
Universität Bielefeld
Fakultät für Physik
Biophysik und angewandte Nanowissenschaften

***Biologische Anwendungen
und Installation neuer Messmodi
in der 2-Photonen-Laserscanning-Mikroskopie***

Masterarbeit im Studiengang „Genombasierte Systembiologie“
Sommersemester 2007

vorgelegt von

Maik Tiemann

Gutachter: Prof. Dr. Dario Anselmetti
PD Dr. Thomas Merkle

Abgabedatum: 12.09.2007

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt worden oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Bielefeld, den
12.09.2007

Maik Tiemann

Inhalt

Eidesstattliche Erklärung.....	3
Inhalt	5
Zusammenfassung	6
Abstract.....	6
1 Einleitung.....	7
2 Theoretischer Hintergrund	9
2.1 2PLSM.....	9
2.2 Proteindynamik des Kernporenkomplexes.....	12
2.3 Reporterproteine.....	13
2.3.1 Pa-GFP	14
2.3.2 DsRed	15
2.4 Multifokaler multispektraler descanned Modus	15
2.5 FLIM	16
3 Material und Methoden	18
3.1 IX71.....	18
3.2 Zweiphotonen-Anregung	18
3.3 Proteindynamik des Kernporenkomplexes.....	20
3.3.1 Transfektion.....	20
3.3.2 Tabak-Protoplasten	21
3.3.3 Filter	21
3.4 Multifokaler multispektraler descanned Modus	21
3.4.1 Setup	21
3.4.2 Bestimmung des Verschiebevektors.....	23
3.4.3 Spectral calibration.....	24
3.4.4 Spectral unmixing.....	26
3.5 Time-Correlated Single Photon Counting	27
3.5.1 Installation.....	29
3.6 Eingesetzte Programme.....	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Pa-GFP.....	32
4.2 Multifokaler multispektraler descanned Modus	35
4.3 FLIM	37
5 Diskussion.....	41
Abbildungsverzeichnis.....	44
.....	
Anhang.....	45
Danksagung.....	48
Literatur	49

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden Messmethoden und Anwendungen der 2-Photonen-Laserscanning-Mikroskopie vorgestellt. Es werden unterschiedliche Messmodi aufgebaut und eingesetzt. Dazu wird auch ein Fluorescence Lifetime Imaging System installiert und getestet, das die Fluoreszenzlebenszeit von Fluorophoren misst. Außerdem kommt ein Messmodus zum Einsatz, der im Rahmen der Doktorarbeit von Jörg Martini etabliert wurde. Dieser Modus erlaubt die Analyse biologischer Proben hinsichtlich ihrer spektralen Charakteristika.

Ein großer Teil der Arbeit beschränkt sich auf die Aktivierung von pa-GFP, was durch Kameraaufnahmen sowie Messungen des FLIM-Systems dokumentiert wird. Die Aktivierung dient als Vorstufe zur Charakterisierung von Proteindynamiken durch pa-GFP, was Teil einer anderen Arbeit sein wird.

Es wird demonstriert, wie mithilfe von Spektraleigenschaften Fluorophore sowohl in einer nativen wie auch in einer markierten Probe ohne den Einsatz von Filtern voneinander unterschieden werden können. Des Weiteren wird gezeigt, dass Fluoreszenzlebenszeiten wichtige Informationen über die Komposition biologischer Proben liefern.

Abstract

This work presents measurement modes and applications of 2-photon laserscanning microscopy. Different modes are configured and installed, like a Fluorescence Lifetime Imaging System which measures the lifetime of fluorophores. Moreover a detection method established by Jörg Martini during his PhD thesis is used. This mode enables analysis of biological samples with respect to their spectral characteristics.

A big part of this work centers around activation of pa-GFP. This is documented by camera as well as by FLIM. In this case activation of pa-GFP serves as a preliminary stage. In a later work protein dynamics shall be characterised using this method.

It is demonstrated how spectral characteristics can help to differentiate fluorophores in a native sample as well as in a marked sample without the use of filters. Furthermore, it is shown that fluorescence lifetimes provide important information about samples' composition.

1 Einleitung

Die Erfindung des Mikroskops war einer der größten Meilensteine in der Geschichte der Biologie. Seit seiner Erfindung im 17. Jh. [1] hat es sich rasant entwickelt und ist zu einem unverzichtbaren Werkzeug in der Aufklärung von Strukturen auf zellulärer Ebene geworden. Nach der enorm schnellen Entwicklung des Mikroskops wurden im 20. Jh. neue Applikationen entwickelt. Gerade für den Bereich der Biologie war hier die Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie [2] innovativ. Diese Technik erfordert allerdings die Markierung der zu untersuchenden Proben. Damit werden die Ergebnisse von in vivo Messungen leicht verzerrt. Da Biologen aber gerade an der Aufklärung von Prozessen interessiert sind, die auf molekularer Ebene stattfinden, sollten diese Prozesse „lebensnah“, also unter realen Umweltbedingungen analysiert werden. Außerdem muss bei der Fluoreszenzmikroskopie ein weiter Bereich des Anregungsweges beleuchtet werden, um Moleküle zur Fluoreszenz anzuregen. Die zu Ende des 20. Jh. eingesetzten Lasermikroskope [3] umgehen diese Probleme und tragen in großem Maße dazu bei, intrazelluläre Prozesse zu beobachten. Der Laserstrahl ist in der Lage, die Probe innerhalb eines kleinen Anregungsbereiches zu beleuchten. Diese Techniken verwenden lineare Absorptionsprozesse (1-Photonenanregung). Mit ihrer Hilfe werden Eindringtiefen von $<100\mu\text{m}$ erreicht [4]. Bei größerer Tiefe muss das Anregungslicht mehr Gewebeschichten durchdringen und wird gestreut. Das führt dazu, dass das Bild nicht klar dargestellt werden kann. Abhilfe schafft hier die Konfokale Mikroskopie, bei der Licht, das nicht aus der Fokalebene stammt, mit einem Pinhole geblockt wird. Diese Technik kann auch auf die Laserscanning-Mikroskopie angewandt werden.

Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden neue optische Mikroskopieverfahren entwickelt, die nicht-lineare lichtabhängige Interaktionen verwenden, um einen hohen Signalkontrast zu generieren (5,6,7). Nicht-lineare Techniken sind weniger sensitiv gegenüber Streuung, was sie für den Einsatz zur Generierung hoch aufgelöster Bilder prädestiniert. Konkret bedeutet das, dass hierbei Moleküle zur Fluoreszenz angeregt werden, indem sie 2 (bei 2-Photonenlaserscanning-Mikroskopie) gleichzeitig auftreffende Photonen absorbieren. Realisiert wird das mithilfe von gepulsten Laserstrahlen.

Mit dieser Methode können Gewebe bis zu 1 mm Tiefe [4] aufgeklärt werden, wobei die biologischen Funktionen intakt bleiben. Die 2-Photonenlaserscanning-Mikroskopie ist heute die einzige Methode, die es erlaubt, Zellen berührungs- und markierungsfrei zu untersuchen.

Dieses Verfahren soll in dieser Arbeit innerhalb von drei Thematiken eingesetzt werden.

Die drei Schwerpunkte sind:

1. Charakterisierung der Proteindynamik des Kernporenkomplexes
2. Fluorescence Lifetime Imaging
3. Multifokale multispektrale Mikroskopie

Im ersten thematischen Schwerpunkt soll mithilfe der 2-Photonen Laserscanning Mikroskopie (2PLSM) die Proteindynamik des Kernporenkomplexes in Pflanzenzellen charakterisiert werden. Der zweite Teil beschreibt ein relativ neues Messverfahren, das auf der 2PLSM aufbaut und die Lebenszeit verschiedener Moleküle detektiert. Im dritten Thema wird ein Messmodus innerhalb des 2PLSM Systems durch ein neues Setup beschrieben, mit dessen Hilfe man biologische Proben auf ihre spektrale Zusammensetzung hin untersuchen kann.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 2PLSM

Die 2-Photonen-Mikroskopie ist eine relativ junge mikroskopische Technologie. Sie wurde erstmals 1990 von Winfried Denk et al. konzeptionell entwickelt [8] und ermöglicht eine berührungsfreie Untersuchung ausgedehnter Zellverbände mit hoher 3-dimensionaler Auflösung. Sie baut auf der konfokalen und der Fluoreszenzmikroskopie auf, die wiederum Weiterentwicklungen der konventionellen Mikroskopie sind. Die Fluoreszenzmikroskopie wird in der Biologie häufig verwendet, um Prozesse in Zellen oder Geweben aufzuklären. Diese Formen der Mikroskopie werden deshalb an dieser Stelle kurz erläutert.

In der konventionellen Hellfeld Mikroskopie wird die Probe mit einer homogenen Lichtquelle beleuchtet [9]. Sowohl Durchlicht wie auch Fluoreszenzlicht werden durch das Objektiv gesammelt und man erhält ein Bild, welches eine Projektion der gesamten Probe darstellt. Dieses Bild ist allerdings schwach aufgelöst, da auch Licht außerhalb der Fokalebene detektiert wird. Es ist auf diesem Wege nahezu unmöglich, einzelne Objekte innerhalb der Probe zu differenzieren. In der Fluoreszenzmikroskopie werden Farbstoffe angeregt, so dass die bei dem Übergang in den Grundzustand freiwerdende elektromagnetische Strahlung detektiert werden kann. Das Jablonski-Diagramm in Abbildung 1 veranschaulicht, dass diese Energie entweder von einem einzelnen Photon oder von zwei Photonen mit halber Energie (doppelter Wellenlänge) geliefert werden kann. Von einem Grundzustand (S0) kann ein Farbstoff in einen angeregten S2-Zustand gebracht werden. Relaxiert das Molekül (S1) und kehrt in den Grundzustand zurück. Dabei wird die freiwerdende Energie in Form von Licht frei. So kann ein Fluoreszenzfarbstoff z.B. mit einem Photon UV-Licht (350 nm, blau) oder mit zwei Photonen Infrarot-Licht (700 nm, rot) angeregt werden. Dazu muss allerdings eine hohe räumliche Leistungsdichte erreicht werden, da nur bei gleichzeitigem Auftreffen zweier Photonen Fluoreszenz entsteht.

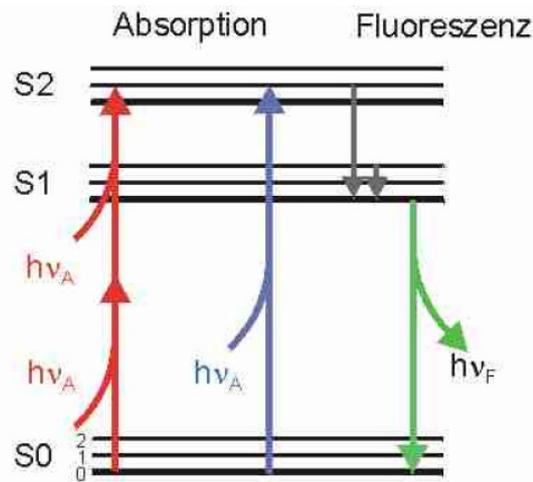


Abbildung 1: Jablonski-Diagramm [10]. S0, S1, S2: Energieniveaus; roter Pfeil: 2-Photonenanregung, blauer Pfeil: 1-Photonenanregung, grüner Pfeil: freier werdende Fluoreszenzphotonen

Bei der konfokalen Laserscanning Mikroskopie wird eine Lochblende („Pinhole“) mit einem sehr kleinen Durchmesser vor dem Detektor platziert [11]. Fluoreszenzlicht aus der Fokalebene passiert die Lochblende, wohingegen Streulicht geblockt wird und nicht am Detektor auftrifft. Mit dieser Methode ist es möglich, ein punktgenaues Bild eines Objektes innerhalb der Probe zu generieren. Um ein 3-dimensionales Bild zu generieren, muss die Probe Punkt für Punkt gescannt werden, sowohl in x-, y-Richtung, um ein Bild der Ebene zu erhalten und anschließend in z-Richtung, um ein Volumen zu erhalten.

Die Funktionsweise eines 2-Photonen-Laserscanning Mikroskops ist mit der eines konfokalen Mikroskops vergleichbar. Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, in der die Bildentstehung parallel durch gleichzeitige Beleuchtung und Betrachtung aller Objektpunkte geschieht, wird in der konfokalen Lasermikroskopie das Objekt Punkt für Punkt mit einem durch das Objektiv fokussierten Laserstrahl gerastert („gescannt“) und dementsprechend am Detektor auch Punkt für Punkt registriert [12]. Das Rastern geschieht hierbei mit Hilfe von zwei beweglichen Scanspiegeln, die den Laserstrahl in x- bzw. y-Richtung verschieben.

Bei der Zweiphotonen-Mikroskopie werden gepulste Infrarotlaser verwendet. Das Licht wird durch ein Objektiv fokussiert, wobei im Brennpunkt eine hohe Lichtintensität entsteht. Die ist im Bereich des Brennpunkts so hoch, dass zwei Photonen aus dem Nahinfrarot-Bereich gleichzeitig von einem Fluoreszenzfarbstoffmolekül absorbiert werden [13]. Aus diesem Grund entsteht nur im Brennpunkt Fluoreszenz. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass Infrarotlicht biologische Proben weniger stark schädigt als Ultraviolettes Licht, dass das Infrarotlicht weniger stark gestreut wird, und dass kein störendes Fluoreszenzlicht außerhalb der Brennebene entsteht. Auch beim 2-Photonen-Laserscanning-Mikroskop wird wie beim konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Laserstrahl durch einen Scanner über die Probe geführt [14].

Ein Vergleich von Einphoton- und Zweiphotonen-Anregung verdeutlicht den Vorteil der Zweiphotonen-Mikroskopie für biologische Anwendungen (Abbildung 2), da hier ein viel kleineres Volumen innerhalb der Probe angeregt wird.

In einer biologischen Probe soll ein Fluoreszenzfarbstoff angeregt werden, dessen Absorptions-Maximum bei 350 nm liegt.

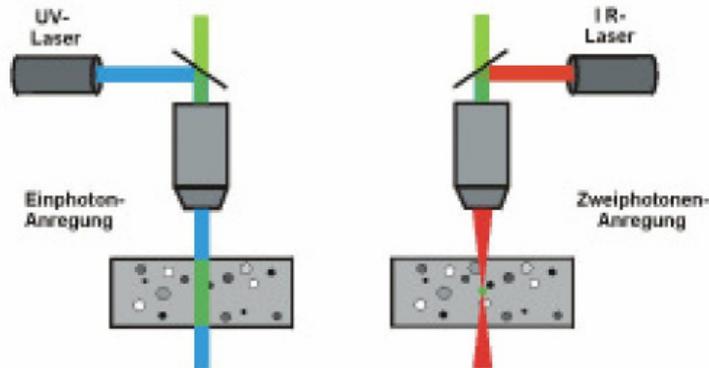


Abbildung 2: Vergleich zwischen 1-P- und 2-P-Mikroskopie [10]

Die 1-Photonen-Anregung geschieht mittels einer Laserstrahl, der auf die Probe gerichtet wird. Dabei werden alle Moleküle innerhalb des Lichtkegels zur Fluoreszenz angeregt. Die Fluoreszenz findet im gesamten beleuchteten Bereich statt.

Bei dieser Methode treten häufig Probleme durch UV-Schäden am Gewebe und durch starke Streuung des kurzwelligen Lichtes in der Probe auf. Zudem entsteht Fluoreszenzlicht auch außerhalb der Brennebene des Objektivs und überlagert dadurch das Licht aus der Brennebene [10]. Daher ist es notwendig, für gute räumliche Auflösung das störende Licht mit einer konfokalen Optik auszublenden. Das ist, wie in der Einleitung bereits beschrieben, in der Zweiphotonen-Anregung nicht notwendig, woraus sich eine Vielzahl von Vorteilen ergeben.

Zum einen bietet sie eine intrinsische 3-dimensionale Auflösung, da die Anregung nur auf den Fokus beschränkt ist ($< 1 \text{ fL}$, [15]), zum anderen beschränkt sich mit der Anregung auch die Photoschädigung der Probe auf die Fokalebene. Ein zusätzlicher Vorteil für die Untersuchung von Zellverbänden ist die Verwendung von Wellenlängen im Bereich von 700 bis 1100 nm. Dies gewährleistet eine geringe Streuung und Absorption im Gewebe im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie. Dadurch können sehr viel tiefer liegende Probenebenen noch abgebildet werden.

Die einzige Limitierung dieser Methode liegt in der Geschwindigkeit des Abtastvorgang, da die Probe Punkt für Punkt in x-, y- und z-Richtung abgerastert wird. Die Aufnahme eines Bildes kann dadurch je nach gewähltem Setup zwischen wenigen Zehntelsekunden und mehreren Sekunden betragen. Dieser Limitierung kann durch den Einsatz von parallelisierten Systemen entgegengewirkt werden, bei denen die Probe mit mehreren Strahlen gleichzeitig abgetastet wird. Ein solches System findet auch in dem in Kapitel 3.4 beschriebenen Messmodus Verwendung, bei dem noch zusätzlich neben dem Einsatz mehrerer Foki die Probe gleichzeitig spektral untersucht wird.

2.2 Proteindynamik des Kernporenkomplexes

Zellen werden unterschieden in eukaryotische und prokaryotische Zellen [16]. Eukaryoten¹ zeichnen sich im Wesentlichen dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu Prokaryoten eine Vielzahl an Kompartimenten aufweisen [12]. Im Zellkern (Nucleus), befinden sich dabei die Chromosomen. Umschlossen wird der Zellkern von einer Hülle, der Kernhülle, die aus einem Doppelmembransystem besteht. Betrachtet man die Proteinkompositionen, so erkennt man, dass die äußere Membran eine Weiterführung des Endoplasmatischen Reticulums darstellt [17]. Die Kernhülle wird von Kernporen unterbrochen, die für den Austausch von Makromolekülen zwischen dem Cytoplasma² und dem Karyoplasma³ zuständig sind.

Während der Mitose dissoziiert die Kernhülle und reassoziert anschließend wieder [18]. Die Kernhülle stellt eine Barriere dar, die den Zellkern vom Cytoplasma abgrenzt. Das erlaubt Eukaryoten, ihr genetisches Material von allen Stoffwechselfvorgängen zu trennen.

Die Kernhülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht und bildet ein Kontinuum. Die Lipiddoppelschicht setzt sich zusammen aus polaren Lipiden, die die Struktur bilden und Proteinen, die u.a. für den Transport, Signalkaskaden und ATP-Synthese verantwortlich sind. Die Kernhülle ist unterbrochen von Kernporen, die für die Regulation von Cargo⁴-Transportvorgängen zuständig sind [19]. Kernporen sind ein Komplex aus Proteinen. Nahezu alle in Eukaryoten vorkommenden Kernporenkomplexe (NPC) setzen sich aus einer Gruppe von 30-40 solcher Kernporenproteine (Nucleoporine) zusammen.

In dieser Arbeit soll die Proteindynamik des NPC anhand von Nucleoporin 198 (NUP198) in Tabak sowie in *Arabidopsis thaliana* charakterisiert werden. Dazu werden zunächst Vorversuche zur Proteinlokalisierung durchgeführt.

¹ Eukaryota: von griechisch *eu* für gut, echt und *karyon* für Kern

² Cytoplasma: der die Zelle ausfüllende Inhalt, besteht aus Zytosol (Zellmedium), Zytoskelett und zytoplasmatischen Organellen, wird von der Plasmamembran eingeschlossen.

³ Karyoplasma: Inhalt des Zellkerns, der von der Kernhülle umschlossen wird (von *karyon* für Kern und *plasma* für Gebilde)

⁴ Als Cargos bezeichnet man Moleküle, die durch die Kernporen vom Karyoplasma ins Cytoplasma oder umgekehrt transportiert werden. Häufig werden für diese Prozesse Transportproteine benötigt, die an das Cargo andocken.

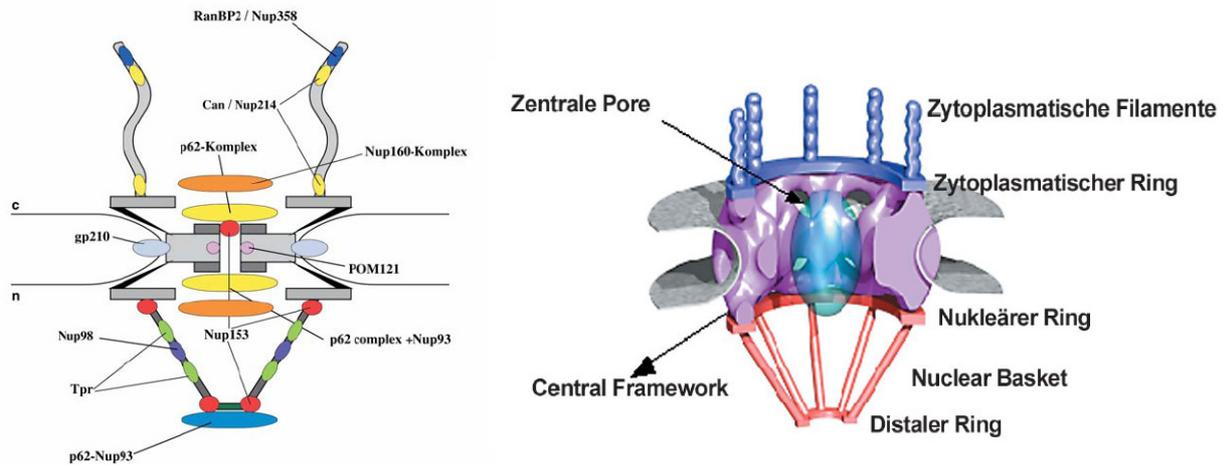


Abbildung 3: Aufbau des Kernporenkomplexes. LINKS: Schematische Darstellung einzelner Nucleoporine, c: Zytoplasma, n: Zellkern; RECHTS: Schematische Darstellung der Raumstruktur des Kernporenkomplexes [20]

Abbildung 3 veranschaulicht den Aufbau des NPC. Auf der linken Seite sind schematisch einige Nucleoporine und deren Lokalisierung dargestellt. NUP214 ist das menschliche Pendant zu NUP198 in *A.thaliana*. Auf der rechten Seite ist die räumliche Struktur des NPC abgebildet. Es ist zu erkennen, dass die Nucleoporine definierte, voneinander abzugrenzende Elemente bilden. So besteht der NPC im Wesentlichen aus der zentralen Pore, dem Central Framework, zytoplasmatischen Filamenten, die im zytoplasmatischen Ring verankert sind, sowie dem Nuclear Basket mit seinem distalen Ring, der im nukleären Ring verankert ist.

Die Dynamik des Kernporenkomplexes während des Zellzyklus soll mithilfe von Reporterproteinen charakterisiert werden. Dabei wird das Nucleoporin 198 (NUP198) mit pa-GFP⁵ (2.3.1) C-terminal⁶ fusioniert. Durch gezielte Anregung der Kernmembran wird das pa-GFP aktiviert. Die Diffusion des NUP198 kann dann durch Anregung der gesamten Zelle beobachtet werden, da nur die vorher aktivierten Proteine fluoreszieren.

2.3 Reporterproteine

Reporterproteine sind Proteine, die die Eigenschaft besitzen, bei einer geeigneten Anregung oder unter Anwesenheit bestimmter Cofaktoren zu fluoreszieren oder deren Enzymaktivität detektiert werden kann. Das bedeutet, sie senden ein Lichtsignal aus, das mit dem Auge oder einer CCD-Kamera detektierbar ist. Sie dienen als Werkzeug, um andere Proteine lokalisieren zu können [21]. Dazu wird mittels gentechnischer Werkzeuge die DNA-Sequenz des Reporters an die DNA-Sequenz des zu untersuchenden Proteins gehängt. Die so modifizierte DNA wird in ein

⁵ Photoaktivierbare Variante des Green Fluorescent Protein (GFP)

⁶ Die beiden Enden eines Proteins werden als C- bzw. N-Terminus bezeichnet.

biologisches System (Zellen) transfiziert. Dieses System exprimiert die Protein-DNA und damit auch den Reporter.

Meist verwendet man als Reporter Fluoreszenzmarker, da diese keine Cofaktoren benötigen und leicht zu detektieren sind. Außerdem sind die meisten Fluoreszenzproteine relativ klein (wenige kDA), sodass ihre räumliche Struktur die Funktion des zu untersuchenden Proteins nicht behindert.

2.3.1 Pa-GFP

GFP (Green Fluorescent Protein) ist ein in der Molekularbiologie häufig eingesetztes Protein, welches bei Anregung fluoresziert. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* [22]. Es kann als Marker benutzt werden, um Proteine zu lokalisieren oder Aussagen über die Expression⁷ von Proteinen treffen zu können. Die zu untersuchende Zelle wird dazu mit der DNA, die für GFP kodiert, transfiziert (3.3.1). Nach der Expression kann es angeregt werden und fluoresziert. Im Vergleich zu anderen Markern benötigt es keine Cofaktoren für die Anregung oder Lichtemission.

Pa-GFP⁸ ist eine abgewandelte Form des Green Fluorescent Protein (GFP). Nach der Expression von pa-GFP im zu untersuchenden System kann der Marker ‚eingeschaltet‘ werden [23]. Diese Fähigkeit unterscheidet ihn von seinem nativen Verwandten, dem GFP. Durch geeignete Anregung innerhalb eines vorgegebenen Volumens und einer spezifischen Anregungswellenlänge ist es möglich, die Fluoreszenzintensität des Moleküls deutlich zu erhöhen.

Gerade die Aktivierung von pa-GFP mittels 2 Photonen bietet eine einzigartige Möglichkeit der Aktivierung, da die Anregung auf ein optisches Volumen im Femtoliterbereich beschränkt werden kann. Die Aktivierung findet statt, indem das Reporterprotein eine Fotokonversion vollzieht.

Photoaktivierung und Photokonversion wurden bereits in [24] beschrieben. Sie sind bedeutsame Methoden, um dynamische Prozesse in lebenden Zellen zu untersuchen. Fotokonversion findet statt, indem das Pa-GFP Molekül eine Verschiebung in der Chromophor⁹-Population erfährt. Dabei geht es von seiner neutralen Phenolform in eine anionische Phenolatform über (vgl. Abbildung 4A).

Das Anregungsmaximum von GFP liegt bei 488 nm. Es emittiert maximal bei 507 nm.

⁷ Als Expression wird das Synthetisieren von Proteinen aus dem genetischen Code bezeichnet

⁸ Pa-GFP = photoaktivierbares GFP

⁹ Chromophore sind die Elemente innerhalb eines Farbstoffs, deren Elektronen angeregt werden können

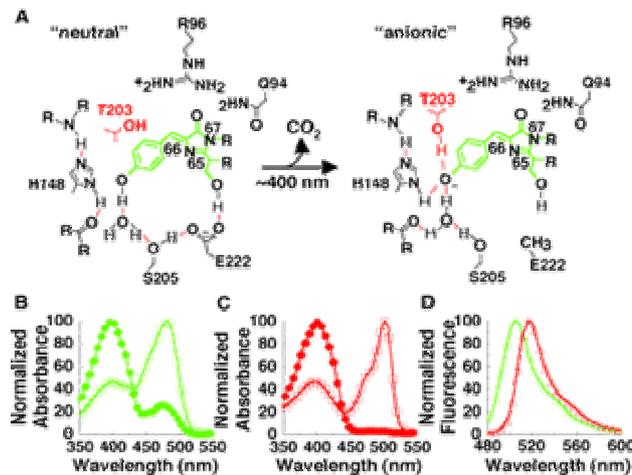


Abbildung 4: Absorptions- und Emissionsspektren von PA-GFP. Die Kreise kennzeichnen die native Absorptionen, Quadrate die photoaktivierten Absorptionen von Wildtyp GFP (B) und PA-GFP (C). D repräsentiert die Emissionsspektren von Wildtyp GFP (grüne Kreise) und PA-GFP (rote Dreiecke). Siehe [25] für detaillierte Informationen.

2.3.2 DsRed

DsRed ist ein rot-fluoreszierendes Protein. Es kommt naturgemäß in der Qualle *Discosoma genus* vor [25]. Wie GFP benötigt es keine Cofaktoren, sondern kann mittels Lichtenergie angeregt werden.

In dieser Arbeit kommen zwei DsRed-Konstrukte zum Einsatz: Pra1-DsRed sowie NLS-CHS-DsRed. Pra1 ist ein Protein, das sich gruppenweise um den Zellkern herum ansammelt. NLS-CHS ist die Chalkonsynthase, ein Kernprotein, das ein Kernlokalisierungssignal (NLS) besitzt, sodass es nicht ins Cytoplasma diffundiert. Beide Reportervarianten werden getestet.

Das Anregungsmaximum von DsRed liegt bei 558 nm. Es emittiert maximal bei 583 nm.

2.4 Multifokaler multispektraler descanned Modus

Die 2PLSM erlaubt eine hoch aufgelöste dreidimensionale Untersuchung biologischer Proben. Mittels der 2PLSM ist es allerdings nicht nur möglich, die Struktur von Proben aufzuklären, sondern ebenfalls spektrale Informationen zu sammeln, also zwischen verschiedenen Fluorophoren zu unterscheiden [26]. Standardmäßig werden dazu Filter eingesetzt, die vor den Detektor platziert werden und selektiv nur Fluoreszenzlicht eines speziellen Wellenlängenbereichs passieren lassen. Der Einsatz von Filtern ist allerdings problematisch, wenn es darum geht, mehrere Fluorophore innerhalb einer Probe zu unterscheiden. Für unterschiedliche Farbstoffe muss zwischen spezifischen Filtern hin und her geschaltet werden, was die Aufnahmezeit erheblich erhöhen kann. Zudem kann es während dieser Zeit passieren, dass sich die Probe verschiebt, was gerade bei wassergelösten Proben vorkommt. Eine Lösung

dafür ist die simultane Detektion aller angeregten Fluorophore. Ein weiteres Problem entsteht durch das Überlappen der Spektren mehrerer Fluorophore. Werden innerhalb einer Probe unterschiedliche Farbstoffe angeregt, so werden deren emittierte Fluoreszenzen gleichzeitig detektiert. Das resultiert darin, dass räumliche und die spektrale Information für jeden Anregungsfokus vermischt werden.

In diesem Setup wird die Probe parallel mit 8 Foki angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wird anschließend spektral aufgespalten und separat detektiert, sodass für jeden Fokus innerhalb einer zweidimensionalen Region zusätzlich die spektralen Charakteristika gespeichert werden [11]. Der größte Vorteil dieser Methode liegt in einem deutlichen Geschwindigkeitsvorteil, da die Probe mit mehr als einem Fokus gescanned wird und außerdem keine Filter gewählt werden müssen, um zwischen unterschiedlichen Fluorophoren zu unterscheiden.

2.5 FLIM

Der Einsatz von Lasern zur Fluoreszenzanregung bietet die Möglichkeit, biologische Proben auf ihre Struktur oder ihre spektrale Zusammensetzung (2.4) hin zu untersuchen. Die durch die Photonen des Laserstrahls angeregten Fluorophore emittieren dabei, nach einer Lebenszeit des angeregten Zustands im ns-Bereich, Fluoreszenzstrahlung (2.1).

Durch eine neue Technik, die die zeitliche Differenz zwischen Anregung und Emission misst, kann eine zusätzliche, temporale Information gewonnen werden. Das wird dazu verwendet, um Moleküle desselben Typs voneinander zu unterscheiden. Diese können bei verschiedenen Umgebungsbedingungen wie pH-Wert oder Temperatur unterschiedliche Fluoreszenzlebenszeiten besitzen [27]. Diese Technologie der Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy gewinnt innerhalb der 2PLSM seit einigen Jahren immer mehr an Bedeutung [28].

Die Ergebnisse von FLIM-Aufnahmen werden als Fluoreszenzabklingkurven dargestellt. Sie liegen typischerweise im Nanosekundenbereich und werden mittels zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen (TCSPC – Time-Correlated Single Photon Counting,) berechnet [29].

Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau eines FLIM-Systems.

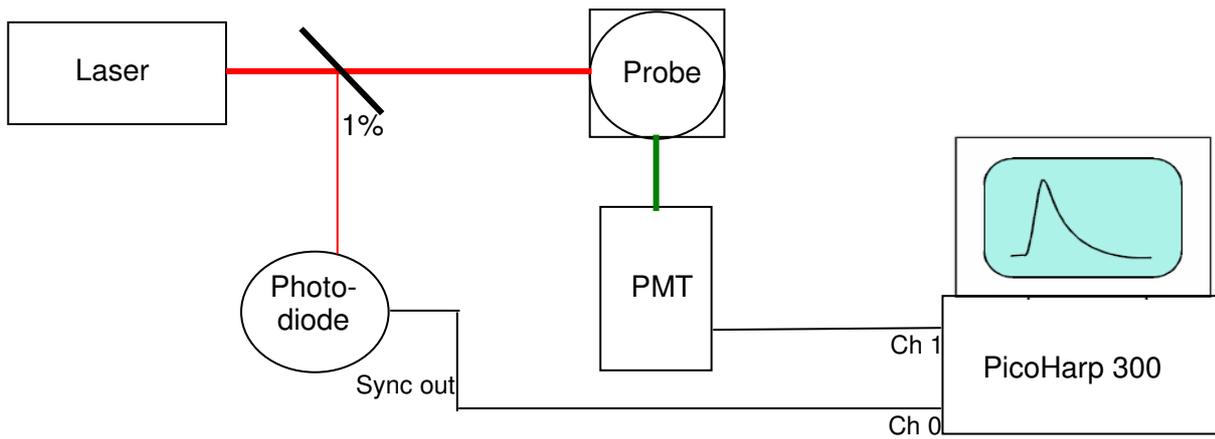


Abbildung 5: FLIM-Setup. Laserstrahl regt die Probe an, der Photomultiplier detektiert deren Fluoreszenzphotonen. 1 % des Laserstrahls wird abgekoppelt und der Laserpuls mit einer Photodiode detektiert. Dieses Referenzsignal trifft an Channel 0 des PicoHarp 300 an, das Fluoreszenzsignal an Channel 1.

3 Material und Methoden

3.1 IX71

Das verwendete Mikroskop ist ein kommerzielles Produkt der Firma Olympus. Die Abbildung 6 veranschaulicht den Aufbau des Mikroskops und benennt die wichtigsten Elemente [30]. An das Mikroskop ist eine Scaneinheit angeschlossen, an die wiederum ein Laser angekoppelt ist (siehe folgendes Kapitel).

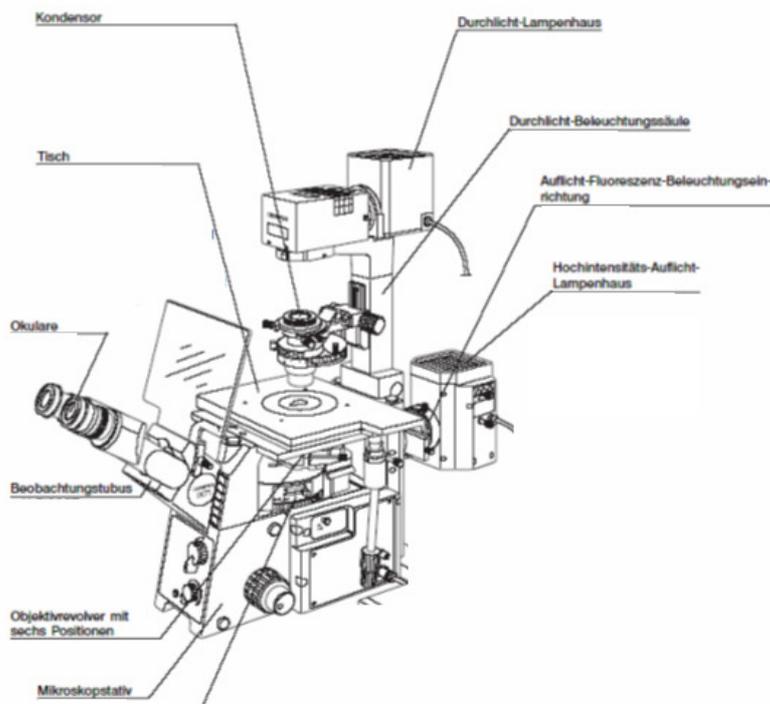


Abbildung 6: Übersicht IX 71 [30]

3.2 Zweiphotonen-Anregung

Das im Folgenden dargestellte Setup dient als Basis, auf der alle abweichenden Modi aufbauen. Es wurde von Jörg Martini im Rahmen seiner Doktorarbeit etabliert. Mit diesem System ist es möglich, sowohl descanned wie auch non-descanned zu messen. Im descanned Modus wird die Fluoreszenz über die Scanspiegel zurückgeleitet, was zu ruhenden Foki führt und besonders im Multifokalen Multispektralen Messmodus (2.4) wichtig ist. Im non-descanned Modus wird die Fluoreszenz direkt am Mikroskop mit einer Kamera bzw. einem Photomultiplier (PMT) detektiert.

Zum grundlegenden Verständnis werden an dieser Stelle die wichtigsten Komponenten erläutert. Abbildung 7 stellt den Aufbau schematisch dar.

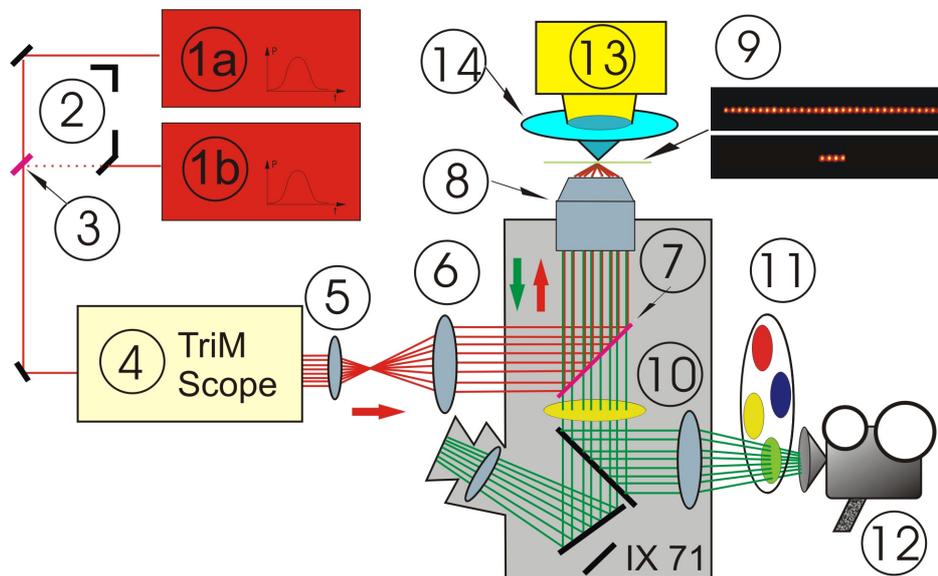


Abbildung 7: Schematischer Aufbau [15].

1a) Ti:Sa Laser; 1b) Ti:Sa Laser; 2) Shutter; 3) Dichroitischer Spiegel; 4) Scanning und Multiplexing Einheit; 5) Scanlinse; 6) Tubuslinse; 7) Dichroitischer Spiegel; 8) Objektiv; 9) Probe; 10) short pass Filter; 11) Filterrad; 12) CCD Kamera; 13) Hg Fluoreszenzlampe; 14) band pass Anregungsfilter; Schwarze Balken repräsentieren 100% Spiegel

Das anregende Laserlicht liegt im nahen Infrarot Bereich zwischen 780 und 960 nm ^[15]. Es wird erzeugt von einem Ti:Sa (Titan-Saphir)-Laser, der eine Repetitionsrate von 80 MHz besitzt. Die erzeugten Anregungspulse liegen im Femtosekundenbereich (100 fs). Der erzeugte Laserstrahl wird in die Scaneinheit (TRIMScope) geschickt, wo der Strahl innerhalb der Multiplexingeinheit auf bis zu 64 Strahlen aufgeteilt werden kann. Über die Steuersoftware Inspector lässt sich sowohl die Anzahl der Strahlen (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64) wie auch die Intensität (1%, 2%, 4%, 8%, 16%, 32%, 64%, 100%) einstellen. Anschließend wird der Strahl über ein Scan-Tubuslinsensystem geleitet und trifft im non-descanned Messmodus auf einen dichroitischen Spiegel¹⁰, der das anregende Licht auf das Objektiv lenkt, wo es die Probe anregt. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht kann den dichroitischen Spiegel passieren und anschließend detektiert werden. Im descanned-Modus kann ein 100% Spiegel eingedreht werden, der das emittierte Fluoreszenzlicht über diesen Spiegel zurück in den Scanner schickt. Dort wird es durch einen Dichroiden vom Anregungslicht getrennt und durch ein Gradsichtprisma geschickt, der das Fluoreszenzlicht spektral aufspaltet. Dieser Messmodus wird im Kapitel (3.4.1) näher erläutert.

¹⁰ Ein dichroitischer Spiegel reflektiert einen Spektralbereich des einfallenden Lichts und lässt bestimmte Wellenlängen passieren.

Das Mikroskop besitzt zwei Ausgänge, an denen Detektoren angeschlossen werden können. Zum Einsatz kommen hier ein Photomultiplier (Hamamatsu H7422-40) sowie eine CCD-Kamera (IXON DV887ECS-UVB, Andor Technology).

Außerdem befindet sich am TRIMScope eine Triggerbox mit mehreren Ports, die die Signale der Scanspiegel weiterleitet. Das ist wichtig für Geräte, die damit Korreliert werden müssen (z.B. Kamera).

Mithilfe des variabel gestalteten Aufbaus lassen sich verschiedene Messmodi realisieren. Er erlaubt es, durch wenige Handgriffe zwischen descanned und non-descanned Messungen zu wechseln und ist damit flexibel für Erweiterungen wie den Anschluss eines FLIM-Systems.

3.3 Proteindynamik des Kernporenkomplexes

3.3.1 Transfektion

Die Transfektion wurde von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Genomforschung durchgeführt.

Die Tabak-Zellen wurden protoplastiert und mithilfe eines Kloniervektors mit DsRed und pa-GFP cotransfiziert. Eine Protoplastierung macht die Zellen sehr anfällig für Umweltreize, allerdings sind sie so in der Lage, fremde DNA aufzunehmen und diese zu exprimieren.

Das Transfektionsprotokoll befindet sich im Anhang.

Pa-GFP dient der Lokalisierung eines markierten Proteins im Cytosol oder im Zellkern. DsRed als Reporter erfüllt zwei Aufgaben: Zum einen können bei geeigneter Anregung (siehe 3.3.3) positiv transfizierte selektiert werden, zum anderen erlaubt die Identifizierung von Pra1 mittels DsRed die Lokalisierung der Kernmembran. Das erlaubt die gezielte Aktivierung von NUP198-pa-GFP in einem definierten Volumen auf der Kernmembran.

Zum Testen der pa-GFP-Aktivierung werden Protoplasten mit folgenden Konstrukten transfiziert:

- NLS-CHS-DsRed (Kernmarker) + pa-GFP-LCL1¹¹ (Cytosol und Kern)
- Pra1-DsRed (Kernmembran) + pa-GFP-LCL1_nes¹² (bleibt im Kern)

¹¹ MYB1R-Transkriptionsfaktor [32]

¹² LCL1-Exportnegativ-Mutante

3.3.2 Tabak-Protoplasten

Protoplasten sind Zellen, deren Zellwand mittels Enzymen verdaut wurden [31]. Diese Zellen werden lediglich von ihrer extrem dünnen Zellmembran geschützt und nehmen eine kugelförmige Gestalt an. Die Membran hindert die Moleküle im Cytosol an der Diffusion ins umgebende Medium. Die eingesetzten Zellen stammen von der Zelllinie BY-2, die häufig in der Genetik eingesetzt wird.

3.3.3 Filter

Zur Anregung der Reporterproteine und zur Detektion der Fluoreszenz kommen folgende Filtersysteme zum Einsatz.

DsRed: 543/22 (Anregungsfilter), 562 (Strahlteiler), 593/40 (Emissionsfilter)

pa-GFP: 470/40 (Anregungsfilter), 495 (Strahlteiler), 525/50 (Emissionsfilter)

Die Anregungsfilter werden vor den Kondensator des Mikroskops eingeschoben, die Emissionsfilter befinden sich als Filtercube gemeinsam mit dem Strahlteiler in der Kassette unterhalb des Objektivrevolvers..

3.4 Multifokaler multispektraler descanned Modus

3.4.1 Setup

In der Laserscanning-Mikroskopie werden zur Bildaufnahme CCD-Kameras oder Photomultiplier eingesetzt. Diese Detektoren sind allerdings nicht in der Lage, die spektralen Charakteristika von Fluoreszenzemissionen einzufangen. Daher werden Filter eingesetzt, um verschiedene Charakteristika und somit verschiedene Fluorophore zu unterscheiden. Da häufig nicht bekannt ist, wie viele Fluorophore in einer biologischen Probe existieren, muss eine Vielzahl an Filtern eingesetzt werden, damit ein großer Spektralbereich abgedeckt wird. Der Einsatz vieler Filter verlängert allerdings die Aufnahmezeit. Außerdem würde das resultierende zweidimensionale Bild die räumliche und die spektrale Information des angeregten Bereichs und somit der Fluorophore vermischen. Die Lösung für dieses Problem ist eine simultane Detektion verschiedener Wellenlängenbereiche.

Da es bei der 2PLSM möglich ist, descanned zu messen, kann ein stationäres Bild erzeugt werden. Das ist möglich, weil die Fluoreszenz den gleichen Weg nimmt wie das Anregungslicht,

da die Fluoreszenz nur nach wenigen Nanosekunden emittiert wird. In diesem Zeitraum verharren die Scanspiegel noch kurz in ihrer derzeitigen Position, bevor der nächste Punkt angesteuert wird. Dadurch kann es über den 100% Spiegel zurückgeleitet werden, wo es innerhalb des Scanners durch einen Dichroiden vom anregenden Laserstrahl getrennt wird und auf ein Gradsichtprisma trifft. Dieses Prisma spaltet das Fluoreszenzlicht spektral auf, sodass acht Fluoreszenzlinien entstehen. Diese Linien werden auf einem 8x8 Multianoden PMT abgebildet, vor dem sich ein Array aus acht Schlitzblenden befindet, um das auftretende Streulicht zu blocken. Jede Zeile des PMT detektiert auf diese Weise unterschiedliche spektrale Charakteristika eines bestimmten Punktes wohingegen jede Spalte einen Fokus repräsentiert. Die acht anregenden Foki scannen die anzuregende Region innerhalb der Probe mithilfe von zwei Scanspiegeln in x- und y-Richtung. Als Ergebnis erhält man acht spektral aufgelöste Bilder von leicht verschobenen Regionen aus der Probe. Diese werden anschließend wieder übereinander gelegt, um einen Bilderstapel zu erhalten, der auf acht Kanälen unterschiedliche spektrale Informationen der Probe enthält. Dazu muss ein Verschiebevektor bestimmt werden, der alle Bilder eines Stapels in der Weise verschiebt, dass jeder Punkt eines Bildes räumlich mit den entsprechenden Punkten der anderen Bilder übereinstimmt. Abbildung 8 Abbildung 10 zeigt den Aufbau dieses Modus'. Der Vorteil des Einsatzes von acht Foki statt einem ist hauptsächlich die gewonnene Messgeschwindigkeit (eine Aufnahme dauert ca. 4 Sek.). Zusätzlich mittelt sich durch den Einsatz mehrerer Foki aber auch die Messgenauigkeit heraus, da nicht alle Kanäle die gleiche Sensitivität aufweisen.

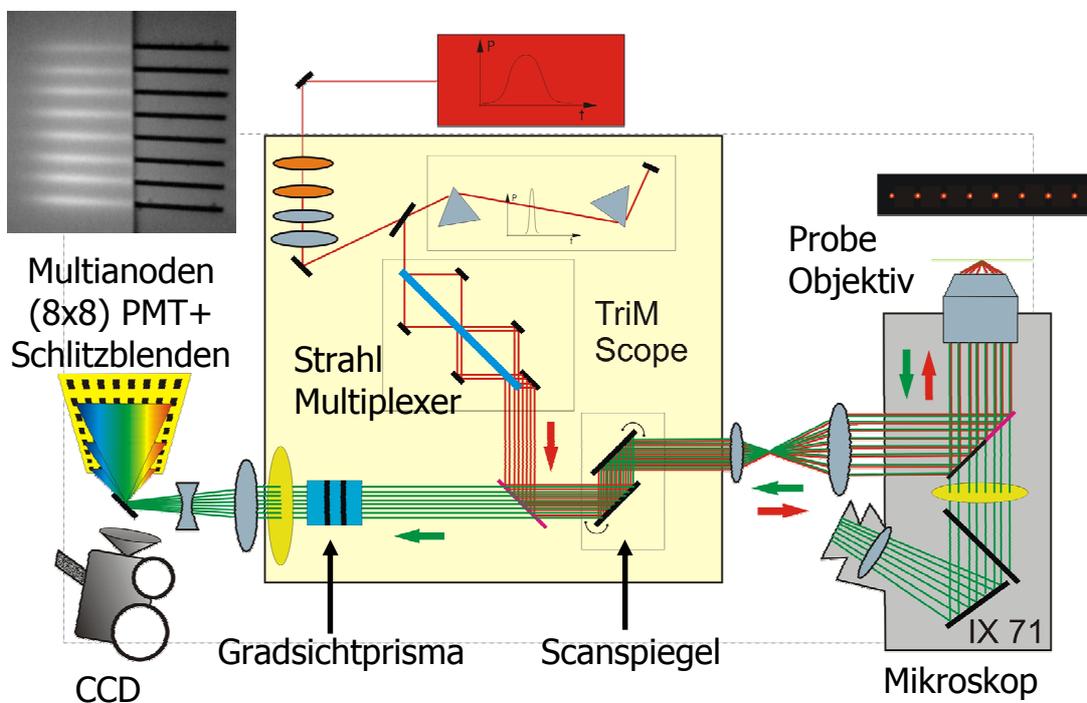


Abbildung 8: Setup des Multifocal-Multispectral-Modus.

Der Laserstrahl wird vom Strahlmultiplexer in acht Anregungsfoki aufgeteilt. Diese werden über die Scanspiegel in das Mikroskop geschickt und regen die Probe an. Die acht resultierenden Fluoreszenzfoki nehmen denselben Weg zurück über die Scanspiegel und

werden anschließend mit Hilfe des Gradsichtprismas spektral aufgespaltet. Dabei entstehen acht Fluoreszenzlinien, die auf dem 8x8 PMT detektiert werden. Der Bereich links oben zeigt die Schlitzblenden, die zur Hälfte abgedeckt sind, um die Fluoreszenzlinien zu verdeutlichen.

Das Ergebnis einer Aufnahme ist ein Bilderstapel aus 64 Bildern, wobei jede Zeile die spektrale Information und jede Spalte die räumliche Information enthält. Das heißt, die Zeilen detektieren das auf Linien aufgespaltete Fluoreszenzlicht, die Spalten die verschiedenen Foki.

Die räumlichen Informationen werden wieder übereinander gelegt, um einen Stapel aus 8 Bildern zu erhalten (Abbildung 9). Dieser kann dann mit Hilfe von „Spectral Unmixing“ (3.4.4) prozessiert werden. Dabei wird jeder Bildpixel einem bestimmten Spektrum zugeordnet, sodass sich durch diese Methode Fluorophore oder Komponenten auf Basis ihrer spektralen Charakteristik unterscheiden lassen.

Nach dem „Spectral Unmixing“ liefert die Software ein Bild, welches zwei oder mehr Fluorophore bzw. Komponenten aufgrund ihrer spektralen Unterschiede berechnen konnte.

3.4.2 Bestimmung des Verschiebevektors

Durch den im Kapitel 3.4 erwähnten Verschiebevektor wird der relative Shift der acht Bilder, hervorgerufen durch die anregenden Foki, berechnet. Zur Bestimmung dieses Vektors muss in jedem der acht leicht verschobenen Bilder eines Spektralkanals jeweils derselbe Punkt ausgewählt werden. Sehr gut eignet sich eine Aufnahme mit Fluoreszenzbeads, da diese sehr klein sind, immer eine bestimmte Größe aufweisen und stark fluoreszieren, wodurch sie in einer Aufnahme gut zu bestimmen sind. Die Position eines einzelnen Beads kann auf ein paar wenige Pixel genau bestimmt werden. Innerhalb eines Bildstapels wird so jeweils der gleiche Bead für jedes Bild, das einen Fokus repräsentiert, markiert und seine Position notiert. Anhand der relativen Positionen wird der Verschiebevektor berechnet, mit dessen Hilfe alle Bilder eines Stapels übereinander gelegt werden.

Dieselben acht spektralen Einzelbilder eines Fokus werden dementsprechend integriert. Das Resultat ist ein Bild eines Spektralkanals, das die Information aus acht Einzelbildern enthält. Der so neu gebildete Stack besteht aus acht benachbarten Spektralbildern. Dabei entsteht im rechten äußeren Rand des Gesamtbildes ein Bereich, der nicht durch alle acht Foki abgedeckt wird. Dieser Bereich ist im Bild als Streifen erkennbar.

Das Verschieben selbst wird durchgeführt mithilfe eines Makros in ImageJ [11].

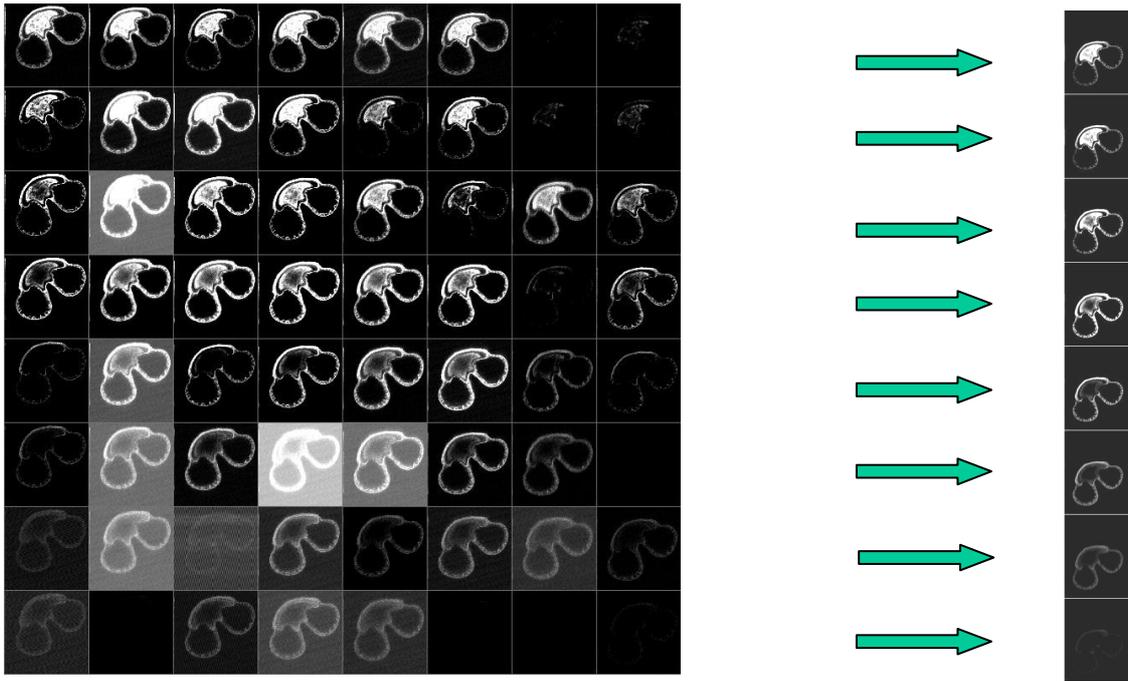


Abbildung 9: LINKS: Resultierender Datensatz einer Aufnahme mit 8 Zeilen (spektrale Information) und 8 Spalten (räumliche Information). RECHTS: Die 8 Spalten werden übereinander gelegt, um für jeden Fokus das Spektrum zu erhalten.

3.4.3 Spectral calibration

Um eine wissenschaftliche Aussage treffen zu können, ist es wichtig, die detektierten Bereiche einer Wellenlänge zuzuordnen. Dazu muss eine Kalibrierung durchgeführt werden.

Um entscheiden zu können, wie groß die Wellenlängenbereiche sind, die die einzelnen Kanäle detektieren, wird eine Aufnahme mit einer stark fluoreszierenden Probe durchgeführt. In den Strahlengang werden schmalbandige Filter (zwischen 6 nm und 8 nm) eingesetzt, sodass immer nur ein bestimmter Wellenlängenbereich der Fluoreszenz aus der Probe auf den PMT trifft. Der PMT konnte also nur auf einigen Segmenten Fluoreszenzphotonen detektieren. Als Referenzprobe wird hier eine Polle gewählt. Diese Probe hat den Vorteil, dass sie relativ stark fluoresziert und zugleich ein breites Emissionsspektrum besitzt. Da die eingesetzten Filter eine geringe Transmissionsrate¹³ (40% bis 50%) besitzen, sind stark fluoreszierende Proben hier von Vorteil. Die eingesetzten Filter liegen im Wellenlängenbereich von 512 nm bis 630 nm. Mit jedem Filter wurde eine Aufnahme der Polle gespeichert. Für jede Aufnahme wird notiert, auf welchen PMT-Kanälen die Polle zu erkennen war. Die getroffenen Kanäle weisen eine hohe Gesamtintensität auf, im Gegensatz zu den Kanälen, die die Probe nicht oder kaum detektieren. Abbildung 10 zeigt eine Beispielaufnahme ohne Filter und mit einem 533 nm- Filter.

¹³ Die Transmissionsrate gibt an, wie viel Prozent des eingestrahlichten Lichts der Spiegel durchlässt

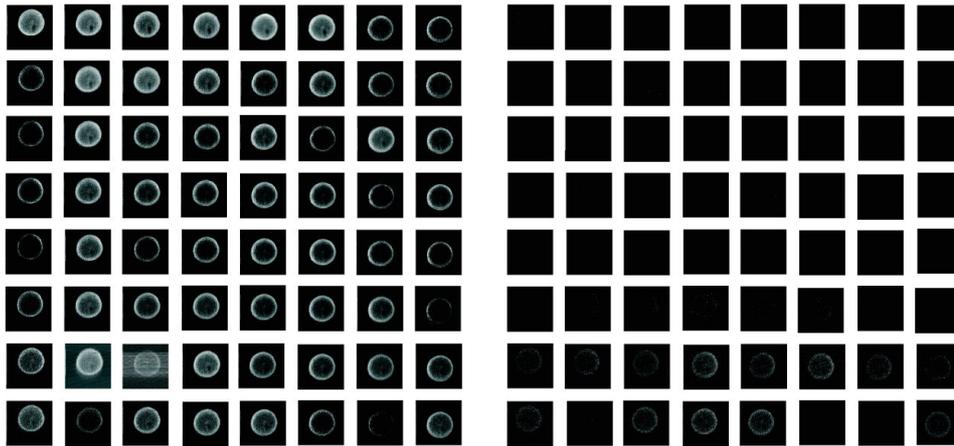


Abbildung 10: LINKS: ohne Filter; RECHTS: Filter 533 nm

Einige Filter können auf mehr als einem Kanal Fluoreszenz detektieren. Dafür gibt es zwei Gründe. Zum einen kann die Transmission des Filters genau zwischen zwei Kanälen liegen, zum Anderen können auch die echten FWHM¹⁴-Werte oberhalb der angegebenen Spezifikationen liegen, sodass die Breite des Filters höher ist als vom Hersteller angegeben.

Alle gemessenen Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sie zeigt alle eingesetzten Filter, ihre Breite in nm, die Transmission sowie die Nummer der Kanäle, die für den entsprechenden Filter die Probe detektieren. Die Werte der Tabelle werden in eine Kalibrationskurve übertragen (Abbildung 11). Anhand dieser Kurve ist es nun möglich, bei einer Messung direkt die Wellenlänge abzulesen, für die ein PMT-Segment detektiert.

Wie man in Abbildung 11 an der Kalibrationskurve erkennen kann, spaltet das eingesetzte Prisma das eingesetzte Gradsichtprisma nicht linear auf. Aus diesem Grund muss nach einem Umbau des Setup eine neue Kalibrierung durchgeführt werden. Dieser Aufbau erlaubt eine Detektion innerhalb von 110 nm.

Wavelength in nm	HW in nm	Transmission max. in %	PMT row
512.1	6.9	52.5	none
525.5	8.0	48.0	1
533.0	6.3	47.1	1,2
535.7	6.0	50.8	1,2
548.9	6.0	52.0	3,4
559.4	8.2	35.8	4,5
572.1	6.4	48.5	5
591.4	7.1	41.0	7
597.2	7.6	41.7	7,8
608.1	6.6	47.5	8
619.8	6.3	48.5	8
631.9	7.2	43.8	none

Tabelle 1: Tabelle mit eingesetzten Filtern

¹⁴ Full Width Half Maximum

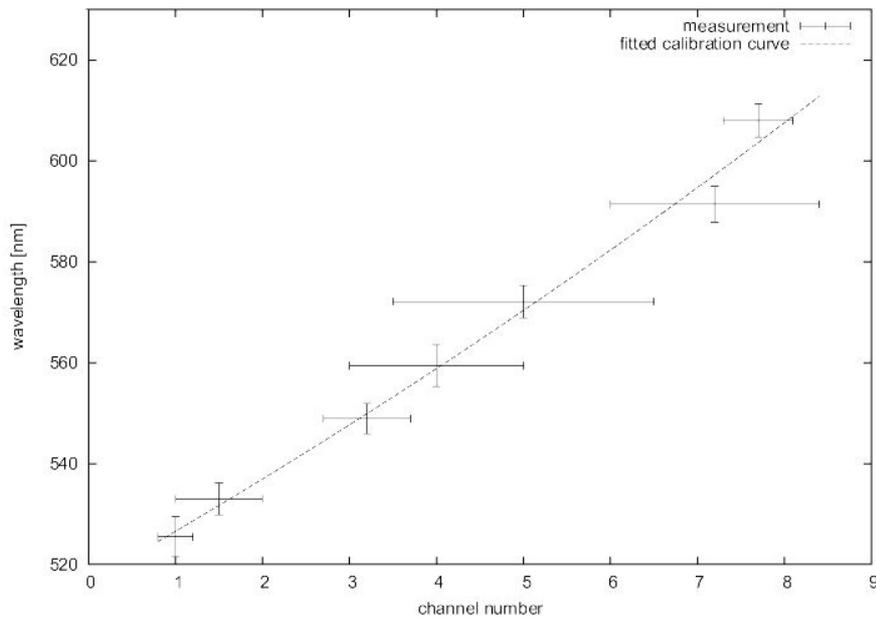


Abbildung 11: Kalibrierungskurve. Die Abszisse zeigt die Kanalnummer, die Ordinate die Wellenlänge. X-Fehlerbalken zeigen die Anzahl der Detektionskanäle an, Y-Fehlerbalken die Breite der eingesetzten Filter (6 – 8 nm).

3.4.4 Spectral unmixing

Spectral Unmixing ist eine Programmoption innerhalb des Inspector-Programmpakets zur Trennung verschiedener Emissionsspektren [11]. Dabei wird jeder Bildpixel einem bestimmten Spektrum zugeordnet, sodass sich durch diese Methode Fluorophore oder Komponenten auf Basis ihrer spektralen Charakteristik unterscheiden lassen.

Die Funktionsweise beruht auf einem Test auf lineare Abhängigkeit der Emissionscharakteristika. Da sich Emissionsspektren innerhalb eines gewählten Wellenlängenbereichs häufig überlagern, ist es schwer, zu welchem Fluorophor die gemessene Emissionsintensität gehört. Beim Spectral Unmixing werden Regionen mit Emissionscharakteristika, die sich besonders deutlich unterscheiden, ausgewählt. Alle Pixel, aus denen sich das aufgenommene Bild zusammensetzt, werden mit den gewählten Emissionsspektren verglichen. Ein Algorithmus ordnet jedem Pixel ein Spektrum zu.

Mithilfe dieses Werkzeuges kann ein aufgenommenes Bild spektral entmixt werden. Dabei ist es unerheblich, ob die spektralen Unterschiede aus dem Einsatz von Fluoreszenzfiltern stammen oder ob das Bild mithilfe des multifokalen multispektralen Modus (3.4) aufgenommen wurde. Im letzteren Fall werden für alle acht Spektralkanäle für eine gewählte Region of Interest die Intensitäten in einem Graphen dargestellt. Eine Referenzaufnahme wurde mit einem Pollenkorn hergestellt. Die Abbildung 12b) zeigt einen solchen Graphen, der aus den rot-markierten Bereichen in a) und c) generiert wurde. Die x-Achse repräsentiert die acht Spektralkanäle, die y-Achse die integrierten Intensitäten. Es wurden beispielhaft die beiden Kanäle 3 und 8 gewählt, da sie zwei spektrale Charakteristika aufweisen, die sich sehr deutlich voneinander

abgrenzen. Diese beiden Kanäle sind charakteristisch für die zwei verschiedenen Kompartimente der Polle. a) zeigt die äußere Membran, wohingegen c) den inneren Bereich darstellt. Für diese unterschiedlichen Kompartimente unterscheiden sich die Spektren ebenfalls sehr deutlich. Das Spektrum von Bild a) weist einen charakteristischen Peak im hinteren Bereich des Graphen auf. c) zeigt einen deutlichen Peak im mittleren Bereich.

Die Inspector Software generiert mithilfe der Spectral Unmixing Option für jedes Spektrum ein Bild. Das Resultat ist in Abbildung 12d) dargestellt. Hier sind deutlich die zwei Komponenten zu erkennen. Die Farben rot und grün wurden gewählt, um den Unterschied der Komponenten innerhalb eines Bildes zu verdeutlichen. Sie geben nicht die natürlichen Farben der Probe wieder, sondern werden von der Software vorgegeben.

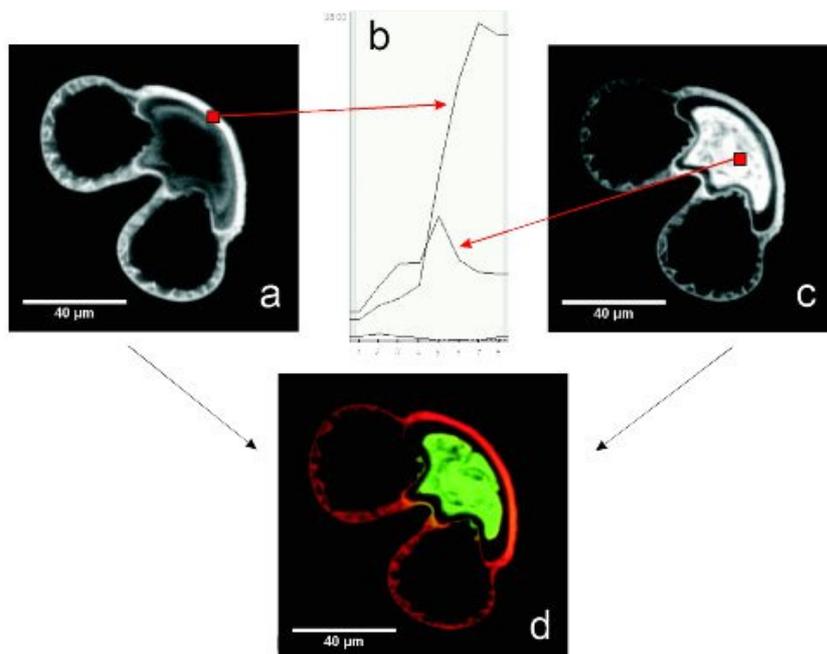


Abbildung 12: Spectral Unmixing. a) und c) repräsentiert die Intensitätsaufnahmen aus zwei ausgewählten Kanälen, die sich besonders stark unterscheiden. b) zeigt die durchschnittlichen Intensitätsspektren der rot markierten Bereiche. d) ist das Bild, das die Software auf Basis der spektralen Informationen aus b) liefert.

Da zuvor eine Kalibrierung durchgeführt wurde, kann anhand der Kalibrierungskurve bestimmt werden, welche Wellenlängen konkret von den beiden Beispielkanälen detektiert wurden. Kanal 3 detektiert in diesem Setup für ~ 550 nm, Kanal 8 für ~ 610 nm.

3.5 Time-Related Single Photon Counting

Das zeitkorrelierte Einzelphotonenzählen (TCSPC – Time-Related Single Photon Counting) ist die Methode, mit der das FLIM-System einzelne Photonen zählt, die eine angeregte Probe emittiert. Dabei wird eine FLIM-Aufnahme über mehrere Zyklen erstellt, bei denen die Probe mit

einem Anregungsstrahl gescannt wird. Bei diesem Verfahren werden hier erst Fluoreszenzphotonen gezählt und anschließend der zugehörige Anregungspuls des Lasers ermittelt. Die Abbildung 13 verdeutlicht diesen Vorgang.

Das Verfahren basiert auf der Detektion einzelner Photonen, die von der durch einen periodischen Laserpuls angeregten Probe emittiert werden. Dabei wird die Anregungsintensität so gering gewählt, dass die Wahrscheinlichkeit, in einem Zyklus ein Photon zu detektieren, sehr klein ist. Das ist wichtig, da die Elektronik nach einem Photonenergebnis einige Zehntel Nanosekunden Totzeit besitzt. Dadurch würde ein zweites detektiertes Photon innerhalb desselben Zyklus verloren gehen. Frühe Photonen würden vermehrt gezählt werden als späte. Dieser Effekt wird als ‚Pile-Up‘ bezeichnet [29], der darin resultiert, dass die Fluoreszenzlebensdauer als zu kurz berechnet werden würde. Die Zählrate muss folglich so gering gehalten werden, dass die Wahrscheinlichkeit, zwischen zwei Anregungspulsen mehr als 2 Photonen zu erhalten, gegen 0 tendiert. Daraus ergibt sich, dass Zyklen, in denen mehr als ein Photon detektiert wird, extrem selten sind. Pro detektiertem Photon wird die Zeit zum Anregungspuls gemessen und sowohl das Photon wie auch die Zeit im Speicher des TCSPC-Moduls hinterlegt (Abbildung 14). Der Anregungspuls dient dabei als Triggersignal und wird mithilfe einer Photodiode gemessen. Aus mehreren Messzyklen baut sich im Speicher eine Laufzeitverteilung auf. Das typische Ergebnis mehrerer Messzyklen ist eine Zerfallskurve für die angeregten Fluorophore. Sie spiegelt die charakteristische Lebensdauer des angeregten Moleküls wieder.

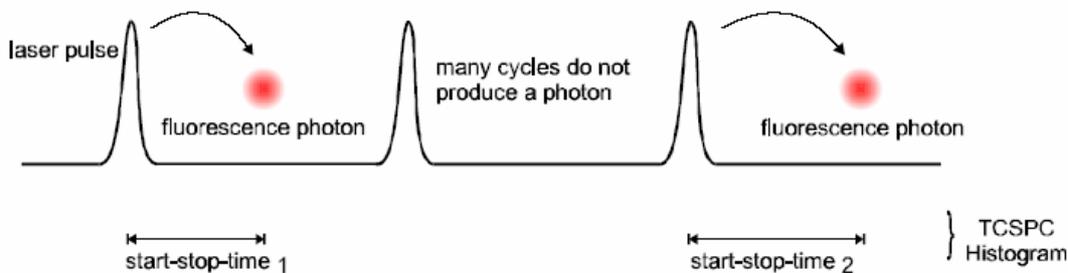


Abbildung 13: Schema Time-Correlated Single Photon Counting. Aus mehreren Zyklen wird ein Histogramm erstellt [24].

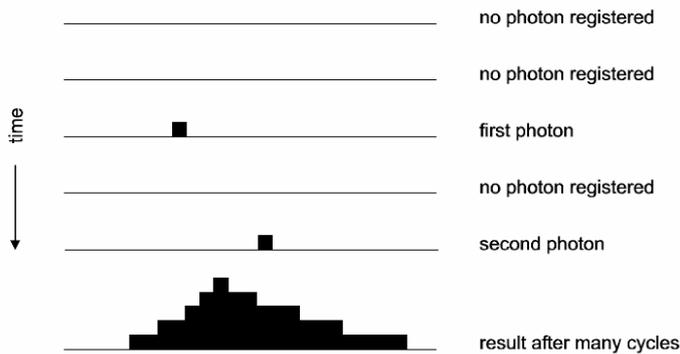


Abbildung 14: Histogrammerstellung beim Time-Correlated Single Photon Counting [24]

Die wichtigsten Elemente des TCSPC-Moduls sind:

- Constant-Fraction Discriminator (CFD)
- Time-to-Amplitude Converter (TAC)
- Analog-to-Digital-Converter (ADC)
- Histogrammer

Der Constant-Fraction Discriminator dient zur genauen Festlegung der Zeit des Eintreffens des jeweiligen Pulses. Er bestimmt aus dem elektrischen Puls, den der Detektor für ein registriertes Photon ausgibt, einen Detektionszeitpunkt. Das Problem bei der Messung von Fluoreszenzlebenszeiten ist, dass auf der einen Seite die Ausgangspulse des Photomultipliers und die Synchronisationspulse unterschiedliche Amplituden besitzen. Allerdings haben sie immer die gleiche Pulsform. Auf der anderen Seite muss die Zeit des Eintreffens der Pulse mit einer Zeitauflösung bestimmt werden, die kürzer als die Pulsdauer ist. Die Lösung ist die Detektion des Zeitpunktes, wann ein bestimmter Bruchteil der Pulshöhe erreicht ist (Constant Fraction).

Der Time-to-Amplitude Converter verknüpft das CFD- und das Trigger-Signal, indem er die Zeit zwischen Photonenpuls und Synchronpuls in eine Spannung wandelt. Dieser baut kontinuierlich eine Spannung auf, ähnlich einer Rampe, auf. Gestartet wird er durch das CFD-Signal, als Stoppsignal dient der Trigger. Dieser Vorgang wird als ‚Reversed Triggering‘ bezeichnet. Die dadurch erhaltene Spannung ist proportional zur Zeitdauer zwischen Anregungspuls und Photonendetektion.

Der Analog-to-Digital-Converter ordnet dieser Spannung, respektive der Zeit eine Speicheradresse zu. Das detektierte Photon wird zu den in dieser Speicheradresse registrierten Photonen addiert. Das geschieht mittels des Histogrammers, der den Wert der entsprechenden Speicherzelle um 1 erhöht.

3.5.1 Installation

Zur Installation des FLIM-Systems müssen nach dem Aufbau der Hardwarekomponenten und dem Anschließen aller Verbindungen (schematisch dargestellt in 2.5) die Trigger-Signale des

TRIMScope eingerichtet werden. Dazu wird das Triggerkabel „Frame“ an Port 3 der TRIMScope-Triggerbox angeschlossen, „Line“ an Port 4. Die SymphoTime-Software muss im „Maintenance-Mode“ gestartet werden, indem „/CONFIGURE“ hinter die Programmverknüpfung auf dem Desktop gehängt wird. Im Programm lädt man einen neuen Workspace und trägt im „Setup“ die in Abbildung 15 angegebenen Werte ein.

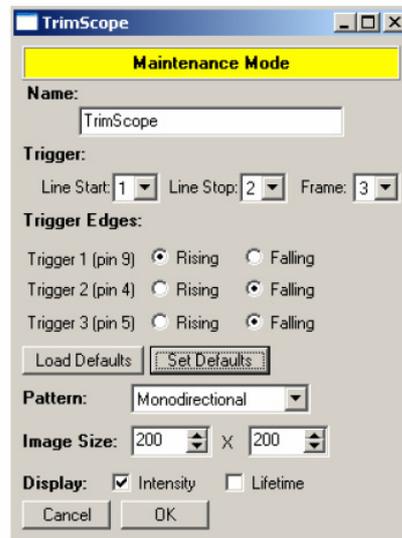


Abbildung 15: Einrichten Triggersignale

Wichtig ist dabei, dass das Line-Signal auf Trigger 1&2 liegt, der Frame-Triger auf 3, da sonst die Position der Scanspiegel nicht korrekt übermittelt wird und die Messsoftware (SymphoTime) nicht weiß, wo ein neuer Aufnahme-Frame beginnt. Anschließend wird eine Messung gestartet, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Image Größe mit der Scanfeldgröße im Inspector übereinstimmt. Sie errechnet sich aus:

$$Pixel = \frac{ScanWidth}{YIncrement}$$

Anschließend wird eine Aufnahme mit einer Referenzprobe durchgeführt. Dabei muss die Abklingkurve innerhalb des Messfensters, wie in Abbildung 15 zu sehen ist, liegen. Ist das nicht der Fall, muss das Kabel des Floureszenzsignals (vgl. Abbildung 5) entsprechend verlängert oder verkürzt werden, um das Signal zu verzögern bzw. zu beschleunigen.

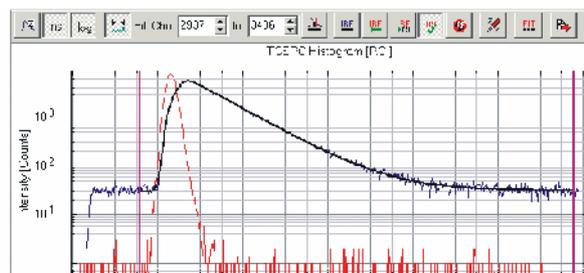


Abbildung 16: Referenzkurve (blau)

Als Referenzprobe dient Rhodamin G6, ein Fluoreszenzfarbstoff, der auch bei geringer Anregung emittiert. Dazu wird eine 1 mM Rhodamin G6-Lösung hergestellt:

Molmasse Rhodamin: $M = 477,2 \text{ g/mol}$

Volumen: $V = 30 \text{ mL}$

Konzentration: $c = 10^{-3} \text{ mol/L}$

$m = c * V * M = 0,0143 \text{ g Rhodamin auf } 30 \text{ mL H}_2\text{O}$

3.6 Eingesetzte Programme

Alle Experimente werden gesteuert durch das Programmpaket Inspector (LaVision BioTec). Durch diese Software lassen sich zum Einen die Einstellungen des Lasers, wie Intensität, Anzahl der Foki, Größe des Scanfeldes etc., regeln. Zum Anderen bietet das Paket die Möglichkeit, direkt Aufnahmen der Messungen zu machen und diese zu speichern. Die Software beinhaltet außerdem eine Vielzahl an Algorithmen, die der Auswertung der gemessenen Daten und aufgenommenen Bilder dienen.

Die 3- bzw. 4-dimensionale Rekonstruktion wird mit Imaris 4 (Bitplane) berechnet und dargestellt.

Die für den multifokalen multispektralen descanned Modus benötigte Aufbereitung der Bilder sowie das Shiften der 8er Stacks wird mithilfe von ImageJ durchgeführt.

FLIM-Aufnahmen werden gemessen mit der Symphotime Software von PicoQuant. Sie erlaubt sowohl die Darstellung als auch die Auswertung der Resultate.

4 Ergebnisse

4.1 Pa-GFP

Um die Proteindynamik des Kernporenkomplexes bestimmen zu können, sollte das Protein NUP198 mit pa-GFP fusioniert werden. Während des Zellzyklus wird dann gezielt ein kleiner Bereich der Kernhülle mit dem Laser bestrahlt, sodass an der Stelle das pa-GFP aktiviert wird. Als Vorexperiment wurde zunächst getestet, mit welchen Parametern pa-GFP am effektivsten aktiviert werden kann. Es werden Versuche mit zytosolischem pa-GFP und karyoplasmatischem pa-GFP durchgeführt.

Dazu werden BY2-Protoplasten auf einen Objektträger gegeben. Mit einer Pipette wird ein Volumen von 18 µl pipettiert. Bei diesem Volumen verteilen sich die Protoplasten so auf dem Träger, dass beim Auflegen des Deckglases wenige Protoplasten durch die auftretenden Adhäsionskräfte zerstört werden. Die Beleuchtungseinheit des Mikroskops wird gegen eine Fluoreszenzlampe zur 1-Photonenanregung des Pa-GFP ausgetauscht. Ihr Spektrum besitzt diskrete Banden, innerhalb derer der Anregungsbereich von pa-GFP sowie DsRed liegt. Zusätzlich werden Anregungsfilter eingesetzt.

Abbildung 17 zeigt einen mit Pra1-DsRed + pa-GFP-LCL1_nes¹⁵ cotransfizierten Protoplasten. a) zeigt die Hellfeld-Aufnahme, auf der deutlich im Zentrum der Zellkern zu erkennen ist. In b) wird derselbe Protoplast mit einer Fluoreszenzlampe mit einem Filter bei 543 nm angeregt. Der eingesetzte Emissionsfilter 593/40 selektiert die DsRed-Fluoreszenz der angeregten Pra1-Moleküle. Die um den Zellkern herum gruppierten Proteine identifizieren diesen Protoplasten als positiv transfiziert und markieren die Kernmembran.

¹⁵ LCL1_nes ist eine Mutante, bei der das Kernlokalisierungssignal (NES) ausgeschaltet ist

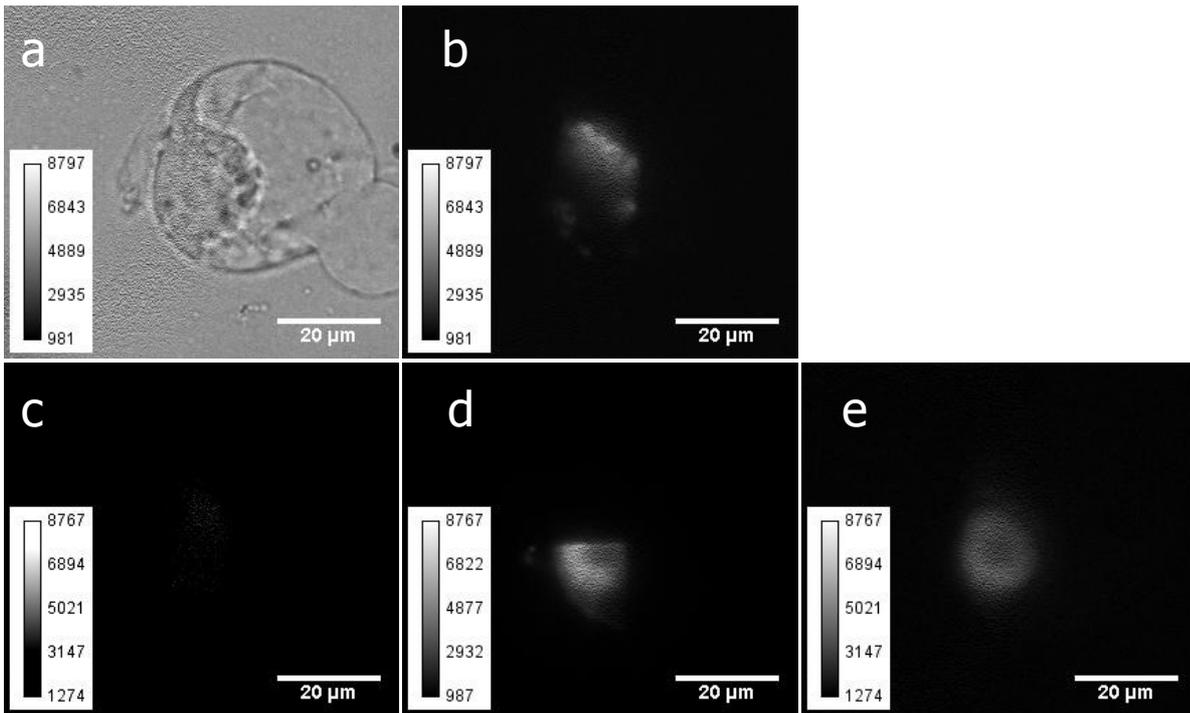


Abbildung 17: BY2-Protoplast bei der Aktivierung von pa-GFP. a) Hellfeld-Aufnahme, b) Anregung von Pra1-DsRed und Emissionsfilter 593/40, c) 1-Photonenanregung des pa-GFP vor Aktivierung mit Fluoreszenzlampe (Anregungsfilter 543/22) und Emissionsfilter 525/50, d) 2-Photonen Aktivierung des pa-GFP und Emissionsfilter 525/50 (Scanfeld 1500x1500, ~200 mW), e) 1-Photonenanregung nach Aktivierung mit Fluoreszenzlampe (Anregungsfilter 543/22) und Emissionsfilter 525/50

Bei 1-Photonenaktivierung (c) des GFP (543 nm) kann kaum Fluoreszenz detektiert werden. Ein kleiner Bereich im Kern wird mit 8 Strahlen und 68 mW/Fokus aktiviert (d). Die Aktivierung dauert ~ 3 Sekunden. Das Bild verdeutlicht das Scanfeld, das nicht den gesamten Kern abdeckt. Wie anhand der Farbskala zu erkennen ist, steigt bei der Aktivierung die Fluoreszenz stark an. Nach der Aktivierung (e) kann bei gleichen Parametern wie bei c) die Fluoreszenz des im Kern exprimierten und durch Diffusion verteilten pa-GFP+LCL1_nes detektiert werden.

Die Tabelle 2 zeigt die Absoluten Werte aller Pixel in den einzelnen Bildern c,d,e. Die Werte wurden mit der „Mean“-Funktion in ImageJ berechnet. Die Spalte „Faktor“ gibt die Verstärkung zwischen c und e an. Bei dieser Aktivierung beträgt die Verstärkung der Fluoreszenz 3,9.

	Vor Aktivierung (c)	Bei Aktivierung (d)	Nach Aktivierung (e)	Faktor
Intensität	1878	8655	7450	3,9

Tabelle 2: Absolute Intensitäten zu Abbildung 16. Mittlere Werte aller Pixel, berechnet mit ImageJ.

Die Abbildung 18 stellt die Aktivierung eines mit NLS-CHS-DsRed + pa-GFP-LCL1 cotransfizierten Protoplasten dar. In a) ist die Zelle als Hellfeld-Aufnahme zu erkennen. b) zeigt das im Kern angeregte (593 nm) DsRed, das den Protoplasten als positiv transfizierten

identifiziert. Das GFP wird in c) mit 1 Photon für ~ 3 Sekunden angeregt (543 nm, Emissionsfilter 525 nm). Die Anregung findet mit 8 Strahlen und 68 mW/Fokus stat. Dabei können kaum Fluoreszenzphotonen detektiert werden. d) zeigt die Aktivierung des pa-GFP. Das Scanfeld deckt die gesamte Zelle ab, um das pa-GFP innerhalb des Cytoplasmas zu treffen. Die Aktivierung wird von einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenz begleitet. Nach der Aktivierung kann mit 1-Photonenanregung pa-GFP Fluoreszenz über die gesamte Zelle verteilt detektiert werden (e). Dabei ist die Fluoreszenz im Kern aufgrund der Konzentration am höchsten.

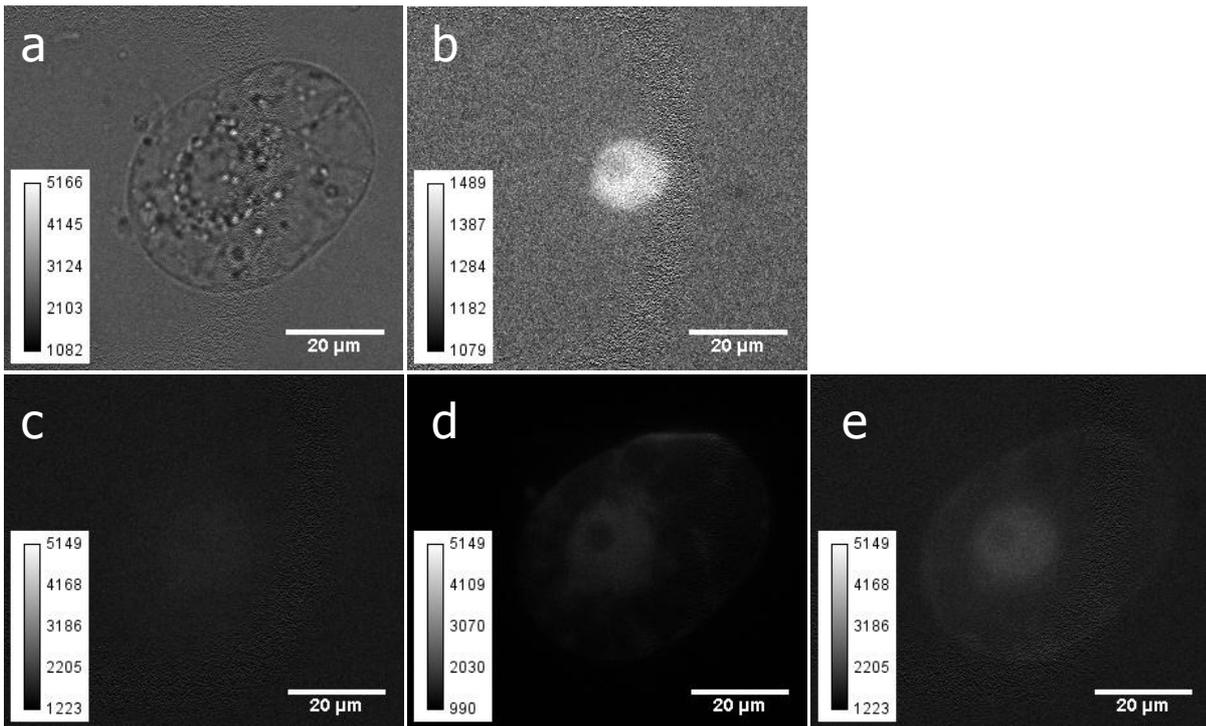


Abbildung 18: BY2-Prorotplast bei der Aktivierung von pa-GFP. a) Hellfeld-Aufnahme, b) Anregung von NLS-CHS-DsRed und Emissionsfilter 593/40, c) 1-Photonenanregung des pa-GFP vor Aktivierung mit Fluoreszenzlampe (Anregungsfilter 543/22) und Emissionsfilter 525/50, d) 2-Photonen Aktivierung des pa-GFP und Emissionsfilter 525/50 (Scanfeld 5000x5000, ~ 200 mW), e) 1-Photonenanregung nach Aktivierung mit Fluoreszenzlampe (Anregungsfilter 543/22) und Emissionsfilter 525/50

Tabelle 3 repräsentiert die Werte aller Pixel aus Abbildung 17. Bei dieser Aktivierung beträgt der Faktor zwischen vor Aktivierung und nach Aktivierung 3,4.

	Vor Aktivierung (c)	Bei Aktivierung (d)	Nach Aktivierung (e)	Faktor
Intensität	1241	4972	4274	3,4

Tabelle 3: Absolute Intensitäten zu Abbildung 17. Mittlere Werte aller Pixel, berechnet mit ImageJ.

Bei beiden Ansätzen kann ein deutlicher Anstieg in der Fluoreszenzintensität des pa-GFP nach der Aktivierung verzeichnet werden. Außerdem ist festzuhalten, dass die Intensität von DsRed bei gleich starker Anregung geringer ist als die des GFP.

4.2 Multifokaler multispektraler descanned Modus

Der multifokale multispektrale descanned Modus testet Proben auf ihre spektralen Eigenschaften. Dabei werden keine Filter eingesetzt. Mit diesem Messmodus werden verschiedene Proben untersucht. Dabei kommen auch die Protoplasten zum Einsatz, die im Kapitel 3.5.1 erläutert wurden. In diesem Kapitel werden zwei herausragende Proben vorgestellt, von denen eine native Fluoreszenz aufweist und die andere als Beispiel für markierte Proben dienen soll.

Zur Messung wird mit einer Rasierklinge eine wenige hundert μm dicke Scheibe aus einer Orangenschale geschnitten und mit einem Tropfen Milipore-Wasser auf einen Objektträger gebracht.

Abbildung 19 stellt das spektral entmischte Ergebnis der Orangenschale dar. Die grüne Färbung kennzeichnet die Zellwand, die aus Zellulose besteht. Rot markiert das Cytosol der Zellen. Die Streifen an der rechten Bildkante sind die in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Artefakte, die beim Shiftprozess der einzelnen Fokalbilder auftreten.

Bei dieser Probe wurde kein Marker verwendet. Die gut getrennten Zellkomponenten basieren auf der nativen Fluoreszenz der Probe.

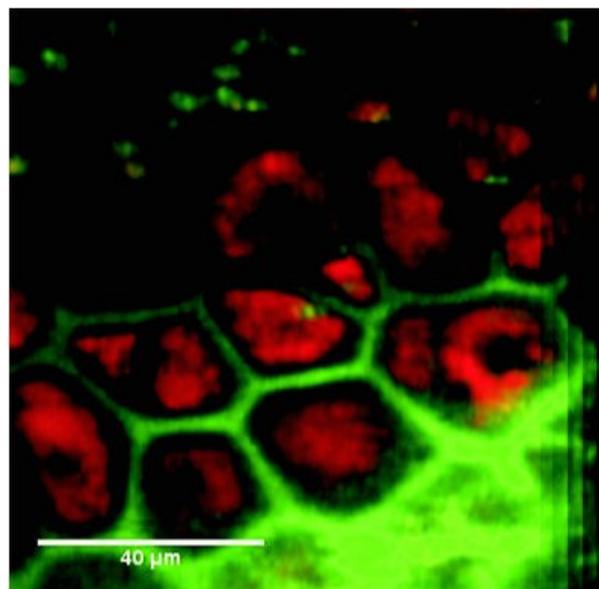


Abbildung 19: Orangenschale. Voneinander getrennte Zellwände (grün) und Cytoplasma (rot). Die Streifen auf der rechten Seite sind das typische Artefakt, das beim Shiften der acht Bilder entsteht. Detektionsbereich: 520 – 630 nm.

Eine Analyse von markierten Protoplasten wird wie in 4.1 beschrieben vorbereitet.

Abbildung 20 zeigt ein spektral aufgelöstes Bild eines Protoplasten. Dieser wurde mit dem Konstrukt NLS-CHS-DsRed + LCL1-pa-GFP transfiziert. In a) und b) ist der Prozess des Spectral Unmixing zu erkennen. Die blauen Bereiche markieren die gewählte Region of Interest. Sie wurden anhand der unterschiedlichen spektralen Charakteristika in diesen Bereichen ausgewählt. c) zeigt das resultierende spektral getrennte Bild. Die rote Färbung repräsentiert die Fluoreszenz des nur im Kern lokalisierten DsRed. LCL1 wird aktiv zwischen dem Kern und dem Cytosol transportiert. Daher wird die grün markierte pa-GFP-Fluoreszenz sowohl im Nucleus als auch im Cytosol detektiert.

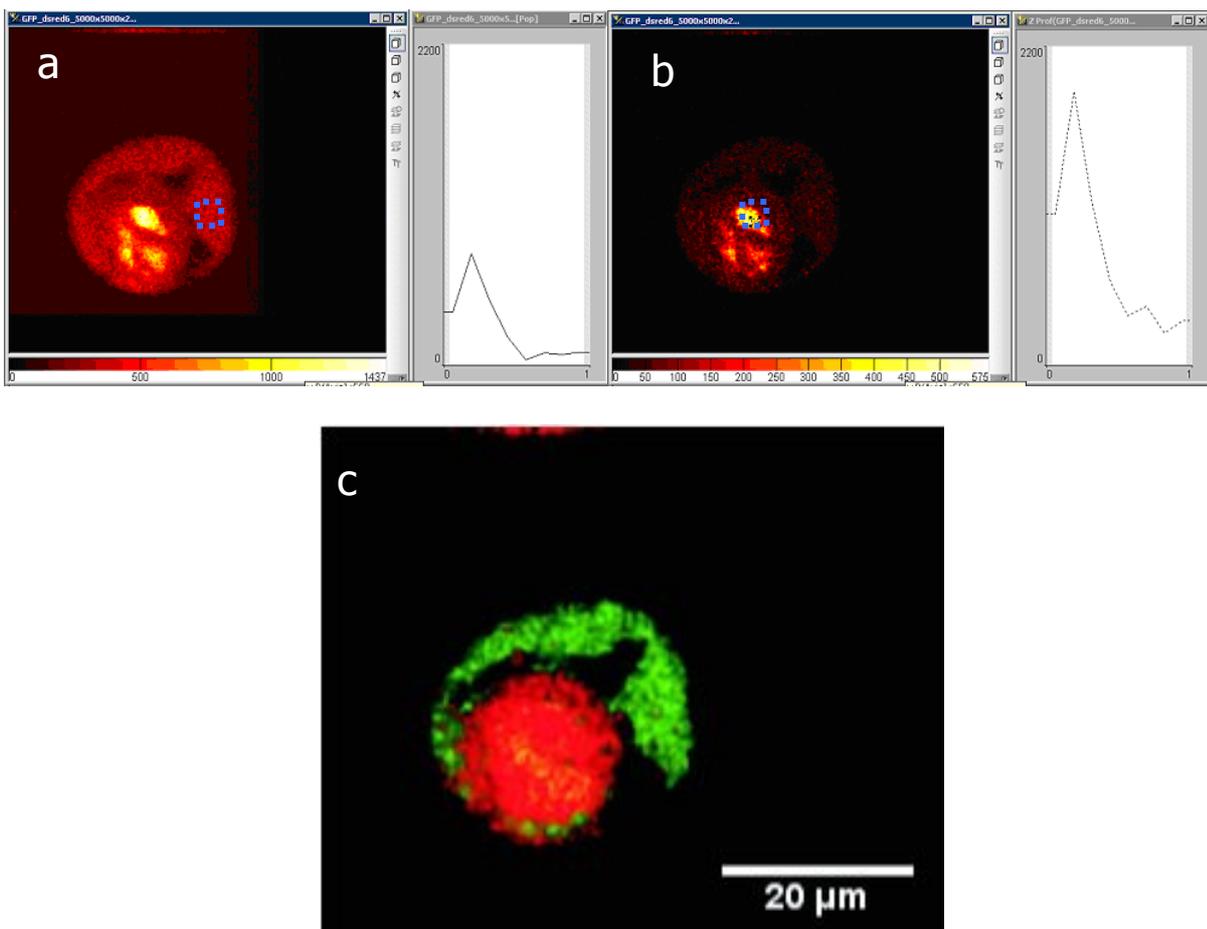


Abbildung 20: spektral entmischte Aufnahme eines mit DsRed im Kern und GFP im Cytoplasma transfizierten Protoplasten.

Beide Proben wurden mit einer Wellenlänge von 800 nm angeregt. Die Leistung in jedem der 8 Foki betrug 4,5 mW.

Der durch die Kalibrierung resultierende Detektionsbereich reicht von 520 nm bis 630 nm. Das entspricht grob dem Wellenlängenbereich, indem man die detektierten Fluorophore erwarten würde, da GFP bei 507 nm emittiert und DsRed bei 580 nm (vgl. 2.3). Die Orangenschale weist ebenfalls in diesem Bereich mindestens zwei Farbstoffe auf. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Farbe Orange in einem Bereich von etwa 585 – 595 nm emittiert [32].

4.3 FLIM

Durch die Messung von Lebenszeiten unterschiedlicher Fluorophore innerhalb einer Probe erhält man eine Dimension, die einen zusätzlichen Informationsgewinn bedeutet. Mithilfe dieses Messmodus werden verschiedene biologische Proben untersucht.

Abbildung 21 zeigt eine FLIM-Aufnahme des Schirms eines „Löwenzahn“-Samens (*Taraxacum* sect. *Ruderalia*). Die Probe wurde mit einem Tropfen Milipore-Wasser auf einen Objektträger gegeben und mit einem Strahl (3mW) angeregt. Das zugehörige Lifetime Histogramm gibt die Lebenszeiten aller detektierten Photonen wieder. Dort sind die Lebenszeiten in ns (x-Achse) gegen die Anzahl der gezählten Photonen $\times 10^6$ (y-Achse) aufgetragen. Die Lebenszeit ist farbkodiert. Kurze Lebenszeiten sind blau, lange rot markiert. Die graue Zerfallskurve repräsentiert das Histogramm der mittleren Lebenszeiten der gezählten Photonen. Die Kurve weist drei charakteristische Peaks auf. Der erste repräsentiert die blauen Pixel im äußeren Bereich der Polle. Die dort gezählten Photonen haben eine Lebenszeit von 1 – 1,8 ns. Der zweite Peak stellt die Pixel im grünen Bereich dar, deren Photonen eine Lebenszeit von 2 – 2,5 ns besitzen. Sie befinden sich eher im mittleren Teil der Polle. Die roten Pixel (Photonen mit Lebenszeit > 4 ns) werden durch den dritten Peak repräsentiert. Mit dem bloßen Auge sind in Abbildung 21a) nahezu keine roten Pixel erkennbar. Trennt man allerdings die Kanäle für blau (c), grün (d) und rot (e), so ist ein definierter ringförmiger Bereich zu erkennen. Die getrennten Kanäle unterstützen auch die Aussagen für blau und grün.

Aus biologischer Sicht bedeutet das:

Der Schirm muss im inneren Bereich dichter gepacktere Moleküle besitzen als im äußeren, da er nur so stabil vom Wind getragen werden kann. Zudem ist im inneren Bereich die Frucht befestigt, die den Samen beinhaltet. Mit den gewonnenen Ergebnissen lässt sich daraus ableiten, dass die äußeren Komponenten („Haare“) eine Proteinkomposition besitzen, die nicht so dicht ist und kürzer fluoresziert als die inneren.

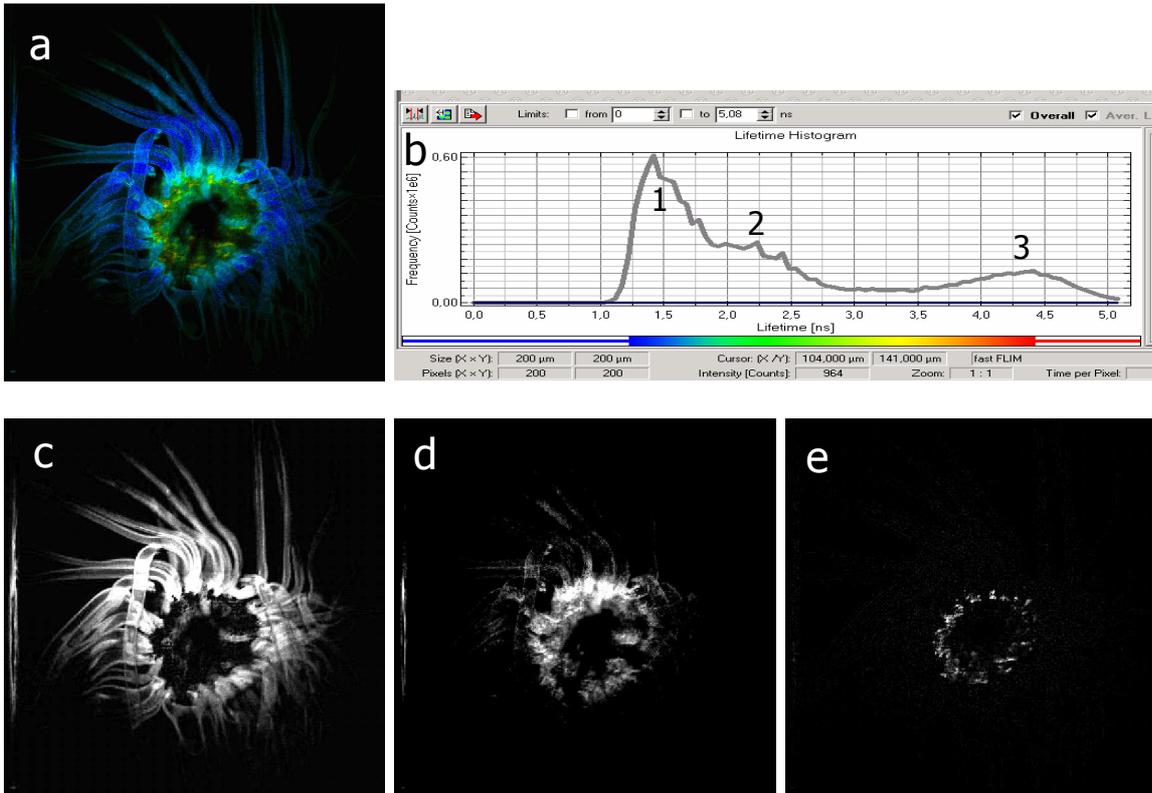


Abbildung 21: FLIM-Aufnahme einer Polle. a) Fluorescence Lifetime Bild, b) zugehörige Zerfallskurve, c) Kanal für blau, d) Kanal für grün, e) Kanal für rot

Das FLIM-Verfahren wird ebenfalls eingesetzt, um die Aktivierung von PA-GFP zu dokumentieren. Dazu werden zwei direkt nebeneinander liegende Protoplasten vor der Aktivierung mit einem Strahl für die FLIM-Detektion gescannt. Anschließend wird mit hoher Energie und 8 Strahlen aktiviert. Nach der Aktivierung wird erneut eine FLIM-Aufnahme durchgeführt. Abbildung 22 zeigt die Protoplasten, von denen der Kern des mittleren eine hohe Intensität aufweist. Der Protoplast in der linken oberen Ecke (roter Kreis) emittiert wenige Photonen. Abbildung 23 stellt dieselben Zellen nach der Aktivierung dar. Die Bildausschnitte Abbildung 22a und Abbildung 23a wurden mit einer manuellen Farbpalette kodiert, um die den Bereich der Aktivierung deutlich hervorzuheben. Wie zu erkennen ist, konnte der Detektor eine Vielzahl an Fluoreszenzphotonen detektieren, was auf eine Aktivierung hindeutet. Der Zellkern wies bereits vor der Aktivierung eine große Fluoreszenz auf. Dort konnte nicht mehr aktiviert werden. Im Bereich des Protoplasten links oben konnte allerdings eine Aktivierung stattfinden. Die Bilder 22a und 23a wurden aus den Aufnahmen 22b und 23b generiert. Diese Bilder wurden maskiert (grauer Bereich). In Abbildung 23 erkennt man im roten Bereich im Vergleich zu Abbildung 22 deutlich mehr grüne Pixel, die Photonen mit einer Lebenszeit von ~ 2 ns repräsentieren. In beiden Aufnahmen sind nahezu identische mittlere Lebenszeiten vertreten (graue Kurve im Histogramm). Allerdings ist der Graph in Abbildung 19 von 0 bis 50 skaliert, der in Abbildung 20 von 0 bis 100. Bei relativ gleich hohen Peaks bedeutet das, dass die Zerfallskurve in Abbildung 20 nach der Aktivierung eine doppelt so hohe Intensität aufweist. Die Zerfallskurve repräsentiert dabei die Intensität aller Pixel. Beim Vergleich der gezählten Photonen im maskierten Bereich (Intensity [Counts]) wird die Steigerung der Aktivität noch

deutlicher. Vor der Aktivierung beträgt die Intensität 176 counts, danach 893 counts, was einer Steigerung um das 4 bis 5 –fache entspricht. Das unterstützt die Literaturangaben [15, 23].

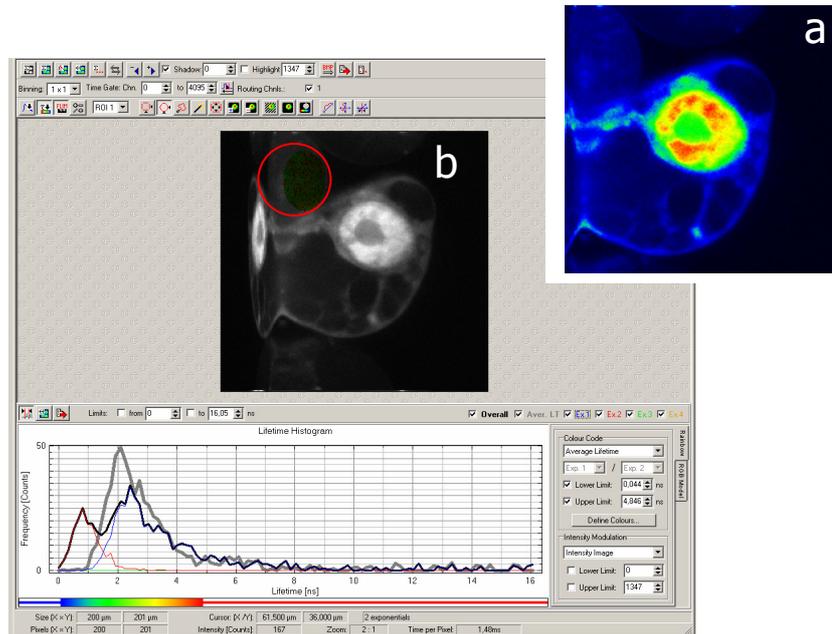


Abbildung 22: Protoplasten vor der Aktivierung. Intensity [Counts]: 167.

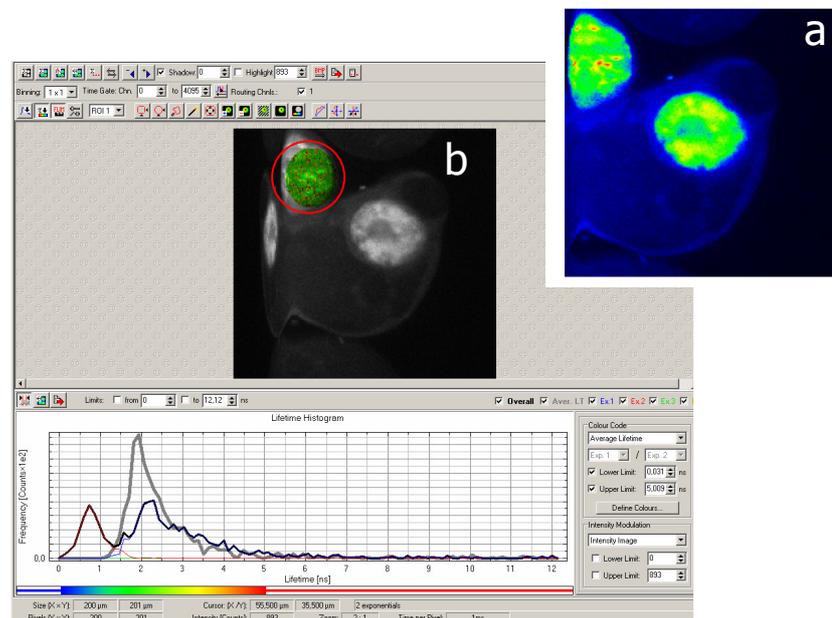


Abbildung 23: Protoplasten nach der Aktivierung. Intensity [Counts]: 893.

Die Tabelle 4 stellt die Intensitäten der Pixel im maskierten Bereich für Abbildung 21 und Abbildung 22 dar. Die Spalte Faktor gibt an, um welchen Faktor sich die Intensität nach der Aktivierung erhöht.

	Vor Aktivierung (21)	Nach Aktivierung (22)	Faktor
Intensität	167	893	5,3

Tabelle 4: Intensitäten der Pixel im maskierten Bereich.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe der 2PLSM verschiedene Messmodi zu realisieren und anhand unterschiedlicher biologischer Proben zu testen. Außerdem sollte das neu angeschaffte FLIM-System installiert und erprobt werden. Der bereits von Jörg Martini implementierte multifokale multispektrale Messmodus sollte reproduziert und wenn möglich weiterentwickelt werden.

Das wichtigste Thema war die Aktivierung von pa-GFP mittels 2PLSM, um in einer späteren Arbeit die Lokalisierung von Nukleoporin 198 und damit verbunden die Proteindynamik des Kernporenkomplexes zu charakterisieren. Diese Thematiken wurden an dem in der Biophysik aufgebauten 2PLSM-System bearbeitet. Die gemeinsame Schnittstelle der unterschiedlichen Messmodi bildet das variable Setup des Systems, das es erlaubt, mit wenigen Handgriffen zwischen verschiedenen Messarten zu wählen. Zudem wurden die Modi multifokaler multispektraler Modus und FLIM-Detektion mit den selben Protoplasten getestet, die zur Aktivierung des pa-GFP zum Einsatz kamen. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse können somit gut verglichen werden.

Die Aktivierung von pa-GFP wurde mit dem 2PLSM-Setup durch 8 Foki erreicht. Während die Probe mit 1-Photonanregung gescanned wurde, konnte parallel für 3 s und 68 mW/Fokus aktiviert werden. Die Aktivierung erwies sich als erfolgreich, da die Kamera mit geeigneten Emissionsfiltern eine Verstärkung der Fluoreszenz in den angeregten Bereichen detektieren konnte. Die Aktivierung wurde positiv für das Cytoplasma wie auch für den Kern durchgeführt. Die Analyse mit dem FLIM-Detektor konnte eine Aktivierung anderer Protoplasten bestätigen. Somit ist festzuhalten, dass der Unterschied zwischen pa-GFP und aktiviertem pa-GFP mit beiden Verfahren zu detektieren ist. Folgende Faktoren konnten errechnet werden, die um die Verstärkung der Intensitäten quantitativ zu beschreiben:

3,9 für den ersten in Kapitel 4.1 (Pa-GFP) beschriebenen Protoplasten, 3,4 für den zweiten in Kapitel 4.1 beschriebenen Protoplasten und 5,3 für den Protoplasten, der in Kapitel 4.3 (FLIM) dargestellt wurde. Zusammenfassend kann man also sagen, dass aktiviertes pa-GFP etwa 4 bis 5 mal stärker emittiert als nicht-aktiviertes. Das bestätigt die Werte der Literaturangaben [15, 24]. Mithilfe des multifokalen multispektralen Messmodus konnten die eingesetzten Markerproteine spektral voneinander unterschieden werden; ein Unterschied zwischen der nicht-aktivierten Form und der aktivierten konnte hingegen nicht beobachtet werden, da sich das Spektrum der beiden Formen nicht signifikant unterscheidet. Der Unterschied zwischen den beiden Formen beruht, wie in Kapitel 3 beschrieben, nur auf der Konversion einer Aminosäure.

Der multifokale multispektrale Messmodus wurde ebenfalls positiv installiert und getestet. Zudem konnte eine Kalibrierungsmethode entwickelt werden, die im Vergleich zu anderen (vgl. Martini [15]) schneller zu realisieren ist und die detektierten Wellenlängen vernünftig aufklärt. Dieser Modus erlaubt die Analyse biologischer Proben hinsichtlich ihrer spektralen Zusammensetzung ohne den Einsatz von Filtern. Dahingehend konnte die Emission

verschiedener Proben innerhalb bestimmter Wellenlängenbereiche festgelegt werden. Die Sensitivität dieser Methode ist allerdings relativ gering, sodass die zu analysierenden Proben mit einer vergleichsweise hohen Energie (meist 32%, was 68 mW pro Fokus entspricht) angeregt werden müssen, um genügend Fluoreszenzphotonen zu detektieren. Diese Methode erlaubt die Analyse markierter Proben wie auch Proben mit nativer Fluoreszenz. Das ist besonders für biologische Anwendung sinnvoll, die in vivo gemessen werden sollen. Eine Verbesserung dieses Modus' wäre, wie Jörg Martini bereits beschrieb, eine sensitivere Hardware. Ebenso wäre es wünschenswert, wenn die Zeiten zur Bildaufnahme verkürzt werden können, da eine Aufnahme ca. 4 Sekunden dauert. Möchte man dreidimensionale Aufnahmen generieren, verlängert sich die Zeit um ein vielfaches.

Der dritte Teil dieser Arbeit war die Installation des neu angeschafften FLIM-Detektors. Dieser konnte aufgebaut und getestet werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind vielversprechend. Das System erlaubt die Analyse biologischer Proben unter dem Einsatz äußerst geringer Laserleistung, also auch geringer Gewebeschädigung. Die Limitierung dieser Anwendung liegt in der Aufnahmezeit, da über mehrere Zyklen gemessen werden muss. Daraus ergibt sich eine Aufnahmezeit von mehreren Sekunden bis hinzu einer Minute für ein Bild. Bei dreidimensional aufgelösten Aufnahmen erhöht sich die Zeit entsprechend pro Ebene.

Die Detektion der Fluoreszenzlebenszeiten ist sowohl bei nativ fluoreszierenden Proben wie auch bei eingesetzten Markern von großem Vorteil. Sie bildet eine zusätzliche Informationsdimension, die bei der Aufklärung zellulärer Prozesse hilfreich ist. Durch die Sensitivität des Systems können diese selbst auf molekularer Ebene geschehen.

Der nächste Test mit diesem System sollte die Charakterisierung von Molekülen zu unterschiedlichen Umgebungsvariablen sein. So ist es laut Hersteller möglich, anhand der Abklingkurven Unterschiede zwischen verschiedenen pH-Niveaus oder verschiedenen Temperaturen für ein Molekül festzustellen [29].

Als Ausblick bleibt festzuhalten, dass die Aktivierung von Pa-GFP nur als Vorstufe für die eigentliche Charakterisierung der Proteindynamik des Kernporenkomplexes zu sehen ist.

Die Aktivierung von pa-GFP sollte den größten Teil der Arbeit bilden. Ziel war es, kurz eine Aktivierung innerhalb des Kerns bzw. des Cytoplasmas zu testen. Anschließend sollte vom Lehrstuhl für Genomforschung mithilfe eines neuen Konstrukts aus NUP198+pa-GFP eine Transfektion in *Arabidopsis thaliana* – Protoplasten durchgeführt werden, um die Transportprozesse des Proteins während des Zellzyklus zu charakterisieren.

Leider ergaben sich Schwierigkeiten mit der Zellkultur, sodass einige Wochen lang keine Test-Protoplasten zur Verfügung standen. Daneben erwies sich das Konstrukt als zu groß, so dass die Transfektion nicht ohne Weiteres durchzuführen war. Somit konnte nur der Test für die Aktivierung durchgeführt werden.

Für die weitere Arbeit kann aber auf die gewonnenen Ergebnisse aufgebaut werden, sodass das Ziel der Proteincharakterisierung weiterhin angestrebt werden sollte, sobald das Konstrukt transfiziert werden kann. Dazu sollte auch das installierte FLIM-System zum Einsatz kommen,

welches eine hohe Sensitivität aufweist. Mit diesem System können sowohl die Intensitäten der angeregten pa-GFP-Moleküle detektiert werden, wie auch eine Identifizierung von aktivierten Molekülen getroffen werden, was eine Analyse intrazellulärer Prozesse unterstützt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Jablonski-Diagramm	10
Abbildung 2: Vergleich zwischen 1-P- und 2-P-Mikroskopie	11
Abbildung 3: Aufbau des Kernporenkomplexes.....	13
Abbildung 4: Absorptions und Emissionsspektren von PA-GFP.....	15
Abbildung 5: FLIM-Setup.....	17
Abbildung 6: Übersicht IX 71	18
Abbildung 7: Schematischer Aufbau	19
Abbildung 8: Setup des Multifocal-Multispectral-Modus.....	22
Abbildung 9: Resultierender Datensatz einer Aufnahme mit 8 Zeilen (spektrale Information) und 8 Spalten (räumliche Information).....	24
Abbildung 10: LINKS: ohne Filter; RECHTS: Filter 533 nm	25
Abbildung 11: Kalibrierungskurve.....	26
Abbildung 12: Spectral Unmixing.....	27
Abbildung 13: Schema Time-Correlated Single Photon Counting.....	28
Abbildung 14: Histogrammerstellung beim Time-Correlated Single Photon Counting.....	29
Abbildung 15: Einrichten Triggersignale	30
Abbildung 16: Referenzkurve	30
Abbildung 17: BY2-Protoplast bei der Aktivierung von PA-GFP.....	33
Abbildung 18: BY2-Protoplast bei der Aktivierung von PA-GFP	34
Abbildung 19: Orangenschale.....	35
Abbildung 20: spektral entmischte Aufnahme eines mit DsRed im Kern und GFP im Cytoplasma transfizierten Protoplasten.....	36
Abbildung 21: FLIM-Aufnahme einer Polle.....	38
Abbildung 22: Protoplasten vor der Aktivierung.....	39
Abbildung 23: Protoplasten nach der Aktivierung.....	39
Tabelle 1: Tabelle mit eingesetzten Filtern	25
Tabelle 2: Absolute Intensitäten zu Abbildung 16. Mittlere Werte aller Pixel, berechnet mit ImageJ.....	33
Tabelle 3: Absolute Intensitäten zu Abbildung 17. Mittlere Werte aller Pixel, berechnet mit ImageJ.....	34
Tabelle 4: Intensitäten der Pixel im maskierten Bereich.....	40

Anhang

Protoplastierung der Tabak BY-2 Zellen

1. Verwendet wird eine Zellkultur 3 Tage nach Subkultivierung.
2. 20 mL der Zellkultur mit einer Pipette abnehmen, in ein steriles 50 mL Falcon-Röhrchen überführen und bei 400 g für 5 min. bei Raumtemperatur (RT, etwa 24°C) pelletieren.
3. Überstand verwerfen und die Zellen einmal mit 25 mL Waschlösung (Verdaulösung ohne Enzyme) waschen.
4. Zentrifugation wie oben, Überstand verwerfen.
5. Zellen in 13 mL Verdaulösung resuspendieren, in eine 90 mm Petrischale geben, diese mit Parafilm verschleißen und bei 26°C über Nacht im Dunkeln inkubieren.

Waschen der Protoplasten und Transformation mit Plasmid-DNA

Die gefrorene PEG-Lösung (Aliquots in Eppendorfhütchen) bei 37°C auftauen, kurz vor Gebrauch mischen, bis die Lösung homogen ist; alle anderen Lösungen auf RT.

1. Protoplasten vorsichtig in ein 50 mL Falcon-Röhrchen überführen, bei 100 g für 5 min. bei RT pelletieren (soft brake oder Bremse aus!).
2. Den Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 mL entfernen, Protoplasten vorsichtig in dem Rest der Lösung resuspendieren, langsam 25 mL Waschlösung zugeben, vorsichtig mischen.
3. Zentrifugation wie oben.
4. Den Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 mL entfernen, Protoplasten vorsichtig in dem Rest der Lösung resuspendieren, langsam insgesamt 10 mL W5-Lösung zugeben (zuerst 1 mL, vorsichtig resuspendieren, dann 2 mL, vorsichtig resuspendieren, dann langsam den Rest, nochmals vorsichtig resuspendieren)
5. Zentrifugation wie oben.

6. Den Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 mL entfernen, Protoplasten vorsichtig in dem Rest der Lösung resuspendieren, insgesamt 5 mL W5-Lösung zugeben; Aliquot zum Zählen abnehmen (etwa 20 μ L; Hämacytometer: Anzahl der Protoplasten/Kleinquadrat x 80.000 oder Anzahl der Protoplasten/Großquadrat x 5000 ergibt Protoplasten/mL); Ausbeute etwa bei $3\text{-}5 \cdot 10^6$ Protoplasten; die Protoplasten für 20-30 min. im Dunkeln bei 4°C inkubieren
7. Überstand vollständig entfernen, Protoplasten vorsichtig und schrittweise in insgesamt 10 mL MMM-Lösung resuspendieren.
8. Zentrifugation wie oben. Den Überstand vorsichtig bis auf etwa 1-2 mL entfernen und mit MMM-Lösung auf entsprechende Protoplastendichte einstellen (etwa $2 \cdot 10^6$ /mL). Die Protoplasten sind nun bereit für die Transformation.
9. Für jeden Transformationsansatz ein steriles Röhrchen vorbereiten, DNA zugeben (30 μ g, nicht mehr als 30 μ L Volumen), dann 300 μ L der Protoplastensuspension mit einer abgeschnittenen 1 mL Spitze zugeben und Röhrchen zum Vermischen drehen (vor dem Abnehmen Protoplastensuspension vorsichtig resuspendieren).
10. Tropfenweise 300 μ L PEG-Lösung zugeben und vorsichtig mischen.
11. Etwa 20 min. bei RT inkubieren.
12. Schrittweise insgesamt 10 mL W5-Lösung zugeben (dies muß sehr vorsichtig geschehen; in Aliquots von 1, 2, 3, und 4 mL zugeben, zwischendurch vorsichtig resuspendieren).
13. Zentrifugation wie oben.
14. Den gesamten Überstand verwerfen. Schrittweise insgesamt 0.7 mL MS+Sucrose zugeben (in Aliquots von 0.2 und 0.5 mL), zwischendurch vorsichtig resuspendieren. Nach der ersten Zugabe von MS+Sucrose etwa 2 min. warten.
15. Die Röhrchen werden mit nicht ganz zugeschraubtem Deckel fast horizontal bei 26°C im Dunkeln über Nacht inkubiert.

Material und Lösungen

- Verdaulösung:** 1% (w/v) Cellulase Onozuka RS 0.5% (w/v) Macerozyme Onozuka RS 0.1% (w/v) Pectinase 0.5% (w/v) BSA 0.01% (v/v) 2-Mercaptoethanol 50 mM CaCl₂ 10 mM Na-Acetat pH 5.8 0.25 M Mannitol steril filtriert
- Waschlösung:** Verdaulösung ohne Enzyme
- W5-Lösung:** 154 mM NaCl 125 mM CaCl₂ 5 mM KCl 5 mM Glucose mit KOH auf pH 5.8-6.0 einstellen steril filtrieren
- MMM-Lösung:** 15 mM MgCl₂ 0.1% (w/v) MES-KOH pH 5.8 0.5 M Mannitol steril filtrieren
- PEG-Lösung:** 40% (w/v) PEG 4000 0.4 M Mannitol 0.1 M Ca(NO₃)₂ mit KOH auf pH 8-9 einstellen, autoklavieren
- BY-2 Zellkulturmedium:** 1x MS-Salze (*basic salts*) 30 g/L Saccharose (Sucrose) 100 mg/L myo-Inositol 1 mg/L Thiamin-HCl 0.2 mg/L 2,4-D 255 mg/L KH₂PO₄ mit KOH auf pH 5.0 einstellen, autoklavieren
- MS+Sucrose:** 0.4 M Sucrose in BY-2 Zellkulturmedium steril filtrieren

Shift_64neu

(führt die Umbenennung und den Shift-Prozess für alle Dateien eines Ordners (hier: Z:\\Descanned64PMT\\Blüte\\Bluetenkern_5000x5000x25_02_02_07_20x\\shifted\\) automatisch durch). Das verwendete **Test11_64_large_neu.txt** wurde bereits von Jörg Martini geschrieben.

```
for (i=0;i<=AnzDateien ;i++){
datei = "Bluetenkern_10.tif"+i+".tif";
open("Z:\\Descanned64PMT\\Blüte\\Bluetenkern_5000x5000x25_02_02_07_20x\\shifted\\"+datei);
run("Size...", "width=200 height=202 constrain interpolate");
run("Run...", "run=E:\\Programme\\ImageJ\\macros\\Test11_64_large_neu.txt number=8
number=8 background crosstalk=7 value=0");
run("Convert Images to Stack");
saveAs("Tiff", "Path:
Z:\\Descanned64PMT\\Blüte\\Bluetenkern_5000x5000x25_02_02_07_20x\\shifted\\"+datei);
close();
close();
}
```

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und überhaupt möglich gemacht haben.

Allen voran möchte ich mich bei Professor Dario Anselmetti für die Betreuung meiner Masterarbeit und für die vertrauensvolle Bereitstellung des Laborequipements bedanken.

Ein weiterer großer Dank gilt Dr. Katja Tönsing, die immer bereit war, mit mir Problemstellungen zu diskutieren – auch solche, die von organisatorischer Natur waren.

Ohne die Protoplasten, die mir wöchentlich zur Verfügung gestellt wurden, wäre ein großer Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Deshalb bedanke ich mich bei Dr. Thomas Merkle und den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Genomforschung für die Präparation der biologischen Proben.

Eine große Hilfe war mir jederzeit mein Laborkollege Thorsten Bergmann, der mich bei vielen Messungen unterstützte und mir half, viele Probleme zu lösen. Eine mindestens genau so große Hilfe waren, neben Thorsten, meine Bürokollegen Norman Schellert und Sebastian Horstmeier, die zu einer äußerst entspannten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ein weiterer Dank geht nach Übersee an Jörg Martini. Er hat Thorsten und mir einen Crashkurs in 2PLSM gegeben und hat mich auch bei Problemen mit dem System per Ferndiagnose weitergeholfen.

Der größte Dank geht allerdings an meine Familie. Vielen Dank, Kathrin, dass du mich in den letzten Tagen der Fertigstellung aus allen gesellschaftlichen Verpflichtungen herausgehalten hast. Und vielen Dank dir, Lena, dass du mich manchmal hast durchschlafen lassen. Ihr seid das Wichtigste.

Literatur

- ¹ <http://www.microscope.de/>
- ² Innovation 14, Carl Zeiss
- ³ Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. 248: p. 73-76.
- ⁴ Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. Nat.Methods, 2005. **2**(12): p. 932-940.
- ⁵ So, P.T., Dong, C.Y., Masters, B.R. & Berland, K.M. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2, 399–429 (2000)
- ⁶ Helmchen, F. & Denk, W. New developments in multiphoton microscopy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 593–601 (2002)
- ⁷ Zipfel, W.R., Williams, R.M. & Webb, W.W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21, 1369–1377 (2003)
- ⁸ Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. 1991: USA.
- ⁹ <http://www.mikroskopie.de/kurse/>
- ¹⁰ Brodde, A: *Multiphotonenmikroskopie (MPM)*, Juni 2004
- ¹¹ Zeug, A: *Fluoreszenz und konfokale Mikroskopie*, September 2005
- ¹² Fricke, M., *Parallel-Processing in der Zwei-Photonen-Laser Raster-Mikroskopie: Anwendung in der Praxis und 3D-Visualisierung biologischer Zellen*. 2000, Bielefeld University.
- ¹³ Hellweg, D., *Dispersionskompensation und Charakterisierung von Femtosekundenpulsen in der 2-Photonen-Laserscanningmikroskopie*. 1999, Bielefeld University.
- ¹⁴ <http://www.physiology.de/methoden/fluo/2photonl.htm>
- ¹⁵ J.Martini, *New Detection Methods in Multifocal Multiphoton Microscopy*, PHD thesis (2006)
- ¹⁶ Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 2002, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- ¹⁷ Annkathrin Rose, S.P.I., *The plant nuclear envelope*. Planta, 2003. 218 p. 327-336.
- ¹⁸ Gwenael Rabut, Peter Lenart and Jan Ellenberg, *Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle*, Current Opinion in Cell Biology 2004, 16:314–321
- ¹⁹ Birthe Fahrenkrog, U.A., *Der Kernporenkomplex: Von der Struktur zur Funktion*. BIOSpektrum, 2007. 1/03 (9.): p. 27-29.

-
- ²⁰ Birthe Fahrenkrog, 08.09.2005, *The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond*, 2005
- ²¹ Themenheft Forschung Systembiologie, *Dem Molekül auf der Spur*, Universität Stuttgart
- ²² Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994): *Science* 263, 802-805
- ²³ Schneider, M., et al., *Two-Photon Activation and Excitation Properties of PA-GFP in the 720-920-nm Region*. *Biophys.J*, 2005. 89: p. 1346-1352.
- ²⁴ Patterson, G.H. and J. Lippincott-Schwartz, *A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells*. *Science*, 2002. 291: p. 1873-1877.
- ²⁵ Wall, M.A., M. Socolich, and R. Ranganathan, *The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed*. *Nat.Struct.Biol.*, 2000. 7(12): p. 1133-1138.
- ²⁶ Dickinson, M.E., et al., *Multiphoton excitation spectra in biological samples*. *J.Biomed.Opt.*, 2003. 8(3): p. 329-338.
- ²⁷ Wolfgang Becker et. al., High resolution TCSPC lifetime imaging, *Proc. SPIE* 4963 (2003)
- ²⁸ Wolfgang Becker et. al. ,*Picosecond Fluorescence Lifetime Microscopy by TCSPC Imaging*, *SPIE BIOS 2001*, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences
- ²⁹ PicoQuant GmbH, PicoHarp 300 User's Manual and Technical Date
- ³⁰ www.olympus.com
- ³¹ www.biosicherheit.de/de/lexikon/103.protoplasten.html
- ³² <http://www.tabelle.info/farben.htm>
- ³² Schmied, K., *Funktionale Charakterisierung einer kleinen Familie von Arabidopsis MYB1R-Transkriptionsfaktoren : LHY/CCA1-like (LCL) Proteine als potentielle Koregulatoren des zentralen Oszillators*. 2005, Bielefeld University.