

Dem Molekül auf der Spur

Mithilfe eines Weitfeld-Fluoreszenzmikroskops lässt sich der Weg einzelner Moleküle und Teilchen verfolgen

Don C. Lamb und Christoph Bräuchle

Auf welchem Weg dringt ein Virus bei einer Infektion in eine Zelle ein? Wie bewegen sich Motorproteine in Zellen oder einzelne Moleküle in nanoporösen Materialien? Das Verfolgen (*Tracking*) einzelner Teilchen unter dem Fluoreszenzmikroskop erlaubt es, diese und ähnliche Fragen aus der Biophysik, der Medizin und den Materialwissenschaften zu beantworten.

Ein Tourist, der sich auf einer Sight-Seeing-Tour in Rom befindet, wird je nach seinen Interessen und Vorlieben ganz unterschiedliche Wege einschlagen. Ein GPS-Gerät (Global Positioning System) würde es erlauben, den Weg aufzuzeichnen und damit, physikalisch gesprochen, die Trajektorie des Touristen durch Rom zu erhalten. Dabei würde sich schnell zeigen, welche Sehenswürdigkeiten ihn interessieren, ob er sie mit der überfüllten Metro, der Vespa oder lieber zu Fuß erreicht und wie lange er jeweils an den einzelnen Plätzen verweilt. **Abb. 1a** zeigt die Trajektorien von drei Touristen, die einen Aufenthalt auf dem Petersplatz (1), den Weg zu den Vatikanischen Museen (2) und einen Spaziergang zur Engelsburg (3) wiedergeben. Ganz analog ist es möglich, z. B. ein einzelnes Biomolekül auf seinem Weg in eine lebende Zelle und innerhalb dieser zu verfolgen (**Abb. 1b**). Dabei kann man es bei seiner Arbeit beobachten, die es in der Zelle zu verrichten hat. Daraus erhält man eine Fülle von Informationen über die Funktion eines solchen Biomoleküls und über die Mechanismen, die in einer Zelle zum Erhalt des Lebens notwendig sind.

Im Gegensatz zu den meisten konventionellen Messungen an Ensembles haben Untersuchungen an einzelnen Molekülen den großen Vorteil, dass sie nicht über Verteilungen mitteln, sondern aus vielen Einzelbeobachtungen bestehen, aus denen sich die Verteilung selbst direkt erschließt. Subpopulationen (im Bild der Touristen diejenigen, die Renaissancekunst lieben bzw. ignorieren) und Anomalien (Personen, die Michelangelo in der Sixtinischen Kapelle nicht besuchen) lassen sich direkt beobachten, während eine Ensemblemessung nur einen Mittelwert wiedergeben würde.

Seit es 1989/90 erstmals gelang, die Fluoreszenz einzelner Moleküle zu detektieren [1, 2], sind die Methoden so verbessert worden, dass sich die ursprünglich schwierigen Experimente heute fast schon routinemäßig ausführen lassen. Viele der Einzelmolekülexperimente werden inzwischen in lebenden

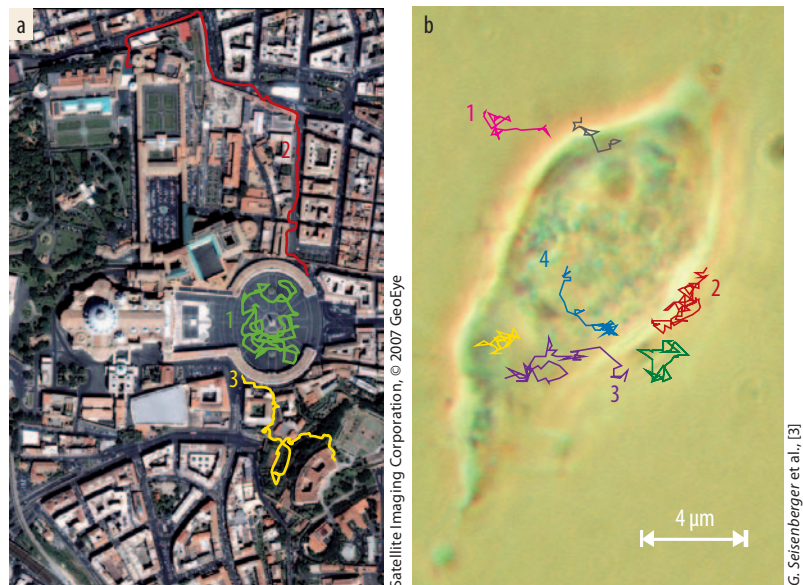


Abb. 1 Das Satellitenbild der Vatikanstadt mit den von drei Touristen eingeschlagenen Wegen (a) ähnelt dem Bild einer Zelle mit den Trajektorien einzelner Viren (b), die in der Lösung außerhalb der Zelle diffundieren (1), mehrere Male

in Kontakt mit der Zellmembran kommen, ohne letztlich anzudocken (2), die Zellmembran durchdringen und in das Innere der Zelle gelangen (3) bzw. sich weiter durch die Kernmembran in das Kerninnere bewegen (4).

Zellen durchgeführt und sind unverzichtbar, um zellbiologische Vorgänge oder die Funktion von Biomolekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden zu verstehen. In diesem Sinne wurde die Zelle bereits als „Reagenzglas“ des 21. Jahrhunderts bezeichnet. Dieser Trend zur quantitativen und mechanistischen Erfassung biologischer Vorgänge hat sich auch auf andere biologische Felder wie die Virologie oder die Embryoentwicklung ausgeweitet. Als Beispiel zeigt

KOMPAKT

- Tracking-Methoden erlauben es, das Fluoreszenzlicht von einzelnen Teilchen zu detektieren und diese mit einer Auflösung von wenigen Nanometern zu lokalisieren.
- Mit diesen Methoden ist es u. a. gelungen, neben dem Infektionsweg von Viren auch die Bewegung von Lipiden und Proteinen in der Kern- und Zellmembran zu verfolgen oder den Bewegungsmechanismus eines Motorproteins aufzuklären.
- Eine Analyse der Trajektorien zeigt, dass vier charakteristische Bewegungsformen existieren: normale, anomale und eingeschränkte Diffusion sowie Transport mit überlagerter Diffusion.

Prof. Don C. Lamb,
PhD und **Prof. Dr. Christoph Bräuchle,**
Department für Chemie und Biochemie, Center for NanoScience (CeNS), Ludwig-Maximilians-Universität München, Butenandtstr. 5-13 (E), 81377 München

Abb. 1b mit hoher Zeit- und Ortsauflösung den Infektionsweg eines markierten Virus' in eine lebende Zelle [3]. Auf diese Weise erfahren wir, wie dieses Virus in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen, auf welche Weise es sich im Zellinnern bewegt und wie es schließlich in den Zellkern eindringt, um dort seine DNA niederzulegen. Damit ist die Zelle infiziert und erzeugt als effiziente chemische Fabrik nach diesem Bauplan neue Viren. Solche Untersuchungen haben drei Ziele: Sie führen zu einem detaillierten Verständnis der Virus-Zell-Wechselwirkung und liefern damit Ansatzpunkte für die Entwicklung antiviraler Medikamente. Schließlich lassen sich mit ihrer Hilfe Gefahren entwickeln, bei denen die virale DNA durch künstliche DNA ersetzt wird, die dann effizient durch das natürliche Boten-System in die Zelle eingebracht werden kann.

Moleküle mit GPS

Analog zu dem eingangs erwähnten Touristen, der sich mithilfe eines bei ihm befindlichen GPS-Geräts lokalisieren lässt, ist es auch für die Verfolgung von Biomolekülen nötig, diese zu markieren. Hier wollen wir uns vornehmlich auf Fluoreszenzmarker beschränken, sodass sich ein „gelabeltes“ Biomolekül mit einem entsprechend empfindlichen Fluoreszenzmikroskop detektieren lässt. Die Markierung mit einem einzigen Farbstoffmolekül ist eine unmerkliche Störung, die es aber erlaubt, das Biomolekül quasi mit einer molekularen Lampe zu versehen und damit seinen Weg aufzuzeichnen. Im Beispiel von Abb. 1b wurde das Farb-

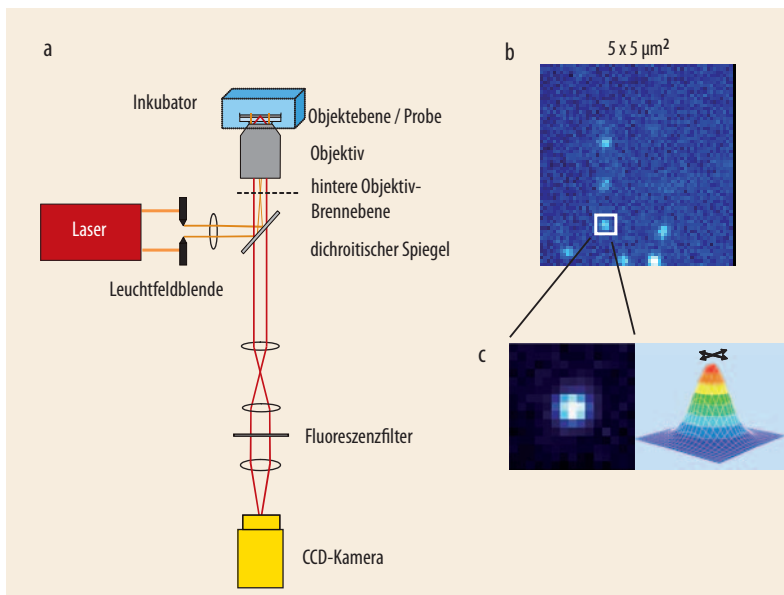


Abb. 2 Bei einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop für das *Tracking* einzelner Moleküle wird das Laserlicht auf die hintere Fokalebene fokussiert, sodass das Objekt im Weitfeld parallel beleuchtet wird (a). Das Objektiv sammelt das rückgestreute Fluoreszenzlicht und bildet es auf eine hochempfindliche CCD-Kamera ab. Die

Fluoreszenz einzelner Moleküle erscheint als helle Flecken auf der CCD-Kamera (b). Aus der Detailstruktur eines Fluoreszenzbilds ergibt sich durch einen Fit mit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion das Intensitätsprofil (c). Die Schärfe, mit der sich das Zentrum bestimmen lässt, gibt die Ortsgenauigkeit an.

stoffmolekül hierzu kovalent an die Proteinhülle des Virus' angebunden.

Zur Verfolgung des einzelnen Partikels und Aufnahme seiner Trajektorie eignen sich eine Vielzahl von Methoden. Relativ einfach gelingt dies mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, bei dem Moleküle als Fluoreszenzpunkte detektiert und einzeln aufgelöst werden, wenn kein weiteres Molekül in unmittelbarer Nähe ist (Abb. 2a,b). Dann lässt sich der Ort dieses Moleküls innerhalb weniger Nanometer durch das Zentrum der Verteilungsfunktion präzise bestimmen, obwohl die Auflösung des optischen Mikroskops mit rund 200 nm sehr viel größer als das Molekül und physikalisch durch die Beugung limitiert ist (Abb. 2c, Infokasten). Wird dies über viele Bilder eines Films gemacht, so erhält man die Position des Teilchens als Funktion der Zeit, d. h. die Trajektorie. Die Genauigkeit, mit der sich ein Teilchen verfolgen lässt, hängt dabei von mehreren Parametern ab.

Aus der Trajektorie eines Teilchens lassen sich nun vielfältige Schlüsse ziehen. So zeigt sich nicht nur, wo, wann und für wie lange das Teilchen in Wechselwirkung z. B. mit anderen Bestandteilen der Zelle steht. Wie im Infokasten ausgeführt, verrät eine Auftragung des mittleren Verschiebungsquadrats (Schrittweitenquadrat) gegen die Beobachtungszeit auch, ob die Bewegung als Brownsche Diffusion (lineare Beziehung), gerichtete Bewegung durch Transport (quadratische Beziehung) oder anomale bzw. eingeschränkte Diffusion (sublineare Beziehung mit Grenzwert) stattfindet. Die Brownsche Bewegung entspräche dem Touristen, der auf dem Petersplatz ziellos umherschlendert. Gerichtet würde sich ein Tourist bewegen, der die Metro verwendet, sich innerhalb des Waggons aber noch frei bewegen kann. Das entspricht der Superposition von gerichtetem Transport und freier Diffusion. Anomale Diffusion ist Brownsche Bewegung, die aber durch Hindernisse wie Häuserblocks nicht frei möglich ist, während eingeschränkte Diffusion eine Bewegung auf dem nach außen abgesperrten Petersplatz wäre. Solche Analysen des Bewegungsverhaltens von Teilchen sind, wie wir in den folgenden Beispielen sehen werden, überaus hilfreich, um molekulare Mechanismen in biologischen und materialwissenschaftlich interessanten Systemen zu untersuchen.

Künstliche Viren

Am Beispiel künstlicher Viren wollen wir uns jetzt etwas detaillierter mit deren Aufnahme in lebende Zellen sowie dem anschließenden Transport innerhalb der Zelle befassen. Künstliche Viren dienen zum Beispiel in der Gentherapie dazu, therapeutische Gene gezielt in spezielle Zellen einzuschleusen. Beispielsweise lässt sich ein künstliches Virus als sog. Polyplex aus kationischem Polyethylenimin und anionischer DNA als circa 150 nm großes Partikel formen, dessen Restladung mit Polyethylenglykol abgeschirmt wird. Auf der Oberfläche ist der Polyplex mit dem Epider-

mal-Growth-Factor als Liganden versehen. Dieser sorgt dafür, dass das Partikel gezielt bzw. vornehmlich an Krebszellen andockt, da diese den entsprechenden EGF-Rezeptor bis zu hundertfach überhöht (überexprimiert) an ihrer Oberfläche tragen. So wird versucht, die Information, die in der DNA des Polyplexes steckt und den Zelltod verursachen soll, mithilfe eines künstlichen Virus' als Genfahre gezielt in die Krebszelle zu bringen [4]. Die aufgenommenen Trajektorien sollen aufklären, ob solche Polyplexe die gewünschte Aufgabe erfüllen.

Abb. 3a zeigt die Trajektorie eines solchen künstlichen Virus' vom Andocken an eine lebende Tumorzelle mit anschließender Internalisierung sowie dem Transport in Richtung Zellkern. Die Bewegung lässt sich in drei Phasen zerlegen:

- Phase I ist durch sehr kleine Momentangeschwindigkeiten (Schrittweiten) charakterisiert (Abb. 3b), und die Partikel bewegen sich, wie sich zeigen lässt, sehr langsam auf der Zelloberfläche. Dabei werden sie durch Transmembranproteine mit dem unter der Membran liegenden kortikalen Aktinnetzwerk verknüpft und führen mit diesem eine langsame gerichtete Bewegung aus. Das mittlere Verschiebungsquadrat wächst als Funktion der Beobachtungszeit quadratisch an – typisch für gerichteten Transport (Abb. 3c, vgl. Infokasten). Zusätzliche Experimente zeigen, dass die Polyplexe während dieser Phase unter Ausbildung von Vesikeln (Ausbildung eines Kompartiments durch Umhüllung mit der Zellmembran) langsam die Membran durchdringen.
- In der zweiten Phase sind die Momentangeschwindigkeiten deutlich höher (Abb. 3b), und die Trajektorie lässt keine gerichtete Bewegung mehr erkennen. Vielmehr handelt es sich um Brownsche Bewegung bzw. einen „Random-Walk“, den das Partikel ausführt. In dieser Phase diffundiert das Vesikel sehr langsam mit

dem eingeschlossenen Polyplex im Zellinneren. Das mittlere Verschiebungsquadrat wächst linear mit der Zeit und entspricht damit normaler Diffusion (Abb. 3d). Lediglich für längere Beobachtungszeiten flacht die Kurve in vielen Fällen asymptotisch zu einem Grenzwert ab. Dies ist ein Hinweis auf anomale und schließlich eingeschränkte Diffusion in ringförmigen Strukturen und typisch für die Diffusion relativ großer Partikel im Zellinneren. Das Zytoskelett sowie Organellen und große Makromoleküle im Zellinneren können die freie Diffusion der Vesikel behindern, was letztlich zur eingeschränkten Diffusion führt.

- Das Vesikel mit dem Polyplex diffundiert so lange in Phase II, bis es mit einem Motorprotein in Kontakt kommt und von diesem transportiert wird. Damit beginnt Phase III. Dann ist die Trajektorie über weite Bereiche gerichtet. In dieser Phase transportieren Motorproteine wie Dynein oder Kinesin den Polyplex in seinem Vesikel entlang von Mikrotubuli mit relativ hohen Geschwindigkeiten von bis zu 4 $\mu\text{m/s}$ (Abb. 3b, e). Lediglich an zwei Stellen (s. Pfeile in Abb. 3a) wird der Transport unterbrochen. Die erste Unterbrechung zeigt eine kurze Diffusionsphase, was bedeuten kann, dass ein neues Motorprotein gesucht wird. Die zweite Unterbrechung ist durch eine Rückwärts- und dann wieder Vorwärtsbewegung gekennzeichnet, was ein Umsteigen von Dynein auf Kinesin und umgekehrt nahelegt. Ein weiterer Hinweis auf den Transport entlang von Mikrotubuli besteht in der Tatsache, dass die Transportbewegung bei Zugabe von Nocodazol einfriert, da dieses zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli führt. Das ist mit Tracking-Methoden sehr schön sichtbar zu machen.

Insgesamt verdeutlicht das Beispiel der Echtzeitverfolgung einzelner künstlicher Viren eindrucksvoll und im Detail, wie solche Partikel durch die Zellmembran

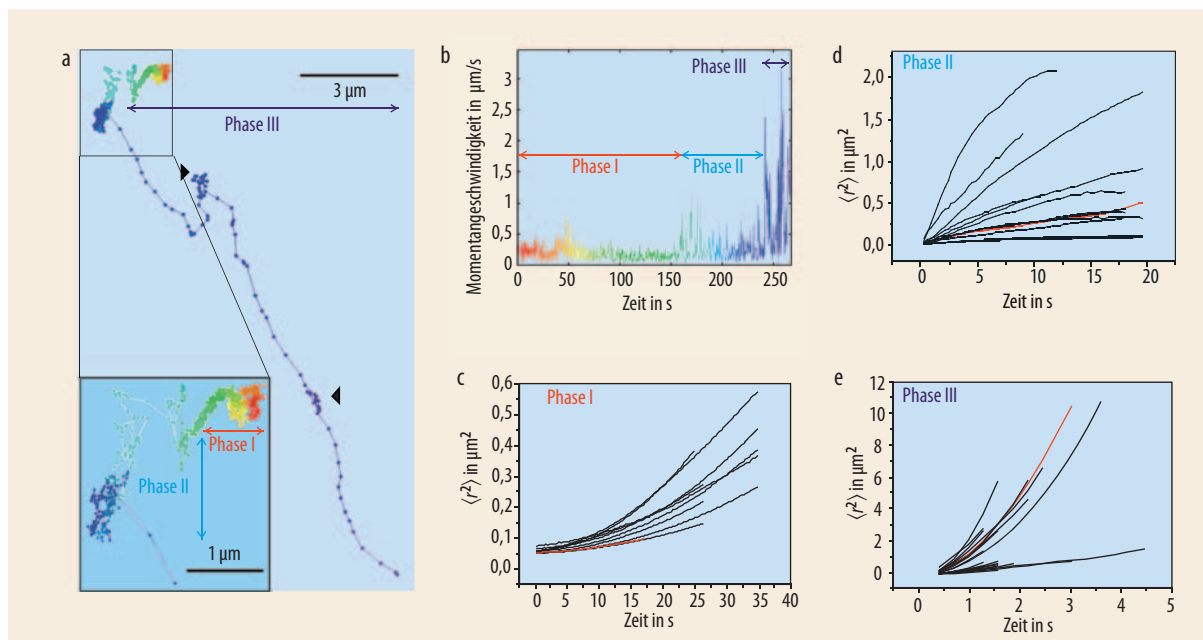


Abb. 3 Die Trajektorie, die ein künstliches Virus bei der Infektion einer lebenden Zelle beschreibt, lässt sich in drei Phasen einteilen (a, die Zeit schrei-

tet mit dem Farbverlauf von rot nach violett fort). Die Momentangeschwindigkeit (b) sowie das mittlere Verschiebungsquadrat (c–e) unterscheiden sich in die-

sen Phasen charakteristisch. Die Kurven in c–e zeigen typische Beispiele, die rote Kurve entspricht jeweils der Trajektorie in a.

K. D. Bruin et al., [5]

Vielfältige Membranen

Wie wir bereits im vorherigen Beispiel gesehen haben, spielen Zellmembranen eine wichtige Rolle zum Schutz und zur Abgrenzung der Zelle. Ihre Funktion ist jedoch wesentlich vielfältiger und hängt eng mit ihrem Aufbau zusammen. Eine ihrer charakteristischen Eigenschaften besteht darin, dass sie sich wie strukturierte zweidimensionale Flüssigkeiten verhalten, in denen sich die Bestandteile wie Lipide und Proteine in der Membranebene bewegen können. In derselben Art und Weise, wie wir Viren verfolgt haben, lässt sich nun auch die Bewegung einzelner Lipide oder Proteine durch Fluoreszenzmarkierung verfolgen. Damit erhält man detaillierte Erkenntnisse über die Beweglichkeit der Bestandteile sowie über Strukturen, die in der Membran, z. B. als ringförmige Einschlüsse, vorliegen können. Die ersten Experimente mit einzelnen fluoreszenzgelabelten Lipiden in künstlichen Membranen [6] wurden später auch auf biologische Zellmembranen übertragen. Ein Beispiel ist die Detektion eines einzelnen, mit Cy5 fluoreszenzmarkierten Lipids in einem Zellmembranausschnitt einer Muskelzelle einer Arterie (HASM, Human coronary Artery Smooth Muscle) (Abb. 4) [7]. Die Analyse von Trajektorien solcher Lipide zeigt für kurze Beobachtungszeiten eine Brownsche Diffusion mit einem Diffusionskoeffizienten $D = 0,6 - 0,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$, der für längere Beobachtungszeiten zu eingeschränkter Diffusion in ringförmigen Strukturen mit typischen Durchmessern im Bereich von $0,7 \mu\text{m}$ führt (Abb. 4c). In diesen ringförmigen Domänen hält sich das gesättigte Lipid im Mittel 13 s auf, d. h. es kann die Domäne ca. 80-mal durchqueren, bevor es sie verlässt. Die Domänen selbst

G.-J. Schütz et al., [7]

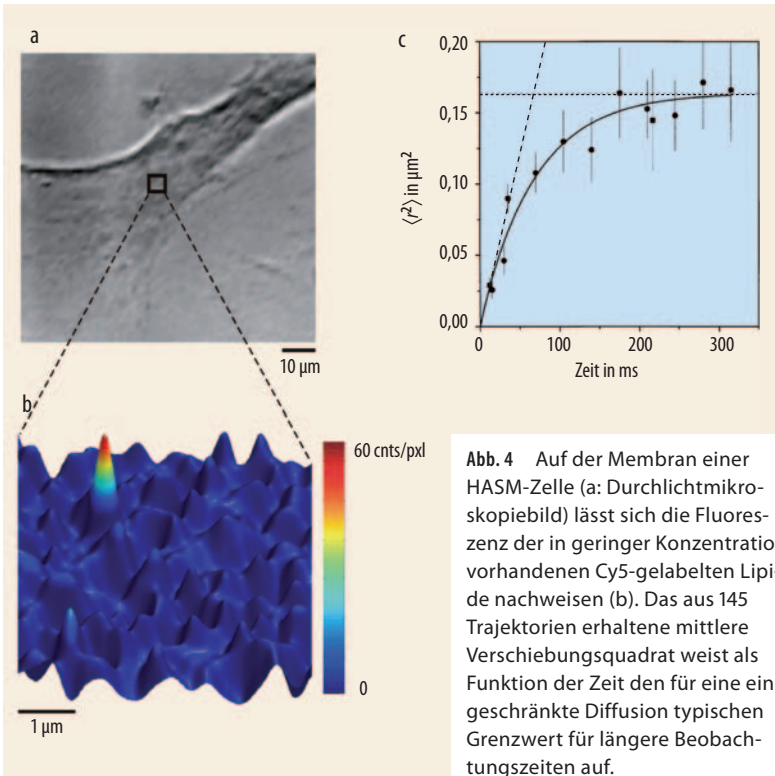


Abb. 4 Auf der Membran einer HASM-Zelle (a: Durchlichtmikroskopiebild) lässt sich die Fluoreszenz der in geringer Konzentration vorhandenen Cy5-gelabelten Lipide nachweisen (b). Das aus 145 Trajektorien erhaltene mittlere Verschiebungsquadrat weist als Funktion der Zeit den für eine eingeschränkte Diffusion typischen Grenzwert für längere Beobachtungszeiten auf.

gelangen und wie sie sich innerhalb der Zelle bewegen. Damit lässt sich überprüfen, inwieweit die Partikel als künstliche Viren tatsächlich ihre Aufgabe in der Zelle ausführen, die als Programm in ihrem Aufbau festgelegt wurde. Außerdem erlauben es diese Untersuchungen, die Eigenschaften dieser Partikel weiter zu optimieren bzw. maßzuschneidern.

AUSWERTUNG DER DYNAMIK

In den 2D-Trackingmethoden wird das Licht, das ein einzelnes Teilchen emittiert, als beugungslimitierter Lichtfleck in Form einer Verteilungsfunktion (*point spread function*) aufgenommen (Abb. 2b). Das Intensitätsmuster lässt sich durch eine zweidimensionale Gauß-Verteilung (Abb. 2c) annähern:

$$I(x,y) = A_0 \exp\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}\right) \exp\left(-\frac{(y-y_0)^2}{2\sigma^2}\right)$$

Auf diese Weise können die Positionen einzelner Moleküle in x und y bestimmt werden. Die Genauigkeit, mit der sich die Moleküle lokalisieren lassen, hängt von der Auflösung des optischen Systems, dem Kontrast der Daten (Signal-zu-Rausch-Verhältnis) und zu einem kleinen Anteil auch von der Dichte der Datenpunkte ab [14]. Typische Orts- und Zeitaufösungen, die heutzutage bei zweidimensionalem Fluoreszenztracking erreichbar sind, liegen im Bereich von 30 nm für 5 ms bzw. $1,5 \text{ nm}$ für $0,5 \text{ s}$ Zeitauflösung.

Nachdem die Trajektorie aus den Positionen der Moleküle in Abhängigkeit der Zeit bestimmt wurde, kann die darin enthaltene Dynamik durch eine Analyse der mittleren Verschiebungsquadrate (mean square displacement, MSD) als Funktion der Zeit analy-

siert werden. In dieser Analyse wird das Quadrat des Abstandes zwischen zwei durch die Zeit t getrennten Positionen bestimmt und über alle Messungen gemittelt. Die so erhaltenen mittleren Verschiebungsquadrate werden gegen die Zeitintervalle t aufgetragen. Dabei lassen sich vier verschiedene Bewegungsformen unterscheiden (Abb.):

- Normale oder Brownsche Bewegung zeigt sich durch ein lineares Anwachsen des MSD, $\langle r^2 \rangle$, mit der Zeit

$$\langle r^2 \rangle = 4 D t,$$

wobei D der Diffusionskoeffizient ist und der Faktor 4 durch die zweidimensionale Betrachtung kommt.

- Transport mit überlagerter Diffusion entspricht der Abhängigkeit

$$\langle r^2 \rangle = 4 D t + (Vt)^2$$

und zeigt sich in einem parabelförmigen Verhalten. Hierbei ist V die Geschwindigkeit des Transports.

- Anomale Diffusion geht mit einem Potenzgesetz einher,

$$\langle r^2 \rangle = 4 D t^a.$$

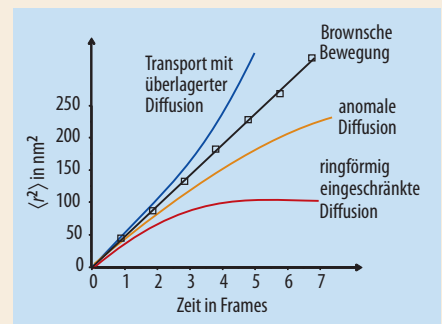
Dabei ist der Skalenfaktor $a < 1$.

- Ringförmig eingeschränkte Diffusion ist durch ein asymptotisches Verhalten für längere Beobachtungszeiten gekennzeichnet:

$$\langle r^2 \rangle = \langle r_c^2 \rangle \cdot [1 - A_1 \exp(-4 A_2 D t / \langle r_c^2 \rangle)].$$

Dabei ist r_c der Radius der Eingrenzung, und A_1 bzw. A_2 geben Abweichungen von einer kreisförmigen Einschränkung an.

In allen Beispielen wird der Term $4D$ durch $6D$ ersetzt, wenn man von zwei Dimensionen zu drei Dimensionen übergeht.



Das mittlere Verschiebungsquadrat als Funktion der Zeit für vier verschiedene Bewegungsformen.

sind relativ stationär und bewegen sich nur sehr langsam in der Membran. Die Domänen lassen sich mit sog. Lipid Rafts in Verbindung bringen, in denen Sphingolipide und Cholesterin angereichert vorliegen. In solchen Bereichen sollten sich bevorzugt gesättigte Lipide wie das oben verwendete Markerlipid aufhalten können. Lipid Rafts werden als wichtige funktionelle Bereiche in den Zellmembranen angesehen, in denen u. a. (Rezeptor-) Proteine als Ausgangspunkt von Signalkaskaden liegen, die von dort aus in die Zelle hinein laufen. Das Modell der Lipid Rafts ist jedoch nicht unumstritten. So haben z. B. Experimente mit Goldnanoteilchen (Durchmesser 40 nm) als Marker, die eine deutlich höhere Zeitauflösung (25 μ s anstatt 1 ms) als einzelne Farbstoffmoleküle erlauben, gezeigt, dass auf der sehr viel kürzeren Zeitskala ganz andere eingeschränkte Diffusionsbereiche beobachtet werden [8]. Insgesamt ist die Forschung auf diesem Gebiet noch zu sehr im Fluss, als dass sich bereits ein abschließendes Bild zeigt. Methoden, die auf der Verfolgung einzelner Moleküle und Teilchen beruhen, werden aber sicher auch in Zukunft einen entscheidenden Anteil an der Aufklärung der Struktur und Dynamik von Zellmembranen haben.

Außer der Zellmembran spielt die Kernmembran für die Funktion der Zelle eine große Rolle, da sie das Zellinnere (Cytosol) und das Kerninnere (Nucleosol) voneinander trennt. Kernporenkomplexe (Nuclear Pore Complex, NPCs), die eine hochgradig differenzierte Struktur aufweisen, erlauben den Durchtritt durch die Kernmembran. Ohne auf Details einzugehen, haben auch hier Tracking-Experimente mit Einzelmolekülen wichtige Ergebnisse für die Funktion der NPCs gebracht. So konnte u. a. die Gruppe um U. Kubitschek mit hochaufgelösten Einzelmolekül-Experimenten zeigen, dass Transportproteine wie NTF2 oder Transportin-1, die für den Transport bestimmter Substrate durch den NPC hindurch verantwortlich sind, an dessen cytosolischer Oberfläche andocken können [9]. Ein Vergleich mit kinetischen Ensembleexperimenten zeigt jedoch, dass die eigentlichen Durchtrittszeiten durch den Kanal viel kürzer sind als die Verweilzeiten an der Andockstelle. Hier hat die Kombination aus Ensemble- und Einzelmolekülmessung zu einem erweiterten Modell für die Funktion eines NPC geführt.

Verräterische Schritte

Ein weiteres schönes Beispiel, bei dem Einzelmolekül-Techniken zur Lösung mechanistischer Fragestellungen in der Biologie beitragen können, sind Untersuchungen zum Bewegungsmechanismus des Motorproteins Myosin-V [10]. Dieses Motorprotein ist eines von vielen verschiedenen solcher Motoren, die in der Zelle für den Transport von Lasten, insbesondere Vesikel, verantwortlich sind. Sie bestehen aus zwei Köpfen, die über Arme aus sog. leichten Ketten mit dem Stiel verbunden sind, auf dem eine Domäne zur Anbindung der Last ausgebildet ist. Lange Zeit war offen, ob ein solches Motorprotein durch einen „hand over hand“-

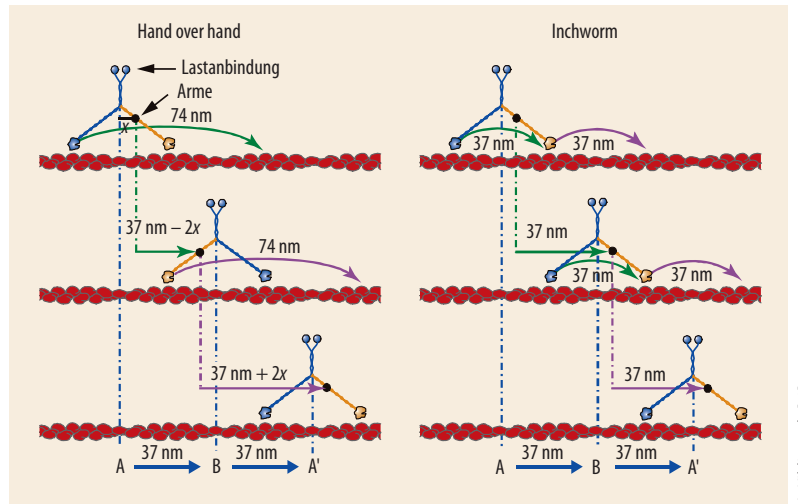


Abb. 5 Für die Bewegung des Motorproteins Myosin V entlang eines F-Actinfilaments kommen sowohl der „hand over hand“ als auch der „inchworm“-Mechanismus infrage. Durch die Positio-

nierung eines Fluorophors an einem Arm (leichte Kette) lässt sich in einem hochauflösenden Fluoreszenztracking-Experiment entscheiden, welcher Mechanismus in der Natur realisiert ist.

Mechanismus oder durch eine „inchworm“-Bewegung¹⁾ vorwärts kommt. Beim „hand-over-hand“-Mechanismus „greift“ der freie Arm bei einem Schritt über den gebundenen Arm hinweg (Abb. 5), während beim „inchworm“-Mechanismus die Arme immer hintereinander bleiben. Für beide Mechanismen gab es Hinweise. P. R. Selvin und seinen Mitarbeitern gelang es, die Frage eindeutig zu beantworten, indem sie in der leichten Kette eines Armes im Abstand x vom Zentrum des Motorproteins einen Fluoreszenzfarbstoff anbrachten (Abb. 5). Beim „hand over hand“-Mechanismus sollte sich der Farbstoff dann in alternierenden Schritten von $(37 - 2x)$ nm bzw. $(37 + 2x)$ nm bewegen. Das Zentrum des Motorproteins bewegt sich dabei gleichmäßig von Schritt zu Schritt um jeweils 37 nm. Beim „inchworm“-Mechanismus wird hingegen ein Bewegungsrhythmus des Farbstoffmoleküls von durchweg 37 nm erwartet.

Für das Experiment wurden F-Actinfilamente auf die Probenoberfläche eines hochgenauen Fluoreszenzmikroskops aufgebracht und Myosin-V-Moleküle hinzugesetzt. In diesem *in vitro*-Experiment, das eine Lokalisierungsgenauigkeit von besser als 1,5 nm bei einer Zeitauflösung von 0,5 s erzielte, marschierten dann in Gegenwart von ATP die Proteine auf den Actinfilamenten entlang. Die Bewegung war langsam genug, um die Schrittweiten als Position des Farbstoffes in Abhängigkeit der Zeit zu beobachten. Deutlich zeigte sich ein alternierendes Schrittmuster von typisch 52:23 nm, das manchmal unterbrochen wurde durch größere Schrittweiten von typisch 74 nm. Dieses Schrittmuster lässt sich sehr gut durch ein Bewegungsmodell nach dem „hand over hand“-Mechanismus erklären, wobei der Farbstoff um 7 nm vom Zentrum des Motorproteins entfernt lokalisiert ist. Die großen Schritte von 74 nm kommen dann zustande, wenn die Zeitauflösung des Experimentes nicht mehr ausreicht, um zwei Schritte (52 nm + 23 nm = 75 nm) voneinander zu trennen. Das Beispiel verdeutlicht, wie sich durch das

¹⁾ inchworm ist der englische Begriff für eine Spannerraupe.

Verfolgen einzelner Myosine der Mechanismus ihrer Bewegung aufklären lässt. Inzwischen wurde diese Untersuchung weitergeführt und dabei der Farbstoff durch zwei Bindungsstellen fest mit der leichten Kette verknüpft. Dadurch ließ sich auch die Rotation bei der Bewegung des Armes durch den „hand over hand“-Mechanismus beobachten, sodass ein sehr genaues Bild des Bewegungsmechanismus' entstand [11].

Reporter in nanoporösen Materialien

Auch in der Materialwissenschaft spielen Einzelmolekülexperimente eine zunehmende Rolle. Nanoporöse Materialien wie Zeolithe oder allgemein Molekularsiebe spielen eine große Rolle in technischen Prozessen (Stofftrennung, Katalyse etc.), vielen Produkten unseres täglichen Lebens (Waschmittel, Farbpigmente etc.) und Hightech-Entwicklungen wie z. B. Biosensoren. Bei diesen typischen Hybridmaterialien sind Gastmoleküle in entsprechende nanoporöse Wirtssysteme eingelagert, wodurch neuartige Eigenschaften entstehen. Diese sind häufig entscheidend geprägt durch die Dynamik der Gastmoleküle in den nanometergroßen Kanal- und Käfigstrukturen der Wirtsmaterialien. Bisher wurde diese Dynamik nur durch konventionelle Ensemblemethoden untersucht. Vor einiger Zeit ist es gelungen, die Bewegung einzelner Moleküle in solchen Materialien direkt zu verfolgen. Inzwischen ist es möglich, die Orientierung, die Translationsbewegung sowie kurzzeitige Adsorptionsvorgänge (Trapping) und vieles mehr von einzelnen Molekülen in nanoporösen Materialien im Detail zu beobachten. **Abb. 6a** zeigt das Beispiel einer Trajektorie für die Bewegung eines einzelnen Farbstoffmoleküls über weite Bereiche in einer hexagonal

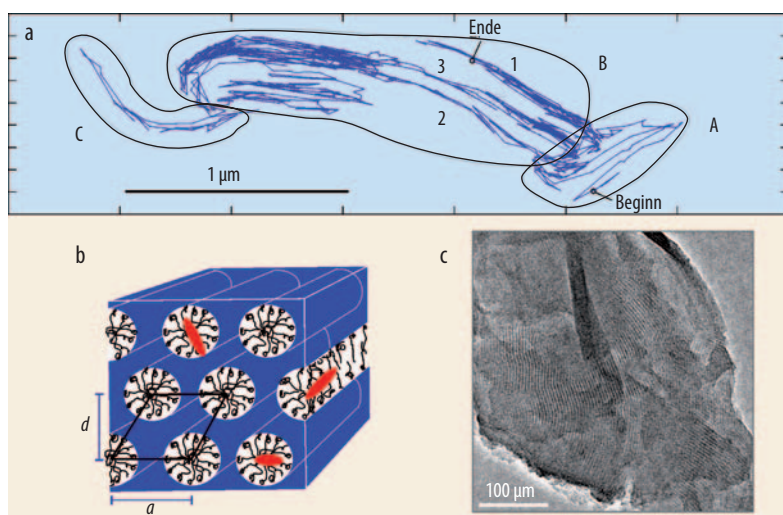


Abb. 6 Wenn ein TDI-Molekül (Terrylen-diimid) durch einen nanoporösen Silikat-Film diffundiert, erkundet es das zugängliche Kanalsystem (a). Aus der Trajektorie ersieht man die Struktur von drei verschiedenen Domänen (A, B, C) sowie aus dem Übergang von Domäne A in Domäne B die Zugänglichkeit von drei

verschiedenen Kanalsystemen (1, 2, 3). In der hexagonalen Phase des Systems (blau) bewegen sich die TDI-Moleküle (rot) in den mit Tensid (schwarz) gefüllten Kanälen (b). Ein Transmissionselektronenmikroskopiebild des Filmes in hoher Auflösung kann diese Details nicht zeigen (c).

strukturierten Phase (**Abb. 6b**) eines mesoporösen Silikatmaterials [12, 13]. Das Molekül macht hier als Reporter die Struktur des Materials sichtbar. Dadurch wird klar, dass hexagonale Kanäle nicht regelmäßig, sondern in Domänen auftreten (A, B, C in **Abb. 6a**). Die Spuren verdeutlichen ferner die Zugänglichkeit der einzelnen Kanalsysteme. Zum Beispiel werden Sackgassen sichtbar durch das vielfache Anstoßen eines Moleküls an das verschlossene Ende des Kanals. Weder die Transmissionselektronenmikroskopie (**Abb. 6c**) noch eine andere Methode kann diese wichtigen Strukturinformationen liefern. Darüber hinaus lässt sich auch die Dynamik der Moleküle in den einzelnen Bereichen untersuchen. Dabei zeigt sich, dass die Bewegung durch eine komplexe Verteilung von Diffusionskoeffizienten, welche sich bis zu einem Faktor 10 unterscheiden können, dargestellt werden muss. Offensichtlich erzeugen die Kanäle durch strukturelle Variationen eine heterogene Bewegung. Dabei ist das einzelne Molekül eine hochempfindliche Sonde für solche heterogenen Bereiche.

Ausblick

Tracking-Experimente mit einzelnen Molekülen und Teilchen liefern einen großen Reichtum an detaillierten Informationen. Grenzen des 2D-Trackings liegen u. a. in dem Verlust von Teilchen, die aus der fokalen Ebene heraus in die dritte Dimension wandern, sowie in der Unsicherheit, mit der man bei manchen Experimenten festlegen kann, wo man sich in der dritten Dimension befindet. Deshalb geht eine der wichtigen Entwicklungen zu präzisen 3D-Tracking-Methoden.

Außer der 3D-Auflösung entwickelt sich eine weitere Richtung dahin, neben der Verfolgung des einzelnen Teilchens auch zusätzliche Informationen über ihre Wechselwirkung mit der Umgebung und die Umgebung selbst zu erhalten. So ist es z. B. möglich, zusätzlich die Orientierung des Fluorophors oder andere spektrale Parameter wie spektrale Shifts oder Lebensdaueränderungen zu messen. Für Experimente in Zellen wäre es z. B. von großem Interesse, wenn man außer der Verfolgung des Teilchens auch den pH-Wert oder die Ca^{2+} -Konzentration entlang der Trajektorie erhalten könnte. Derartige Tracking-Experimente, die Multiparameter-Ergebnisse entlang der Trajektorie liefern, werden sicherlich in Zukunft mit den in diesem Artikel vorgestellten Möglichkeiten verknüpft werden.

Bei unserer Verfolgung eines einzelnen Touristen durch Rom können wir eine Menge lernen über die Interessen und das Verhalten dieses einen Touristen. Wenn wir jedoch Aussagen machen wollen über Touristen im Allgemeinen, muss man eine große Zahl einzelner Touristen beobachten. Ganz analog ist es mit einzelnen Teilchen; auch dort sind Schlüsse über das allgemeine Verhalten nur möglich, wenn wir eine entsprechende Statistik über viele Teilchen vorliegen haben. Deshalb wird auch eine automatisierte Aufnahme und Analyse von Daten in Zukunft viel Beachtung erhalten. Dazu gehört ferner die Entwicklung einer

effizienten Software für die Analyse der großen Datenmengen, die solche Untersuchungen liefern.

Insgesamt haben die Tracking-Methoden sicher eine große Zukunftsperspektive. Dabei dürften zunehmend eine große Zahl von einzelnen Partikeln in 3D über lange Zeitabläufe mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung verfolgbar werden. Gleichzeitig dürfte eine Vielzahl anderer spektroskopischer Parameter, die Aussagen über die Wechselwirkung der einzelnen Teilchen mit ihrer Umgebung und über Veränderungen in der Umgebung selbst geben, einbezogen werden.

Literatur

- [1] W. E. Moerner und L. Kador, Phys. Rev. Lett. **62**, 2535 (1989)
- [2] M. Orrit und J. Bernard, Phys. Rev. Lett. **65**, 2716 (1990)
- [3] G. Seisenberger, M. U. Ried, T. Endress, H. Büning, M. Hallek und C. Bräuchle, Science **294**, 1929 (2001)
- [4] A. Shir, M. Ogris, E. Wagner und A. Levitzki, PLoS Med. **3**, e6 (2006)
- [5] K. D. de Bruin, N. Ruthardt, K. V. Gersdorff, R. Bausinger, E. Wagner, M. Ogris und C. Bräuchle, Mol. Ther. **15**, 1297 (2007)
- [6] T. Schmidt, G. J. Schutz, W. Baumgartner, H. J. Gruber und H. Schindler, J. Phys. Chem. **99**, 17662 (1995)
- [7] G. J. Schütz, G. Kada, V. P. Pastushenko und H. Schindler, EMBO J **19**, 892 (2000)
- [8] K. Jacobson, O. G. Mouritsen und R. G. Anderson, Nat. Cell Biol. **9**, 7 (2007)
- [9] U. Kubitscheck, D. Grunwald, A. Hoekstra, D. Rohleder, T. Kues, J. P. Siebrasse und R. Peters, J. Cell Biol. **168**, 233 (2005)
- [10] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman und P. R. Selvin, Science **300**, 2061 (2003)
- [11] E. Toprak, J. Enderlein, S. Syed, S. A. McKinney, R. G. Petschek, T. Ha, Y. E. Goldman und P. R. Selvin, V. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **103**, 6495 (2006)
- [12] J. Kirstein, B. Platschek, C. Jung, R. Brown, T. Bein C. Bräuchle, Nat. Mater **6**, 303 (2007)
- [13] A. Zürner, J. Kirstein, M. Döblinger, C. Bräuchle und T. Bein, Nature, doi:10.1038/nature06398 (2007)
- [14] N. Bobroff, Rev. Sci. Instr. **57**, 1152 (1986)

DIE AUTOREN

Christoph Bräuchle ist seit 1988 Professor für Physikalische Chemie an der LMU München und beschäftigt sich dort mit der Abbildung, der Spektroskopie sowie der Manipulation von einzelnen Molekülen. In München engagiert er sich für die vielfältige Vernetzung von CeNS, der Sonderforschungsbereiche sowie der beiden Exzellenzcluster NIM und CiPSM. Die Seefeste des leidenschaftlichen Seglers (zweimalige EM-Teilnahme) sind in seiner Arbeitsgruppe ebenso berühmt wie sein Hang zum schnellen Skifahren und seine Liebe zur italienischen Kunst des Quattro Cento. **Don C. Lamb** wurde kürzlich auf eine Professur für Physikalischen Chemie an der LMU München berufen und wendet fortgeschrittene empfindliche Fluoreszenz-Methoden an, um die Geheimnisse der Nano- und Bio-Welten zu erforschen. In Rahmen dieser interdisziplinären Forschung arbeitet er mit dem CeNS zusammen und engagiert sich im Exzellenzcluster NIM sowie in zwei Sonderforschungsbereichen. Durch die Makro-Bio-Welt wandert er ebenso ausdauernd wie er auf der Tastatur seines Flügels spielt.

