-Zustand, verkürzen die scheinbare Aufenthaltsdauer im Volumen. Auch die Rotation von sehr großen Molekülen, z.B. DNA-Strängen, kann die Signalfunktion beeinträchtigen.

3.2 Diffusion einer Komponente

Der Fluktuationsterm $\Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$ (Formel 3.2) wird durch die physikalische Situation vorgegeben [12]. Für reine Diffusion in drei Dimensionen wird er beschrieben durch die Gleichung

$$\Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \frac{\bar{C}}{(\pi 4D\tau)^{\frac{3}{2}}} e^{-\left(\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2 + (z-z')^2}{4D\tau}\right)} \quad (3.4)$$

Ein erster Schritt bei der Lösung der Integrale 3.3 stellt die Berechnung des Nenners mit Hilfe der Beziehung $\int_{-\infty}^{\infty} e^{-ax^2} dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}}$ dar. Das Ergebnis beschreibt das Fokusbild durch die $1/e^2$ -Radien der Gaußintensität.

$$\iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r}) d^3r = \iiint_{\mathbb{R}^3} e^{-\frac{2}{\omega_0^2}x^2} e^{-\frac{2}{\omega_0^2}y^2} e^{-\frac{2}{z_0^2}z^2} dx dy dz = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z_0$$

Für die Berechnung des Zählerintegrals 3.3 kann eine Separation durchgeführt und jede Dimension getrennt betrachtet werden. In einem zweiten Schritt wird die Ersetzung $\tau_{\text{diff}} = \frac{\omega_0^2}{4D}$ durchgeführt. Nach einer quadratischen Ergänzung im Exponenten kann die erste Integration durchgeführt werden. Mit der hierbei verwendeten Beziehung für uneigentliche Gauß-Integrale kann sofort die zweite Integration erfolgen. An dieser Stelle der Berechnung wird klar, warum in der Lösung keine Exponentialfunktion mehr zu finden ist. Dies ändert sich erst, wenn ein nichtquadratischer Restterm auftritt. Nach einer weiteren Umformung

erhält man die unten stehende Lösung.

$$\begin{aligned}
 \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} W_x W_{x'} \Phi_{x'x} dx dx' &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{2}{\omega_o^2} x'^2} e^{-\frac{2}{\omega_o^2} x^2} e^{-\frac{(x-x')^2}{4D\tau}} dx dx' \\
 &= \frac{\sqrt{\pi} \sqrt{4D\tau}}{\sqrt{2\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} + 1}} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{1}{4D\tau} \left(-\left(\frac{1}{2\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} + 1}\right) + \left(2\frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} + 1\right) \right) x'^2} dx' \\
 &= \frac{\pi}{2} \sqrt{4D\tau} \omega_o \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}}
 \end{aligned}$$

Zusammengefügt ergibt sich die normierte Korrelationsfunktion für Diffusion in einem gaußförmigen Volumen zu

$$\begin{aligned}
 g(\tau) - 1 &= \frac{\frac{\bar{C}}{(\pi 4D\tau)^{\frac{3}{2}}} \left(\frac{\pi}{2} \sqrt{4D\tau}\right)^3 \left(\omega_o \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}}\right)^2 z_o \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\omega_o^2}{z_o^2} \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}}}{\bar{C}^2 \left[\left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \omega_o^2 z_o\right]^2} \quad (3.5) \\
 &= \frac{1}{\bar{C}} \frac{1}{\omega_o^2 z_o} \frac{1}{\pi^{\frac{3}{2}}} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right) \sqrt{1 + \frac{\omega_o^2}{z_o^2} \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}}
 \end{aligned}$$

Für die spätere Auswertbarkeit werden die Einzelfaktoren zusammengefaßt. Mit den Ersetzungen

$$\tau_{\text{diff}} = \frac{\omega_o^2}{4D} \quad k = \frac{\omega_o^2}{z_o^2} \quad V = \frac{4}{3} \pi \omega_o^2 z_o \quad N = \bar{C} V \quad g_o = \frac{1}{N} \frac{4}{3\sqrt{\pi}} \approx 0,75 \frac{1}{N}$$

ergibt sich die fundamentale Formel für die Diffusionsmessung eines fluoreszierenden Partikels in einem gaußförmigen Detektierbarkeitsvolumen.

$$\boxed{g(\tau) - 1 = g_o \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}}} \quad (3.6)$$

In Abbildung (3.2 oben) werden die Auswirkungen der verschiedenen Parameter auf den Kurvenverlauf, wie er sich bei der Messung darstellt, abgebildet. Die Diffusionszeit τ_{diff} beschreibt größenordnungsmäßig, wie schnell ein Teilchen im Mittel das Volumenelement V verläßt. Sie ist nur über den Volumenradius ω_o mit der Diffusionskonstante D verknüpft. Der Faktor k beschreibt das räumliche Ausdehnungsverhältnis des Fokus. Gängige Spezialfälle wären $k = 1$ für gleiche Gaußradien in allen Richtungen, $k = 0$ für einen nur in zwei Dimensionen gaußförmigen Zylinder und $k = 0,04$ als Beispiel für einen realen Fokus mit einer fünffach größeren z -Ausdehnung $z_o = k^{-\frac{1}{2}} \cdot \omega_o = 5 \cdot \omega_o$. Die mittlere Anzahl von Partikeln N findet sich mit einem kleinen Korrekturfaktor im Vorfaktor g_o wieder und über die umgekehrte Proportionalität werden die obigen Annahmen (Abschnitt 3.1) über die Zahl der beobachteten Partikel auch mathematisch bestätigt.

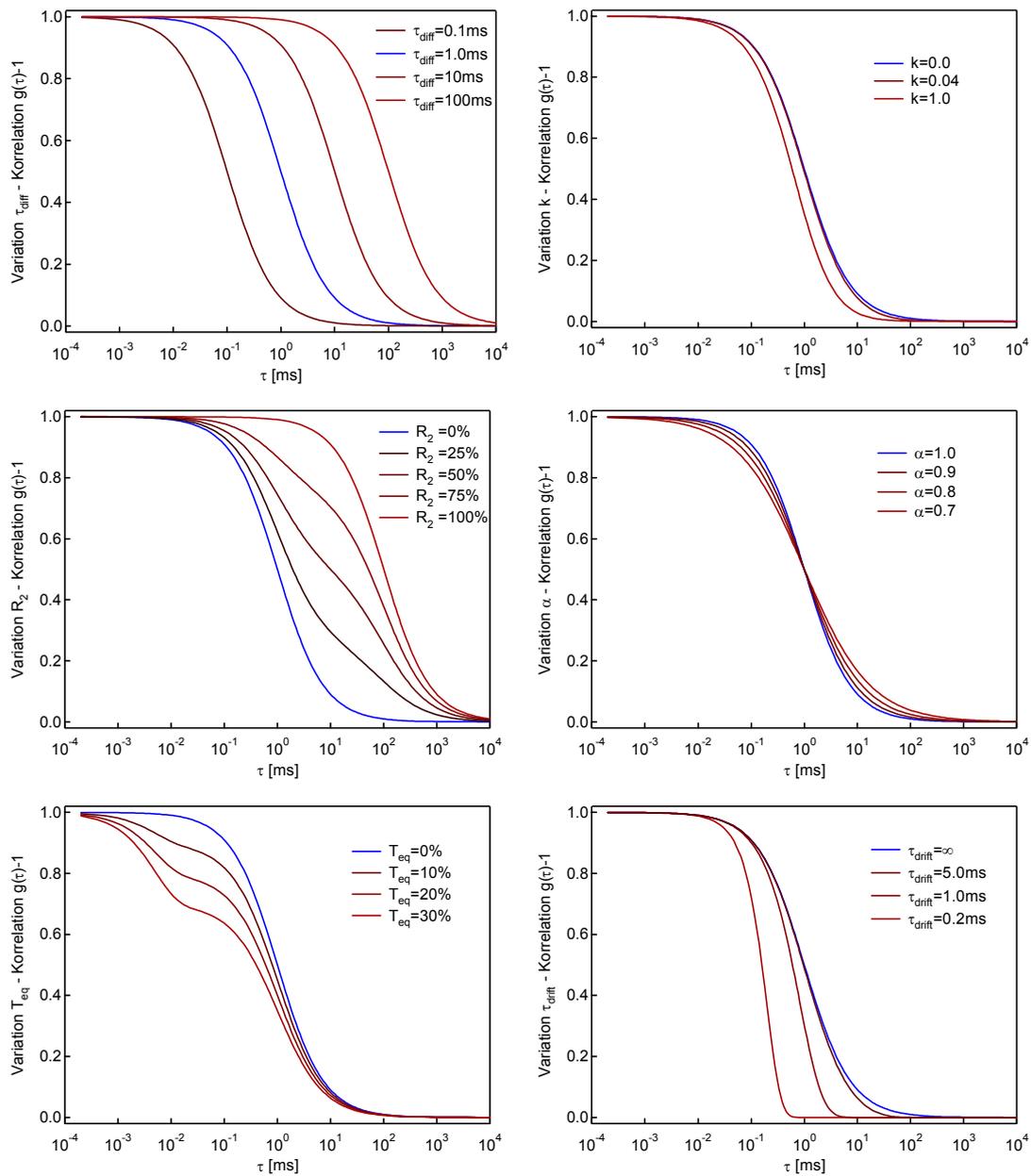


Abbildung 3.2: Parametervariation für die FCS-Funktion 4.1. Standardparametersatz ($N = 1$; $\tau_{diff1} = 1$ ms; $k = 0$; $T_{eq} = 0$; $\tau_{triplett} = \infty$; $\tau_{drift1} = \infty$; $R_2 = 0$; $\tau_{diff2} = \infty$; $\alpha = 1$). **(oben links)** Der Parameter τ_{diff1} verschiebt die Kurve. Bei dieser Parametrisierung entspricht der Zeitwert der halben Amplitude der Diffusionszeit. **(oben rechts)** Zwischen dem k -Wert des Zylindermodells $k = 0$ und einem Gauß-Ellipsoid mit $\omega_z = 5 \cdot \omega_o$, entspricht mit $k = 0.04$ einem realen Fokus, ist kaum ein Unterschied zu erkennen. Bei kugelförmiger Gaußverteilung $k = 1$ sind deutliche Abweichungen zu erkennen. **(mitte links)** Für $\tau_{diff1} = 1$ ms und $\tau_{diff2} = 100$ ms lassen sich je nach Anteil R_2 Mischformen finden. **(mitte rechts)** Der Grad der anomalen Diffusion α bewirkt für kleinere Werte einen flacheren Abfall der Funktion. **(unten links)** Der Triplet-Anteil T_{eq} , hier bei $\tau_{triplett} = 5 \mu s$, zeigt seinen Einfluß über einen Amplitudenabfall bei sehr kleinen Zeiten. **(unten rechts)** Eine driftende Komponente zeigt die größte Auswirkung, wenn die Driftzeit τ_{drift1} und die Diffusionszeit τ_{diff1} in der gleichen Größenordnung liegen.

3.3 Drift einer Komponente

Die Drift einer Komponente bewirkt eine verkürzte mittlere Aufenthaltsdauer in einem Beobachtungsbereich, da sie als unabhängig von der eigentlichen Diffusionbewegung zu betrachten ist. Für die Berechnung der Korrelationsfunktion wird ein modifizierter Fluktuationsterm [39] verwendet, der in diesem Modell eine Driftkomponente (Formel 2.5) senkrecht zur optischen Achse, in diesem Fall in x -Richtung, erhält.

$$\Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \frac{\bar{C}}{(\pi 4D\tau)^{\frac{3}{2}}} e^{-\left(\frac{(x-x'+v\tau)^2 + (y-y')^2 + (z-z')^2}{4D\tau}\right)} \quad (3.7)$$

Das Problem kann für jede Raumrichtung getrennt berechnet werden, so daß eine Erweiterung auf beliebige Driftvektoren nicht problematisch ist. Die Berechnung des Zählerintegrals in einer Dimension mit den Ersetzungen $\tau_{\text{diff}} = \frac{\omega_o^2}{4D}$ und $\tau_{\text{drift}} = \frac{\omega_o}{v}$ erfolgt wieder über zwei quadratische Ergänzungen und die Verwendung der Beziehung für uneigentliche Gauß-Integrale. Im Gegensatz zu obiger Ableitung (3.5) ergibt sich ein Restterm und nach der Integration bleibt eine Exponentialfunktion übrig.

$$\begin{aligned} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} W_x W_{x'} \Phi_{x'x} dx dx' &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{2}{\omega_o^2} x'^2} e^{-\frac{2}{\omega_o^2} x^2} e^{-\frac{(x-x'+v\tau)^2}{4D\tau}} dx dx' \\ &= \frac{\pi}{2} \sqrt{4D\tau} \omega_o \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}} e^{-\left(\left(\frac{\tau}{\tau_{\text{drift}}}\right)^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)}\right)} \end{aligned}$$

Das Nennerintegral bleibt unverändert und der gesamte Ausdruck kann, unter Zuhilfenahme der Ersetzungen

$$\tau_{\text{drift}} = \frac{\omega_o}{v} \quad \tau_{\text{diff}} = \frac{\omega_o^2}{4D} \quad k = \frac{\omega_o^2}{z_o^2} \quad g_o = \frac{1}{N} \frac{4}{3\sqrt{\pi}}$$

für die Korrelationsfunktion mit Diffusion und Drift, fast komplett von obiger Ableitung übernommen und nur an die jeweilige Driftrichtung angepaßt werden.

$$g(\tau) - 1 = g_o \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}}} e^{-\left(\left(\frac{\tau}{\tau_{\text{drift}}}\right)^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)}\right)} \quad (3.8)$$

Die angegebene Formel 3.8 ist für eine Driftrichtung senkrecht zur optischen Achse gültig. Bei einer Erweiterung mit Driftanteilen in z -Richtung, also entlang der optischen Achse, muß in dem Exponenten die abweichende Fokustiefe mit Hilfe des k -Faktors berücksichtigt werden.

3.4 Triplet und andere konkurrierende Anteile

Neben dem eigentlichen diffusiven Prozeß sind bei einem realen Meßsystem auch andere Vorgänge, zumeist ungewollt, beteiligt. Diese proben- oder aufbaubezogenen Eigenschaften lassen sich nur zum Teil durch erweiterte Überlegungen in einfache Gleichungen packen.

3.4.1 Triplett

Die Auswirkung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes wird bei der Triplett-Behandlung deutlich. Neben den für die Fluoreszenz verantwortlichen Singulett-Zuständen kann die Energie der Anregung auch über einen Triplett-Zustand strahlungslos, oder zumindest zeitverzögert, abgegeben werden. Die Ratenkonstante, mit der dieser Zustand abgebaut wird, ist kleiner als die der Fluoreszenz und verzögert die später erneut mögliche Anregung des Farbstoffs derart, daß der Photonenschauer eines Fokusbereichs unterbrochen wird.

Eine einfache Behandlung dieses Effekts führt zu einer Korrektur der Korrelationskurve mit der unten angegebenen Formel 3.9, die als Faktor in die Bewertung mit eingeht [74].

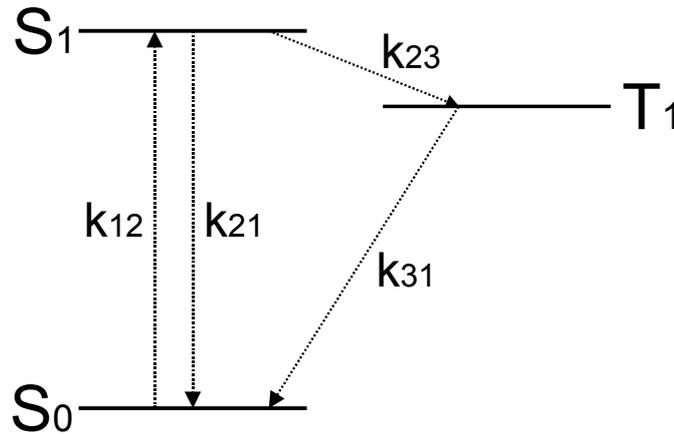


Abbildung 3.3: Vereinfachtes Energieschema mit eingezeichneten Übergangsraten k_{ij} . Vom Grundzustand S_0 ausgehend wird das Molekül mit der Übergangsrate k_{12} in den ersten angeregten Zustand S_1 überführt, wobei diese Rate wesentlich durch die Anregungsintensität und den Anregungsquerschnitt des Moleküls beeinflusst wird. Aus dem S_1 -Zustand wird die Energie entweder strahlend als Fluoreszenz mit k_{21} abgegeben oder über die Intersystem-Crossing-Rate k_{23} in den ersten Triplett-Zustand T_1 überführt. Von T_1 wird die Energie strahlungslos oder über Phosphoreszenz abgegeben, wobei die Übergangsrate in den S_0 -Zustand deutlich, etwa 200 – 1000 fach, kleiner als die Fluoreszenzrate k_{21} ist. Ein Molekül in diesem Zustand blockiert zeitlich die gewünschte Fluoreszenz.

Als anschauliche Grundlage für die Beschreibung dient ein vereinfachtes Energieschema (Abb. 3.3). Die Übergangsraten des Grundzustands S_0 , des ersten angeregten Zustandes S_1 und des ersten Triplett-niveaus T_1 bilden ein Differentialgleichungssystem für die jeweiligen zeitabhängigen Besetzungszahlen,

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} = \begin{bmatrix} -k_{12} & k_{21} & k_{31} \\ k_{12} & -(k_{23} + k_{21}) & 0 \\ 0 & k_{23} & -k_{31} \end{bmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix}$$

deren Lösung bei Vorgabe der Anfangsbedingungen über das Finden der Eigenwerte λ_i eingeleitet wird. Von den ermittelten Eigenwerten ist nur der dritte von Interesse, da $\lambda_1 = 0$ nur das Erreichen eines stationären Status für $t \rightarrow \infty$ ausdrückt und $\lambda_2 = -(k_{21} + k_{12})$ als "antibunching"-Term eine deutlich höhere Meßpräzision erfordert. Der Wert λ_3 ist direkt mit der Rate für die Zunahme des Triplettanteils verknüpft und kann für $k_{12} + k_{21} \gg k_{31} + k_{23}$ genähert werden als

$$\lambda_3 = - \left(k_{31} + \frac{k_{12}k_{23}}{k_{12} + k_{21}} \right) = - \frac{1}{\tau_{\text{triplett}}}$$

und für den Besetzungsanteil im Gleichgewichtszustand ergibt sich der normierte Anteil

$$T_{\text{eq}} = \frac{k_{12}k_{23}}{k_{12}(k_{23} + k_{31}) + k_{31}(k_{21} + k_{23})}$$

Wie zu erwarten, sind beide Größen mit der Anregungsrate $k_{12} = \sigma_{\text{ex}}I_{\text{ex}}$ verknüpft und damit von der anregenden Lichtleistung I_{ex} und dem Anregungsquerschnitt des Farbstoffs σ_{ex} abhängig. Die Triplettrelaxationszeit τ_{triplett} ist in dieser Definition speziell an die Bedürfnisse der FCS angepaßt und beinhaltet sämtliche Ratenkonstanten k_{ij} . Sie ist nicht mit der in der Farbstoffspektroskopie verwendeten Triplettzeit identisch ($\tau_{\text{triplett}} \neq \frac{1}{k_{23}}$).

Die letztendlich verwendete Formel für die Triplettkorrektur der Korrelationsfunktion folgt aus der Lösung der Differentialgleichungen unter Beachtung des Anfangswertproblems. Letzteres wird vorgegeben für den Start im Grundzustand S_0 .

$$F_{\text{triplett}}(\tau) = \left[1 - T_{\text{eq}} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}} \right) \right] \quad (3.9)$$

Sie dient in den meisten Fällen nicht zur Beurteilung des Farbstoffsystems mit seinen Übergangsraten, sondern der Beschreibung des diffusiven Systems auch für kleine Zeiten (Abb. 3.2) respektive großen Laserleistungen. Eine erweiterte ortsabhängige Betrachtung der Triplettkorrektur [73] ist kaum notwendig.

3.4.2 Hintergrund

Eine bei der Messung auftretende konstante Hintergrundintensität $I_{\text{Hintergrund}}$ beeinflusst die Bewertung der Fluktuationsamplitude. Das Einzelsignal verliert in Relation zur Gesamtintensität $I_{\text{Gesamtsignal}}$ an Gewicht. Die scheinbare Gesamtpartikelzahl wird erhöht [42][30]. Durch einen Vorfaktor läßt sich die Korrelationsfunktion korrigieren.

$$F_{\text{Hintergrund}} = \left[1 - \frac{\langle I_{\text{Hintergrund}} \rangle}{\langle I_{\text{Gesamtsignal}} \rangle} \right]^2 \quad (3.10)$$

Diese Faktor kann bei den meisten Messungen vernachlässigt werden. Er wird bei der Abschätzung der Partikelzahl vor einem reflektierenden Substrat eingesetzt.

3.4.3 Weitere konkurrierende Anteile

Neben den bisher genannten Effekten gibt es eine Vielzahl von weiteren, die das Fluoreszenzverhalten beeinflussen. Ein chemischer Zerfall, oder allgemeiner eine Reaktion, ob mit oder ohne Fluoreszenzänderung, führt zu einer Modifikation des Systems und damit des Detektionssignals. Eine Rotation des Probenmoleküls spielt im Normalfall erst bei sehr großen Ausdehnungen eine Rolle und kann in den meisten Fällen vernachlässigt werden. Ebenfalls bei großen Molekülen kann ein durch Lichtstreuung "verwaschener" Fokus entstehen, der erst als sekundärer Effekt ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Bei hohen Anregungsleistungen kann ein Farbstoffmolekül, entsprechend einem Sättigungsverhalten nicht mehr angeregt werden und die Überlegungen bezüglich des Detektionsvolumens muß korrigiert werden. Die Todzeit des Detektors und die damit verbundene Nichtlinearität der Zählrate beeinflussen das Signalverhalten zusätzlich.

3.5 Normale und Anomale Diffusion in 2D-Systemen

Die in den vorherigen Teilabschnitten formulierten allgemeinen Betrachtungen der bei der FCS wichtigen Korrelationsfunktionsanteile müssen hier nun an die speziellen Gegebenheiten bei der Diffusion in Membranen angepaßt werden[59]. Normale und Anomale Diffusion in einem zweidimensionalen System (Formel 2.6) erfordert die angepaßte Definition der Fluktuationsfunktion.

$$\Phi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) = \langle \partial C(\mathbf{r}, 0) \partial C(\mathbf{r}', \tau) \rangle = \frac{\bar{C}}{(\pi 4 D_\alpha \tau^\alpha)} e^{-\left(\frac{(x-x')^2 + (y-y')^2}{4 D_\alpha \tau^\alpha}\right)}$$

Die Integration in zwei Dimensionen ist angelehnt an die obige Betrachtung und die dort gefundenen Zusammenhänge sind mit minimalen Änderungen durchführbar.

$$\begin{aligned} g(\tau) - 1 &= \frac{\iint_{\mathbb{R}^2} \iint_{\mathbb{R}^2} W(\mathbf{r}) W(\mathbf{r}') \Phi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \tau) d^2r d^2r'}{\bar{C}^2 \left[\iint_{\mathbb{R}^2} W(\mathbf{r}) d^2r \right]^2} \\ &= \frac{\frac{\bar{C}}{(\pi 4 D_\alpha \tau^\alpha)} \left(\frac{\pi}{2} \sqrt{4 D_\alpha \tau^\alpha}\right)^2 \left(\omega_o \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau^\alpha}{\tau_{\text{diff}}^*}}}\right)^2}{\bar{C}^2 \left[\left(\frac{\pi}{2}\right) \omega_o^2\right]^2} \\ &= \frac{1}{\bar{C} \omega_o^2 \pi} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau^\alpha}{\tau_{\text{diff}}^*}\right)} \end{aligned}$$

Die modifizierte Diffusionszeit $\tau_{\text{diff}}^* = \frac{\omega_o^2}{4 D_\alpha}$ hat als Einheit s^α . Die Unterscheidung soll darauf hinweisen, daß die beim Fit der Meßdaten gefundenen Werte nicht mehr auf Grundlage der normalen Diffusionskonstante zu interpretieren sind, sondern eine neue physikalische Bedeutung besitzen. Da der Parameter α in die Fitfunktion eingeht, wird die mögliche Fehlerquelle durch die mißverständliche Namensgebung $\tau_{\text{diff}}^\alpha$ bewußt ausgeschlossen. Durch das Zusammenfassen des Vorfaktors ergibt sich eine sehr kompakte Schreibweise der normierten Korrelationsfunktion für anomale Diffusion in Membranen:

$$\boxed{g(\tau) - 1 = g_o \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau^\alpha}{\tau_{\text{diff}}^*}\right)}} \quad (3.11)$$

$$\tau_{\text{diff}}^* = \frac{\omega_o^2}{4 D_\alpha} \quad A = \pi \omega_o^2 \quad N = \bar{C} A \quad g_o = \frac{1}{N}$$

Der funktionale Verlauf (Abb. 3.2) hätte ebenfalls durch einen Grenzübergang für die obige Diffusionskorrelationsfunktion 3.6 erhalten werden können. Dies ergibt sich mit $k = \frac{\omega_o^2}{z_o^2} \rightarrow 0$, d.h. einer Gaußfunktion mit unendlicher Breite in z-Richtung, die keinen Verlauf zeigt und insbesondere kein Verlassen der Teilchen in dieser Raumrichtung zuläßt. Die Volumeninterpretation im Vorfaktor und die Erweiterung auf anomale Diffusion stellen dann nur noch geringfügige Änderungen dar.

3.6 Mehrkomponentensysteme

Die bisherigen Überlegungen gehen von der Annahme aus, daß sich im Probenbereich stets nur eine Sorte von fluoreszierenden Teilchen befindet. Dies ist bei vielen zu beobachtenden Systemen nicht gegeben. Wenn die Diffusionsbewegungen der unterschiedlichen Teilchensorten unabhängig voneinander sind, über-

lagern sich deren Einzelkorrelationsfunktionen.

Bei einem zweidimensionalen System mit M unterschiedlichen Teilchensorten mit jeweiliger Diffusionszeit τ_{diff_i} werden die Komponenten, gewichtet durch ihren Anteil R_i , überlagert.

$$g(\tau) - 1 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^M R_i \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}_i}}\right)}$$

Für die korrekte Wiedergabe der Gesamtpartikelzahl N muß als Nebenbedingung $1 = \sum_{i=1}^M R_i$ gelten. Für ein Zwei-Komponenten-System ist der prinzipielle Verlauf der Korrelationsfunktion bei unterschiedlichen Anteilen in Abb. 3.2 dargestellt.

Die eigentlich für jede Einzelkomponente getrennt durchzuführende Triplet-Betrachtung wird in der Praxis oft vernachlässigt, da sie bei einer Standard-FCS-Messung nicht separiert werden kann und nur allgemein als Korrektur für kleine Zeiten τ angesehen wird.

3.7 Beschreibung des konfokalen Volumens in der FCS

Ein für die Herleitung der Autokorrelationsfunktion wichtiger Aspekt ist die exakte Beschreibung des illuminierten und detektierten Volumenbereiches. Da ältere Anordnungen mit speziellen Spiegelsystemen inzwischen durch konfokale Mikroskopaufbauten (Abb. 1.2) ersetzt sind und diese Konformation auch in dieser Arbeit verwendet wird, gelten die hier gemachten Betrachtungen auch ausschließlich für letztere.

3.7.1 Standardbeschreibung für ideale Objektiv-Proben-Systeme

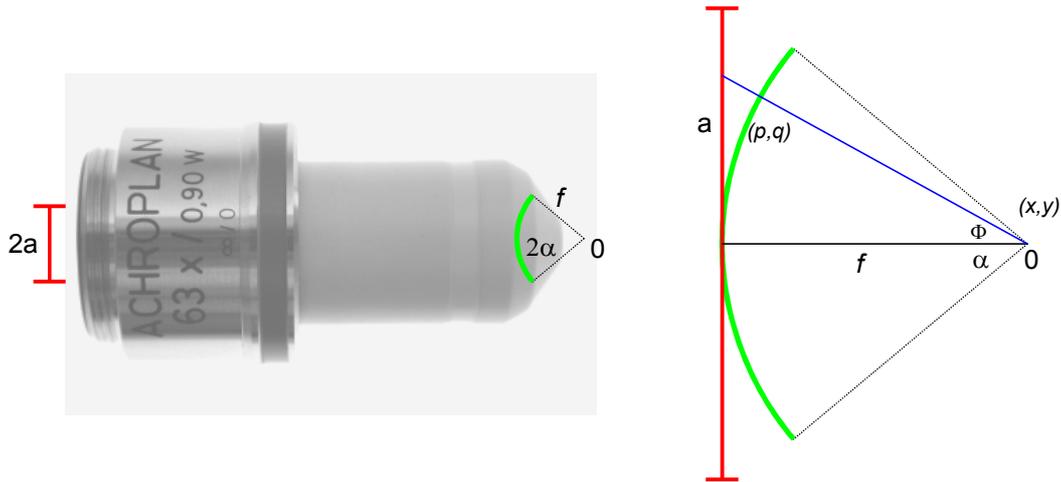


Abbildung 3.4: Schemazeichnung eines idealisierten Objektivs. Das auf die mikroskopseitige Eintrittspupille mit Radius a treffende Licht wird phasenerhaltend durch das Objektiv auf ein virtuelles Kugelsegment mit Radius f entsprechend der nominalen Brennweite abgebildet. Die Numerische Apertur $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ dient als Kennzahl für den maximalen Öffnungswinkel α bei gegebenem Proben-Brechungsindex n .

Das elementare Bauteil eines konfokalen Mikroskopaufbaus ist das verwendete Objektiv. Für dessen Verständnis werden zunächst die Objektivparameter und ihr Zusammenhang erläutert. Neben der vorgegebenen Vergrößerung stellt die Numerische Apertur $N.A.$ hierbei eine wichtige Kenngröße dar. Heute gebräuchliche auf unendlich korrigierte Objektive bilden erst mit ihrer Tubuslinse, bei Zeiss $f_{\text{Tubus}} = 164,5 \text{ mm}$, eine abbildende Anordnung und die zugeordnete Vergrößerung ist erst in dieser Kombination gültig. Obwohl der hochkomplexe Aufbau eines Objektivs mit allen verwendeten Zwischen- und Korrekturlinsen zunächst als nicht beschreibbar erscheint, kann man diesen vernachlässigen und als "Black-Box" behandeln. Von außen betrachtet verbleibt ein Gebilde aus hinterer mikroskopseitiger Eintrittspupille mit Aperturradius a , probenseitiger Kugelsegment-Phasenfront mit einem maximalen Öffnungswinkel α , entsprechend der Numerischen Apertur $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ und einem Probenbrechungsindex n . Der Radius der Kugelphasenfront entspricht der nominalen Brennweite $f = f_{\text{Tubus}}/M$ des Objektivs und setzt sich zusammen aus der Brennweite der Tubuslinse und der Vergrößerung M . Beleuchtet man die Eintrittspupille des Objektivs mit einem Laserstrahl der Vakuum-Wellenlänge λ_o und Leistung P sowie gaußförmiger radialer Intensitätsverteilung mit einem $1/e^2$ -Radius ω_1 , so ergibt sich für die Lichtintensität in der Nähe des Fokuspunktes $z = 0$

eine in radialer Richtung (x, y) gauß- und in z -Richtung lorentzförmige Verteilung.¹

$$I(x, y, z) = \frac{2P}{\pi\omega^2(z)} e^{-\left(\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega^2(z)}\right)} \quad (3.12)$$

Die Tailenbreite ω_o des Strahles in der Fokusebene bestimmt sich durch die Beziehung $\omega_o = \frac{\lambda f}{\pi\omega_1} = \frac{\lambda_o f}{n\pi\omega_1}$ und für eine in z -Richtung verschobene Schnittfläche, im Defokusbereich, ergibt sich $\omega^2(z) = \omega_o^2 + z^2 \left(\frac{\omega_1}{f}\right)^2$. In Abschnitt 3.7.2 wird die Gültigkeit dieser Beziehung nochmals aufgegriffen. Hier sei nur erwähnt, daß die Korrektur des Objektivs dem Brechungsindex der Probe entsprechen sollte und bei einer Eintrittsöffnung mit Radius a der beleuchtende Laserstrahl mit dem Radius ω_1 deutlich kleiner sein muß. Im allgemeinen wird als Grenze $\omega_1 \leq a/2$ verwendet.

Ein fluoreszierendes Molekül erfährt an seiner Position in der Probe eine Anregung, die proportional zur lokalen Lichtintensität ist und durch obige Gleichung 3.12 beschrieben werden kann.

Nach dieser Betrachtung der Anregbarkeit einer Position in der Probe folgen nun weitere Überlegungen zur entsprechenden Detektierbarkeit dieses Punktes; dies geschieht in Anlehnung an [49][52]. Für die Beschreibung wird zunächst die *Point Spread Function* (PSF) definiert. Die Scheibenflächenfunktion $\text{circ}(r)$ ist abschnittsweise definiert und besitzt für die Radien $|r| \leq 1$ den Wert 1 und für $|r| > 1$ den Wert 0.

$$\text{PSF}(\mathbf{r}', \mathbf{r}, z) = \frac{\text{circ}\left(\frac{|\mathbf{r}' - \mathbf{r}|}{R(z)}\right)}{\pi R^2(z)} = \begin{cases} \frac{1}{\pi R^2(z)} & \text{für } \frac{\sqrt{(x' - x)^2 + (y' - y)^2}}{R(z)} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.13)$$

Ein leuchtender Punkt an der Stelle (x', y', z) wird in der Fokusebene ($z = 0$) als kleines Scheibchen mit einer Größe entsprechend dem Auflösungsvermögen R_o der optischen Komponenten festgelegt. Für Punkte außerhalb der Fokusebene wird diese Scheibe entsprechend einer Lorentzfunktion $R^2(z) = R_o^2 + z^2 \tan^2(\alpha)$ vergrößert und berücksichtigt die Unschärfe durch die Abbildung des Punktes auf der Fokusebene.

Eine weitere Funktion $T(r)$ definiert die Einschränkung der Detektion aufgrund des Pinholes. Durch die konfokale optische Geometrie kann das Pinhole mit Radius S_o über die Vergrößerung M auf eine verkleinerte Scheibe mit Radius $s_o = S_o/M$ in die Fokusebene projiziert werden. Die so beschriebene *Transmissionsfunktion* lautet

$$T(r) = \text{circ}\left(\frac{r}{s_o}\right) = \begin{cases} 1 & \text{für } \frac{r}{s_o} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

Über die *Collection Efficiency Function* (CEF) wird zu jedem Punkt (x, y, z) im Probenvolumen eine integrierte Detektionseffizienz erstellt. Ein an diesem Punkt emittiertes Lichtquant passiert mit einer zu der CEF proportionalen Wahrscheinlichkeit das Objektiv und das Pinhole.

$$\text{CEF}(\mathbf{r}, z) = \frac{\iint_{\mathbb{R}^2} T(r) \text{PSF}(\mathbf{r}', \mathbf{r}, z) d^2 r'}{\iint_{\mathbb{R}^2} \text{PSF}(\mathbf{r}', \mathbf{r}, z) d^2 r'}$$

Eine Kombination der Anregbarkeit und Detektierbarkeit für einen bestimmten Probenpunkt wird durch die

¹ Zur übersichtlicheren Darstellung wird der dreidimensionale Vektor \vec{r} , bestehend aus den kartesischen Koordinaten (x, y, z) , unterteilt in den (x, y) -Ebenenvektor \mathbf{r} und der Koordinate z . Zusätzlich wird die Konvention $|\mathbf{r}| = r$ verwendet.

Molecule Detection Efficiency (MDE) definiert.

$$\text{MDE}(x, y, z) = \text{CEF}(x, y, z) \cdot I(x, y, z)$$

Erst durch diese Überlagerung aufgrund der konfokalen Geometrie wird bei geeigneter Wahl von Pinhole- und Laseranregungsradius, in Bezug auf die optischen Komponenten, eine idealisierte Intensitätsfunktion möglich, die eine vereinfachte Betrachtung des Systems erlaubt

$$\text{MDE}(x, y, z) \approx W(\vec{r})_{\text{ideal}} = I_o e^{-2\left(\frac{x^2+y^2}{\omega_o^2}\right)} e^{-2\left(\frac{z^2}{z_o^2}\right)}$$

und das wirkende Fokusvolumen durch eine dreidimensionale Gaußfunktion nähern läßt.

Bedingungen für die Idealisierung des Fokusvolumens

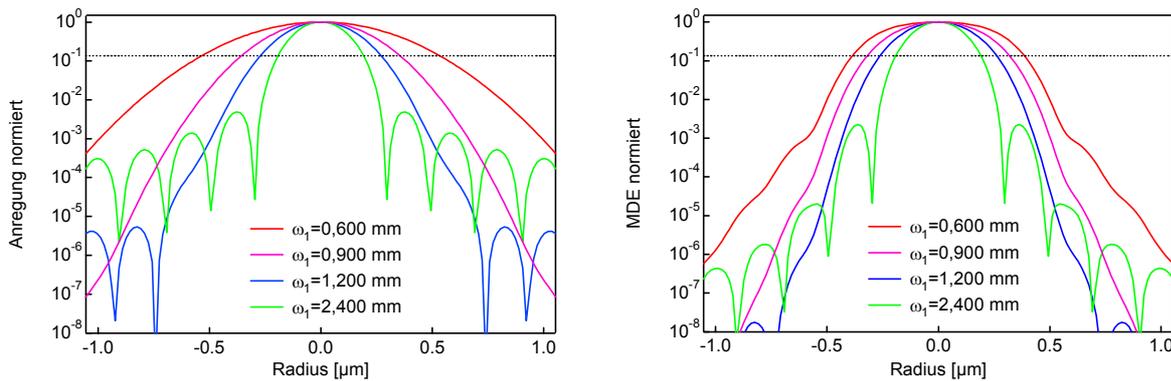


Abbildung 3.5: Anregungsintensität und Detektierbarkeitsfunktion für die Fokusebene eines Objektiv-Pinhole-Systems. Die Eckdaten dieses Systems sind dem realen Aufbau nachempfunden. Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 514\text{nm}$; Detektionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 555\text{nm}$; Pinholeradius $25\mu\text{m}$; Objektiv-Tubustyp entsprechend Zeiss x63/0,9W und einem Eintrittspupillenradius $a \approx 2,4\text{mm}$. Zusätzlich ist die $1/e^2$ -Linie gestrichelt eingezeichnet. **(links)** Der das Objektiv ausleuchtende Laserstrahl, mit Gauß-Intensitätsverteilung und $1/e^2$ -Radius ω_1 , wird je nach Breite unterschiedlich durch die Objektivpupille beschnitten und es ergibt sich eine Faltung mit der Funktion für homogene Ausleuchtung. **(rechts)** Die MDE-Funktion zeigt einen Einfluß jenseits des Pinholeabbilds $\frac{25\mu\text{m}}{63} \approx 0,4\mu\text{m}$ und schränkt so nur sehr breite Verteilungen in ihrem $1/e^2$ -Radius ein. Sie unterdrückt im Idealfall die Auswirkung der Nebenmaxima der Anregungsintensität.

Es ist einleuchtend, daß die Idealisierung des Fokusvolumens nicht automatisch bei jeder Kombination der vorgegebenen Parameter möglich ist. Die Intensitätsverteilung senkrecht zur optischen Achse stellt kein Problem dar, da sie durch den gaußförmigen Laserstrahl vorgegeben ist. Es muß für diese Richtungen gewährleistet sein, daß diese Vorgabe nicht durch ungeschickte Wahl des Laserstrahl- und des Pinholedurchmessers zerstört wird. Für den Laserstrahldurchmesser wird eine Bedingung für die Beugungseigenschaft des Objektivs angewendet. Der Aperturradius a begrenzt den anregenden Gaußstrahl mit Radius ω_1 . Damit diese Beschränkung bei der Abbildung keine Verfälschung der Gaußverteilung bedingt, wird als Limit

$$\omega_1 \leq \frac{a}{2}$$

verwendet. In Abbildung (3.5 links) sind die Auswirkungen einer abweichenden Vorgabe dargestellt. Für die anregende Intensitätsverteilung im Probenvolumen bleibt unter dieser Randbedingung die Gaußverteilung mit Radius $\omega_o = \frac{\lambda f}{\pi \omega_1} = \frac{\lambda_o f}{n \pi \omega_1}$ in sehr guter Näherung erhalten. Bei der konfokalen Abbildung kann

das Pinhole mit Radius S_o in die Fokusebene projiziert werden. Bei der Berücksichtigung der Objektivvergrößerung M folgt ein Radius in der Probe von $s_o = \frac{S_o}{M}$. Damit das Pinhole nicht die Detektion der Intensitätsverteilung verändert, sollte

$$\omega_o \leq s_o$$

gelten. Eine kleinere Wahl des Pinholes ist nicht zu empfehlen, da das Zusammenwirken der Anregungsfunktion $I(x, y, z)$ mit der Detektierbarkeitsfunktion $CEF(x, y, z)$ das wirkende Volumen am effektivsten begrenzt.

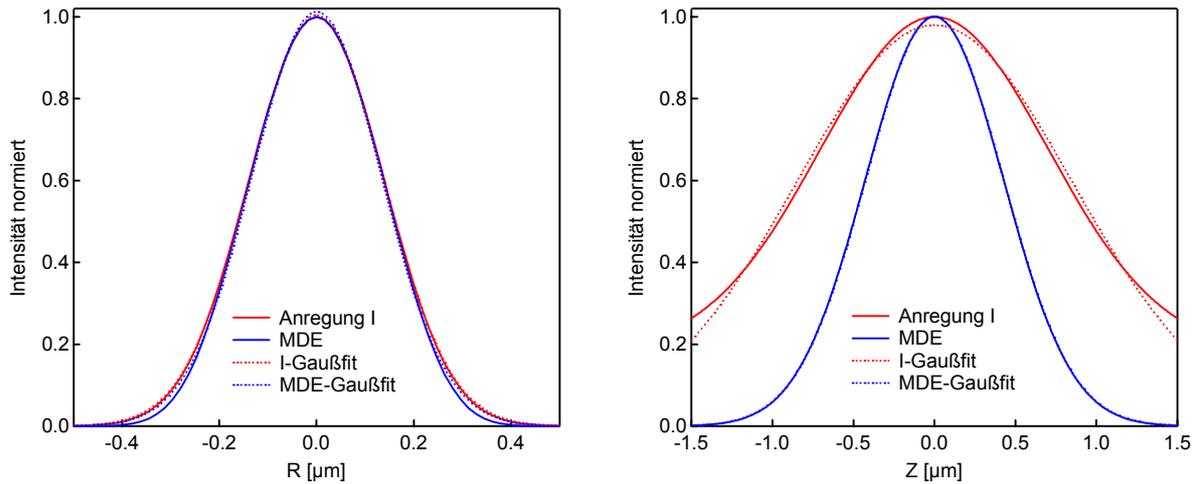


Abbildung 3.6: Anregungsintensität I und wirkende Detektionsfunktion MDE für ein Objektiv-Pinholesystem mit jeweiligem Gaußfit. Die Eckdaten dieses Systems sind dem realen Aufbau nachempfunden. Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 514nm$; Anregungsstrahlbreite $\omega_1 = 1,2mm$; Detektionswellenlängen $\lambda_{em} = 530 - 610nm$; Pinholeradius $25\mu m$; Objektiv-Tubustyp entsprechend Zeiss x63/0,9W und einem Eintrittspupillenradius $a \approx 2,4mm$ eingezeichnet. **(links)** Die Intensitätsverteilung senkrecht zur optischen Achse wird kaum modifiziert und läßt sich sehr gut durch eine Gaußfunktion beschreiben. **(rechts)** Die Anregungsintensität I ist in Z-Richtung lorentzverteilt und läßt sich nur sehr schlecht durch eine Gaußfunktion beschreiben. Die wirkende Detektionsfunktion MDE zeigt unter dem Einfluß des Pinholes einen deutlich steileren Abfall und ist sehr gut durch eine Gaußfunktion näherbar.

Ein, nach diesen Vorgaben, konfokal angebrachtes Pinhole verändert die gaußförmige Intensitätsverteilung in der (x, y) -Ebene kaum (Abb. 3.6 links), zeigt aber einen deutlichen Einfluß auf die in z -Richtung wirkende Intensitätsverteilung (Abb. 3.6 rechts)². Der entlang der optischen Achse durch die Anregung vorgegebene lorentzförmige Verlauf ist zunächst nur sehr schlecht durch eine Gaußfunktion beschreibbar. Durch die Pinhole-begrenzte Abbildung des Fokussvolumens erfährt dieses eine zusätzliche Einschränkung in der Detektierbarkeit. Die Überlagerung aus Anregbarkeit und Detektierbarkeit (CEF) ergibt eine wirkende Intensitätsverteilung (MDE), welche sehr gut durch eine Gaußfunktion beschrieben werden kann.

² Die Berechnung der Intensitätsverteilung für den Fokusschnitt bei $R = 0$ erfolgt als Vorgriff zu der Defokusbeschreibung in Abschnitt 3.7.2.3. Mit den Näherungsformeln für die Anregung 3.12 und die PSF 3.13 ergeben sich vergleichbare Verteilungen.

3.7.2 Erweiterte Betrachtung von idealen Objektiv-Proben-Systemen

Die bisher vorgestellte Theorie zur Beschreibung des Objektiv-Proben-Systems erlaubt die vereinfachte Betrachtung des Effekts der konfokalen Geometrie. Sie beinhaltet die Verwendung von fertigen, bereits genähernten, Formeln für die Anregungsintensitätsverteilung und das Auflösungsvermögen $R(z)$. Die Entstehung der Formeln erscheint zunächst nicht einleuchtend. In dieser erweiterten Betrachtung wird für ein idealisiertes Objektiv-Proben-System eine rechentechnisch aufwendigere aber prinzipvereinfachte Beschreibung entwickelt.

Beschreibung für die Fokusebene

Mit der Näherung für kleine optische Weglängenunterschiede, d.h. bei Objektivgeometrie eine Beschränkung auf kleine Aperturen, läßt sich das beugungsbedingte Verhalten in der Fokusebene über die *Fraunhofer-Formel* [6, S. 421] beschreiben.

$$U(x, y) = \iint_{\mathbb{R}^2} V(p, q) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xp+yq)} dpdq \quad (3.14)$$

Die Amplitudenbelegung der Eintrittspupille $V(p, q)$ kann dabei über eine Fouriertransformation in den Probenraum (x, y) abgebildet werden. Daraus folgt die Amplitudenfunktion des Probenraums $U(x, y)$. Mit dem *Parseval-Theorem* für Fouriertransformation [6, S. 385]

$$\iint_{\mathbb{R}^2} |U(x, y)|^2 dx dy = \left(\frac{1}{\lambda f}\right)^2 \iint_{\mathbb{R}^2} |V(p, q)|^2 dpdq \quad (3.15)$$

läßt sich die zu berücksichtigende Normierungskonstante ermitteln, welche bei jeder Intensitätsbetrachtung korrigiert werden muß.

Spezialfall der gaußförmigen unbeschränkten Pupillenamplitudenfunktion Als erste Anwendung bietet sich der Spezialfall der gaußförmigen unbeschränkten Pupillenamplitudenfunktion $V(p, q)$ an, da an diesem Beispiel das Vorgehen für die Berechnung sehr anschaulich erläutert werden kann. Die über die Beziehung $\iint_{\mathbb{R}^2} |V(p, q)|^2 dpdq = 1$ normierte Gaußfunktion

$$V(p, q) = \sqrt{\frac{2}{\pi\omega_1^2}} e^{-\left(\frac{p^2+q^2}{\omega_1^2}\right)}$$

beschreibt die Amplitudenverteilung der Objektivseite. Die probenseitige Fokusamplitudenfunktion $U(x, y)$ läßt sich daraus über die oben schon vorgestellte Beziehung

$$U(x, y) = \iint_{\mathbb{R}^2} V(p, q) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xp+yq)} dpdq = \lambda f \sqrt{\frac{2}{\pi\omega_o^2}} e^{-\left(\frac{x^2+y^2}{\omega_o^2}\right)}$$

berechnen, wobei die schon früher verwendete Ersetzung $\omega_o = \frac{\lambda f}{\pi\omega_1} = \frac{\lambda_o f}{n\pi\omega_1}$ gewählt wird. Die Gaußfunktion wird in eine Gaußfunktion mit geänderter Breite transformiert und die im vorherigen Abschnitt verwendete Beziehung zwischen den e^{-2} -Radien der Gauß-Intensitätsfunktionen folgt direkt aus der Berechnung der unbeschränkten Pupillenamplitudenfunktion.

Spezialfall der homogenen beschränkten Pupillenamplitudenfunktion Der Fall der homogenen beschränkten Pupillenamplitudenfunktion ist aus zwei Gründen von besonderem Interesse. Jedes reale Objektiv hat eine Eintrittspupille mit definierten geometrischen Abmessungen. Dieser Umstand muß bei jeder realen Anregung in Betracht gezogen werden. Für den üblichen Fall der runden Objektiv-Eintrittspupille mit Radius a läßt sich diese Einschränkung berechnen. Der zweite Grund liegt in der Beschreibung der Detektion. Das Objektiv gewichtet im Idealfall keine Amplitudenverteilung und bei der Rückberechnung einer detektierten Intensität in ihren Entstehungsort muß gerade diese homogene Amplitudenbelegung berechnet werden. Diese Vorstellung geht natürlich direkt mit dem Begriff des Auflösungsvermögens einher.

Für die in der Literatur gebräuchliche Form der Amplitudennormierung $\iint_{\mathbb{R}^2} V(p, q) dpdq = 1$ ergibt sich die beschreibende Funktion für die runde Eintrittsapertur zu

$$V(p, q) = \frac{\text{circ}\left(\frac{\sqrt{p^2+q^2}}{a}\right)}{\pi a^2} = \begin{cases} \frac{1}{\pi a^2} & \text{für } \frac{\sqrt{p^2+q^2}}{a} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases}$$

Die sich so ergebende eingeschränkte Pupillenamplitudenfunktion läßt sich nach einem gut beschriebenen Schema [6] entwickeln und ist hier nur der Vollständigkeit halber skizziert.

$$\begin{aligned} U(x, y) &= \iint_{\mathbb{R}^2} V(p, q) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xp+yq)} dpdq \\ &= \frac{1}{\pi a^2} \iint_{\mathbb{R}^2} \text{circ}\left(\frac{\sqrt{p^2+q^2}}{a}\right) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xp+yq)} dpdq \end{aligned}$$

Für die Lösung der Integrale werden zunächst Polarkoordinaten eingeführt, $x = r \cos(\varphi)$, $y = r \sin(\varphi)$, $p = s \cos(\gamma)$ und $q = s \sin(\gamma)$, um die Aperturgeometrie zu berücksichtigen.

$$\begin{aligned} U(r, \varphi) &= \frac{1}{\pi a^2} \int_0^a \int_0^{2\pi} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}rs(\cos(\varphi)\cos(\gamma)+\sin(\varphi)\sin(\gamma))} d\varphi ds \\ &= \frac{1}{\pi a^2} \int_0^a \int_0^{2\pi} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}rs \cos(\varphi-\gamma)} d\varphi ds \end{aligned}$$

Durch geschickte Verwendung von Definitionen der Besselfunktionen, $J_n(x) = \frac{i^{-n}}{2\pi} \int_0^{2\pi} e^{ix \cos(\alpha)} e^{in\alpha} d\alpha$ und $\int_0^x x' J_0(x') dx' = x J_1(x)$, lassen sich die Integrale lösen.

$$U(r) = \frac{1}{\pi a^2} \int_0^a 2\pi J_0\left(\frac{2\pi rs}{\lambda f}\right) s ds = 2 \frac{J_1\left(\frac{2\pi ra}{\lambda f}\right)}{\frac{2\pi ra}{\lambda f}}$$

Die sich hieraus durch quadrieren ergebende Intensitätsfunktion stellt sich bei der Auftragung als helle Fläche mit vielen abwechselnd dunklen und hellen Ringen dar. Die nach Airy benannte Mittelscheibe beinhaltet einen Großteil der Gesamtintensität. Die erste Nullstelle R_o der Intensitätsfunktion, welche sich direkt aus dem Argument der Besselfunktion ergibt,

$$R_o \approx \frac{3,8 \dots \lambda_o}{2\pi} \frac{\lambda_o}{n \frac{a}{f}} \approx 0,61 \frac{\lambda_o}{N.A.}$$

wird für die Beschreibung des Auflösungsvermögens eines Objektives herangezogen. Bei diesem Abstand

lassen sich zwei leuchtende Punkte in der beugungslimitierten Abbildung noch getrennt darstellen.

Konfokale Beschreibung für die Fokusebene

Die sich aus den Spezialfällen ergebende Betrachtung für die Fokusebene läßt sich nun auf die Berechnung des konfokalen Fokusschnittes anwenden. Ein anregender gaußförmiger Laserstrahl wird durch die Eintrittspupille mehr oder weniger beeinflusst und die resultierende Anregungsverteilung in der Probe ergibt sich als Faltung der Gaußfunktion mit der homogenen beschränkten Funktion (Abb. 3.5 links).

Die Lösung der homogenen beschränkten Amplitudenfunktion beschreibt gleichzeitig die Detektierbarkeit eines Punktes im Probenvolumen, hier in der Fokusebene, und läßt sich so direkt als *Point Spread Function* (PSF) identifizieren. Mit diesen modifizierten Vorgaben läßt sich nun zunächst die *Collection Efficiency Function* (CEF) über eine durch die Pinhole-Transmissionfunktion gewichtete Flächenintegration ermitteln. Die Überlagerung dieser Detektierbarkeitsverteilung mit der Anregbarkeitsverteilung ergibt die *Molecule Detection Efficiency* (MDE), also die effektive Beobachtungsverteilung (Abb. 3.5 rechts). Für eine Intensitätsabschätzung der Nebenminima würden die vom Radius abhängigen Funktionen noch durch das Flächenelement $dA = 2\pi r dr$ gewichtet und damit verstärkt.

Allgemeine Beschreibung der Objektivseigenschaften (Defokus-Beschreibung)

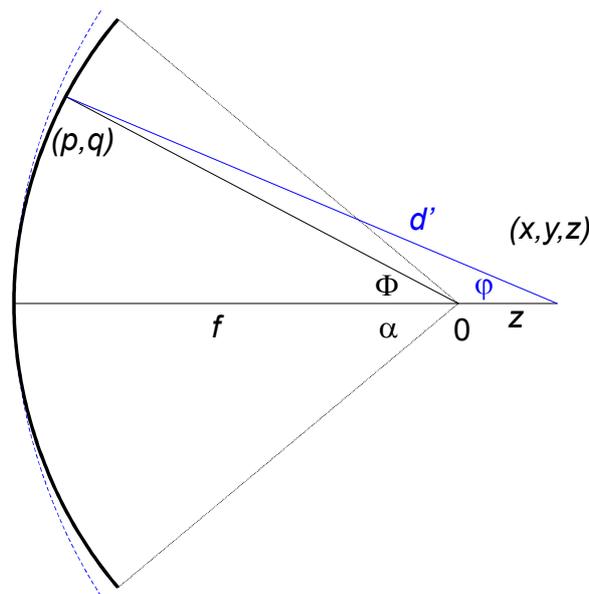


Abbildung 3.7: Defokusbeschreibung für ideale Objektiv-Schichtsysteme. Für den Bereich in unmittelbarer Nähe zum Fokuspunkt kann durch eine winkel- und wellenlängenabhängige Phasenverschiebung die Intensitätsverteilung berechnet werden. Die modifizierte optische Weglänge für ein Kugelsegment mit Radius $f + z$ läßt sich dafür aus geometrischen Überlegungen ableiten.

Die bisher für die Fokusebene gemachten Betrachtungen können auf die Beschreibung von fokusnahen Punkten erweitert werden [63][6]. Die bisherige reelle Pupillenamplitudenfunktion auf dem phasengleichen Kugelsegment mit Radius f erleidet bei dem Übergang zu einem Kugelsegment mit Radius $f + z$ eine wellenlängen- und winkelabhängige Phasenverschiebung, die durch die *Defokus-Phase-Funktion*

DPF(p, q, z), mit $|\text{DPF}(p, q, z)| = 1$, beschrieben werden kann.

$$U(x, y, z) = \iint_{\mathbb{R}^2} V(p, q) \text{DPF}(p, q, z) e^{-i\frac{2\pi}{\lambda_f}(xp+yq)} dpdq$$

Für die in Abbildung 3.7 dargestellte Idealisierung läßt sich aus rein geometrischen Überlegungen die sich ergebende optische Weglänge direkt bestimmen.

$$\text{DPF}(p, q, z) = e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} d'} = e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \left((f+z) - f \sqrt{1 + 2\frac{z}{f} \cos\left(\frac{\sqrt{p^2+q^2}}{f}\right) + \frac{z^2}{f^2}} \right)}$$

Ein kleiner Test dieser Formel für die Fokusebene $z = 0$ ergibt, wie zu erwarten, keinen winkelabhängigen Phasenverlauf für das Kugelsegment. Eine konstante Phase würde bei der Berechnung der Intensitätsfunktion wegfallen. Dies erklärt auch die für die Fokusebene unberücksichtigt gebliebene Unabhängigkeit von der Wellenlänge.

Durch die Defokusbeschreibung der optischen Abbildung läßt sich das konfokale Prinzip der Fokusebene (Abschnitt 3.7.2.2) auf die Volumenberechnung übernehmen. Die beschränkten Pupillenamplitudenfunktionen liefern bei gaußförmiger Ausleuchtung die Gauß-Anregungsverteilung I und im homogenen Fall die Punktdetektierbarkeit (PSF) im Probenvolumen. Über die Integration der PSF gewichtet mit der Pinholefunktion T folgt die Detektierbarkeitsverteilung im Probenvolumen CEF. Das wirkende, konfokale Fokusvolumen MDE setzt sich aus der Anregbarkeit und der Detektierbarkeit eines Punktes in der Probe zusammen.

Eine Beispielberechnung für ein reales System ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Die Objektivdaten entsprechen mit einer Vergrößerung $M = 63$ und einer Numerischen Apertur $N.A. = 0,9$ dem Zeiss x63/0,9W-Objektiv. Das Wasserobjektiv ist nicht deckglaskorrigiert und wird bei der vorgesehenen Brennweite der Tubuslinse von $f = 164,5\text{mm}$ eingesetzt. Das verwendete Pinhole hat einen Radius $S_o = 25\mu\text{m}$ und wird in der Idealisierung als Scheibchen mit Radius $s_o = \frac{S_o}{M} = \frac{25\mu\text{m}}{63} \approx 0,4\mu\text{m}$ in das Probenvolumen konfokal abgebildet. Der anregende Laserstrahl der Wellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 514,5\text{nm}$ leuchtet die mikroskopseitige Eintrittspupille des Objektivs gaußförmig mit einem $1/e^2$ -Radius der Intensität von $\omega_1 = 1200\mu\text{m}$, das entspricht der halben Apertur $\omega_1 = \frac{q}{2}$, aus. Die Detektionsfunktionen werden für einen Wellenlängenbereich von $\lambda_{\text{em}} = 530 - 610\text{nm}$ berechnet.

Die gefundenen Intensitätsverläufe zeigen typische Charakteristika. Die gaußförmige Anregung verbreitert sich mit zunehmendem Abstand vom Fokuspunkt, zeigt aber einen einheitlichen Verlauf ohne Nebenmaxima. Die Punktspreizfunktion PSF definiert über ihren Verlauf bei $Z = 0$ das Auflösungsvermögen des Objektivs und zeigt ausgeprägte Nebenmaxima. Ihre Verteilung ist durch eine unendliche Reihe von Besselfunktionen analytisch beschreibbar [6], wird hier aber ebenfalls numerisch bestimmt. Über die Integration, gewichtet mit der Pinholefunktion, ergibt sich die Detektierbarkeit für homogene Probenausleuchtung CEF. Bei geeigneter Wahl des Pinholeradius werden die Nebenmaxima der PSF hierdurch gemittelt und verwischen derart, daß sie nicht mehr separat vorkommen. Das Produkt aus gaußförmiger Anregung und Detektierbarkeit ergibt das wirkende Fokusvolumen MDE. Die Beschneidung durch die konfokale Detektion bewirkt eine deutliche Begrenzung in Z -Richtung. Der lorentzförmige Verlauf der Anregung ist

verschwunden und die Verteilung entlang der optischen Achse läßt sich sehr gut durch eine Gaußfunktion beschreiben (Abb. 3.6). Die Breite der Verteilung in den (x, y) -Ebenen wird bei dieser Konstellation durch die Breite der Anregung in der Fokusebene vorgegeben. Die Verhältnisbildung von Gaußbreite in z -Richtung z_o zur radialen Breite ω_o ergibt einen Faktor $\frac{z_o}{\omega_o} \approx 3$ der bei Messungen nach oben korrigiert werden muß und ungefähr 5 beträgt.

Spezialfall der gaußförmigen unbeschränkten Pupillenamplitudenfunktion mit genäherter Defokus-Phasen-Funktion Im allgemeinen ist die Defokusbeschreibung nicht mehr analytisch zu behandeln. Nur in wenigen Spezialfällen gelingt es, einen geschlossenen Ausdruck zu finden. Zur Anschauung wird hier ein Näherung vorgestellt. Die Berechnung in unmittelbarer Umgebung des Fokuspunktes erfolgt zumeist über eine genäherte Defokus-Phasen-Funktion. Sie ergibt sich bei Zuhilfenahme der Beziehungen $\sqrt{1+x} \approx 1 + \frac{x}{2}$ für $|x| \leq 1$ und $\cos(x) \approx 1 - \frac{x^2}{2!}$ und entspricht einer parabolischen Näherung der Kugelsegmentfunktion mit einer kleinen Verschiebung des Bezugspunktes.

$$d' = \left((f+z) - f \sqrt{1 + 2\frac{z}{f} \cos\left(\frac{\sqrt{p^2+q^2}}{f}\right) + \frac{z^2}{f^2}} \right) \approx \frac{z}{2f^2} (p^2 + q^2) - \frac{z^2}{2f}$$

Im Spezialfall der gaußförmigen unbeschränkten Pupillenamplitudenfunktion $V(p, q)$, normiert über die Beziehung $\iint_{\mathbb{R}^2} |V(p, q)|^2 dpdq = 1$,

$$V(p, q) = \sqrt{\frac{2}{\pi\omega_1^2}} e^{-\left(\frac{p^2+q^2}{\omega_1^2}\right)}$$

$$\text{DPF}(p, q, z) = e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} d'} = e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \left(\frac{z}{2f^2}(p^2+q^2) - \frac{z^2}{2f}\right)}$$

ergibt sich hieraus die Defokusamplitudenfunktion $U(x, y, z)$. Durch eine sinnvolle Umordnung nach quadratischen Termen kann die Berechnung der Fourier-Integrale erfolgen.

$$\begin{aligned} U(x, y, z) &= \iint_{\mathbb{R}^2} \sqrt{\frac{2}{\pi\omega_1^2}} e^{-\left(\frac{p^2+q^2}{\omega_1^2}\right)} e^{-\frac{2\pi i}{\lambda} \left(\frac{z}{2f^2}(p^2+q^2) - \frac{z^2}{2f}\right)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xp+yq)} dpdq \\ &= \frac{\lambda f}{\omega_o} \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{e^{\frac{2\pi i}{\lambda} \frac{z^2}{2f}}}{\left(1 + iz\frac{\omega_1}{f}\frac{1}{\omega_o}\right)} e^{-\left(\frac{1}{\omega_o^2(1+iz\frac{\omega_1}{f}\frac{1}{\omega_o})}(x^2+y^2)\right)} \end{aligned}$$

Für eine bessere Lesbarkeit des Ergebnisses werden die schon früher verwendeten Ersetzungen $\omega_o = \frac{\lambda f}{\pi\omega_1} = \frac{\lambda_o f}{n\pi\omega_1}$ und $\omega^2(z) = \omega_o^2 + z^2 \left(\frac{\omega_1}{f}\right)^2$ durchgeführt, so daß sich die resultierende Defokusintensitätsfunktion sehr kompakt schreiben läßt.

$$|U(x, y, z)|^2 = \lambda^2 f^2 \frac{2}{\pi\omega^2(z)} e^{-\left(\frac{2(x^2+y^2)}{\omega^2(z)}\right)}$$

Im Fall der Näherung ist die Phasenverschiebung bei Defokussierung symmetrisch und es folgt unter Berücksichtigung der Intensitätsnormierung aus dem Parseval-Theorem die schon verwendete Formel 3.12. Für $z = 0$ ergibt sich als Schnitt senkrecht zur optischen Achse die im vorherigen Abschnitt beschriebene Gaußfunktion der Fokusebene.

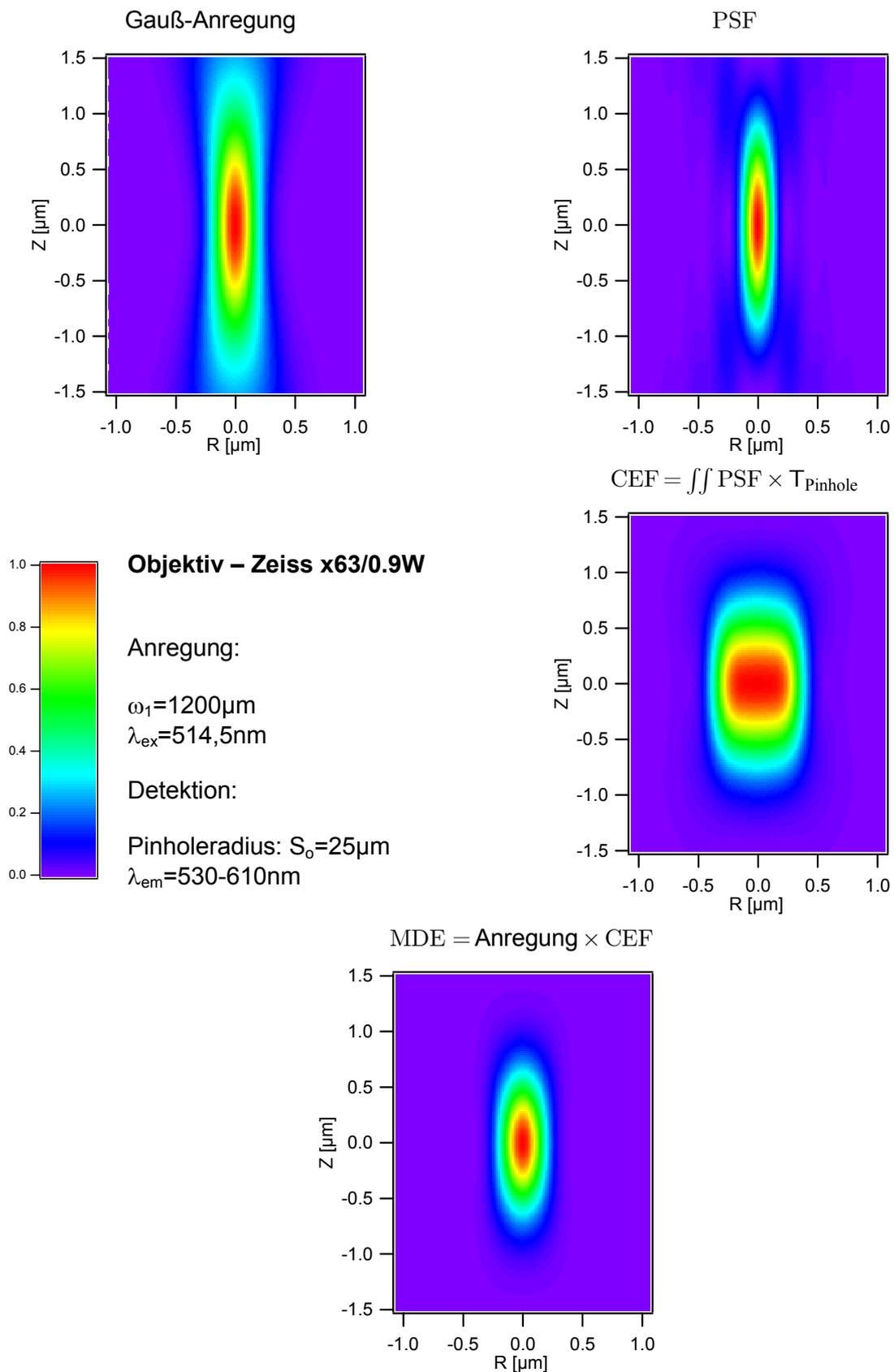


Abbildung 3.8: Berechnung der Molecule Detection Efficiency MDE. **(oben links)** Aus der beschränkten Gaußfunktion wird die Defokusanregungsintensität ermittelt. **(oben rechts)** Über die beschränkte, homogene Funktion ergibt sich die PSF. **(mitte rechts)** Durch Integration ergibt sich aus PSF und Pinholefunktion die CEF. **(unten)** Die MDE erhält man durch Multiplikation der Anregungsfunktion mit der CEF.

3.7.3 Fokusbeschreibung vor spiegelnden Flächen

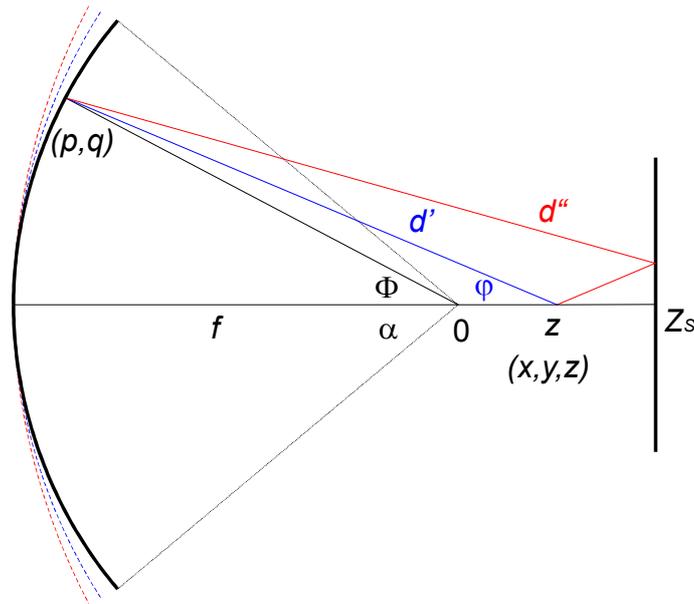


Abbildung 3.9: Defokusbeschreibung vor einer spiegelnden Fläche bei Z_S . Es müssen zwei Defokusphasenfunktionen berechnet und deren Amplitude unter Berücksichtigung des Phasensprungs am Spiegel addiert werden.

In Hinblick auf die in Abschnitt 5.3 und 6 verwendete Technik der Fluoreszenz-Interferenzkontrast-Mikroskopie (FLIC) zur Abstandsbestimmung einer fluoreszierenden Membran vor einem spiegelnden Schichtsystem aus Silizium und Siliziumoxid, kann durch eine Erweiterung der bisher vorgestellten Defokustheorie ein vereinfachtes Modell für die Berücksichtigung einer reflektierenden Fläche bei der Berechnung des konfokalen Detektionsvolumens entwickelt werden.

Eine an der Position Z_S senkrecht zur optischen Achse stehende spiegelnde Ebene wird durch eine Erweiterung in die Berechnung mit aufgenommen. Hierzu wird die *Defokus-Phase-Funktion* sowohl für den direkten als auch für den gespiegelten Strahl berechnet. Da an der Spiegelebene ein Phasensprung stattfindet, werden die so gewonnenen komplexen Werte voneinander abgezogen.

$$U(x, y, z) = \iint_{\mathbb{R}^2} V(p, q) [\text{DPF}(p, q, z) - \text{DPF}(p, q, 2Z_S - z)] e^{-i\frac{2\pi}{\lambda f}(xp+yq)} dpdq$$

Von besonderem Interesse bei der Berechnung des effektiven konfokalen Detektionsvolumens ist die für die Membranmessung wichtige Breite der entstehenden Gaußfunktion. Hier zeigt sich, daß die sich senkrecht zur optischen Achse ergebende MDE-Funktion durch die Spiegelung nur in ihrer Amplitude modifiziert ist, nicht aber in ihrer Breite. Im Extremfall, wenn der Spiegel direkt bei $Z = 0$, also im Fokuspunkt liegt, löschen sich die Amplituden für diesen Schnitt aus (Abb. 3.10). Das erste Maximum der Interferenz liegt bei $Z \approx 100\text{nm}$ und ist deutlich höher als ohne Interferenzverstärkung. Für große Abstände der spiegelnden Fläche gleichen sich die Kurven an jene ohne Spiegel an und der Interferenzeffekt verschwindet.

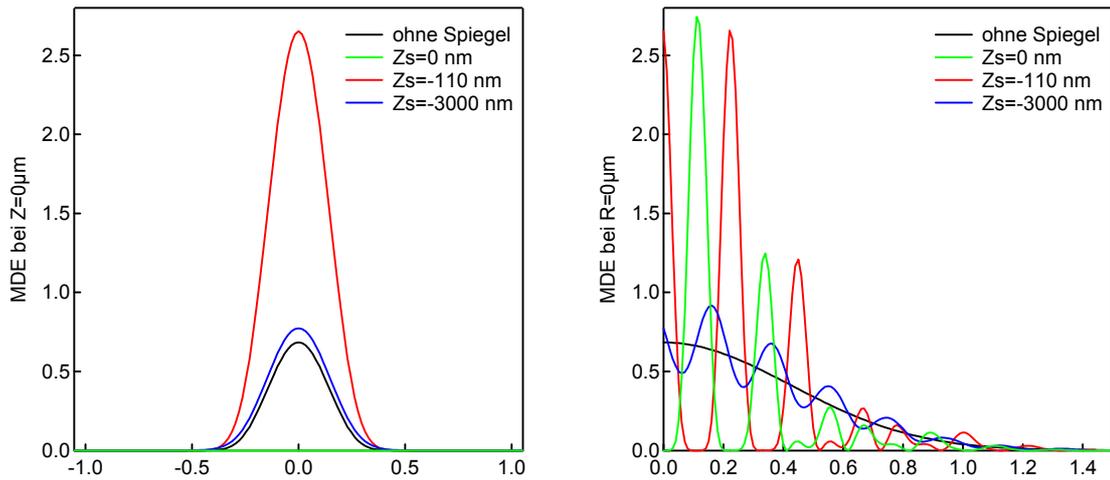


Abbildung 3.10: Molecule Detection Efficiency (MDE) bei Berücksichtigung einer spiegelnden Fläche im Abstand Z_S vom Fokuspunkt. **(links)** Die für Diffusionsmessungen in der Membranebene wichtige Breite der Gaußfunktion an der Stelle $Z = 0$ bleibt bei der Spiegelung erhalten. Sie wird nur in ihrer Höhe beeinflusst. **(rechts)** Der Z -Schnitt der MDE bei $R = 0$ zeigt starke Interferenzeffekte, welche das Detektionsvolumen unterteilen. Die Graphen sind die Ergebnisse numerischer Berechnungen für ein Zeiss x63/0,9W-Objektiv mit einfallendem Gaußstrahl der Wellenlänge $\lambda_{ex} = 514,5nm$ und Breite $\omega_1 = 1,2mm$, bei einer homogenen Wellenlängendetektion λ_{em} von $530 - 610nm$ und einem Pinholedurchmesser von $50\mu m$.

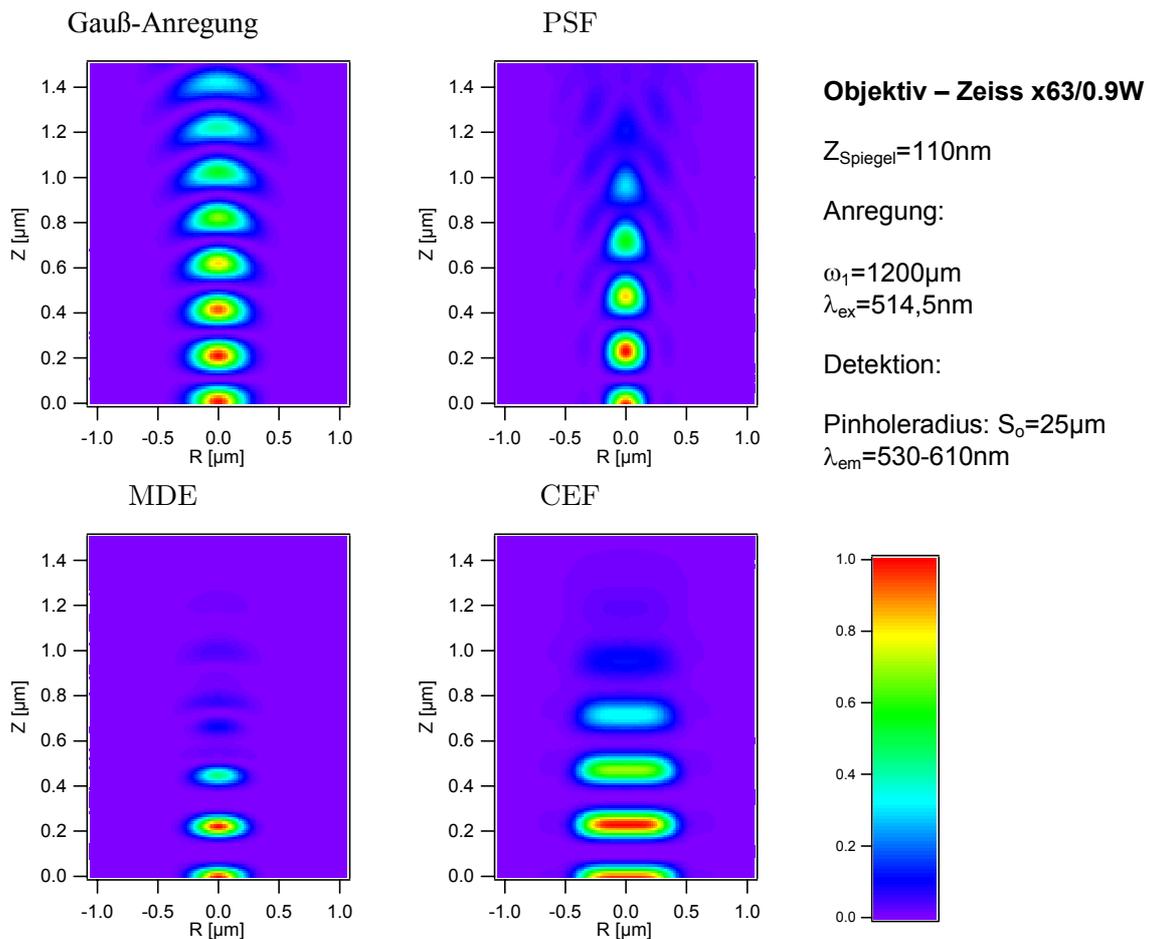


Abbildung 3.11: MDE Berechnung für $Z_S = -110nm$. Die Auswirkungen der spiegelnden Fläche sind deutlich zu erkennen. Sie stellen in guter Näherung eine Überlagerung aus FLIC-Kurve und ungespiegelter Fokusberechnung dar.

Im Hinblick auf das später verwendete Substrat Silizium-Siliziumoxid mit einer Oxiddicke von 100nm und $2,73\mu\text{m}$ werden hier die entsprechenden Abstände der spiegelnden Fläche mit dem Brechungsindex gewichtet berechnet. So ergeben sich die scheinbaren Spiegelabstände $Z_S = \frac{1,46}{1,333} \cdot 100\text{nm} = 110\text{nm}$ und $Z_S = 3000\text{nm}$ für die optische Ersetzung des Siliziumoxids durch Wasser. Die geringe Winkelmodifikation wird nicht berücksichtigt.

3.7.4 Modifikationen für nichtideale optische Schichtsysteme

Als nichtideales optisches Schichtsystem ist in dieser Arbeit die Verwendung eines Long-Distance-Luftobjektivs für eine Messung in wässriger Umgebung anzusehen. Um eine Abschätzung für die Fokussgüte und den Effekt des Schichtsystems zu studieren, läßt sich unter Beachtung des Snellius-Brechungsgesetzes eine modifizierte optische Weglänge berechnen, welche die Defokusphasenfunktion verändert. Als Standard bei dieser Betrachtung wird ein System aus Luft-Glas-Wasser verwendet, dessen Flächen jeweils senkrecht zur optischen Achse stehen (Abb. 3.12).

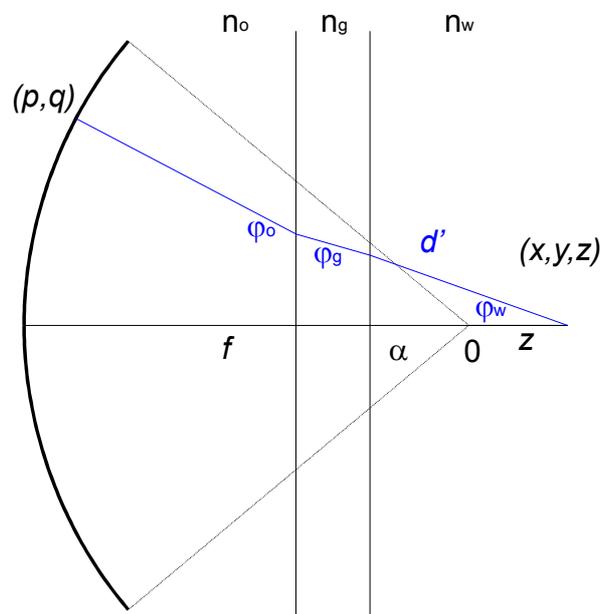


Abbildung 3.12: Defokusbeschreibung für ein nichtideales Objektiv-Schichtsystem. Unter Beachtung des Snellius-Brechungsgesetzes wird die optische Weglänge für die Berechnung der Defokusphasenfunktion ermittelt. Bei der Long-Distance-Fokusbestimmung ist ein gängiges Schichtsystem eine Abfolge von Luft-Glas-Wasser.

Die Berechnungen (Abb. 3.13) für ein reales Schichtsystem zeigen eine Verschlechterung der Abbildung durch die nichtidealen optischen Bedingungen. Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Verschiebung des Fokuszentrums zu, vom Objektiv, weiter entfernten Z -Werten. Der Fokuspunkt in Luft entspricht nicht dem in einem Medium mit abweichendem Brechungsindex. In dieser Beispielberechnung sind die Parameter entsprechend der Gegebenheiten des Long-Distance-Aufbaus (Abschnitt 4.2) gewählt. Die Eckdaten des Luftobjektivs Mitutoyo x100/0.55 sind durch die Vergrößerung $M_{\text{soll}} = 100$ und die Numerische Apertur $N.A. = 0,55$ bei einer Tubuslinsenbrennweite $f_{\text{soll}} = 200\text{mm}$ vorgegeben. Durch den abweichenden Mikroskopaufbau mit einer 60mm -Tubuslinse ergibt sich eine reale Vergröße-

zung $M_{\text{ist}} = M_{\text{soll}} \frac{f_{\text{ist}}}{f_{\text{soll}}} = 100 \frac{60\text{mm}}{200\text{mm}} = 30$. Das verwendete Pinhole mit $S_o = 40\mu\text{m}$ ist formal (Abschnitt 3.7.1.1) zu groß gewählt liefert aber im Meßeinsatz die besten Ergebnisse bei unterschiedlichen Positionen in der Probe. Für diese Beispielberechnung wird als Schichtsystem ein Deckglas mit Brechungsindex $n_g = 1,5$ und einer Dicke $Z_g = 80\mu\text{m}$ eingesetzt. Die Position des "Luftfokus" wäre bei einer Probentiefe von $Z_w = 50\mu\text{m}$. Bei dieser Berechnung mit einer wäßrigen Probe mit Brechungsindex $n_w = 1,333$ liegt der Fokuspunkt bei $Z \approx 50\mu\text{m} + 75\mu\text{m}$ hinter dem Deckglas.

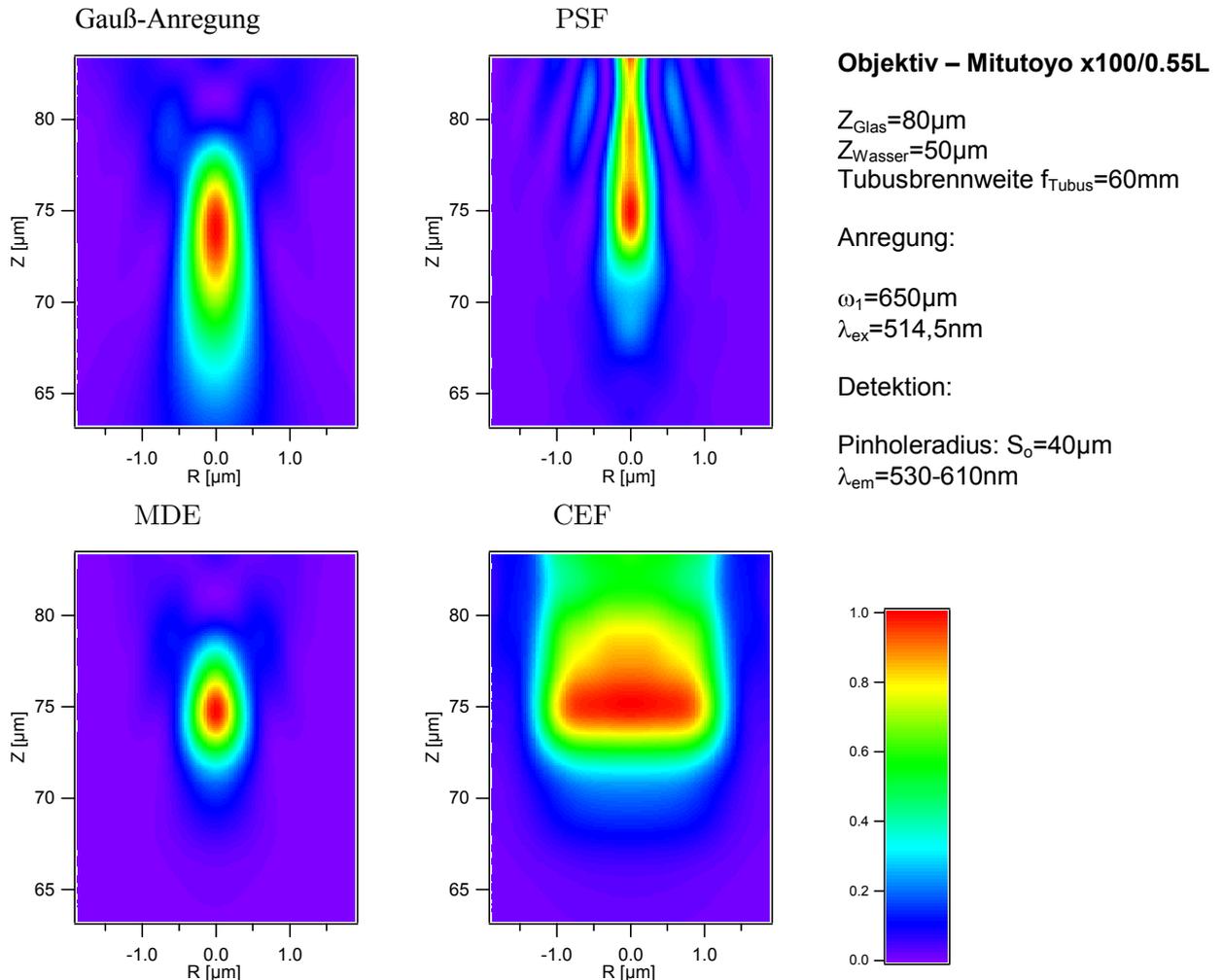


Abbildung 3.13: MDE Berechnung für die Long-Distance-Konfiguration bei einer Deckglasdicke $Z_g = 80\mu\text{m}$ und einer Position des nominalen Fokus bei $Z_w = 50\mu\text{m}$. Die wirkliche Fokusslage ist durch das nichtideale optische System um weitere $75\mu\text{m}$ verschoben. Das Fokusvolumen zeigt deutlich den Einfluß der Abbildung und die MDE-Funktion ist nicht mehr ideal gaußförmig.

3.7.5 Numerik der Berechnung

Für die Berechnung der speziellen Fraunhofer-Formel für die gaußförmig und homogen beschränkte Pupillenamplitudenfunktion wird ein angepaßter zweidimensionaler Fast-Fourier-Algorithmus (FFT) [48] verwendet. Um keine Randeefekte berücksichtigen zu müssen, ist das Verhältnis aus vorgegebenem Aperturradius zu der Gesamtkantenlänge sehr niedrig gewählt. Aufwendige Filterfunktionen können damit vermieden werden. Für eine genügende Anzahl von Stützpunkten wird mit einem komplexen Feld von 512×512 Punkten gerechnet. Das Ergebnis der Transformation, bei einer Vorgabe der beschränkten Gaußamplitude

und einer Anregungswellenlänge λ_{ex} , kann direkt der Defokusposition z zugeordnet werden. Es ergibt sich eine vom Radius abhängige Anregungsintensität aus der Berechnung des Betragsquadrates.

Das Ergebnis bei homogener beschränkter Amplitudenvorgabe wird entsprechend der *Point Spread Function* (PSF) zugeordnet. Sie wird, gewichtet mit der Transmissionsfunktion des Pinholes, durch einen zweidimensionalen Simpson-Algorithmus [48] für jede (x, y) -Ebene integriert. Die sich daraus ergebende *Collection Efficiency Function* (CEF) wird für verschiedene Emissionswellenlängen λ_{em} berechnet und kann über eine spektrale Gewichtung mit Hilfe einer einfachen Trapezregel integriert werden. Die ortsabhängige *Molecule Detection Efficiency* (MDE) wird durch Multiplikation der Anregungs- mit der Detektionseffizienz CEF berechnet und entspricht dem effektiv wirkenden Detektierbarkeitsvolumen.

Für die vorgestellten Berechnungen wird als Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 514,5\text{nm}$ verwendet. Die spektrale Gewichtung der Emission geschieht homogen über einen Wellenlängenbereich von $\lambda_{\text{em}} = 530 - 610\text{nm}$, wobei die Stützpunkte im 5nm -Abstand gewählt werden.

Die Berechnung der *Defokus-Phasen-Funktion* DPF im Fall des nichtidealen optischen Schichtsystems erfolgt über ein Winkelvariationsverfahren zur Berücksichtigung des Snellius-Brechungsgesetzes in der optischen Pfadbestimmung. Als Startwert wird der jeweilige Wert der vereinfachten geometrischen Betrachtung vorgegeben.

Kapitel 4

Experimenteller Aufbau

Durch die sich erst während der Arbeit ergebenden Möglichkeiten, welche die Vermessung von Riesenvesikeln im Gegensatz zu der Problematik von Black-Lipid-Membranes bieten, werden zwei Aufbauten für die FCS-Messung vorgestellt, die jeweils für ihre Anwendung optimiert sind. Der erste Aufbau ist optimiert für die Auflichtmessung mit sehr großem Arbeitsabstand und kann sowohl in senkrechter als auch waagrechter Konfiguration betrieben werden. Der zweite Aufbau ist speziell für die Auflichtmessung an Vesikeln angepaßt und gestattet vor allem eine Beobachtung der Probe. Beiden Aufbauten gemein ist das konfokale Meßprinzip und die Verarbeitung der Meßdaten. Begonnen wird hier mit der Vorstellung der für die Messung unabdingbaren Fluoreszenzfarbstoffe, welche über ihr Anregungs- bzw. Emissionsspektrum eng mit den Verwendung findenden Lasern, Filtern und Detektoren verknüpft sind.

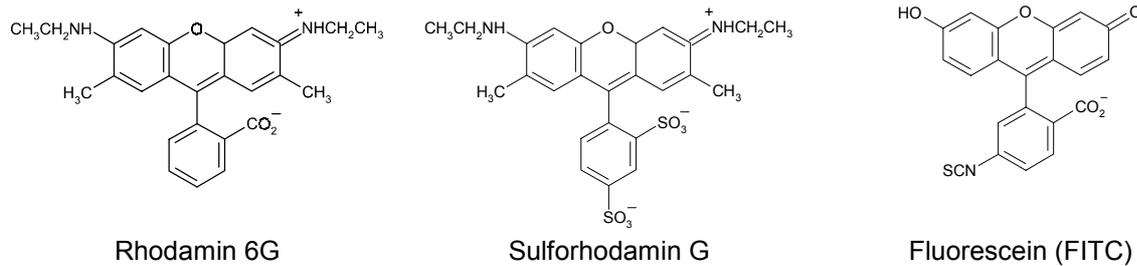
4.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe gliedern sich in drei Untergruppen. Die erste Gruppe stellt die in Lösung vorliegenden Farbstoffe dar. Diese werden in wäßriger Umgebung eingesetzt. Die zweite Gruppe sind die lipidartigen und -gebundenen Farbstoffe. Sie zeichnen sich durch eine einfache Handhabung beim Einbau in Lipidmembranen aus. Die letzte Gruppe sind proteingebundene Farbstoffe, welche erst über eine chemische Umsetzung an die Bausteine der Peptide gebunden werden. Das ebenfalls in dieser Arbeit für Vergleichsmessungen in menschlichen Nierenzellen HEK293 verwendete enhanced-Yellow-Fluorescence-Protein (eYFP) stellt eine Erweiterung dieser Gruppenunterteilung dar und wird erst später beschrieben.

4.1.1 Farbstoffe für Messungen in wäßriger Lösung

Wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe stellen das Basissystem in der FCS dar, da hier die Wirkung des konfokalen Prinzips direkt anhand der ermittelten Daten verifiziert werden kann. Die Messungen an diesen Farbstoffen (Molecular Probes; Eugene - USA) dienen gleichzeitig zur Überprüfung der fokalen Dimensionen. Vor jeder Messung wird speziell Rhodamin 6G mit einer Diffusionskonstante von $D = 280 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ herangezogen, um die Justage des Meßaufbaus zu optimieren.

Das Sulforhodamin G wird für die Fluoreszenzmarkierung der später vorgestellten Peptide eingesetzt. Neben diesen Einzelfarbstoffen werden für die ersten "Gehversuche" mit mehreren Farbstoffen markierte La-



Rhodamin 6G

Sulforhodamin G

Fluorescein (FITC)

Abbildung 4.1: Fluoreszenz-Farbstoffe für Messungen in wässriger Lösung. **(links)** Rhodamin 6G ist der Standardlaserfarbstoff, da er hohe Quanteneffizienz besitzt und durch typische Laserlinien, in dieser Arbeit bei 514nm , sehr gut angeregt werden kann. **(mitte)** Sulforhodamin G unterscheidet sich nur geringfügig von Rh6G und gestattet die einfache Verbindung zu anderen Molekülen, wie das hier verwendete Gramacidin C oder das Peptid LAH₄. **(rechts)** Fluorescein, hier FITC, ist ein weiterer typischer Farbstoff für Laseranwendungen, da er bei 488nm gut angeregt werden kann.

textkugeln (Molecular Probes; Eugene - USA) Größe eingesetzt. Diese Latexkugeln sind in unterschiedlichen Variationen erhältlich und liegen als hochkonzentrierte Dispersion vor. Für Testmessungen werden speziell Fluorescein markierte Latexkugeln mit 15nm und 100nm Durchmesser eingesetzt. In der "Rhodamin"-Konfiguration des Meßaufbaus erfolgt die Messung mit 20nm -Latexkugeln, welche zusätzlich mit Carboxylat-Gruppen versehen sind und sich hierdurch für Driftexperimente eignen.

4.1.2 Lipidartige und lipidgebundene Farbstoffe

Neben den in wässriger Lösung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen werden für die Messung in Membranen lipidartige bzw. lipidgebundene eingesetzt.

- TRITC-DHPE (Tetramethylrhodaminethiocarbamoyl-Dihexadecanoyl-Glycero-Phosphoethanolamine; T-1391; Molecular Probes; Eugene - USA). Der Chromophor aus der Gruppe der Rhodamine ist über eine Thioharnstofffunktion an das Lipid gebunden. Durch die Carboxylat-Gruppe am Farbstoff und einem ungesättigten Sauerstoff am Lipid ist dieses Molekül bei nicht zu saurer Umgebung negativ geladen.
- DiIC₁₈ (Dioctadecyl-Tetramethylindocarbocyanine; D-282; Molecular Probes; Eugene - USA). Der Chromophor aus der Gruppe der Cyanine verfügt über zwei Kohlenstoffketten mit je 18 C-Atomen. Dieser Farbstoff weist neben seiner positiven Ladung auch die Besonderheit auf, daß der Chromophor in der Membranebene liegt und sich daher auch als Standardfarbstoff für die FLIC-Mikroskopie bewährt hat. Ein weiterer Vorteil dieses Farbstoffes ist, daß er recht einfach auch nachträglich bestehende Membranen, und somit gezielt nur den äußeren Monolayer, anfärben kann.
- Di-8-ANEPPS (D-3167; Molecular Probes; Eugene - USA). Der elektrochrome Farbstoff ist ein Standard bei Messungen der elektrischen Membranspannung mittels Fluoreszenzänderung. Eine über die Membran angelegte Spannung verändert dabei die Ladungsverschiebung und damit das Fluoreszenzverhalten.

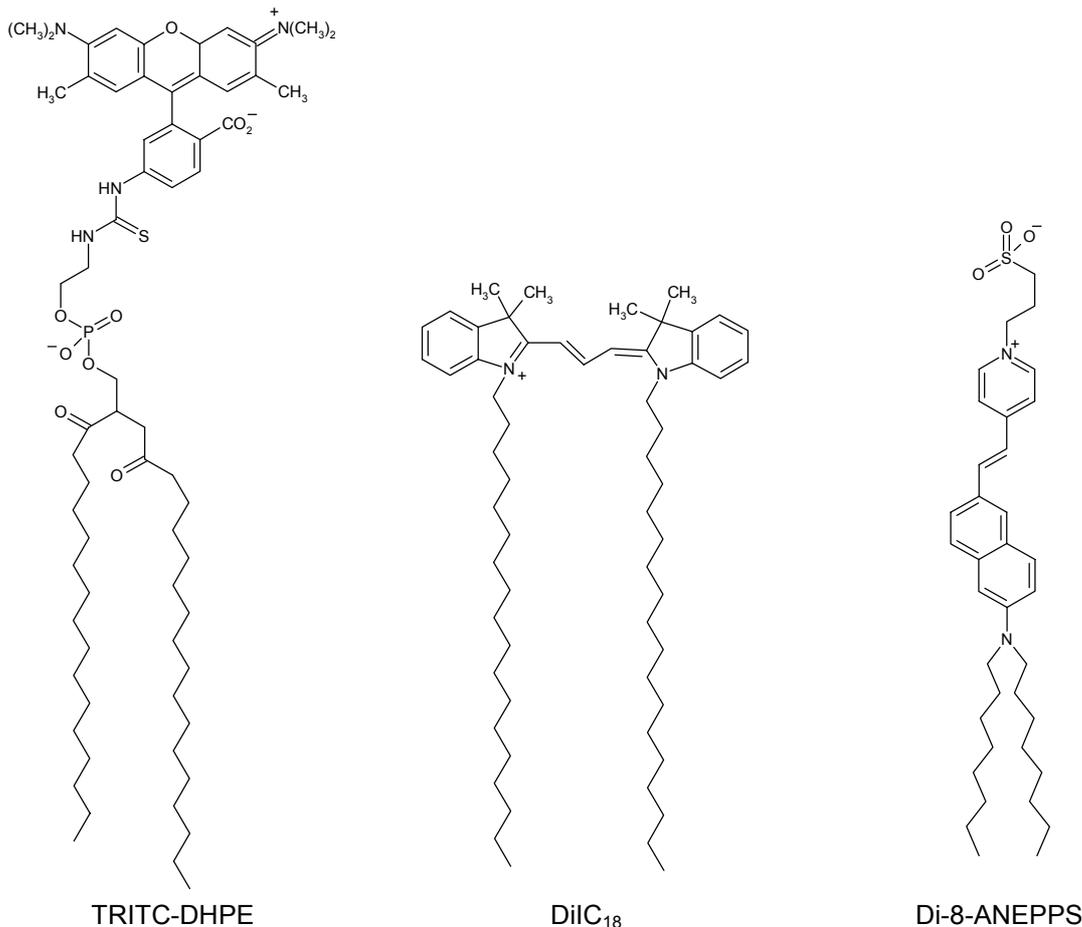


Abbildung 4.2: Verwendete lipidartige und -gebundene Farbstoffe. **(links)** TRITC-DHPE mit einem Chromophor aus der Gruppe der Rhodamine. **(mitte)** DiIC₁₈ ist ein Standard bei der FLIC-Messung, da der Chromophor aus der Gruppe der Cyanine waagrecht in der Membran liegt und zudem auch ein Anfärben von fertigen Vesikeln und Zellen keine Probleme bereitet. **(rechts)** Di-8-ANEPPS ist ein Vertreter der elektrochromen Farbstoffe.

| | Mol.Gewicht $[\frac{g}{mol}]$ | Abs.max. [nm] | Ext.koeff. $[\frac{1}{cm \cdot mol}]$ | Em.max. [nm] |
|--------------------|-------------------------------|---------------|---------------------------------------|--------------|
| TRITC-DHPE | 1236,68 | 540 | 93 000 | 566 |
| DiIC ₁₈ | 933,88 | 549 | 148 000 | 565 |
| Di-8-ANEPPS | 592,88 | 498 | 35 000 | 713 |

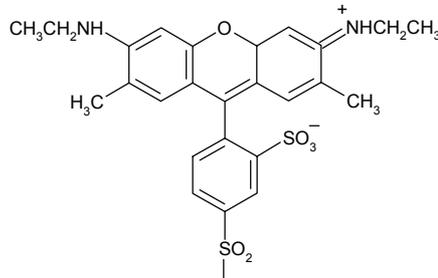
Tabelle 4.1: Daten der verwendeten lipidartigen und lipidgebundenen Farbstoffe laut Herstellerangaben (Molekulargewicht, Absorptionsmaximum, Extinktionskoeffizient, Emissionsmaximum). Die Fluoreszenzangaben sind dabei in einer Methanollösung ermittelt worden. In einer Membranumgebung verschieben sich die Maxima zum Teil deutlich.

4.1.3 Proteingebundene Farbstoffe

Als proteingebundener Farbstoff findet Sulforhodamin G Verwendung. Es wird jeweils kovalent an das entsprechende Peptid gekoppelt. Dies sind das Antibiotikum Gramicidin C und das synthetische Protein LAH₄. Diese Markierung der Peptide wird von Gerd Hübener durchgeführt.

Sulforhodamin G markiertes Gramicidin C

Das kanalbildende Protein Gramicidin¹ des *Bacillus Brevis* wird in einer gereinigten Form als C-Variante (Fluka; Deisenhofen) verwendet, da durch das Tyrosin an Position 11 ein in der Literatur [67] beschriebenes Verfahren zur Ankopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Dansylchlorid modifiziert und auf das hier verwendete Sulforhodamin G (Molecular Probes; Eugene - USA) angepaßt werden kann.



CHO-NH-Val-Gly-Ala-**Leu**-Ala-**Val**-**Val**-**Val**-Trp-**Leu**-Tyr-**Leu**-Trp-**Leu**-Trp-CO-NH-CH₂-CH₂-OH

Abbildung 4.3: Sulforhodamin G markiertes Gramicidin C. Das in der C-Variante vorkommende Tyrosin wird als Anknüpfungspunkt für den Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Die D-Aminosäuren sind durch eine verstärkte Schrift gekennzeichnet.

Die Strukturaufklärung mittels NMR oder Röntgenuntersuchungen liefert je nach Lösungsmittel und Umgebung unterschiedliche Formen der Kanal- und Porenbildung [69][70]. In Lösungsmitteln, z.B. in Ethanol, dominiert dabei die Konformation als antiparallel ausgerichtete, linksgängige Doppelhelix. Je nach Modifikation des Lösungsmittels lassen sich aber auch andere Zustände erzeugen. Die für die Einbettung in Lipide wichtige Form ist die rechtsgängige β -Helix-Konformation mit antiparalleler Ausrichtung der Monomere und einander zugewandten N-terminalen Enden. Bei einer Aminosäurezahl pro Umdrehung von 6,5 ergibt sich die Gesamtlänge des Dimers zu 2,5 nm. Weitere Daten sind ein Innendurchmesser des Kanals von 0,4 nm und ein Außendurchmesser von 1,6 nm. In seiner hier vorgestellten Variante SRh-GramC ist das Molekulargewicht 2371,8 $\frac{g}{mol}$. Auf die für elektrische Messungen wichtige Kanalbildung wird in Abschnitt 5.3 näher eingegangen.

Sulforhodamin G markiertes LAH₄

Das Flip-Flop-Designerprotein LAH₄ wird mittels eines Standard-Festphasensynthese-Zyklus auf einem automatischen Peptid-Synthetisierer (Applied Biosystems 431A; Weiterstadt) hergestellt, wobei ein vierfacher Überschuß an Fmoc-geschützten Aminosäuren zugeführt wird. An das zuletzt zugegebene mit einer BOC-Gruppe versehene Lysin wird zuvor an dem N-Terminal ein Sulforhodamin G als Fluoreszenzfarbstoff angekoppelt. Mittels Massenspektroskopie und HPLC werden während der Herstellung die zwei Hauptprodukte, Basispeptidstrang und Sulforhodamin G-Lysin sowie das Produkt überprüft. Das SRh-LAH₄ besitzt ein Molekulargewicht von 3292,11 $\frac{g}{mol}$.

¹ Der Name *Gramicidin* stammt von der zerstörenden Wirkung des Peptids gegenüber Gram-positiven Bakterien. Modernere Studien sehen das Anwendungsgebiet des Antibiotikums ebenfalls in dem Feld der HIV-Bekämpfung.



Abbildung 4.4: LAH_4 ist ein synthetisch erzeugtes Protein aus den aliphatischen Aminosäuren Alanin-A und Leucin-L sowie den basischen Lysin-K und Histidin-H. Es besteht aus 26 Aminosäuren und bildet eine α -helikale Struktur. Bei einer Ganghöhe von $0,54\text{nm}$ und einer Aminosäurezahl von 3,6 pro Umdrehung ergibt sich eine Länge der α -Helix von $3,9\text{nm}$, welche der Dicke eines Lipidbilayers entspricht. Der Helix-Durchmesser beträgt $0,5\text{nm}$. (**rechts**) Durch die spezielle Anordnung der Histidine (hier mit verstärkter Schrift dargestellt) wird eine pH-abhängige Ausrichtung waagrecht oder senkrecht zur Membran hervorgerufen. Unter sauren Bedingungen sind sie geladen und liegen damit bevorzugt in der polaren Umgebung des Wassers. Die Lage des Peptids ist damit parallel zur Membranebene (hier durch je einen Strich links und rechts angedeutet). (**links**) Für die Fluoreszenzmessung wird bei der Peptidsynthese das zuletzt angebrachte Lysin zuvor mit dem Farbstoff Sulforhodamin gekoppelt. Die Lysine befinden sich an den Enden des Peptidstrangs und sind nur lose an die Helixordnung gebunden.

Das Peptid wird in der Arbeit von Bechinger [4] vorgestellt und mittels Festkörper-NMR und Infrarotspektroskopie an POPC-Membranstackeln bei unterschiedlichen pH -Werten untersucht[5]. Das Protein liegt als α -Helix vor, wobei die Endbereiche nicht starr an diese Ordnung gebunden sind. Es zeigt sich, daß durch Änderung des pH -Wertes die Lage bezüglich der Membranebene beeinflusst wird. Bei niedrigen pH -Werten $< 5,5$ liegt die Proteinachse in der Membranebene, während für $pH > 7$ eine transmembrane Ausrichtung angenommen wird.

4.2 Erster Meßaufbau für optimierte Long-Distance-Messungen

Der erste Meßaufbau (Abb. 4.5) zeichnet sich durch eine optimierte Anordnung für Long-Distance-Messungen aus. Er ist sowohl vertikal als auch horizontal durch Kippen der Basisplatte auf einem schwingungsgedämpften Tisch einsetzbar. Die stabile Konstruktion ist aus kommerziell erhältlichen Einzelkomponenten und einem lichtdichten Eigenbau-Detektionsarm zusammengesetzt. Ein wesentliches Element stellt das Long-Distance-Objektiv dar, mit dem FCS-Messungen bei einem Arbeitsabstand von 12mm in wässriger Lösung möglich sind. Die sich durch die Verwendung eines Luftobjektives und den enormen Abstand zum eigentlichen Meßort ergebenden Einschränkungen erschweren in Hinblick auf die Lichtausbeute und die Fokusradiusabmessungen die Messung bzw. die Interpretation der Daten. Der Vorteil: Diese Erweiterung des Meßbereiches für die FCS machen es aber gerade für Spezialaufgaben interessant. Diese Eigenschaften waren vornehmlich auf die Meßmöglichkeit von aufgezogenen Black-Lipid-Membranes (BLM) auf Siliziumstrukturen ausgerichtet, wie sie in [31] verwendet wurden. Durch die Vorteile der lösungsmittelfreien

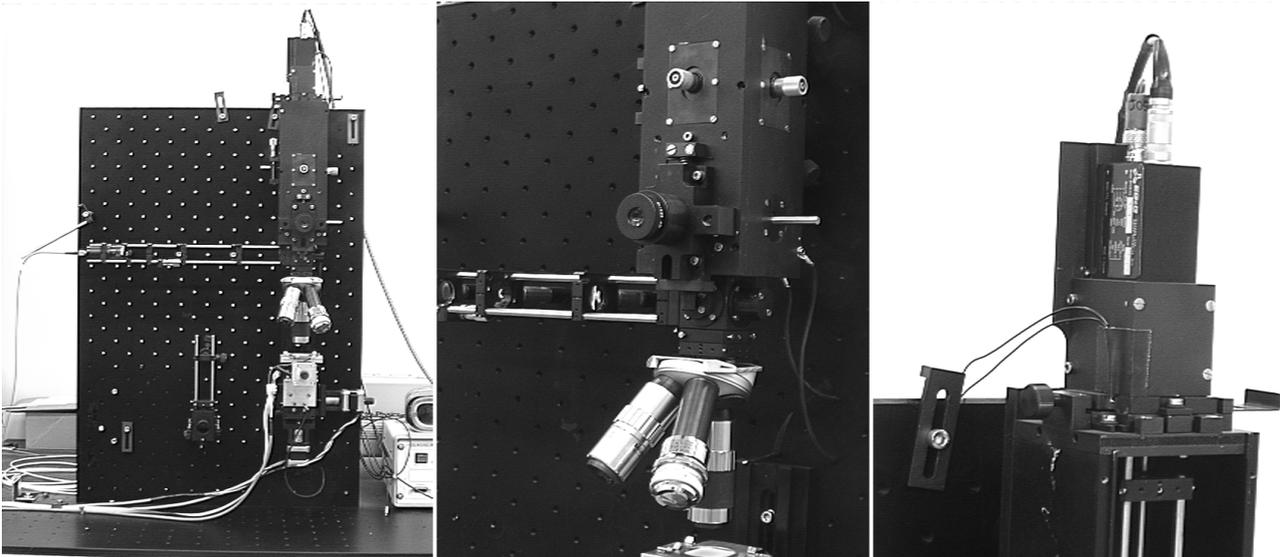


Abbildung 4.5: Aufbau für Long-Distance-Messungen in senkrechter Konfiguration. **(links)** Überblick über den mikroskopartigen Aufbau. **(mitte)** Zentrum mit von links kommendem Anregungsarm und nach oben verlaufender Detektionseinheit. **(rechts)** Avalanche Photodiode lichtdicht montiert auf der Einheit zur Pin-holeverstellung.

Riesenvesikel als Matrix für Farbstoffe und Proteine veränderten sich die Anforderungen und ein zweiter Meßaufbau auf Mikroskopbasis wurde konstruiert. Dieser bietet gleichzeitig die Möglichkeit, in Zellen Vergleichsmessungen vorzunehmen und gestattet eine einfachere Handhabung im täglichen Meßbetrieb.

4.3 Zweiter Meßaufbau für optimierte Probenvisualisierung

Als Basis für den zweiten Meßaufbau (Abb. 4.6) dient ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Axioskop; Zeiss; Oberkochen), welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch fixiert ist. Für eine zusätzliche Versteifung werden verschraubbare Profilelemente eingesetzt, welche der Konstruktion eine sehr hohe Stabilität verleihen. Dieser starre Aufbau gewährleistet bei Justage und Messung eine unproblematische Handhabung. Die dadurch verlorene Funktionalität des variablen Objektivarmes kann leicht durch die Verwendung von Schrittmotoren ersetzt werden.

Neben diesen stabilisierenden Anbauten sind auch einige funktionelle Eingriffe in den Mikroskopaufbau notwendig bzw. empfehlenswert. Aus dem Anregungsarm sind alle Linsen und Filter entfernt, um den Laserstrahl mit einer definierten Lage und Güte einzukoppeln. Die ursprünglich verwendete Zeiss-Xenon-Lampe zur Beobachtung in Normallicht und Fluoreszenz zündete unkontrolliert bei Alterung der Röhre nach und gefährdete durch ihre elektromagnetischen Zündimpulse die empfindliche Elektronik des Photodetektors. Ersetzt wurde sie durch eine Xenon-Kaltlichtquelle (LQX1800; Spindler&Hoyer) mit 8mm-Flüssigkeitslichtleiter und UV-Spotlight-Kollimator. Diese Kombination, ausgerüstet mit einer Zusatzfrontlinse ($f = 100\text{mm}$; Owis; Staufen i. Br.), liefert einen Großteil des bei Entfernung der Anregungslinsen verlorenen Ausleuchtungsfeldes zurück, wobei dessen Homogenität und Helligkeit deutlich verbessert wird.

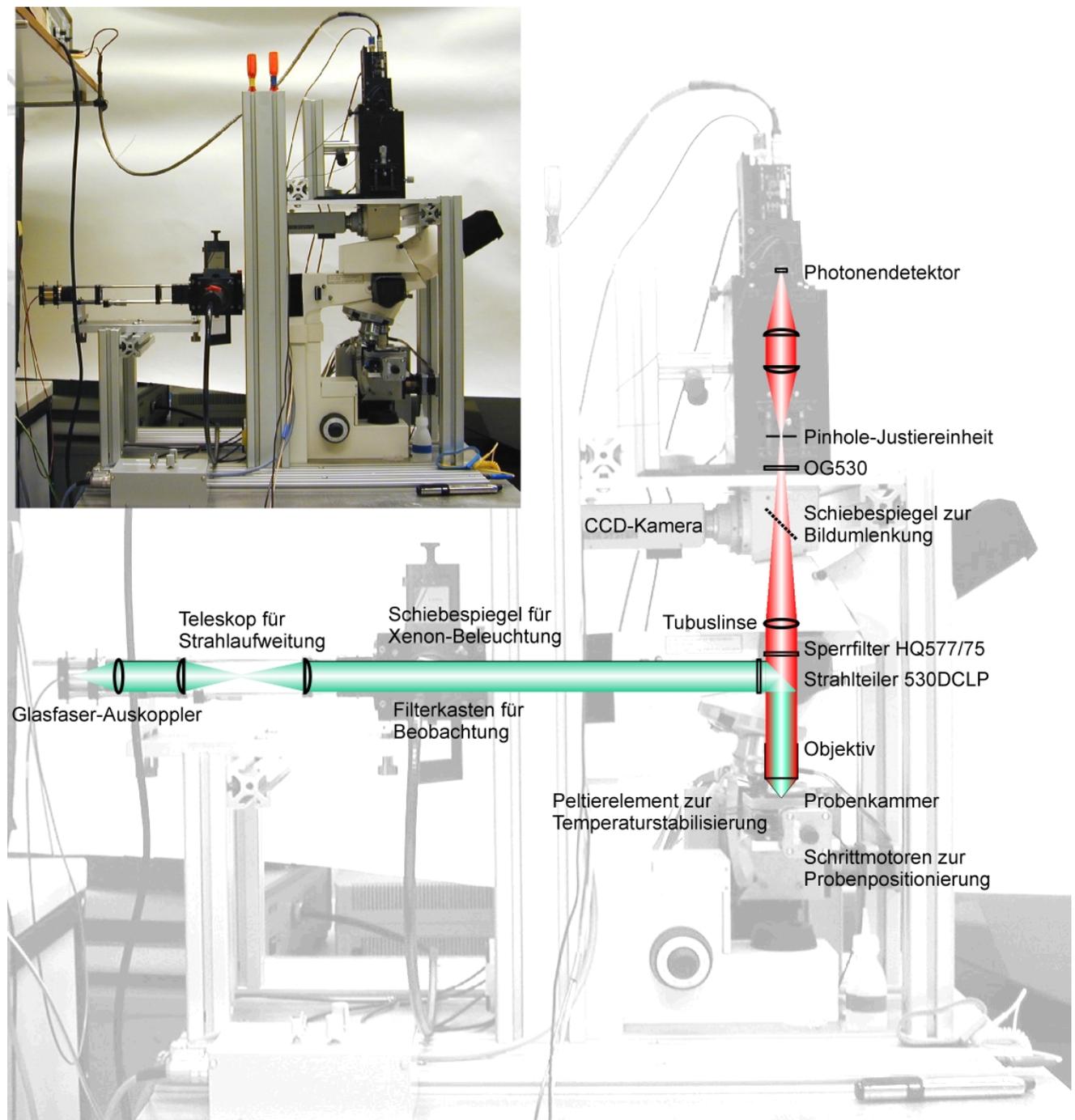


Abbildung 4.6: Zweiter FCS-Aufbau auf Basis eines aufrechten Mikroskops. Der Lichtweg wird über die Prinzipschreibung beschrieben. Von links wird das Anregungslicht eingekoppelt, welches über einen dichroitischen Strahlteiler in das Objektiv und damit zur Probe geleitet wird. Das Fluoreszenzlicht passiert das Objektiv in umgekehrter Richtung, kann aufgrund seiner größeren Wellenlänge den Strahlteiler und Sperrfilter passieren und wird dann im Detektionsarm von der Tubuslinse auf das Pinhole fokussiert, von wo es auf den Photonendetektor geleitet wird.

Die als Gesichtsfeldblende gedachte Iris kann nach diesen Umbauten noch zur Kontrasterhöhung eingesetzt werden und arbeitet dann als nichtoptimale Aperturblende und ermöglicht auch die Beobachtung von nicht angefärbten Vesikeln.

Die Lampeneinheit ist über einen Filterhalter und einen Spiegelschieber an das Mikroskop gekoppelt. Der Filterhalter nimmt sowohl ein Wärmeschutzglas der Dicke 5mm auf als auch die Beobachtungsfiltter. Dies sind ein Interferenzfilter 500nm $HWB=40\text{nm}$ (Melles Griot; Zevenaar - Niederlande) zur Fluoreszenzbetrachtung und ein Farbglass OG570 (Schott; Mainz) bei Kontrastbeobachtung. Der Eigenbau-Spiegelschieber gestattet sowohl den Durchlaß des Laserstrahles ohne Umlenkung als auch eine Überlagerung mit dem Licht der Xenonlampe. Hierfür sind drei Positionen vorgesehen, welche mit Spiegelgläsern ausgerüstet werden können. Eingesetzt werden ein 100%-Spiegel zur Beobachtung sowie ein 50/50-Spiegelglas für die Überlagerung der Lichtquellen. Die dritte Position bleibt zur FCS-Messung frei und erlaubt eine umlenkungsfreie Einkopplung des Laserstrahls.

Weitere Veränderungen zur konfokalen Einzelphotonenmessung betreffen den Emissionszweig des Aufbaus. Hier können die vorgegebenen Schwalbenschwanzführungen, unterstützt durch zusätzliche Verstärkungen, zur Ankopplung verwendet werden. Am umschaltbaren Fototubus des Mikroskops ist am Durchgangsausgang die modifizierte Detektoreinheit für FCS-Messungen und am umgelenkten Ausgang die CCD-Kamera angebracht. Eine zusätzliche Aluminiumplatte dient hierbei zur seitlichen Fixierung und gleichzeitig als Basis eines Profilelements zur starren Verbindung der lichtdichten Detektionseinheit mit dem Mikroskop.

4.4 Vorstellung der optischen Einzelkomponenten

Die Komponenten der Meßaufbauten (Abb. 4.5 und 4.6) werden einzeln vorgestellt. Ihr Zusammenwirken ist aufeinander und auf das Meßsystem abgestimmt.

4.4.1 Argon-Ionen-Laser als Lichtquelle und weiterer Lichtweg

Für die Messung wird ein wassergekühlter Argon-Ionen-Laser (Modell 2065A-65-BeamLok; Spectra-Physics; Darmstadt) mit einer maximalen Lichtleistung im sichtbaren Wellenlängenbereich von 7 Watt verwendet. Durch ein Prisma im Resonatorteil des Lasers kann durch eine leichte Veränderung des hinteren Spiegels (High-Reflector) die Wellenlänge selektiert werden. Bevorzugt werden hier die "starken" Argonlinien 488nm für Fluorescein oder $514,5\text{nm}$ für Rhodamine verwendet. Der Laser besitzt als Zusatz eine Option zur Verbesserung und variablen Anpassung der Strahlage sowie eine Leistungskontrolle (BeamLok), die im wesentlichen auf einer Quadrantendiode und angeschlossener Piezosteuerung für den vorderen Spiegel (Output-Coupler) beruht. Für einen stabilen Betrieb wird der Laser bei den oben genannten Wellenlängen mit 500mW geregelter Leistung und eingeschaltetem BeamLok betrieben. Direkt am Lichtausgang wird der Strahl durch eine Kombination von Neutralgläsern auf die später benötigte Lichtmenge abgeschwächt. Dieses Vorgehen hat sich im Zusammenspiel mit dem Glasfaser-Einkoppler als sinnvoll erwiesen, da eine veränderte vorgegebene Laserleistung die Strahlage leicht verändert. Für die Einkopplung wird ein einfaches Objektiv (x20/0,4 Luft; Newport; Darmstadt) in Kombination mit einer Eigenbau-Fiber-Connector-Buchse (FC-Buchse) verwendet, welche über Positionierschrauben abgestimmt werden können.

Die am Einkoppler über einen FC-Stecker angeschlossene Single-Mode-Faser² (Kerndurchmesser $3,1\mu\text{m}$; Diamond; Größenzell) gestattet, die Justage von Laser- und Mikroskopanordnung komplett zu trennen und bewirkt zugleich eine Unterdrückung aller höheren Lasermoden. Sie wirkt als Raumfilter. Der Auskoppler (Kollimator MB02; Spindler&Hoyer; Göttingen) ist über eine Justageeinheit direkt an ein Mikrobanksystem befestigt und gestattet die Verwendung der hierauf aufbauenden Komponenten. Eine Teleskopanordnung dient zur Anpassung des Strahldurchmessers an das verwendete Mikroskopobjektiv.

4.4.2 Filtercharakterisierung

Die Wahl der Filter richtet sich nach den Farbstofftypen und dem eingesetzten Laserbereich. In dieser Arbeit werden hauptsächlich die energiereichen Linien 488nm und 514nm des Argon-Lasers verwendet, da die erste für fluoresceinartige und die zweite für rhodaminartige Farbstoffe besonders geeignet sind.

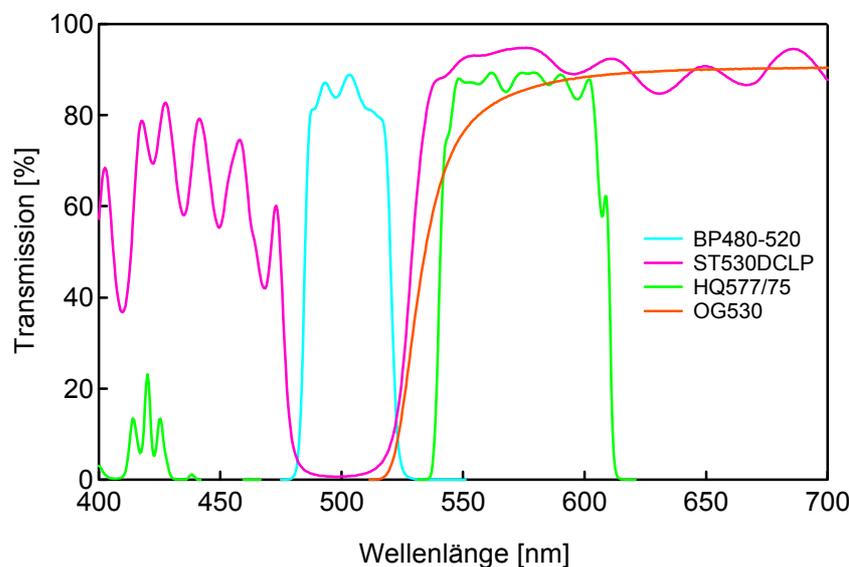


Abbildung 4.7: Wellenlängenabhängige Auftragung der Transmission für den verwendeten Rhodaminfiltersatz. Der dichroitische Strahlteiler 530DCLP wird für die Transmissionsmessung unter dem realen Anstellwinkel von 45° vermessen. In dem zweiten FCS-Aufbau kann auf den ersten Bandpaß BP480-520 verzichtet werden, da der Mikroskopanregungsarm Streulicht weitestgehend abblockt.

Der Filtersatz für 488nm -Anregung wird in dem ersten Aufbau eingesetzt und für Long-Distance-Messungen herangezogen. Er besteht aus:

- Anregungsfilter BP480-520 (AHF Analysentechnik; Tübingen). Da im ersten Aufbau der Anregungsarm offen liegt, muß das Streulicht abgeblockt werden.
- Strahlteiler BSP488/514 (Delta Light&Optics; Lyngby-Dänemark). Der Strahlteiler ist optimiert zur Trennung der Argon-Linien und paßt gut zu den Anregungs- und Emissionsspektren des Fluoresceins.
- Sperrfilter HQ535/50 (AHF Analysentechnik; Tübingen). Der Bandpaß von $510-560\text{nm}$ blockt sowohl

² Bei Einmodenfasern gilt für die Bestimmung der Grenzwellenlänge λ_{Grenze} der Zusammenhang $\lambda > \lambda_{\text{Grenze}} \approx 1,3 \cdot D_{\text{Kern}} \cdot N.A._{\text{Faser}}$. Für eine Numerische Apertur der Faser $N.A._{\text{Faser}} = 0,1$ und einen Kerndurchmesser $D_{\text{Kern}} = 3,1\mu\text{m}$ ergibt sich eine minimale Wellenlänge von $\lambda_{\text{Grenze}} = 400\text{nm}$ für den Singlemodebetrieb.

eventuell reflektierte Anregungsstrahlen als auch die *O-H*-Raman-Linie des Wassers ab.

Für die Anregung bei 514nm existieren zwei unterschiedliche Filtersätze, einer für den ersten Aufbau und einer für den zweiten:

- Anregungsfilter BP480-520 (AHF Analystechnik; Tübingen). Dieser Filter ist dem obigen gleich und wird nur im ersten Aufbau verwendet.
- Strahlteiler 530DCLP mit einer 514nm Laseroptimierung für einen 45° -Einfallswinkel. Er wird in beiden Aufbauten verwendet, allerdings in unterschiedlichen Abmessungen, da die Filterhalter sich in ihrer Montageform unterscheiden.
- Sperrfilter HQ577/75 mit O.D.5 bei 624nm (AHF Analystechnik; Tübingen). Er wird ebenfalls in beiden Aufbauten zur Unterdrückung des reflektierten Anregungslichtes sowie der Ramanlinie des Wassers ab $\lambda_{\text{O-H-Raman}} = \left(\frac{1}{\lambda_{\text{Anregung}}} - \Delta\nu \right)^{-1} = \left(\frac{1}{514,5\text{nm}} - 3400 \frac{1}{\text{cm}} \right)^{-1} = 624\text{nm}$ verwendet. Die Begrenzung der Detektionswellenlängen bewirkt eine Verringerung der Meßintensität, allerdings werden neben der Raman-Unterdrückung gleichzeitig chromatische Fehler des optischen Aufbaus minimiert.
- Farbglas OG530 (Schott; Mainz) mit 3mm Dicke. Für eine zusätzliche Unterdrückung der Anregungslinie mit einer Optischen Dichte $O.D. > 4$ wird dieser Filter für stark reflektierende Proben eingesetzt.

Schätzt man die Zahl der Anregungsphotonen für die spätere Meßleistung von $15\mu\text{W}$ über die Beziehung $n = \frac{P_{\text{gesamt}}}{P_{\text{Photon}}} = \frac{15\mu\text{W} \cdot 514,5\text{nm}}{h \cdot c} \approx 4 \cdot 10^{13}$ ab, so ist bei reflektierendem Substrat eine starke Abschwächung dieser Wellenlänge mit $O.D. > 8$ zu empfehlen. Da nicht alle reflektierten Strahlen wirklich den Detektor treffen würden und dieser auch nicht alle zählen könnte, wird eine scheinbare $O.D. > 10$ erreicht.

Für die Beobachtung unter Xenon-Beleuchtung werden im zweiten Aufbau drei zusätzliche Filter eingesetzt, ein Kaltglas, ein Farbglas OG570 für die Kontrastbetrachtung und ein Interferenzfilter BP480-520 für die Fluoreszenzbeobachtung. Diese Filter werden bei der dortigen Beschreibung genauer berücksichtigt.

4.4.3 Objektive zur Beobachtung und Messung

Ein zentrales Bauteil für die Beobachtung und Messung mittels eines Mikroskop-Prinzips ist das jeweilig verwendete Objektiv. In dieser Arbeit kommen fünf Objektive zum Einsatz.

- Zeiss LD Achromplan x20/0,4 Korr - Das Objektiv läßt sich mit und ohne Deckglas verwenden und eignet sich für die Beobachtung und grobe Positionierung der Probe.
- Zeiss Achromplan x63/0,9W - Arbeitsabstand $1,46\text{mm}$; keine Deckglaskorrektur. Es ist das Standardobjektiv für die Vesikelmessungen, da es durch seinen kleinen Durchmesser auch in der gewählten Auflichtkonfiguration im Probenschälchen positioniert werden kann.
- Zeiss C-Apochromat x63/1,2W - Arbeitsabstand $0,25\text{mm}$; deckglaskorrigiert $0,14 - 0,18\text{mm}$. Inzwischen wohl ein Standard-Objektiv in der FCS, das durch seine Deckglaskorrektur für die Auflichtbetrachtung nicht geeignet erscheint und nur für Referenzmessungen Verwendung findet.
- Mitutoyo M Plan Apo 20. Luftobjektiv zur Betrachtung bei Long-Distance-Konfiguration.



Abbildung 4.8: Objektive zur Beobachtung und Messung. (von links) Zeiss x20/0,40; Zeiss x63/0,9W; Zeiss x63/1,2W; Mitutoyo x20/0,42L; Mitutoyo x100/0,55L. (rechts) Gewindeadapter um Mitutoyo-Objektive an Standard-Mikroskopgewinde anzubringen.

- Mitutoyo M Plan Apo SL100/0,55 - Arbeitsabstand 12mm. Luftobjektiv zur FCS-Messung mit extrem großem Arbeitsabstand, aber den sich daraus ergebenden Einschränkungen für die Lichtausbeute und der notwendigen Schichtsystemkorrektur für Messungen in Wasser.

Alle aufgeführten Objektive sind für unendlichen Strahlengang korrigiert, wobei die Vergrößerung M_{nominal} erst durch die Brennweite der Tubuslinse f_{soll} bei den Zeiss-Objektiven 164,5mm und bei den Mitutoyo-Objektiven 200mm definiert ist. Abweichende Tubus-Brennweiten f_{ist} verändern die wirkende Vergrößerung des Objektiv über die Beziehung $M_{\text{wirkend}} = M_{\text{nominal}} \cdot \frac{f_{\text{ist}}}{f_{\text{soll}}}$. Das Mitutoyo SL100-Objektiv mit einer Sollbrennweite der Tubuslinse von $f_{\text{soll}} = 200\text{mm}$ zeigt in einem Zeiss-Mikroskop eine wirkende Vergrößerung von $M_{\text{wirkend}} = 100 \cdot \frac{164,5\text{mm}}{200\text{mm}} = 82,25$.

4.4.4 Schrittmotoren zur Positionierung

Da ein starrer optischer Aufbau die Qualität der Meßergebnisse deutlich verbessert, sind die optischen Komponenten der verwendeten Aufbauten fixiert. Im Fall der Long-Distance-Apparatur ist dies durch einen von vorneherein festen Aufbau gegeben. Das Mikroskop wird mit zusätzlichen Versteifungen arretiert. Um trotzdem "mobil" zu sein, wird die Probe mit Hilfe von drei Schrittmotoren (Meßtisch LM60; Owis; Staufen i. Br.) verfahren. Mit einer Schrittweite von $1\mu\text{m}$ bei einem Maximalweg von 25mm können großflächig Probenbereiche abgesucht und gleichzeitig mit ausreichender Genauigkeit positioniert werden. Die Steuerungs- und Halteströme werden hierbei durch eine Eigenbau-Motorsteuereinheit geliefert, welche über TTL-Impulse von einer Computereinsteckkarte (LabPC+; National Instruments; München) gesteuert werden. Zur Synchronisation von Schritimpulsen und aufgenommener Photonen-Zählrate wird ein selbstentwickeltes Programm verwendet. Durch diese Positionierung und lokale Messung ist eine Rasterung der Probe möglich.

4.4.5 Temperaturregelung mit Peltierelement

Bei der Messung wird die Proben­temperatur über einen Pt100-Temperaturwiderstand bestimmt. Eine PID-Regelung (ST70-31.02; Störk; Stuttgart) mit angeschlossenem Schalt­netzteil und einem Peltierelement (PKE72; Peltron; Fürth) als aktivem Bauteil dient zur Temperatureinstellung. Hiermit kann die Probe sowohl gekühlt als auch geheizt und die dann erreichte Endtemperatur bis auf $0,1^{\circ}\text{C}$ eingeregelt werden. Für eine auf einen Objektträger aufgeklebte Küvette erschließt sich ein Temperaturbereich von 10°C bis 45°C .

4.4.6 CCD-Kamera und Framegrabber zur Beobachtung

Für die Dokumentation und speziell für die FRAP-Messung wird eine Kombination aus einer empfindlichen Halbleiter-Kamera (HRC; Theta-System; Gröbenzell) nach dem CCD-Prinzip (Charge Coupled Device) und einer Framegrabber-Meßkarte (PC-EYE-1; Eltec; Mainz) für den Computer verwendet. Die auf einem $\frac{1}{2}$ – Zoll-Chip (Sony ICX039AL) basierende Kamera mit 752×582 Bildpunkten (Pixelgröße $8,6\mu\text{m} \times 8,3\mu\text{m}$) ermöglicht neben verschiedenen Belichtungszeiten in Videonorm (50Hz pro Halbbild) auch einen speziellen Triggermodus für Langzeitbelichtungen bis 320ms pro Halbbild. Direkt an der Kamera werden die Einstellungen der Intensitätskorrektur ($\text{Gamma}=1$) und der automatischen Verstärkung (Autogain=aus) vorgenommen, um unverfälschte Intensitätsprofile bei mehreren Bildern vergleichen zu können. Zusätzlich können mit einer selbstentwickelten Steuerelektronik die Belichtungszeit und die Verstärkung manuell vorgegeben werden. Die Framegrabber-Karte wird über eine DLL (Dynamic Link Library) von einem selbstentwickelten Programm gesteuert, welches eine Aufnahme und unkomprimierte Abspeicherung der 8Bit -Graustufen­daten in Echtzeit auf die Festplatte des Rechners in einem gebräuchlichen TIFF-Bilddatenformat gestattet.

4.4.7 Einheit zur Pinhole- und Detektorjustage

Die emissionsseitige Einheit zur Pinholejustage ist ein Eigenbau der Abteilungswerkstatt und unterscheidet sich in den zwei vorgestellten Aufbauten. In der für Long-Distance-Messungen optimierten ersten Form besteht sie aus einem lichtdichten eloxierten Aluminiumkasten, welcher im Inneren drei zum Mikrobanksystem kompatible Führungsstangen beherbergt, an denen die optischen Komponenten befestigt sind. Am dem Strahlteiler zugewandten Ende sind zunächst die emissionsseitigen Filter platziert, danach folgt ein Spiegelsystem, welches das vom Objektiv kommende Licht über eine separate Tubuslinse ($f = 30\text{mm}$; Spindler&Hoyer; Göttingen) wahlweise auf eine oben beschriebene CCD-Kamera oder ein Okularsystem (Mitutoyo; Kawasaki; Japan) lenkt. Diese Komponenten dienen zur groben Positionierung und Kontrolle des Laserfokus. Für die Messungen mit dem Einzelphotonendetektor kann der Spiegel aus dem Strahl gezogen und das Fluoreszenzlicht über eine entspiegelte Tubuslinse ($f = 60\text{mm}$; ARB2-Entspiegelung $490 - 660\text{nm}$; Spindler&Hoyer; Göttingen) auf das Pinhole ($50, 80, 100, 120\mu\text{m}$; Owis; Staufen i. Br.) fokussiert werden. Letzteres kann über drei Mikrometerschrauben in alle Raumrichtungen verschoben werden und gestattet eine sehr exakte Führung. Für eine optische Abbildung des Pinholes auf die Detektorfläche werden zwei entspiegelte Quarzlinsen ($f = 60\text{mm}$; ARB2-Entspiegelung $490 - 660\text{nm}$; Spindler&Hoyer;

Göttingen) verwendet, die eine entkoppelte und damit einfachere Justage ermöglichen. Der Detektor kann in seiner Halterung in Strahlrichtung grob- und senkrecht dazu feinjustiert werden. Ebenfalls integriert in dieser Halterung ist ein manueller Verschuß und ein Pt100-Temperaturwiderstand zur Kontrolle eines möglichen Wärmestaus.

Im zweiten Aufbau auf Mikroskopbasis (Axioskop; Zeiss; Oberkochen) kann auf einige Komponenten verzichtet werden, welche schon standardmäßig integriert sind und die Einzelmolekülbetrachtung nicht zu sehr stören. Die Tubuslinse ($f = 164,5\text{mm}$) sowie der Filterschieber werden weiterverwendet. Die Linse, da bei Verwendung von Zeiss-Objektiven die Farbkorrektur erst in Verbindung mit dieser erfolgt. Die Weiterverwendung des Filterschiebers stellt einen Kompromiß dar, da trotz Schwalbenschwanzführung die Stabilität leidet. Zudem sind für die zu erzielende Lichtdichtigkeit zusätzliche Abklebungen notwendig. Die gesamte Pinhole-Detektoreinheit muß an das aufrechte Mikroskop angepaßt werden. Dies beinhaltet die Verlagerung des ersten emissionsseitigen Interferenzfilters in den Filterschieber und die Entfernung der Tubuslinsen. Ebenfalls wird das Gehäuse verkürzt, damit die Pinholeebene entsprechend der Fokusebene der Tubuslinse positioniert werden kann.

4.4.8 Avalanche Photodiode (APD) als Einzelphotonendetektor

Der verwendete Einzelphotonendetektor SPCM-AQ-161 (EG&G Optoelectronics Canada) basiert auf einer aktiv gequenchten Avalanche Photodiode. Die Diode ist mit einer so hohen Sperrspannung belegt, daß ein Photon eine andauernde Ladungsträgerlawine triggern kann. Dieser Lawinenstrom wird durch eine Verstärkereinheit in ein 10ns -TTL-Signal (Transistor-Transistor-Logik) gewandelt und kann über ein BNC-Kabel abgegriffen werden. In älteren Modulen findet die Kompensation des Lawinenstroms durch einfache RC-Glieder statt, die Totzeit ist dementsprechend hoch $\approx 200\text{ns}$. Die modernere Modulform vermindert die Zeit zwischen Pulsauslösung und erneuter Detektionsbereitschaft durch transistorgesteuerte aktive Kompensation drastisch auf 30ns und weist eine sehr hohe Quantenausbeute von $60 - 70\%$ bei einer Dunkelzählrate $< 25\text{cps}$ auf. Der empfindliche Bereich des Detektors hat einen Durchmesser von $170 - 200\mu\text{m}$, so daß selbst ohne separat angebrachtes Pinhole diese Fläche bereits als begrenzendes Element arbeitet. Das Niedervoltmodul wird mit einem doppelstabilisierten Labornetzteil (LNG16-12; Knürr-Heinzinger; Rosenheim) mit effektiv 5V Gleichspannung betrieben. Eine unterbrechungsfreie Stromversorgung (Fortress LI1420DT; Best Power Technology; Erlangen) schützt die APD gegen Stromschwankungen und -ausfälle.

An dieser Stelle sei eine kleine persönliche Bemerkung erlaubt: Der Modultypus weist nicht nur die oben beschriebenen erfreulichen Detektionseigenschaften auf: Durch seine Instabilität, nicht behobene Produktionsmängel und enorme Lieferschwierigkeiten löste er erheblichen Experimentatorverdruß aus. Der sich aus diesen Umständen ergebende Zeitverlust sprengt die berechenbare Phase des Meßaufbaus und ist ein steter Unsicherheitsfaktor bei der Anwendung. Ob die aktuelle Produktionslinie bei EG&G von ihren Kinderkrankheiten befreit ist, kann hier nicht beantwortet werden. Für einen effektiven Einsatz in der Forschung ist zumindest zu hoffen, daß die Qualität und Verfügbarkeit des Produktes deutlich gesteigert wird.

4.5 Verarbeitung der Meßdaten

Die Verarbeitung der Meßdaten findet mittels Computer statt. Er beherbergt die erforderlichen Meßkarten für die Korrelation der Photonensignale und die Steuerung der angeschlossenen Geräte.

4.5.1 Computer Hard- und Software

Der Computer stellt ein wichtiges Element zur Aufnahme und Verarbeitung der Meßdaten dar. Als Hardwarebasis wird ein selbstkonfektionierter Rechner (Synchron, Gilching) der PentiumII-Klasse mit 256MB-Hauptspeicher und 9,1GB U2W-SCSI-Festplatte verwendet, der unter dem Betriebssystem Windows98 (Microsoft; Unterschleißheim) seinen Dienst verrichtet. Da die bereits beschriebene Framegrabber-Karte (PC-EYE-1; Eltec; Mainz) über den PCI-Bus die Daten in den Hauptspeicher bzw. die Grafikkarte transferiert, muß letztere eine lineare, unsegmentierte Einblendung ihres Bildschirmspeichers in den Prozessoradressraum gestatten. Eine Millenium G200 AGP (Matrox; Unterhaching) erfüllt dieses Kriterium und arbeitet in der beschriebenen Konstellation stabil. Für die Ansteuerung der Schrittmotoren und den elektrischen Verschuß über TTL-Signale wird eine Multifunktionsmeßkarte (LabPC+; National Instruments; München) eingesetzt. Die Korrelatorkarte (ALV5000E; ALV; Langen) dient zur Aufnahme und Vorverarbeitung der Photonenzählereignisse. Auf sie wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

Für die Entwicklung der Spezialsoftware werden, teils aus historischen Gründen, teils aus praktischen Gesichtspunkten, unterschiedliche Entwicklungsumgebungen eingesetzt. Die Ansteuerung der Korrelatorkarte geschieht über eine 16-Bit-Treiberschicht, welche sich recht einfach über Borland Pascal 7.0 (Inprise; Langen) ansprechen läßt. Ebenso können damit die Funktionen der Multifunktionskarte genutzt werden. Im gleichen Entwicklungszeitraum ist das Fitprogramm mit dem gleichen Programmierwerkzeug entstanden. Da für die Theorieberechnungen, speziell die Fouriertransformation, große Speicherbereiche angesprochen werden, verbietet sich der Einsatz eines 16-Bit-Adressraums, somit werden diese Berechnungen in einer Java-Entwicklungsumgebung (Visual Café 3.0; Symantec; Ratingen) durchgeführt. Für die Ansteuerung der Framegrabberkarte wird das C++-System Visual-Studio97 (Microsoft; Unterschleißheim) eingesetzt, da entsprechende Programmierbibliotheken der Karte beiliegen. Dieses "Sammelsurium" an Entwicklungsprodukten wird abgerundet durch Labview 5.1 (National Instruments; München), das für die Aufbereitung und Analyse z.B. der FRAP-Videodaten eingesetzt wird und die Funktionalität bietet, die übrigen Programmentwicklungssysteme obsolet zu machen.

4.5.2 Korrelatorkarte als Aufnahmeeinheit

Der digitale Korrelator ALV-5000E (ALV; Langen) ist als Computereinsteckkarte realisiert und berechnet die normierte Korrelationsfunktion der gemessenen Intensitätssignale "online" während der Messung. Die Karte verfügt über 288 Kanäle, die als "Multiple-Tau-Digital-Correlator" eine quasilogarithmische Zeitverteilung vorweisen. Der Registersatz ist in mehrere lineare Zeitbereiche unterteilt und verfügt über eine der möglichen Zahl der Ereignisse angepaßte Speicherbreite von 8Bit für die kleinsten Kanalzeiten ab 200ns bis 32Bit für die Zeiten ab $409\mu\text{s}$. Die maximale Korrelationszeit liegt bei einigen Stunden und wird in der

Praxis bei der hier beschriebenen Art der Messung nicht erreicht.

Das TTL-Signal des Photonendetektors kann direkt über ein 50 Ω -BNC-Kabel in die Meßkarte eingespeist und dort sofort weiterverarbeitet werden. Als Standardeinstellung für die Aufnahme wird die Karte in einen SINGLE-AUTO-MODE versetzt, der die Photonenpulse an einem der möglichen zwei BNC-Eingänge als Signalquelle auswählt und später die Autokorrelationsfunktion berechnet. Die Möglichkeiten der zweifachen Auto- oder Kreuzkorrelation werden in dieser Arbeit nicht verwendet. Vor jeder Messung kann eine automatische Skalierung des Korrelators erfolgen, welche bei nicht zu kleinen Farbstoff-Verdünnungen verwendet wird. In eher seltenen Fällen wird ein Bereich vorgegeben. Als Standardmeßzeit werden 30 oder 100 Sekunden verwendet, da bei den hier üblichen Farbstoffkonzentrationen von einem Partikel pro Meßvolumen eine Vielzahl von Fokusdurchtritten erfolgt und die Korrelationskurven sich nicht mehr deutlich verbessern.

4.5.3 Software zur Steuerung und Messung

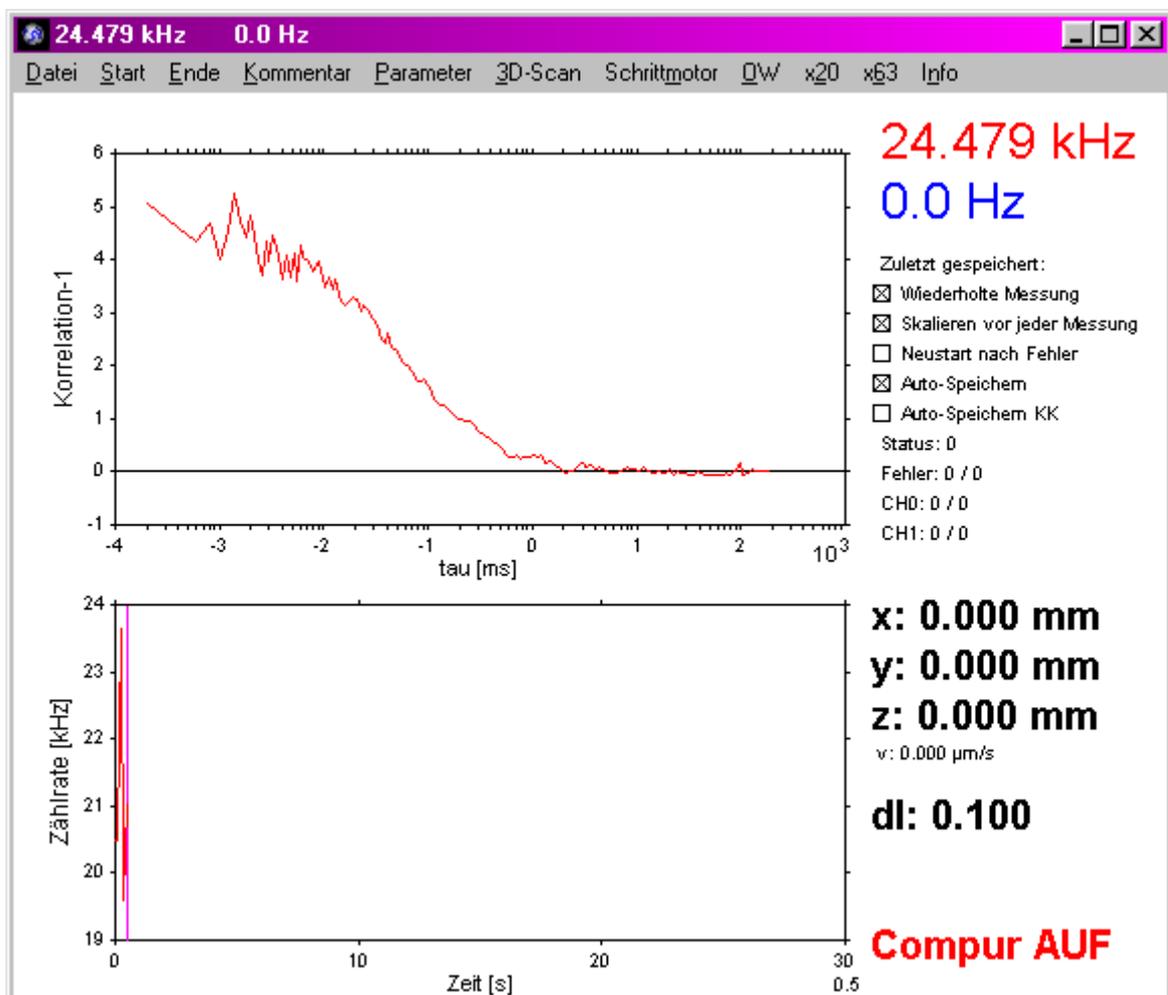


Abbildung 4.9: Oberfläche des Meßprogramms während einer Messung an Rhodamin 6G. Schon nach kürzester Zeit ist eine Korrelationsfunktion zu erkennen, die sich bei längerer Meßzeit zusehens glättet. Eine Abschätzung der Größenordnung für die Zahl der Durchläufe durch den Fokus liegt in diesem Fall bei ca. 1000.

Die bei der Messung verwendete selbstentwickelte Software (Abb. 4.9) bietet durch die Integration einer Positionier- und Scanoption sowie einer effizienteren Handhabung einen wesentlichen Vorteil gegenüber dem Standard-Korrelatorprogramm. Das Hardwareinterface beruht auf einer DLL (Dynamic Link Library), die für eine frühe Version der ALV-Software (Version vom 17.12.1996; ALV; Langen) entwickelt und freundlicherweise dokumentiert wurde. Das objektorientiert aufgebaute Programm gestattet eine Synchronisation zwischen Bewegung der Schrittmotoren und Aufnahme der Korrelations- und Zählratendaten, so daß ein langsames, örtliches Scannen der Probe möglich wird. Nach negativen Erfahrungen mit der Haltbarkeit der APDs wurden zusätzlich Sicherheits- und Überwachungsfunktionen eingebaut, die im Hintergrund die Zählrate protokollieren und bei einer Überschreitung von bestimmten Richtwerten warnen bzw. den elektrischen Shutter am Laser schließen.

4.5.4 Software zur Meßdatenanalyse

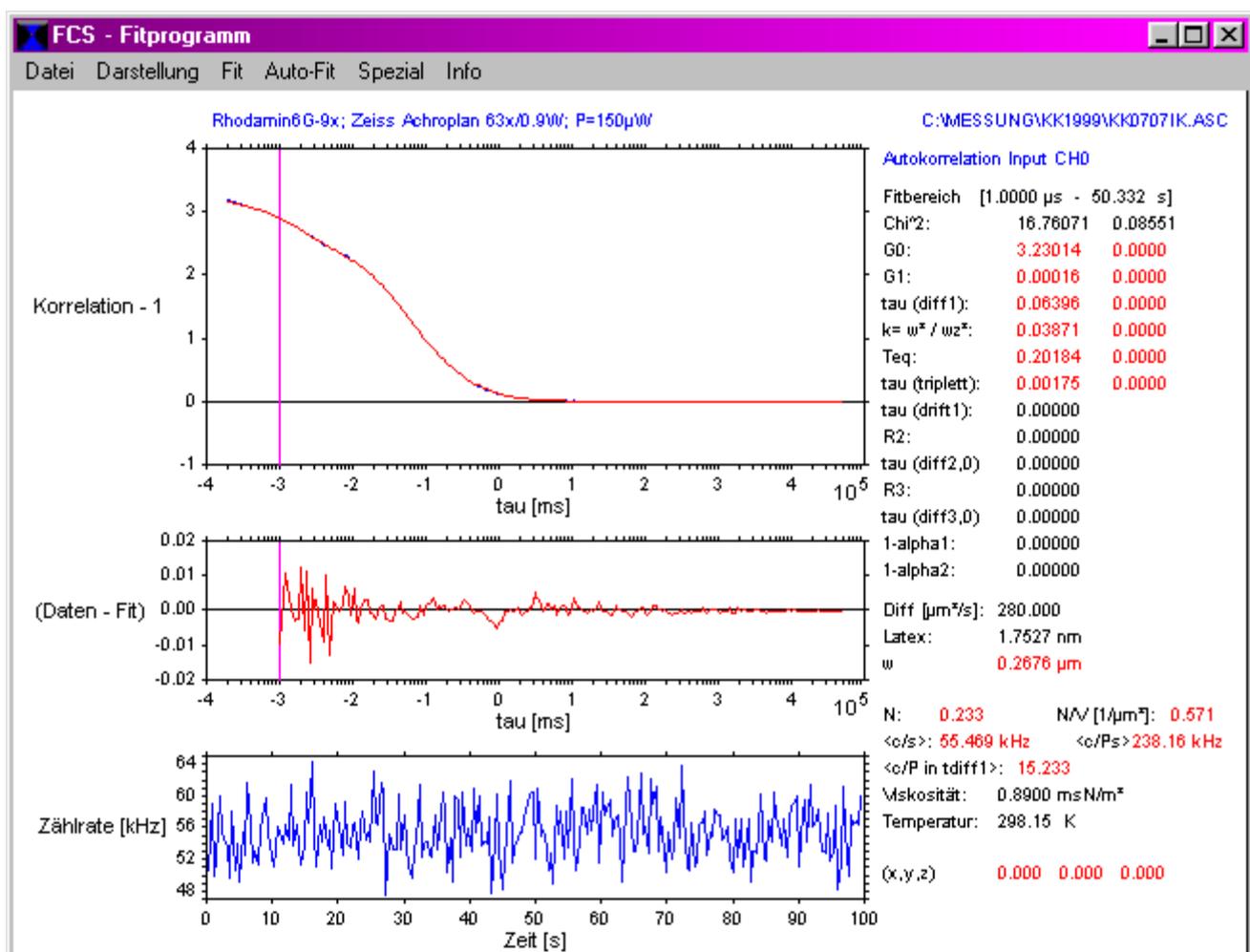


Abbildung 4.10: Oberfläche des Fitprogramms. Das selbstentwickelte Fitprogramm gestattet die schnelle und komfortable Visualisierung und Auswertung der Meßdaten.

Zur Auswertung der gemessenen Daten wird ein selbstentwickeltes Programm (Abb. 4.10) verwendet, dessen nichtlinearer Fit auf einer Standardimplementierung [48] des unabhängig von Levenberg [36] und

Marquardt [40] entwickelten Algorithmus zur Minimierung der Summe der Fehlerquadrate beruht. Bei einem Datensatz $\{x_i, y_i, \sigma_i\}$ (σ_i = Fehler der Einzeldaten) aus N Elementen und einer Modellfunktion $y = y(x; \mathbf{a})$ wird die Summe der Fehlerquadrate

$$\chi^2(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{y_i - y(x_i; \mathbf{a})}{\sigma_i} \right]^2$$

als Maß für die Güte der Übereinstimmung von Modell und Daten herangezogen. Durch eine Minimierung der Abweichung kann der Parametersatz \mathbf{a} der Modellfunktion bestimmt werden, welcher die Daten am besten beschreibt. Die weitere Verbreitung dieses Algorithmus liegt im Vorzug der schnellen und exakten Konvergenz begründet. Dies wird durch die Kombination zweier auch einzeln anzutreffenden Methoden erzielt. Die "steepest-descent" oder Gradientenmethode wird in der Anfangsphase verwendet, sie steigt sehr schnell in die Nähe des Minimums ab. Dort wird durch Verwendung von Inverser-Hesse-Matrizen bzw. deren stärkerer Gewichtung eine exaktere Bestimmung der Parameter für das Minimum \mathbf{a}_{\min} möglich.

Die konkret bei der Auswertung verwendete Formel stellt eine angepaßte aber leicht zu erweiternde Teilmenge der möglichen Konfigurationen dar.

$$G(\tau) - 1 = G_1 + G_0 \left[1 - T_{\text{eq}} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}} \right) \right] \quad (4.1)$$

$$\left[(1 - R_2 - R_3) \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{diff1}}}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{diff1}}}}} e^{-\left(\left(\frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{drift1}}}\right)^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{diff1}}}\right)} \right)} \right. \\ \left. + R_2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_2}}{\tau_{\text{diff2}}}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \delta_{\text{kdiff2}} k \frac{\tau^{\alpha_2}}{\tau_{\text{diff2}}}}} + R_3 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff3}}}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \delta_{\text{kdiff3}} k \frac{\tau}{\tau_{\text{diff3}}}}} \right]$$

Diese Version berücksichtigt maximal drei diffundierende Komponenten mit ihren entsprechenden Diffusionszeiten τ_{diff} und ihren Partikelanteilen R_2 , R_3 und $R_1 = (1 - R_2 - R_3)$. Für alle Komponenten einheitlich wird ein Triplettanteil T_{eq} mit der Triplett-Zeitkonstanten τ_{triplett} ermittelt. Die erste Komponente ist für eine zusätzliche Bestimmung der Driftzeit τ_{drift1} vorbereitet. Über die entsprechenden α -Parameter läßt sich für den ersten und zweiten Anteil eine anomale Diffusion berücksichtigen. Bei einem vom normalen Diffusionsmodell ($\alpha = 1$) abweichenden Wert ändert sich die Interpretation der τ_{diff} . Sie stellen mit einer Einheit s^α keine Zeitkonstante mehr dar, sondern dienen als reiner Fitparameter. Eine Entkopplung des Volumenmodells läßt sich über die δ_{kdiff} -Parameter erzielen, durch deren mögliche Werte von 0 und 1 kann für die erste Komponente ein gaußförmiges, dreidimensionales Diffusionsmodell verwendet und für die anderen beiden eine Kopplung an dieses oder ein zweidimensionales Modell berücksichtigt werden. Für die eigentliche Auswertung werden jeweils nur ein Teil der gezeigten Parameter eingesetzt, da sich trotz logarithmischer Zeitbasis der Daten nicht so viele Strukturinformationen eindeutig identifizieren lassen.

Die Frage der Startparameter \mathbf{a}_0 wird erst bei genauerer Betrachtung der FCS-Modellfunktion und der Auswirkung verschiedener Parameter deutlicher. Generell gilt, daß für einen guten Fit die Startparame-

ter entweder durch eine grobe Voranalyse der Funktion, durch eine Minimum-Maximum-Suche und eine Steigungskontrolle oder durch physikalisch-meßtechnische Überlegungen möglichst nahe am Minimum gewählt werden sollten. Um nicht in ein Nebenminimum zu geraten ist das Heranziehen von Daten aus Referenzmessungen sehr hilfreich. In der Praxis hat sich eine Unterteilung in drei Voranalysebereiche bewährt, die für einfache Systeme automatisch sehr gute Startparameter findet. Im Lagtime-Bereich bis $10\mu s$ wird zunächst das Interzept G_o und über die Steigung der Triplettanteil T_{eq} sowie die Triplettzeit $\tau_{triplett}$ bestimmt. Im zweiten Voranalysebereich wird über den Zeitwert am halben Interzeptwert die Diffusionszeit τ_{diff} und, falls vorhanden, über die dortige Steigung die Driftzeit τ_{drift} ermittelt. Im letzten Teilbereich wird der Offset G_1 bestimmt. Bei den normierten Korrelationsdaten sollte dieser Wert immer 1 bzw. 0 sein. Mehrkomponentensysteme oder Messungen zur Bestimmung der Fokusverzerrung lassen sich ohne Zusatzangaben nur schlecht automatisch fitten oder bedürfen einer aufwendigen Voranalyse.

Neben dieser automatischen Datenanalyse sprechen gegen die Verwendung von Standardfitprogrammen (Wavemetrics-IgorPro; Microcalc-Origin) deren unpraktische Importprozedur, die eine die Messung begleitende Auswertung aufwendig gestalten. Für die Überprüfung der Fitparameter bei Modifikation der Auswertesoftware sind diese Programme jedoch neben der in der ALV-Software integrierten Fitmöglichkeit sehr nützlich. Auf die Interpretation der bei dem Fit gefundenen Parameter a_{min} wird in Abschnitt 6 näher eingegangen.

4.6 Meßvorbereitungen und -ablauf

Als Vorbereitung zur FCS-Messungen wird zunächst der Argon-Ionen-Laser angeschaltet und nach einer Aufwärm- und Stabilisierungsphase die Strahlage mit der Beamlok-Funktion überprüft. Ebenfalls erfolgt eine Kontrolle der gaußförmigen Ausleuchtung der Objektivapertur und der groben Lage des Fokusspots. Mit Rhodamin 6G in einer nanomolaren wäßrigen Lösung wird bei einer Lichtleistung von $150\mu W$ über die Okulare die Fokusalage im Gesichtsfeld überprüft und dessen Position durch ein Fadenkreuz im Okular markiert. Im allgemeinen müssen kaum Änderungen an dieser Grundjustage durchgeführt werden. Die folgende Optimierung der Pinhole- und Detektorlage auf Basis der Einstellungen des letzten Meßtages ist schnell und unkompliziert möglich. Alle Messungen finden in einem abgedunkelten Raum statt, um die Ergebnisse nicht durch unglücklich reflektiertes oder gestreutes Licht zu verfälschen.

Bevor die eigentlichen Einzelphotonenmessungen beginnen, werden alle Geräte mit hohem Stromverbrauch oder Zündfunken eingeschaltet. Dies sind speziell die Xenonlampe, die Schrittmotorensteuerung, die Hochspannungsquelle für Driftmessungen und der Temperaturregler für das Peltier-Element. Negative Erfahrungen mit den Avalanche-Photodiodenmodulen machen diese Vorsichtsmaßnahmen notwendig und können nur empfohlen werden.

Die Messungen an Riesenvesikeln werden mit dem Zeiss-Objektiv x63/0,9W durchgeführt. In aufrechter Konfiguration ohne Deckglas ist die Positionierung, im Vergleich zu den anderen Objektiven, wesentlich flexibler. Die kleine Numerische Apertur stellt bei langsamen Diffusionskonstanten der Membranbausteine und dem zweidimensionalen System keine Einschränkung dar.

Vor der Messung an Vesikeln wird die oben beschriebene nanomolare Rhodamin-Lösung als Referenz vermessen. Rhodamin hat bei Raumtemperatur ($T = 25^{\circ}C$) in Wasser eine Diffusionskonstante von $280 \frac{\mu m^2}{s}$. Dieser Wert wird bei der Bestimmung des Fokusradius als Referenz verwendet. Für diese Messung wird das Schälchen mit der Lösung in einen Halter auf dem Peltierelement fixiert und der Temperaturfühler eingetaucht. Mit den Schrittmotoren kann die Probe in Meßposition gebracht werden. Der Photonendetektor wird im nichtbeleuchteten Zustand angeschaltet, wobei während der gesamten Betriebszeit das Meßprogramm die Zählrate protokolliert und gegebenenfalls Warnmeldungen ausgegeben werden.

Bei einer Lichtleistung von $150 \mu W$ wird die Justage von dem Pinhole und der APD kontrolliert und auf maximale Photonenzählrate nachgeregelt. Die sich ergebenden Korrelationskurven können dabei mit einem separaten Programm parallel ausgewertet und die gefundenen mit früher bestimmten Werten verglichen werden. Gegebenenfalls kann durch leichte Veränderungen die Amplitude der Korrelation verbessert und die Güte des Detektionsvolumens gesteigert werden. Über einen Meßtag hinweg verändern sich die so gefundenen Werte durch die Strahlagenregelung des Lasers und den stabilisierten Aufbau nur minimal.

Nach erfolgter Justage werden mehrere Referenzmessungen mit Rhodamin durchgeführt, dies sowohl bei der oben schon erwähnten Lichtleistung von $150 \mu W$ sowie der für Messungen vorgesehenen Leistung. Für Vesikel- und Rastermessungen werden hier $15 \mu W$ verwendet. Nach erfolgter Referenzmessung wird das verwendete Wasserobjektiv kurz mit Reinstwasser abgespült, um Farbstoffanhaftungen zu entfernen.

Kapitel 5

Herstellung von Riesenvesikeln

In diesem Abschnitt wird eine vereinfachte und effiziente Methode zur Herstellung von unilamellaren Riesenvesikeln mittels elektrischer Felder vorgestellt. Für eine Optimierung werden verschiedene Erkenntnisse aus Veröffentlichungen in einem Verfahren zusammengefaßt und durch eigene Verbesserungen erweitert.

Ideenlieferanten

Die generelle Idee zum Quellen von Vesikeln mittels elektrischer Felder stammt aus den Arbeiten von Angelova und Dimitrov [1][9], wobei in der ersten Arbeit mit Gleichspannung und in der zweiten mit 10Hz-Wechselspannung gearbeitet wird. Als Elektroden werden vornehmlich Platindrähte eingesetzt. Ein Hinweis auf Indium Tin Oxide (ITO) als Elektrodenmaterial ist in einer späteren Arbeit [2] zu finden, wobei gegenüberliegende Plättchen verwendet werden. Verbesserungen durch ein Gemisch aus Diethylether und Methanol im Verhältnis 9 : 1 als Lösungsmittel des Lipids und die Herstellung mittels Spannungsrampe [72] ergeben in Kombination mit den ITO-Strukturen eine große Ausbeute an Riesenvesikeln. Die Vereinzelung mittels niedrigerer Frequenz (4Hz) und die Verwendung von unterschiedlichen Zuckern zur Sedimentation werden in einem weiteren Artikel [41] beschrieben.

Eine wesentliche Verbesserung dieser Ausgangslage wird durch die einfache Handhabung der hier vorgestellten planaren Elektrodenanordnung und durch das Sputtern von Quarz auf die ITO-Elektroden erreicht. Letzteres macht sich durch ein modifiziertes Spreit-Verhalten der Lipidlösung und einer damit erhöhten Ausbeute von unilamellaren Riesenvesikeln bemerkbar.

5.1 Herstellung der ITO/Quarz-Objektträger

Vor dem Bedampfen mit ITO/Quarz werden die Objektträger mit einem ethanolgetränkten, fusselreinen Reinraumtuch kräftig abgerieben und danach in Ethanol gereinigt (Ultraschallbad 15min). Nach dem Trocknen mit einer Stickstoffpistole wird in der Objektträgermitte mit einem permanenten Faserschreiber (Schwan Stabilo OHPen 842 universal; Farbe lila; Dicke F; ergibt eine Strichbreite von ca. 0,8mm) quer ein Strich als ITO-Maske gezogen und dieser an den Enden verbreitert. Zur Vermeidung von Kurzschlüssen werden die Objektträgerkanten ebenfalls in der Mitte bemalt.

In der Aufdampfanlage (Univex 450; Leybold; Hanau) werden dann 70nm des elektrisch leitenden und durchsichtigen ITO aufgesputtert. In einem Ultraschallbad aus Isopropanol:Aceton 10 : 1 wird die Faser-

schreibermaske und die in dieser Region aufgebrachte ITO-Schicht abgelöst und anschließend der Objektträger mit einer Stickstoffpistole getrocknet.

In einem zweiten Aufdampfschritt wird über das ITO 70nm Quarz aufgesputtert, wobei die Enden des Objektträgers für eine spätere Kontaktierung durch eine Metallmaske abgedeckt sind. Mit dem medizinischen Silikonkleber MK3 wird auf die Objektträgermitte ein Polyethylen-Rahmen (20mm × 20mm × 3mm Innenraum) als Flüssigkeitsreservoir fixiert. Ein fertiger Objektträger ist in Abbildung (5.2 links) zu sehen.

Die fertigen ITO/Quarz-Objektträger können mehrmals für die Herstellung von Riesenvesikeln eingesetzt werden, wobei ihre Lebensdauer im wesentlichen von der Reinigungsprozedur zwischen den Anwendungen abhängt. Eine sanfte Reinigung mit Millipore und Ethanol läßt etwa zehn Zyklen zu.

5.2 Schwellen der Riesenvesikel

Das Schwellen von Riesenvesikeln gliedert sich in mehreren Phasen. In der ersten wird eine Lipidlösung in einem flüchtigen Lösungsmittel auf die Elektroden gespreitet. Die Oberflächenbeschaffenheit der hier vorgestellten planaren ITO/Quarz-Elektroden vereinfachen diesen Vorgang. Die derart erzeugten Lipidschichten werden in einer zweiten Phase durch ein Vakuum von ihrem Lösungsmittel befreit - sie werden getrocknet. Die Zugabe von Wasser führt zu einer leichten Ablösung von ganzen Lipidverbunden. Durch das Anlegen einer zusätzlichen langsamen Störung, sei es in Form von Temperaturrampen oder elektrischen Feldern, wird das Ablösen und die Vesikelformung begünstigt.

5.2.1 Lipidmischung

Als Lipidbasis wird eine 2mM-Lösung von palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-choline POPC (Avanti Polar Lipids; Alabaster; USA) in einer Mischung aus Diethylether und Methanol im Verhältnis 9 : 1 verwendet. Das gewählte Lösungsmittel zeigt beim späteren Aufbringen auf die ITO/Quarz-Elektroden ein sehr homogenes Spreitverhalten und führt zu großen, unilamellaren Vesikeln mit minimalen Einschlüssen. Dem neutralen POPC wird ein negativ geladenes Lipid dioleoyl-phosphatidyl-methylester DOPME (Sigma, Heidelberg) beigemischt, um später immer mit dem gleichen Haftungsprotein arbeiten zu können. Es wird eine ebenfalls 2mM-Lösung von DOPME in 0,25ml Chloroform und 3,165ml Methanol hinzugegeben, so daß ein Lipidverhältnis POPC:DOPME von 100 : 1 vorliegt.

Auf dieser Basis aufbauend werden die Farbstoffträger je nach Verwendungszweck beigemischt. Typisch zur Beobachtung in Fluoreszenz, d.h. für FLIC- und FRAP-Messungen sowie mit dem Laser-scannmikroskop, sind Zugaben von Farbstoffen im Verhältnis POPC:Farbstoff 200 : 1, die in einer 1mM-Lösung in Methanol vorliegen. Für die Einzelmolekülmessungen mit FCS werden die entsprechenden Farbstoffe weiter auf eine 5µM-Methanol-Lösung verdünnt und im Lipidverhältnis POPC:Farbstoff 100 000 : 1 hinzugegeben.

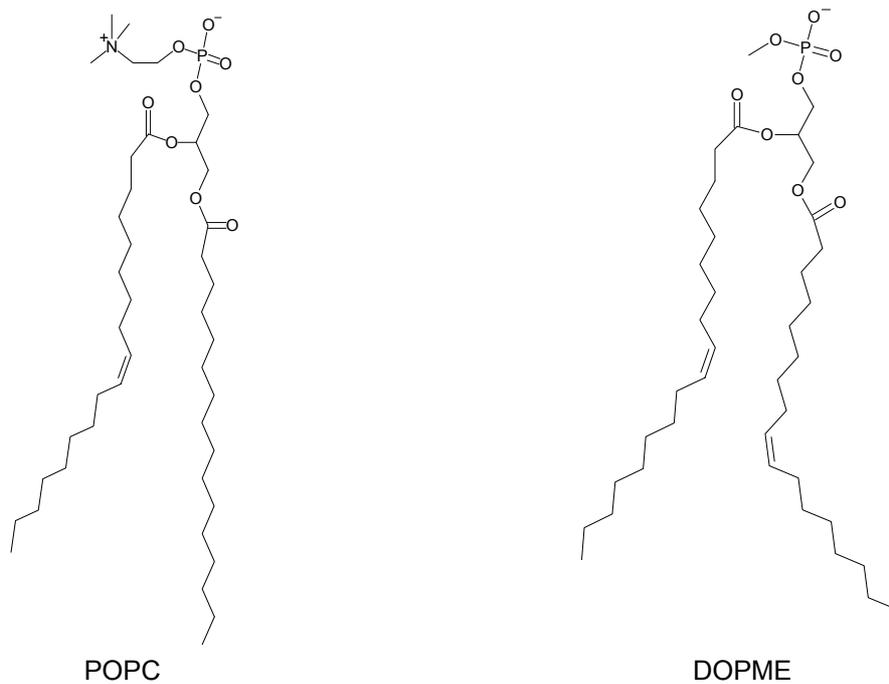


Abbildung 5.1: Zur Herstellung von Riesenvesikeln verwendete Lipide. **(links)** POPC ist die eigentliche Lipidbasis. **(rechts)** DOPME wird in kleinen Mengen beigemischt, um eine negativ geladene Membran zu erhalten.

5.2.2 Schwellen und Ablösen mittels Wechsellspannung

Von der Lipidmischung werden $5\mu\text{l}$ mit einer Glasspritze über den Reservoirbereich des ITO/Quarz-Objektträgers verteilt. Die Objektträger werden über mehrere Stunden, normalerweise über Nacht, in einem Vakuum ($< 0,1\text{mbar}$) gehalten, um dem Lipid das Lösungsmittel zu entziehen.

Die Objektträger werden mit Hilfe von Kupferlitze an den beiden Enden kontaktiert und mit einem Funktionsgenerator (HP33120A; Hewlett-Packard; Böblingen) verbunden. In das Reservoir wird $1,25\text{ml}$ 300mM Saccharoselösung gegeben. Bei 10Hz wird eine Wechselstromspannungsrampe, beginnend bei $0,1\text{V}_{pp}$ (Volt-peak-peak) mit $0,05\text{V}_{pp}/\text{min}$ bis zu einem Endwert von 6V_{pp} durchlaufen. Es folgt ein zwanzigminütiges Plateau bei 6V_{pp} und 10Hz . Die entstandenen Riesenvesikel werden anschließend abgelöst. Hierzu werden bei gleicher Spannungsamplitude drei Abschnitte mit kleinerer Frequenz angelegt, 4Hz für 20min , 1Hz für 10min und $0,1\text{Hz}$ ebenfalls für 10min .

5.2.3 Umsetzen der Riesenvesikel

Etwa $0,5\text{ml}$ der in der Saccharoselösung schwimmenden Vesikel werden aus dem Mittelbereich des Objektträgerreservoirs mit einer Kunststoffpipette mit großer Eingangsöffnung vorsichtig abgesaugt und in ein Schälchen mit $2,5\text{ml}$ einer 300mM Glucoselösung gegeben, in der sie sich aufgrund der Dichteunterschiede zwar absetzen, aber nicht anhaften, so daß man sie ohne Probleme in die einzelnen Meßgefäße umsetzen kann. In dieser Konstellation lassen sich die Vesikel mehrere Tage aufbewahren.

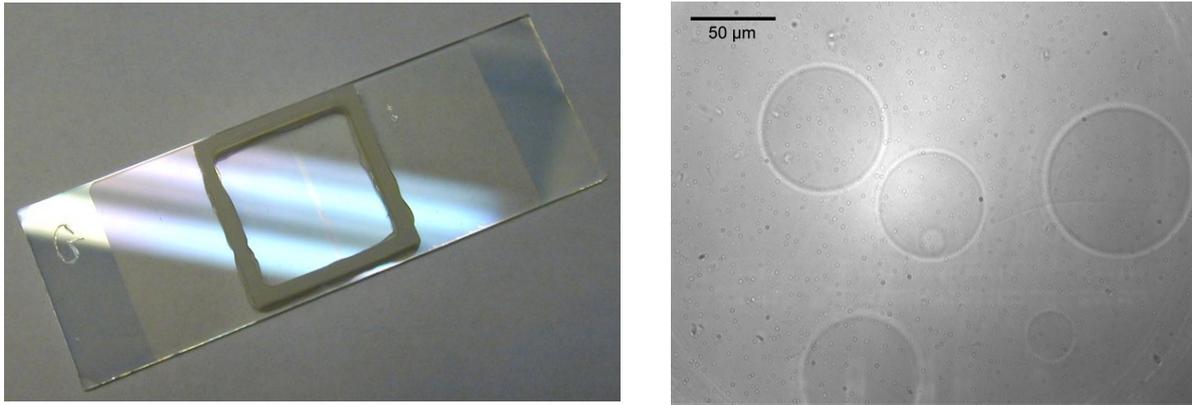


Abbildung 5.2: (links) ITO-Quarz-Objektträger. Für die Herstellung der Riesenvesikel werden Objektträger mit 70nm ITO besputtert. Durch einen dünnen abgedeckten Bereich in der Mitte entstehen zwei getrennte Elektroden. Bis auf die Kontaktflächen an den Objektträgerenden wird 70nm Quarz aufgebracht. Ein aufgeklebter Rahmen dient als Flüssigkeitsreservoir. (rechts) Riesenvesikel in der Kontrastansicht nach dem Umsetzen in ein Schälchen mit Glucoselösung. Durch den Dichteunterschied sinken die Vesikel auf den Boden, adhären aber nicht.

5.2.4 Reinigung und Beschichtung der Deckgläser und Siliziumchips

Als Substrat werden oxidierte Siliziumchips sowie Standarddeckgläser $20\text{mm} \times 20\text{mm}$ mit einer Dicke von $135 - 165\mu\text{m}$ verwendet. Die Reinigung und Weiterverarbeitung der Siliziumchips erfolgt im abteilungseigenen Reinraum. Je nach Einsatzzweck werden in einem Quarzrohrföfen unterschiedliche Oxidationen der Wafer durchgeführt. Für die Messungen an Vesikel werden zwei Oxiddicken mit 200nm und $2,75\mu\text{m}$ erzeugt. Nach der Oxidation wird die eigentliche Enddicke von 100nm und $2,73\mu\text{m}$ erst nach einem Ätzprozeß in Flußsäure erreicht, da dadurch die Oberflächenbeschaffenheit der Chips mit der für FLIC-Messungen übereinstimmt. Die Siliziumwafer werden abschließend nach intensivem Spülen mit Reinstwasser mit einer Diamantsäge auf ein an die Falcon-Schälchen abgestimmtes Maß zerteilt und können darin festgeklemt werden.

Zur Reinigung der Deckgläser und Siliziumchips werden diese in ein Falcon-Schälchen mit einem 35mm -Durchmesser und einer Höhe von 10mm gelegt und mit 60°C heißer alkalischer Detergenzlösung (Tickopur RP100; Bandelin; Berlin) übergossen. Mit einem fusselfreien Reinraumtuch wird die Oberfläche intensiv abgerieben. Der anschließende Spülschritt erfolgt, nach mehrmaligen Austausch der noch heißen Reinigungslösung, mit $\frac{1}{2}$ Liter Reinstwasser. Mit Stickstoff wird das hydrophile Substrat getrocknet.

Die vorbereiteten Substrate werden in ihren Schälchen mit $2,5\text{ml}$ einer $25\mu\text{g}/\text{ml}$ -Lösung von Poly-L-Lysin (M.W. 10 000, P-6516; Sigma; Heidelberg) überdeckt. Nach 1h wird die Flüssigkeit abgegossen und mehrmals mit Reinstwasser und abschließend mit einer der Meßanforderung entsprechenden 300mM Meßlösung gespült, wobei das Substrat nie abtrocknet. Zum Schluß wird $1,5\text{ml}$ Meßlösung in das Schälchen gegeben.

Diese Meßlösungen werden je nach Anforderung leicht modifiziert, so daß insgesamt drei Varianten Ver-

wendung finden:

- Als Standardlösung wird ein Puffer aus 10mM Tris/HCl pH 7,4 mit Glucose auf eine letztendlich 300mM Meßlösung erweitert.
- Die Lösung für elektrische Messungen enthält neben dem Puffer 10mM Tris/HCl pH 7,4 noch zusätzlich 40mM NaCl, bevor sie mit Glucose auf insgesamt 300mM erweitert wird.
- Für die pH -Variation bei der LAH₄-Proteinmessung wird anstatt des Tris-Puffers ein Acetat-Puffer für die Einstellung des pH 5,0 verwendet. 100ml einer 1N -Essigsäure werden mit $70,5\text{ml}$ 1N -Natronlauge gemischt und mit Reinstwasser auf 500ml aufgefüllt.

Diese Varianten beeinflussen die gefundenen Abstände für die starke Adhäsion der Riesenvesikel kaum [76] und das gefundene Diffusionsverhalten der Membransonden sollte ebenfalls nicht durch diesen Parameter verändert werden.

5.3 Eigenschaften der Riesenvesikel

Die Eigenschaften der gewonnenen Riesenvesikel wurden bezüglich ihrer geometrischen und elektrischen Adhäsionseigenschaften in einer Gemeinschaftsarbeit [20] charakterisiert. Günther Zeck führte dabei die Abstandsmessungen durch und Volker Kießling die elektrischen Messungen auf Feldeffekttransistoren. Eine erste Diffusionsuntersuchung mittels FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) wurde ebenfalls durchgeführt.

5.3.1 Kontaktbeschreibung (Adhäsion)

Die Riesenvesikel sedimentieren aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Zuckerlösungen. Durch die Substratbeschichtung mit Poly-L-Lysin wird eine Haftbedingung zur starken Adhäsion vorgegeben, wobei eine große Kontaktfläche entsteht und sich ein Membran-Substratabstand $< 2\text{nm}$ einstellt. Als starke Adhäsion wird dabei das Minimum der Gesamtenergie direkt vor der sterischen Abstoßung bezeichnet[76][50]. Die dabei auftretenden Potentiale werden dominiert durch die elektrostatische Anziehung. Die Gravitation liefert nur einen kleinen Beitrag zur Energiebilanz. Die abstoßende Wirkung der Fluktuations- und Krümmungsenergie bedingen je nach Vorgaben ein zweites Potentialminimum bei etwa 50nm Membran-Substratabstand[75].

Mit einem Laser-Scan-Mikroskop (FluoView BX50WI; Olympus) läßt sich die Form der haftenden Vesikel bestimmen (Abb. 5.3). Hilfreich sind bei der Charakterisierung vor allem die dargestellten optischen Schnitte, d.h. die Rasterung des Vesikels in vorgegebenen Ebenen.

Riesenvesikel in der gewählten Konfiguration adhäreren mit großer Kontaktfläche!

Mit Fluoreszenz-Interferenzkontrast-Mikroskopie (FLIC) läßt sich der Abstand der Membran zur Substratoberfläche sehr genau bestimmen [34][8]. Die Methodik beruht auf dem Effekt der *Stehenden Wellen* vor einem reflektierenden Substrat. Da bei der Fluoreszenz das anregende und das emittierte Licht diesem

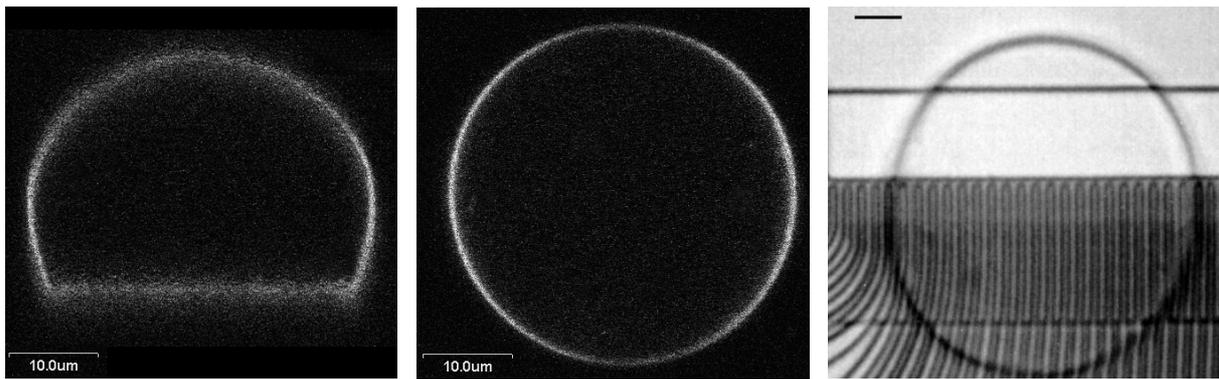


Abbildung 5.3: Formbestimmung der haftenden Riesenvesikel. **(links)** XZ-Schnitt eines Riesenvesikels aus POPC:DOPME:SRh-GramC 500 : 5 : 1, aufgenommen mit einem Laser-Scan-Mikroskop. Die Kontaktfläche, in diesem Fall auf einem Deckglas, ist im unteren Bereich gut zu erkennen. **(mitte)** XY-Schnitt des gleichen Vesikels an seiner breitesten Stelle. **(rechts)** Positioniertes Riesenvesikel auf einer linearen Anordnung von Feldeffekt-Transistoren in Kontrastbetrachtung. Von unten sind die einzelnen Drain-Zuleitungen zu erkennen. Der Balken entspricht jeweils $10\mu\text{m}$.

Effekt unterworfen sind, entsteht eine Art Schwebung der Wellen. Durch unterschiedliche durchsichtige Abstandshalter definierter Höhe ergeben sich mehrere Stützpunkte dieser resultierenden Funktion.

In der Praxis wird ein oxidiertes Siliziumchip zur Messung eingesetzt, dessen durchsichtiges Oxid durch mehrere Lithographie- und Ätzschritte in Karos unterschiedlicher Dicke unterteilt ist (Abb. 5.4 links). Das Probenschichtsystem aus Silizium-Siliziumoxid-Wasserschicht-Membran-Wasser wird jeweils durch geometrische und wellenlängenabhängige Kenngrößen beschrieben, wobei die Membran als Matrix für die Fluoreszenzfarbstoffe in ihrer relativen Lage zum Substrat als sehr empfindlicher und damit sehr exakt bestimmbarer Parameter in die Berechnung eingeht. Bei der aufwendigen Funktionsberechnung werden neben dieser Probenbeschreibung die spektralen wie auch die geometrischen Parameter des Meßaufbaus, im wesentlichen von Lichtquelle, Filtersatz, Objektiv und Halbleiterkamera, berücksichtigt.

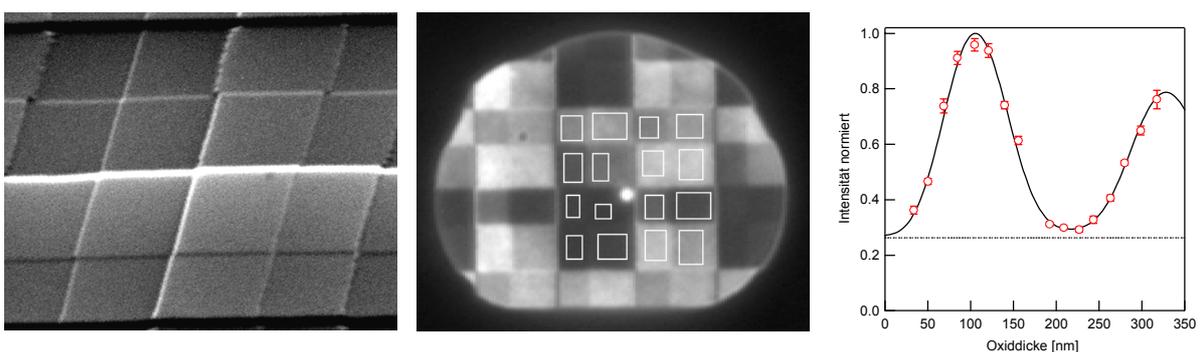


Abbildung 5.4: Abstandsmessung mittels Fluoreszenz-Interferenzkontrast (FLIC). **(links)** Elektronenmikroskopaufnahme eines 16-Oxid-Siliziumchips mit Karogröße $2,5\mu\text{m} \times 2,5\mu\text{m}$. **(mitte)** Kontaktmembran eines Riesenvesikels auf einem 16-Oxid-Chip mit eingezeichneten Intensitätsauswahlbereichen. **(rechts)** Über der jeweiligen Oxiddicke aufgetragene Fluoreszenz-Intensitätswerte und die ermittelte Fitfunktion.

Für die Abstandsbestimmung wird ein Bild der Membran aufgenommen. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten (Abb. 5.4 mitte) kann über eine Zuordnung der Helligkeitswerte zu den ellipsoidisch bestimmten Oxiddicken die Höhe der Wasserschicht zwischen Membran und Substrat gefittet werden (Abb. 5.4 rechts).

Für die Vesikelabstandsbestimmung [76] wird ein Lipid-Farbstoffverhältnis POPC:DOPME:DiIC₁₈ von 200 : 2 : 1 verwendet. Die zusätzliche Beigabe von 40mM NaCl bei der Herstellung der Glucoselösung beeinflusst die gefundenen Abstände nicht und es ergibt sich ein Abstand der unteren Vesikelmembran zum Poly-L-Lysin beschichteten Siliziumoxid-Substrat von $d_{\text{Wasser}} = 1,1 \pm 0,2 \text{ nm}$ als Mittelwert von 30 Messungen. Derartig nah am Substrat anliegende Membranen sind Kennzeichen für die starke Adhäsion, die über elektrostatische Wechselwirkungen diese Anhaftung hervorruft.

Riesenvesikel in der gewählten Konfiguration zeigen starke Adhäsion!

5.3.2 Elektrische Eigenschaften als Nachweis der Funktionsfähigkeit

Ein grundsätzliches Problem der elektrischen Untersuchung von gestützten Membranen ist deren mögliche Perforation. Zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften von Membranen werden mit in den Siliziumchip integrierten Feldeffekt-Transistoren (FET) Messungen der ortsabhängigen Übertragungsfunktion durchgeführt [31]. Die Charakterisierung der Riesenvesikel erfolgt mit einem System aus 36 an Transistorverstärker angekoppelte Lock-In-Verstärker [27].

Die Riesenvesikel werden für die Messung einzeln auf der gereinigten und beschichteten Oberfläche des Siliziumchips positioniert. Der Arbeitspunkt der p-Kanal-FETs, Drain-, Source- und Bulk-Potential, wird über die Spannungsversorgung eingestellt. Über eine Silber/Silberchlorid-Elektrode wird eine sinusförmige Modulation des Badpotentials vorgegeben. Aus den verstärkten Source-Drain-Ströme der einzelnen Transistoren werden die entsprechenden Frequenzanteile durch die Lock-Ins gefiltert und als Real- und Imaginärteil ausgegeben. Durch eine Verrechnung mit Referenzmessungen ohne Vesikelbelegung wird der Einfluß der stark adhären Riesenvesikel orts- und frequenzabhängig bestimmt. Aus dem komplexen Verhältnis von gemessener Transistor- und Anregungsspannung ergibt sich die Übertragungsfunktion des Systems.

Für reine Lipidmembranen ergeben sich durch einen Fit der Übertragungsfunktionen bei vorgegebener spezifischen Membrankapazität $c_{JM} = 0,65 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ für den Schichtwiderstand zwischen Vesikel und Substrat $r_J = 130 \pm 20 \text{ G}\Omega$ und als hier besonders hervorzuhebender Wert für die spezifische Membranleitfähigkeit im Kontaktbereich $g_{JM} \leq 1 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}^2}$. Dieser sehr niedrige Wert zeugt von einer intakten Membran im Kontaktbereich.

Die Kontaktmembran der Riesenvesikel ist elektrisch dicht!

Dieses hochohmige Membranverhalten gestattet den Einsatz der Riesenvesikel als ideale Matrix für kanalbildende Proteine. Als typischer Vertreter dieser Gilde wird das Protein des Bacillus Brevis, Gramacidin,

eingesetzt, da es gut untersucht und einfach zu handhaben ist [68]. Es bildet in einem Lipidbilayer für eine Zeit im Sekundenbereich einen leitfähigen Dimer, wobei die N-terminalen Enden einander zugewandt sind (Abb. 5.5)[69].

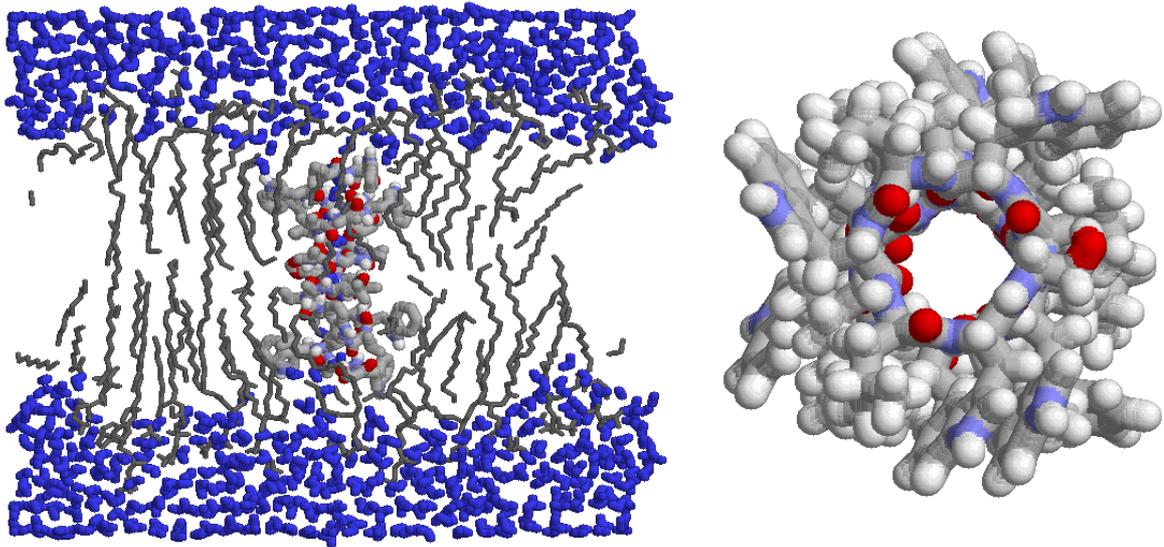


Abbildung 5.5: Gramicidin ist ein Protein des *Bacillus Brevis*. **(links)** Zwei Gramicidin-Moleküle bilden in einem Lipidbilayer für eine Zeit im Sekundenbereich einen Dimer, wobei ihre N-terminalen Enden einander zugewandt sind. Durch die alternierende Anordnung von L- und D- Aminosäuren bildet sich eine rechtsgängige helikale Struktur (β -Helix) mit großem Innendurchmesser von $0,4\text{nm}$. **(rechts)** Der Gramicidin-Dimer bildet eine für monovalente Kationen (z.B. H^+ , Na^+ , K^+) durchlässige und damit leitfähige Pore, wobei der Durchtritt durch die polaren Gruppen des Peptidrückgrats, welche den Kanalbereich auskleiden, begünstigt wird. [Bildquelle: 1MAG].

Besonderes Interesse verdient in dieser Arbeit die Untersuchung der mit Sulforhodamin G markierten Variante des Gramicidin C. Es zeigt sich, daß bei Zugabe des markierten Proteins die Leitfähigkeit der Membran dramatisch zunimmt. Eine Einschränkung der Porenbildung durch die kovalente Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs kann nicht festgestellt werden.

Aus dem Verlauf der ort- und frequenz aufgelösten Messung lassen sich die elektrischen Parameter für diesen Fall bestimmen und bei vorgegebener spezifischer Membrankapazität $c_{JM} = 0,65 \frac{\mu\text{F}}{\text{cm}^2}$ ergeben sich für den Schichtwiderstand zwischen Vesikel und Substrat der Wert $r_J \geq 1\text{G}\Omega$ und für die hier wichtige Membranleitfähigkeit $g_{JM} = 5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2}$. Der gefundene Membranwiderstand liegt für die reine Lipidmembran um einen Faktor 5000 über der mit SRh-GramC dotierten. Durchgeführte Vergleichsmessungen mit unmarkiertem Gramicidin C liefern ähnliche Ergebnisse.

Das für Fluoreszenzmessungen markierte Gramicidin bleibt auch durch den anhaftenden Farbstoff in seiner Funktion intakt und die Kanalbildungsmöglichkeit durch Dimerisierung bleibt bestehen.

Sulforhodamin markiertes Gramicidin C ist in der Membran funktionsfähig!

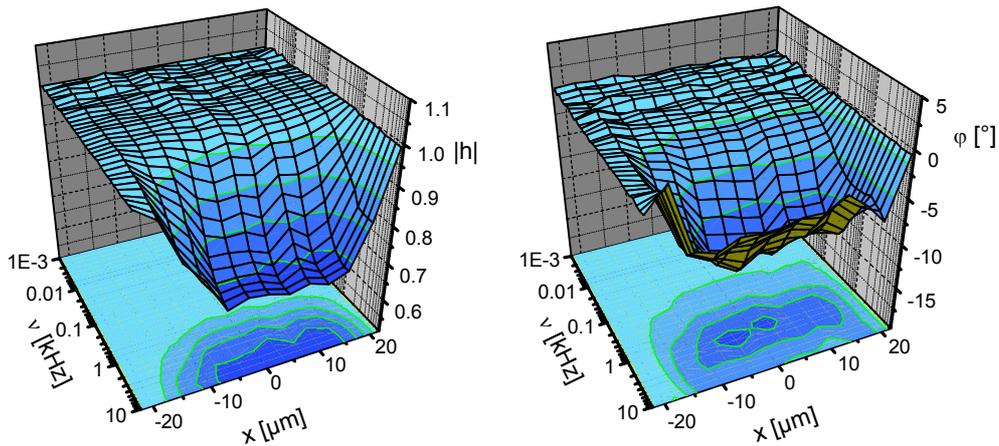


Abbildung 5.6: Ort- und frequenz aufgelöste Messung der Übertragungsfunktion eines Lipidvesikels mit Sulforhodamin markierten Gramicidin C. Das linke Diagramm ist die gemessene Betragsfunktion, das rechte die entsprechende Phase. Gut zu erkennen ist steile örtliche Abfall bei 1200Hz, der im Flächenkontaktmodell[27] Kennzeichen einer großen Membranleitfähigkeit ist. Aus dem örtlichen und frequenzabhängigen Verhalten lassen sich die Membranparameter bestimmen.

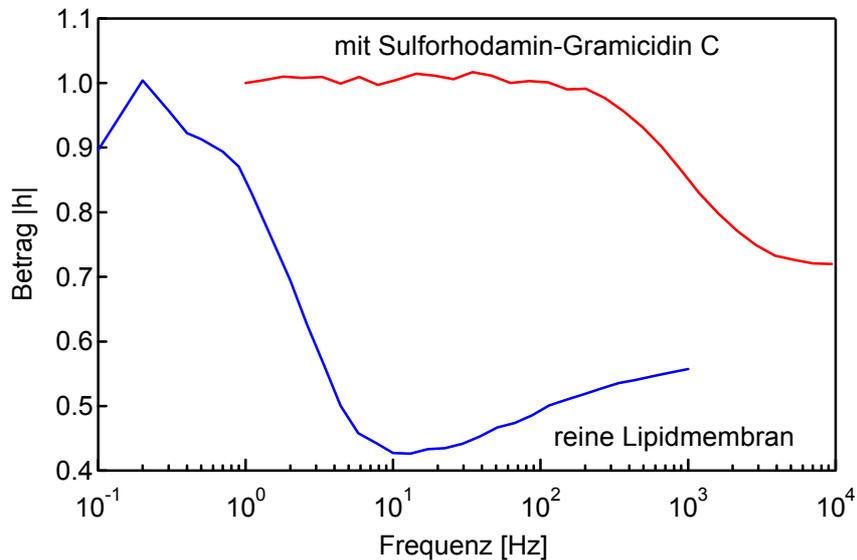


Abbildung 5.7: Vergleich der in der Mitte der Adhäsionsfläche mit den FETs gefundenen Meßwerte. Aufgetragen ist der Betrag der gemessenen Übertragungsfunktionen einer reinen Vesikelmembran und einer mit Sulforhodamin-markierten Gramicidin C dotierten. Bei der reinen Membran fällt die Übertragungsfunktion schon bei sehr niedrigen Frequenzen deutlich ab. Bei hohen Frequenzen dominiert das Verhältnis der Membran- und Oxidkapazitäten den Verlauf. Mit Gramicidin ist der Abfall erst bei Frequenzen ab 1kHz zu beobachten und die Leitfähigkeit der Membran dominiert das Verhalten für kleinere Werte.

5.3.3 Erste Test-Diffusionsmessungen mittels Fluorescence-Recovery-After-Photobleaching (FRAP)

In diesem Abschnitt soll die klassische Methode zur Messung des Diffusionsverhaltens in Membranen kurz vorgestellt werden. Da der eigentliche Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit nicht auf diesem Konzept beruht, werden nur einige wichtige Punkte erläutert und die für das Verständnis der Auswertung notwendigen Abläufe erklärt.

Allgemeines Konzept der FRAP

Fluoreszenz-Recovery-After-Photobleaching (FRAP) in seinen unterschiedlichen Spielarten stellt ein leistungsfähiges Konzept zur Messung der Diffusion von fluoreszierenden Molekülpopulationen in bevorzugt zweidimensionalen Systemen dar. So findet sie gerade in der Untersuchung von Membranen und Polymeren ihre Anwendung. Das generelle Konzept des Meßvorgangs besteht aus einer Bleichphase (Photobleaching), in welcher ein definierter Anteil der Moleküle gezielt zerstört wird, und einer Beobachtungsphase, in welcher die Regeneration der Fluoreszenz in diesem Bereich gemessen wird (Fluorescence-Recovery). Diese Regeneration erfolgt durch eine diffusive Zuwanderung an unzerstörten Farbstoffen, weshalb oft auch Fluorescence-Redistribution als Deutung der Abkürzung angeführt wird. In der ursprünglichen Variante[3] wird für das Bleichen ein intensiver fokussierter Laserstrahl verwendet, der in seiner abgeschwächten Form in der Beobachtungsphase zur Anregung der nichtzerstörten, beweglichen Fluoreszenzmoleküle eingesetzt wird. Als Detektoren kommen hier empfindliche Photodetektoren (Photomultiplier) ohne Ortsauflösung zum Einsatz. Erste Ansätze zur ortsaufgelösten Messung wurden in der FRAPP (Fluorescence Recovery After Pattern Photobleaching) mittels eines Ausbleichmusters und eines fotokameraähnlichen Mikroskopanbaus unter Verwendung eines hochempfindlichen Films realisiert [60]. Weitere Varianten sind die Microphotolysis [46] und inzwischen auch die konfokale FRAP.

Warum FRAP?

Die hier vorgestellte Methode der FRAP mittels Halbleiterkamera gestattet ein anschauliches und gut überprüfbares Vorgehen bei der Beurteilung des Diffusionsverhaltens in Membranen. Der Farbstoff wird in "sichtbaren" Mengen eingesetzt, so daß eine visuelle Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop ohne lichtverstärkende Elemente möglich ist. Ein Vorteil in der Entwicklungsphase der Methodik ist, daß auch geplatze Membranen gut sichtbar und damit gut zu untersuchen sind. Ein weiterer Aspekt ist die einfache Interpretation der Ergebnisse, da die Skalierung der Kameraabbildung unabhängig überprüft werden kann. Nachteile sind durch die starre Zeitskalierung der hier vorgestellten Variante gegeben und den damit verbundenen engen Rahmen, in dem eine effektive Unterscheidung zwischen "Immobilier Phase", "Anomaler Diffusion" und "Mehrkomponentenanalyse" nicht möglich ist.

FRAP-Messung mittels Halbleitervideokamera

Für die FRAP-Messungen werden die gleichen Mikroskopkomponenten, wie im Abschnitt 4 beschrieben, verwendet, allerdings in ihrer vom Hersteller optimierten Beobachtungskonfiguration. Ein wesentlicher Unterschied besteht in dem für Laseranregung nicht optimal geeigneten Anregungslinsensystem, welches

für die FCS-Messungen entfernt wird. Die Detektion erfolgt mit der beschriebenen CCD-Kamera mit Langzeitbelichtungsoption.

In der Fluoreszenzbetrachtung wird unter Verwendung eines Wasserimmersionsobjektives Zeiss x63/0,9W eine geeignete Stelle der Vesikelmembran gesucht. Dazu wird die Probe mit dem Licht der Xenon-Lampe über einen Bandpaß 480 – 520nm beleuchtet. In dem Detektionsarm passiert das Fluoreszenzlicht des Lipid-Farbstoffs DiI₁₈ den dichroitischen Strahlteiler und den emissionsseitigen Bandpaß. Nach der Auswahl des Membranbereiches wird die Videoaufzeichnung initialisiert. Die Halbleiter-Kamera liefert in einem speziellen Langzeitbelichtungsmodus alle 320ms ein Halbbild mit 744 × 288 Bildpunkten an die Framegrabber-Meßkarte und wird von dort in echtzeit im Computer abgelegt. So wird bei jeder Messung automatisch ein Referenzbild aufgenommen. Durch Umschwenken eines Spiegels wird auf die Belichtung durch das Laserlicht umgestellt und ein Teilbereich der Farbstoffe lokal ausgebleicht. Das Ausbleichen erfolgt bei einer Wellenlänge von 514,5nm und einer geregelten Laserleistung von 500mW. Direkt vor dem Objektiv ergibt sich durch Verluste bei der Glasfaser-Einkopplung eine effektive Bleach-Leistung von 15 – 100mW. Nach fünf Sekunden wird der Spiegel wieder auf die Xenon-Beleuchtung zurückgeschwenkt und die Videoaufzeichnung nach weiteren 30 Sekunden beendet. Die genannten Zeiten sind veränderlich und können je nach Probe variieren.

Für die Auswertung wird aus dem entstanden "Videofilm" zunächst eine örtliche und zeitliche Vorauswahl getroffen und dieser reduzierte Datensatz anschließend durch den entsprechenden Ausschnitt des Referenzbildes geteilt ($F(t)/F_o$). Das erste Bild nach dem Ausbleichen wird zur Bestimmung des Bleichzentrums verwendet. Dies geschieht durch mehrmals durchgeführte horizontale und vertikale Iterationen eines Gauß-Funktionsfits. Um das gefundene Zentrum herum werden alle korrigierten Bilder kreisförmig gemittelt und es ergibt sich eine vom Radius r abhängige Funktion $f(r, t) = (F(t)/F_o)[r]$. Deren Parameter können durch einen weiteren Fit mit der Funktion

$$f(r, t) = f_o(t) \cdot e^{-\frac{r^2}{2\sigma^2(t)}}$$

bestimmt werden. Durch den Zusammenhang $\sigma^2(t) = 2D_\alpha t^\alpha + \sigma_{t=0}^2$ läßt sich die Diffusionskonstante des Farbstoffs in der Membran bei normaler Diffusion ($\alpha = 1$) durch eine Lineare Regression der Daten finden. Für anomale Diffusion lassen sich die Parameter über einen nichtlinearen Levenberg-Marquardt-Fit ermitteln, wobei als Startparameter das Ergebnis des linearen Fits verwendet wird.

Kleine Diskussion der Theorie

Die in Abschnitt 2 vorgestellte Lösung der Diffusion bei einem δ -Anfangswertproblem in zwei Dimensionen bei radialer Symmetrie dient als Greensche Funktion für modifizierte Startbedingungen. So kann durch Integration das angenähert gaußförmige Ausbleichen des Lasers berücksichtigt werden.

$$I(\mathbf{r}) = \frac{1}{\pi w^2} e^{-\left(\frac{r^2}{w^2}\right)}$$

$$c_{\text{gauss}}(\mathbf{r}, t) = \iint_{\mathbb{R}^2} \frac{1}{\pi w^2} e^{-\left(\frac{r'^2}{w^2}\right)} \frac{1}{\pi 4D_\alpha t^\alpha} e^{-\left(\frac{(r-r')^2}{4D_\alpha t^\alpha}\right)} d^2 r' = \frac{1}{\pi (4D_\alpha t^\alpha + w^2)} e^{-\left(\frac{r^2}{4D_\alpha t^\alpha + w^2}\right)}$$

Der Laserstrahl mit vorgegebene Startbreite w bewirkt bei der Bewertung der zeitabhängigen Gaußbreiten

einen zusätzlichen Offset. Auf die Integration über das vorgegebene Zeitintervall des Ausbleichens kann verzichtet werden, wenn die zuerst detektierte Farbstoffverteilung nach dem Bleichprozeß sich gut durch ein Gaußprofil beschreiben läßt. Dies ist bei der hier verwendeten Anordnung der Fall. Problematisch bei der bildgebenden FRAP-Analyse, ist die Größe des beobachteten Membranbereichs. Um Effekte durch den Membranrand auszuschließen wird der Beobachtungszeitraum bei gegebener Diffusionskonstante an die Fläche der Kontaktmembran mit Radius R_{Membran} angepaßt. Es gilt stets $4Dt_{\text{max}} < R_{\text{Membran}}^2$. Durch die Größe der vermessenen Kontaktfläche wird diese Ungleichung um einen Faktor 4 – 7 überboten. Die Analyse der Amplituden ist stärker dem Effekt des Ausbleichens während der Detektion unterworfen, weshalb auf sie verzichtet wird.

Ergebnis und Diskussion

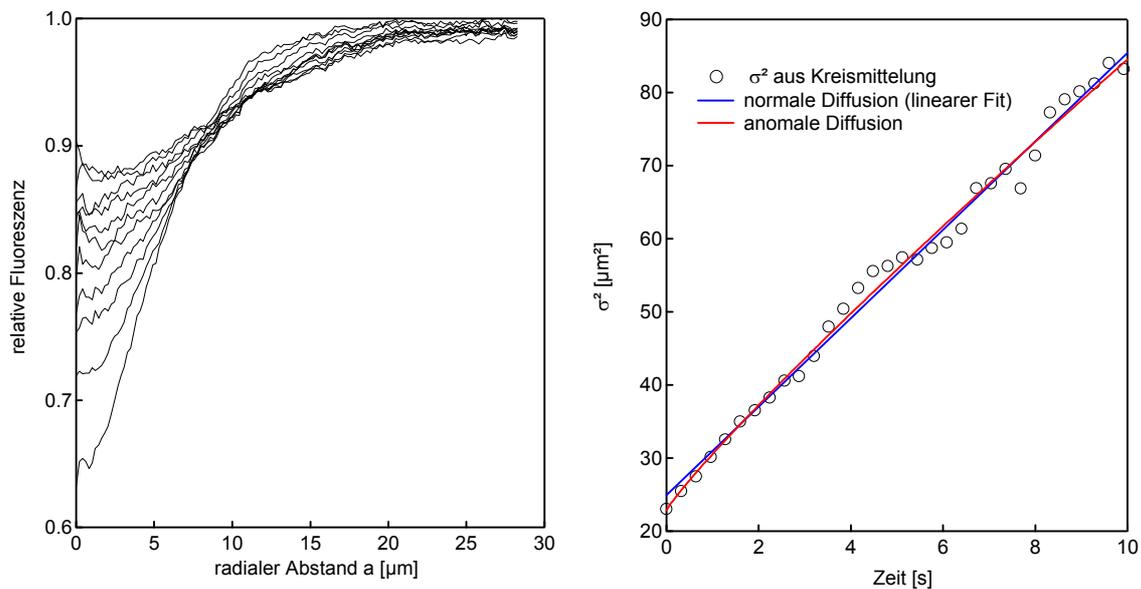


Abbildung 5.8: FRAP-Messung an einer mit DiIC_{18} angefärbten Vesikelmembran auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Chip mit 100nm Oxiddicke. Nach dem Ausbleichen werden im Abstand von 320ms Einzelbilder aufgenommen. **(links)** Nach einer Kreismittlung erhält man für jeden Zeitschritt Daten, hier gezeigt im Abstand von $0,96\text{s}$, an die eine Gaußfunktion angefitet werden kann. **(rechts)** Die typischen Breiten der Gaußfunktion σ , quadratisch aufgetragen über die Zeit, ergeben in erster Näherung eine Gerade $\sigma^2(t) = 2Dt + \sigma_{t=0}^2$, aus deren Steigung die Diffusionskonstante D ermittelt werden kann (hier $D = 3,03 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$). Bei entsprechender Auswertung mit der Funktion für anomale Diffusion $\sigma^2(t) = 2D_\alpha t^\alpha + \sigma_{t=0}^2$ ergibt sich das Wertepaar $D_\alpha = 3,84 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha}$ und $\alpha = 0,90$.

Die vorgestellte Methode zur Bestimmung der Diffusionskonstante mittels FRAP-Messung liefert einen ersten Anhaltspunkt zur Größenordnung der bei starker Adhäsion von Membranen zu erwartenden Werte. Die untersuchten Membranen sind bei der Entstehung ausschließlich mit DiIC_{18} angefärbt und auf Poly-L-Lysin beschichteten Siliziumchips mit 100nm Oxiddicke vermessen. Als Lipidverhältnis wird $\text{POPC}:\text{DOPME}:\text{DiIC}_{18}$ $200 : 2 : 1$ gewählt. Die Membran ist dadurch sehr gut in Fluoreszenz zu beobachten und verändert ihre Ladung nur geringfügig.

Der Lipid-Farbstoff ist in der Kontaktmembran mobil!

Nach der Ausbleichphase ist eine schnelle Regeneration der Fluoreszenz zu beobachten und die Analyse der entstandenen CCD-Bilder ergibt nach radialer Mittelung und Fit mit einer Gaußfunktion eine Verbreiterung bei gleichzeitiger Abnahme der Amplitude (Abb. 5.8). Die Auftragung der ermittelten quadratischen Breiten über die Zeit ergibt auf den ersten Blick ein lineares Verhalten. Über eine Steigungsanalyse mittels Linearer Regression läßt sich hieraus die Diffusionskonstante $D \approx 3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bestimmen. Der aufwendigere Fit der Daten mit dem Modell der *Anomalen Diffusion* liefert ein Beweglichkeitswertepaar (Tab. 5.1), dessen Exponent $\alpha \approx 0,9$ Abweichungen vom normalen Diffusionsmodell erkennen läßt.

| | Normale Diffusion | | Anomale Diffusion |
|---|------------------------|---|------------------------|
| $D \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$ | $2,93 \pm 0,32$ $n=19$ | $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ | $3,77 \pm 0,49$ |
| | | α | $0,89 \pm 0,07$ $n=19$ |

Tabelle 5.1: FRAP-Diffusionsanalyse an der Kontaktmembran für DiIC₁₈. Die Zahl der Einzelmessungen n ist mit angegeben.

Diese Meßmethode ist gekennzeichnet durch die eingeschränkte Dynamik der äquidistanten Zeitschritte der Videoaufzeichnung und dient für eine erste Abschätzung der Membrandiffusion. Andere FRAP-Methoden, die nicht auf Kameradetektion aufbauen, liefern deutlich ausgefeiltere Ansätze, sind aber nicht so anschaulich und werden zunehmend von moderneren Methoden der Dynamikanalyse wie der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie abgelöst.

Kapitel 6

FCS-Charakterisierung und Durchführung

Vor der eigentlichen Verwendung des Meßaufbaus zur Bestimmung des Diffusionsverhaltens in Lipidmembranen muß dieser mit Hilfe von Standardmessungen überprüft werden. Dies geschieht durch Messungen von Farbstoff in wäßriger Lösung bzw. durch eine Dispersion von Latexkugeln mit 20nm Durchmesser, die mit mehreren Farbstoffen markiert sind.

Ebenfalls wird in der Meßkonfiguration das Verhalten der Lipidmembranen untersucht. Die deutlich reduzierte Fluoreszenzpartikelzahl, etwa ein Faktor 500 weniger als bei den FLIC- und LSM-Messungen, läßt eine stichprobenartige Überprüfung sinnvoll erscheinen.

6.1 Warum FCS?

Die physikalische Basis beruht auf dem Effekt der Fluktuationsanalyse. Was bedeutet, daß (quasi-)statische Prozesse nicht berücksichtigt werden. Dies betrifft vor allem den Themenkreis um die "Immobilfraktion", der im Umfeld der FRAP-Anwendungen sehr oft verwendet wird. Bei einer Anordnung von fixiertem Farbstoff, als Beispiel seien hier mit Fluoreszenzfarbstoff getränkte Polyacrylamid-Gele zu nennen[31], kann das Ausbleichverhalten an großen Farbstoffmengen aufgrund der Zählrate bestimmt werden. Bei Einzelmolekülexperimenten ist dieser Mengeneffekt jedoch sinnlos. Gerade die Fluktuationsanalyse bei kleinen Farbstoffkonzentrationen beinhaltet aber das weitaus mächtigere Hilfsmittel des Partikelzählens. Fluktuationen werden bezüglich des Hintergrunds bewertet und so kann durch den Vergleich der Gesamtzählrate zu der Zählrate des mittleren Einzelmoleküleffekts die Zahl der gleichzeitig beobachteten Partikel bestimmt werden. Durch den Einsatz von wesentlich geringeren Konzentrationen an Farbstoffsonden wird das zu beobachtende System weniger beeinflusst, was gerade bei Membranmessungen einen Vorteil darstellt. Der Vergleich mit der FRAP macht in zwei weiteren Punkten den Fortschritt deutlich. Die Zerstörung des Farbstoffs ist nicht Teil der Meßmethodik und kann durch empfindliche Detektion großteils vermieden werden. Das sehr lokal wirkende Meßsystem gestattet eine ortsaufgelöste Betrachtung in zwei- und dreidimensionalen Meßproben.

Ein wichtiger Aspekt bei der Beurteilung des Meßvorteils der FCS stellt die Beobachtung der Fluoreszenzfluktuationen auf einer logarithmischen Zeitskala dar. Mehrere wichtige Zeitabschnitte können gleichzeitig

aufgenommen, aber doch getrennt werden. Ebenso werden Effekte, die über den gesamten Zeitbereich wirken, wie die später dargestellte *Anomale Diffusion*, einfacher erkennbar.

6.2 Freier Farbstoff in wässriger Lösung

Die Standardanwendung der FCS ist die Diffusionsbestimmung von Fluoreszenzfarbstoffen in wässrigen Lösungen. Diese Art der Messung dient umgekehrt zur Überprüfung des Meßaufbaus und zur Justage der optischen Komponenten. Bei gängigen Konzentrationen des Fluoreszenzfarbstoffs im nanomolaren Bereich sind im Mittel einzelne Moleküle in der Fokuszone, die durch die hohe Empfindlichkeit der Detektion als fluktuierendes Signal zwar dem Korrelator zugeführt werden, aber nur selten durch Spezialhardware einer Visualisierung bedürfen. Die spezielle Bahn im Fokus wäre erst bei einer bildgebenden Detektion interessant, die als Schwachpunkt aber derzeit nur eine schlechte Zeitauflösung und Empfindlichkeit bietet. Die eingesetzte Korrelatorkarte gestattet das Auslesen eines Zählratenregisters, welches maximal 16 mal pro Sekunde seinen Wert ändert und später für den Einsatz als "Slowest"-Laser-Scan-Mikroskop verwendet wird. Zusätzlich wird ein Zählratenfeld an die Meßsoftware übergeben, welches die Gesamtmeßzeit in 255 Werten protokolliert (Abb. 6.1). Bei einer normalen Messung dient die Zählrate zur Kontrolle, ob starke Einzelpulse durch Farbstoffklumpen die Korrelationsdaten beeinflussen.

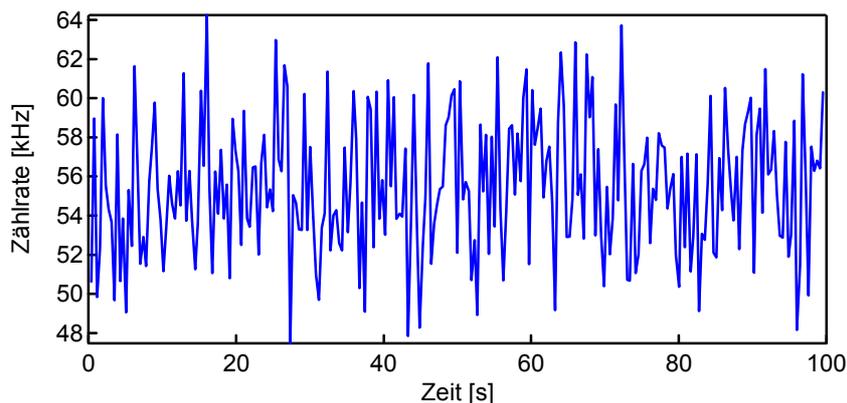
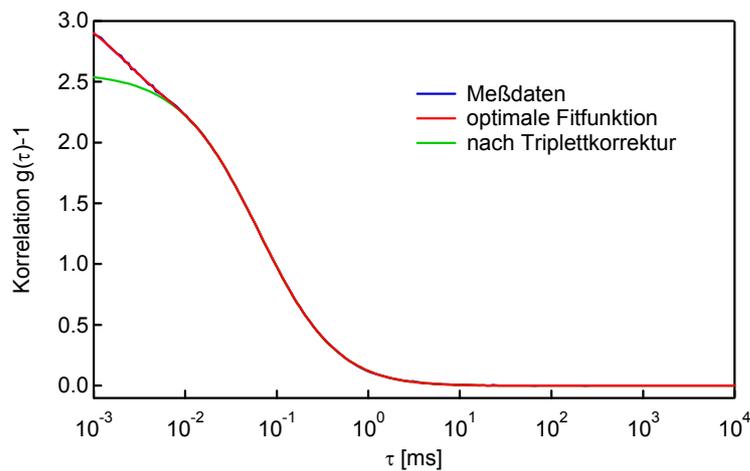


Abbildung 6.1: Zählrate einer Messung an Rhodamin 6G mit dem Zeiss x63/0,9W Objektiv bei einer Anregungsleistung von $150\mu W$. Bei einer Standardmessung sind in der Zählrate keine einzelnen Signalkaskaden zu sehen, sondern nur ein stark variierendes Gesamtsignal. Bei der mittleren Zahl von Partikeln im Fokusbereich von 0,23 ergibt sich eine mittlere Zählrate pro Partikel von 240kHz. Die zugehörigen Korrelationsmeßdaten sind in Abbildung 6.2 dargestellt.

Bereits während der Messung kann die Korrelationsfunktion beobachtet werden. Schon nach kürzester Zeit ist die typische Form zu erkennen (Abb. 4.9), die sich mit zunehmender Zahl der detektierten Fokusburchtritte von Farbstoffmolekülen noch glättet.

Nach erfolgter Messung werden die Daten mit der Formel 4.1 ausgewertet, wobei für die dreidimensionale



Rhodamin 6G
[Zeiss x63/0.9W bei 150μW]

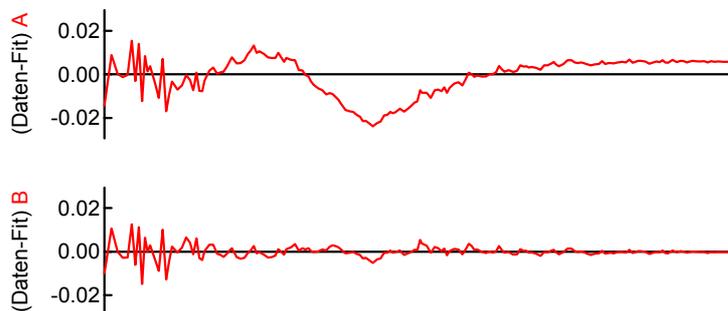
Fokusradius 0,27 μm

Partikelzahl im Fokus ca. 0,23

Mittlere Zählrate 55 kHz

Triplettanteil

$\tau_{\text{triplett}} = 0,002 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,20$



(Daten-Fit) bei $k=0$ fix

$\tau_{\text{diff1}} = 0,060 \text{ ms}$

(Daten-Fit) bei k variabel

$\tau_{\text{diff1}} = 0,064 \text{ ms}$
 $k = 0,039$

Abbildung 6.2: Korrelationsdaten einer Messung an Rhodamin 6G mit dem Zeiss x63/0,9W Objektiv bei einer Anregungsleistung von 150μW. **(oben)** Meßdaten und deren Fit stimmen exakt überein. Nach Korrektur des Triplettanteils wird dessen Auswirkung auf den Bereich bei kleinen Zeiten $< 10^{-2}ms$ deutlich. **(mitte A)** Bei fest vorgegebenem Formfaktor des Fokus $k = 0$ treten deutliche Abweichungen zwischen Daten und Fitfunktion auf. **(unten B)** Mit variablem Formfaktor k stimmen Daten und Fitfunktion sehr gut überein und zeigen keine funktionalen Abweichungen. Für das Verhältnis der Fokusbreite zu dessen z-Ausdehnung folgt $z_o \approx 5,06 \cdot 0,27\mu m \approx 1,37\mu m$. Die zugehörigen Zählratendaten sind in Abbildung 6.1 dargestellt.

Diffusion in Lösung der verkürzte Term Verwendung findet.

$$G(\tau) - 1 = G_1 + G_0 \left[1 - T_{\text{eq}} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}} \right) \right] \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff1}}} \right)} \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{\text{diff1}}}}}$$

In Abbildung 6.2 sind die Daten einer Messung von Rhodamin 6G in Wasser mit dem Zeiss x63/0,9W Objektiv dargestellt. Die eigentlichen Meßdaten und der Fit sind in der normalen Auftragung kaum zu unterscheiden und so werden separat die Abweichungen (Daten-Fit) in eigenen Diagrammen berücksichtigt. Zur Demonstration des Triplett-Anteils ist in der obersten Abbildung ebenfalls der durch den Fit bestimmte Anteil T_{eq} herausgerechnet, so daß dessen bei kleinen Zeiten $< 10^{-2}ms$ maßgeblicher Einfluß deutlich wird. Oberhalb dieses Bereiches sind die Auswirkungen der eigentlichen Diffusion zu beobachten, die den Parameterfit der Diffusionszeit τ_{diff1} bestimmen. In einem, wie hier vorgestellt, klar definierten System läßt sich darüber hinaus das Fokusmodell überprüfen. Ein einfaches Zylindermodell mit $k = 0$ liefert einen deutlichen funktionalen Verlauf der Abweichungen (Abb. 6.2 mitte). Läßt man den Formfaktor k ebenfalls bei dem Fit variabel, so verschwindet dieser Abweichungsverlauf und der hier gefundene Wert

$k = 0,039$ spiegelt die in z-Richtung fünffach vergrößerte Fokusachse wider. Die weiteren Werte liefern die mittlere Zahl von Partikeln in der Fokuszone $N = \frac{1}{G_o} \frac{4}{3\sqrt{\pi}} \approx 0,233$ und die Diffusionskonstante $D = \frac{\omega_o^2}{4 \cdot \tau_{diff1}} = \frac{(0,27\mu m)^2}{4 \cdot 64\mu s} \approx 285 \frac{\mu m^2}{s}$. Aus der Fokus-Teilchenzahl läßt sich die mittlere Teilchendichte berechnen $\bar{C} = \frac{N}{V} = \frac{N}{\frac{4}{3}\pi\omega_o^2 z_o} \approx 0,57 \frac{\text{Partikel}}{\mu m^3}$; dies entspricht einer Konzentration des Farbstoffs von $\bar{C}_{Mol} = 0,57 \frac{10^{15}}{N_A \cdot l} = 0,95 \frac{nMol}{l}$.

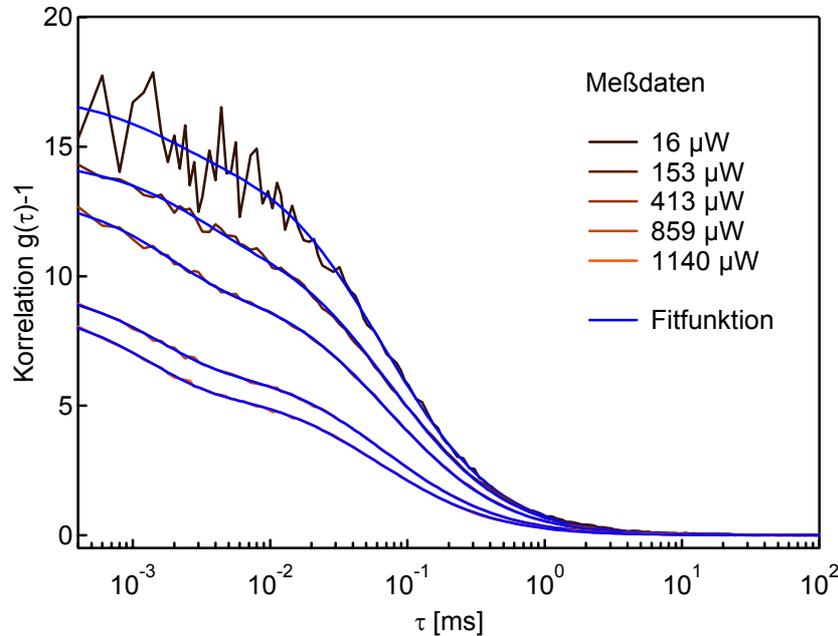


Abbildung 6.3: Variation der Anregungsleistung bei einer Rh6G-Probe, gemessen mit dem Zeiss x63/1,2W Objektiv. Der mit der Leistung zunehmende Triplett-Anteil beeinflusst die Korrelationsfunktion, kann aber durch den Fit beschrieben werden. Gleichzeitig nimmt aber auch das Hintergrundsignal zu und variiert zusätzlich die scheinbare Partikelzahl. Mit zunehmender Zählrate pro Partikel nimmt das verbleibende Rauschen der Daten ab.

Eine rein qualitative Betrachtung der Auswirkung der Anregungsleistung ist in Abbildung 6.3 zu sehen. Bei Erhöhung der Lichtleistung ist eine Verformung der Korrelationskurve zu beobachten, die durch einen steigenden Triplett-Anteil beschrieben werden kann. Durch das ebenfalls erhöhte Hintergrundsignal wird die scheinbare Partikelzahl ebenfalls beeinflusst. Bei stärkerer Anregung der Farbstoffe wird das Rauschen der Korrelationsdaten verringert. Bei starken Anregungen stimmt der Fit mit den gemessenen Daten nicht mehr exakt überein, für den normalen Meßbereich stellt dies kein Problem dar. Die Abweichungen stammen vermutlich durch das nicht gaußförmige Anregungsvolumen. Entlang der optischen Achse erfährt der Farbstoff schon bevor er das Detektionsvolumen erreicht eine starke Anregung, die über Triplettbeeinträchtigungen sich auf die Detektierbarkeit im Fokusvolumen auswirken.

Die Messungen in Long-Distance-Konfiguration, d.h. mit einem Arbeitsabstand von 12mm zwischen Objektiv und Probe, sind durch die kleinere Apertur weniger empfindlich und für eine gleiche Zählrate pro Partikel werden höhere Laserleistungen eingesetzt. Durch die Vorgaben des Objektivs ist der Anregungslaserstrahl nicht im gleichen Maße fokussierbar und es werden $1/e^2$ -Fokusradien von 0,5–0,7μm eingesetzt.

Neben diesen Änderungen sind durch das Schichtsystem Luft-Deckglas-Wasser auch die Beeinflussung des Radius durch die Eindringtiefe des fokussierten Strahls in die Probe zu beachten (Abb. 6.4).

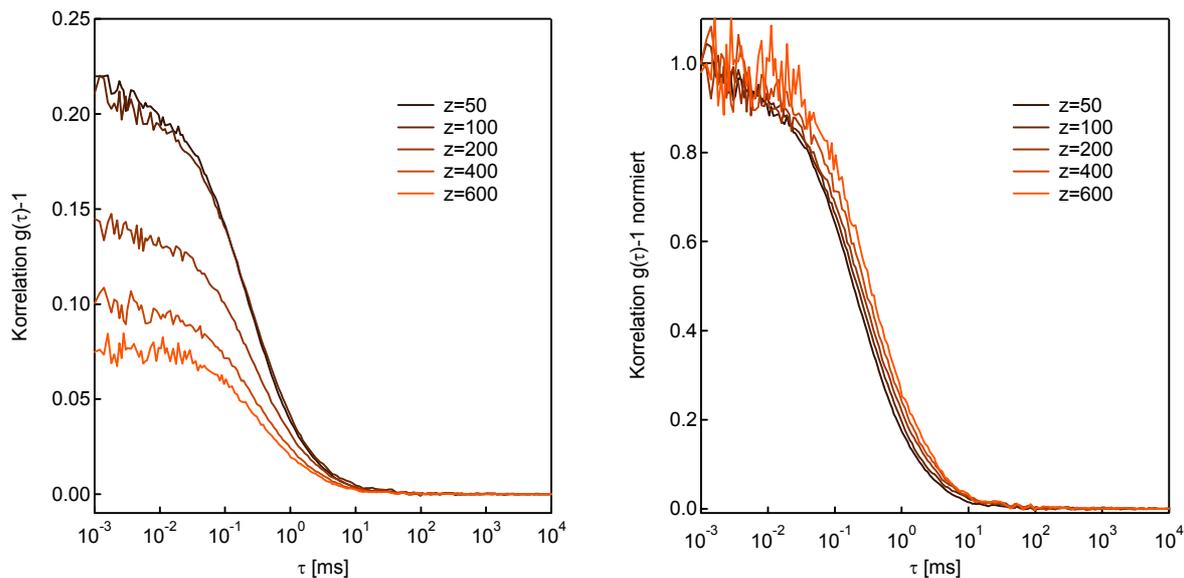


Abbildung 6.4: Long-Distance-Messungen in verschiedenen Rh6G-Probentiefen. Die Position $z = 0$ entspricht der probenzugewandten Seite eines extra dünnen Deckglases mit $80\mu\text{m}$ Dicke. Die Positionsangaben zeigen den vorgegebenen Ort an, nicht den des Fokus. Die 1mm entfernte Probenwand wird schon bei einer Position von $z = 730\mu\text{m}$ erreicht, da die relative Fokusverschiebung mit der Wasserschichtdicke zunimmt. (links) Die Meßdaten für verschiedene Positionen in der Probe zeigen eine starke Ortsabhängigkeit und eine veränderliche Partikelzahl. (rechts) Der ermittelte Fokusradius und das gesamte Volumen verändern sich durch die unterschiedliche Eindringtiefe.

Long-Distance-Messungen zeigen eine Ortsabhängigkeit!

Die starke Ortsabhängigkeit schränkt den Einsatzbereich der Long-Distance-Messungen ein, falls keine Vergleichsmessungen am gleichen System durchgeführt werden können. Das Einsatzgebiet liegt daher vielmehr in der Durchführung von Vergleichsmessungen, welche durch den enormen Arbeitsabstand in den meisten Fällen berührungslos durchgeführt werden können. Bei konstanter Fokuslage im Probenvolumen lassen sich Veränderungen des Diffusionsverhaltens feststellen.

Die Diffusionsmessung bei Variation der Temperatur liefert anschaulich eine Abhängigkeit zwischen diesen Größen (Abb. 6.5). Eine Auswertung der Diffusionskonstanten über einen Arrheniusplot liefert auf Grundlage der Formel $D = D_o \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$ den Wert für die Aktivierungsenergie $E_a = 25,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$. In der linearen Auftragung zeigt sich der vereinfachte Zusammenhang zwischen Diffusionskonstante und Temperatur über die Einsteinbeziehung 2.1 bei nichtbeachten des ebenfalls temperaturabhängigen Reibungskoeffizienten.

Trivial aber meßbar: Die Diffusion ist temperaturabhängig!

Es ist erfreulich, daß diese Form der Long-Distance-FCS auf Einzelmolekülniveau funktioniert und bei Beachtung der Einschränkungen das Einsatzfeld dieser Meßmethode erweitert. So ist eine kreuzförmige Anordnung von Objektiven denkbar, die ein kugelförmig wirkendes Fokusvolumen erzeugen könnte.

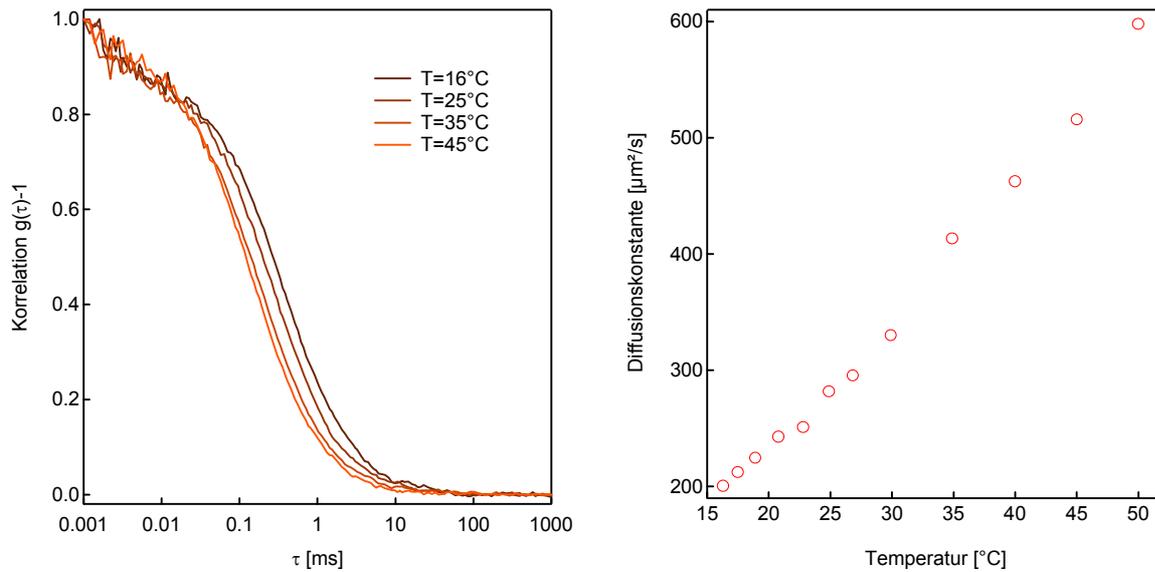


Abbildung 6.5: Long-Distance-FCS-Messungen von Rh6G bei Temperaturvariation. **(links)** Die gemessenen, normierten Korrelationsfunktionen zeigen eine Verschiebung der Diffusionszeiten. **(rechts)** Die ermittelten Diffusionskonstanten, aufgetragen über der Temperatur, zeigen das erwartete lineare Verhalten mit einer exponentiellen Überlagerung. Eine alternative Auftragung als Arrheniusplot liefert für die Aktivierungsenergie $E_a = 25,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ auf diese wird aber der Anschaulichkeit halber hier verzichtet.

6.3 Latexkugeln als Testsystem

Zeitlich vor den Messungen der Einzelmoleküle entstanden, liefern kleine, aus Latex bestehende Kugeln („Beads“), die mit mehreren Farbstoffen und funktionellen Gruppen versehen sind, eine interessante Anwendungsform der Long-Distance-FCS. Bei der Driftbestimmung im elektrischen Feld kommen 20nm-Latexkugeln (FluoSpheres 535/575; Molecular Probes; Eugene-Oregon) zum Einsatz, die mit Carboxylat-Gruppen versehen sind. Als Konzentration wird, durch Verdünnung mit einer 2mM-Natriumazidlösung, ein Teilchen pro Kubikmikrometer eingestellt.

Als Meßkammer wird für die waagerechte Anordnung des ersten FCS-Aufbaus ein senkrecht stehendes Plexiglas-konstrukt verwendet (Abb. 6.6), das aus zwei Reservoirs besteht, die über ein kleines Labyrinth zu einem Meßfenster aus zwei planparallelen Gläschen führen, und damit über diesen einengenden Bereich miteinander verbunden sind. In die Reservoirs wird je ein Platindraht eingeführt, der im Deckel verankert ist. Dieser Deckel dient als Verdunstungsschutz und verhindert damit Konvektion und den Verlust an Flüssigkeit, die sich in dieser Anordnung dramatisch auf die Güte der Messung auswirken. Nach Einfüllen der Meßflüssigkeit wird der Fokus des Long-Distance-Aufbaus so positioniert, daß er sich in der Mitte zwischen den eingrenzenden Glaskörpern befindet. Das Labyrinth zwischen dem Elektrodenreservoir und dem Meßbereich dient zum Abhalten der durch Elektrolyse entstehenden Gasbläschen.

Der Parameterfit erfolgt mit einer verkürzten Form der Formel (4.1). Sie beinhaltet die Berücksichtigung

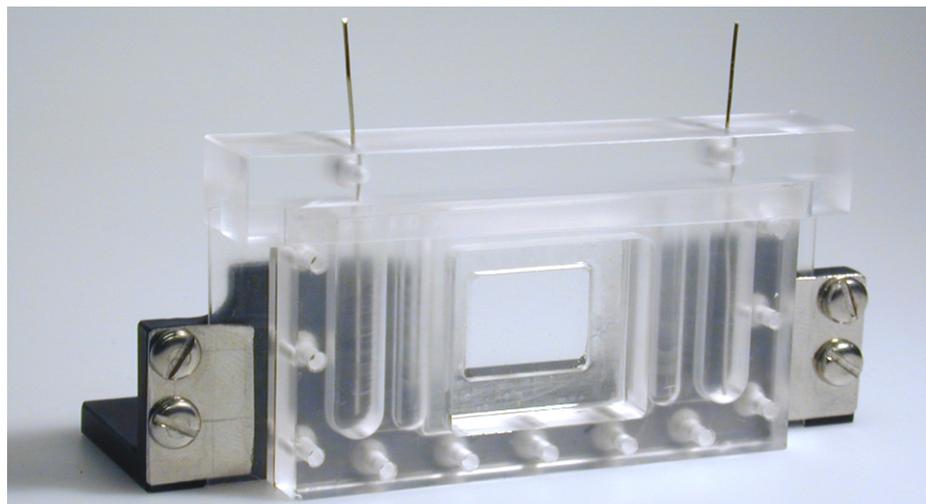


Abbildung 6.6: Aufrechte Meßkammer für Driftmessungen an 20nm-Latexkugeln. Zwei Reservoirs mit Platinelektroden sind über je ein Flüssigkeitslabyrinth mit dem Meßfenster verbunden, das durch zwei parallel verlaufende Gläschen, ein Deckglas vorne, ein Objektträgerstück hinten, gebildet wird. Der Abstand der Gläschen beträgt etwa $100\mu\text{m}$ und ihre Fläche gliedert sich in eine Kanallänge von 25mm und eine Breite von 21mm .

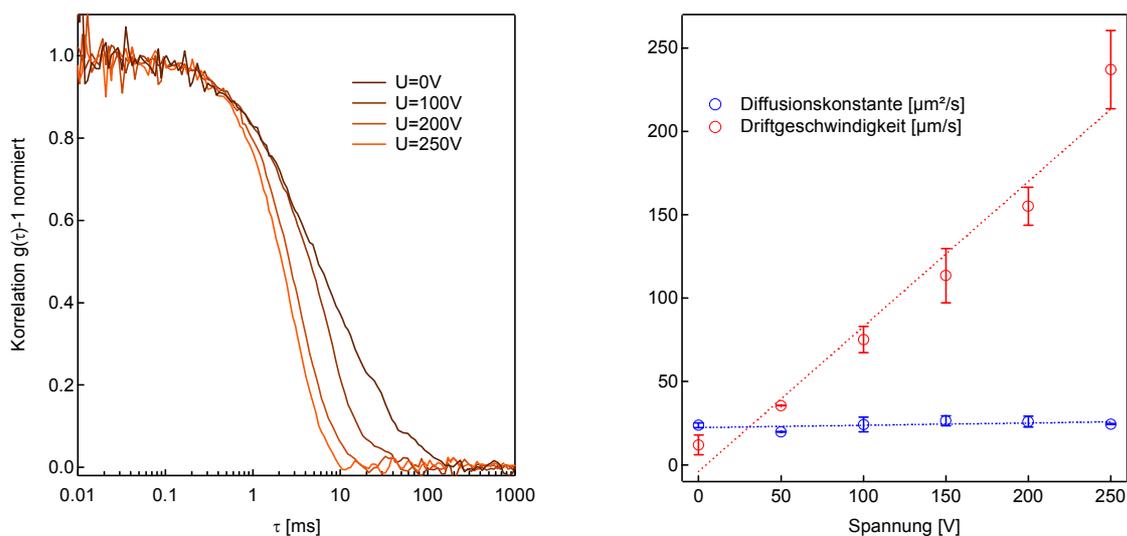


Abbildung 6.7: Drift von geladenen 20nm-Latexkugeln im elektrischen Feld. Gemessen mit Long-Distance-FCS. **(links)** Normierte Korrelationskurven - bei höherer Spannung verkürzt die gerichtete Bewegung der Latexkugeln die Aufenthaltsdauer im Fokus. **(rechts)** Die Diffusionskonstante $D = 24,4 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und die Driftgeschwindigkeit sind über den Parameterfit ermittelbar. Die sich ergebende Spannungsabhängigkeit der Geschwindigkeit, ermittelt über eine Lineare Regression, liefert $0,87 \frac{\mu\text{m}}{\text{sV}}$.

einer driftenden Komponenten mit der Zeitkonstante τ_{drift1} .

$$G(\tau) - 1 = G_1 + G_0 \left[1 - T_{\text{eq}} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triple}}}} \right) \right] \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff1}}} \right)} \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{\text{diff1}}}}} e^{-\left(\left(\frac{\tau}{\tau_{\text{drift1}}} \right)^2 \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff1}}} \right)} \right)}$$

Der Zusammenhang zwischen der angelegten Spannung U und der Driftgeschwindigkeit v kann mit der Formel

$$v = \frac{\omega_o}{\tau_{\text{drift}}} = z \frac{eD}{k_B T d} U$$

verglichen werden. Für die hier vorgestellte Messung (Abb. 6.7) folgt unter Verwendung der Elementarladung e , der Boltzmann-Konstante k_B , der absoluten Temperatur $T = 298K$, der Kanallänge der Meßkammer $d = 25mm$ und der ermittelten Diffusionskonstante $D = 24,4 \frac{\mu m^2}{s}$ und der Geradensteigung $\frac{\Delta v}{\Delta U} = 0,87 \frac{\mu m}{sV}$ die mittlere Zahl der Ladungsträger pro Latexkugel z . Es ergibt sich mit $z = \frac{\Delta v}{\Delta U} \frac{k_B T d}{e D} \approx 0,87 \frac{\mu m}{sV} \cdot 0,026V \cdot \frac{25000 \mu m}{24,4 \frac{\mu m^2}{s}} \approx 23$ ein Wert, der deutlich von der Herstellerangabe $z \approx 1260$ abweicht. Dieser Herstellerwert folgt aus der angegebenen Oberflächenladung von $16,1 \frac{\mu C}{cm^2}$ über die Beziehung für die Zahl der Ladungsträger von $z = \frac{16,1 \cdot 10^{-2} C}{e m^2} \cdot 4\pi (10nm)^2 \approx 1260$ für die $20nm$ -Latexbeads. Die Diskrepanz ist zum Teil auf eine Abschirmung der Ladungsträger im polaren Medium zurückzuführen, aber ein Faktor 50 scheint für einen derartigen Effekt etwas zu hoch. Auch die Herstellerangabe bezüglich der Anzahl von gebundenen Farbstoffen kann nicht bestätigt werden, da der Zählratenvergleich pro Partikel für einen Einzelfarbstoff und einem $20nm$ -Latexbead nur einen Faktor von 6 – 10 aufweist, während der Hersteller von etwa 100 ausgeht.

Die Drift einer Komponente kann mittels FCS bestimmt werden!

Für genaue Messungen eignen sich die Latexkugeln leider kaum, da sie nicht monodispers sind und die Zahl der angekoppelten Farbstoffe, wie auch die Zahl der funktionellen Gruppen, variieren kann. Ebenfalls ein Problem stellen größenbedingte Effekte dar. So ist eine Streuung und damit indirekte Fluoreszenz möglich, die bei der Messung stört.

6.4 Überprüfung der Lipidvesikeleigenschaften auf Einzelmolekülniveau

Die Untersuchung von gestützten Lipidriesenvesikeln bietet die Möglichkeit, am gleichen System die Eigenschaften der freien Membran an der Oberseite und des Kontaktbereichs direkt zu vergleichen. Die vorgestellten Messungen greifen zunächst die oben (Abschnitt 5.3) diskutierten Ergebnisse zur Form der Riesenvesikel sowie zu ihrem Abstand zum Substrat auf, und überprüfen diese bei einer für FCS-Messung typischen Anfärbung.

6.4.1 Durchführung der Vesikelmessungen

Für die Durchführung der Vesikelmessungen wird zunächst das Schälchen mit den auf dem Substrat anhaftenden Vesikeln in der Halterung fixiert und der Temperaturfühler positioniert. Durch eine Blende im Anregungsstrahlengang kann der Kontrast im Licht der Xenonlampe vergrößert werden¹. Damit die Farbstoffe nicht vorzeitig ausbleichen, beschneidet ein Farbglass OG570 das Spektrum der Lampe nach unten hin. Unter Verwendung des Zeiss x20 Luftobjektivs lassen sich in dieser Kontrastansicht die Vesikel leicht

¹ Da alle Linsen aus dem Anregungsstrahlengang des Mikroskops entfernt wurden, arbeitet die ursprünglich als Gesichtsfeldblende gedachte Irisöffnung hier als nichtoptimale Aperturblende.

auffinden und über das Fadenkreuz im Okular vorpositionieren. Nach Umschwenken auf das Meßobjektiv Zeiss x63/0,9W kann das ausgewählte Vesikel, ebenfalls noch in Kontrastansicht, auf die spätere Fokusslage vorzentriert werden. Dieser Wechsel des Objektivs ist ratsam, da sowohl der Kontrast als auch der Bildausschnitt mit dem x20-Objektiv größer ist, wodurch das Auffinden und die Vorauswahl vereinfacht wird. Eine Veränderungen bei FCS-Referenzmessungen durch den Wechsel ist nicht zu beobachten.

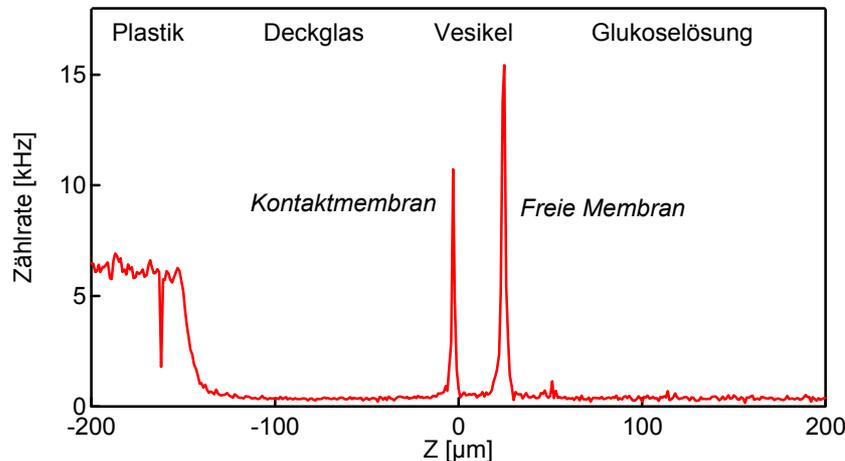


Abbildung 6.8: Z-Scan eines Vesikels auf einem Deckglas. Diese Art von schneller Z-Rasterung wird standardmäßig zur Überprüfung der Membranlagen, d.h. zur Identifikation von unterer und oberer Membran, durchgeführt. Die Kontaktmembranposition ist hier bei der $0\mu\text{m}$ und die Freie Membran bei $25\mu\text{m}$. Bei Positionen kleiner $-140\mu\text{m}$ ist das fluoreszierende Plastikschildchen zu erkennen. Der Einbruch bei $-170\mu\text{m}$ wird durch einen Neustart des Korrelators hervorgerufen.

Nach der Vorpositionierung erfolgt das Umschalten auf Fluoreszenzdetektion, d.h. der Schiebepiegel im Anregungsarm wird auf Laseranregung umgestellt und die Irisblende ganz geöffnet. Im Detektionsarm wird auf den oberen Fotoausgang umgestellt und ein manueller Shutter am Einzelphotonendetektor geöffnet.

Neben der Online-Aufnahme der Korrelationsfunktion, gestattet die Korrelatorkarte das Auslesen der aktuellen Photonenzählrate. In Kombination mit der Positioniermöglichkeit über die Schrittmotoren, besteht die Möglichkeit, die Probe abzurastern und ein konfokales "Slowest"-Laserscan-Mikroskop zu erhalten. Durch einen schnellen Z-Scan, d.h. eine Tiefenrasterung mit verringerter Ortsauflösung und ohne zeitliche Mittelung, können die Membranen identifiziert werden.

In Meßkonfiguration kann obere und untere Membran getrennt werden!

Anschließend wird eine Z-Position im unteren Drittel des Vesikels eingenommen und manuell in X- und Y-Richtung kurz die seitliche Membran angefahren, um eine Nachzentrierung vorzunehmen. Bei sorgfältiger Positionierung in der Kontrastansicht über das Okularfadenkreuz ist eine Korrektur unnötig.

6.4.2 "Slowest"-Laserscan-Mikroskop

Der Einsatz als "Slowest"-Laserscan-Mikroskop gestattet neben diesen eindimensionalen Rasterfahrten die Aufnahme beliebiger Orts-Zählratenzuordnungen. So lassen sich auch bildgebende Vesikelschnitte reali-

sieren um, als einfachste Anwendung, die Form darzustellen (Abb. 6.9).

In einer Sekunde können, inklusive einer Mittelung über mehrere Zählwerte, im Durchschnitt nicht mehr als fünf Meßpositionen aufgenommen werden. Deswegen benötigt ein zweidimensionaler Scan mit einer Kantenlänge von $60\mu m$ bereits zwölf Minuten. Das Auflösungsvermögen bei der Rasterung ist in dieser Konfiguration durch die Schrittweite der Motoren, die mit $1\mu m$ größer als der Durchmesser des Fokus ist (ca. $0,6\mu m$), in der XY-Ebene begrenzt. In Z-Richtung ist der Fokus etwa um das fünffache ausgedehnter und stellt das Auflösungslimit dar. Hierdurch ist für die Diffusionsmessung gewährleistet, daß die Membran mit ausreichender Genauigkeit im Fokus positioniert werden kann, ohne eine zu starke Abweichung des Beleuchtungsradius von der Fokustaille zu erhalten.

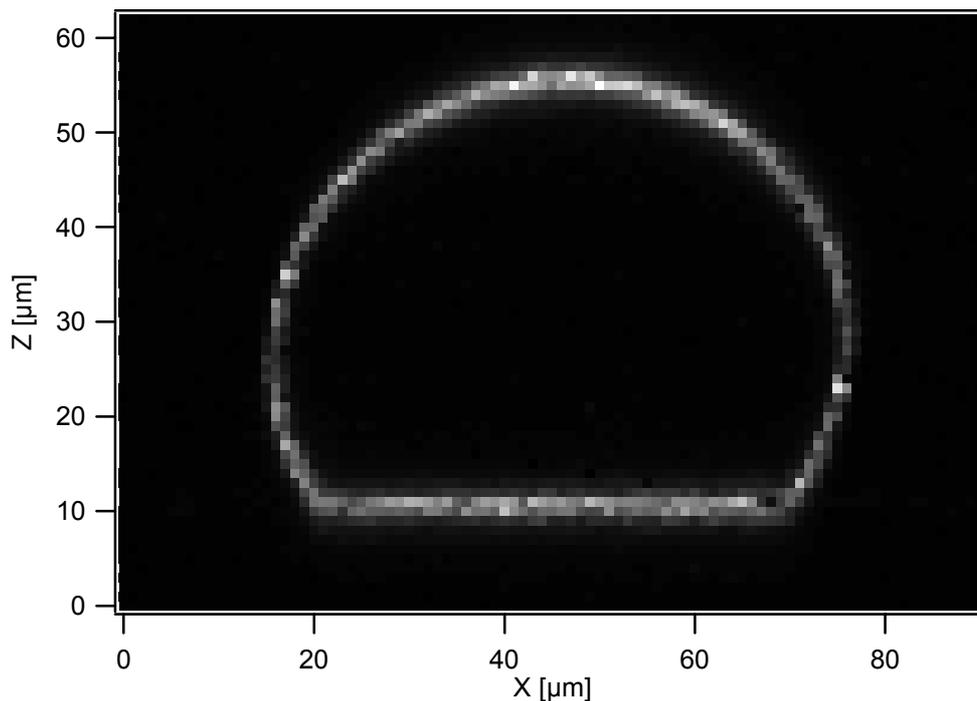


Abbildung 6.9: XZ-Schnitt durch ein Riesenvesikel auf Poly-L-Lysin-beschichtetem Deckglas. Die Deckglasebene liegt etwa bei $Z = 10\mu m$. Als Farbstoff wurde TRITC-DHPE in einem Verhältnis von 1 : 200 000 zu POPC verwendet, so daß im Fokusbereich im Mittel ein Fluoreszenzmolekül vorhanden ist. Dieses Experiment zeigt deutlich, daß über die Schrittmotorpositionierung ein wiederholtes Anfahren der Vesikeloberseite und -unterseite kein Problem darstellt.

6.4.3 Form- und Kontaktbeschreibung

Während der eigentlichen Rasterung muß das Vesikel fest auf der Unterlage adhärirt sein und darf sich auch sonst nicht zu stark bewegen. Dies ist bemerkenswerterweise im hier vorgestellten System gegeben. Sehr vereinzelt platzen die Vesikel ausgenommen. Durch die Adhäsion scheint auch die Vesikeloberseite sehr gespannt vorzuliegen, so daß Membranfluktuationen nicht zu beobachten sind. Das Ausbleichen der Farbstoffe stellt ein Problem bei jeder Art der Fluoreszenzmessung dar, hält sich aber bei der gegebenen Meß- und Scan-Leistung von $15\mu W$ in Grenzen. Der Verlust an Farbstoffen liegt bei einer Standardmes-

sung, wie dem XY-Scan in Abbildung 6.9, bei weniger als 5%. Dieser Wert, der über eine FCS-Messung vor und nach dem Scan ermittelt werden kann, schwankt je nach Vesikelgröße und damit dem Farbstoffreservoir und der Farbstoffart, liegt aber stets unter 10%.

In Meßkonfiguration ist die Vesikelform durch Rasterung bestimmbar!

Neben dieser Form- und Kontaktbestimmung wäre durchaus eine orts aufgelöste Korrelationsmessung denkbar. Die hierfür benötigte Meß- und damit auch Ausbleichzeit, zudem die Schwierigkeit bei der Auswertung von schräg liegenden Membranabschnitten, lassen die sich daraus ermittelten Modellparameter aber als nur begrenzt aussagekräftig erscheinen.

Bei den stichprobenartigen Messungen der Form und des Kontaktbereiches kann kein Unterschied zu den mit dem Laserscan-Mikroskop durchgeführten festgestellt werden. Eine direkte Übernahme der mit viel Farbstoff durchgeführten Betrachtungen erscheint problemlos möglich.

6.4.4 FLIC-Abstandsmessung

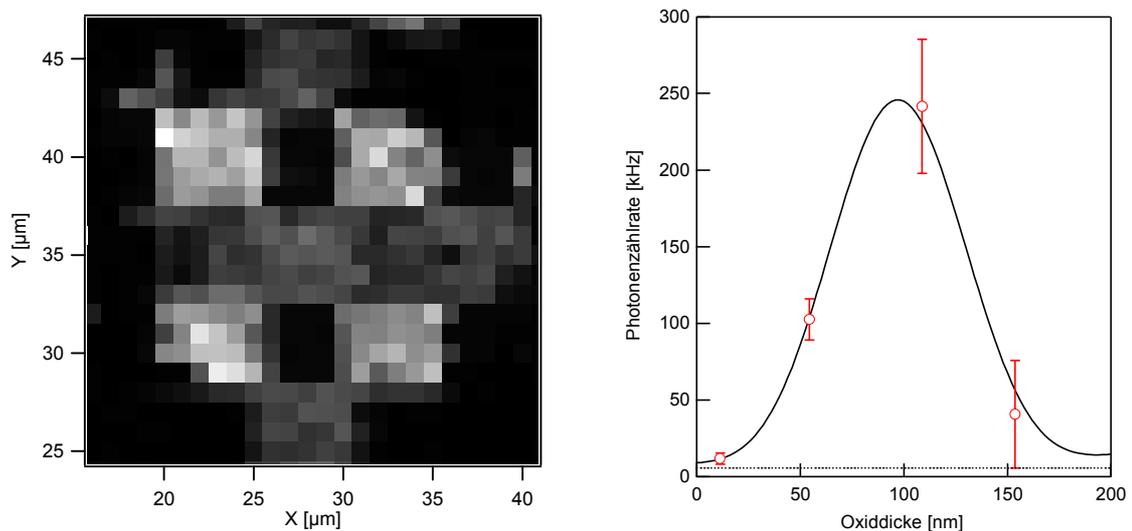


Abbildung 6.10: Überprüfung der starken Adhäsion auf Einzelmolekülniveau mittels angepaßter FLIC-Messung. Im Mittel sind fünf DiIC_{18} Moleküle im Detektionsbereich, dies kann durch eine FCS-Messung vor und nach der Rasterung überprüft werden. **(links)** Rasterbild eines Membranbereiches eines 4-Oxid-Karochips (Kantenlänge $5\mu\text{m}$). Die hellsten Bereiche entsprechen einer Oxiddicke von etwa 100nm . **(rechts)** Die auf den Oxiden ermittelten Meßwerte mit ihrer Fit-Funktion. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Mittelung der örtlichen Abweichung über die inneren Bereiche der einzelnen Oxidstufen. Es ergibt sich in diesem Fall eine Wasserschichtdicke von $d_{\text{Wasser}} = 0,24\text{nm}$, bei einer ebenfalls ermittelten Aperturabdeckung der Anregungsgaußamplitude von $\sigma_{\text{N.A.}} = 0,37$. Die Untergrundphotonenzählrate entspricht mit $5,6\text{kHz}$ einem recht hohen Wert für den Restdurchlaß der Filter, bei einer vollständig reflektierten Anregung.

Auch die Überprüfung des Abstandes zum Substrat scheint bei der drastischen Verringerung der Farbstoffkonzentration angebracht. Die Methode der Wahl stellt die FLIC-Abstandsmessung dar, welche bereits oben (Abschnitt 5.3) für die Bestimmung verwendet wurde. Beim ursprünglichen Meßaufbau und bei ent-

sprechender Anpassung der Daten an die Modellgeometrie kann der Membran-Substratabstand bis zu einer Genauigkeit im Subnanometerbereich bestimmt werden. Er liegt für die starke Adhäsion auf Poly-L-Lysin bei $d_{\text{Wasser}} = 1,1\text{nm}$. Die Modifikation der Anregung ist die wesentliche Veränderung, die bei einer Vergleichsmessung mit der konfokalen Rasterung auf Basis der FCS-Apparatur durchgeführt werden muß. Die Standard-Theorie erwartet hier eine homogene Ausleuchtung der Objektivapertur, welche im klaren Gegensatz zu den Grundprinzipien der FCS steht. Bei Laseranregung mit einer gaußförmigen Ausleuchtung führt ein zu groß gewählter Radius zu einer nicht mehr gaußförmigen Intensitätsverteilung in der Fokusebene. Dieser Umstand ist in der Betrachtung der FCS-Theorie (Abschnitt 3.7.2.3) behandelt. Entgegen der dort üblichen Beschreibung wird in der FLIC-Theorie als Koordinatenparametrisierung die Numerische Apertur herangezogen, weshalb die Intensitätsverteilung in dieser Betrachtung, abhängig vom verwendeten Objektiv, umgerechnet wird. Eine Berücksichtigung von kohärenter und polarisierter Beleuchtung wird bei der Ermittlung der Abstände aktiviert, verändert diese jedoch nur minimal.

Reflektierende Substrate zeigen in Meßkonfiguration Fluoreszenz-Kontrastverstärkung!

Die Messung erfolgt mit "4-Oxid-Chips", da diese mit einer Kantenlänge von $5\mu\text{m}$ eine örtliche Mittelung gestatten (Abb. 6.10 links). Für die Auswertung wird der innere Bereich mit $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ gemittelt und die dort gefundene örtliche Standardabweichung als Fehler angegeben (Abb. 6.10 rechts). Die starken Fluktuationen der wenigen Farbstoffmolekülen im Meßbereich werden hier nicht direkt berücksichtigt, da sie bereits über die örtliche Mittelung in den Fehler einfließen. Im Vergleich zu der Standard-FLIC-Messung mit hoher Farbstoffkonzentration (Abschnitt 5.3) sind die absoluten Photonenzählraten als Skalierung möglich und der Untergrund fällt deutlich geringer aus.

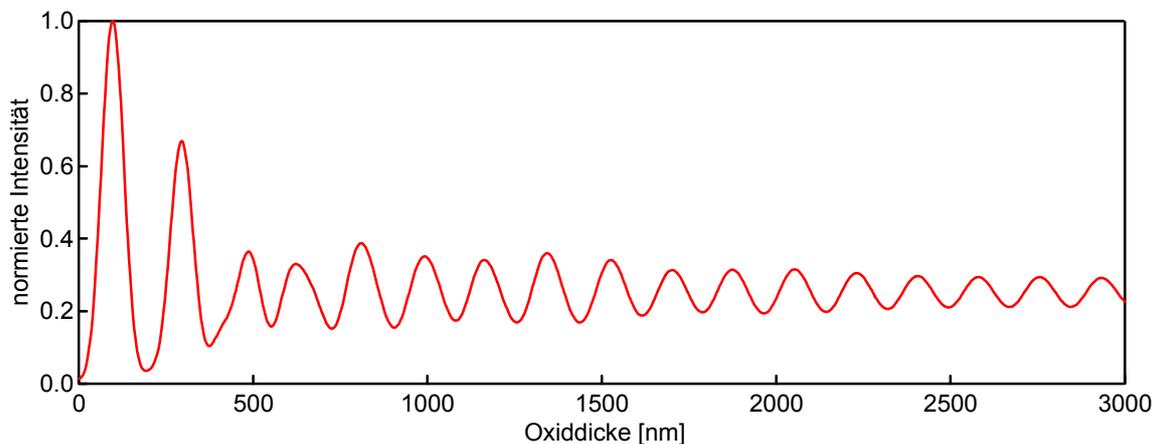


Abbildung 6.11: Standard-FLIC-Berechnung für große Oxiddicken. Auch bei Abständen im Mikrometerbereich ist aufgrund der kleinen Anregungsapertur noch eine leichte Schwebung der Anregbarkeits- und Detektierbarkeitsfunktionen zu erkennen. Für die Messungen an Vesikeln kommen Siliziumchips mit den Oxiddicken 100nm und $2,73\mu\text{m}$ zum Einsatz, also sowohl eine Variante mit ausgeprägter Kontrastverstärkung als auch eine eher konventionell gehaltene.

Für die Berechnung der Fit-Parameter wird als Schichtsystem Silizium-Siliziumoxid-Wasser-Membran-Wasser festgelegt, wobei die Membran mit einer Dicke von $d_{\text{Membran}} = 3,7\text{nm}$ als beidseitig mit DiIC₁₈,

angefärbter Bilayer behandelt wird. Die spektralen Kennlinien des Farbstoffs, des verwendeten Filtersatzes sowie des Photonendetektors werden bei der Berechnung ebenfalls berücksichtigt. Beim Fitdurchlauf werden standardmäßig der Untergrund, ein Intensitätsskalierfaktor und die Wasserschichtdicke zwischen Siliziumoxid und Membran als Parameter variiert. Für die in Abbildung 6.10 gezeigte Messung ergibt sich eine Wasserschichtdicke von $d_{\text{Wasser}} = 0,11 \pm 1,49 \text{ nm}$ bei vorgegebener Anregungsgaußamplitude von $\sigma_{\text{N.A.}} = 0,35$. Dies entspricht einem $1/e^2$ -Radius für die Gaußintensität² von $\omega_1 = 1,2 \text{ mm}$, bei einer gesamten Numerischen Apertur von $N.A._{\text{Objektiv}} = 0,9$. Ein gleichzeitiger Fit der Wasserschichtdicke sowie der Anregungsverteilung liefert $d_{\text{Wasser}} = 0,24 \text{ nm}$ und $\sigma_{\text{N.A.}} = 0,37$. Eine Fehlerangabe ist bei dieser hohen Zahl freier Parameter nicht mehr sinnvoll. Der ermittelte Untergrund von $5,6 \text{ kHz}$ liegt über den üblichen Werten, welche bei einem langsamen Z-Scan an der spiegelnden Fläche bestimmt werden und sich eher in der Größenordnung von $1 - 2 \text{ kHz}$ bewegen.

In Meßkonfiguration ist der Abstand zum Substrat bestimmbar!

Die Messung zeigt, daß die Membran im engen Kontakt mit der Siliziumoxidoberfläche steht und die Ergebnisse zur Abstandsmessung bei geringer Farbstoffkonzentration erhalten bleiben. Die leichte Diskrepanz zu den ermittelten Daten mit viel Farbstoff ($d_{\text{Wasser}} = 1,1 \text{ nm}$) ist auf die unterschiedlichsten Ursachen zurückzuführen. Durch das vorgestellte Auslesen der Zählrate aus der Korrelatorkarte liegt diese als gemittelter Wert vor, weshalb keine wirkliche Korrektur der Detektortodzeit vorgenommen werden kann. Bei den für Vesikelsysteme üblichen kleinen Zählraten mit langsamer Diffusion bewirkt die Korrektur keine nichtlineare Umskalierung der gemessenen Intensitäten, hat damit auf die Abstandsberechnung keine Auswirkung. Ebenfalls bleibt, begründet durch die kleinen Zählraten, der aufgrund der Anregungsintensitäten unterschiedliche Triplettanteil auf den verschiedenen Oxidstufen unberücksichtigt. Der bei kleinen Oxiddicken wichtige Energieübertrag in das Silizium bewirkt eine leichte Korrektur der ermittelten Wasserschichtdicke [35], die aber innerhalb des oben angegebenen Fehlerbereiches liegt.

Problematisch scheint bei der Abstandsmessung mit der FCS-Apparatur vor allem die bisher nicht berücksichtigte Fokusbeschreibung (Abschnitt 3.7.3). Für kleine Oxidstufen, besser gesagt für einen Bruchteil der Fokustiefe, scheint dieser Effekt zwar kaum einen Unterschied zu bewirken, bei großen Oxiddickenbereichen ohne Nachführung der Fokusebene ist eine Erweiterung hin zur "Laser-FLIC" aber unumgänglich.

Für Einzelmolekülabstandsmessungen, die nicht nur, wie hier vorgestellt, eine generelle Überprüfung darstellen, ist die Verwendung von mehr Oxidstufen ratsam. Entsprechende "16-Oxid-Chips" gibt es bereits und werden für die Vesikeleigenschaftenbestimmung eingesetzt (Abschnitt 5.3), können aber wegen ihrer zu kleinen Oxidflächen beim derzeitigen Meßaufbau nicht sinnvoll eingesetzt werden.

² Die Umrechnung für die die Objektivpupille mit Radius $a = f \tan \alpha$ ausleuchtende Gaußintensität mit dem $1/e^2$ -Radius ω_1 liefert die Beziehung $N.A._{\text{Objektiv}} = n \sin \alpha$ und für die Gaußamplituden der Zusammenhang $\omega_1 = \sqrt{2} \sigma_{\text{Pupille}}$. Insgesamt ergibt sich so der Ausdruck $\sigma_{\text{N.A.}} = n \sin \left(\frac{\alpha \omega_1}{a \sqrt{2}} \right)$. Für das Zeiss x63/0,9W-Objektiv werden die Werte $f = 2,6 \text{ mm}$, $N.A. = 0,9$, $n = 1,333$ und für die Laseranregung $\omega_1 = 1,2 \text{ mm}$ eingesetzt.

6.4.5 Meßablauf für FCS-Messungen an Vesikeln

Nachdem, wie beschrieben (Abschnitt 6.4.1), die ungefähren Membranlagen, d.h. die Ober- und die Unterseite des Vesikels, identifiziert sind und gleichzeitig das Vesikel zentriert ist, kann gezielt eine Membran mit Hilfe der Schrittmotoren grob angefahren werden. Die exakte Positionierung erfolgt durch Einzelschritte bis die Zählrate maximal ist. Nach einer kurzen Wartezeit wird durch einen $1\mu\text{m}$ -Schritt Abweichung in positiver wie in negativer Z-Richtung überprüft, ob das Maximum wirklich erreicht war, ansonsten wird leicht nachkorrigiert. Obwohl der Fokusbereich in Z-Richtung etwa $3\mu\text{m}$ beträgt, ist über dieses Verfahren ein Zählratenmaximum einfach zu finden und die Lage der Membran auch über lange Zeit, im Minutenbereich, konstant.

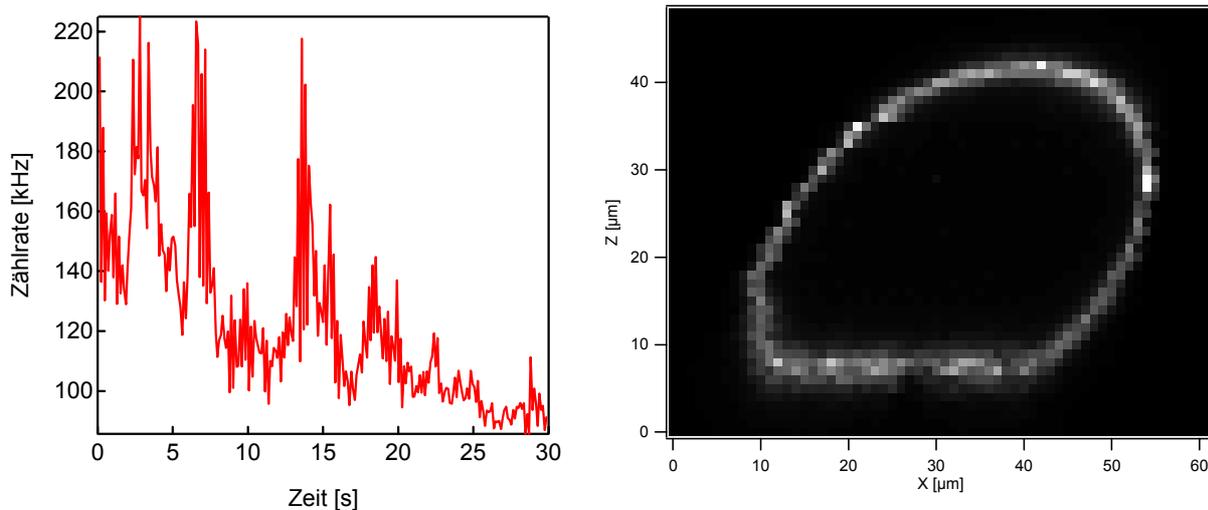


Abbildung 6.12: Zwei Beispiele für leicht zu erkennende Positionierprobleme. **(links)** Photonenzählrate eines stark fluktuierenden Vesikels, gemessen an der Oberseite. Derart starke Fluktuationen sind sehr selten und können durch einen Z-Scan leicht als noch nicht vollständig adhärirtes oder abgelöstes Vesikel identifiziert werden. **(rechts)** "Vesikel auf der Flucht" - Bei diesem Positionierungsversuch hat sich die das Deckglas haltende Klammer gelöst und dieses gleitet mitsamt Vesikel auf einem dünnen Wasserfilm im Schälchen. Die zeilenweise Abtastung des XZ-Schnitts erzeugt eine scheinbare Unsymmetrie. Durch die Rastermöglichkeit und die damit verbundene Überprüfung läßt sich dieses Verhalten aufklären und bei weiteren Messungen vermeiden.

Ist die Membran im Fokus positioniert, wird die Messung gestartet. Zu Beginn jeder Einzelmessung wird eine automatische Skalierung der Korrelatorkarte durchgeführt. Bei den beschriebenen Farbstoffkonzentrationen, mit genügend Fokusdurchgängen innerhalb der drei Sekunden Skalierzeit, ist die sich ergebende Einstellung akzeptabel. Ist dies nicht der Fall, kann diese manuell variiert werden. Als Meßzeit werden zumeist 30s in etwa 5% der Vesikelmessungen zur Überprüfung und für die oben beschriebenen Referenzmessungen 100s eingestellt.

Nach beendeter Messung wird auf die jeweilig andere Membran positioniert und eine neue Messung gestartet. Dieses Vorgehen garantiert, daß ein Platzen des Vesikels frühzeitig erkannt wird und nur die letzte Messung verworfen werden muß. Nach mehrmaligem Wechsel wird das nächste Vesikel aufgesucht.

Die vorgestellten Vesikelmessungen werden bei zwei verschiedenen Grundkonfigurationen des Aufbaus durchgeführt. Eine sehr konservative Konfiguration macht sich dabei durch einen $1/e^2$ -Fokusradius der Intensität von $\omega_0 = 0,328\mu m$ bemerkbar. Die zweite liefert bei einer breiteren Aperturasleuchtung den Wert $\omega_0 = 0,270\mu m$. Der ursprüngliche Gedanke hinter dieser Variation - störende optische Reflexionen am Silizium zu erkennen - war bei genauer Betrachtung hinfällig. In beiden Fällen wird das Pinhole mit dem Durchmesser $50\mu m$ für die konfokale Begrenzung des Meßvolumens eingesetzt. Für die Vesikelmessungen wird durch die Graufilter eine Laserleistung von $15\mu W$, gemessen im Anregungsstrahl direkt vor dem Objektiv, eingestellt. Dies entspricht einer flächenbezogenen Leistung von $\approx 50 \frac{mW}{\mu m^2}$.

Kapitel 7

FCS an Vesikeln - Messung und Diskussion

Nach der im Kapitel 6 vorgestellten Charakterisierung des Systems aus Aufbau und Probe werden nun die Messungen an Vesikeln vorgestellt und diskutiert. Dies geschieht anhand typischer Beispielauswertungen, da hierbei die Problematik der Parameterinterpretation am anschaulichsten darzustellen ist.

7.1 Farbstoffträger in der *Freien Lipidmembran*

Die Untersuchungen an der Vesikeloberseite geben einen ersten Einblick in das Diffusionsverhalten in der *Freien Membran*. Der Vergleich der Farbstoffträger dient zur Vorauswahl geeigneter Kandidaten für eine umfangreichere Betrachtung des Systems. Die genauere Analyse erfolgt für das Lipid TRITC-DHPE in Abschnitt 7.2 und für das Peptid Gramicidin C in Abschnitt 7.3.

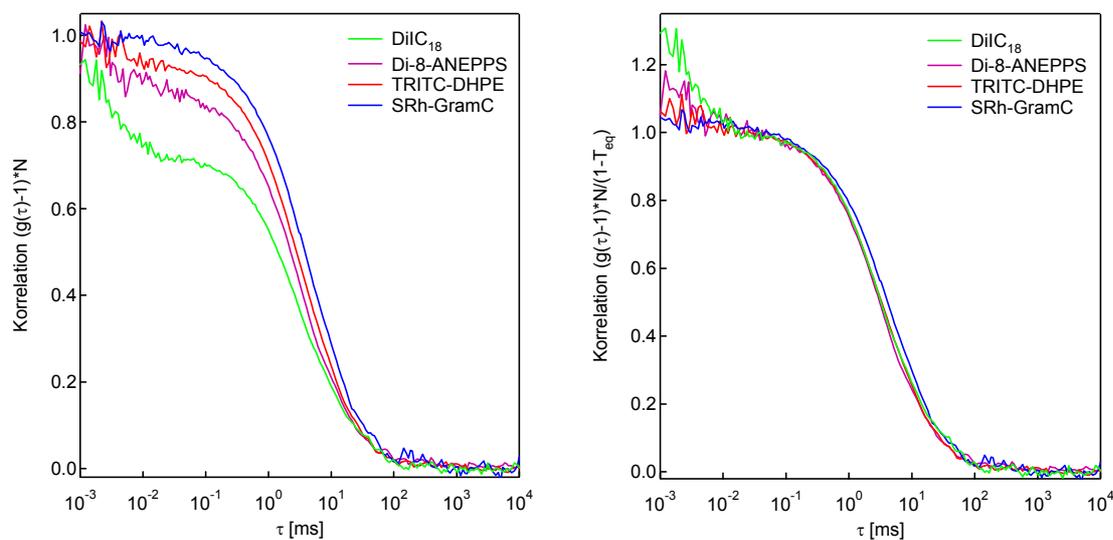


Abbildung 7.1: Vergleich der normierten Korrelationsdaten von lipidartigen und -gebundenen Farbstoffen sowie Sulforhodamin G-Gramicidin C in der Vesikeloberseite. Die Meßdaten lassen sich durch ein normales Diffusionsmodell beschreiben. Es ergibt sich für die Lipidfarbstoffe eine Diffusionskonstante von ca. $6,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und für das Peptid $3,8 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bei einer Proben temperatur von 25°C . Als Lipidverhältnis wird POPC:DÖPME:Farbstoffträger $100\,000 : 1\,000 : 1$ verwendet, nur bei TRITC-DHPE wird mit der Hälfte der Farbstoffmenge gearbeitet. (**links**) Die Normierung über die Partikelzahl N verdeutlicht die Unterschiede im Triplettverhalten. (**rechts**) Die Normierung über die Partikelzahl N und den Triplettanteil T_{eq} gestattet den anschaulichen Vergleich der Diffusionszeiten.

Die Messungen an der Vesikeloberseite (Abb. 7.1) zeigen ein vergleichbares Diffusionsverhalten der lipidartigen bzw. -gebundenen Farbstoffe mit einer Diffusionskonstante um $6,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Davon deutlich trennbar ist die langsamere Diffusion des mit dem Farbstoff Sulforhodamin G markierten Gramicidin C (SRh-GramC), mit einem Wert von $3,8 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Die Werte sind mit dem Fitmodell der normalen Diffusion

$$G(\tau) - 1 = G_1 + G_0 \left[\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff1}}}\right)} \right] \left[1 - T_{\text{eq}} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}} \right) \right]$$

ermittelt, von diesem sind keine grundlegenden funktionellen Abweichungen zu beobachten¹. Aus dem Kehrwert der Amplitude G_0 ergibt sich die Zahl der Partikel $N = \frac{1}{G_0}$, welche zur Normierung der Darstellung (Abb. 7.1 links) verwendet wird. Bei unterschiedlichem Triplettverhalten eignet sich in Spezialfällen die Normierung über die Partikelzahl N und den Triplettanteil T_{eq} (Abb. 7.1 rechts) zur besseren Sichtbarmachung der Unterschiede in der Diffusionszeit $\tau_{\text{diff1}} = \frac{\omega^2}{4D}$.

Als Vergleichswerte eignen sich die mit FRAP ermittelten Diffusionswerte in hydrierten Multibilayerstapeln, da sie am ehesten dem vorgestellten System entsprechen. Für das Lipid-Farbstoffsystem [17] POPC:NBD-eggPE 1250 : 1 ergibt sich durch lineare Extrapolation der Werte $5,19 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ für 21°C und $7,17 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ für 30°C eine Diffusionskonstante bei $T = 25^\circ\text{C}$ von $6,1 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, wobei eine mobile Fraktion im Mittel von 94% angegeben wird. Die Diffusionskonstante von einer mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dansyl markierten Gramicidin C Variante in einem EPC-Multibilayersystem folgt ebenfalls über eine lineare Extrapolation von Literaturdaten [66]. Bei 25°C folgt daraus die Diffusionskonstante $D = 4 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Im Abschnitt 7.3 wird das Diffusionsverhalten dieses Peptids genauer untersucht.

| Variation: Farbstoffträger | TRITC-DHPE | DiIC ₁₈ | Di-8-ANEPPS | SRh-GramC |
|--|--|--|---|---|
| Oberseite $D \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$ | $5,84 \pm 1,33$ <small>$n=118$</small> | $6,24 \pm 0,94$ <small>$n=9$</small> | $6,66 \pm 1,40$ <small>$n=11$</small> | $3,80 \pm 1,01$ <small>$n=66$</small> |
| $T_{\text{eq}} [\%]$ $\tau_{\text{triplett}} [ms]$ | 6 0,005 | 25 0,003 | 13 0,005 | 5 0,004 |
| Zählrate/Partikel [kHz] [counts/Partikel] | 12 38 | 16 45 | 7,5 22 | 17 100 |

Tabelle 7.1: Variation des Farbstoffträgers in der freien Membran. Die Bestimmung der Diffusionskonstante ergibt für die lipidartigen Farbstoffe einen Wert um $6,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, wobei eine Tendenz zu beobachten ist, daß kleinere Moleküle ein schnelleres Diffusionsverhalten zeigen. Für Sulforhodamin G-Gramicidin C ergibt sich ein deutlich abgesetzter Wert von $3,8 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Die Zahl der Einzelmessungen n ist angegeben.

Betrachtet man die Einzelwerte (Tab. 7.1) genauer, fällt schon bei den "Lipiden" eine Tendenz zur schnelleren Diffusion kleinerer Moleküle auf, was auch gefühlsmäßig zu erwarten ist. Alle drei gewählten Lipidfarbstoffe eignen sich als Meßsonden für das Membransystem. Die unterschiedliche Ladung der Moleküle scheint keine Auswirkung auf ihr Diffusionsverhalten zu zeigen. Befürchtungen, daß es speziell beim positiven DiIC₁₈ in Verbindung mit dem negativen Lipid DOPME zu Anhäufungen kommt, erweisen sich als unbegründet. Die Membranlage des DiIC₁₈-Chromophors in Verbindung mit einem hohen Extink-

¹ Die Auswertung von SRh-GramC wird in Abschnitt 7.3 näher erläutert. Sie erfolgt mit einem Zwei-Komponenten-Modell, das zusätzlich freien Rhodamin-Farbstoff in der Lösung berücksichtigt.

tionskoeffizienten hat eine sehr gute Anregbarkeit zur Folge. Dies macht sich in einer hohen Zählrate pro Partikel bemerkbar, aber auch in einem hohen Triplettanteil T_{eq} . Diese Werte können allerdings aufgrund der spektralen Unterschiede nur begrenzt verglichen werden. Di-8-ANEPPS scheidet durch seine unklare Membranlage [33] als Kandidat für eine genauere Untersuchung aus. Das kleine Molekül ist zudem für den verwendeten Filtersatz am wenigsten geeignet.

Alle gewählten Farbstoffträger diffundieren in der *Freien Membran*!

Für die genauere Betrachtung der Lipidfarbstoffe wird TRITC-DHPE ausgewählt. Das Spektrum des gebundenen Tetramethylrhodamins ist zu dem des Proteinmarkers Sulforhodamin am ähnlichsten. Das Triplettverhalten ist vergleichbar und die Beeinflussung der Korrelationskurven am geringsten. Ein weiterer Grund ist, daß die negative Nettoladung in Verbindung mit dem negativen DOPME am unproblematischsten erscheint. Hinderlich scheint speziell für die Untersuchungen an der Vesikelunterseite der aus der Membranebene reichende Chromophor, durch dessen sehr bewegliche Anbringung am Lipidteil ist eine Beeinflussung durch diesen Umstand jedoch kaum zu erwarten.

TRITC-DHPE wird als Membransonde ausgewählt!

Die Wölbung der Membran an der Vesikeloberseite bewirkt bei den verwendeten Fokusradien von ca. $0,3\mu m$ und einer typischen Vesikelgröße von $60\mu m$ Durchmesser keine nennenswerte Abweichung. Selbst bei einem als kugelförmig angenommenen Vesikel mit $10\mu m$ Durchmesser beträgt die Flächendifferenz $0,2\%$ und ist damit zu vernachlässigen. Größere Abweichungen ergeben sich bei Fehlpositionierung, d.h. bei nicht zentrierter Anordnung. Eine angenommenen Verschiebung eines $60\mu m$ -Vesikels um den hohen Wert von $5\mu m$ bewirkt aufgrund der Membranverkipfung eine Flächenabweichung von $2,8\%$. Bei einem gut anhaftenden Vesikel und einer sorgfältigen Ausrichtung (Abschnitt 6.4.1), sollte eine derartig große Verschiebung nicht vorkommen.

7.2 Direkter Vergleich der *Freien Membran* zur *Kontaktmembran*

Durch das Riesenvesikelsystem ist es möglich, direkt die Diffusion in der Oberseite, sprich der *Freien Membran*, im Vergleich zu der Unterseite, der *Kontaktmembran*, zu studieren.

7.2.1 Beispielauswertung für TRITC-DHPE auf Chip mit $100nm$ Oxiddicke

In dieser Beispielauswertung (Abb. 7.2) sind typische Daten eines Riesenvesikels aus POPC:TRITC-DHPE $200\ 000 : 1$ gezeigt, das mit Poly-L-Lysin auf einen Siliziumchip mit $100nm$ Oxiddicke anhaftet. Nach dem im Abschnitt 5 beschriebene Herstellungsverfahren, sind das Vesikelinnere und das -äußere mit Zuckern unterschiedlicher Dichte gefüllt und über einen Puffer auf $pH\ 7,4$ eingestellt. Bei den im Diagramm (7.2 oben) gezeigten Meßdaten für die Ober- und Unterseite fällt die deutliche Abweichung der Kurven voneinander auf. Ausgehend von den Daten der Oberseite, ist die Kurve für die Unterseite nach rechts zu

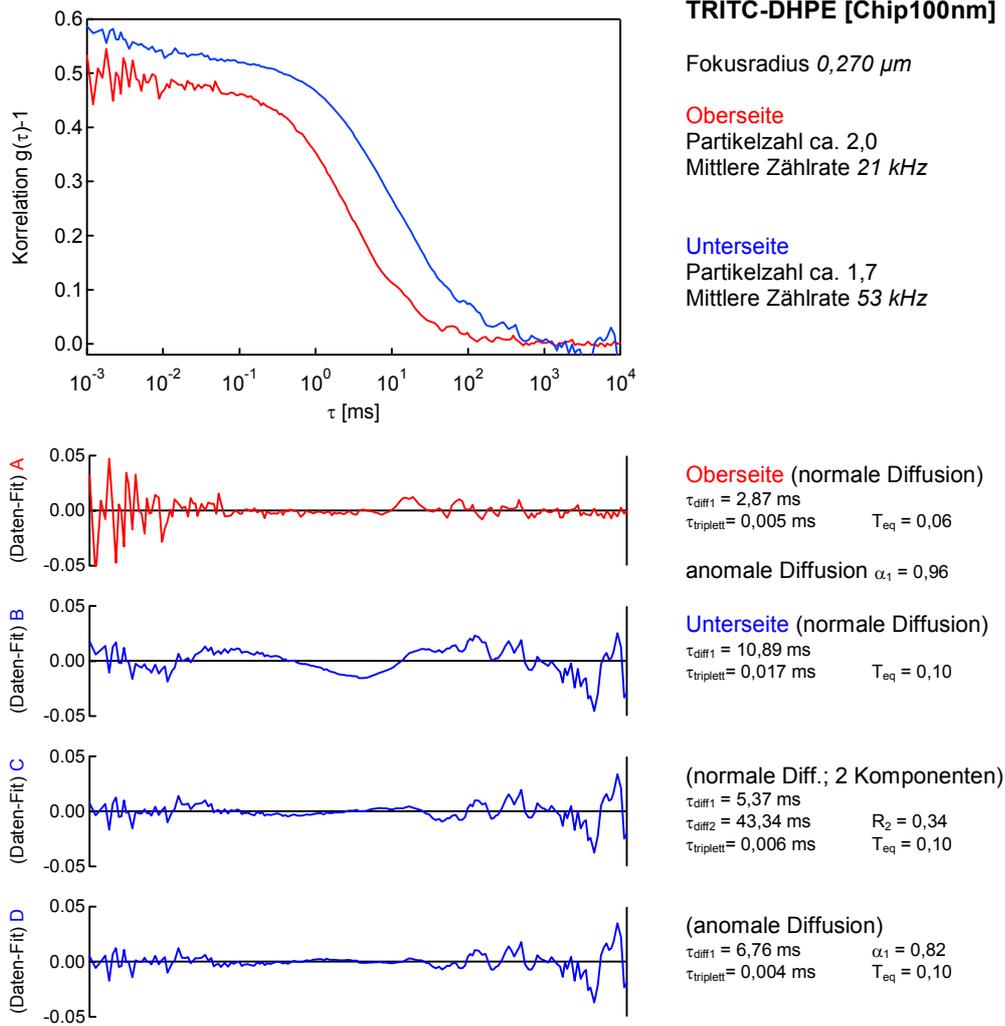


Abbildung 7.2: TRITC–DHPE Vesikel auf Chip mit 100nm Oxiddicke. **(oben)** Meßdaten für die Ober- und Unterseite. **(mitte A)** Abweichung des Fitmodells für die Oberseite. **(unten B bis D)** Abweichungen der Fitmodelle für die Unterseite.

größeren Zeiten τ und gleichzeitig nach oben zu kleineren Partikelzahlen verschoben. Über den Kehrwert der extrapolierten Datenwerte bei $\tau = 0$ ergibt sich die Partikelzahl der Oberseite $N_{\text{Oberseite}} \approx \frac{1}{0,5} = 2,0$ und der Unterseite $N_{\text{Unterseite}} \approx \frac{1}{0,58} \approx 1,7$. Für die Beurteilung der Güte eines Parameterfits, wie in Abschnitt 6 beschrieben, eignet sich besonders die Darstellung der Abweichung von ermittelter Fitfunktion zu den Meßdaten. Diese Differenz kann eventuell durch die Fitdaten oder die Meßdaten geteilt werden, um damit eine Normierung durchzuführen. Da die Auftragung der Differenz zwischen Meßdaten und Fitfunktion den direkteren Vergleich zu den Originaldaten zuläßt, wird diese Darstellungsform gewählt. Die allgemeine Auswerteformel 4.1 kann für die Membranbetrachtungen dabei deutlich reduziert werden. Dies geschieht über den für die Fokus-Ausdehnung in Z-Richtung wichtigen k -Faktor, da bei $k = \left(\frac{\omega_z}{\omega_o}\right)^2 = 0$

keine Gaußverteilung in dieser Richtung berücksichtigt wird.

$$G(\tau) - 1 = G_1 + G_0 \left[\frac{(1 - R_2)}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{diff1}}}\right)} + \frac{R_2}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_2}}{\tau_{\text{diff2}}}\right)} \right] \left[1 - T_{\text{eq}} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}} \right) \right]$$

Oberseite - Teilbild 7.2 A

Nach durchgeführtem Fit der Oberseitendaten mit dem Modell der "Normalen Diffusion", ergeben sich die im Teilbild A dargestellten Abweichungen. Über den gesamten logarithmischen Zeitbereich sind keine funktionellen Abweichungen zu finden, so daß der Fit als "gelingen" eingestuft werden kann. Die beim Fit gewonnenen Daten widerspiegeln im Rahmen des Fitmodells "Normale, zweidimensionale Diffusion einer Komponente mit Tripletbestimmung" die zugehörigen Modellannahmen. Aus der Diffusionszeit $\tau_{\text{diff1}} = \frac{\omega_o^2}{4D}$ läßt sich die Diffusionskonstante bestimmen, man erhält $D = \frac{(0,27\mu\text{m})^2}{4 \cdot 2,87\text{ms}} = 6,35 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, wobei für ω_o der in mehreren Referenzmessungen ermittelte Wert für den $1/e^2$ -Radius der Fokusintensität senkrecht zur optischen Achse eingesetzt wird. Ein kurzer Blick auf die gefundenen Tripletwerte zeigt, daß mit $T_{\text{eq}} = 6\%$ Tripletanteil und einer Zeit von $\tau_{\text{triplett}} = 5\mu\text{s}$ dessen Einfluß recht klein und für rhodaminartige Farbstoffe bei dieser Laserleistung üblich ist. Die bei dem Fit ebenfalls gewonnenen Parameter G_0 und G_1 dienen in erster Linie der Partikelanzahlberechnung und werden darum hier nicht extra aufgeführt.

Lipid-Farbstoffe in der Freien Membran zeigen normales Diffusionsverhalten!

Unterseite - Teilbild 7.2 B bis D

Das gleiche Fitmodell, angewendet auf die Daten der Unterseite, liefert die in Teilbild B dargestellte Differenz von Meßdaten und Fitfunktion. Schon bei grober Betrachtung ist eine deutliche funktionelle Abweichung über große Zeitbereiche zu erkennen. Auffällig ist ebenfalls eine mit $\tau_{\text{triplett}} = 17\mu\text{s}$ sehr große Tripletzeit, die in diesem Fall nicht einer realen Größe zuzuordnen ist, sondern ein Zeichen des fehlgeschlagenen Fitmodells darstellt.

Da es sich bei der Membran an der Vesikelunterseite um einen Bilayer handelt ist zu vermuten, daß sich die untere Seite des Bilayers anders verhält als die obere. Auf dieser Vorstellung basiert das in Teilbild C anhand seiner Residuen dargestellte Fitmodell des 2-Komponenten-Systems. Die in B deutlichen Abweichungen sind im für die Diffusion wichtigen Zeitbereich zwischen 10^{-2}ms und 10^2ms großteils verschwunden. Nur bei genauerer Betrachtung ist ein leichtes "Schwingen" zu erkennen. Zwei sich mit unterschiedlicher Diffusionskonstante bewegende Fraktionen zeigen eine Überlagerung der Korrelationskurven, wobei sich die Partikelzahlen addieren. Das Fitmodell muß um eine zweite Diffusionszeit τ_{diff2} und um einen Partikelanteil R_2 erweitert werden. Betrachtet man die ermittelten Werte, so ist die oben auffällige Tripletzeit mit $\tau_{\text{triplett}} = 6\mu\text{s}$ wieder im gewohnten Bereich und dient nicht mehr offensichtlich als "Modellkorrektur". Die gefundenen Diffusionszeiten liefern zwei Komponenten mit den Diffusionskonstanten $D_1 = 3,4 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und $D_2 = 0,4 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil von $R_2 = 34\%$. Da ein immobilier Anteil an Fluoreszenzpartikel prinzipbedingt nicht durch die FCS berücksichtigt werden kann, die Partikelzahlen in der Vesikeloberseite und -unterseite Abweichungen zeigt, stellt eine Anteilsverteilung, die keine 50%-Zuordnung zuläßt, kein

Problem bei der Interpretation dieses Parameters dar. Ordnet man die zweite langsamere Komponente sowie eine immobile Fraktion dem unteren Monolayer zu und geht von einer anfänglich gleichen Anfärbung beider Monolayer aus, so erhält man eine mobile Fraktion im Bilayer von 80%. Bei homogener Farbstoffverteilung im Vesikel ergibt sich, unter Berücksichtigung der Daten der Oberseite, für die Unterseite eine Partikelzahl von 1,6. Trotz dieser ersten Übereinstimmung führt dieser Datensatz mit der vorgestellten Idee der Bilayerdiffusion, d.h. ungestörter Monolayer oben und beeinflusster Monolayer unten, allerdings nicht zu einem wirklich befriedigenden Ergebnis. Am augenfälligsten ist die deutliche Abweichung der schnellen Diffusionskomponente mit der in der freien Membran gemessenen, also $D_{\text{frei}} \approx 6 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Ein Fit mit diesen Zwangsparametern, d.h. fixierter Diffusionsparameter für eine Komponente bei $\tau_{\text{diff1}} = 2,87\text{ms}$, liefert eine noch deutlichere Abweichung der Daten vom Modell. Das resultierende Wertepaar der zweiten Komponente $\tau_{\text{diff2}} = 22,2\text{ms}$ und $R_2 = 62\%$ ergibt keinen Informationsmehrwert über das System, da selbst die geänderte Partikelzahl nun nicht mehr erklärbar ist.

Die bisher beste Übereinstimmung von Fitmodell und Meßdaten wird erzielt, wenn man davon ausgeht, daß sowohl der untere Monolayer, als auch der obere Monolayer der Kontaktmembran beeinflusst sind und zudem eine immobile Fraktion von 20% vorhanden ist. Von einer wirklichen Trennung der Monolayer kann also keine Rede sein. Treibt man die Zahl der diffundierenden Komponenten in die Höhe, so lassen sich auch die verbleibenden funktionellen Abweichungen minimieren. Der wirkliche Informationsgewinn leidet aber unter der Flut an freien Fitparametern, die je nach Startannahmen auch unterschiedlichste Endresultate liefern.

Eine "quasikontinuierliche" Verteilung der diffundierenden Komponenten wird durch die "Anomale Diffusion" beschrieben, d.h. das *Mittlere Quadrat der Verschiebung* ist nicht mehr proportional zur Zeit. Eine Störung der normalen Diffusion findet dabei auf jeder Größen- und Zeitskala statt und bewirkt eine generelle Verlangsamung ($\alpha < 1$) der Bewegung. Im Teilbild **D** ist die Abweichung der Meßdaten vom verwendeten Fitmodell der "Anomalen zweidimensionalen Diffusion einer Komponente mit Triplettbestimmung" eingezeichnet. Im für die Diffusion wichtigen Zeitbereich stimmt die Kurve nicht nur optisch sehr gut überein, auch die *Summe der Fehlerquadrate* χ^2 zeigt eine deutliche Verbesserung. Mit nur einem abweichenden Parameter ($\alpha = 0,82$) lassen sich die gemessenen Daten deutlich besser und eindeutiger beschreiben als mit einem Mehrkomponentensystem. Leider ist der damit aus der Diffusionszeit gewonnene Wert $D_\alpha = 2,7 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha}$ nur noch ein Beweglichkeitsmaß und nicht mehr die Diffusionskonstante.

Lipid-Farbstoffe in der *Kontaktmembran* zeigen ein langsames, anomales Diffusionsverhalten!

Eine Trennung der Monolayeranteile liefert auch bei anomaler Diffusion im unteren Monolayer der Kontaktmembran keinen befriedigenden Parametersatz. Bei einem festen 50%-Anteil einer Komponente mit $\tau_{\text{diff1}} = 2,87\text{ms}$, dem Wert für die Vesikeloberseite, ergibt sich für die zweite Komponente der Parametersatz $\tau_{\text{diff2}}^* = 47,4\text{ms}^\alpha$ und $\alpha = 1,12$. Dies entspricht einer beschleunigten Bewegung auf sehr langsamen Niveau und einer sehr großen Fitabweichung von den Meßdaten.

Diskussion der Partikelzahl

Die Beschreibung mittels "Anomalem Diffusionsmodell" mit Auswirkung auf den gesamten Bilayer stimmt, nicht nur in diesem Beispielfall, am besten mit den gewonnenen Meßdaten überein. Bei den dargestellten Meßdaten sind andere für dieses System typische Merkmale zu erkennen. Bisher wurde die abweichende Partikelzahl kurz erwähnt, aber nicht diskutiert. Für die Diskussion sind ein paar Merkmale hinzuzufügen. Mit der Partikelzahl sind ebenfalls die mittleren Zählraten aufgeführt und es fällt auf, daß an der Unterseite mit $\frac{53kHz}{1,7} = 31kHz$ ein dreifach höherer Wert als bei der Zählrate pro Partikel an der Oberseite $\frac{21kHz}{2,0} = 10,5kHz$ zu finden ist. Dies ist auf die Fluoreszenz-Kontrastverstärkung beim verwendeten $100nm$ -Chip zurückzuführen und stellt eine schnelle Methode zur Überprüfung der starken Adhäsion dar. Aufgrund der erhöhten Zählrate pro Partikel sind die Abweichungen bei niedrigen Zeiten ($< 10^{-1}ms$) an der Unterseite gegenüber der Oberseite deutlich verringert und der Triplett-Anteil etwas erhöht.

Eine Abschätzung für das Hintergrundsignal der reflektierenden Fläche und die daraus resultierende Abweichung der Partikelzahl (Formel 3.10) liefert für die Unterseite einen erhöhten Wert $N_{scheinbar} = N_{real} / \left(1 - \frac{I_{Hintergrund}}{I_{Signal}}\right)^2 \approx 2,0 / \left(1 - \frac{1,5kHz}{53kHz}\right)^2 \approx 2,1$. Gleichzeitig ist das Detektionsvolumen im Fokusbereich aufgrund der stehenden Wellen und dem zu betrachtenden Halbraum drastisch verkleinert und damit auch der aus dem Volumen stammende Hintergrundsignalanteil. Leider ist gerade die Partikelzahl ein sehr unverlässlicher Parameter, da eine Vielzahl von Faktoren ihn beeinflussen können, so daß dieser Effekt nicht genauer beschrieben werden kann. Neben der erwähnten Erhöhung durch ein Hintergrundsignal muß bei jeder Messung berücksichtigt werden, daß sie nicht gleichzeitig sondern nacheinander durchgeführt werden. Damit wird die jeweilige andere Vesikelseite ebenfalls ausgebleicht. Der Triplettanteil ist bei hoher Verdünnung, wie in diesem Fall, ebenfalls ein etwas unsicherer Faktor, da bei den entscheidenden kleinen Zeiten das Rauschen recht hoch ist.

Ungeachtet dieser Tatsachen liegt der Fall bei dieser Beispielauswertung anders. Die großen Abweichungen für große Zeiten ($> 10^2ms$) deutet auf einen Schwingungs- oder Fluktuationseffekt hin. Für die größten Abweichungen ergibt sich eine Frequenz von $0,5Hz$ und ist damit eher Gebäude- und Aufbauschwingungen zuzuordnen, deren Schwankungen durch die Kontrastverstärkung noch höher ausfallen. Eine "Höhenfluktuation" der Membran scheint recht abwegig, da sie für 10% Intensitätsschwankung bereits mehr als $20nm$ betragen müßte und dieses Verhalten auch bei der Beobachtung mit viel Farbstoff (Abschnitt 5.3) zu sehen sein sollte. Nicht ganz so abwegig scheint eine fluktuierende Winkeländerung des Farbstoffs im Bereich von 20° , welche die gleiche Intensitätsschwankung erzeugen würde. Da aber im Fall von TRITC-DHPE die Winkelverteilung in der Membran nicht wie bei DiIC₁₈ streng vorgegeben und nicht statisch ist, fällt eine quantitative Abschätzung schwer. In jedem Fall von Schwingung oder Fluktuation würde der beschriebene Effekt der scheinbar reduzierten Partikelzahl in der Membran hervorgerufen.

Ein anderer Aspekt der Partikelzahl ist die Berechnungsmöglichkeit der mittleren Lipidfläche. Im observierten Bereich sind $N = 1,7$ die sich auf eine Bilayerfläche $2 \cdot A = 2 \cdot \pi \omega_o^2 = 0,46\mu m^2$ verteilen. Bei einem Lipid-Farbstoffverhältnis von $200\,000 : 1$ ergibt dies eine Lipiddichte von $0,74 \cdot 10^6 \frac{\text{Lipide}}{\mu m^2}$. Ein POPC-Lipid nimmt nach dieser Berechnung eine Fläche von $1,3nm^2$ ein. Entsprechende Literaturwerte

gehen von einem mittleren Fläche für POPC von $0,63nm^2$ in supported membranes aus [58]. Die hohe Verdünnung über mehrere Zwischenschritte bei der Herstellung der Lipidmischung rechtfertigen diese Abweichung durchaus. Ebenfalls muß davon ausgegangen werden, daß bei der Beobachtung zum Finden des Vesikels und bei der anschließenden Rasterfahrt zur Membranpositionierung ein Teil der Farbstoffe ausbleicht.

Darstellung in linearer Auftragung

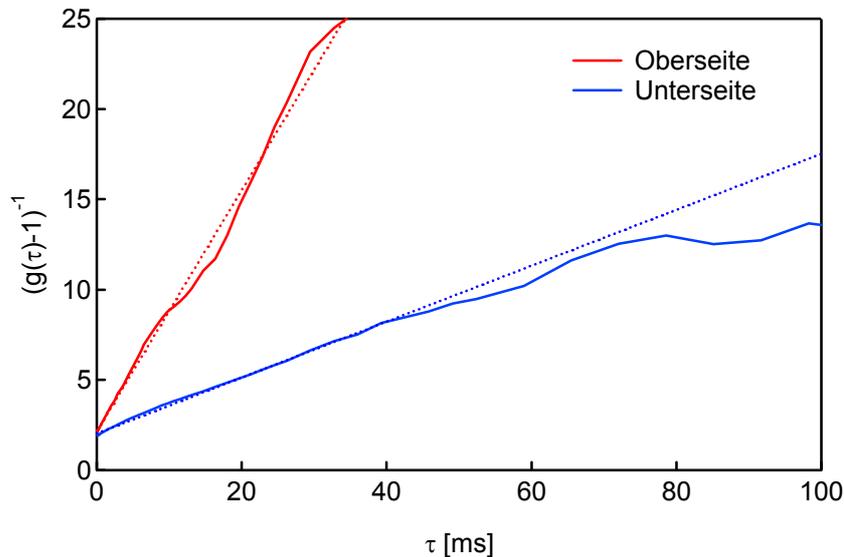


Abbildung 7.3: Lineare Auftragung der inversen Korrelationsdaten sowie deren lineare Regression im Zeitbereich $1 - 40ms$. Die gefundenen Parameter sind für die Oberseite $(g(\tau) - 1)^{-1} = 2,15\left(\frac{1}{3,22ms}\tau + 1\right)$ und für die Unterseite $(g(\tau) - 1)^{-1} = 2,03\left(\frac{1}{13,06ms}\tau + 1\right)$.

Einen einfacheren und anschaulicheren Einblick in die anomale Diffusion gestattet eine reduzierte Auswerteformel für die Korrelationsfunktion 4.1, die sich durch eine Umformung in eine Geradengleichung umwandeln läßt.

$$(g(\tau) - 1)^{-1} = N \left(\frac{1}{\tau_{diff}} \tau + 1 \right)$$

Nach einer Aufbereitung der Daten und einer in der Zeit linearen Auftragung lassen sich diese durch eine Gerade beschreiben. Der geeignete Zeitbereich für diese Art der Darstellung ist durch den starken Abfall der Funktion oberhalb des Tripletteinflusses und unterhalb des Übergangs zum unkorrelierten Mittelwert $g(\tau) = 1$ vorgegeben. In Abbildung 7.3 sind die oben beschriebenen Daten (Abb. 7.2) für diese Art der Darstellung aufbereitet und mit *Linearer Regression* gefittet. Die erhaltenen Wertepaare für die Oberseite ($N = 2,15$ und $\tau_{diff} = 3,22ms$) und für die Unterseite ($N = 2,03$ und $\tau_{diff} = 13,06ms$) sind mit den Parametern des komplexeren *Nichtlinearen Fits* für normale Diffusion vergleichbar. In dieser Art der Auftragung ist die Abweichung, die durch die anomale Diffusion in der Unterseite zustandekommt, als Abweichung von der Geraden gut zu erkennen und bestätigt die diskutierte Modellhypothese.

Die FCS gestattet durch die logarithmische Zeitskala eine detailliertere Betrachtung der Diffusion!

Durch die lineare Zeitauftragung wird der Vorteil der FCS-Messung verschenkt, da es durch den begrenzten Zeitbereich, wie bei der in Abschnitt 5.3.3.5 vorgestellten FRAP-Messung, unmöglich erscheint, zwischen Anomaler und Zwei-Komponenten Diffusion zu unterscheiden. Diese Aussage hin zur Anomalen Diffusion wird durch die scheinbare Störung des Normalsystems auf jeder Zeitskala begründet und so ist ein logarithmischer Zeitbereich unabdingbar.

7.2.2 Beispielauswertung für TRITC-DHPE auf Chip mit $2,73\mu\text{m}$ Oxiddicke

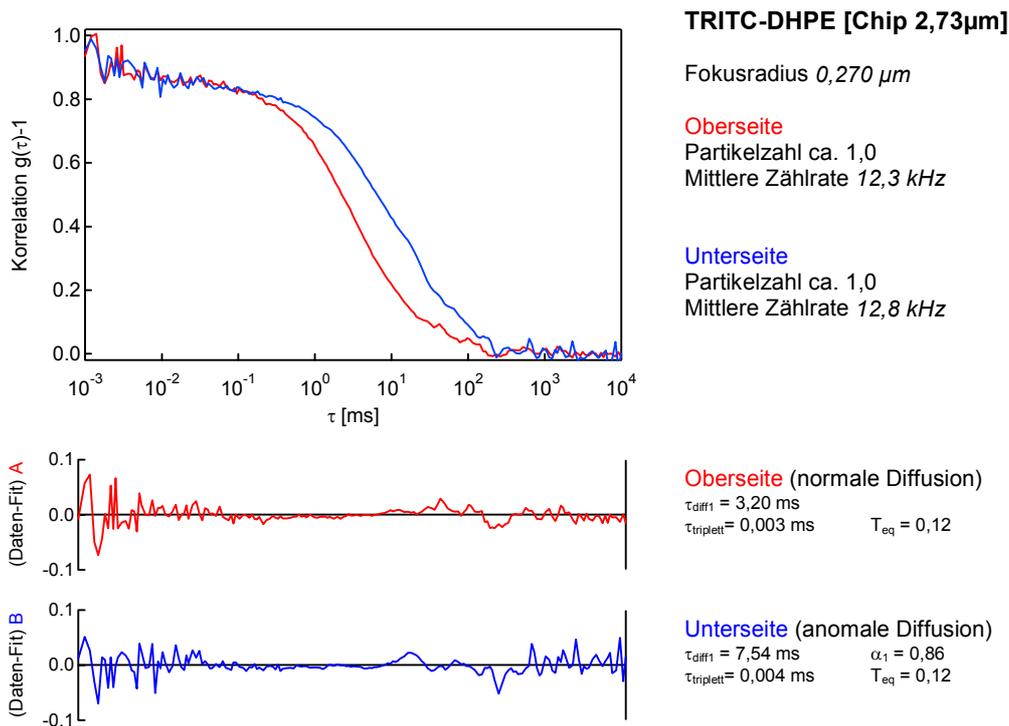


Abbildung 7.4: TRITC–DHPE Vesikel auf Chip mit $2,73\mu\text{m}$ Oxiddicke. **(oben)** Meßdaten für die Ober- und Unterseite. **(mitte A)** Abweichung des Fitmodells für normale Diffusion in der Oberseite. **(unten B)** Abweichung des Fitmodells für anomale Diffusion in der Unterseite.

Auf der gleichen Lipid-Farbstoffbasis POPC:TRITC-DHPE 200 000 : 1 beruht die nachstehende vorgestellte Beispielauswertung (Abb. 7.4). Der wesentliche Unterschied besteht nur im verwendeten Substrat, da ein Siliziumchip mit $2,73\mu\text{m}$ Oxiddicke eingesetzt wird. Bei der Auftragung der Meßwerte ist deutlich die Verschiebung der Unterseitendaten von den Oberseitendaten zu erkennen. Die Verschiebung nach rechts, zu höheren Diffusionszeiten, deutet auf eine verlangsamte Beweglichkeit der Membranbausteine auf diesem Substrat hin. Die Partikelzahlen liegen bei $N = 1,0$ und die Zählrate pro Partikel liegt mit ca. 12 kHz auf gleichem Niveau. Sie ist direkt mit dem Oberseitenwert für den 100 nm -Chip vergleichbar. Der hier verwendete $2,73\mu\text{m}$ -Chip unterliegt keiner derart ausgeprägten Fluoreszenz-Kontrastverstärkung.

Bei genauerer Betrachtung der Fitmodelle ergeben sich die gleichen Resultaten für die Beweglichkeitsbeschreibung der Lipid-Farbstoffsonde. Die Meßdaten der Freien Membran an der Oberseite sind am besten durch ein normales Diffusionsverhalten zu beschreiben, die der Kontaktmembran durch ein anomales Diffusionsverhalten. Dies wird durch die Abweichungen der Meßdaten vom jeweiligen Fitmodell, Teilbild **A** für die Oberseite und Teilbild **B** für die Unterseite, ausgedrückt. Aus den gefundenen Werten ergibt sich für die Oberseite eine Diffusionskonstante $D = \frac{(0,27\mu\text{m})^2}{4 \cdot 3,2\text{ms}} = 5,70 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und für die Unterseite ein Beweglichkeitswertepaar $D_\alpha = 2,7 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha}$ und $\alpha = 0,82$.

Die bei den Residuen verbleibenden Restabweichungen zeigen keine besonderen Auffälligkeiten mehr. Durch die gleiche Zählrate pro Partikel sind bei kleinen Verschiebungszeiten die Rauschdifferenzen auf gleichem Niveau. Bei großen Zeiten scheinen die Abweichungen an der Unterseite geringfügig größer zu sein, weichen aber keinesfalls in dem Maße voneinander ab, wie es beim 100nm-Chip gefunden wird. Ein Vergleich der Partikelzahlen zwischen diesen beiden Beispielauswertungen ergibt eine Halbierung bei gleicher Lipidzusammensetzung. Dies ist in diesem Fall auf eine größere Zahl von vorangegangenen Einzelmessungen zurückzuführen, die durch Bleichen die Farbstoffzahl herabsetzen.

7.2.3 Auswirkungen der Substratoberfläche

Aus der Betrachtung unterschiedlicher Substratoberflächen können Abschätzungen über die Verwendbarkeit des Meßprinzips vorgenommen werden. Auf den ersten Blick erscheint die stark reflektierende Siliziumoberfläche als großer Unsicherheitsfaktor. Nur auf den Chips ist eine exakte Abstandsmessung via Fluoreszenzkontrast möglich. Gleichzeitig sind die elektrischen Messungen (Abschnitt 5.3) auf diesem Substrat durchgeführt, so daß sich der Aufwand der genaueren Betrachtung auf jeden Fall für ein Verständnis des Systems lohnt.

Für die Untersuchung werden die drei Substrate eingesetzt: Standard-Deckglas, Silizium-Chip mit 100nm und mit 2,73µm Oxiddicke. Das Deckglas dient als Vertreter für schwach reflektierende Substrate (≈ 3%). Der 2,73µm-Chip hat die vollreflektierende Siliziumoxid-Silizium-Grenzfläche erst außerhalb der normalen Fokustiefe und zeigt einen schwachen Fluoreszenz-Kontrast. Der 100nm-Chip hingegen zeigt maximal verstärkte Fluoreszenz und die Fokustiefe beinhaltet die reflektierende Grenzschicht, er ist als der kritischste Kandidat einzustufen. Eine Oxiddicke mit maximaler Kontrastverstärkung (positive Flanke ≈ 60nm; negative Flanke ≈ 125nm) wird nur im Rahmen der FLIC-Rasterung vermessen (Oxiddicke 54nm). Sie zeigt keine besonderen Auffälligkeiten, welche nicht schon beim 100nm-Chip zu sehen sind.

| Variation: Substrat | Glas | Chip 100nm | Chip 2,73µm |
|---|--------------|--------------|--------------|
| Unterseite | | | |
| $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ | 2,97 ± 0,89 | 2,31 ± 0,50 | 2,35 ± 0,53 |
| α | 0,91 ± 0,06 | 0,85 ± 0,10 | 0,87 ± 0,06 |
| | <i>n</i> =25 | <i>n</i> =18 | <i>n</i> =12 |

Tabelle 7.2: Variation bei unterschiedlichen Substraten anhand des Beispielsvesikeltyps POPC:TRITC-DHPE 200 000 : 1. Ein Vergleich der Werte auf den Silizium-Chips mit 100nm und 2,73µm Oxiddicke liefert keinen Unterschied bezüglich der Diffusionswerte. Auf Glas scheint die Beeinflussung der Membran und damit des Diffusionsverhaltens weniger ausgeprägt zu sein. Die Zahl der Einzelmessungen *n* ist angegeben.

Die in Tabelle 7.2 aufgeführten Werte für die drei verwendeten Substrattypen bestätigen die Aussage zur anomalen Diffusion in der Kontaktmembran. Zwischen den beiden Chiptypen mit 100nm und $2,73\mu\text{m}$ -Oxiddicke ist kein Unterschied zu erkennen. So kann davon ausgegangen werden, daß sich die theoretischen Überlegungen zum Fokusbereich senkrecht zur optischen Achse (Abschnitt 3.7.3) bewahrheiten, dieser also nicht verändert wird. Die gefundenen Werte beruhen somit nicht auf Meßartefakte aufgrund einer optischen Fokusdeformation, sondern zeigen substratabhängiges Verhalten. In den weiteren Betrachtungen können die Beweglichkeitswerte des zweidimensionalen Systems der Siliziumchips zusammengefaßt werden.

Auf der Basis dieser Aussage stellen die leichten Abweichungen zwischen den Chip- und Deckglaswerten eine Membran-Beschichtung-Substrat-Eigenschaft dar. Die Prozedur zur Reinigung und Beschichtung der Substrate wird zwar gleich durchgeführt, aber aufgrund der Oberflächenunterschiede ist keine Gleichartigkeit zu erzielen. So läßt sich über diese Methodik nur die scheinbar etwas weniger ausgeprägte Beeinflussung der Beweglichkeit auf Glas feststellen. Die gereinigte Substratoberfläche wird als eher negativ geladen angesehen, hier gibt es durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Oberflächengruppen geringfügige Unterschiede zwischen dem oxidierten Chip und dem Glas. Die Rauigkeit sollte bei dem Siliziumeinkristall geringer sein und sich höchstens über wenige Atomlagen ausdehnen. Die Beschichtung mit dem positiv geladenen Poly-L-Lysin bewirkt eine Abschirmung und eine Überkompensation der Substratoberflächenladung. Die negativ geladenen Lipidvesikel werden über die elektrostatische Anziehung in den Zustand der starken Adhäsion gezwungen.

Unterschiedliche Substrate bewirken verändertes Diffusionsverhalten in der Kontaktmembran!

Der Vergleich mit Literaturdaten bieten sich die Werte für "supported bilayer" auf Quarz an. Für den Lipidfarbstoff TRITC-DHPE in POPC wird der Diffusionswert $3,47\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ angegeben [61]. Die gleiche Gruppe findet für das vergleichbare System mit dem Lipidfarbstoff TMR-POPE den Wert $1,42\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ [58].

Als kleiner Nachtrag des bei den FRAP-Messungen (Abschnitt 5.3.3.5) verwendeten Vesikelsystems aus POPC:DOPME:DiIC₁₈ 100 000 : 1 000 : 1 ergibt sich bei der FCS-Messung an der Kontaktmembran auf Chip das Wertepaar für die *Anomale Diffusion* $D_\alpha = 2,61 \pm 1,7\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha}$ und $\alpha = 0,87 \pm 0,05$. Die FCS-Messung liefert somit vergleichbare Ergebnisse. Gleichzeitig wird die Behauptung bei der Oberseitenbetrachtung bestätigt, daß DiIC₁₈ gegenüber den TRITC-DHPE-Werten etwas schnellere Diffusion zeigt.

7.2.4 Auswirkungen der Lipidzusammensetzung

Neben der Oberfläche spielt die Lipidzusammensetzung eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Membran-Beschichtung-Substrat. Als Basislipidmischung wird POPC:DOPME im Verhältnis 100 : 1 eingesetzt, da dadurch die Membran eine geringe negative Ladung erhält und so die starke Adhäsion über elektrostatische Wechselwirkungen erzielt wird. Bei einem derartigen System stellt sich die Frage, ob das geladene Lipid, wenn auch in hoher Verdünnung, nicht als Anker die Diffusion beeinträchtigt. Für die Untersuchung dieses Sachverhalts werden drei unterschiedliche Lipidverhältnisse erzeugt: Das schon beschriebene Verhältnis 100 : 1, dann eines mit 100 : 10 und schließlich noch eine Lipidbasis ohne DOP-

ME (100 : 0). Auch in der Lipidversion ohne DOPME ist eine starke Adhäsion der Kontaktmembran zu beobachten, aber die Haftung von kleinen Vesikeln scheint herabgesetzt. Als Ursachen für dieses Verhalten scheint eine leichte Verschmutzung des Lipids mit Varianten ohne angekoppelter Stickstoffgruppe und damit verbleibender negativer Ladung möglich. Alternativ wäre auch eine aufgrund des Dipolcharakters der POPC-Kopfgruppe verbleibende Nettoladung nach außen hin möglich, welche dann für die Adhäsion verantwortlich zeichnet.

| Variation: DOPME-Verhältnis | 200 000 : 0 : 1 | 200 000 : 2 000 : 1 | 200 000 : 20 000 : 1 |
|---|--|---|--|
| Oberseite $D \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$ | $5,74 \pm 1,45$ <i>n</i> =46 | $5,84 \pm 1,33$ <i>n</i> =118 | $6,77 \pm 1,60$ <i>n</i> =17 |
| Oberseite (anomal) $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ α | $6,17 \pm 1,17$ $0,97 \pm 0,06$ <i>n</i> =46 | $6,14 \pm 1,12$ $0,98 \pm 0,06$ <i>n</i> =118 | $7,80 \pm 0,91$ $0,93 \pm 0,05$ <i>n</i> =17 |
| Unterseite Glas $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ α | $2,97 \pm 0,89$ $0,91 \pm 0,06$ <i>n</i> =19 | $3,66 \pm 1,16$ $0,91 \pm 0,09$ <i>n</i> =25 | $3,68 \pm 1,58$ $0,83 \pm 0,07$ <i>n</i> =10 |
| Unterseite Chip $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ α | $2,32 \pm 0,50$ $0,86 \pm 0,09$ <i>n</i> =30 | $2,42 \pm 0,32$ $0,90 \pm 0,05$ <i>n</i> =14 | $3,20 \pm 1,26$ $0,85 \pm 0,06$ <i>n</i> =19 |

Tabelle 7.3: Variation des Lipidverhältnisses POPC:DOPME:TRITC-DHPE. Die gefundenen Werte zeigen keine allzu großen Abweichungen. Bei genauerer Betrachtung ist ein Trend zu größerer Mobilität bei zunehmender DOPME-Konzentration erkennbar. Dies ließ sich durch dessen zweite cis-Doppelbindung und durch eine Lockerung des Membranverbunds durch die geladenen Kopfgruppen erklären. Ebenfalls leicht erhöht ist die Abweichung vom normalen Diffusionsmodell, welche aber erst mit sehr hoher DOPME-Konzentration einzusetzen scheint. Die Zahl der Einzelmessungen *n* ist angegeben.

Wie in Tabelle 7.3 dargestellt, bewirkt eine Zugabe des als Fixierpunkt gedachten DOPME keine Verlangsamung der Diffusion, sondern im Gegenteil sogar eine Verschnellerung. Sowohl in der Oberseite als auch in der Unterseite scheint damit ein Mechanismus aktiv zu sein, welcher die Beweglichkeit der Farbstoffsonden fördert. Die wohl naheliegendste Erklärung hierfür ist in der Struktur der Lipide zu finden. POPC zeichnet sich besonders dadurch aus, daß durch die einfache cis-Bindung in einer der Fettsäuren die Fluidität der Membran derart gesteigert wird, daß sie erst bei sehr kleinen Temperaturen in den kristallinen Zustand übergeht. DOPME besitzt solche cis-Bindungen an beiden Fettsäureketten und eine gesteigerte Fluidität der dotierten Membran scheint wahrscheinlich. Eine andere Erklärung wäre eine leichte Lockerung des Membranverbunds durch die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen DOPME-Lipide. Dies würde auch mit den Beobachtungen in einem POPC:POPG-Lipidsystem [17] übereinstimmen. Für das Lipid-Farbstoffsystem POPC:POPG:NBD-eggPE 1250 : 0 : 1 ergibt sich eine Diffusionskonstante bei $T = 25^\circ\text{C}$ von $6,1 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und bei dem Verhältnis 1250 : 312 : 1 ein Wert von $6,5 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ wobei jeweils eine mobile Fraktion von ca. 94% angegeben wird. Für ein reines POPG-Lipidsystem ist der Diffusionswert des Farbstoffs um 20 – 25% gegenüber der reinen POPC-Membran erhöht.

Die Lipidzusammensetzung beeinflusst die Membranviskosität!

Der Parameter α zeigt eine leichte Veränderung hin zu einer deutlicheren Abweichung vom normalen Dif-

fusionsverhalten bei zunehmender DOPME-Konzentration an. Dieser Effekt ist in der Ober- und Unterseite des Vesikels zu sehen und deutet eventuell auf kleine Entmischungsinseln der Lipide bei hohen Konzentrationen hin, welche als eine Ursache für anomale Diffusion anzusehen ist. Die kleinen Abweichungen des α -Parameters beim anomalen Diffusionsfit der Oberseite für kleine DOPME-Konzentrationen sind aufgrund des deutlich größeren Fehlers nicht signifikant. Erst beim Verhältnis 10 : 1 läßt sich eine Abweichung erkennen.

7.2.5 Membranflecken geplatzter Vesikel

Die Messung der Diffusion in Membranflecken gestaltet sich in der vorgestellten Konfiguration problematisch, da sie durch die geringe Farbstoffkonzentration nicht in der Fluoreszenz und mangels Kontrast auch nicht in der Normalansicht zu erkennen sind. Die einzige Meßmöglichkeit besteht, wenn das Vesikel während der Messung oder Beobachtung platzt. Erstaunlicherweise ist dieses Ereignis relativ selten. Das Platzen findet zumeist während des Adhäsionsvorgangs statt, d.h. beim Kontakt mit dem Substrat oder kurz danach. Vesikel, die diesen Stress verkraften, sind im allgemeinen sehr lange beständig. Nach dem selten Platzen eines beobachteten Vesikels wird bei der Messung sehr schnell ein neues aufgesucht. Ob dieser Tatsache ist die experimentelle Statistik für einen "Membran auf Substrat"-Typ sehr gering. Eine Abschätzung bezüglich des Diffusionsverhaltens zeigt keine Abweichungen zu dem der Kontaktmembran. Für TRITC-DHPE:DOPME:POPC 1 : 2 000 : 200 000 auf 100nm-Chip ergibt sich aus $n = 3$ Messungen das Beweglichkeitswertepaar für die *Anomale Diffusion* $D_\alpha = 2,18 \pm 0,18 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha}$ und $\alpha = 0,94 \pm 0,02$. Die Unterschiede der elektrischen Daten von Kontaktmembran und geplatztmembran [20] lassen nicht durch ein verändertes Diffusionsverhalten veranschaulichen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Diffusionsmessung in Membranflecken ist die Veränderung des Systems bezüglich seiner Fluktuationseigenschaften. Die Membranflecken zeigen den gleichen Abstand zum Substrat, aber unterliegen nicht den gleichen Zwangsbedingungen wie ein adhärirtes Riesenvesikel. Die Vergleichbarkeit der Diffusionswerte zeigt leider keine meßbaren Auswirkungen auf das anomale Diffusionsverhalten, so daß eine Interpretation bezüglich einer Mikrofluktuation des Membransystems nicht möglich ist.

7.3 Sulforhodamin G-Gramicidin C

Das mit Sulforhodamin G markierte Gramicidin C (SRh-GramC) dient in dieser Arbeit als Vertreter der kanalbildenden Membranproteine. Es ist bereits während der Vesikelherstellung einbaubar und eine definierte Lipid-Protein-Zusammensetzung zu erzielen. Eingesetzt wird die gleiche Konzentration wie bei den Lipid-Farbstoffen, d.h. POPC:DOPME:SRh-GramC 100 000 : 1 000 : 1. Daß die Modifikation des Antibiotikums durch das Ankoppeln des Farbstoffs keine Auswirkung auf seine Funktion als kanalbildendes Protein zeigt, wird in Abschnitt 5.3 nachgewiesen.

7.3.1 Beispielauswertung für SRh-GramC auf Chip mit 100nm Oxiddicke

In dieser Beispielauswertung (Abb. 7.5) wird die Problematik der Messung an dem verwendeten SRh-GramC dargestellt. Bei der Herstellung des markierten Proteins durch Ankoppeln des Fluoreszenzfarbstoffs Sulforhodamin an das Tyrosin des Gramicidin C verbleibt eine geringe Restmenge des Farbstoffs ungebunden im Produkt. Bei der Herstellung schwimmt auch freier Farbstoff in der Lösung und ist deswegen ebenfalls im Vesikelinneren zu finden. Das Vesikeläußere wird durch das mehrmalige Umsetzen in die Glucoselösungen verdünnt, wodurch dort kaum freier Farbstoff vorhanden ist. Durch diese zusätzlich diffundierende Komponente auf nur einer Membranseite wird nicht so sehr die Auswertung, als vielmehr die Positionierung des Fokus in der Membranebene etwas erschwert.

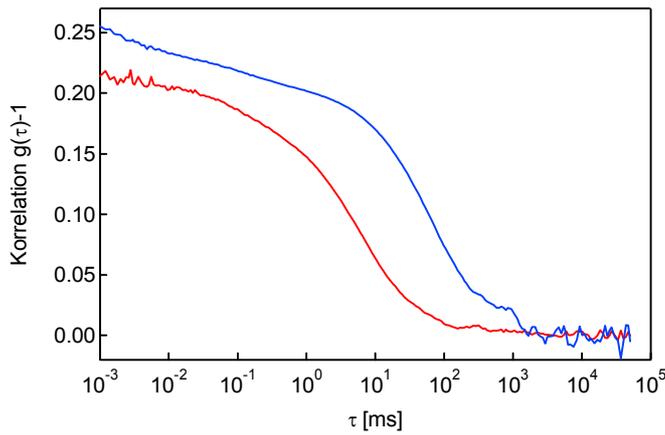
Auch bei diesem Membransystem ist eine deutliche Verschiebung der Korrelationsdaten der Vesikelunterseite gegenüber der Oberseite hin zu größeren Zeiten und zu kleineren Partikelzahlen zu erkennen. Diese Übereinstimmung mit der oben für TRITC-DHPE auf einem 100nm-Chip gemachten Feststellung setzt sich bei der Bewertung der partikelbezogenen Zählrate fort. Für die Oberseite ergibt sich hier ein Wert von $\frac{80kHz}{3,4} = 24kHz$ und für die Unterseite der deutlich erhöhte Wert $\frac{172kHz}{2,9} = 59kHz$. Der Einfluß der Fluoreszenzverstärkung ist auch hier feststellbar.

Oberseite - Teilbild 7.5 A bis C

Die allgemeine Auswerteformel (4.1) braucht für die folgenden Betrachtungen nicht in ihrem ganzen Umfang berücksichtigt werden. Für die Diffusion im zweidimensionalen Membransystem kann entweder über $k = \left(\frac{\omega_z}{\omega_o}\right)^2 = 0$ oder durch die $\delta_{k2} = \delta_{k3} = 0$ eine Entkopplung vom Volumenfokussystem, $k = 0,04$ entspricht $\omega_z = 5 \cdot \omega_o$, erzielt werden.

$$G(\tau) - 1 = G_1 + G_0 \left[1 - T_{eq} \left(1 - e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}} \right) \right] \left[\frac{(1 - R_2)}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{diff1}}} \right) \sqrt{1 + k \frac{\tau^{\alpha_1}}{\tau_{\text{diff1}}}}} + \frac{R_2}{\left(1 + \frac{\tau^{\alpha_2}}{\tau_{\text{diff2}}} \right)} \right]$$

Die sich schon durch eine erhöhte Zählrate im Vesikelinneren bemerkbar machende Störung des reinen Membransystems, macht sich auch im nichtlinearen Parameterfit bemerkbar. In Teilbild A zeigt der Fit mit dem Modell der *Normalen Diffusion* funktionelle Abweichungen im unteren Zeitbereich ($< 10^1 ms$). Typisch sind auch bei diesem fehlgeschlagenen Fit die sich ergebenden Phantasiewerte für den Triplet-

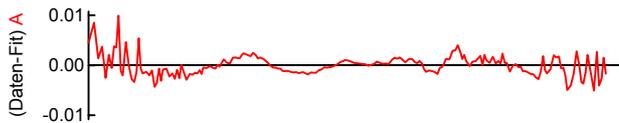


SRh-GramC [Chip100nm]

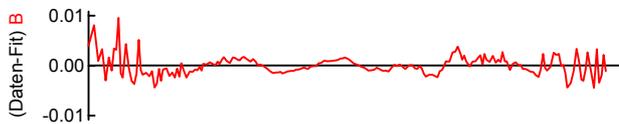
Fokusradius $0,328 \mu\text{m}$

Oberseite
 Partikelzahl ca. 3,4
 Mittlere Zählrate 80 kHz

Unterseite
 Partikelzahl ca. 2,9
 Mittlere Zählrate 172 kHz



Oberseite (normale Diffusion)
 $\tau_{\text{diff1}} = 5,53 \text{ ms}$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,108 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,17$

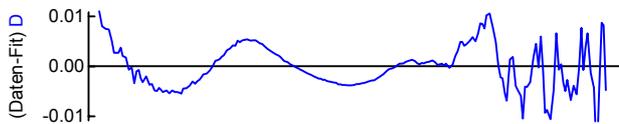


(anomale Diffusion)
 $\tau_{\text{diff1}} = 4,57 \text{ ms}$ $\alpha_1 = 0,93$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,08 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,14$

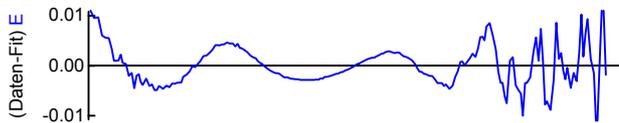


(normale Diff.; 2 Komponenten)
 $\tau_{\text{diff1}} = 0,12 \text{ ms}$ $k_1 = 0,04 \text{ fix}$
 $\tau_{\text{diff2}} = 6,09 \text{ ms}$ $R_2 = 0,80$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,003 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,04$

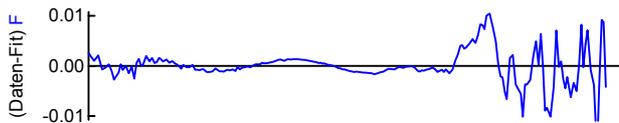
anomale Diffusion liefert $\alpha_2 = 0,99$



Unterseite (normale Diffusion)
 $\tau_{\text{diff1}} = 55,66 \text{ ms}$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,088 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,15$



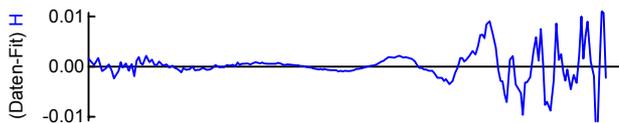
(anomale Diffusion)
 $\tau_{\text{diff1}} = 30,22 \text{ ms}$ $\alpha_1 = 0,86$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,047 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,13$



(normale Diff.; 2 Komponenten)
 $\tau_{\text{diff1}} = 0,17 \text{ ms}$ $k_1 = 0,04 \text{ fix}$
 $\tau_{\text{diff2}} = 60,51 \text{ ms}$ $R_2 = 0,86$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,004 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,10$



(anomale Diff.; 2 Komponenten)
 $\tau_{\text{diff1}} = 0,092 \text{ ms}$ $k_1 = 0,04 \text{ fix}$
 $\tau_{\text{diff2}} = 40,38 \text{ ms}$ $\alpha_2 = 0,93$
 $R_2 = 0,87$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,004 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,10$



(normale Diff.; 3 Komponenten)
 $\tau_{\text{diff1}} = 0,11 \text{ ms}$ $k_1 = 0,04 \text{ fix}$
 $\tau_{\text{diff2}} = 48,38 \text{ ms}$ $R_2 = 0,78$
 $\tau_{\text{diff3}} = 424,08 \text{ ms}$ $R_3 = 0,09$
 $\tau_{\text{triplett}} = 0,003 \text{ ms}$ $T_{\text{eq}} = 0,11$

Abbildung 7.5: SRh-GramC-Vesikel auf Chip mit 100 nm Oxiddicke. (**oben**) Meßdaten für die Ober- und Unterseite. (**mitte A bis C**) Abweichungen der Fitmodelle für die Oberseite. (**unten D bis H**) Abweichungen der Fitmodelle für die Unterseite.

anteil, welche mit $\tau_{\text{triplett}} = 108\mu\text{s}$ und $T_{\text{eq}} = 0,17$ das Scheitern des Modellsystems anzeigen. Daß die anomale Diffusion kein Allheilmittel für Mehrkomponentensysteme ist, zeigt Teilbild **B**. Zwar ermöglicht ein weiterer freier Parameter eine bessere Anpassung an die Meßdaten, aber die funktionellen Abweichungen bleiben, wenn auch verringert, erhalten und auch die Triplettzeit $\tau_{\text{triplett}} = 80\mu\text{s}$ ist inakzeptabel. Erst die Funktionswerte eines Zwei-Komponenten-Modells liefern eine gute Übereinstimmung mit den Meßdaten (Teilbild **C**). Die sich ergebenden Diffusionskonstanten $D_1 = \frac{(0,328\mu\text{m})^2}{4 \cdot 0,12\text{ms}} = 224\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und $D_2 = \frac{(0,328\mu\text{m})^2}{4 \cdot 6,09\text{ms}} = 4,42\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ können klar getrennt werden. Für die erste Komponente wird hierbei das aus der Messung von freiem Farbstoff bekannte Volumenmodell des Fokus verwendet, da es wohl am ehesten zu vorliegendem Fall paßt. Ob der etwas zu niedrige Diffusionswert des freien Farbstoffs bedeutet, daß ebenfalls noch SRh-GramC in der Lösung vorliegt oder ob nur die höhere Kompartimentanzahl die Exaktheit beeinträchtigt, kann aus den Daten nicht entnommen werden. Die sich bei diesem Modell ergebenden Triplettwerte $\tau_{\text{triplett}} = 3\mu\text{s}$ und $T_{\text{eq}} = 0,04$ bewegen sich im Rahmen des üblichen für ein Rhodamin-System. Der Partikelanteil von SRh-GramC $R_2 = 80\%$ zeigt in diesem Fall nicht nur den Unterschied der einzelnen Komponenten, sondern trennt gleichzeitig den zweidimensionalen von dem dreidimensionalen Diffusionsanteil.

Ein weiterführender Fit mit einem anomalen Diffusionsmodell für die zweite Komponente liefert keine Verbesserung der Übereinstimmung von Daten und Modell. Mit $\alpha_2 = 0,99$ bestätigt sich die Richtigkeit des normalen Diffusionsmodells für die Membrankomponente.

SRh-Gramicidin C in der Freien Membran zeigt normales Diffusionsverhalten!

Oberseite - Teilbild 7.5 D bis H

Wie nicht anders zu erwarten, scheitern für die Meßdaten der Kontaktmembran alle Fitversuche mit weniger als zwei Komponenten (Teilbild **D** und **E**). Auch der an der oberen Membran zutreffende Fall der normalen Diffusion zweier Partikeltypen liefert Abweichungen (Teilbild **F**). Bei der Betrachtung der sich ergebenden Fitparameter fällt auf, daß nicht mehr der Triplettparametersatz zur Kaschierung der Modellmängel herhalten muß, $\tau_{\text{triplett}} = 4\mu\text{s}$ und $T_{\text{eq}} = 0,10$ sind normale Werte, sondern die dem freien Farbstoff zuzuordnende erste Diffusionszeit $\tau_{\text{diff1}} = 0,17\text{ms}$ zu hoch erscheint.

Im nächsten Teilbild **G** sind die Residuen für das Fitmodell der anomalen Diffusion der zweiten Komponente dargestellt. Dieses Modell beschreibt die Meßdaten in ihrem funktionalen Verlauf am besten und auch die bestimmten Werte zeigen keine Auffälligkeiten. Der Triplettanteil ist mit $\tau_{\text{triplett}} = 4\mu\text{s}$ und $T_{\text{eq}} = 0,10$ in einem normalen Wertebereich und die erste Diffusionszeit $\tau_{\text{diff1}} = 0,092\text{ms}$ führt zu einer Diffusionskonstanten $D = \frac{(0,328\mu\text{m})^2}{4 \cdot 0,092\text{ms}} = 292\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, welche dem freien Farbstoff zuzuordnen ist. Der Anteil der zweiten Komponente $R_2 = 87\%$ stimmt gut mit dem Verhältnis an der Oberseite überein; es ergibt sich das Beweglichkeitswertepaar $D_\alpha = 0,67\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}\alpha}$ und $\alpha = 0,93$. Die leichte Restwelligkeit der Abweichungen stammen eventuell vom vorgegebenen fixen k -Wert der ersten Komponente, der für ein gaußförmiges Volumenmodell gültig ist, jedoch durch die Fokusmodifikation vor einer spiegelnden Fläche seine Gültigkeit verliert, und hier mangels besserer Modelle eingesetzt wird.

SRh-Gramicidin C in der Kontaktmembran zeigt anomales Diffusionsverhalten!

In Teilbild **H** ist der Abweichungsgraph für einen Drei-Komponentenfit dargestellt. Er beschreibt den Verlauf der Meßdaten jedoch deutlich schlechter. Der Parametersatz liefert zwei Membrankomponenten mit dem Gesamtanteil von 87% und den Diffusionskonstanten $D_2 = \frac{(0,328\mu\text{m})^2}{4\cdot 48,38\text{ms}} = 0,56\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und $D_3 = \frac{(0,328\mu\text{m})^2}{4\cdot 424,08\text{ms}} = 0,063\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Diese Werte sind ebenfalls nicht mit unterschiedlichem Monolayerverhalten zu erklären, da hier bei einer derartigen Interpretation ein scheinbarer immobilere Anteil im unteren Monolayer von 89% aufträte, welcher aber als sehr unwahrscheinlich anzusehen ist, und sich die Gesamtmembranpartikelzahl nicht derart dramatisch ändert. Die Diffusionskonstante der freien, schnellen Komponente liegt mit $D_1 = \frac{(0,328\mu\text{m})^2}{4\cdot 0,11\text{ms}} = 245\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ auch hier im Bereich des wasserlöslichen Rhodamins. Trotz der höheren Gesamtkomponentenzahl sind die Meßdaten mit diesem Modell nicht genau zu beschreiben und die Verteilung der Diffusionszeiten deutet auf den eigentlich quasikontinuierlichen Verlauf der anomalen Diffusion hin. Sie bestätigen die dort (Teilbild **G**) gefundene Parameterinterpretation.

Der Wertebereich für $\tau > 10^1\text{ms}$ ist, wie bei der Beispielauswertung von TRITC-DHPE auf 100nm-Chips, durch starkes Rauschen geprägt, das in diesem Maße bei der Oberseite nicht zu beobachten ist. Die Frequenz der größten Schwingung liegt mit 2Hz im gleichen Schwingungsbereich und läßt sich ebenfalls durch eine kontrastverstärkte Gebäude-Aufbau-Bewegung erklären.

7.3.2 Vergleich Ober- und Unterseite für SRh-GramC

Zusammengefaßt lassen sich für die mit Sulforhodamin G markierten Gramicidin C Moleküle die in Tabelle 7.4 aufgeführten Beweglichkeitswerte finden. Der gefundene Diffusionswert für die Oberseite ist direkt mit Daten aus der Literatur [66] zu vergleichen. Für ein EPC-Multibilayersystem wird ein linearer Anstieg der Diffusionskonstante von $2\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bei 5°C bis $5\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bei 35°C für die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dansyl markierte Gramicidin C Variante gefunden. Bei 25°C folgt daraus die Diffusionskonstante $D = 4\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$.

| | Oberseite | | Unterseite Glas | Unterseite Chip |
|---|------------------------|---|---|---|
| $D \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$ | $3,80 \pm 1,01$ $n=66$ | $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ | $1,01 \pm 1,28$ $0,95 \pm 0,10$ $n=20$ | $1,83 \pm 1,48$ $0,88 \pm 0,13$ $n=22$ |

Tabelle 7.4: Diffusion von Sulforhodamin G-Gramicidin C in der Ober- und Unterseite. Die Diffusion in der Kontaktmembran ist gegenüber der Freien Membran verlangsamt und zeigt anomales Verhalten. Die Zahl der Einzelmessungen n ist angegeben.

Interessant ist an dieser Stelle ein Versuch zu entscheiden, ob das SRh-GramC bevorzugt als Monomer oder als Dimer vorliegt. Hierfür wird dem eigentlichen Lipid-Protein-Ansatz mit POPC:DOPME:SRh-GramC 100 000 : 1 000 : 1 ein starker Überschuß an nicht markiertem Gramicidin C zugegeben, so daß auf 200 ungelabelte Gramicidine ein markiertes entfällt. Die Zählrate pro Partikel verändert sich nicht, damit diffundieren bevorzugt Monomere im für obige Messungen verwendeten Membrantyp. Bei derart kleinen Konzentrationen ist dieses Verhalten zu erwarten. Die Grenze, bei der ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren angegeben wird, liegt bei eine Lipid-Gramicidinverhältnis 10 000 : 1 [69]. Sachdienlicher ist die Gleichgewichtskonstante für die Dimerbildung mit $K = \frac{n_d}{(n_m - 2n_d)^2} < 2 \cdot 10^{-4}\mu\text{m}^2$ [29]. Hieraus

folgt für die beobachtete Monomer-Gramicidindichte $n_m = \frac{N}{\pi\omega_0^2} = \frac{3,5}{\pi(0,328\mu\text{m})^2} \approx 10 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$ eine Dimerdichte $n_d \approx n_m^2 \cdot K < 0,02 \frac{1}{\mu\text{m}^2}$. Für die höhere Konzentration folgt aus $n_m \approx \frac{2000}{\mu\text{m}^2}$ eine Dimerdichte $n_d < \frac{350}{\mu\text{m}^2}$, dies führt zu einer Konstellation bei der das Verhältnis Monomere-Dimere etwa 4 : 1 ist. Dieser Anteil an Dimeren läßt sich bei einem Zwei-Komponentensystem und nur kleinen Diffusionskonstantendifferenzen nicht durch den FCS-Parameterfit trennen. Der in Abschnitt 5.3 gefundene Wert der Membranleitfähigkeit $g_{JM} = 5 \frac{\text{mS}}{\text{cm}^2} = 50 \frac{\text{pS}}{\mu\text{m}^2}$ führt bei einer Kanalleitfähigkeit $\Lambda = 12,3\text{pS}$ zur einer Kanaldichte von $n_d \approx 4$. Leider sind diese elektrischen Werte nicht direkt vergleichbar, da bei der Bestimmung der Einzelkanalleitfähigkeit [45] eine höhermolare Salzkonzentration (100mM KCl) verwendet wurde. Die unterschiedliche Dimer-Dichte könnte auch durch eine verstärkte Fluktuation der Membran im Kontaktbereich hervorgerufen werden, welche als eine Ursache für die *Anomale Diffusion* anzusehen ist. Die Dimerbildung und vor allem die anschließende Trennung der einzelnen, für die Membran zu kurzen, Gramicidine ist auf örtliche Membranfluktuationen zurückzuführen, welche die aneinander haftenden Moleküle separiert.

7.3.3 Problem der Positionierung

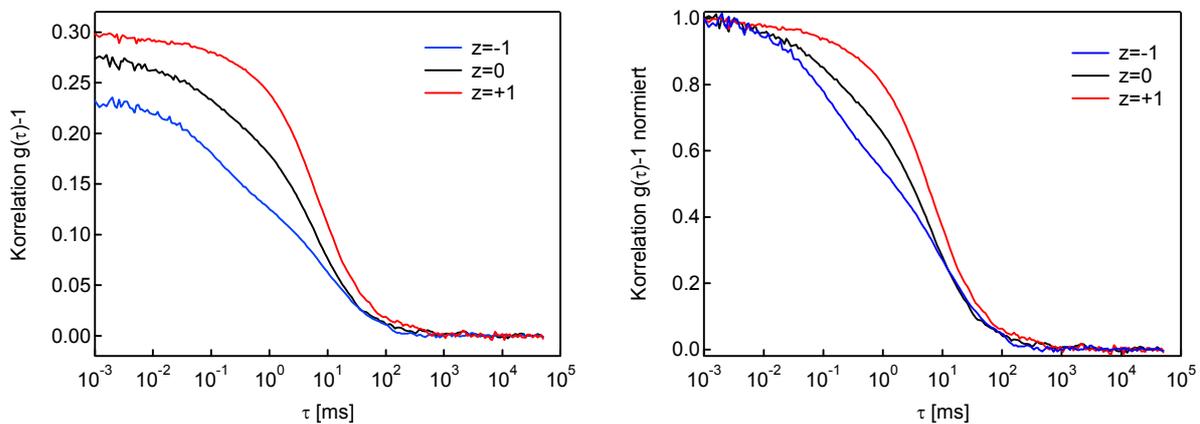


Abbildung 7.6: SRh-GramC Vesikel an der Oberseite bei Variation der Z-Position. Die Angaben entsprechen jeweils Mikrometerschritten, wobei negativere Werte ins Vesikelinnere gerichtet sind. **(links)** Die Amplitude der Korrelationskurven deutet auf eine Vergrößerung der Partikelzahl zum Vesikelinneren hin. **(rechts)** Die Formveränderungen der normierten Korrelationsfunktionen zeigen zunehmende Zwei-Komponentenanteile zum Vesikelinneren hin an.

Der freie Farbstoff im Vesikelinneren führt, wie im Beispiel oben beschrieben, nicht nur zu einer komplexeren Auswertung, sondern erschwert auch während der Messung die Positionierung des Fokus im Membranbereich. In Abbildung 7.6 sind die Veränderungen der Meßkurven an der Vesikeloberseite bei unterschiedlichen Positionen zu erkennen. Negativere Z -Werte entsprechen einer Positionierung zum Vesikelinneren hin. Durch den Farbstoff im Inneren nimmt die Partikelzahl dorthin zu, entsprechend die Meßamplitude ab. In der normierten Darstellung ist der wachsende Einfluß der schnelleren Komponente gut zu sehen.

In Tabelle 7.5 sind die ermittelten Fitparameter aufgeführt. Entgegen der bei den anderen Wertaufflistungen angegebenen Standardabweichungen aller Messungen am gleichen System, sind hier die Abweichungen der Einzelmessung dargestellt. Durch die beschränkte Schrittmotorenauflösung $1\mu\text{m}$ kann die Mem-

| Variation: Z [μm] | -2 | -1 | 0 | +1 | +2 | +3 |
|---------------------------------------|-----|-------------------|------------------|------------------|--------------|--------------|
| Partikelzahl | 2,5 | 4,3 | 3,6 | 3,4 | 9 | 29 |
| Zählrate [$k\text{Hz}$] | 33 | 47 | 54 | 65 | 32 | 14 |
| τ_{diff1} [ms] | | $0,108 \pm 0,003$ | $0,085 \pm 0,01$ | $0,092 \pm 0,01$ | | |
| τ_{diff2} [ms] | | $9,21 \pm 0,17$ | $5,83 \pm 0,08$ | $6,72 \pm 0,06$ | ≈ 16 | ≈ 43 |
| R_2 [%] | | $56,0 \pm 0,3$ | $75,2 \pm 0,3$ | $92,4 \pm 0,3$ | 100 | 100 |

Tabelle 7.5: Variation der Position an der Vesikeloberseite. Negative Werte verschieben den Fokus in das Innere, positive in das Vesikeläußere. Im Inneren ist aufgrund des Herstellungsprozesses eine höhere Konzentration an freiem Farbstoff vorhanden. Für die erste Komponente wird bei dem Fit $k=0,04$ fix vorgegeben, also ein Volumenmodell verwendet.

bran nur bedingt im Fokusmaximum positioniert werden, so daß die optimale Lage zwischen $0\mu\text{m}$ und $+1\mu\text{m}$ angenommen wird. Die Diffusionskonstanten dieser Positionen liegen bei $D_{0\mu\text{m}} = 4,6\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und $D_{+1\mu\text{m}} = 4,0\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Die erste Komponente für ist dem freien Farbstoff zuzuordnen. Es ergibt sich der Wertebereich $250 - 320\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, wobei ein Volumenfokusmodell mit $k = 0,04$ bei der Parameterermittlung fest vorgegeben wird. Dieser Umstand berücksichtigt nicht die Verteilung dieser Komponenten ausschließlich in nur einem Membranhilbraum. Deshalb erreichen die gefundenen Werte nur bedingt die Präzision des üblichen Meßdaten-Modell-Zusammenhangs.

Da durch den zusätzlichen Farbstoff bei der Suche nach der richtigen Membranlage zumindest in einer Richtung ein Verwaschungseffekt auftritt, wird die ohnehin sorgsam vorzunehmende Positionierung auf ein fluktuierendes System zusätzlich erschwert. Dieses Problem der Positionierung durch den freien Farbstoff in nur einem durch die Membran getrennten Halbraum läßt sich durch eine bei der Vesikelherstellung größere Menge an Saccharose-Lösung weitestgehend beheben, da dann der wasserlösliche Farbstoff in einer höheren Verdünnung vorliegt, und die Zählrate nicht beeinflusst. Diese Maßnahme wird bei den meisten Messungen an SRh-GramC vorgenommen und verbessert die Membransuche und die Auswertung spürbar. Zusätzlich ist diese Problematik mit ein Grund für die Änderung des Fokusradius auf $0,27\mu\text{m}$ durch die Verbreiterung des Anregungsstrahls, da dadurch zusätzlich das Fokusvolumen eingeschränkt wird.

Bei der Betrachtung der Werte für die Positionen $+2\mu\text{m}$ und $+3\mu\text{m}$ ist fern der eigentlichen Fokuslage noch eine diffundierende Komponente zu erkennen. Dies rührt vom "Abrastern" des Anregungsstrahls durch die Membranposition her, da die Detektierbarkeitsfunktion hier die Intensität zwar insgesamt deutlich abschwächt, aber nicht vollständig unterdrückt. Eine Abschätzung der Anregungsapertur durch $\omega_{+1\mu\text{m}} = 0,328\mu\text{m}$, $\omega_{+2\mu\text{m}} = \omega_{+1\mu\text{m}} \cdot \sqrt{\frac{\tau_{+2\mu\text{m}}}{\tau_{+1\mu\text{m}}}} = 0,328\mu\text{m} \cdot \sqrt{\frac{16\text{ms}}{6,7\text{ms}}} = 0,51\mu\text{m}$ und $\omega_{+3\mu\text{m}} = 0,83\mu\text{m}$ liefert eine mittlere Radiuszunahme pro Mikrometer von $0,217\mu\text{m}$. Die Anregungsapertur folgt daraus mit $\sigma = n \cdot \sin \delta = 1,333 \cdot \frac{0,217}{1} = 0,29$. Dieser Wert ist nicht direkt mit der Betrachtung aus Abschnitt 6 zu vergleichen, da dort eine Konstellation mit kleinerem Fokusradius gewählt ist. Bei der hier verwendeten Gaußanregung von $\omega_1 \approx 1\text{mm}$ ergibt sich für das verwendete Zeiss x63/0,9W Objektiv eine Anregungsapertur von $\sigma_{\text{N.A.}} = 0,29$, die mit der aus den Diffusionszeiten ermittelten übereinstimmt.

7.4 Funktionsuntersuchung am Flip-Flop-Designerprotein LAH₄

Das Designerprotein LAH₄ dient als Vertreter der lageändernden Membranproteine. Abhängig von äußeren Einflüssen, in diesem Fall des *pH*-Werts, verändert das Protein seine Ausrichtung und liegt einmal in der Membranebene (*pH* < 5,5) und einmal transmembran (*pH* > 7) vor [4][5]. Im Gegensatz zum Gramacidin C ist es nicht gelungen, das Protein während der Vesikelherstellung einzulagern. Dies mag an der eher sauren Herstellungsumgebung liegen. Um das Protein dennoch einzubinden, wird es nach der Vesikelherstellung über eine Methanollösung zugeführt. Dafür wird 10 μ l einer 5 μ M-Methanollösung von SRh-LAH₄ gleichmäßig über die in der ungepufferten Glucoselösung schwimmenden Lipidvesikel getropft und anschließend durch leichtes schwenken verteilt. Bei Verwendung wesentlich höherer Konzentrationen läßt sich die geglückte Anfärbung der Membran kontrollieren. Bedingt durch diese Art der Einbindung, wird das Protein eher in der äußeren Monolayerschicht zu finden sein. Die angefärbten Vesikel werden anschließend in die entsprechend gepufferte Meßlösung auf das beschichtete Silizium-Substrat umgesetzt.

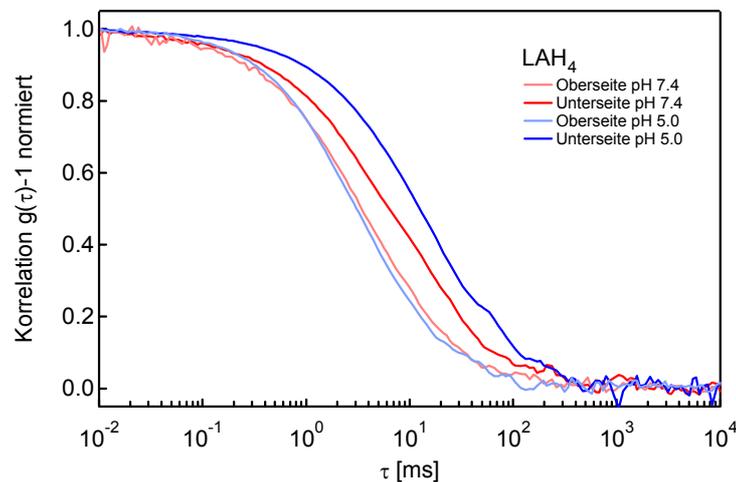


Abbildung 7.7: *pH*-abhängige FCS-Messung an SRh-LAH₄ in Riesenvesikeln. Bei *pH* 7,4 liegt das Peptid als transmembrane Helix vor, bei *pH* 5,0 liegt das Peptid aufgrund der geladenen Histidine parallel zur Membranebene. Der leichte Unterschied im Diffusionsverhalten an der Oberseite zwischen den Peptidlagen wird an der Vesikelunterseite deutlich verstärkt.

| SRh-LAH ₄ | <i>pH</i> 5,0 (Membranebene) | <i>pH</i> 7,4 (Transmembran) |
|---|---|--|
| Oberseite $D \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \right]$ | $6,04 \pm 0,40$ <i>n</i> =14 | $4,89 \pm 1,29$ <i>n</i> =11 |
| Unterseite $D_\alpha \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}^\alpha} \right]$ α | $1,23 \pm 0,75$ $0,94 \pm 0,08$ <i>n</i> =12 | $3,96 \pm 0,52$ $0,81 \pm 0,08$ <i>n</i> =6 |

Tabelle 7.6: Diffusionswerte des Proteins LAH₄ bei verschiedenen *pH*-Werten. Bei niedrigem *pH* < 5,5 ist das Peptid bevorzugt parallel zur Membranebene ausgerichtet. Bei hohem *pH* > 7,0 ist die Helix transmembran angeordnet. Die Zahl der Einzelmessungen *n* ist angegeben.

Die Betrachtung der gefundenen Oberseitenwerte für die Diffusionskonstante zeigt für die verschiedenen Orientierungen des Modellpeptids ein zu erwartendes Bild. In transmembraner Lage ist die Diffusion durch die auf eine größere Fläche wirkende Membranviskosität etwas langsamer. Die Konfiguration in der Membranebene ist durch eine Eintauchtiefe von etwa $\frac{2}{3}$ des Moleküldurchmessers bevorzugt.

Das Flip-Flop-Verhalten ist mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie meßbar!

Die Diffusion in der Kontaktmembran ist, verglichen zur Oberseitendiffusion, verlangsamt. Entgegen der dort gefundenen Werte ist die transmembrane Konfiguration in der Adhäsionszone schneller als die Lage in der Membranebene. Eine Erklärung für dieses Verhalten ist in der Einbettung der Peptide zu suchen. Durch die Einlagerung der Peptide nach der Vesikelherstellung sind diese auch in der Kontaktmembran eher im unteren Monolayer zu finden. Der aus der Membranebene reichende Anteil des helikalen Moleküls bewirkt durch zusätzliche Reibung eine Verlangsamung der Bewegung.

In der Kontaktmembran werden die Unterschiede im Diffusionsverhalten verstärkt!

Die pH -Änderung bewirkt keine Beeinflussung des Membran-Substrat-Abstandes[76]. Bei der Betrachtung des Peptids als diffundierender Zylinder gemäß der Modelle [55][13] stört die nur lose Bindung der Lysin-Enden an die Helixordnung. An diesem Modellsystem des Flip-Flop-Peptids wird deutlich, daß durch die Diffusion ebenfalls die Funktion, in diesem Fall die Lage, bestimmt werden kann.

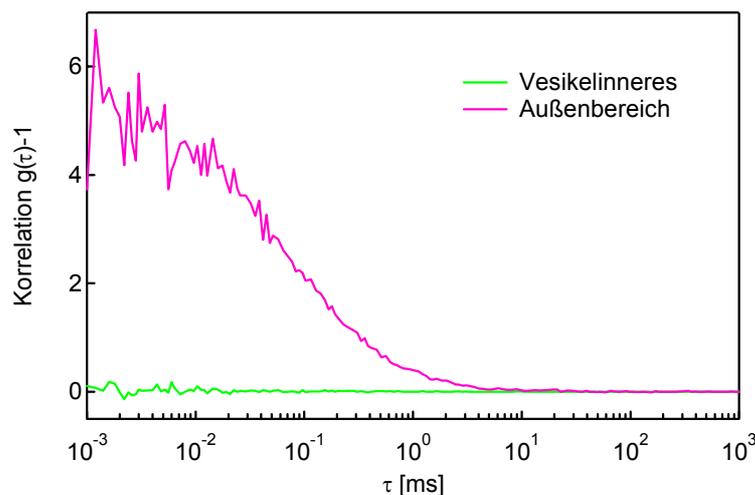


Abbildung 7.8: Innen- und Außenbereich bei SRh-LAH₄-Vesikel. Die nachträgliche Anfärbung über eine Methanollösung des Peptids bewirkt eine zusätzliche Komponente im Vesikeläußeren. Der Innenbereich zeigt weder eine Korrelationsamplitude G_o , noch, gegenüber reinem Wasser, eine erhöhte Zählrate.

Die nachträgliche Anfärbung der fertigen Riesenvesikel hat eine freie Farbstoff-Komponente in der Außenraum zur Folge (Abb. 7.8). Diese macht sich nur bei der Vermessung der Oberseite bemerkbar. Der untere Spalt zwischen Vesikelmembran und Substrat bietet nicht genügend Volumen um einen merklichen Anteil an dem Fluktuationssignal zu erzeugen.

Kapitel 8

Ausblick

Das entwickelte Proben- und Meßsystem eignet sich hervorragend für die Untersuchung der fluiden Eigenschaften von Lipidmembranen im engen Kontakt zu einem Substrat. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Bewegungsmodelle - speziell der *Anomalen Diffusion* - bieten interessante Aspekte für weitere Studien der Adhäsionsproblematik. Das aufgebaute Meßsystem zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie gestattet auf der gelegten Grundlage dessen Anwendung bei erweiterten Membran-Substrat-Untersuchungen, so daß sowohl für die Selbstfokussierung von Ionenkanälen als auch für die Zell-Siliziumkopplung ein probates Hilfsmittel entstanden ist.

Der Einsatz von Riesenvesikeln hat sich auch über diese Arbeit hinaus bewährt [76][27][20]. Die Meßmethode der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie stellt ein mächtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung der Diffusion dar. Mit dem aufgebauten Meßsystem ist zudem eine direkte Verknüpfung der unterschiedlichen, in der Abteilung eingesetzten, Untersuchungsmethoden denkbar oder schon durchgeführt. Die Verbindung von Diffusions- und vor allem Partikelzahlmessungen bei niedrigem Hintergrundsignal mit der Fluoreszenzkontrast-Mikroskopie (FLIC) gestattet, neben der Abstandsmessung bei kleinen Farbstoffkonzentrationen, auch die lokale Untersuchung von Membranfluktuationen. Das schon verwendete Di-8-ANEPPS als elektrochromer Lipidfarbstoff zeigt ein anderes Anwendungsgebiet auf. Die Messung spannungsabhängiger Fluoreszenzsignale krankt bei der Einzelzelluntersuchung an der Toxizität der großen Farbstoffmengen. Eine lokale Untersuchung durch konfokale Mikroskopie bei wenigen beobachteten Farbstoffen wäre der Lebenserwartung der Zellen zuträglich.

Neben diesen Anwendungen aus dem Umfeld ließen sich auch bei der eigentlichen Meßmethode Verbesserungen durchführen. Ein großes Gebiet stellt sicherlich die zu untersuchenden Probensysteme dar. Die einfache Herstellung von Riesenvesikeln mit integrierten Peptiden bietet genügend Möglichkeiten um auch komplexere Proteinkonstrukte in einer definierten Umgebung zu untersuchen. Ein weiteres Anwendungsfeld sind Untersuchungen an den verschiedensten Zelltypen. Durch gentechnisch modifizierte Zellen lassen sich spezielle Proteine durch Varianten des Grün Fluoreszierenden Proteins GFP markieren (Anhang A). Eine Anfärbung mittels Antikörper ist ebenfalls schon Stand der Technik und kann bei der FCS-Untersuchung verwendet werden. Eine technisch interessante Alternative zur Anfärbung stellt die natürliche Fluoreszenz von Aminosäuren bei UV-Anregung dar. Ohne Markierung sind hierbei Diffusionsuntersuchungen denkbar, wobei die Problematik der UV-Optik durch die Verwendung von Zwei- oder Mehrphotonenanregung gemildert werden kann.

Die Messung der Musterbildung erfordert die Diffusions- und Driftbestimmung der verwendeten geladenen

Ionenkanäle. Für eine orts aufgelöste Messung wäre eine Erweiterung des Meßaufbaus mit einer empfindlichen Halbleiterkamera denkbar, welche die Kombination aus der statistisch exakten FCS-Messung und einer bildgebenden Einzelmoleküldetektion ermöglicht. In dieser Kombination wären zugleich Auswertungen auf Basis der Image-Korrelation denkbar.

Die Verteilungsbestimmung von Ionenkanälen stellt ein weiteres Anwendungsgebiet. Mit GFP gekoppelte Ionenkanäle existieren bereits und könnten an einem einheitlichen Meßsystem sowohl optisch als auch elektrisch untersucht werden. Die elektrische Meßmethode auf Feldeffekt-Transistoren wäre bereits jetzt in der Lage an stark adhärirten Riesenvesikeln Einzelkanalsignale zu detektieren. Zusammen mit einer ebenfalls auf Einzelmolekülniveau arbeitenden optischen Detektion könnten hieraus Kombinationsmessungen über eine Kreuzkorrelation der Signale entwickelt werden, die Bewegungs- und Funktionsuntersuchung direkt miteinander vereint.

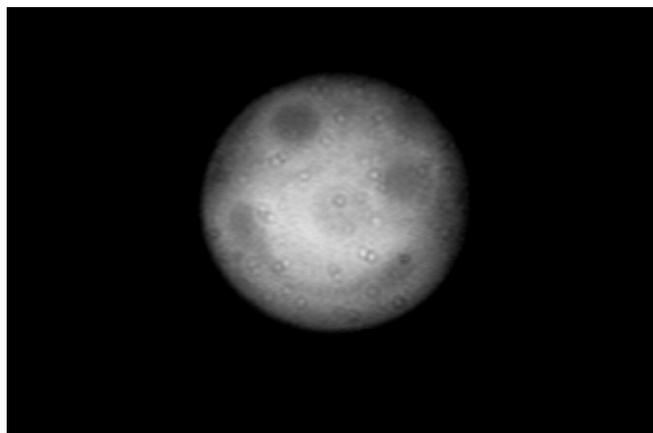


Abbildung 8.1: *Lachender Vesikel. Zum Glück ein seltenes Bild in der Beobachtung der Riesenvesikel ist das Vorkommen von multilamellaren Vertretern dieser Gattung.*

Anhang A

Messungen an HEK293-Zellen

Als Ausblick sind Messungen an HEK293-Zellen zu betrachten, welche hier nur kurz angesprochen werden. Mikrobiologisch werden die menschlichen embryonalen Nierenzellen aus einem Zellstamm mit einem DNA-Strang transfiziert [32], so daß sie nach wenigen Stunden die gelb fluoreszierende Variante des GFP, enhanced Yellow Fluorescence Protein (eYFP), exprimieren. Die Zellen werden zuvor in sehr kleiner Dichte auf gereinigte und mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser gegeben, auf welchen sie im Nährmedium (Dulbecco's mod eagle medium; Life Technologies; Karlsruhe) wachsen. Für die Messung wird das Medium nach mehrmaligem Spülen durch PBS (phosphat buffered saline; Life Technologies; Karlsruhe) ersetzt.

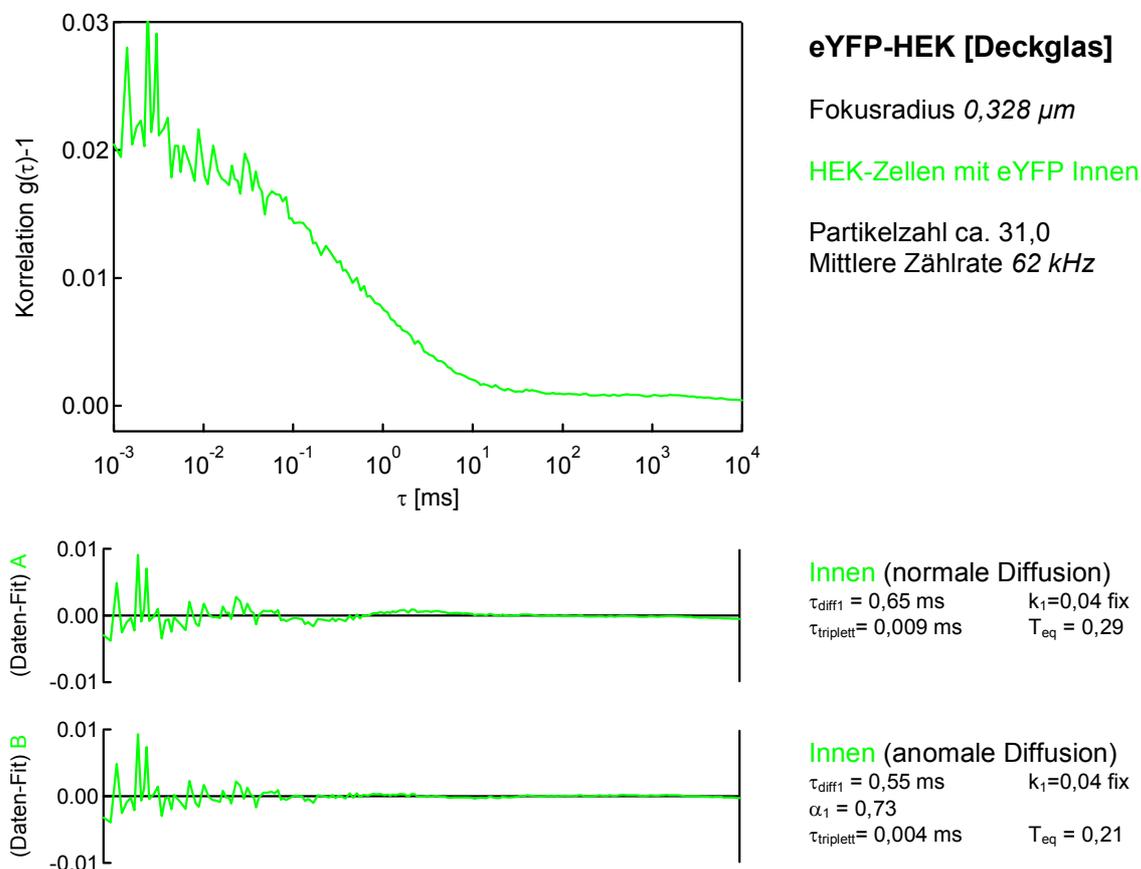


Abbildung 8.2: Messung an HEK293 Zellen mit eYFP im Inneren.

Leider passen Anregungs- und Emissionsspektrum des eYFP nicht zum standardmäßig verwendeten Filtersatz, so daß die Zählrate pro Partikel mit $2kHz$ sehr klein ausfällt. Auch bei der Bewertung der bei der FCS-Messung im HEK-Inneren gefundenen Meßdaten beschreibt das Fitmodell der anomalen Diffusion,

hier im dreidimensionalen Fokusmodell, den zeitlichen Verlauf am besten. Dies mag von der starken Behinderung des Proteins in seiner Diffusionsbewegung durch die große Zahl an Organellen und sonstigen "Zell-Innereien" herrühren.

Anomale Diffusion ist auch im Volumen von Zellen zu finden!

Die Beispielauswertung (Abb. 8.2) zeigt die deutlich bessere Beschreibung der Meßdaten durch das anomale Diffusionsmodell mit $D_\alpha = \frac{(0,328\mu m)^2}{4 \cdot 0,55ms^\alpha} = 48,9 \frac{\mu m^2}{s^\alpha}$ und dem niedrigen Wert $\alpha = 0,73$. Die HEK-Zellen zeigen eine ortsabhängige Autofluoreszenz, welche die Messungen verfälscht. Für eine Bewertung dieser Experimentendaten fehlt die statistische Grundlage, aber als Ausblick zeigen sie, daß die Methode direkt auf Fragestellungen bei Zelluntersuchungen angewendet werden kann.

Anhang B

Nicht gängige Abkürzungen

- FCS - Fluorescence Correlation Spectroscopy
- FRAP - Fluorescence Recovery After Photobleaching
- FLIC - Fluorescence Interference Contrast
- PSF - Point Spread Function
- CEF - Collection Efficiency Function
- MDE - Molecule Detection Efficiency
- DPF - Defocus Phase Function
- cps - Counts Per Second - Photonenanzahlrate, in dieser Arbeit oft in der Einheit Hz angegeben
- kcps - 1000 cps
- APD - Avalanche Photodiode
- CCD - Charge Coupled Device - Verarbeitungsprinzip einer auf Halbleiterbasis arbeitenden Kamera
- FC - Fiber Connector
- Rh6G - Rhodamine 6G
- SRh-GramC - Sulforhodamin G markiertes Gramicidin C
- SRh-LAH₄ - Sulforhodamin G markiertes Peptid LAH₄

Literaturverzeichnis

- [1] Angelova M.I., Dimitrov D.S., *Liposome Electroformation*, Faraday Discuss. Chem. Soc. **81** (1986), 303–311.
- [2] Angelova M.I., Soleau S., Meleard Ph., Faucon J.F., Bothorel P., *Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications*, Progress in Colloid and Polymer Science **89** (1992), 127–131.
- [3] Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J., Elson E. Webb W.W., *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery experiment*, Biophys. J. **16** (1976), 1055–1069.
- [4] Bechinger B., *Towards Membrane Protein Design: pH-sensitive Topology of Histidine-containing Polypeptides*, J. Mol. Biol. **263** (1996), 768–775.
- [5] Bechinger B., Ruyschaert J.M., Goormaghtigh E., *Membrane Helix Orientation from Linear Dichroism of Infrared Attenuated Total Reflection Spectra*, Biophys. J. **76** (1999), 552–563.
- [6] Born M., Wolf E., *Principles of Optics*, sixth ed., Pergamon Press, 1993.
- [7] Bouchaud J.P., Georges A., *Anomalous Diffusion in Disordered Media: Statistical Mechanisms, Models and Physical Applications*, Physics Reports **195** (1990), 127–293.
- [8] Braun D., Fromherz P., *Fluorescence Interference-Contrast Microscopy of Cell Adhesion on Oxidized Silicon*, Appl. Phys. A **65** (1997), 341–348.
- [9] Dimitrov D.S., Angelova M.I., *Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields*, Bioelectrochemistry and Bioenergetics **253** (1988), no. 19, 323–336.
- [10] Ehrenberg M., Rigler R., *Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations*, Chemical Physics **4** (1974), 390–401.
- [11] Ehrenberg M., Rigler R., *Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules*, Quart. Rev. Bioph. **9** (1976), no. 1, 69.
- [12] Elson E.L., Madge D., *Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory*, Biopolymers **13** (1974), 1–27.
- [13] Evans E., Sackmann E., *Translational and rotational drag coefficients for a disk moving in a liquid membrane associated with a rigid substrate*, J. Fluid Mech. **194** (1988), 553–561.
- [14] Fahey P.F., Koppel D.E., Barak L.S., Wolf D.E., Elson E.L., Webb W.W., *Lateral diffusion in planar lipid bilayers*, Science **195** (1977), 305–306.
- [15] Fahey P.F., Webb W.W., *Lateral Diffusion in Phospholipid Bilayer Membranes and Multilamellar Liquid Crystals*, Biochemistry **17** (1978), no. 15, 3046–3053.
- [16] Feder T.J., Brust-Mascher I., Slattery J.P. Baird B., Webb W.W., *Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation*, Biophys. J. **70** (1996), 2767–2773.

-
- [17] Frey S., Tamm L.K., *Membrane insertion and lateral diffusion of fluorescence-labelled cytochrome c oxidase subunit IV signal peptide in charged and uncharged phospholipid bilayers*, *Biochem. J.* **272** (1990), 713–719.
- [18] Fromherz P., *Self-organization of the Fluid Mosaic of Charged Channel Proteins in Membranes*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988), 6353–6357.
- [19] Fromherz P., Kaiser B., *Stationary Patterns in Membranes by Nonlinear Diffusion of Ion Channels*, *Europhys. Lett.* **15** (1991), no. 3, 313–318.
- [20] Fromherz P., Kießling V., Kottig K., Zeck G., *Membrane-Transistor with Giant Lipid Vesicle Touching a Silicon Chip*, *Appl. Phys. A* **69** (1999), 571–576.
- [21] Fromherz P., Offenhäusser A., Vetter T., Weis J., *A Neuron-Silicon Junction: A Retzius Cell of the Leech on an Insulated-Gate Field-Effect Transistor*, *Science* **252** (1991), 1290–1293.
- [22] Gritsch S., Nollert P., Jähnig F., Sackmann E., *Impedance Spectroscopy of Porin and Gramicidin Pores Reconstituted into Supported Lipid Bilayers on Indium-Tin-Oxide Electrodes*, *Langmuir* **14** (1998), no. 11, 3118–3125.
- [23] Havlin S., Ben-Avraham D., *Diffusion in disordered media*, *Advances in Physics* **36** (1987), no. 6, 695–798.
- [24] Hughes B.D., Pailthorpe B.A., White L.R., *The translational and rotational drag on a cylinder moving in a membrane*, *J. Fluid Mech.* **110** (1981), 349–372.
- [25] Jenkner M., *Hybride Netzwerke aus Neuronen von Lymnaea Stagnalis und Silizium-Chips*, Doktorarbeit TU München, Dezember 1999.
- [26] Jost W., Hauffe K., *Diffusion - Methoden der Messung und Auswertung*, Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1972.
- [27] Kießling V., *Zelladhäsion als Kern-Mantel-Leiter: Charakterisierung mit Transistoren und extrazellulär angelegten Wechselspannungen*, Doktorarbeit TU München, 1999.
- [28] Klemm A., Müller H.P., Kimmich R., *Evaluation of fractal parameters of percolation model objects and natural porous media by means of NMR microscopy*, *Physica A* **266** (1999), 242–246.
- [29] Klingler J., Fromherz P., *Profiles of Voltage and of Channel Density in a Planar Membrane Cable on Micromachined Silicon*, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **99** (1995), no. 7, 958–964.
- [30] Koppel D.E., *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy*, *Physical Review A* **10** (1974), no. 6, 1938–1945.
- [31] Kottig K., *Flache Membrankabel auf Silizium Feldeffekt-Transistoren*, Diplomarbeit, Universität Ulm, Juli 1995.
- [32] Kupper, J., *Functional expression of GFP-tagged Kv1.3 and Kv1.4 channels in HEK 293 cells*, *European J. of Neuroscience* **10** (1998), no. 12, 3908–3912.

- [33] Lambacher A., *Fluoreszenz-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie von Membranen auf Silizium*, Doktorarbeit Universität Ulm, 1994.
- [34] Lambacher A., Fromherz P., *Fluorescence Interference-Contrast Microscopy on Oxidized Silicon using a Monomolecular Dye Layer*, Appl. Phys. A **63** (1996), 207–216.
- [35] Lambacher A., Fromherz P., in *Vorbereitung*, 2000.
- [36] Levenberg K., *A method for the solution of certain non-linear problems in least squares*, Quart. Appl. Math. **2** (1944), 164–168.
- [37] Madge D., Elson E.L., Webb W.W., *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Phys. Rev. Lett. **29** (1972), 705.
- [38] Madge D., Elson E.L., Webb W.W., *Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization*, Biopolymers **13** (1974), 29–61.
- [39] Madge D., Webb W.W., Elson E.L., *Fluorescence Correlation Spectroscopy. III. Uniform Translation and Laminar Flow*, Biopolymers **17** (1978), 361–376.
- [40] Marquardt D.W., *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*, J. Soc. Indust. Appl. Math. **11** (1963), no. 2, 431–441.
- [41] Mathivet L., Cribier S., Devaux P.F., *Shape Change and Physical Properties of Giant Phospholipid Vesicles Prepared in the Presence of an AC Electric Field*, Biophysical Journal **70** (1996), 1112–1121.
- [42] Mets Ü., Rigler R., *Submillisecond Detection of Single Rhodamine Molecules in Water*, J. of Fluorescence **4** (1994), no. 3, 259–264.
- [43] Metzler R., Glöckle W.G., Nonnenmacher T.F., *Fractional Model Equation for Anomalous Diffusion*, Physica A **211** (1994), 13–24.
- [44] Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C., *Reconstitution of Cell Membrane Structure in vitro and its Transformation into an Excitable System*, Nature **194** (1962), 979–980.
- [45] Neher E., Sandblom J., Eisenmann G., *Ion selectivity, saturation and block in Gramicidin A channels*, J. Membr. Biol. **40** (1978), 97.
- [46] Peters R., *Fluorescence Microphotolysis - Diffusion Measurements in Single Cells*, Naturwissenschaften **70** (1983), 294–302.
- [47] Peters R., Cherry R.J., *Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: Experimental test of the Saffman-Delbrück equations*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** (1982), 4317–4321.
- [48] Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P., *Numerical Recipes in C*, second ed., Cambridge University Press, 1996.

-
- [49] Qian H., Elson E.L., *Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-D fluorescence correlation spectroscopy*, Applied Optics **30** (1991), no. 10, 1185–1195.
- [50] Rädler J.O., Feder T.J., Strey H.H., Sackmann E., *Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates*, Physical Review E **51** (1995), no. 5, 4526–4537.
- [51] Rigler R., Mets Ü., *Diffusion of single molecules through a gaussian laser beam*, Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng. **1921** (1992), 239–248.
- [52] Rigler R., Mets Ü., Widengren J., Kask P., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*, Eur. Biophys. J. **22** (1993), 169–175.
- [53] Sackmann E., *Supported Membranes: Scientific and Practical Applications*, Science **271** (1996), 43–48.
- [54] Saffman P.G., *Brownian motion in thin sheets of viscous fluid*, J. Fluid Mech. **73** (1976), no. 4, 593–602.
- [55] Saffman P.G., Delbrück M., *Brownian motion in biological membranes*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72** (1975), no. 8, 3111–3113.
- [56] Saxton M.J., *Lateral Diffusion in an Archipelago - Effects of Impermeable Pathces on Diffusion in a Cell Membrane*.
- [57] Schätzthauer R., Fromherz P., *Neuron-Silicon Junction with Voltage-Gated Ionic Currents*, Eur. J. Neurosci. **10** (1998), 1956–1962.
- [58] Schmidt Th., Schütz G.J., Baumgartner W., Gruber H.J., Schindler H., *Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid Membrane*, J. Phys. Chem. **99** (1995), 17662–17668.
- [59] Schwille P., Korlach J., Webb W.W., *Fluorescence Correlation Spectroscopy with Single-Molecule Sensitivity on Cell and Model Membranes*, Cytometry **36** (1999), 176–182.
- [60] Smith B.A., McConnell H.M., *Determination of molecular motion in membranes using periodic pattern photobleaching*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75** (1978), no. 6, 2759–2763.
- [61] Sonnleitner M., Schütz G.J., Schmidt Th., *Imaging individual molecules by two-photon excitation*, Chemical Physics Letters **300** (1999), 221–226.
- [62] Steinem C., Janshoff A., Galla H.J., Sieber M., *Impedance analysis of ion transport through gramicidin channels incorporated in solid supported lipid bilayers*, Bioelectrochem. Bioenerg. **42** (1997), 213–220.
- [63] Stokseth P.A., *Properties of a Defocused Optical System*, Journal of the Optical Society of America **59** (1969), no. 10, 1314–1321.
- [64] Straub B., Meyer E., Fromherz P., *in Vorbereitung*, 2000.

- [65] Tamm L.K., *Membrane insertion and lateral mobility of synthetic amphiphilic signal peptides in lipid model membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta* **1071** (1991), 123–148.
- [66] Tank D.W., Wu E.S., Meers P.R., Webb W.W., *Lateral diffusion of gramicidin C in phospholipid multibilayers*, *Biophys. J.* **40** (1982), 129–135.
- [67] Veatch W.R.; Blout E.R., *Preparation and Properties of O-Dansyltryosine Gramicidin C*, *Biochemistry* **15** (1976), no. 14, 3026–3030.
- [68] Veatch W.R., Mathies R., Eisenberg M., Stryer L., *Simultaneous Fluorescence and Conductance Studies of Planar Bilayer Membranes Containing a Highly Active and Fluorescent Analog of Gramicidin A*, *J. Mol. Biol.* **99** (1975), 75–92.
- [69] Wallace B.A., *Gramicidin Channels and Pores*, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19** (1990), 127–157.
- [70] Wallace B.A., *Recent Advances in the High Resolution Structures of Bacterial Channels: Gramicidin A*, *J. Structural Biology* **121** (1998), 123–141.
- [71] Webb W.W., *Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy*, *Quart. Rev. Biophysics* **9** (1976), no. 1, 49–68.
- [72] Wick R., Angelova M.I., Walde P., Luisi P.L., *Microinjection into giant vesicles and light microscopy investigation of enzyme-mediated vesicle transformations*, *Chemistry and Biology* **3** (1996), no. 2, 105–111.
- [73] Widengren J., Mets Ü., Rigler R., *Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study*, *J. Phys. Chem.* (1995), 13368–13379.
- [74] Widengren J., Rigler R., Mets Ü., *Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, *J. of Fluorescence* **4** (1994), no. 3, 255–258.
- [75] Zeck G., Fromherz P., *Giant Lipid Vesicles on Silicon Probe Steric Repulsion by Laminin in Cell Adhesion*, in *Vorbereitung*, 2000.
- [76] Zeck G.M., *Adhäsion von Lipidvesikeln auf Siliziumchips*, Diplomarbeit, TU München, Dezember 1997.

Danken möchte ich...

- Herrn Prof. Fromherz, für die Möglichkeit eine derart abwechslungsreiche Thematik zu bearbeiten und für die Freiheit eigene Ideen zu entwickeln.
- Volker und Günther, für die produktive Zusammenarbeit bei der Vesikelcharakterisierung.
- Dieter, für die FLIC-Anpassung und viele anregende Optikdiskussionen.
- Herrn Neusser und Herrn Wagner, für die perfekte Umsetzung meiner optomechanischen Phantasien. Ich war immer sehr angetan, wenn die Ergebnisse meiner Systemanforderungen aus Aluminium und Messing vor mir lagen und in punkto Stabilität, Lichtdichtigkeit und Anwendbarkeit keine Wünsche offen ließen.
- dem Chemielabor mit Gerd, Michaela und Birgit, für die Markierung der Peptide mit Fluoreszenzfarbstoffen.
- Helge und Georg, für die Herstellung der ITO/Quarz-Objektträger.
- Bernd, für die Farbstoffspektren und Einblicke in die Fossilienkunde.
- den Mitgliedern der Abteilung Membran- und Neurophysik am Max-Planck-Institut für Biochemie, die zu einer angenehmen und produktiven Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich während meiner Ausbildung in allen Lebensbelangen unterstützt haben.

Lebenslauf

Karsten Kottig

geboren am 9. August 1968 in Wuppertal

Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig
Eltern Christa und Karlheinz Kottig

Schulbildung

1975-1979 Grundschule Mittelrain in Heidenheim an der Brenz
1979-1988 Werkgymnasium in Heidenheim an der Brenz

Grundwehrdienst

1988-1989 Panzergrenadierbataillon 302 in Ellwangen

Studium

1989-1995 Studium der Physik an der Universität Ulm
1994-1995 Diplomarbeit bei Herrn Prof. Fromherz
Abteilung für Biophysik an der Universität Ulm und
Abteilung Membran- und Neurophysik am Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Thema: *Flache Membrankabel auf Silizium Feldeffekt-Transistoren*
seit 1995 Wissenschaftlicher Angestellter in der Abteilung Membran- und Neurophysik
des Max-Planck-Instituts für Biochemie in Martinsried bei München