

Differentielle interferometrische Partikelverfolgung mit Subnanometer- und Submillisekundenauflösung

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm ProPhys

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Dennis Müller

aus Salzgitter

Göttingen, 2013

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Rainer G. Ulbrich, IV. Physikalisches Institut
.....

Prof. Dr. Tim Salditt, Institut für Röntgenphysik
.....

Dr. Martin Wenderoth, IV. Physikalisches Institut
.....

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. Rainer G. Ulbrich, IV. Physikalisches Institut
.....

Korreferent: Prof. Dr. Tim Salditt, Institut für Röntgenphysik
.....

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Hans-Ulrich Krebs, Institut für Materialphysik
.....

Prof. Dr. Markus Münzenberg, I. Physikalisches Institut
.....

Prof. Dr. Sarah Köster, Institut für Röntgenphysik
.....

Prof. Dr. Claus Ropers, Institut für Materialphysik
.....

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

I EINFÜHRUNG

1	MOTIVATION	
2	METHODEN ZUR PARTIKELLOKALISIERUNG	
2.1	Übergang von der Abbildung zur Lokalisierung	7
2.2	Mittelpunktbestimmung von Beugungsscheibchen	9
2.3	Partikellokalisierung mit einer Quadrantenphotodiode	13
2.4	Optical-Trapping-Interferometer	16

II DIFFERENTIELLE INTERFEROMETRISCHE PARTIKELVERFOLGUNG: VORSTELLUNG DER MESSMETHODE

3	MESSPRINZIP UND EXPERIMENTELLER AUFBAU	
3.1	Beleuchtung	20
3.2	Interferometer	23
3.3	Messwerterfassung	27
4	AUSWERTUNG DER INTERFEROGRAMME	
4.1	Form der Interferogramme	29
4.2	Interferenzphase und Partikelposition	31
4.3	Phasenrekonstruktion	32
4.4	Reichweite der Partikelbewegung	34
5	KALIBRIERUNGEN	
5.1	Kalibrierung der Phase-Orts-Beziehung	39
5.2	Zeitauflösung	41
5.3	Ortsauflösung und Drifteliminierung	42

III ANWENDUNG: MESSUNG DER KINESINBEWEGUNG

6	KINESIN UND MIKROTUBULI	
6.1	Funktion von Motorproteinen	50
6.2	Mikrotubuli	50
6.3	Kinesin	52
7	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	
7.1	Probenpräparation	55
7.2	Entwicklung der Interferogramme	59
7.3	Entwicklung der Stromsignale	62
8	ERGEBNISSE	
8.1	Gemessene Pfade	65
8.2	Untersuchung der Leistungsspektren	67
8.3	Interpretation der Ergebnisse	68

INHALTSVERZEICHNIS

IV ZUSAMMENFASSUNG

9 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

ANHANG

A ANSATZ EINES MOBILITÄTS-ASSAYS

LISTE DER VERWENDETEN SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

LITERATURVERZEICHNIS

DANKSAGUNG

Teil I

EINFÜHRUNG

MOTIVATION

Die Positionsbestimmung und Bahnverfolgung einzelner Partikel eröffnet die Möglichkeit, dynamische Prozesse auf Längenskalen von Millimetern bis unterhalb von Nanometern abzubilden. Insbesondere mit Blick auf Anwendungsgebiete in der Biochemie, wo relevante Prozesse auf molekularer Ebene hohe räumliche und zeitliche Auflösungen erfordern, sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche neue optische Methoden entwickelt worden. Sowohl fluoreszente als auch phasenverschiebende und lichtstreuende Marker werden verwendet, um die Bewegung molekularer Proben sichtbar zu machen. Einige Techniken erlauben Ortsauflösungen weit unterhalb der Beugungsgrenze sichtbaren Lichts [1–3], wodurch Einblicke in die Mechanik einzelner biologischer Moleküle gewonnen werden können [4–6]. Zum Beispiel wurde direkt beobachtet, dass sich das Motorprotein Kinesin mit 8 nm großen Schritten an Proteinfilamenten des Zytoskeletts, den Mikrotubuli, entlang bewegt [7–9]. Sogar die 0,37 nm großen Schritte der Bewegung von RNA-Polymerase an der DNA entlang konnten aufgelöst werden [10].

In der Praxis wird die Orts- und Zeitaufklärung der Bahnverfolgung von Partikeln durch verschiedene Faktoren wie die begrenzte zur Verfügung stehende Photonennrate oder die mechanische Instabilität des optischen Aufbaus und der Probe selbst beschränkt. Diesen limitierenden Aspekten kann auf verschiedene Weise begegnet werden, zum Teil mit hohem experimentellen Aufwand: Die begrenzte Strahlungsleistung, die von dem zu verfolgenden Partikel emittiert wird, beschränkt die mittlere Anzahl der Photonen, die innerhalb eines festen Zeitfensters zu einem Einzelbild beitragen. Hierin liegt eine prinzipielle Grenze für die Genauigkeit der Objektlokalisierung [11]. Durch die Wahl einer geeigneten Bildwiederholrate muss ein angemessener Kompromiss zwischen Orts- und Zeitaufklärung gefunden werden. Diese Einschränkung wird besonders bei der Bahnverfolgung einzelner Fluoreszenzmoleküle deutlich, die eine begrenzte Photonennabstrahlrate besitzen. Im Fall lichtstreuender Partikel gibt es keine prinzipielle Begrenzung für die emittierte Strahlungsleistung, da die Anzahl der gestreuten Photonen proportional zur Intensität der Beleuchtung ist. Obwohl die Strahlungsleistung des gestreuten Lichts stark von der Partikelgröße abhängt, konnten bereits Goldpartikel mit einem Durchmesser von nur 10 nm in einem Zeitfenster von etwa einer Mikrosekunde detektiert werden [12]. Hohe Zeitaufklärungen können entweder mit Hilfe von Hochgeschwindigkeitskameras oder –

was wesentlich kostengünstiger ist – durch die Verwendung nur weniger Detektionskanäle mit hoher Bandbreite erreicht werden [13, 14]. Größere Partikel streuen mehr Licht und ermöglichen daher als Marker an einer biologischen Probe eine hohe Orts- und Zeitauflösung. Jedoch lässt die oftmals flexible Verbindung zur Probe eine relativ freie Bewegung des Markers innerhalb eines begrenzten Volumens zu. Die thermische Bewegung des Markers verschlechtert somit die Genauigkeit der Probenlokalisierung. Eine optische Pinzette kann dazu verwendet werden, den Marker festzuhalten und dessen thermische Bewegung zu unterdrücken. Gleichzeitig ermöglicht dies die gezielte Anwendung und Messung von Kräften [15–17]. Hier tut sich eine neue Fehlerquelle auf: Die Position der optischen Pinzette in der Objektebene kann sich aufgrund der thermischen Ausdehnung, die das fokussierende Objektiv durch die hohe Strahlungsleistung des Lasers erfährt, um mehrere hundert Nanometer verschieben. Um die Punktstabilität einer optischen Pinzette dennoch zu gewährleisten, haben Mahamdeh et. al. ein Objektiv mit Temperaturfühlern und Heizfolien versehen, um dessen Temperatur auf Schwankungen von weniger als 1 mK zu stabilisieren [18]. Weiterhin haben Abbondanzieri et. al. ein Mikroskop in einen abgedichteten, mit Helium gefüllten Kasten eingeschlossen, um Fluktuationen der Position der optischen Pinzette zu minimieren, die auf Luftzüge und Dichteschwankungen zurückzuführen sind [10]. Der Drift des Objektstischs kann dadurch kompensiert werden, dass in der Objektebene fixierte Marker verfolgt werden und deren Bewegung nachträglich von der gemessenen Bewegung der Probe subtrahiert oder darüber der Objektstisch aktiv stabilisiert wird [19]. Eine andere Möglichkeit besteht darin, den gesamten Messaufbau von thermischen Fluktuationen zu entkoppeln, indem der Aufbau vollständig automatisiert und in einem separaten Raum platziert wird [18].

In dieser Arbeit wird eine neue Methode vorgestellt, die „differentielle interferometrische Partikelverfolgung“. Sie kombiniert einen relativ simplen Messaufbau mit hoher Orts- und Zeitauflösung und einer inhärenten Eliminierung des Mikroskopdrifts aus den Messwerten. Die differentielle interferometrische Partikelverfolgung basiert auf der Interferenz zwischen dem Streulicht eines Testpartikels und eines in der Objektebene fixierten Referenzpartikels. Dazu wurde ein aufrechtes Mikroskop mit einer Laserdunkelfeldbeleuchtung ausgestattet und ein kompaktes Mach-Zehnder-ähnliches Interferometer auf den Kameraausgang des Mikroskops montiert. Das Interferenzsignal, das die Information über die eindimensionale Partikelbewegung enthält, wird mit zwei Avalanche-Photodioden gemessen. Dadurch ist diese Messanordnung bei geeigneter Auswertung der Messwerte unempfindlich gegen Fluktuationen der Laserleistung. Um die Leistungsfähigkeit dieser Methode zu demonstrieren, wurde die Bewegung von Kinesin an Mikrotubuli entlang gemessen. Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 0,5 μm dienten als Markierung der Kinesinmoleküle. Die typischen 8 nm

großen Schritte konnten ohne Verwendung einer optischen Pinzette deutlich aufgelöst gemessen werden.

METHODEN ZUR PARTIKELLOKALISIERUNG

In diesem Kapitel wird ein Überblick über bereits etablierte Methoden zur Partikellokalisierung gegeben. Die Auswahl und Reihenfolge der vorgestellten Techniken soll verdeutlichen, dass der Übergang von der Abbildung zur Interferometrie fließend ist, wenn es um die Lokalisierung kleiner Objekte in der Größenordnung der Wellenlänge des Lichts geht. Im ersten Abschnitt des Kapitels wird zunächst auf prinzipielle Grenzen der Genauigkeit der optischen strukturellen Abbildung und der Objektlokalisierung eingegangen.

2.1 ÜBERGANG VON DER ABBILDUNG ZUR LOKALISIERUNG

Das Auflösungsvermögen abbildender optischer Instrumente ist durch den Wellencharakter und die daraus resultierende Beugung des Lichts begrenzt. Das Licht punktförmiger Strahler wird nicht wieder als Punkt abgebildet, sondern als flächiges Beugungsmuster, dessen Größe von der Wellenlänge λ_0 des Lichts und der numerischen Apertur NA des abbildenden Linsensystems abhängt. Die kreisförmige Blende einer Linse oder eines Mikroskopobjektivs erzeugt als Bild einer Punktlichtquelle ein Airy-Scheibchen [20], bestehend aus einem zentralen Intensitätsmaximum und mehreren nach außen hin schwächer werdenden umliegenden Ringen. Zur Quantifizierung des Auflösungsvermögens eines optischen Instruments kann das Rayleigh-Kriterium herangezogen werden, welches besagt, dass zwei punktförmige Strahler mit dem Abstand Δx gerade noch getrennt voneinander dargestellt werden können, wenn das zentrale Beugungsmaximum des einen Strahlers in das erste Beugungsminimum des anderen Strahlers fällt. Für nicht kohärent strahlende Punktlichtquellen gilt dann die Abbesche Auflösungsgrenze eines Mikroskops

$$\Delta x = 0,61 \cdot \frac{\lambda_0}{NA} \quad (2.1)$$

als minimaler Abstand zwischen zwei aufgelöst abbildbaren Punkten [21]. Mit der konventionellen Lichtmikroskopie können somit Strukturen, die kleiner

als 200 nm sind, nicht mehr aufgelöst werden. Neuartige Ansätze wie die STED-Mikroskopie [22, 23] erzielen höhere Auflösungen durch Ausnutzung nichtlinearer Eigenschaften fluoreszierender Marker.

Die Lokalisierung von Objekten muss grundsätzlich von der strukturellen Abbildung unterschieden werden. Die Genauigkeit optischer Positionsbestimmungen ist nicht prinzipiell durch die Beugung des Lichts limitiert. So kann die laterale Position eines punktförmigen Strahlers mit einem abbildenden System im Prinzip beliebig genau ermittelt werden, da der Mittelpunkt des entstehenden – rauschfreien – Beugungsscheibchens trotz seiner endlichen Ausdehnung präzise bestimmt werden kann (Abschnitt 2.2). Beschränkt wird die Genauigkeit solch einer Positionsbestimmung durch Rauschen, das die Messung überlagert. Als intrinsische Grenze ist dabei das Schrotrauschen des Lichts zu nennen, das auf die Quantisierung des elektromagnetischen Felds in einzelne Photonen und deren voneinander unabhängiges Eintreffen am Detektor zurückzuführen ist. Die ultimative Grenze für die Genauigkeit der Positionsbestimmung eines Objekts wird durch die Heisenbergsche Unschärferelation

$$\Delta x \Delta p_x \geq \hbar/2 \quad (2.2)$$

beschrieben [2, 24–26]. Dabei ist \hbar das Plancksche Wirkungsquantum. Bei einer Positionsbestimmung eines Objekts mit nur *einem* Photon kann die Unschärferelation so interpretiert werden, dass Δp_x die Unschärfe der Impulskomponente in x -Richtung darstellt, die dem Photon durch den Streuprozess (oder einen anderen Wechselwirkungsmechanismus) mit dem Objekt und die anschließende Winkelbegrenzung durch die Aperturblende der optischen Komponenten aufgeprägt wird. Δx ist dann die Ortsunschärfe, mit der das Photon und somit auch dessen Ursprungsort lokalisiert werden kann. Diese Betrachtungsweise steht im Einklang mit der Beugungsbegrenzung abbildender optischer Systeme, bei der die numerische Apertur des Objektivs die Impulsunschärfe der Photonen in lateraler Richtung bestimmt (Gleichung 2.1). Das Beugungsmuster stellt in diesem Fall die Wahrscheinlichkeitsdichte dar, ein Photon in einem bestimmten Flächenelement der Bildebene zu detektieren. Eine entsprechende Lokalisierung mit N voneinander unabhängigen Photonen reduziert die Ortsunschärfe um einen Faktor $1/\sqrt{N}$ ¹.

¹ Streng genommen muss noch berücksichtigt werden, dass auch dem zu lokalisierenden Objekt von jedem gestreuten Photon eine gewisse Impulsunschärfe aufgeprägt wird, die zu einer Bewegung und somit nach einer gewissen verstrichenen Zeit wieder zu einer Ortsunschärfe führt. Dieser Effekt vergrößert sich mit zunehmender Photonenzahl und wirkt der Verbesserung der Ortsauflösung entgegen, die bei hohen Intensitäten durch Zunahme des Signal-Rausch-Verhältnisses zu erwarten ist. Dies führt zu einer ultimativen Grenze der Genauigkeit, mit der ein freies Objekt lokalisiert werden kann, $\Delta x = (2\hbar\tau/m)^{1/2}$, die nur von der Masse m des Objekts und der Messdauer τ abhängt [27–29].

2.2 MITTELPUNKTBESTIMMUNG VON BEUGUNGSSCHEIBCHEN

Die Position einer einzelnen Punktlichtquelle, z.B. eines fluoreszierenden Moleküls, kann mit einem abbildenden Instrument sehr präzise bestimmt werden, indem der Mittelpunkt des abgebildeten Beugungsscheibchens ermittelt wird. Dies kann z.B. durch Berechnung des Schwerpunkts geschehen, oder aber, was sich oft als präziser herausstellt, durch Anpassen einer Funktion, die der Punktspreizfunktion (PSF) des abbildenden Systems ähnlich ist [30]. Hierzu bietet es sich an, eine Gaußfunktion mit der Methode der kleinsten Quadrate an das gemessene Beugungsscheibchen anzupassen. Als Schätzparameter werden unter anderem die Koordinaten des Mittelpunkts bestimmt, die die Position der Punktlichtquelle repräsentieren. Die dabei erzielte Genauigkeit liegt deutlich unterhalb der Abbeschen Auflösungsgrenze und wird durch die Größe des Beugungsscheibchens und das Rauschen bestimmt, das die Messung überlagert [11, 31]. Ist das Schrotrauschen der detektierten Photonen die dominierende Rauschkomponente, so ist die Unsicherheit, mit der die Partikelposition bestimmt werden kann,

$$\Delta x = \sqrt{\frac{\sigma^2}{N} + \frac{a_p^2/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{a_p^2 N^2}} \approx \frac{\sigma}{\sqrt{N}}. \quad (2.3)$$

a_p ist die Seitenlänge der quadratischen Pixel, b das mittlere Hintergrundsignal pro Pixelfläche. Die Näherung gilt für vernachlässigbar kleine a_p und b . σ ist die Standardabweichung der Gaußfunktion, die der PSF angepasst wird und entspricht in etwa der Hälfte der Abbeschen Auflösungsgrenze des abbildenden Systems. Gleichzeitig ist dies die Unschärfe einer Positionsbestimmung, zu der nur ein einziges Photon beiträgt. Die Abhängigkeit $\Delta x \propto N^{-1/2}$ kommt dadurch zustande, dass bei einer Messung mit N voneinander unabhängigen Photonen Δx als Standardfehler des arithmetischen Mittels von N einzelnen Messungen betrachtet werden kann. Die Zunahme der Bildqualität, und somit der Genauigkeit einer Positionsrekonstruktion, mit steigender Photonenzahl wird in Abbildung 2.1 verdeutlicht. Hier sind sechs Bilder eines fluoreszierenden Partikels dargestellt. Die Bilder mit größeren Photonenzahlen wurden durch nachträgliche Überlagerung von jeweils 2, 4, 8, 16 oder 32 Einzelbildern konstruiert. Durch Anpassen einer Gaußfunktion mit dem Scheitelwert als Schätzparameter wurde die Zahl N der beteiligten Photonen bestimmt.

Beispiel 1: FIONA

Die Positionsbestimmung einzelner fluoreszierender Moleküle mit geringer Messunschärfe Δx im Nanometerbereich kann genutzt werden, um funktionelle Details von Proteinen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Yildiz et. al. haben die Mittelpunktsbestimmung von Beugungsscheibchen (FIONA,

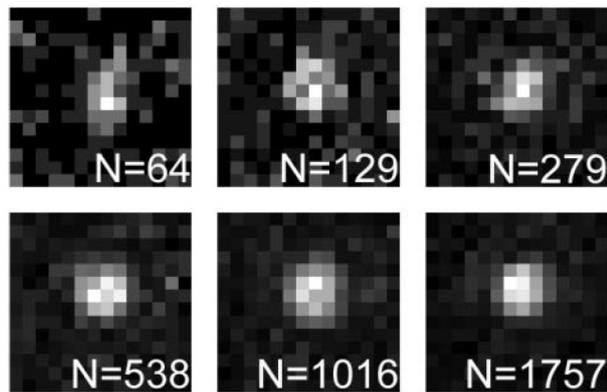


Abbildung 2.1: Zunahme der Bildqualität, und somit der Genauigkeit einer Positionsbestimmung, eines fluoreszierenden Partikels mit steigender Anzahl N der beteiligten Photonen. Aus [11].

„fluorescence imaging with one-nanometer accuracy“) dazu verwendet, die Bewegung des Motorproteins Myosin-V, das sich durch ATP-Hydrolyse entlang des Filaments Aktin bewegt, zu messen und den Mechanismus, der hinter der in Schritten erfolgenden Bewegung steckt, aufzudecken [4]. Dazu wurde ein Myosin-V-Molekül mit einem einzelnen Fluoreszenzmolekül markiert. Mit einer gekühlten CCD-Kamera mit hoher Quantenausbeute und geringem Rauschen wurden in vitro fluoreszenzmikroskopische Videos des wandernden Motorproteins mit einer Bildwiederholrate von 2 Hz aufgenommen. Dieses relativ große Zeitfenster ist der limitierten Photonemissionsrate des Fluoreszenzmoleküls geschuldet. Eine entsprechend niedrige Schrittrate des Myosin-V wurde durch eine geringe ATP-Konzentration in der umgebenden Lösung erreicht. Die Position des Fluoreszenzmoleküls wurde für jedes Einzelbild durch Anpassen einer Gaußfunktion an dessen Bild bestimmt. Zur Entstehung jedes Einzelbildes des Fluoreszenzmoleküls trugen jeweils etwa 5000 bis 10000 Photonen bei. Die Standardabweichung σ der an die PSF angepassten Gaußfunktion betrug etwa 125 nm. Diese Werte ergeben mit Gleichung 2.3 eine Ortsunschärfe Δx von 1,3 nm bis 1,8 nm. Unter Berücksichtigung des Hintergrundrauschens und der endlichen Pixelgröße des CCD-Sensors konnten Ortsunschärfen von $\Delta x \approx 3$ nm erreicht werden. Die einzelnen, im Mittel 37 nm großen Schritte, mit denen sich das als Dimer vorliegende Myosin-V am Aktin entlang bewegt, sind in den gemessenen Pfaden somit deutlich sichtbar (Abbildung 2.2). Die genaue Größe der einzelnen Schritte wurde bestimmt, indem der Mittelwert der Positionen der einzelnen Plateaus berechnet wurde.

Das Fluoreszenzmolekül wurde an den Bereich der leichten Kette des Myosin-V im Abstand δ von der Mitte des Motorproteins befestigt (Abbildung 2.3). Für verschiedene Modelle des Fortbewegungsmechanismus ergeben sich dadurch unterschiedliche Voraussagen für die zu messende Schrittsequenz. Bei einer „raupenartigen“ Bewegung [32] ist für jeden ge-

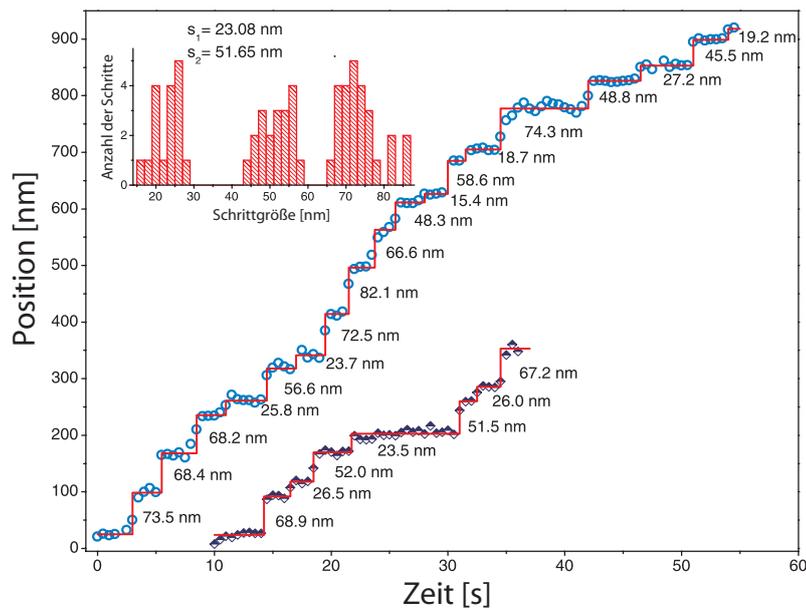


Abbildung 2.2: Zwei durch Anpassen einer Gaußfunktion an die PSF gemessene Pfade eines an die leichte Kette eines Myosin-V-Moleküls gebundenen Fluoreszenzmoleküls. Die Ortunscharfe beträgt $\Delta x \approx 3$ nm, die Bildwiederholrate liegt bei 2 Hz. Anstelle der bekannten Schrittweite des Myosin-V von 37 nm werden neben 74 nm großen Schritten (entsprechen zwei Schritten innerhalb eines Messintervalls) abwechselnd 23 nm und 52 nm große Schritte gemessen (Histogramm). Dieser Befund deutet auf eine „hangelnde“ Bewegung des Motorproteins hin. Nach [4].

messenen Schritt die einheitliche Größe von 37 nm zu erwarten, wohingegen bei einer „hangelnden“ Bewegung [33–35], bei der immer ein Kopf nach dem anderen vorgesetzt wird, eine Abfolge mit abwechselnd $(37 - 2\delta)$ nm und $(37 + 2\delta)$ nm großen Schritten erwartet wird. Dank der hohen Ortsauflösung konnte tatsächlich die Beobachtung gemacht werden, die auf eine „hangelnde“ Bewegung schließen lässt. So wurden unter anderem Pfade gemessen, die abwechselnd 52 nm und 23 nm große Schritte zeigen (Abbildung 2.2). Die hochpräzise Lokalisierung von Fluoreszenzmolekülen durch Mittelpunktsbestimmung der Beugungsscheibchen wurde in diesem Fall dazu genutzt, den Bewegungsmechanismus des Myosin-V-Aktin-Komplexes zu bestimmen.

Beispiel 2: PALM / STORM

Die geringe Ortsunscharfe bei der Positionsbestimmung einzelner Fluoreszenzmoleküle kann auch zur hochauflösenden Abbildung genutzt werden [36]. Um eine große Detailtreue des Bilds zu ermöglichen, müssen die Farbstoffmoleküle möglichst dicht an der abzubildenden Probe haf-

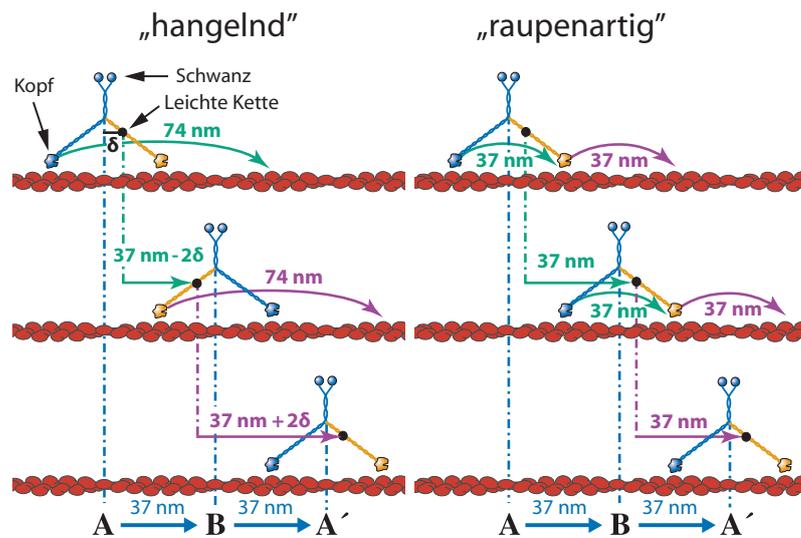


Abbildung 2.3: Erwartete Schrittgrößen der Bewegung eines Myosin-V-Moleküls am Proteinfilament Aktin entlang bei den beiden möglichen Mechanismen „hangelnd“ und „raupenartig“. Das Fluoreszenzmolekül ist im Abstand δ von der Mitte des Myosin-V an dessen leichte Kette gebunden. Bei einer hangelnden Bewegung werden Schrittgrößen des Fluoreszenzmoleküls von abwechselnd $(37 - 2\delta)$ nm und $(37 + 2\delta)$ nm erwartet, eine raupenförmige Bewegung liefert durchgehend 37 nm große Schritte. Nach [4].

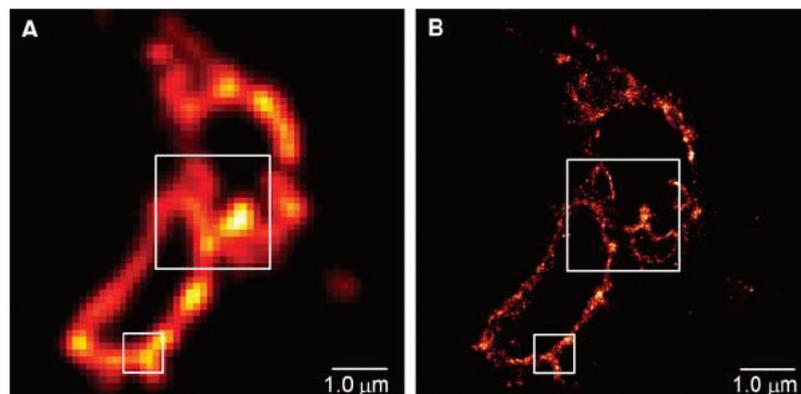


Abbildung 2.4: Aufnahme eines Lysosoms. (A): Konventionelles fluoreszenzmikroskopisches Bild. (B): Mit PALM aufgenommenes Bild desselben Objekts. Details in der Größenordnung von 10 nm sind zu erkennen. Aus [37].

ten. Einzelne Marker können jedoch nur dann präzise lokalisiert werden, wenn sich die Beugungsscheibchen der einzelnen Punktlichtquellen nicht überlagern. Um dieses Problem zu umgehen, nutzen die Methoden PALM (**P**hoto**a**ctivated **L**ocalization **M**icroscopy [37, 38]) und STORM (**S**tochastic **O**ptical **R**econstruction **M**icroscopy [39]) das sequenzielle Schalten einzelner photoaktivierbarer fluoreszierender Proteine, um dicht beieinander befindliche Punktlichtquellen nacheinander abzubilden und präzise zu lokalisieren. Diese Farbstoffe können sich in einem aktivierten oder in einem deaktivierten Zustand befinden. Nur im aktivierten Zustand sind sie fluoreszent. Durch Licht einer geeigneten Wellenlänge können wenige, zufällig ausgewählte Proteine aktiviert werden, die dann mit Licht einer anderen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden und so lange zur Belichtung eines Bilds beitragen, bis sie irreversibel ausgebleicht sind. Sofern sich die Beugungsscheibchen der zu einem Zeitpunkt aktivierten Farbstoffmoleküle nicht überlagern, können sie jeweils mit hoher Genauigkeit lokalisiert werden. Der Vorgang der Aktivierung und Abbildung einiger weniger Fluoreszenzmoleküle wird so lange wiederholt, bis alle Marker ausgebleicht sind. Die nachträgliche Überlagerung sämtlicher so erhaltener Farbstoffpositionen ergibt ein hochaufgelöstes Bild der Probe, dessen Aufnahme durch das sequenzielle Auslesen der Fluoreszenzproteine mehrere Stunden dauern kann. Mechanischer Drift kann durch die simultane Positionsbestimmung unbeweglicher Markierungen in der Objektebene und nachträgliche Subtraktion derer Bewegung von den gemessenen Positionen der Fluoreszenzproteine korrigiert werden. Abbildung 2.4 zeigt den Vergleich einer solchen Aufnahme (B) mit einem konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Bild (A) derselben Probe. Es handelt sich um ein Lysosom, ein Zellorganell, bei dem bestimmte Transmembranproteine mit fluoreszierenden Proteinen markiert worden sind. Details in der Größenordnung von 10 nm sind zu erkennen, die in der konventionellen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme verborgen bleiben.

2.3 PARTIKELLOKALISIERUNG MIT EINER QUADRANTENPHOTODIODE

Für die hochgenaue Lokalisierung eines Objekts ist nicht unbedingt ein Kamerasensor mit mehreren tausend Pixeln erforderlich. Die Information über die Bewegung eines Partikels kann bereits mit wenigen Detektionskanälen, z.B. mit einer geteilten Photodiode, gewonnen werden. Der Vorteil im Vergleich zu Kamerasensoren ist ein relativ einfacher Zugang zu hohen Zeitauflösung, vorausgesetzt, die zur Verfügung stehende Strahlungsleistung ist ausreichend groß. So wurden, vor allem im Zusammenhang mit optischen Pinzetten, zahlreiche Methoden entwickelt, die eine Quadrantenphotodiode (QPD) zur Positionsbestimmung eines Objekts nutzen. Bei diesen verschiedenen im Folgenden vorgestellten Ansätzen wird besonders gut der fließende Übergang von der Abbildung zur Interferometrie deutlich. Bei den zu lokalisierenden Markern handelt es sich zumeist um dielektrische

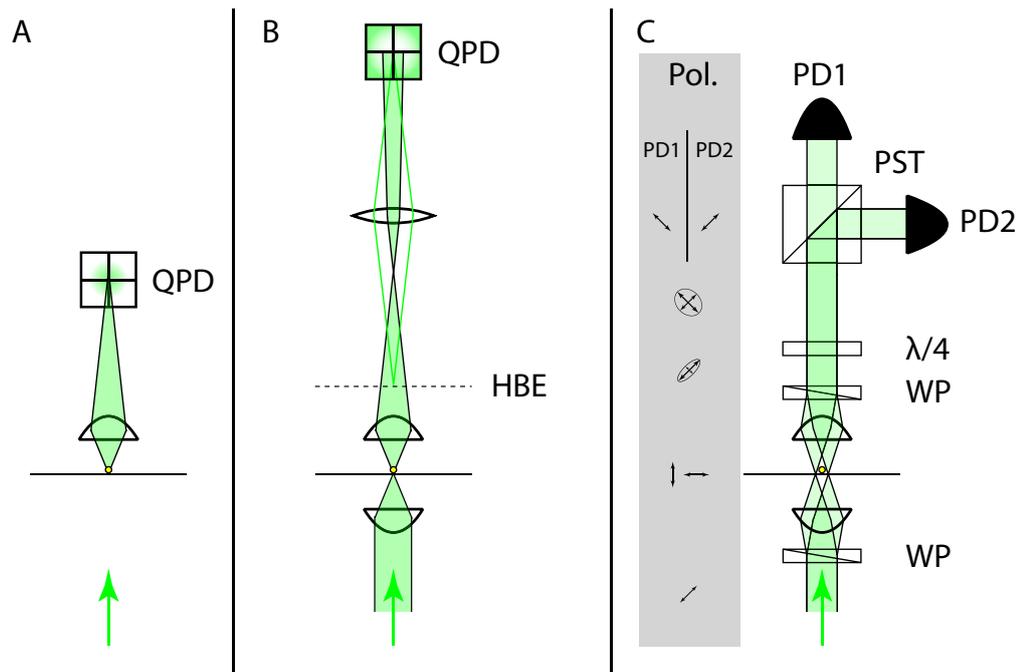


Abbildung 2.5: Verschiedene Lokalisierungsmethoden mit geteilten Photodioden. (A): Direkte Abbildung auf eine Quadrantenphotodiode (QPD). (B): Abbildung der hinteren Brennebene (HBE) auf eine QPD. (C): Partikellokalisierung mit Hilfe eines Optical-Trapping-Interferometers. PD1, PD2: Photodioden; PST: Polarisierender Strahlteiler; $\lambda/4$ -Plättchen; WP: Wollaston-Prisma. Im grau hinterlegten Kasten ist die jeweilige Polarisationsrichtung des Lichts dargestellt.

Partikel mit einem Durchmesser von etwa $1\ \mu\text{m}$, die sich zum einen leicht mit optischen Pinzetten einfangen lassen und die zum anderen einen großen Streuquerschnitt besitzen, sodass das Streulicht eine wesentlich höhere Strahlungsleistung hat als das Fluoreszenzlicht vergleichbarer gefärbter Partikel.

Abbildung auf eine geteilte Photodiode

Die naheliegendste Art, die Position und die Bewegung eines Partikels mit einer geteilten Photodiode zu messen, besteht darin, das Partikel als vergrößertes Beugungsscheibchen auf die Schnittstelle zwischen den einzelnen Photodiodensegmenten abzubilden. Das differentielle Auslesen der Photoströme der gegenüberliegenden Segmente liefert ein Maß für die Verschiebung des Beugungsscheibchens auf der Sensorfläche. Innerhalb einer gewissen Reichweite der Bewegung ist diese Differenz proportional zur Verschiebung der Punktlichtquelle. Dieses Prinzip wurde erstmals von Kamimura angewendet, um die Bewegung von Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von $1\ \mu\text{m}$ mit einer Genauigkeit von ca. $1\ \text{nm}$ zu messen [1]. Dazu wurde das vergrößerte Bild eines Partikels auf die Kante eines prismenförmigen Spiegels projiziert, sodass zwei Halbbilder entstanden und deren Strahlungsleistung jeweils von einer Photodiode erfasst wurde. Trifft das Bild die Kante des Prismenspiegels genau mittig, so sind die beiden Halbbilder identisch und die Differenz der Photoströme der beiden Photodioden ist null. Verschiebt sich jedoch das Partikel und somit dessen Bild, lässt sich das an einer wachsenden Differenz der Photoströme ablesen. Anstelle des prismenförmigen Spiegels kann das Bild des Partikels auch direkt auf zwei eng beieinanderliegende Photodioden projiziert werden [40]. Die Verwendung einer QPD erlaubt die Bewegungsmessung in zwei Dimensionen [3, 41–43], indem die vier Segmente paarweise die Position in x - und y -Richtung liefern (Abbildung 2.5A). Die Beleuchtung kann auf unterschiedliche Weise geschehen, z.B. als konventionelle Hellfeldbeleuchtung mit der mikroskopeigenen Wolfram-Halogenlampe. Da auf diese Weise nur vergleichsweise geringe Strahlungsintensitäten in der Objektebene erzeugt werden können, ist die erzielbare Zeitauflösung der Messsignale durch das Schrotrauschen der Photonen dementsprechend stark begrenzt. Da der Kontrast bei Hellfeldabbildungen kleiner Partikel gering ist, bietet sich eine Dunkelfeldanordnung an [6]. Höhere Intensitäten können mit Bogenlampen oder mit Laserbeleuchtung erzielt werden, wobei hier zu beachten ist, dass Bogenlampen weniger stabil sind und Laserbeleuchtung Probleme wie ungewollte Interferenz und Specklemuster mit sich bringen kann.

Abbildung der hinteren Brennebene

Alternativ zu einer Abbildung der Objektebene auf einen Detektor haben Visscher et. al. eine QPD in der hinteren Brennebene (HBE) bzw. in einer zu ihr konjugierten Ebene platziert [44] (Abbildung 2.5B). Das Muster in der HBE resultiert aus der Interferenz zwischen dem ungestörten beleuchtenden, fokussierten Lichtstrahl und dem an dem Partikel gestreuten Licht [45]. Dieses Muster stellt die Winkelverteilung des Lichts dar, das den Fokus passiert und ist im Gegensatz zu einer Abbildung des Partikels unabhängig von der tatsächlichen Position des Fokus in der Objektebene. Vielmehr wird hierbei die Position des Partikels relativ zum Fokus des beleuchtenden Lichtstrahls gemessen. Dient dieser Fokus gleichzeitig als optische Pinzette, so kann diese zur Manipulation der Probe frei bewegt werden – zumindest innerhalb einer gewissen Reichweite – ohne, dass die Position der QPD entsprechend nachjustiert werden muss.

2.4 OPTICAL-TRAPPING-INTERFEROMETER

Eine weitere nichtabbildende Methode zur Positionsmessung von Partikeln wurde von Denk et. al. vorgestellt und basiert auf der Differentialinterferenzkontrast- (DIK-) Mikroskopie [2]. Hierbei wird ein Laserstrahl, bevor er auf die Probe fokussiert wird, mit einem Wollaston-Prisma in zwei orthogonal polarisierte Teilstrahlen getrennt (Abbildung 2.5C). Diese beiden Strahlen formen in der Objektebene zwei beugungsbegrenzte Brennpunkte, die sich teilweise überlappen und gemeinsam die optische Pinzette bilden. Die Strahlen werden nach Verlassen der Probe an einem zweiten Wollaston-Prisma wieder überlagert. Diese Anordnung bildet somit ein Zweistrahlinterferometer, dessen Ausgang empfindlich auf Phasenschübe in einem der beiden Interferometerarme ist. In der Fachliteratur ist diese Messanordnung unter dem Namen „Optical-Trapping-Interferometer“ bekannt. Ist kein Partikel in der optischen Pinzette, oder befindet sich eines genau in deren Zentrum, so ist die lineare Polarisation des Strahls hinter dem zweiten Wollaston-Prisma die gleiche wie in dem Ausgangsstrahl vor dem ersten Wollaston-Prisma. Befindet sich jedoch ein phasenverschiebendes Partikel dezentriert in der Falle, so wird ein Teilstrahl in der Objektebene stärker dephasiert als der andere, was eine elliptische Polarisierung des rekombinierten Strahls zur Folge hat, die mit Hilfe eines $\lambda/4$ -Plättchens, eines geeignet angeordneten polarisierenden Strahlteilers und zwei Photodioden leicht gemessen werden kann. Innerhalb einer gewissen Reichweite der Partikelpositionen ist das gemessene Differenzsignal der beiden Photodioden proportional zur Partikelposition. Mit dieser Methode konnten Svoboda et. al. erstmalig die 8 nm großen Schritte des Kinesin-Mikrotubulus-Komplexes beobachten [7].

Teil II

DIFFERENTIELLE INTERFEROMETRISCHE PARTIKELVERFOLGUNG: VORSTELLUNG DER MESSMETHODE

MESSPRINZIP UND EXPERIMENTELLER AUFBAU

Die hier vorgestellte Messmethode der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung beruht auf der Interferenz zwischen den gestreuten Lichtstrahlen¹ eines Referenzpartikels und eines Testpartikels. Die Phasenbeziehung zwischen den beiden Lichtstrahlen wird im Interferenzbild in eine Strahlungsintensität² transformiert, wodurch sie beobachtbar wird und experimentell leicht zugänglich ist. Bei geeigneter geometrischer Anordnung des Messaufbaus ist die Phasenbeziehung sehr empfindlich gegenüber Änderungen des Abstands der beiden Partikel. Das Referenzpartikel ist in der Objektebene fixiert und das gemessene Interferenzsignal enthält Informationen über die relative Bewegung des Testpartikels zur Referenz. Auf diese Weise werden Drifteffekte eliminiert, die auf beide Partikel gleichermaßen wirken. In diesem Kapitel wird das Prinzip und die experimentelle Implementierung der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung vorgestellt.

Das Herzstück des Messaufbaus bildet ein aufrechtes Lichtmikroskop (Olympus BX51, Abbildungen 3.1 und 3.2), das durch eine Laserdunkelfeldbeleuchtung und ein kompaktes Interferometer am Kameraausgang erweitert worden ist. Zwei Avalanche-Photodioden (APD) messen die Interferenzsignale an den Ausgängen des Interferometers. Um mechanische Schwingungen zu minimieren, befindet sich der gesamte optische Aufbau auf einem pneumatisch gelagerten optischen Tisch (Newport RS4000). Das Mikroskop ist in einem abgedunkelten Plexiglaskasten vor Luftzügen geschützt. Der

-
- 1 Hier sind nicht Lichtstrahlen im Sinne der geometrischen Optik gemeint, also Trajektorien klassischer Lichtteilchen, sondern räumlich begrenzte Wellen wie im Konzept des Gaußstrahls.
 - 2 Als „Strahlungsleistung“ wird im Folgenden die Energie bezeichnet, die pro Zeiteinheit von einer elektromagnetischen Welle transportiert wird. Die Strahlungsleistung der elektromagnetischen Welle, die auf eine Oberfläche trifft, wird, bezogen auf die Größe dieser Fläche, „Strahlungsintensität“ genannt.

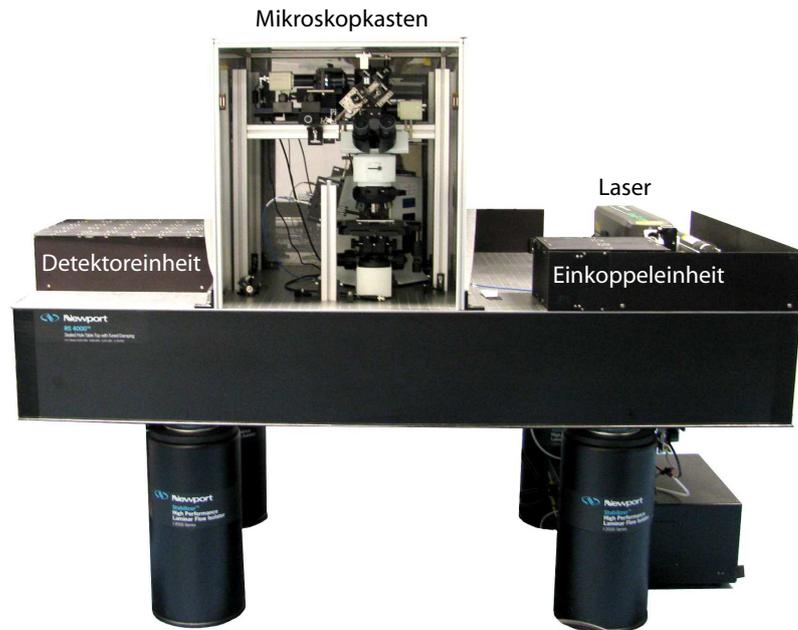


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau auf pneumatisch gelagertem optischen Tisch. Der Laser wird zunächst in eine Singlemode-Glasfaser eingekoppelt und so in den Mikroskopkasten geleitet, wo er als Dunkelfeldbeleuchtung eingesetzt wird. Multimode-Glasfasern leiten das Interferenzlicht in die Detektoreinheit, wo es von Avalanche-Photodioden gemessen wird.

Laser für die Dunkelfeldbeleuchtung und die Detektoren zu Messung der Interferenzsignale befinden sich außerhalb des Kastens. Über Glasfasern werden die jeweiligen Lichtstrahlen in diesen hinein bzw. von diesem heraus geleitet.

3.1 BELEUCHTUNG

Als Lichtquelle dient ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (Coherent Verdi V-10) mit Vakuumwellenlänge $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$, dessen Licht in eine Singlemode-Glasfaser eingekoppelt und in den Mikroskopkasten geleitet wird. Dort mündet das Glasfaserkabel in die Beleuchtungseinheit (Abbildung 3.3), die im Wesentlichen aus einer Kollimatorlinse und einer asphärischen Sammellinse mit numerischer Apertur $NA=0,13$ besteht. Hierdurch wird das Laserlicht im Abstand der Brennweite $f = 22 \text{ mm}$ hinter der Sammellinse auf einen beugungsbegrenzten Bereich von wenigen Mikrometern fokussiert. Die Beleuchtungseinheit wird seitlich vom Objektisch platziert, sodass der Laserstrahl die Objektebene schräg von der Seite trifft und in deren Nähe fokussiert ist. Um diese Anordnung erst zu ermöglichen, wird ein Objektiv (Olympus LM Plan Fl BD; $50\times$; $NA 0,50$) mit großem Arbeitsabstand (10.6 mm) verwendet. Die optischen Achsen des Laserstrahls und des Mikro-

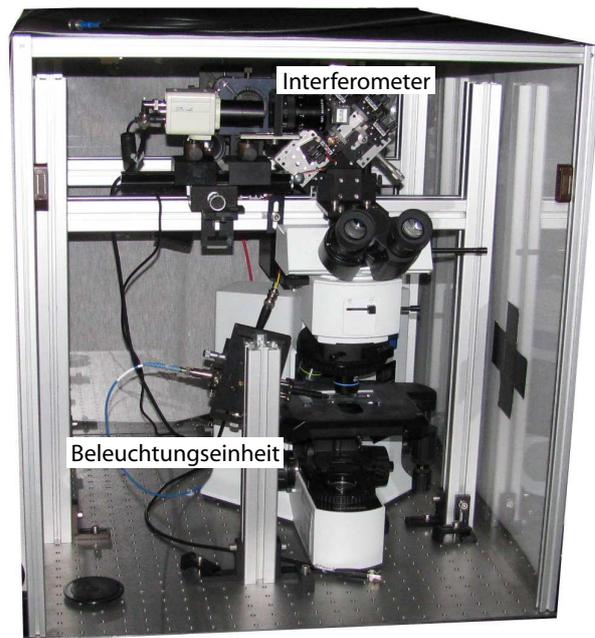


Abbildung 3.2: Aufrechtes Lichtmikroskop mit Laserdunkelfeldbeleuchtung und kompakter Interferometereinheit auf dem Kameraausgang. Der Teil des Strahlengangs, der sich an das Interferometer anschließt (bis zur Einkopplung in die Multimode-Glasfasern), befindet sich auf einem Gerüst aus Aluminiumprofilrohren. Ein abgedunkelter Plexiglkasten schützt diesen Teil des Aufbaus vor Luftzügen.

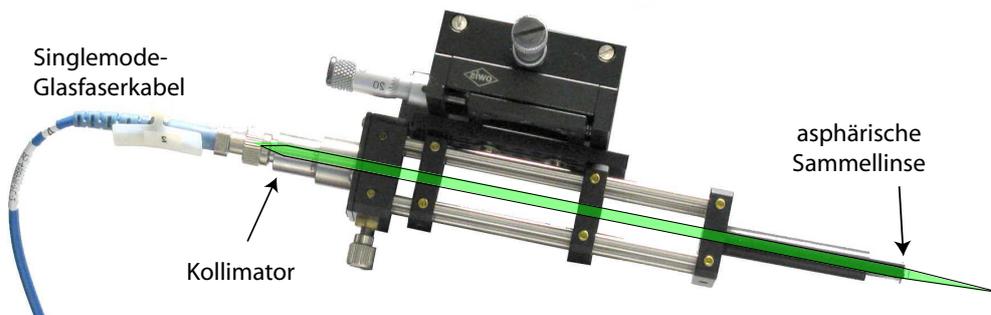


Abbildung 3.3: Beleuchtungseinheit mit eingezeichnetem Strahlengang. Der kollimierte Laserstrahl wird von der asphärischen Sammellinse fokussiert. Der Brennpunkt befindet sich im Abstand von 22 mm hinter der Sammellinse und beleuchtet die Probe in der Objektebene des Mikroskops. Die genaue Positionen der Beleuchtungseinheit und somit des Brennpunkts in der Objektebene kann mit den drei Linearpositionierern eingestellt werden.

skops schließen einen Winkel von $\alpha = 80^\circ$ ein. Die Schnittfläche aus dem kegelförmigen Laserstrahl und der Objektebene bildet einen elliptischen beleuchtenden Lichtfleck. Die Beleuchtungseinheit ist über drei Linearpositionierer an einem Stativ befestigt, sodass die Position des Laserfokus in alle drei Raumrichtungen sehr genau eingestellt werden kann. Durch ein Verfahren der Beleuchtungseinheit entlang der optischen Achse des Laserstrahls kann die Größe des Lichtflecks in der Objektebene variiert werden. Die beiden übrigen Raumrichtungen legen dessen Position in der Objektebene fest.

Die Wahl der Größe des beleuchtenden Lichtflecks ist von entscheidender Bedeutung. Er muss groß genug sein, um sowohl das Referenzpartikel als auch das Testpartikel zu erfassen. Außerdem werden bei der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung an die Beleuchtung neben der Strahlungsintensität vor allem zwei Anforderungen gestellt: Erstens muss eine ausreichende Homogenität der Strahlungsintensität in der Umgebung des Referenz- und Testpartikels gewährleistet sein, sodass die Streulichtmenge sich nicht als Funktion der Partikelposition ändert. Das betrifft neben der zu messenden Bewegung des Testpartikels auch die nicht gänzlich vermeidbare ständige Bewegung des Lichtflecks aufgrund von Schwingungen im Beleuchtungsstativ³. Zweitens muss auch die Geradheit der Wellenfronten gegeben sein. Um eine einfache Beziehung zwischen der Interferenzphase und der Partikelposition zu erhalten, wird bezüglich des beleuchtenden Lichtfeldes vereinfachend von ebenen Wellen ausgegangen (siehe Abschnitt 4.2), was aber in unmittelbarer Nähe der Strahltaile eines Gaußstrahls nicht mehr gilt. Diese beiden Kriterien legen es nahe, das Licht möglichst weit entfernt von der Objektebene zu fokussieren, um einen großen Lichtfleck in der Objektebene zu erhalten. Allerdings führen Glasoberflächen in der Objektebene (wie etwa das Deckgläschen und der Objektträger der Flusskammer bei den Kinesinmessungen in Kapitel 7, siehe Abbildung 7.1) zu Reflexionen, die sich ab einem bestimmten Strahldurchmesser mit dem Primärstrahl überlagern, sodass in dem beleuchtenden Lichtfeld aufgrund von Interferenz Modulationen der Strahlungsintensität auftreten, was der Homogenität entgegenwirkt. Im Experiment hat es sich als guter Kompromiss erwiesen, die Beleuchtungseinheit so zu positionieren, dass der ausgeleuchtete Bereich zentral im Bildfeld liegt und eine Größe in der Objektebene von ca. $300 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ aufweist. Dies bedeutet einen Strahlradius von $30 \mu\text{m}$. Mit einer einfachen geometrischen Betrachtung folgt daraus, bei einer numerischen Apertur der asphärischen Sammellinse von $NA = 0,13$, dass sich der

³ In Abschnitt 4.3 wird gezeigt, dass die Schwankung der Laserleistung, die sich ebenfalls auf die Streulichtleistung auswirkt, das Messergebnis nicht beeinflusst, da sie als Vorfaktor betrachtet werden kann, der auf die Messsignale beider APD gleichermaßen wirkt und bei der anschließenden Auswertung herausgekürzt werden kann. Dies ist jedoch bei Signalschwankungen aufgrund einer Bewegung des inhomogenen Beleuchtungsbereichs im Allgemeinen nicht der Fall.

Fokus in einer Entfernung von etwa $230\ \mu\text{m}$ vom Mittelpunkt des Bildfelds in der Objektebene befindet. Dieser Abstand ist auch gleichzeitig der Krümmungsradius der Wellenfronten, was in der lokalen Umgebung der Partikel die Annahme ebener Wellen rechtfertigt. Bei einer Strahlungsleistung von $30\ \text{mW}$, wie es in den Messungen der Kinesinbewegung in Kapitel 8 der Fall ist, bedeutet dies eine Strahlungsintensität von etwa $20\ \text{kW}/\text{cm}^2$ im Mittelpunkt des Bildfelds.

Diese Beleuchtungsvorrichtung beeinträchtigt nicht die mikroskopeigene Dunkelfeldweißlichtbeleuchtung, sodass beide Beleuchtungsvarianten parallel durchgeführt werden können.

3.2 INTERFEROMETER

Die Funktionsweise des Interferometers - ein modifiziertes Mach-Zehnder-Interferometer [47, 48] - wird anhand von Abbildung 3.4 verdeutlicht. Das Streulicht von Partikeln in der Objektebene wird vom Objektiv gesammelt, kollimiert und von der Tubuslinse in die Zwischenbildebene am Kameraausgang des Mikroskops projiziert. Dabei werden im Folgenden nur die Streulichtstrahlen, die von dem Referenzpartikel und dem Testpartikel ausgehen, betrachtet. In der Zwischenbildebene befindet sich ein Spiegel (M1), der eine Hälfte des projizierten Bildfelds zur Seite ablenkt. Die andere Hälfte passiert M1 ungehindert. Befinden sich die Streulichtstrahlen des Referenzpartikels und des Testpartikels in unterschiedlichen Halbbildern, so werden diese voneinander separiert und gelangen in jeweils einen der beiden Interferometerarme. Dort werden sie über die Spiegel M2 bzw. M3 auf den Strahlteiler gelenkt, sodass sie sich dort überlagern. An beiden Ausgängen des Strahlteilers entsteht ein Interferogramm. Diese sind identisch bis auf einen Phasenversatz von 180° . Anders ausgedrückt, wenn in einem der beiden Interferogramme an einer Stelle vollständig konstruktive Interferenz auftritt, dann liegt an der entsprechenden Stelle des anderen Interferogramms vollständig destruktive Interferenz vor. Durch geeignete Justage der Spiegel können die beiden Strahlen so eingestellt werden, dass sich ihre Wellenfronten hinter BS genau decken. Das ist dann der Fall, wenn die beiden virtuellen Bildpunkte P' und R' genau übereinanderliegen und zudem die Ausbreitungsrichtungen der beiden Strahlen übereinstimmen. Jetzt ergeben sich an beiden Ausgängen des Strahlteilers homogene Interferenzbilder, die keine Streifen aufweisen. Die gesamte Strahlungsleistung eines Interferogramms ist in diesem Fall eine Funktion der Phasendifferenz zwischen den beiden überlagerten Streulichtstrahlen und kann mit jeweils einer APD gemessen werden. Dazu werden mit den Sammellinsen L1 und L2 zwei weitere Bildebenen erzeugt, in denen die beiden Lochblenden PH1 und PH2 nur den Teil des Bilds ausschneiden, der die Überlagerung des Referenz- und des Testpartikels enthält. Streulicht von anderen Partikeln in der Objektebene wird geblockt. Hinter PH1 und PH2 wird das Licht jeweils

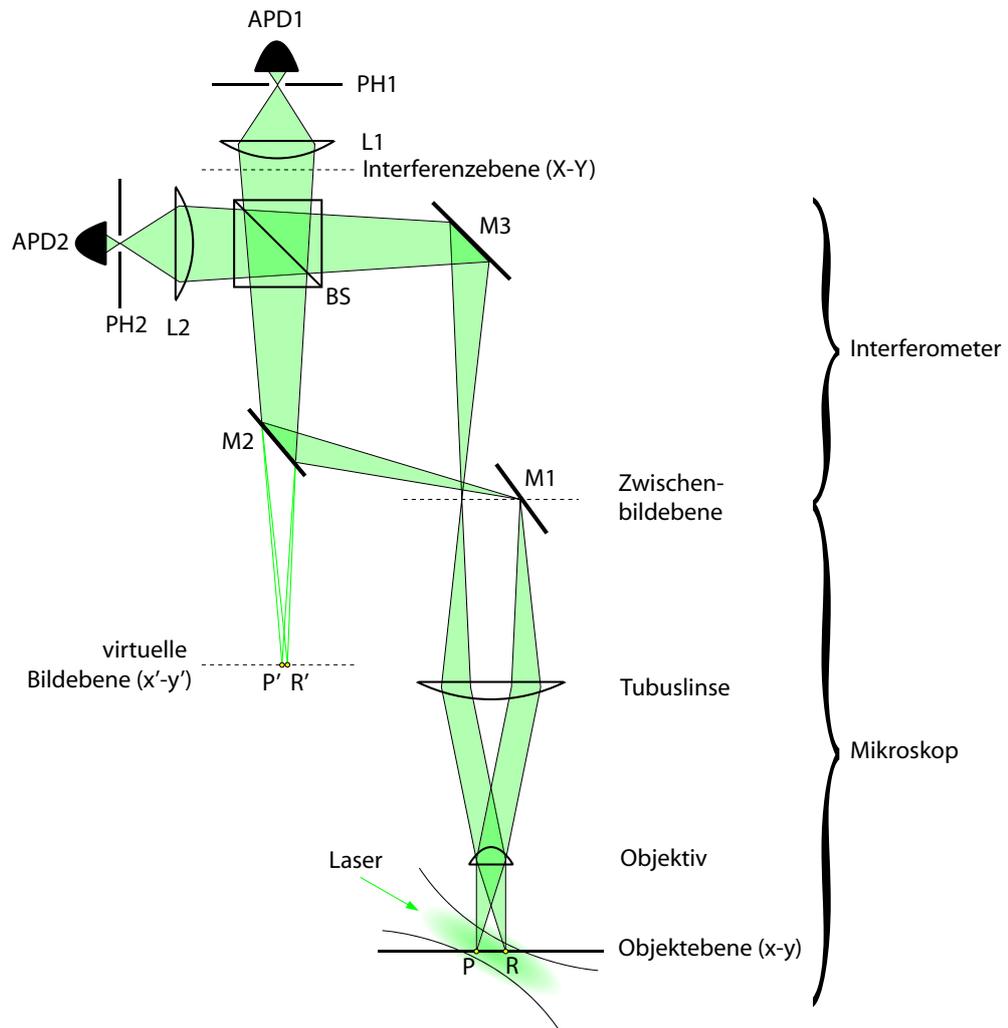


Abbildung 3.4: Schema des experimentellen Aufbaus zu differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung. Ein Laserstrahl ($\lambda_0 = 532\text{nm}$, $P_0 = 30\text{mW}$) beleuchtet das Objekt in Dunkelfeldanordnung. Der Spiegel M1 halbiert die Zwischenbildebene, sodass die Streulichtstrahlen des Referenzpartikels R und des Testpartikels P separiert werden und in die beiden Interferometerarme gelangen. Am Strahlteiler BS werden sie wieder überlagert. Die Strahlungsleistung der beiden entstehenden Interferogramme wird von den Avalanche-Photodioden APD1 und APD2 gemessen. Die Sammellinsen L1 und L2 erzeugen weitere Bildebenen, in denen die Lochblenden PH1 und PH2 den Teil des Bildes ausschneiden, der das Referenzpartikel und das Testpartikel enthält. Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

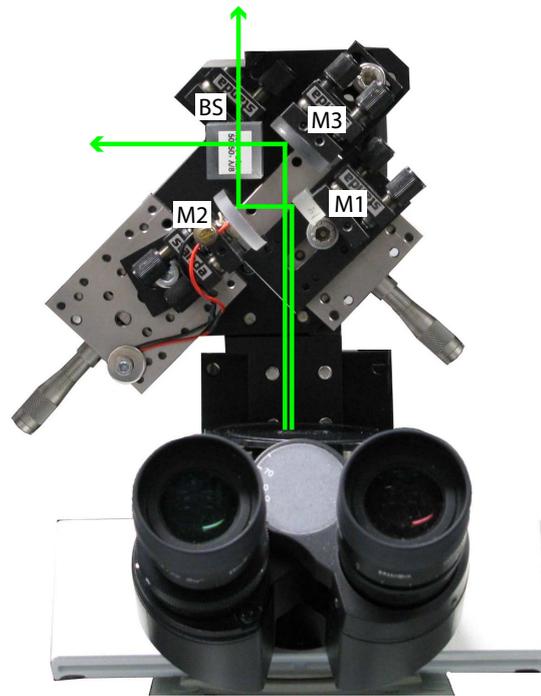


Abbildung 3.5: Kompakte Interferometereinheit, die auf dem Kameraausgang des Mikroskops installiert ist. Der Spiegel M2 ist an einem Piezoelement befestigt, durch das dieser zu Kalibrierungszwecken (siehe Abschnitt 4.3) minimal vor und zurück bewegt werden kann. Die Strahlengänge des Streulichts von Referenzpartikel und Testpartikel sind schematisch eingezeichnet.

in eine Multimode-Glasfaser eingekoppelt, durch die es aus dem Mikroskopkasten zu der Detektoreinheit gelangt, in der sich die APD befinden⁴. Zu Justagezwecken kann anstelle der Lochblende PH2 eine Kamera platziert werden.

Der Teil des Strahlengangs vom Spiegel M1 bis zum Strahlteiler des Interferometers ist besonders empfindlich gegen mechanische Störungen, da hier die beiden Strahlen des Test- und des Referenzpartikels getrennt voneinander verlaufen. Eine mechanische Verformung des Aufbaus in diesem Bereich, wie es bei Vibrationen der Fall ist, kann zu Änderungen der optischen Weglängen der beiden Pfade führen, was sich in einer Phasenänderung in den Interferogrammen niederschlägt und im Allgemeinen nicht von der eigentlichen Messgröße, der Relativbewegung zwischen Test- und Referenzpartikel, unterschieden werden kann. Dieser Teil des Aufbaus stellt besonders hohe Anforderungen an die mechanische Stabilität. Aus diesem Grunde ist das Interferometer als kompakte Einheit konzipiert worden, die direkt auf den Kameraausgang des Mikroskops aufgesetzt werden kann

⁴ Die Multimode-Fasern samt der Optik, die zum Einkoppeln benötigt wird und das aus den Glasfasern austretende Licht auf die empfindlichen Flächen der APD abbildet, ist in Abbildung 3.4 nicht mit eingezeichnet.

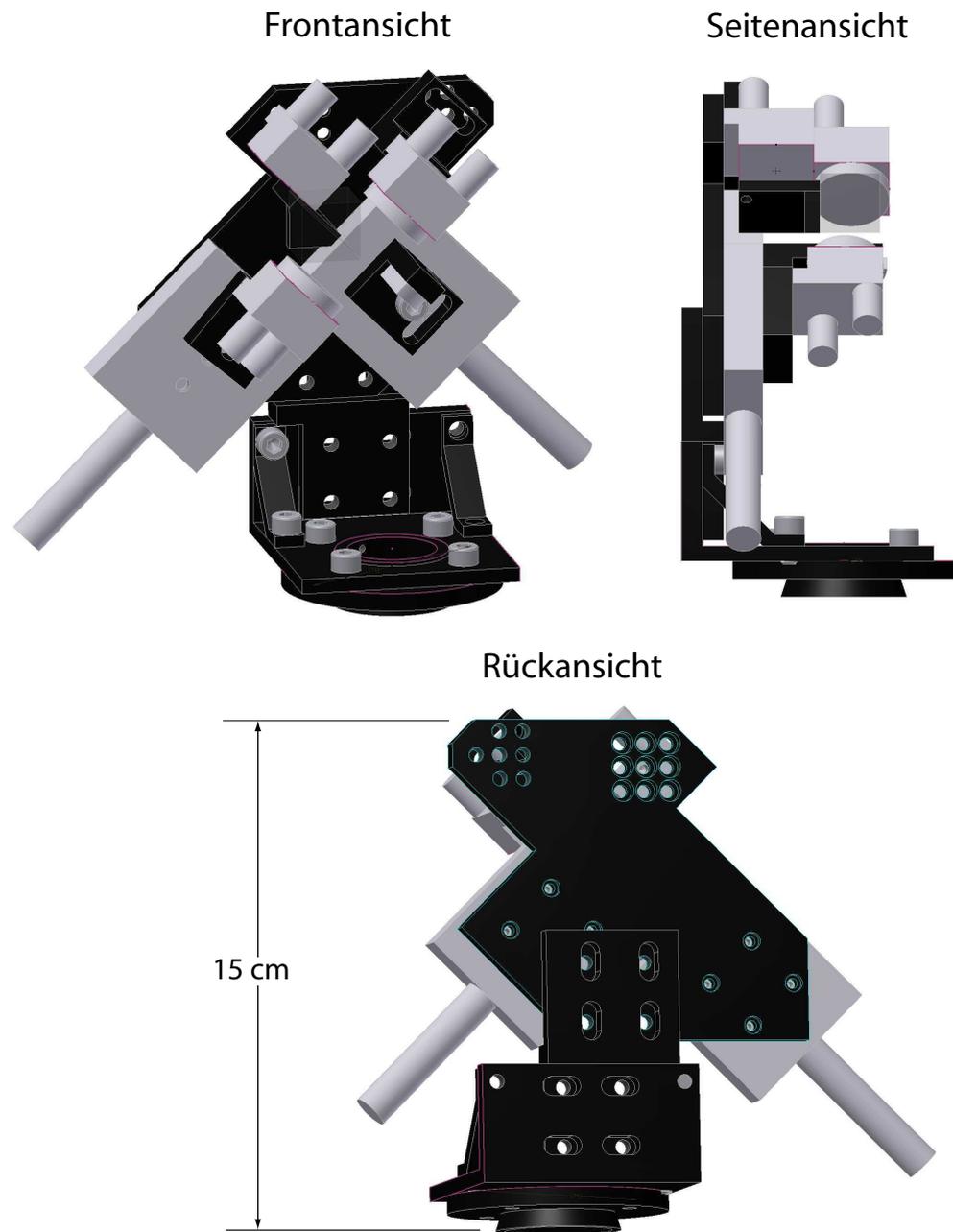


Abbildung 3.6: 3D-Konstruktionszeichnung des Interferometersaufsatzes. Die schwarzen Teile wurden eigens für diesen Aufbau angefertigt, bei den hellgrauen Teilen handelt es sich um handelsübliche Komponenten wie winkelverstellbare Spiegelhalter und Linearpositionierer.

(Abbildung 3.5). Diese empfindliche Interferometereinheit berührt ausschließlich das Mikroskopstativ, um die Übertragung von Vibrationen vom übrigen Aufbau zu vermeiden. Die Teile des Aufbaus hinter dem Strahlteiler des Interferometers (ab den Sammellinsen L1 und L2 bis zur Einkopplung in die Multimode-Glasfasern) befinden sich auf einem separaten Gerüst aus Aluminiumprofilrohren, welches das Mikroskopstativ nicht berührt. Hier ist der Aufbau mechanisch nicht mehr so sensibel, da Bewegungen dieser optischen Komponenten beide Teilstrahlen gleichermaßen betreffen und somit keine Auswirkung auf die Phase der Interferogramme haben. Abbildung 3.6 zeigt eine 3D-Konstruktionszeichnung der Interferometereinheit in drei verschiedenen Ansichten. Sie besteht im Wesentlichen aus einer Aluminiumgrundplatte mit passenden Gewindebohrungen, auf der die Halter für die benötigten optischen Komponenten befestigt sind. Ein Linearpositionierer trägt den Spiegel M1, ein zweiter einen winkelverstellbaren Spiegelhalter mit dem Spiegel M2. Zwei weitere Spiegelhalter, ebenfalls winkelverstellbar und direkt auf die Grundplatte montiert, tragen den Spiegel M3 und den Strahlteiler. Die Grundplatte ist über ein Winkelstück mit einem Aufsatz versehen, der über eine konische Klemmvorrichtung auf den Kameraausgang des Mikroskops passt, sodass die Interferometereinheit mit wenigen Handgriffen am Mikroskopstativ befestigt werden kann.

3.3 MESSWERTERFASSUNG

Die Wandlungskette der Strahlungsleistung eines Interferogramms hin zu einem digitalen Wert, der von einem Computer ausgewertet und gespeichert werden kann, ist in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt. Zunächst trifft das Licht des Interferogramms, nachdem es über eine Glasfaser vom Mikroskopkasten in die Detektoreinheit geleitet worden ist, auf die empfindliche Fläche der APD (PerkinElmer C30902SH-DTC), wo ein der Strahlungsleistung proportionaler Strom generiert wird. Eine Vorspannung von -180 V , die in Sperrichtung an die APD angelegt ist, sorgt für die interne Verstärkung des Photostroms durch den Avalanche-Effekt, sodass die Empfindlichkeit der APD etwa 8 A/W beträgt⁵. Der Photostrom wird mit einem Transimpedanzverstärker ($1 \cdot 10^6\text{ V/A}$) in eine Spannung umgewandelt. Sie wird

⁵ Die APD befinden sich in einem selbstgebauten Modul, das verschiedene Messmodi erlaubt. Im Analogmodus wird ein der Strahlungsleistung proportionaler Strom erzeugt. Die interne Verstärkung durch den Avalanche-Effekt kann über die angelegte Vorspannung reguliert werden. Im Photon-Counting-Modus werden einzelne Photonen gezählt, indem für jedes registrierte Photon ein TTL-Spannungspuls ausgegeben wird, der von einem elektronischen Zähler erfasst werden kann. Dazu wird ein aktiver Löschsaltkreis verwendet [49]. Des Weiteren ist in diesem Fall eine Kühlung der APD notwendig, um die Dunkelzählrate zu reduzieren. Diese wird durch ein im APD-Modul integriertes Peltierelement erreicht. Die in unseren Experimenten verfügbaren Strahlungsleistungen sind jedoch für den Photon-Counting-Modus zu groß, sodass der Analogmodus mit einer Vorspannung von -180 V die geeignete Wahl darstellt.

von einer Messkarte mit AD-Wandlereingängen (Meilhaus ME-4660s) in einem PC gemessen und in einen digitalen Wert übersetzt. Der Messbereich von -10 V bis $+10\text{ V}$ wird in 16 Bit aufgelöst. Bei simultaner Erfassung zweier Messkanäle können Abtastraten von bis zu 250 kHz erreicht werden. Die Steuerung und Messwerterfassung erfolgt mit LabVIEW und Messsignale werden in Echtzeit ausgewertet (gemäß Abschnitt 4.3). So können während der Messung die Partikelbewegung und wichtige Kontrollgrößen, wie z.B. die Standardabweichung und das Signal-Rausch-Verhältnis der Stromsignale sowie das Leistungsspektrum der Partikelbewegung, auf dem Computerbildschirm verfolgt werden.

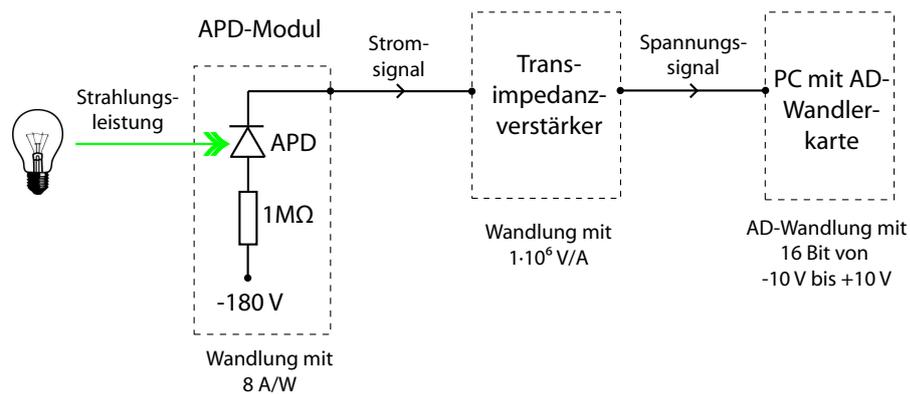


Abbildung 3.7: Schema der elektronischen Messwerterfassung.

4

AUSWERTUNG DER INTERFEROGRAMME

Die beiden Interferogramme am Interferometerausgang enthalten, kodiert in ihrer Phase, die Information über die Partikelbewegung. Dieses Kapitel erklärt, wie diese Information aus den Messwerten gewonnen wird. Zunächst wird das Zustandekommen der Interferogramme und ihr Erscheinungsbild beschrieben. Anschließend erfolgt eine Herleitung der Beziehung zwischen der Interferenzphase und der Partikelposition. Die Rekonstruktion der Interferenzphase und schließlich der Partikelbewegung aus den Messwerten der beiden APD wird behandelt, bevor abschließend eine Betrachtung der Reichweite der Partikelbewegung gemacht wird, innerhalb derer die Messmethode der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung zu präzisen Ergebnissen führt.

4.1 FORM DER INTERFEROGRAMME

Die Streulichtstrahlen, die am Strahlteiler überlagert werden und die Interferogramme formen, können näherungsweise als Kugelwellen mit begrenztem Öffnungswinkel $\theta' = \arctan(\tan(\theta)/M)$ betrachtet werden, deren Ursprünge in den virtuellen Partikelpositionen P' und R' liegen (Abbildungen 3.4 und 4.1). θ ist der halbe Öffnungswinkel des Mikroskopobjektivs, M ist die Vergrößerung des Mikroskops. Das macht es leicht, die Form der Interferogramme zu berechnen. Befinden sich P' und R' auf der x' -Achse parallel zur X - Y -Interferenzenebene, so ist die Situation der des klassischen Doppelspaltversuchs ähnlich [50]. Die Verteilung der Strahlungsintensität in den beiden Interferogrammen verläuft dann in der Näherung kleiner Öffnungswinkel kosinusförmig:

$$I_1(X, Y) = \frac{A_1}{2}(1 + \cos(KX + \Phi)) + B_1, \quad (4.1)$$

$$I_2(X, Y) = \frac{A_2}{2}(1 - \cos(KX + \Phi)) + B_2. \quad (4.2)$$

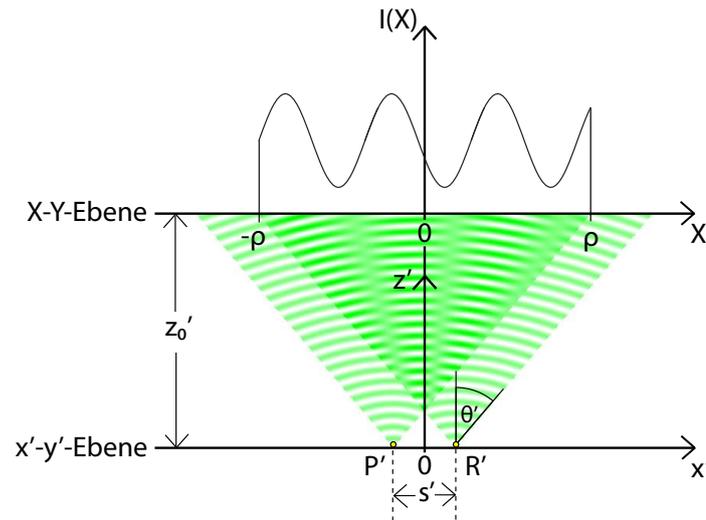


Abbildung 4.1: Ausschnitt des Interferometers aus Abbildung 3.4. Das Erscheinungsbild des Interferogramms kann als Überlagerung zweier Kugelwellen angesehen werden, die von den virtuellen Bildpunkten P' und R' ausgehen. Das entstehende Interferenzbild ist für kleine Öffnungswinkel θ' in erster Näherung kosinusförmig mit einem Streifenabstand, der vom Abstand s' zwischen P' und R' abhängt. Die Phase Φ der Kosinusfunktion ist gleich der Differenz der Phasenwerte der beiden Kugelwellen an ihren Ursprungsorten zu einem bestimmten Zeitpunkt. Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

A_1 und A_2 sind die Intensitätsamplituden, B_1 und B_2 sind die Hintergrundintensitäten. Der Abstand $2\pi/K = \lambda_0 z'_0/s'$ zwischen den Intensitätsmaxima ist eine Funktion des Abstands s' zwischen P' und R' . Dieser kann durch Justage der Spiegel beliebig eingestellt werden, unabhängig vom tatsächlichen Abstand s zwischen den Partikeln in der Objektebene. Wird s' auf null gesetzt, so wird der Abstand zwischen den Intensitätsmaxima unendlich, die Interferogramme erscheinen homogen ohne Interferenzstreifen. λ_0 ist die Vakuumwellenlänge des Lichts, z'_0 ist der Abstand zwischen der virtuellen Bildebene und der Interferenzebene. Die entscheidende Messgröße, aus der bei der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung die Information über die Partikelposition gewonnen wird, ist die Phase Φ der Interferogramme. Sie gibt die seitliche Verschiebung der Kosinusfunktion an. Wichtig ist hierbei der Referenzpunkt $X = 0$, der als Mittelpunkt zwischen den Projektionen von R' und P' entlang z' auf die X - Y -Ebene definiert wird. Φ ist das Argument der Kosinusfunktion an dieser Stelle und gleich dem Phasenunterschied der beiden Kugelwellen an ihren Ursprungsorten P' und R' zu einem bestimmten Zeitpunkt, unabhängig von s' und somit vom Abstand zwischen den Intensitätsmaxima der Interferogramme. Dieser Phasenunterschied ist gleichzeitig die Differenz der Phasenwerte des elektrischen Feldes des beleuchtenden Laserstrahls an den Orten der beiden Partikel in der

Objektebene zu einem bestimmten Zeitpunkt, plus einem konstanten Offset, der auf die unterschiedliche optische Weglänge der beiden Interferometerarme zurückzuführen ist. Bei Kenntnis des Verlaufs der Wellenfronten des Laserstrahls in der Objektebene können direkt Rückschlüsse von einer Phasenänderung der Interferogramme auf eine Änderung des Abstandes zwischen Referenz- und Testpartikel gezogen werden.

4.2 INTERFERENZPHASE UND PARTIKELPOSITION

Der Verlauf der Wellenfronten des beleuchtenden Laserstrahls in der Objektebene ist in Abbildung 4.2 skizziert. Dabei wird die Phase am Ort des Referenzpartikels auf Null gesetzt. Es wird die Annahme gemacht, dass es sich um ebene Wellen handelt. In Abschnitt 3.1 ist erläutert worden, unter welchen Umständen diese Näherung gerechtfertigt ist. Als weitere Randbedingung wird angenommen, dass sich das Testpartikel nur parallel zur Objektebene bewegen darf. Dies ist in vielen Fällen auch gegeben, z.B. bei den Messungen der Kinesinbewegung in Kapitel 7, wo sich das Kinesin entlang eines Mikrotubulus bewegt, das an einer Deckgläschenoberfläche haftet. Unter den genannten Bedingungen ist die Differenz der Phasenwerte Φ des Laserstrahls an den Orten der beiden Partikel eine eindeutige Funktion des Abstands s zwischen den Partikeln. Andererseits kann aber aus dieser Phasendifferenz kein eindeutiger Rückschluss auf den Partikelabstand gezogen werden, da sich die Phase periodisch wiederholt. Einer Phasenänderung $d\Phi$ kann jedoch eindeutig eine Änderung des Partikelabstandes ds zugeordnet werden, sofern $ds \ll \lambda_0$ gilt. Für die Phasenbetrachtung ist dann lediglich der Abstand $\lambda_x = \lambda_0 / \sin(\alpha)$ der Wellenfronten in x -Richtung relevant. Diese Größe ist unabhängig vom Brechungsindex n des umgebenden Mediums, solange n in x -Richtung konstant ist. λ_x bleibt auch dann unverändert, wenn das Licht Schichten parallel zur Objektebene durchläuft, die unterschiedliche Brechungsindizes besitzen und somit die Wellenlänge des Lichts ändern. In Abbildung 4.2 ist solch ein Fall skizziert, in dem das Licht zunächst von Luft in ein Deckgläschen eindringt und schließlich die Partikel erreicht, die sich in wässriger Umgebung an der Deckgläschenoberfläche befinden. Diese Konfiguration entspricht der Flusskammer (Abbildung 7.1), in der die Proben für die Kinesinmessungen präpariert werden. Eine Änderung des Partikelabstandes um $ds = \lambda_x$ würde eine Phasenänderung von $d\Phi = 2\pi$ bedeuten. Folglich ist der Zusammenhang zwischen Abstands- und Phasenänderung

$$d\Phi = \frac{2\pi}{\lambda_x} ds = \frac{2\pi \sin(\alpha)}{\lambda_0} ds. \quad (4.3)$$

Für die Werte $\alpha = 80^\circ$ und $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$ ergibt sich als Umrechnungsfaktor $ds/d\Phi = 86 \text{ nm/rad}$.

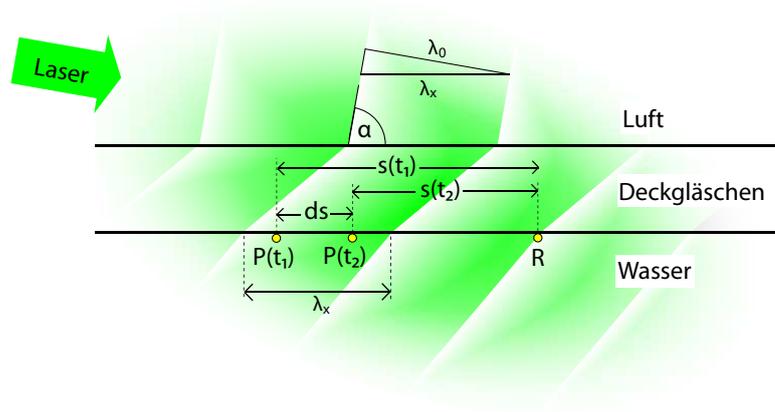


Abbildung 4.2: Wellenfronten des beleuchtenden Laserstrahls in der Objektebene. Die unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft, Glas und Wasser beeinflussen nicht den Abstand $\lambda_x = \lambda_0 / \sin(\alpha)$ zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wellenfronten in x -Richtung. Die Wellenfronten und die Objektebene schließen einen Winkel von $\alpha = 80^\circ$ ein. Aus dieser Geometrie kann eine Beziehung abgeleitet werden zwischen der Verschiebung ds des Testpartikels relativ zum Referenzpartikel und der Differenz der Phasenwerte $d\Phi$ des beleuchtenden Laserstrahls an den beiden Partikelorten zu einem bestimmten Zeitpunkt. Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

4.3 PHASENREKONSTRUKTION

In Abschnitt 4.1 ist die Interferenzphase Φ als Argument der Kosinusfunktion der Intensitätsverteilung der Interferogramme bei $X = 0$ definiert worden. Im Experiment werden die Interferogramme jedoch nicht mit Multipixelsensoren als Bilder aufgenommen, sodass deren Intensitätsverläufe bekannt wären, sondern die gesamte Strahlungsleistung eines Interferogramms wird mit einer einzigen APD erfasst. Um Φ für solch eine Messung zugänglich zu machen, muss das Interferometer so justiert werden, dass die virtuellen Partikelpositionen P' und R' übereinander liegen. Die Interferenzbilder sind dann homogene Scheibchen mit Radius $\rho = z'_0 \tan(\theta')$ ohne Interferenzstreifen, deren Helligkeit eine Funktion von Φ ist (vgl. Abbildung 7.5A und 7.5B). Die Strahlungsleistung der Interferogramme kann als Integral der Intensitätsverteilung der Interferenzbilder über deren kreisförmige Fläche angesehen werden. Die von den APD gelieferten Stromsignale sind der Strahlungsleistung proportional und hängen wieder kosinusförmig von Φ ab:

$$S_1(\Phi) = \chi(t) \left(\frac{a_1}{2} (1 + \cos(\Phi)) + b_1 \right), \quad (4.4)$$

$$S_2(\Phi) = \chi(t) \left(\frac{a_2}{2} (1 - \cos(\Phi)) + b_2 \right). \quad (4.5)$$

a_1 und a_2 sind die Amplituden der Stromsignale, b_1 und b_2 sind die Hintergrundsignale. Diese Signalparameter hängen von der Form, also dem

Streifenabstand der Interferogramme, ab. Sind die Interferogramme homogen ($K = 0$), so sind die Amplituden maximal und die Hintergrundsignale minimal. $\chi(t)$ ist ein dimensionsloser Faktor, der die zeitliche Schwankung der Laserleistung beschreibt¹.

Die Phasendifferenz Φ kann aus den gemessenen Stromsignalen wie folgt rekonstruiert werden:

$$\hat{\Phi} = \arccos \left(\frac{(a_2 + 2b_2)S_1 - (a_1 + 2b_1)S_2}{a_2S_1 + a_1S_2} \right). \quad (4.6)$$

Hier ist zu erwähnen, dass dies nicht die einzige Möglichkeit ist, um aus den beiden Messsignalen die Phase zu rekonstruieren. So liefert auch der Arkuskosinus der Differenz der beiden Signale, oder auch der Arkuskosinus nur eines der beiden Signale - jeweils normiert mit den entsprechenden Signalparametern - einen Phasenwert. Im Prinzip genügt bereits die Messung nur eines der beiden Interferogramme zur Ermittlung der Phase. Jedoch erweist sich die hier vorgestellte Phasenrekonstruktion als sehr vorteilhaft, da zum einen durch die Messung beider Interferogramme das gesamte verfügbare Signal genutzt wird und zum anderen durch die Quotientenbildung $\chi(t)$ effektiv eliminiert wird. Der rekonstruierte Phasenwert ist somit unempfindlich gegen Schwankungen der Laserleistung. Dies wird in Abschnitt 5.3 demonstriert.

Die Signalparameter a_1 , a_2 , b_1 und b_2 müssen für die Phasenrekonstruktion bekannt sein. Sie werden in einem Kalibrierdurchlauf vor der eigentlichen Messung bestimmt, indem ein Piezoaktuator den Spiegel M2 im Interferometer um wenige Mikrometer vor und zurück bewegt. Das Interferometer ist dabei schon für ein Partikelpaar justiert, das während des Kalibrierdurchlaufs ruht. Durch die Bewegung des Spiegels wird die Interferenzphase über den gesamten Wertebereich $0 \dots 2\pi$ durchmoduliert, sodass die gemessenen Stromsignale die Maximal- und Minimalwerte überschreiten, die den Phasenwerten $\Phi = 0$ und $\Phi = \pi$ entsprechen. Diese werden vom Messprogramm erfasst und aus ihnen die Signalparameter gewonnen. Die Parameter b_1 und b_2 sind die jeweiligen Minimalwerte der beiden Stromsignale, a_1 und a_2 sind jeweils die Differenzen zwischen Maximal- und Minimalwert.

Eine Einschränkung dieser Phasenrekonstruktion aus zwei um 180° phasenverschobenen Interferenzsignalen ergibt sich aus der Begrenzung des Wertebereichs der Arkuskosinusfunktion auf das Intervall $0 \dots \pi$. So liefert Gleichung 4.6 für eine Interferenzphase Φ aus dem Intervall $0 \dots \pi$ das gleiche Rekonstruktionsergebnis $\hat{\Phi}$ wie für die Interferenzphase $2\pi - \Phi$, sodass das Vorzeichen der Bewegungsrichtung nicht bestimmt werden kann. Des Weiteren kann, sobald die Stromsignale eine Extremstelle bei $\Phi = 0$ oder $\Phi = \pi$

¹ Die Schwankung der Laserleistung schlägt sich natürlich in gleicher Weise bereits in der Intensitätsverteilung der Interferogramme nieder. $\chi(t)$ wurde in den Gleichungen 4.1 und 4.2 jedoch nicht explizit als Vorfaktor eingeführt, da seine Bedeutung bzw. Eliminierung aus den rekonstruierten Phasenwerten erst in diesem Abschnitt zum Tragen kommt.

erreichen, allein aus den Messwerten nicht mehr ersehen werden, ob an diesem Punkt ein Vorzeichenwechsel der Bewegungsrichtung stattfindet oder nicht. Grundsätzlich kann diese Einschränkung jedoch durch eine Quadratur der Messsignale aufgehoben werden, indem zusätzliche Interferenzsignale erfasst werden, die um 90° phasenverschoben sind. Um dies zu erreichen kann der vorhandene Messaufbau unter Verwendung von $\lambda/2$ - und $\lambda/4$ -Plättchen so erweitert werden, dass das Licht in einem Interferometerarm zirkular polarisiert ist und in dem anderen diagonal [51]. Eine jeweilige Trennung der beiden hinter dem Strahlteiler BS erzeugten Interferogramme durch zwei zusätzliche polarisierende Strahlteiler in vertikale und horizontale Polarisationsrichtung ergibt insgesamt vier Interferogramme, die jeweils um 90° gegeneinander phasenverschoben sind. Wird die Strahlungsleistung jedes Interferogramms mit einer APD gemessen, so kann aus den vier erhaltenen Interferenzsignalen die Partikelbewegung mit korrekter Richtung auch bei Überschreiten der Phasenwerte $\Phi = 0$ und $\Phi = \pi$ rekonstruiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf diese Erweiterung jedoch verzichtet, da die oben genannten Einschränkungen der zweikanaligen Messung weitestgehend unproblematisch sind, wenn es sich um Probensysteme handelt, deren Bewegung ohnehin durch bekannte Randbedingungen limitiert ist. Die Bewegung von Kinesin entlang eines Mikrotubulus (Kapitel 7) ist dadurch eingeschränkt, dass sie unidirektional stattfindet und Vorzeichenwechsel der Bewegungsrichtung nicht auftreten. Bei diesem Probensystem ist die Kenntnis der Bewegungsrichtung von untergeordneter Bedeutung.

4.4 REICHWEITE DER PARTIKELBEWEGUNG

Bei der oben beschriebenen Rekonstruktion der Interferenzphase aus den Messwerten der APD wird die Annahme gemacht, dass sich bei einer Bewegung des Testpartikels relativ zum Referenzpartikel um die Strecke ds nur die Interferenzphase Φ gemäß Gleichung 4.3 ändert, nicht aber die Form der Interferogramme im Sinne des Interferenzstreifenabstandes $2\pi/K$ in den Gleichungen 4.1 und 4.2. Diese Näherung ist allerdings ab einer gewissen zurückgelegten Distanz nicht mehr gültig, da sich mit dem Partikelabstand s gleichzeitig auch der Abstand s' zwischen den virtuellen Partikelpositionen ändert, was zu einer Veränderung des Interferenzstreifenabstands führt (siehe Abbildung 4.1). Sind die Interferogramme anfänglich homogen, treten nach einer hinreichend großen Änderung des Partikelabstands Interferenzstreifen auf, deren Abstand mit der zurückgelegten Distanz kleiner wird. Das hat Auswirkungen auf die Parameter a_1 , a_2 , b_1 und b_2 der Stromsignale. Die Amplituden werden kleiner und die Hintergrundsignale größer. Somit wird auch die Phasenrekonstruktion nach Gleichung 4.6 fehlerhaft, bis schließlich überhaupt keine Modulation der Strahlungsintensität mehr messbar ist.

Es soll nun diskutiert werden, wie weit sich das Testpartikel gegenüber dem Referenzpartikel bewegen darf, ehe die Verzerrung der Phasenrekon-

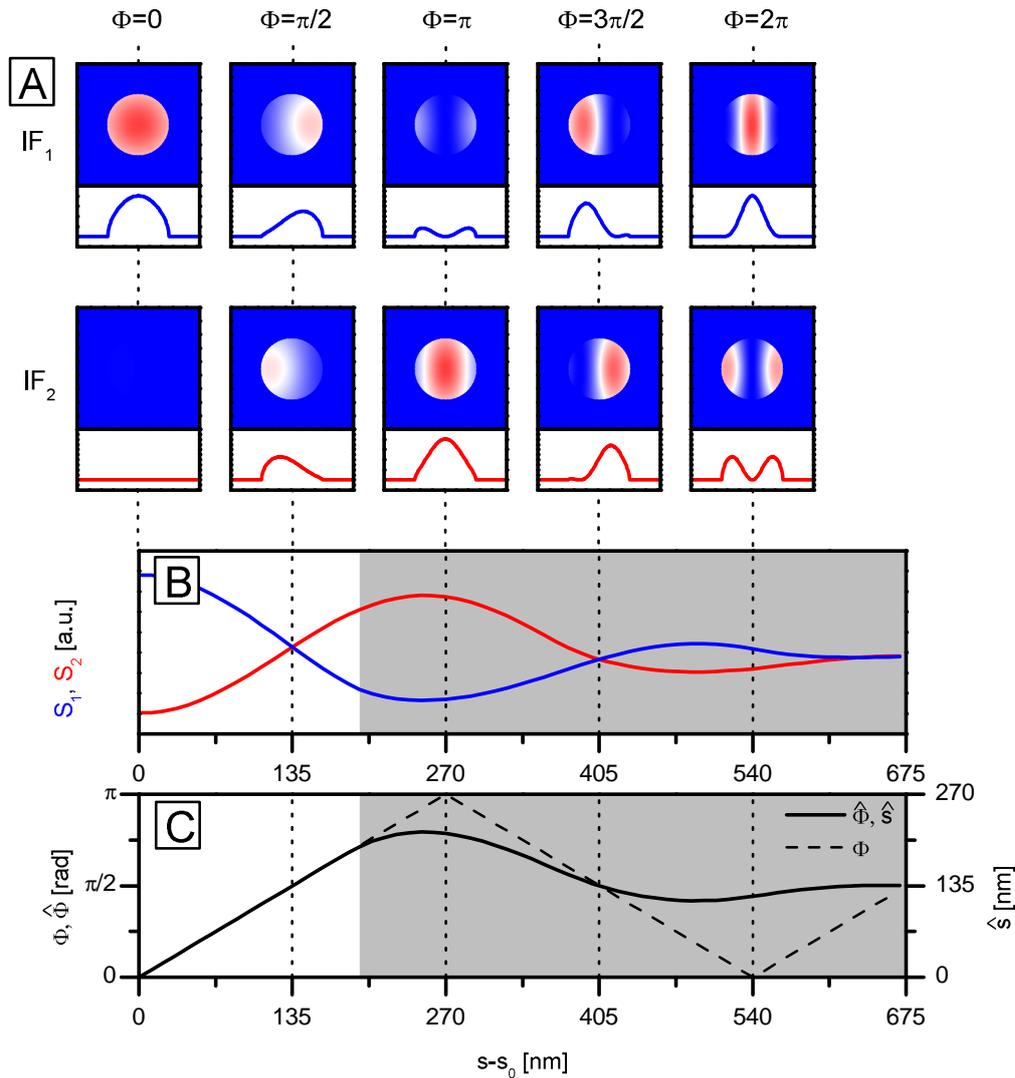


Abbildung 4.3: Simulation der Entwicklung der Interferogramme bei gleichförmiger Partikelbewegung zur Untersuchung der Reichweite des Messverfahrens. (A) Simulierte Interferogramme und Intensitätsprofile an den beiden Strahlteilerausgängen (IF₁ und IF₂) als Überlagerung zweier Kugelwellen mit kreisförmiger Blende für verschiedene zurückgelegte Partikeldistanzen $s - s_0$. (B) Simulation der entsprechenden Stromsignale der beiden APD als Funktion von $s - s_0$. (C) Gemäß Gleichung 4.6 und 4.7 rekonstruierte Interferenzphase $\hat{\Phi}$ und Partikelposition \hat{s} (durchgezogene Linie). Die tatsächlichen Phasenwerte, in das Intervall $0 \dots \pi$ hineingefaltet, sind gestrichelt gezeichnet. Im grau hinterlegten Bereich ist die Abweichung der rekonstruierten von der tatsächlichen Partikelposition größer als 1 nm.

struktions nach der oben beschriebenen Methode merklich wird. Dazu werden die Interferogramme für ein sich bewegendes Testpartikels simuliert und daraus wiederum die Phasenrekonstruktion durchgeführt. Die Interferogramme werden nach Abbildung 4.1 als Überlagerung zweier Kugelwellen in der Interferenzebene berechnet, die auf eine Kreisfläche mit Radius $\rho = z'_0 \tan(\theta')$ beschränkt ist. Die Ursprungsorte der beiden Kugelwellen haben in x' -Richtung den Abstand s' . Im experimentellen Aufbau beträgt der Öffnungswinkel der Streulichtstrahlen ab der virtuellen Bildebene $\theta' = \arctan(\tan(\theta)/M) = 0,7^\circ$. Hier ist $\theta = 30^\circ$ der Öffnungswinkel des Objektivs mit numerischer Apertur $NA = 0,5$ und $M = 50$ die Vergrößerung des Mikroskops. Der Abstand zwischen der virtuellen Bildebene und der Interferenzebene wird zu $z'_0 = 10$ cm gewählt, sodass der Radius der kreisförmigen Interferogramme $\rho = 1,2$ mm beträgt. Zunächst werden die Interferogramme für $s' = 0$ berechnet und anschließend s' sukzessive erhöht. Dabei entspricht eine Änderung ds des Partikelabstands in der Objektebene einer Änderung des Abstands zwischen den virtuellen Partikelpositionen $ds' = M \cdot ds$. Als Anfangsphase für $s' = 0$ wird $\Phi = 0$ gesetzt, sodass die beiden Kugelwellen phasengleich sind, was jedoch eine willkürliche Wahl ist. Im Experiment kann die Anfangsphase jeden beliebigen Wert annehmen. Der Phasenunterschied der beiden Kugelwellen an ihren Ursprungsorten wird nach einer zurückgelegten Distanz ds um $d\Phi$ angepasst ($ds/d\Phi = 86$ nm/rad, Gleichung 4.3).

In Abbildung 4.3A sind die Interferogramme für verschiedene zurückgelegte Distanzen $s - s_0$ mit den entsprechenden Intensitätsprofilen zu sehen. $s - s_0$ ist in 4.3B und 4.3C auch auf den Abszissenachsen aufgetragen, die jeweiligen Interferogramme sind mit den entsprechenden Stellen auf diesen Achsen durch gestrichelte Linien verbunden. Dabei ist s der Partikelabstand in x -Richtung und s_0 der Anfangspartikelabstand, dem durch die Justage des Interferometers die homogenen Interferogramme, also $s' = 0$, entsprechen. Die beiden Reihen enthalten die gegenphasigen Interferogramme der beiden Strahlteilerausgänge (IF₁ und IF₂). In der ersten Spalte, bei $s - s_0 = 0$, sind die Interferogramme noch homogen. Die folgenden Spalten enthalten die Interferogramme nach jeweils einer zurückgelegten Distanz des Testpartikels von 135 nm, was bei der Geometrie des experimentellen Aufbaus einer Phasenänderung von $d\Phi = \pi/2$ entspricht (siehe Abschnitt 4.2). Bereits bei $s - s_0 = 270$ nm bzw. $\Phi = \pi$ ist eine Formänderung der Interferogramme erkennbar. So ist das Interferogramm am ersten Strahlteilerausgang (IF₁) nicht komplett dunkel, wie etwa IF₂ bei $s - s_0 = 0$, sondern hat an den Rändern helle Säume. Die Strahlungsleistung des Interferogramms bei $s - s_0 = 270$ nm, die von APD1 gemessen wird, ist somit nicht identisch mit der bei $s - s_0 = 0$ von APD2 gemessenen Strahlungsleistung, obwohl hier jeweils die gleiche Interferenzphase vorliegt. Dies ist auch in Abbildung 4.3B zu beobachten. Hier sind die über die gesamte kreisförmige Fläche integrierten Interferogramme, also die den Stromsignalen S_1 und S_2 der

beiden APD entsprechenden Werte, als Funktion der zurückgelegten Distanz des Testpartikels dargestellt. Anstelle eines kosinusförmigen Verlaufs zeigt sich eine Oszillation mit abnehmender Amplitude. In Abbildung 4.3C wird schließlich als durchgezogene Linie die aus S_1 und S_2 rekonstruierte Phase $\hat{\Phi}$ gezeigt, die mit Hilfe der Signalparameter ermittelt worden ist, die bei $s - s_0 = 0$ gelten. Die rekonstruierte Partikelposition \hat{s} , die auf der rechten Ordinatenachse von Abbildung 4.3C aufgetragen ist, kann aus $\hat{\Phi}$ nach Integration der Gleichung 4.3 mit Startwert $\Phi(s = 0) = 0$, also

$$\hat{s}/\hat{\Phi} = 86 \text{ nm/rad}, \quad (4.7)$$

für $\alpha = 80^\circ$ und $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$, gewonnen werden. Zum Vergleich ist die tatsächliche Phase Φ , die als Phasenunterschied der beiden Kugelwellen zu Beginn in die Simulation eingeflossen ist, gestrichelt eingezeichnet. Da die Phasenrekonstruktion $\hat{\Phi}$ aufgrund des begrenzten Wertebereiches der Arkuskosinusfunktion nur Werte innerhalb des Intervalls $0 \dots \pi$ liefert (siehe Abschnitt 4.3), wurde die Kurve des Φ -Verlaufs dementsprechend in diesen Wertebereich zurückgefaltet, um eine bessere Vergleichbarkeit der wahren und der rekonstruierten Phasenwerte zu gewährleisten.

Aus Abbildung 4.3C folgt, dass bis zu einer zurückgelegten Distanz von ca. 200 nm die Werte von Φ und $\hat{\Phi}$ sehr gut übereinstimmen, die Verzerrung der rekonstruierten Partikelposition $Bias(\hat{s}) = 86 \text{ nm/rad} \cdot (\hat{\Phi} - \Phi)$ ist hier kleiner als 1 nm. Von da an wird der Fehler aufgrund der veränderten Form der Interferogramme jedoch signifikant. Dieses Ergebnis bezieht sich lediglich auf eine Anfangsphase $\Phi(s = 0) = 0$. Bei anderen Anfangsphasenwerten ist zu beachten, dass bereits nach kürzeren zurückgelegten Distanzen als 200 nm die Phasenwerte $\Phi = 0$ oder $\Phi = \pi$ erreicht werden, an denen die Stromsignale der APD ihre Extremwerte erreichen. An diesen Stellen ist Vorsicht bei der Phasenrekonstruktion geboten, da sich hier zum einen die Formänderung der Interferogramme in einer besonders großen Verzerrung niederschlägt, zum anderen an den Extremstellen die Möglichkeit eines Vorzeichenwechsels der Bewegungsrichtung besteht, der aber allein aus den Messwerten nicht identifiziert werden kann und somit zu einer Mehrdeutigkeit der rekonstruierten Phase führt (Abschnitt 4.3). Simulationen mit Anfangsphasenwerten $\Phi(s = 0) \neq 0$ ergeben, dass ungefähr 25 nm vor Erreichen eines Signalextrimums die Verzerrung größer als 1 nm wird. Als Faustregel kann festgehalten werden, dass die Rekonstruktion von Phasen- und somit von Positionsänderungen des Testpartikels bis zu einer zurückgelegten Distanz von 200 nm, oder aber bis 25 nm vor Erreichen einer Extremstelle der Interferenzsignale mit einer Verzerrung von weniger als 1 nm genau ist. In Abbildung 4.3 ist der Messabschnitt außerhalb dieses verzerrungsfreien Bereichs grau hinterlegt. In Abbildung 7.6 wird diese Faustregel auf eine reale Messreihe zur Bestimmung des verzerrungsfreien Bereichs angewendet.

Die Reichweite der verzerrungsfreien Phasen- und Positionsrekonstruktion kann prinzipiell dadurch vergrößert werden, dass der Öffnungswinkel θ' der Streulichtstrahlen verkleinert wird. Dadurch wird der Radius ρ der Interferenzspots in der X - Y -Interferenzebene bei gleichbleibendem Interferenzstreifenabstand kleiner (siehe Abbildung 4.1), die Homogenität der Interferogramme geht dann erst bei größerem Abstand s' zwischen den virtuellen Bildpunkten P' und R' verloren. Die Verkleinerung des Öffnungswinkels kann durch eine geeignete Blende zwischen Objektiv und Tubuslinse erzielt werden. Jedoch geht diese Vergrößerung der Reichweite auf Kosten der Signalstärke und somit, abhängig von der zur Verfügung stehenden Streulichtleistung, der Ortsauflösung. Es bedarf eines brauchbaren Kompromisses. Die Quadratur der Interferenzsignale nach der in Abschnitt 4.3 beschriebenen Methode stellt eine weitere Möglichkeit dar, die Reichweite der Messung zu erhöhen. Die Interferenzphase kann dann auch bei $\Phi = 0$ und $\Phi = \pi$ verzerrungsfrei rekonstruiert werden. Des Weiteren kann die zusätzlich verfügbare Information aus vier Messkanälen dazu genutzt werden, Veränderungen der Signalparameter zu kompensieren. Formänderungen der Interferogramme verursachen dann keine Verzerrung der Phasenrekonstruktion mehr. Die Reichweite wird in diesem Fall lediglich dadurch begrenzt, dass die Amplituden der Stromsignale bei enger werdenden Interferenzstreifen soweit abnehmen, dass das Signal-Rausch-Verhältnis zu klein für eine hinreichend genaue Auswertung ist.

KALIBRIERUNGEN

Erst die hohe räumliche und zeitliche Präzision ermöglichen Messungen auf molekularer Ebene der Biochemie mit Hilfe der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung, die in Teil III präsentiert werden. In diesem Kapitel werden die Orts- und Zeitauflösung anhand von Kalibrierungsmessungen quantifiziert sowie die Unempfindlichkeit der Messmethode gegenüber Mikroskopdrift und Fluktuationen der Laserleistung gezeigt. Zunächst wird jedoch die in Abschnitt 4.2 hergeleitete Beziehung zwischen der Interferenzphase und der Partikelposition experimentell verifiziert.

5.1 KALIBRIERUNG DER PHASE-ORTS-BEZIEHUNG

In Abschnitt 4.2 wurde durch eine geometrische Betrachtung der Wellenfronten des beleuchtenden Laserstrahls in der Objektebene eine Beziehung zwischen einer Änderung $d\Phi$ der Interferenzphase und der entsprechenden Verschiebung ds des Testpartikels relativ zum Referenzpartikel gefunden. Dieser Zusammenhang ist von entscheidender Bedeutung, wenn die Partikelbewegung aus den Messwerten korrekt rekonstruiert werden soll. Aus diesem Grund wird die Abhängigkeit der Interferenzphase vom Partikelabstand nun experimentell überprüft. Eine naheliegende und sehr direkte Möglichkeit für eine solche Kalibrierung wäre, ein Testpartikel um einen bekannten Betrag relativ zum Referenzpartikel zu verschieben, etwa mit Hilfe eines geeichten Piezoaktuators, und die Phasenänderung der Interferogramme zu messen. Hier wird ein Weg verfolgt, die Phase-Orts-Beziehung zu messen, der experimentell wesentlich einfacher umzusetzen und dennoch aussagekräftig ist.

Zunächst werden Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 200 nm (BBInternational) zufällig verteilt auf einem Deckgläschen immobilisiert. Dies wird erreicht, indem ein Tropfen des Kolloids auf der Oberfläche platziert und nach einer Wartezeit von 20 s mit Druckluft weggeblasen wird. Auf der

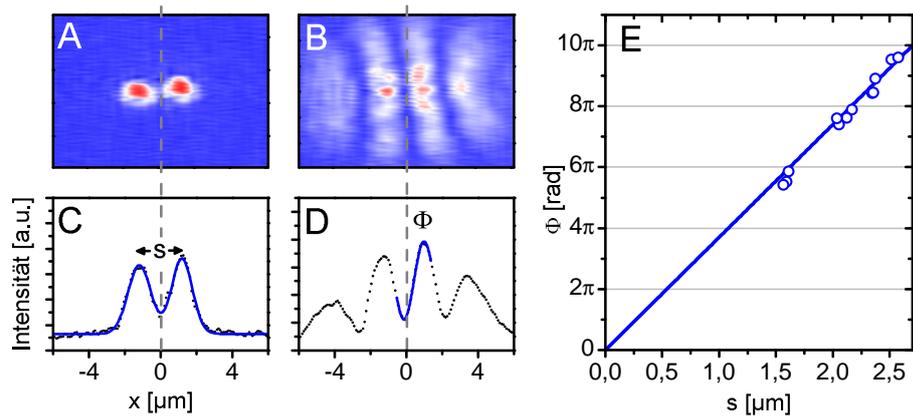


Abbildung 5.1: Scharfes (A) und defokussiertes (B) Bild eines Partikelpaars. Die Helligkeitswerte der Pixelspalten sind jeweils aufsummiert (C und D). Dem Intensitätsprofil des scharfen Bildes wird die Summe zweier Gaußfunktionen angepasst (C), um den Partikelabstand und den Mittelpunkt zu bestimmen. Dem zentralen Bereich des defokussierten Intensitätsprofils wird eine Kosinusfunktion angepasst, wodurch die Phase des Interferenzbildes bestimmt wird. Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

Fläche, die zuvor von dem Tropfen bedeckt war, sind nun die Goldpartikel mit einer mittleren Dichte von ungefähr $1/(100 \mu\text{m}^2)$ statistisch zufällig verteilt. Das Deckgläschen wird kopfüber auf einen Objektträger mit zwei parallelen Streifen doppelseitigen Klebebands gedrückt. Der so entstehende Hohlraum wird mit Wasser gefüllt. Diese Anordnung entspricht einer Flusskammer, in der später die Kinesinmessungen durchgeführt werden (Kapitel 7, siehe Abbildung 7.1).

Unter dem Mikroskop werden Partikelpaare gesucht, die einen Abstand s von wenigen Mikrometern haben und in x -Richtung angeordnet sind. Von jedem Partikelpaar werden zwei Bilder aufgenommen, indem eine Kamera in der Zwischenbildebene anstelle des Spiegels M1 positioniert wird: Ein scharfes Bild (Abbildung 5.1A), bei dem sich der Kamerasensor exakt in der Bildebene befindet, und ein leicht defokussiertes Bild (Abbildung 5.1B). Das scharfe Bild dient der genauen Bestimmung des Abstands und des Mittelpunkts zwischen den beiden Partikeln. Dazu wird ein Intensitätsprofil des Bildes durch Aufsummieren der Helligkeitswerte der einzelnen Pixelspalten erstellt (Abbildung 5.1C), an das die Summe zweier Gaußfunktionen angepasst wird. Die Schwerpunkte der so erhaltenen Gaußfunktionen werden als Partikelpositionen angesehen und liefern den Abstand s mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern. Der Mittelpunkt zwischen den beiden Partikelpositionen wird als Nullpunkt $x = 0$ definiert. Durch die Defokussierung überlagern sich die flächigen Bilder der beiden Partikel auf dem Kamerasensor und es entsteht ein Interferenzmuster. Der Inten-

sitätsverlauf dieses Interferenzmusters stellt, zumindest in dessen Mitte, näherungsweise einen Kosinusverlauf dar (Abbildung 5.1D). Durch Anpassen einer Kosinusfunktion an diesen Bereich des Intensitätsprofils wird die Phase Φ am Mittelpunkt zwischen den beiden Partikeln ermittelt. Analog zu Abbildung 4.1 ist die so ermittelte Phase des Interferogramms gleichzeitig die Phasendifferenz zwischen den beiden Kugelwellen, die dieses Interferogramm formen, und reflektiert somit den Phasenunterschied des beleuchtenden Laserstrahls zwischen den Positionen der beiden Partikel. Für verschiedene Partikelpaare werden s und Φ aufgenommen. In Abbildung 5.1E sind die gemessenen Werte als Kreise dargestellt. Der nach Gleichung 4.3 mit Startwert $\Phi(s = 0) = 0$ erwartete Verlauf ist als durchgezogene Linie eingezeichnet. Der erwartete Verlauf von Φ überschreitet in dieser Darstellung das Intervall $0 \dots 2\pi$, wohingegen die Anpassung der Kosinusfunktion an die Interferogramme lediglich Werte innerhalb dieses Intervalls liefert. Um die gemessenen Phasenwerte mit dem theoretischen Verlauf vergleichbar zu machen, werden geeignete ganzzahlige Vielfache von 2π zu den gemessenen Werten addiert. Aus Gleichung 4.7 folgt für $\alpha = 80^\circ$ und $\lambda_0 = 532 \text{ nm}$, dass sich die Interferenzphase nach einer Zunahme des Partikelabstands um 540 nm zyklisch wiederholt. Daher wird mit Hilfe des zuvor bestimmten Partikelabstands s der Phasenoffset $\text{floor}(s/540 \text{ nm}) \cdot 2\pi$ bestimmt und zu den ermittelten Phasenwerten Φ addiert. *floor* ist hierbei die Abrundungsfunktion, die dem Quotienten die nächstkleinere ganze Zahl zuordnet.

Die gemessenen Werte bestätigen die erwartete Phase-Orts-Beziehung sehr gut. Dabei ist festzuhalten, dass die entscheidende Größe die Steigung der Kurve ist. Der Ordinatenabschnitt bei $s = 0$ ist bei diesen Kalibriermessungen trivialerweise $\Phi = 0$, was jedoch in den Messungen mit Interferometeraufsatz im Allgemeinen nicht der Fall ist. Dort bezieht sich $s' = 0$ auf den Abstand der virtuellen Bildpunkte R' und P' . Die Interferenzphase kann in diesem Fall aufgrund der unterschiedlichen Längen der Interferometerarme jeden beliebigen Wert annehmen.

5.2 ZEITAUFLÖSUNG

Die differentielle interferometrische Partikelverfolgung ermöglicht hohe Zeitaufösungen, da die Interferogramme mit lediglich zwei APD gemessen werden. Die zeitliche Auflösung dieser zweikanaligen Messwerterfassung wird begrenzt durch die Bandbreite der Messelektronik, die von der internen Beschaltung der Transimpedanzverstärker sowie den elektronischen Eigenschaften (z.B. der Kapazität) der APD bestimmt wird. Um den Frequenzgang des Detektor-Verstärker-Systems (Abbildung 3.7) zu vermessen wird ein modulierte Lichtsignal mit einstellbarer Frequenz, aber gleichbleibender Amplitude, auf die APD gerichtet. Für verschiedene Frequenzen wird nun die Amplitude des gemessenen Signals ermittelt. Diese Signalstärke ist in

Abbildung 5.2 in Abhängigkeit von der Frequenz dargestellt. Der so ermittelte Frequenzgang wird auf die bekannte Transimpedanz des Verstärkers bei niedrigen Frequenzen von 10^6 V/A normiert. Die Dämpfung bei hohen Frequenzen sorgt ab etwa 20 kHz für eine Amplitudenabsenkung um einen Faktor $1/\sqrt{2}$ unterhalb der Amplitudenwerte bei niedrigen Frequenzen, was dem gängigen 3 dB-Kriterium als Maß für die Bandbreite entspricht [52]. Die mit diesem Detektor-Verstärker-System erreichbare Zeitauflösung liegt somit bei 50 μ s. Das Nyquist-Shannon-Kriterium ist bei einer Abtastrate von 40 kHz erfüllt [53, 54].

Für die Messungen der Partikelbewegungen steht somit ein Detektorsystem zur Verfügung, das wesentlich höhere Zeitauflösungen erlaubt als herkömmliche Kameras. Im Vergleich zu teuren Hochgeschwindigkeitskameras mit Bildwiederholraten im kHz-Bereich stellen die beiden APD eine kostengünstige Alternative dar.

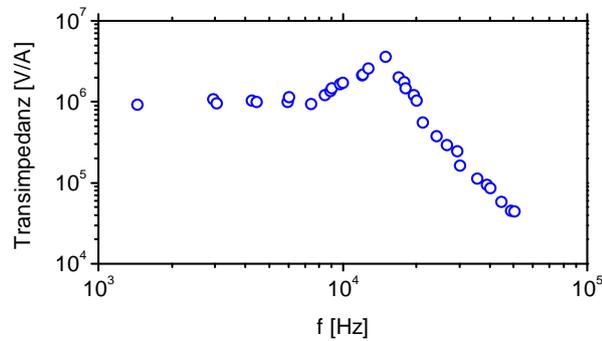


Abbildung 5.2: Frequenzgang der Messelektronik, bestehend aus APD, Transimpedanzverstärkern und AD-Wandlertkarte im PC (siehe Abbildung 3.7). Die Bandbreite beträgt nach dem gängigen 3 dB-Kriterium etwa 20 kHz.

5.3 ORTSAUFLÖSUNG UND DRIFTELIMINIERUNG

Die Ortsauflösung wird von mehreren Faktoren begrenzt, die grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden können: In Instrumentenfehler und Probenfehler. Der Instrumentenfehler resultiert unter anderem aus der begrenzten mechanischen Stabilität des Messaufbaus und dem elektronischen Rauschen der Detektoren samt nachgeschalteter Elektronik. Die mechanische Stabilität ist bei dieser Messmethode von entscheidender Bedeutung, da Bewegungen der optischen Komponenten des Interferometers zu Phasenänderungen in den Interferogrammen führen, die sich nach der Rekonstruktion aus den Messwerten im Allgemeinen nicht von solchen Phasenänderungen unterscheiden lassen, die auf die eigentlich zu messende Relativbewegung zwischen Referenz- und Testpartikel zurückzuführen sind. Um diese Fehlerquelle weitestgehend einzudämmen ist das Interferometer als kompakte, stabile

Einheit konzipiert worden (Abschnitt 3.2). Elektronisches Rauschen wird vor allem von den Detektoren erzeugt. Dabei ist thermisches Rauschen die dominierende Komponente, aber auch die interne Verstärkung der APD kann bei ungeeigneter Wahl der Sperrspannung einen wesentlichen Rauschanteil liefern. Der Photostrom in den APD wird durch den Avalanche-Effekt verstärkt, der durch eine angelegte Sperrspannung von einigen 100 V für eine starke Beschleunigung der erzeugten freien Ladungsträger sorgt, die durch Stoßionisation weitere freie Ladungsträger generieren. Da diese Stoßprozesse statistisch zufällig geschehen, geht mit der Verstärkung des Signals auch ein zusätzliches, verstärktes Schrotrauschen einher [55]. Mit zunehmender interner Verstärkung verbessert sich zunächst das Signal-Rausch-Verhältnis, da bei gleichbleibendem thermischen Rauschen das Signal stärker wird. Ab einem gewissen Verstärkungsgrad sorgt jedoch das zusätzliche verstärkte Schrotrauschen dafür, dass sich das Signal-Rausch-Verhältnis wieder verschlechtert. Der Verstärkungsgrad wird durch die angelegte Sperrspannung bestimmt. Es gibt somit eine ideale Sperrspannung, bei der das Signal-Rausch-Verhältnis maximal ist. Im Experiment wird eine Sperrspannung von -180 V verwendet, was bei den vorhandenen APD einem Multiplikationsfaktor von etwa 20 entspricht. In diesem Fall ist das verstärkte Schrotrauschen wesentlich kleiner als das thermische Rauschen. Als weitere Rauschquellen sind die Transimpedanzverstärker, die AD-Wandlerkarte und das Schrotrauschen der auf die Detektoren treffenden Photonen zu nennen, die allerdings bei den im Experiment vorhandenen Signalstärken und Strahlungsleistungen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Im Gegensatz zum Instrumentenfehler ist der Probenfehler auf Bewegungen der Partikel selbst zurückzuführen, die die zu messende Bewegungskomponente überlagern. Dies kann z.B., wenn sich die Probe in einer Flüssigkeit befindet und die Partikel eine gewisse Bewegungsfreiheit haben, die Brownsche Bewegung der Partikel sein (siehe Abschnitt 8.2).

In diesem Abschnitt soll der Instrumentenfehler quantifiziert werden. Dazu wird als Probe ein trockenes Deckgläschen verwendet, auf dessen Oberfläche zuvor, wie bereits in Abschnitt 5.1 beschrieben, Goldnanopartikel immobilisiert worden sind. Es werden zwei Partikel als Referenz- und Testpartikel ausgewählt und das Interferometer dementsprechend justiert. Da sich die Partikel nicht bewegen, ist der Abstand zwischen ihnen auf dieser Oberfläche keinen Schwankungen unterworfen. Die Fluktuationen in einer zeitlichen Messung dieses Abstands können daher eindeutig als Instrumentenfehler identifiziert werden. Die Messung wird mit einer Abtastrate von 5 kHz durchgeführt, die Messdauer beträgt 60 s. Da das thermische Rauschen der Detektoren als dominierende elektronische Fehlerquelle bei allen Messungen einen nahezu gleichbleibenden Wert hat, hängt das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung von den Amplituden a_1 und a_2 der Interferenzsignale ab. Diese sollten durch eine gute Beleuchtung der Probe und Justage des Interferometers (resultierend in homogenen Interferogrammen)

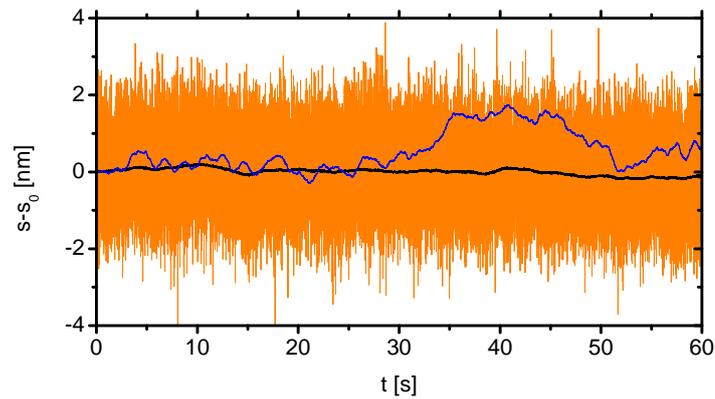


Abbildung 5.3: Partikelverfolgung mit immobilisiertem Referenz- und Testpartikel. Messung mit Abtastrate 5 kHz über 60 s (orange). Die Standardabweichung der gesamten Messreihe beträgt 0,9 nm. Glättung der Messreihe mit gleitendem Durchschnitt der Fensterbreite 1 s (schwarz). Der Abstand zwischen Minimal- und Maximalwert beträgt hier 0,4 nm. Die blaue Kurve zeigt die Ortsrekonstruktion aus lediglich einem der beiden APD-Signale, ebenfalls geglättet mit gleitendem Durchschnitt der Fensterbreite 1 s. Die deutlich erhöhte Streuung der Messwerte ist auf Schwankungen der Laserleistung zurückzuführen. Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

grundsätzlich einen möglichst großen Wert annehmen. In der Praxis sind der Größe der Signalamplituden jedoch zumeist Grenzen gesetzt. So kann z.B. die Intensität des beleuchtenden Laserstrahls bei biologischen Proben nicht beliebig hoch gewählt werden, da die Messung nicht invasiv sein soll und somit ein Aufheizen der Probe durch die Beleuchtung zu vermeiden ist. Die Ortsauflösung der Messungen der Kinesinbewegung, die in Teil III vorgestellt werden, ist durch die Eigenbewegung des an das Kinesin gebundenen Testpartikels limitiert. Daher wird in diesem Fall die Intensität des beleuchtenden Laserstrahls so eingestellt, dass das elektronische Rauschen nicht mehr der begrenzende Faktor für die Ortsauflösung ist, sondern die Eigenbewegung der Probe. Eine weitere Erhöhung der Beleuchtungsintensität führt zu keiner weiteren Verbesserung der Messqualität¹. Für die hier gezeigte Kalibrierungsmessung wird die Beleuchtungsintensität so gewählt, dass die Signalamplituden in etwa den Werten entsprechen, die sie auch bei den Messungen der Kinesinbewegung in Kapitel 8 haben.

Die rekonstruierten Partikelposition $\hat{s} - s_0$ für diese Kalibrierungsmessung ist in Abbildung 5.3 dargestellt (orange). Dabei ist s_0 der Mittelwert der gesamten Messreihe. Die Standardabweichung beträgt $\Delta\hat{s} = 0,9$ nm,

¹ Ermöglicht wird diese Einstellung der Beleuchtungsintensität dadurch, dass das LabVIEW-Messprogramm in Echtzeit sowohl die Standardabweichung als auch das Signal-Rausch-Verhältnis der rekonstruierten Partikeldistanz in einem beliebig wählbaren Zeitfenster anzeigt (siehe Abschnitt 3.3).

was als Maß für die durch den Instrumentenfehler beeinträchtigte Ortsauflösung für die gegebenen Signalamplituden angesehen werden kann. Die schwarze Kurve zeigt die gefilterte Messreihe, die mit einem gleitenden Durchschnitt mit Fensterbreite 1 s geglättet worden ist. Die Spannweite dieser geglätteten Messreihe, also der Abstand zwischen dem Minimal- und dem Maximalwert über die gesamten 60 s, beträgt nur 0,4 nm. Dieser Wert verdeutlicht die Effektivität der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung inhärenten Drifteliminierung. Messungen zeigten, dass der Drift des Objektstischs in diesem Aufbau bis zu 150 nm/min in x-Richtung beträgt.

Neben dem Mikroskopdrift werden durch die Nutzung der zweikanaligen Messung auch Einflüsse der Schwankungen der Laserleistung auf das Messergebnis eliminiert. Um dies zu verdeutlichen, wird die Interferenzphase und darüber die Partikelposition alternativ zu der in Gleichung 4.6 beschriebenen Methode aus lediglich einem der beiden Messkanäle mit $\hat{\Phi} = \arccos(2(S_1 - b_1)/a_1 - 1)$ rekonstruiert. Das Ergebnis wird wiederum mit einem gleitenden Durchschnitt der Fensterbreite 1 s geglättet und ist in Abbildung 5.3 als blaue Kurve eingezeichnet. Der Vergleich mit der schwarzen Kurve zeigt eine deutlich größere Streuung der Werte, die auf die Schwankungen der Laserleistung zurückzuführen ist und gleichzeitig veranschaulicht, dass diese effektiv mit einer zweikanaligen Messung aus den Messergebnissen eliminiert werden können.

Teil III

ANWENDUNG: MESSUNG DER KINESINBEWEGUNG

 KINESIN UND MIKROTUBULI

An dieser Stelle erfolgt eine kurze Einführung in den Aufbau und die Funktionsweise von Motorproteinen. Insbesondere werden Mikrotubuli - Filamente des Zytoskeletts - und das Motorprotein Kinesin beschrieben, ehe in den folgenden Kapiteln die Bewegungsmessungen von Kinesin an Mikrotubuli entlang mit Hilfe der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung vorgestellt werden.

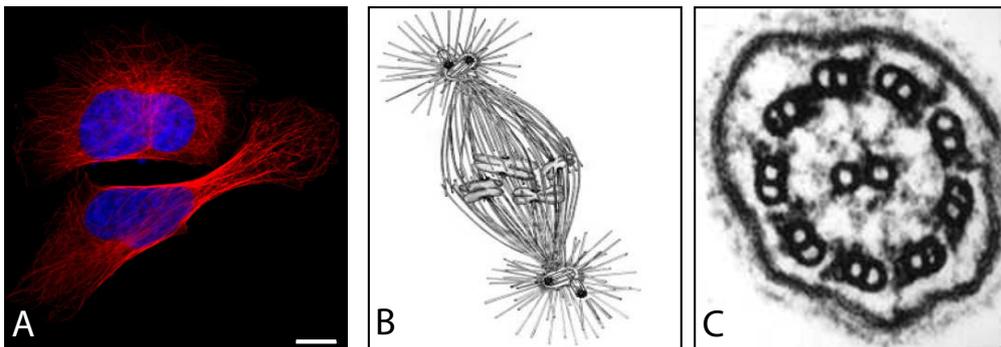


Abbildung 6.1: Verschiedene Vorkommen von Kinesin und Mikrotubuli. (A): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme menschlicher Zellen. Mikrotubuli (rot) stellen einen Teil des Zytoskeletts der Zelle dar. Die Zellkerne sind blau gefärbt. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 10 μm . Aus [56]. (B): Der für die Zellteilung benötigte Spindelapparat bildet sich aus Mikrotubuli und ist im Zusammenspiel mit Kinesin für die Trennung der beiden Schwesterchromatiden eines Chromosoms zuständig. Aus [57]. (C): Elektronenmikroskopische Querschnittsaufnahme eines Flagellums. Die ringförmigen Strukturen sind Mikrotubuliquerschnitte mit einem Durchmesser von 25 nm in der typischen $(9 \times 2 + 2)$ -Anordnung. Aus [58].

6.1 FUNKTION VON MOTORPROTEINEN

Die Fähigkeit, gerichtete Bewegungen auszuführen, ermöglicht es einem Lebewesen, auf seine Umwelt zu reagieren, z.B. sich einer Nahrungsquelle zu nähern oder sich von einer Gefahrenquelle zu entfernen. Auch innerhalb eines Organismus oder einer einzelnen Zelle sind gerichtete Bewegungen erforderlich, etwa zum Stofftransport oder bei der Zellteilung und der Trennung der beiden Schwesterchromatiden eines Chromosoms. Für die meisten dieser Bewegungsabläufe, vom Transport einzelner Moleküle bis hin zur Muskelkontraktion, sind Motorproteine zuständig. Die drei wichtigsten Gruppen von Motorproteinen in Eukaryotenzellen sind die Myosine, Dyneine und Kinesine. Allen dreien ist gemein, dass sie chemische Energie durch Hydrolyse von ATP zu $\text{ADP} + \text{P}_i$ in kinetische Energie umwandeln¹, indem sie ihre Proteinkonformation ändern und sich dadurch schrittweise an Proteinfasern entlangbewegen, die als eine Art Schiene genutzt werden und somit eine geordnete Bewegung über größere Entfernungen ermöglichen. Myosin, das unter anderem für Muskelkontraktionen zuständig ist, bewegt sich an Aktinfilamenten entlang, Dynein und Kinesin nutzen Mikrotubuli als Interaktionspartner. Diese Filamente treten jeweils polar auf und bestimmte Motorproteine bewegen sich immer in eine einzige Richtung entlang des Filaments.

6.2 MIKROTUBULI

Mikrotubuli sind steife, röhrenartige Filamente mit einem Durchmesser von 25 nm, die verschiedene Aufgaben in eukaryotischen Zellen wahrnehmen. Sie bilden einen Teil des Zytoskeletts und haben somit eine Stützfunktion. Außerdem ermöglichen sie im Zusammenspiel mit Motorproteinen Stofftransporte innerhalb der Zelle und stellen die wesentlichen Bestandteile von Flagellen und Zilien dar, mit denen sich einzelne Zellen fortbewegen können. Hierzu werden zwei benachbarte Mikrotubuli-Doppelfibrillen der sogenannten $(9 \times 2 + 2)$ -Anordnung (Abbildung 6.1C) durch Dynein gegeneinander verschoben, sodass sich eine Biegung und dadurch eine Bewegung des Flagellums ergibt. Der Aufbau eines Mikrotubulus ist in Abbildung 6.2 dargestellt. Mikrotubuli sind aus zwei sehr ähnlichen Grundbausteinen aufgebaut, dem α - und dem β -Tubulin, die sich in ihrer elektrischen Ladung unterscheiden. Diese beiden Bausteine bilden zusammen ein α - β -Heterodimer als Untereinheit eines Mikrotubulus. Mehrere dieser Dimere hintereinander formen eine Kette, das sogenannte Protofilament, das aufgrund der Ladungsunterschiede der beiden Tubulinbausteine eine Polarität besitzt, die die Laufrichtung der verschiedenen Motorproteine auf dem Mikrotubulus festlegt.

¹ Adenosintriphosphat (ATP) ist der universelle Energieträger in jeder Zelle. Durch hydrolytische Spaltung in Adenosindiphosphat (ADP) und Orthophosphat (P_i) wird Energie frei, die als Antrieb für weitere Reaktionen in der Zelle genutzt wird.

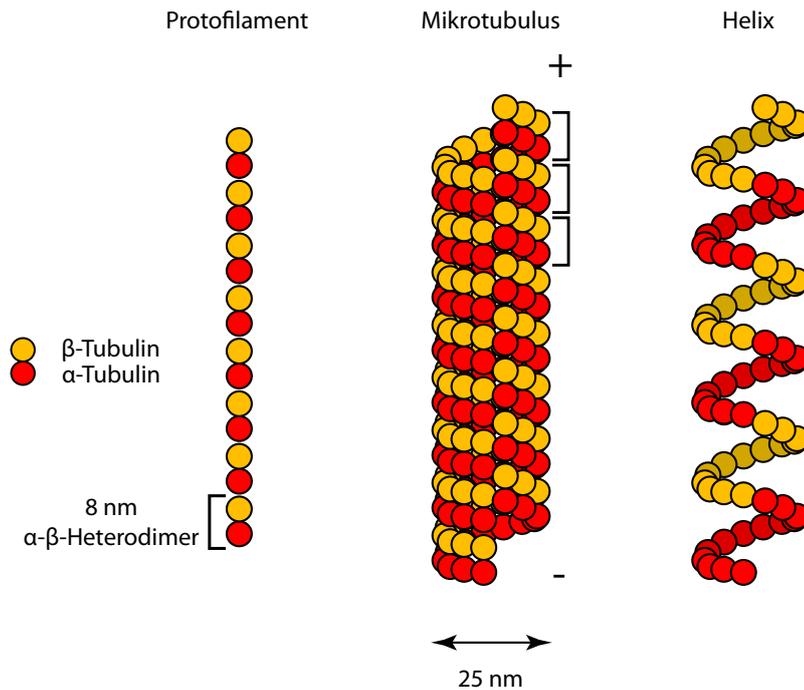


Abbildung 6.2: Schematischer Aufbau eines Mikrotubulus. Ein Protofilament ist eine Kette aus mehreren hintereinander angeordneten α - β -Tubulindimeren. 13 ringförmig angeordnete Protofilamente bilden einen Mikrotubulus. Benachbarte Tubulinmonomere in einem Mikrotubulus bilden eine von drei Helices, die hier als visuelle Hilfe gezeichnet ist, aber kein reales Zwischenprodukt der Mikrotubulus-synthese darstellt. Nach [59].



Abbildung 6.3: Aufbau des konventionellen Kinesins. Am Kopf (blau) wird ATP hydrolysiert. Diese Region ist zusammen mit dem Hals (hellblau) für die Bewegungserzeugung zuständig. Am Ende des Stiels (grau) befinden sich der Bereich der leichten Kette (grün) und der Schwanz (violett), der die zu ziehende Fracht bindet. Aus [64].

Die Länge einer α - β -Tubulindimereinheit in einem Protofilament beträgt 8 nm. Dabei ist das Ende eines Protofilaments, an dessen Ende sich ein α -Tubulin befindet, das minus-Ende. Typischerweise bilden 13 ringförmig angeordnete Protofilamente einen Mikrotubulus. In einer lebenden Zelle werden Mikrotubuli durch Polymerisation und Depolymerisation ständig auf- und abgebaut und können dort Längen von bis zu 25 μm erreichen. Diese dynamische Instabilität ist für die Funktion der Mikrotubuli bei der Zellteilung wichtig. Hier liegt der Angriffspunkt verschiedener Zellgifte, die entweder die Polymerisation oder die Depolymerisation der Mikrotubuli inhibieren. Taxol beispielsweise stabilisiert die polymerisierten Mikrotubuli und wird für Medikamente zur Krebsbekämpfung verwendet, da aufgrund dieser Funktion die Zellteilung beeinträchtigt wird, was sich vor allem auf sich schnell teilende Krebszellen auswirkt [60]. In in-vitro-Experimenten wird Taxol ebenfalls zur Stabilisierung von Mikrotubuli verwendet, um diese für Messungen besser zugänglich zu machen. [61–63]

6.3 KINESIN

Kinesin, dessen Bewegung im Rahmen dieser Arbeit gemessen wird, wurde Mitte der 1980er Jahre von Vale et. al. entdeckt [65]. Dieses Motorprotein bewegt sich unidirektional an Mikrotubuli entlang, die in einer eukaryotischen Zelle zusammen mit anderen Proteinfilamenten das Zytoskelett bilden und meistens vom Zellkern weg in Richtung der Zellmembran führen. Den Kinesinen kommt die Aufgabe zu, Vesikel, Organellen oder Biomakromoleküle, die zellkernnah synthetisiert werden, zur Zellperipherie zu befördern. Auch an der Zellteilung sind Kinesine beteiligt, weshalb die Kinesinforschung für die Krebstherapie von Bedeutung ist [66], da entsprechende Medikamente oft in den Prozess der Mitose eingreifen. Die Kinesine stellen eine Gruppe von Motorproteinen dar, denen die sogenannte Kopfregion gemein ist. Diese bindet an den Mikrotubulus und erzeugt durch ATP-Hydrolyse die Bewe-

gung [67–69]. Viele Kinesine liegen als Dimere mit zwei Köpfen vor, wodurch das prozessive Laufen entlang eines Mikrotubulus erst möglich wird [70]. Ein einzelnes dimerisiertes Kinesinmolekül kann mehrere hundert aufeinanderfolgende Schritte gehen, ehe es wieder vom Mikrotubulus dissoziiert [71]. Im Gegensatz dazu sind monomere Motorproteine, wie die meisten Myosine, nicht prozessiv, sondern können nur im Verbund aus mehreren Molekülen eine gerichtete Bewegung über eine längere Distanz vollziehen. Abgesehen von der Kopfreion unterscheiden sich die verschiedenen Kinesine sehr stark voneinander, was sie für unterschiedliche Funktionen prädestiniert. Dennoch kann man bei den meisten Kinesinen bestimmte Domänen ausmachen: Neben der Kopfreion bestehen Kinesine im Allgemeinen aus einem Hals, der ebenfalls eine Rolle bei der Bewegungserzeugung spielt, einem Stiel mit mehreren scharnierähnlichen Bereichen, die die Beweglichkeit des Proteins vergrößern, und einem Schwanz, der für die Bindung an die zu ziehende Fracht zuständig ist (Abbildung 6.3) [72, 73].

Dimerisiertes Kinesin läuft auf Mikrotubuli mit 8 nm großen Schritten entlang [7–9], was nicht unbedingt die Länge der Konformationsänderung des Motorproteins widerspiegelt, sondern durch den Abstand zwischen den Tubulindimeren in den Protofilamenten vorgegeben ist. Die beiden Kopfreionen eines Kinesinmoleküls können wahlweise ADP oder ATP binden, was zum einen die Affinität zu den α - β -Tubulindimeren und zum anderen die Proteinkonformation des Kopf-Hals-Bereiches beeinflusst. Der Mechanismus der schrittweisen Bewegung kann anhand von Abbildung 6.4 beschrieben werden. Dargestellt sind die beiden Kopfreionen (blau) eines dimerisierten Kinesinmoleküls, die beide jeweils unter Verwendung von ADP an ein α - β -Tubulindimer (grün: β -Tubulin; weiß: α -Tubulin) gebunden sind. Das Loslassen des ADP und das anschließende Binden von ATP der vorderen Kopfreion verursacht zum einen eine stärkere Affinität dieses Kopfes an den Mikrotubulus und zum anderen eine Konformationsänderung des Bereiches zwischen Kopf und Hals (A), sodass der schwächer gebundene hintere Kopf vom Mikrotubulus losgerissen und um ungefähr 16 nm nach vorn geworfen wird (B). Nach zufälligem diffusivem Suchen findet der nach vorn geworfene Kopf das nächstgelegene α - β -Tubulindimer und bindet an dieses. Währenddessen findet in der nun hinteren Kopfreion die Hydrolyse von ATP zu ADP + P_i statt (C), wodurch die Proteinkonformation wieder in die ursprüngliche Form übergeht und der Prozess von vorn beginnen kann. Bei jedem Schritt wird ein einzelnes ATP-Molekül hydrolysiert [75, 76]. Ein einzelnes Kinesinmolekül kann eine maximale Kraft von 5–7 pN ausüben [77–80].

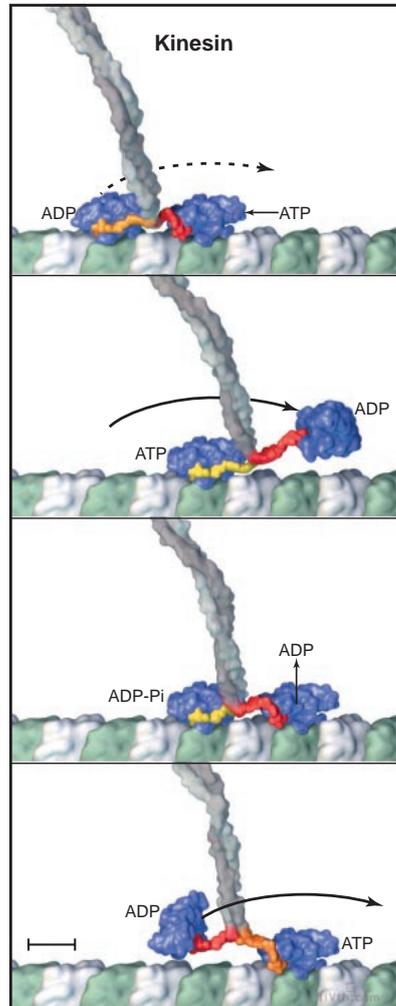


Abbildung 6.4: Schrittweise Bewegung eines Kinesinmoleküls an einem Mikrotubulus entlang. Der Skalierungsbalken zeigt eine Länge von 4 nm an. Aus [74].

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die Messung der Bewegung von Kinesin entlang eines Mikrotubulus, insbesondere die Auflösung einzelner 8 nm großer Schritte, stellt eine experimentelle Herausforderung dar, die tiefere Einblicke in die Funktionsweise dieses Proteinkomplexes erlaubt. In diesem Kapitel wird die Implementierung solcher Messungen der Kinesinbewegung mit Hilfe der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung vorgestellt. Die Probenpräparation sowie die Auswertung der Interferogramme und der gemessenen Stromsignale werden beschrieben.

7.1 PROBENPRÄPARATION

Die Messungen der Kinesinbewegung finden *in vitro* statt. Dazu wird der Proteinkomplex Kinesin-Mikrotubulus in einer Flusskammer präpariert, die aus einem Objektträgerglas, zwei parallel angeordneten Streifen doppelseitigen Klebebands und einem Mikroskopdeckgläschen besteht (Abbildung 7.1). Zwischen den beiden Klebebandstreifen befindet sich somit ein nach zwei Seiten geöffneter Kanal, der nacheinander mit verschiedenen Flüssigkeiten

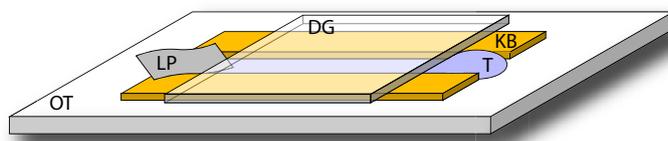


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung einer Flusskammer zur Präparation einer Kinesinprobe. OT: Objektträger; DG: Mit Diethyltriämin (DETA) beschichtetes Mikroskopdeckgläschen; KB: doppelseitiges Klebeband; LP: Löschpapier; T: Tropfen der Lösung, die die Flusskammer füllen soll. Die zwischen Objektträger und Deckgläschen befindliche Kammer hat ein Volumen von etwa $18 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \approx 5 \mu\text{L}$.

geflutet werden kann, um die für das Experiment benötigten Komponenten sukzessive einzuführen. Die zu untersuchenden Proteinkomplexe befinden sich während der Messung an der Unterseite des Deckgläschens im Innenraum der Flusskammer. Bei der Herstellung einer solchen Flusskammer wird zunächst das Mikroskopdeckglas mit Diethylentriamin (DETA) beschichtet, um eine positiv geladene Oberfläche zu erzeugen, an der die Mikrotubuli sehr gut haften. Anschließend wird ein Tropfen von Goldkolloid (Partikel mit einem Durchmesser von 200 nm, BBInternational) für 20 s mittig auf der Deckglasoberfläche platziert und anschließend mit Druckluft weggeblasen. Dadurch bleiben einige Goldnanosphären an der Oberfläche haften, die im Experiment als Referenzpartikel dienen. Das Deckglas wird kopfüber auf die parallelen Streifen doppelseitigen Klebebands gelegt und leicht angedrückt, sodass sich die Goldpartikel im Innenraum der Flusskammer befinden.

Für das Fluten wird an das eine Ende der Kammer mit einer Pipette ein Tropfen der Flüssigkeit gegeben, die die Kammer füllen soll. Auf Grund der Kapillarität dringt die Flüssigkeit in die Flusskammer ein und flutet diese vollständig. Um den Inhalt einer bereits gefüllten Flusskammer durch eine andere Flüssigkeit zu ersetzen, wird wieder ein entsprechender Tropfen von ca. 20 μL an die gleiche Stelle pipettiert. An die andere Öffnung der Kammer wird ein Stück Löschpapier gehalten, das die in dem Kanal befindliche Flüssigkeit aufsaugt, während der gegenüberliegende Tropfen in die Kammer eindringt. Das Volumen der Kammer beträgt ungefähr $18 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} \approx 5 \mu\text{L}$. Somit ist diese deutlich kleiner als das Volumen des Tropfens, sodass der Inhalt der Kammer durch diesen Spülvorgang komplett ausgetauscht wird.

Zur Präparation einer Kinesinprobe wird die Flusskammer nacheinander mit Flüssigkeiten geflutet, die die verschiedenen benötigten Komponenten enthalten (eine detaillierte Anleitung dieser Probenpräparation befindet sich in Anhang A). Zunächst wird eine Lösung mit Mikrotubuli, die mit Rhodamin fluoreszenzmarkiert sind, in die Flusskammer gegeben. Bei diesem initialen Füllvorgang wird bereits ein 20 μL -Tropfen mit Hilfe eines am anderen Kanalende befindlichen Löschpapiers durch die Flusskammer gespült, obwohl bereits 5 μL der Lösung genügen, um die Kammer vollständig zu füllen. Mit diesem Durchspülen wird jedoch gewährleistet, dass die Mikrotubuli durch den Flüssigkeitsstrom entlang der Flussrichtung ausgerichtet werden, wenn sie an der mit DETA beschichteten Deckglasoberfläche haften bleiben. Die Flussrichtung entspricht im Experiment der x -Richtung der Objektebene. Das DETA sorgt dafür, dass die Mikrotubuli nahezu über ihre gesamte Länge an der Oberfläche haften und somit fixiert sind. An Oberflächen, die nicht mit DETA beschichtet sind, haften die Mikrotubuli nur punktuell, sodass die Abschnitte zwischen diesen Haftpunkten frei beweglich bleiben. Gleich anschließend wird die Flusskammer mit einer Caseinlösung gespült. Dadurch werden zum einen die Mikrotubuli, die nicht

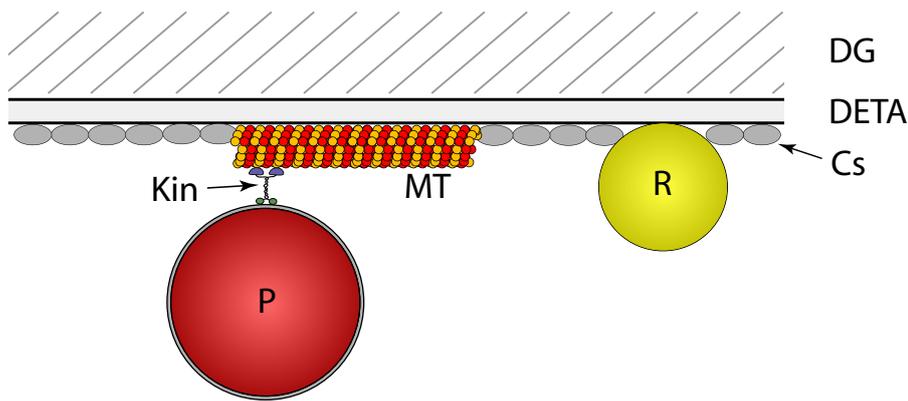


Abbildung 7.2: Mikroskopisches Schema der präparierten Kinesinprobe in der Flusskammer. Sowohl fluoreszenzmarkierte Mikrotubuli (MT) als auch die als Referenzpartikel fungierenden Goldnanopartikel (R) haften an der mit DETA beschichteten Deckglasoberfläche (DG). Die mit Protein G beschichteten fluoreszenzmarkierten Polystyrolkugelchen (P) binden über einen Anti-HIS₆-Tag-Antikörper und ein Kinesin (Kin) an ein Mikrotubulus. Eine Caseinschicht (Cs) erschwert das Haften des Polystyrolkugelchens an der Deckglasoberfläche.

an der Oberfläche gehaftet haben, aus der Kammer entfernt. Zum anderen benetzt das Casein die freien Stellen der Deckglasoberfläche, an denen sich keine Mikrotubuli befinden. Das ist wichtig, um ein späteres Haften der Testpartikel an der Oberfläche zu erschweren. Nun wird der Kinesinansatz in die Flusskammer gespült. Dieser Ansatz enthält fluoreszenzmarkierte Polystyrolkugelchen mit einem Durchmesser von 500 nm, deren Oberfläche mit Protein G beschichtet ist (Kisker Biotech). Über einen Anti-HIS₆-Tag-Antikörper, der als Bindeglied zu dem Protein G fungiert, ist das Kinesin an die Polystyrolkugelchen gebunden. Der Kinesinansatz ist zuvor für zehn Minuten auf Eis inkubiert worden, um die Bindung des Kinesins an die Polystyrolkugelchen zu gewährleisten. Zusätzlich ist in dem Ansatz AMP-PNP¹ enthalten. Der Kinesinansatz wird für eine Inkubationszeit von zwei Minuten in der Flusskammer gelassen. In dieser Zeit bindet das Kinesin an die Mikrotubuli unter Verwendung des AMP-PNP, jedoch zunächst ohne auf ihnen entlangzulaufen. Nach dieser Inkubationszeit wird die Flusskammer mit einem Ansatz gespült, der das Ausbleichen des Rhodamins in den Mikrotubuli verlangsamt, wodurch die restlichen Polystyrolkugelchen, die sich noch frei im Flüssigkeitsvolumen befinden, entfernt werden. An der präparierten Deckglasoberfläche in der Flusskammer haften nun, wie es in Abbildung 7.2 schematisch dargestellt ist, sowohl Goldnanopartikel als auch Mikrotubuli, an die wiederum über Kinesin und Anti-HIS₆-Tag-Antikörper die Polystyrolkugelchen gebunden sind.

¹ AMP-PNP ist ein ATP-Analogon, unter dessen Verwendung Kinesin an einen Mikrotubulus binden kann, ohne jedoch auf diesem entlangzulaufen.

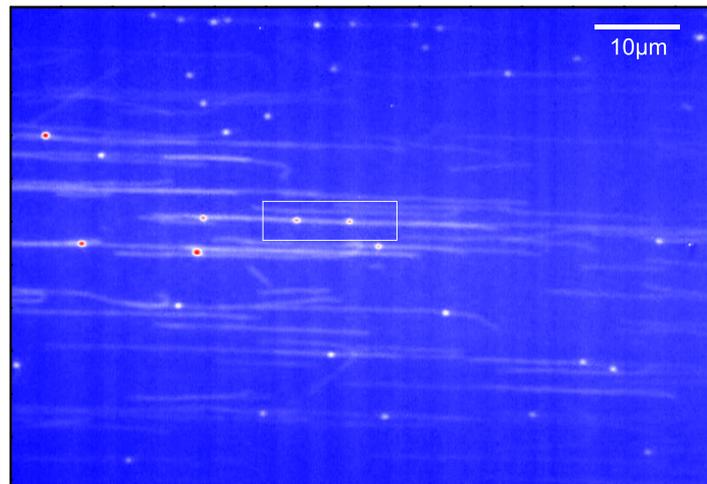


Abbildung 7.3: Fluoreszenzmikroskopisches Bild von Mikrotubuli und Polystyrolkugeln auf der Deckgläschenunterseite. Durch die klar definierte Flussrichtung in der Flusskammer sind die Mikrotubuli entsprechend ausgerichtet. Die Polystyrolkugeln sind beinahe ausnahmslos auf den Mikrotubuli zu finden, was auf eine Bindung über Kinesin und Anti-HIS₆-Tag-Antikörper schließen lässt. Das weiße Rechteck markiert den Ausschnitt, dessen zeitliche Entwicklung in Abbildung 7.4 dargestellt ist. Zur besseren Sichtbarkeit der Helligkeitsunterschiede ist das Bild in Falschfarben dargestellt.

Das Verhältnis der Polystyrolkugeln- zur Kinesinkonzentration im Kinesinansatz wird so gewählt, dass sich nur wenige Kinesine an der Oberfläche eines Partikels befinden, bzw. nur wenige Kinesine zur Bindung eines Partikels an einen Mikrotubulus beitragen. Dies kann erreicht werden, indem in aufeinanderfolgenden Versuchen die Kinesinkonzentration solange verringert wird, bis die Polystyrolkugeln sichtbar seltener an die Mikrotubuli binden. Dann ist davon auszugehen, dass die mittlere Zahl der Kinesine pro Partikel, die diese an ein Mikrotubulus binden, auf unter eins gefallen ist. Nach der Präparation wird die Probe in den Objektisch des Mikroskops eingesetzt.

Zum Auffinden eines geeigneten Testpartikels wird das Mikroskop zunächst im Fluoreszenzmodus betrieben. Dadurch können zum einen die fluoreszierenden Polystyrolkugeln von den nicht fluoreszierenden Goldpartikeln unterschieden werden. Im Dunkelfeldmodus mit Laserbeleuchtung sind die verschiedenen Partikelsorten kaum voneinander zu unterscheiden, da sie einen ähnlichen Streuquerschnitt besitzen und ähnlich hell erscheinen, und außerdem trotz unterschiedlicher Größe jeweils wie Punktlichtquellen aussehen und keinen erkennbaren Formunterschied aufweisen. Zum anderen werden die Mikrotubuli erst durch den Fluoreszenzmodus sichtbar, deren Streulicht im Dunkelfeldmodus vom Hintergrundstreulicht der Deckgläschenoberfläche überstrahlt wird. Als anregendes Licht wird im

Fluoreszenzmodus der gleiche grüne Laserstrahl wie im Dunkelfeldmodus verwendet. Über einen entsprechenden Farbfilter (Langpass OG 590) im Mikroskop zwischen Objektiv und Tubuslinse wird das rote Fluoreszenzlicht selektiert, sodass nur die Mikrotubuli und die Polystyrolkugelchen sichtbar sind (Abbildung 7.3). Somit können diejenigen Kugelchen leicht identifiziert werden, die sich direkt auf einem Mikrotubulus befinden und somit wahrscheinlich über ein Kinesin an dieses gebunden sind. Die Goldpartikel sind dadurch zu identifizieren, dass sie erst bei Herausnahme des Fluoreszenzfilters sichtbar werden. Ein geeignetes Paar aus einem Goldnanopartikel und einem an ein Mikrotubulus gebundenen Polystyrolkugelchen wird gesucht, das Interferometer für dieses Paar justiert und die Kalibrierung zur Bestimmung der Signalparameter durchgeführt. Sobald dies geschehen ist, wird der ATP-Ansatz in die Flusskammer gespült. Nach etwa 20 Sekunden fängt das Kinesin an sich entlang der Mikrotubuli zu bewegen, was durch eine Bewegung der Polystyrolkugelchen beobachtet werden kann. Exemplarisch ist die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Bewegung eines vom Kinesin UNC-104 gezogenen Polystyrolkugelchens in Abbildung 7.4 dargestellt. Es sind zwei Partikel auf einem Mikrotubulus zu sehen, die sich bei $t = 0$ noch nicht bewegen. Die folgenden Bilder zeigen den gleichen Ausschnitt im zeitlichen Abstand von jeweils einer Sekunde. Von $t = 1$ s bis $t = 3$ s ist jeweils eine deutliche Positionsänderung des rechten Partikels erkennbar, wohingegen sich dieses Partikel bei $t = 4$ s bereits vom Mikrotubulus gelöst hat. Zwischen $t = 1$ s und $t = 3$ s wandert das Partikel mit einer mittleren Geschwindigkeit von $\bar{v} = 1 \mu\text{m/s}$, was mit bekannten Literaturwerten gut übereinstimmt [81].

7.2 ENTWICKLUNG DER INTERFEROGRAMME

Für die differentielle interferometrische Partikelverfolgung wird der Fluoreszenzfilter aus dem Strahlengang entfernt, da für diese Messmethode das kohärente, an den Partikeln elastisch gestreute Licht verwendet wird. Nach erfolgter Justage des Interferometers für ein bestimmtes Partikelpaar entsteht in den Interferenzebenen hinter den beiden Strahlteilerausgängen zunächst das homogene Interferenzbild, entsprechend der Simulation aus Abbildung 4.3A. Die Startphase Φ_0 ist im Allgemeinen von null verschieden und hängt vom Abstand s zwischen Referenz- und Testpartikel in der Objektebene und vom Unterschied der optischen Weglängen der beiden Interferometerarme ab. Die zeitliche Entwicklung des realen Interferogramms bei einem sich bewegenden Testpartikel wird zu Demonstrationszwecken aufgenommen, indem der Detektor APD1 durch eine Kamera ersetzt und die Lochblende PH1 entfernt wird (vgl. Abbildung 3.4). Durch eine leichte Defokussierung erscheint der Interferenzspot auf dem lichtempfindlichen Sensor der Kamera als flächiges Scheibchen und eine Aufnahme entspricht in etwa dem Interferogramm in der X - Y -Ebene aus Abbildung 4.1.

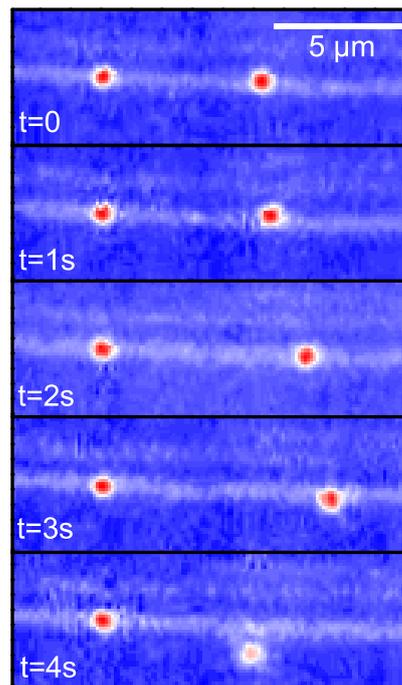


Abbildung 7.4: Falschfarbenkodierte fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Bewegung des Kinesins UNC-104. Dargestellt ist der durch das Rechteck markierte Bereich aus Abbildung 7.3. Zwischen $t = 1$ s und $t = 3$ s beträgt die mittlere Geschwindigkeit $1 \mu\text{m/s}$. Bei $t = 4$ s hat sich das Partikel bereits vom Mikrotubulus gelöst.

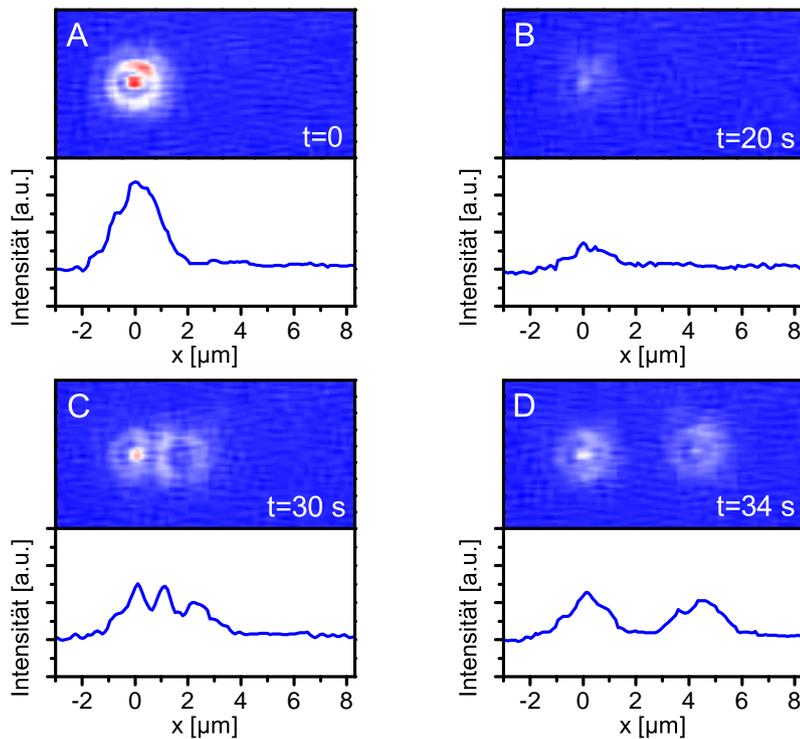


Abbildung 7.5: Zeitliche Entwicklung des Interferogramms bei Bewegung des Testpartikels. Die farbkodierten Aufnahmen des defokussierten Interferenzspots mit Intensitätsprofilen zeigen zunächst mit einsetzender Partikelbewegung eine Veränderung der Helligkeit des homogenen Interferogramms von (A) zu (B). In (C) sind bereits Interferenzstreifen zu erkennen, in (D) liegen die Spots von Referenz- und Testpartikel separat vor. Für eine Auswertung der Partikelbewegung gemäß Abschnitt 4.3 sind lediglich die Situationen (A) und (B) geeignet.

Die Entwicklung solch eines Interferenzscheibchens bei einer Bewegung des Testpartikels wird in Abbildung 7.5 gezeigt. Hier sind vier nacheinander aufgenommene Bilder eines defokussierten Interferenzspots dargestellt, in denen sich das Testpartikel nach rechts bewegt. Bei der Probe handelt es sich um eine wie in Abschnitt 7.1 beschriebene präparierte Flusskammer mit an der Deckgläschenoberfläche immobilisierten Goldnanopartikeln als Referenzpartikel und Polystyrolkugeln, die an das Kinesin Nkin 433 gebunden sind, als Testpartikel. Zusätzlich zu den defokussierten Interferenzspots sind die entsprechenden Intensitätsprofile zu sehen, die die Summen der Pixelwerte aus den einzelnen Pixelspalten enthalten. In Abbildung 7.5A ist das homogene Interferogramm zu sehen, wie es direkt nach der Justage des Interferometers aussieht, bevor das Kinesin beginnt auf dem Mikrotubulus entlangzulaufen. Die virtuellen Bilder der beiden Partikel liegen übereinander. Die Helligkeit des Interferenzspots ist nahe seines Maximalwertes, was einem Interferenzphasenwert von $\Phi \approx 0$ entspricht (vgl. Gleichung 4.4). Nach Zugabe des ATP-Ansatzes in die Flusskammer zum Zeitpunkt $t = 0$ beginnt das Testpartikel nach einer Zeit von $t = 20$ s sich langsam zu bewegen, was sich in einer Modulation der Helligkeit des immer noch homogen erscheinenden Interferenzmusters niederschlägt. In Abbildung 7.5B ist die Helligkeit in der Nähe des Minimalwertes ($\Phi \approx \pi$, entspricht einer gelaufenen Distanz von $s - s_0 \approx 135$ nm). Nach einer Zeit von $t = 30$ s hat sich das Testpartikel bereits so weit bewegt, dass die virtuellen Bilder der beiden Partikel deutlich erkennbar nicht mehr exakt übereinander liegen und im defokussierten Interferogramm Interferenzstreifen sichtbar sind (Abbildung 7.5C). Eine Veränderung der Phase Φ bewirkt nun im Interferogramm ein seitliches Durchlaufen der Interferenzstreifen. Die gesamte Strahlungsleistung des Interferogramms, der die Fläche unter dem Intensitätsprofil entspricht, moduliert dann kaum noch. Schließlich liegen die Spots der beiden Partikelbilder separat vor, ohne dass sie sich überlagern und Interferenzstreifen ausbilden (Abbildung 7.5D). Für eine Auswertung der Partikelbewegung gemäß Abschnitt 4.3 sind lediglich die Situationen (A) und (B) geeignet, da nur hier die Strahlungsleistung der Interferenzspots entsprechend den Gleichungen 4.4 und 4.5 moduliert.

7.3 ENTWICKLUNG DER STROMSIGNALLE

Die eigentliche Messung bei der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung erfolgt nicht mit einer Kamera, sondern mit zwei APD, die die Strahlungsleistung des Interferenzspots an den beiden Strahlteilerausgängen des Interferometers aufnehmen, wie es in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Dazu werden die Lochblenden PH1 und PH2 in der Bildebene hinter dem Strahlteiler so positioniert, dass sie nur den Interferenzspot ausschneiden und dessen Licht auf die empfindlichen Flächen der APD treffen lassen. Der von den Lochblenden ausgeschnittene Bereich entspricht in etwa einem

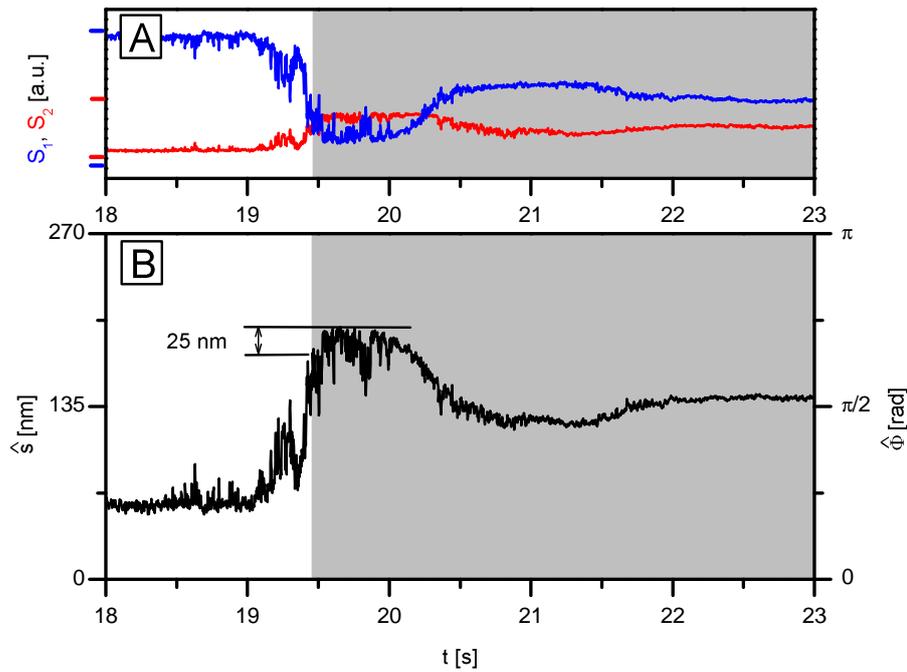


Abbildung 7.6: (A) Zeitlicher Verlauf der Stromsignale S_1 und S_2 und (B) der rekonstruierten Partikelposition \hat{s} bzw. Interferenzphase $\hat{\Phi}$ einer Kinesinmessung. ATP wird bei $t = 0$ in die Flusskammer gespült. Die zuvor ermittelten Maximal- und Minimalwerte der Interferenzsignale sind in (A) an der linken Achse als entsprechend farbliche Markierungen eingezeichnet. Der grau hinterlegte Bereich stellt den Bereich der Messung dar, der nach den in Abschnitt 4.4 gegebenen Kriterien nicht mehr als verzerrungsfrei angesehen werden kann. Dieser Bereich beginnt ab der Stelle, an der \hat{s} den Wert des ersten Extremums, abzüglich 25 nm, annimmt.

Ausschnitt, wie er in Abbildung 7.5 gezeigt ist. Die Strahlungsleistung, die von einer APD detektiert wird, entspricht der Fläche unter dem jeweiligen Intensitätsprofil.

Der zeitliche Verlauf der Stromsignale der beiden APD bei einer solchen Messung ist in Abbildung 7.6A dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein vergleichbares Experiment mit dem aus Abbildung 7.5 mit identischer Probenpräparation. Die Stromsignale der APD werden mit einer Abtastrate von 40 kHz aufgenommen. In den gezeigten Messkurven sind allerdings zum Zwecke der Rauschunterdrückung jeweils 100 aufeinanderfolgende Messpunkte zu einem Mittelwert zusammengefasst, sodass die effektive Abtastrate der gezeigten Kurven bei 400 Hz liegt. Um aus den beiden Stromsignalen die Phase Φ des Interferenzspots rekonstruieren zu können, müssen die Maximal- und Minimalwerte der Stromsignale, die sie bei $\Phi = 0$ und $\Phi = \pi$ aufweisen, bekannt sein (siehe Abschnitt 4.3). Diese werden in einem Kalibrierdurchlauf durch Bewegen des Spiegels M2 im Interferometer mit einem Piezoaktuator vor der eigentlichen Messung bestimmt und sind in Abbildung 7.6A an der linken Achse für beide Stromsignale als entsprechend farbliche Markierungen eingezeichnet. Die unterschiedliche Größe der Minimal- und Maximalwerte für beide Stromsignale kann zurückgeführt werden auf unterschiedliche Verstärkungen der beiden APD und auf verschiedene gute Einkopplung der beiden Interferenzspots in die jeweilige Glasfaser, die das Licht vom Interferometer zum Detektor transportiert. Der Verlauf der beiden Stromsignale ähnelt dem der Simulation (Abbildung 4.3B) insofern, als auch hier die Signale mit zunehmender zurückgelegter Distanz des Testpartikels um einen Mittelwert herum mit abnehmender Amplitude oszillieren.

In Abbildung 7.6B ist die mit Gleichung 4.6 rekonstruierte Interferenzphase $\hat{\Phi}$ und die mit Gleichung 4.7 ermittelte Position \hat{s} des Testpartikels gezeichnet. Der grau hinterlegte Teil der Zeichnung beinhaltet den Bereich der Pfadrekonstruktion, der nach den in Abschnitt 4.4 genannten Kriterien als nicht mehr hinreichend verzerrungsfrei angesehen werden kann. Um diesen Bereich zu ermitteln, wird zunächst die erste Extremstelle des rekonstruierten Partikelpfads betrachtet. Da es sich bei der Messung um eine unidirektionale Kinesinbewegung entlang eines Mikrotubulus handelt, können die Extremstellen des rekonstruierten Pfads nicht auf Umkehrpunkte der Bewegung zurückgeführt werden, sondern es handelt sich um Artefakte der Phasenrekonstruktion, die bei den Phasenwerten $\Phi = 0$ oder $\Phi = \pi$ auftreten. Von der rekonstruierten Partikelposition dieses ersten Maximums werden 25 nm subtrahiert. Bis zu der Stelle, an der \hat{s} diesen Wert annimmt, hat das Testpartikel eine Distanz von etwa 110 nm zurückgelegt und es kann von einer vernachlässigbar kleinen Verzerrung ausgegangen werden.

ERGEBNISSE

In diesem Kapitel werden Messungen der Bewegung von Kinesin entlang eines Mikrotubulus gezeigt, die mit der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung aufgenommen wurden. Als Marker fungieren an das Kinesin gebundene Polystyrolkugeln. Die für den Proteinkomplex Kinesin-Mikrotubulus typischen 8 nm großen Schritte sind deutlich zu erkennen. Dank der hohen Zeitauflösung sind Untersuchungen der spektralen Leistungsdichten der gemessenen Pfade bis in den kHz-Bereich hinein möglich, wodurch eine Charakterisierung der unterschiedlichen Rauscheigenschaften verschiedener Proben vorgenommen werden kann. Die Pfade und deren spektrale Leistungsdichten werden im Hinblick auf die lokale Umgebung und Bindung der Testpartikel interpretiert.

8.1 GEMESSENE PFADE

In Abbildung 8.1A ist ein gemessener Pfad eines von Kinesin gezogenen Testpartikels dargestellt. Der durch das schwarze Rechteck gekennzeichnete Bereich der Länge 1 s wird in Abbildung 8.1B detaillierter gezeigt (rote Kurve), zusammen mit dem Pfad eines weiteren kinesingetriebenen Partikels (blaue Kurve). Beide Proben wurden wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben präpariert. Die schwarze Kurve stellt den gemessenen Pfad eines an der Deckgläschenoberfläche einer gefluteten Flusskammer haftenden Polystyrolkugels ohne Kinesin dar (im Folgenden wird diese Probe „stationäres Partikel“ genannt). Alle drei Messungen wurden mit einer Abtastrate von 40 kHz aufgenommen. Die Strahlungsleistung des beleuchtenden Laserstrahls beträgt 30 mW, was bei einer Größe des Lichtflecks in der Objektebene von $300\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ einer Strahlungsintensität von $20\ \text{kW}/\text{cm}^2$ entspricht. Die gezeigten Kurven enthalten den Verlauf der rekonstruierten Partikelpositionen, die durch Mittelung über jeweils 100 Werte geglättet worden sind. Die dargestellten Ausschnitte erfüllen die in Abschnitt

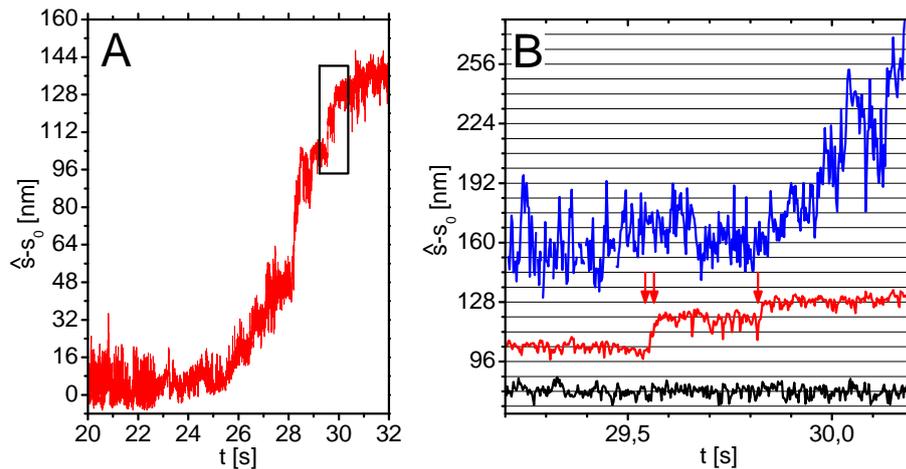


Abbildung 8.1: (A): Beginn einer kinesingetriebenen Partikelbewegung (bei $t = 25$ s). ATP wurde bei $t = 0$ in die Flusskammer gespült. (B): Vergrößerte Darstellung des durch das schwarze Rechteck in (A) gekennzeichneten Bereichs (rote Kurve). Die roten Pfeile markieren drei 8 nm große Stufen. Blaue Kurve: Beginn der Kinesinbewegung aus einer weiteren Messung, sowohl in t - als auch in s -Richtung verschoben. Schwarze Kurve: Bewegungsmessung eines an der Deckgläschenoberfläche einer gefluteten Flusskammer haftenden Polystyrolkügelchens. Die horizontalen Linien haben einen Abstand von 8 nm. Die Messungen wurden mit einer Abtastrate von 40 kHz erfasst. Die dargestellten Kurven sind geglättet durch eine Mittelung über jeweils 100 Messwerte. Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

4.4 genannten Kriterien für eine verzerrungsfreie Positionsrekonstruktion. In Abbildung 8.1A wird der Beginn einer Kinesinbewegung nach Zugabe von ATP in die Flusskammer gezeigt. Die vom Testpartikel innerhalb des gezeigten Bereichs zurückgelegte Distanz beträgt etwa 130 nm, ehe die Rekonstruktion der Partikelposition nicht mehr als hinreichend verzerrungsfrei angesehen werden kann. Der Zeitpunkt $t = 0$ stellt dabei den Anfang des Spülvorgangs dar, der etwa 5 s dauert. Die Bewegung des Testpartikels setzt bei $t = 25$ s ein. Diese relativ lange Zeitspanne zwischen der ATP-Zugabe und dem Loslaufen des Motorproteins schließt die Möglichkeit aus, dass die gemessene Bewegung auf den Flüssigkeitsstrom beim Spülvorgang in der Flusskammer zurückzuführen ist. In dem gemessenen Pfad sind mehrere Stufen und Plateaus sichtbar. In der detaillierten Ansicht in Abbildung 8.1B sind eine 8 nm große Stufe und eine weitere 16 nm große Stufe zu erkennen, die möglicherweise aus zwei dicht aufeinanderfolgenden Stufen von jeweils 8 nm besteht (rote Pfeile). Die blaue Kurve zeigt den Beginn einer weiteren gemessenen kinesingetriebenen Partikelbewegung (ab $t = 29,8$ s, diese Messkurve ist sowohl auf der Zeit- als auch auf der Ortsachse verschoben, um eine bessere Vergleichbarkeit mit dem in der roten Kurve dargestellten

Pfad zu gewährleisten). Diese beiden Pfade unterscheiden sich wesentlich voneinander. So ist das Rauschen in der blauen Kurve größer, weshalb einzelne 8 nm große Stufen nicht zu erkennen sind: Die Standardabweichung der ungeglätteten Werte bis zum Beginn der Bewegung, also von $t = 29,2$ s bis $t = 29,8$ s, beträgt $\Delta s = 19,1$ nm, wohingegen die Standardabweichung des geraden Abschnitts der ungeglätteten roten Kurve von $t = 29,2$ s bis $t = 29,5$ s lediglich $\Delta s = 3,8$ nm beträgt. Die schwarze Kurve des an der Deckgläschenoberfläche haftenden Testpartikels weist ebenfalls eine Standardabweichung von $\Delta s = 3,8$ nm auf. Die möglichen Ursachen für diese Unterschiede werden in Abschnitt 8.3 näher betrachtet. Auch die Geschwindigkeiten unterscheiden sich in den beiden Messungen signifikant: Die blaue Kurve zeigt zwischen $t = 29,8$ s und $t = 30,2$ s eine mittlere Partikelgeschwindigkeit von $\bar{v} \approx 250$ nm/s, in der roten Kurve beträgt die mittlere Geschwindigkeit zwischen $t = 29,2$ s und $t = 30,2$ s nur $\bar{v} = 24$ nm/s. Im Folgenden wird die Probe, der die rote Kurve entspricht, „langsame Kinesinprobe“ genannt, wohingegen die blaue Kurve der „schnellen Kinesinprobe“ zuzuordnen ist.

8.2 UNTERSUCHUNG DER LEISTUNGSSPEKTREN

Die hohe Zeitauflösung der Messreihen ermöglichen eine Untersuchung der spektralen Leistungsdichten der gemessenen Partikelpfade bis in den kHz-Bereich hinein. Dies soll dazu dienen, die Ursachen für das Rauschen auf den Messreihen zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde vor jeder Pfadmessung - nach erfolgter Interferometerjustage und bevor der ATP-Ansatz in die Flusskammer gegeben worden ist - eine viersekündige „Ruhemessung“ aufgenommen. Diese Messungen enthalten bereits diejenigen Rauschanteile, die auf die lokale Umgebung und Bindung des Partikels zurückzuführen sind, also auf die thermische Bewegung des über Kinesin und Antikörper an einen Mikrotubulus gebundenen Polystyrolpartikels. Von den Ruhemessungen der Proben, deren Pfadmessungen in Abbildung 8.1 gezeigt sind, werden die spektralen Leistungsdichten berechnet. Die so erhaltenen Spektralkurven werden nachträglich geglättet, indem über gleichgroße Intervalle auf der logarithmischen Frequenzskala gemittelt wird. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8.2 zu sehen. Die Farben der Kurven entsprechen denen der zugehörigen gemessenen Pfade aus Abbildung 8.1. Zusätzlich ist die spektrale Leistungsdichte der Messkurve aus Abbildung 5.3 dargestellt, in der die Probe aus einer trockenen Deckgläschenoberfläche mit auf ihr immobilisierten Goldnanopartikeln besteht. Die spektralen Leistungsdichten der Proben, in denen Polystyrolkugeln in wässriger Umgebung die Testpartikel darstellen, folgen, im Gegensatz zum Spektrum der trockenen Probe, dem Verlauf einer Lorentzkurve. Das wird beispielhaft an der schwarzen Kurve verdeutlicht. Die aus den Messwerten gewonnene spektrale Leistungsdichte ist durch schwarze Punkte dargestellt. Diesen Werten wird eine Lorentz-

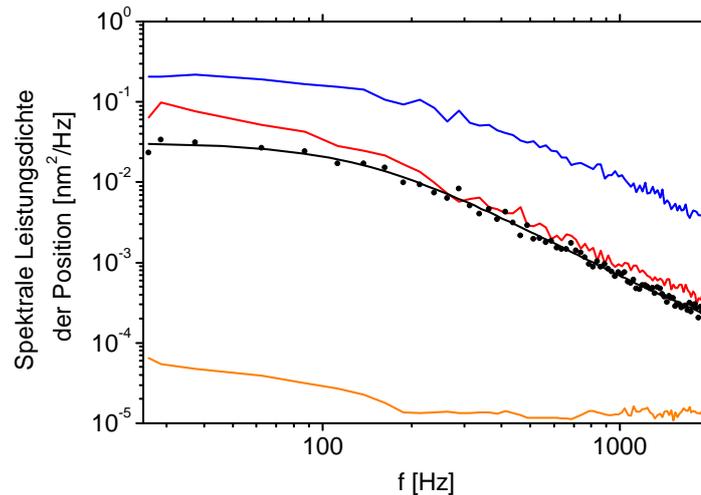


Abbildung 8.2: Spektrale Leistungsdichte der Position. Zugrunde liegen viersekündige Messreihen vor Beginn der Kinesinbewegung der Messreihen aus Abbildung 8.1. Die Farbgebung der Kurven ist für die Messungen in beiden Abbildungen die gleiche. Die schwarze Messreihe ist durch Punkte dargestellt, ihr wird eine Lorentzfunktion angepasst (schwarze durchgezogene Linie). Nach Müller et. al., *Opt. Express* 21, 7362 (2013) [46].

funktion angepasst, die als durchgezogene schwarze Linie eingezeichnet ist und dem Verlauf der Punkte sehr gut folgt.

8.3 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Diese spezielle Kurvenform lässt auf die Brownsche Bewegung eines Teilchens in einem harmonischen Potential schließen, da diese gerade eine lorentzförmige spektrale Leistungsdichte aufweist [17]. Der absteigende Bereich bei hohen Frequenzen hat in der doppeltlogarithmischen Auftragung eine Steigung von -2 . Dies spiegelt die rein diffusive Bewegung in der lokalen viskosen Umgebung des Partikels wider [13]. Die niedrigen Frequenzen werden durch das Potential abgeschwächt, was darin begründet ist, dass das Partikel den Bereich des Potentials nicht verlassen kann und gefangen ist. Die blaue, rote und schwarze Kurve unterscheiden sich vor allem dadurch voneinander, dass sie in der doppeltlogarithmischen Auftragung nach oben und unten gegeneinander verschoben sind. Dies trifft vor allem für die Kurve der schnellen Kinesinprobe (blau) zu, die sich deutlich oberhalb der beiden anderen Kurven befindet. Solch eine Verschiebung der Kurven entspricht konstanten Koeffizienten, die eine Funktion von der anderen unterscheiden. Diese Koeffizienten werden bestimmt, indem den abfallenden Spektralbereichen mit Steigung -2 entsprechende Geraden angepasst werden. Deren Ordinatenabschnitte liefern einen Faktor $\approx 1,4$ zwischen der schwarzen und der roten Kurve, bzw. einen Faktor ≈ 15 zwischen der schwarzen und

der blauen Kurve. Bei einer Brownschen Bewegung in einem harmonischen Potential stellen diese Faktoren die Inversen des Reibungswiderstands dar, den das Partikel aufgrund der Viskosität des umgebenden Mediums erfährt. Im Vergleich zur Messung des stationären Polystyrolkugelchens ist der Reibungswiderstand bei der langsamen Kinesinbewegung um einen Faktor $\approx 1,4$ geringer, bei der Messung der schnellen Kinesinbewegung sogar um einen Faktor ≈ 15 . Im Fall des stationären Partikels resultiert das Potential,

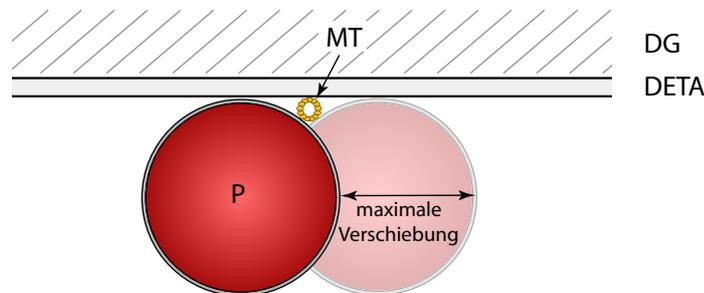


Abbildung 8.3: Schema zur Abschätzung der maximalen Verschiebung eines an einen Mikrotubulus (MT) gebundenen Polystyrolkugelchens (P). Das Deckglaschen (DG) ist mit DETA beschichtet. Nach [13].

das das Polystyrolkugelchen gefangen hält, offensichtlich aus der Haftung des Partikels an der Deckglaschenoberfläche. Die Ähnlichkeiten der Standardabweichung der Pfadmessung und der spektralen Leistungsdichte dieser Probe mit denen der langsamen Kinesinprobe legen den Schluss nahe, dass das Polystyrolkugelchen in der langsamen Kinesinmessung ebenfalls an der Deckglaschenoberfläche haftet. Dahingegen bindet das Partikel in der schnellen Kinesinmessung möglicherweise nicht direkt an der Deckglaschenoberfläche, sondern spürt ein attraktive Potential lediglich aufgrund der Kinesin-Antikörper-Anbindung an den Mikrotubulus, die wie eine kurze Leine fungiert. Eine geometrische Betrachtung der Deckglaschenoberfläche, eines an ihr haftenden Mikrotubulus und eines entsprechend angebondenen Polystyrolkugelchens erlaubt eine Abschätzung der maximalen Verschiebung, die das Partikel in einer solchen Konfiguration erfahren kann. Es wird der Argumentation von Allersma et. al. gefolgt [13], die zu diesem Zweck vereinfachend annehmen, dass der Mikrotubulus fest mit der Deckglaschenoberfläche verbunden ist und das Polystyrolkugelchen diesen berührt und sich frei auf dessen Oberfläche bewegen kann, soweit es das Deckglaschen zulässt (Abbildung 8.3). Aus den Radien des Mikrotubulus (12,5 nm) und des Polystyrolkugelchens (250 nm) ergibt sich, dass das Partikel mit diesen Randbedingungen eine maximale seitliche Verschiebung von ca. 220 nm erfahren kann. Dieser Wert deckt sich recht gut mit der Spannweite, also der Differenz aus der minimalen und maximalen rekonstruierten Partikelposition, aus dem Bereich der ungeglätteten schnellen Kinesinmessung, in dem die Kinesinbewegung noch nicht begonnen hat. Um dies zu verdeutlichen, wird eine nähere Betrachtung dieser Pfadmessung vorgenommen: Abbildung 8.4

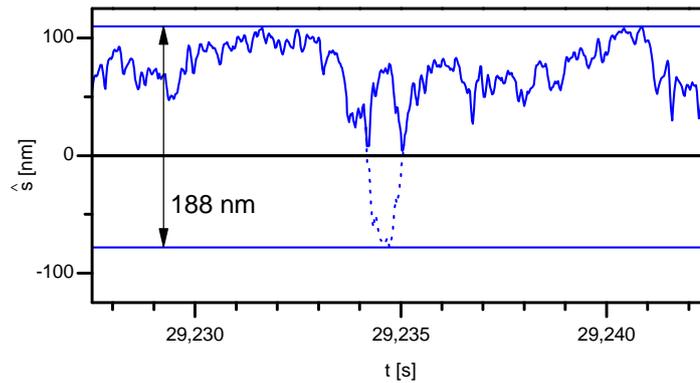


Abbildung 8.4: Detaillierter Ausschnitt der ungeglätteten blauen Kurve aus Abbildung 8.1 („schnelle Kinesinmessung“). Die nach Gleichung 4.6 und 4.7 erhaltene Positionsrekonstruktion \hat{s} ist als durchgezogene Linie gezeichnet. Aus der Uneindeutigkeit der Bewegungsrichtung bei Nulldurchgängen der Phase ergibt sich alternativ der gestrichelt gezeichnete Pfad. Die Spannweite der Bewegung beträgt dann für den gezeigten Bereich 188 nm.

zeigt einen ausgewählten Ausschnitt mit einer Dauer von 15 ms. Zunächst beträgt die Spannweite der rekonstruierten Partikeldistanz dieses Bereichs (durchgezogene Kurve) etwas mehr als 100 nm. Ungefähr in der Mitte der gezeigten Kurve befinden sich jedoch zwei Stellen, an denen die rekonstruierte Partikeldistanz \hat{s} den Nullwert erreicht. Da \hat{s} aus der rekonstruierten Phase mit Hilfe der Gleichung 4.7 gewonnen wird, entsprechen die genannten Stellen auch Phasenwerten um Null. Wie bereits in Abschnitt 4.4 erörtert wurde, befinden sich bei den Phasenwerten $\Phi = 0$ und $\Phi = \pi$ möglicherweise Vorzeichenwechsel der Bewegungsrichtung des Partikels. So sind bei den Nulldurchgängen der Phase zwei Interpretationen möglich:

1. Das Partikel ändert seine Bewegungsrichtung und bewegt sich zurück in die Richtung, aus der es gekommen ist. Diese Lösung wird automatisch von der Phasenrekonstruktion gemäß Gleichung 4.6 geliefert, die immer Phasenwerte innerhalb des Intervalls $\hat{\Phi} = 0 \dots \pi$ ergibt.
2. Oder aber das Partikel behält seine Bewegungsrichtung beim Nulldurchgang bei, was einem Verlassen des Phasenintervalls $\hat{\Phi} = 0 \dots \pi$ entspricht.

In Abbildung 8.4 werden beide Interpretationsmöglichkeiten angeboten. Der Pfad gemäß Variante 1 ist durch eine durchgezogene Linie zwischen den beiden Nulldurchgängen dargestellt. Die gestrichelte Linie in diesem Bereich folgt der zweiten Interpretationsmöglichkeit für beide Nulldurchgänge. Sie entspricht der Spiegelung der ersten Variante an der Achse, die durch $\hat{s} = 0$ gegeben ist. Im Fall der zweiten Deutungsmöglichkeit ergibt sich innerhalb des gezeigten Ausschnitts eine Spannweite von 188 nm, was der Abschätzung

von 220 nm nahe kommt.¹ Des Weiteren besteht auch noch die Möglichkeit, dass nur bei einem der beiden Nulldurchgänge eine Richtungsänderung vorliegt. Dieser Fall ist nicht eingezeichnet. Er liefert allerdings eine ähnliche Spannweite für den gezeigten Ausschnitt wie Variante 2.

Diese Untersuchung führt zu der Schlussfolgerung, dass das Testpartikel der schnellen Kinesinmessung aus Abbildung 8.1 nicht an der Deckgläschenoberfläche haftet, sondern, abgesehen von der Kinesinbindung an den Mikrotubulus, frei beweglich ist. Sowohl diese Bindung als auch das Haften der Partikel an der Deckgläschenoberfläche schlagen sich in den spektralen Leistungsdichten wie ein harmonisches Potential nieder. Sie unterscheiden sich jedoch voneinander durch unterschiedliche Reibungswiderstände. Aus der Literatur ist bekannt, dass Kräfte aufgrund von Reibungswiderstand die Kinesingeschwindigkeit herabsetzen [77]. Dieses deckt sich mit unseren Messungen. So ist der Reibungswiderstand im Falle der langsamen Kinesinmessung ungefähr 15 mal höher als bei der schnellen Kinesinmessung, die mittleren Geschwindigkeiten unterscheiden sich ungefähr um einen Faktor zehn.

Die beiden hier gezeigten Kinesinmessungen stellen nur eine exemplarische Auswahl aus vielen vermessenen Proben dar. Vor jeder Messung wurde eine entsprechende Ruhemessung aufgenommen, aus der die spektrale Leistungsdichte der rekonstruierten Partikelposition ermittelt worden ist. Dabei kann festgestellt werden, dass die Spektren der meisten Proben dem der schnellen Kinesinprobe sehr stark ähneln, was auch auf die Standardabweichung der rekonstruierten Partikelpositionen der Ruhemessungen zutrifft. Der oben gegebenen Interpretation folgend ist also davon auszugehen, dass die Testpartikel in den meisten Fällen nicht an der Deckgläschenoberfläche haften. In keiner dieser Messungen sind 8 nm große Schritte zu erkennen. Allerdings variieren trotz ähnlicher spektraler Leistungsdichten die gemessenen Geschwindigkeiten zwischen diesen Proben sehr stark. So wurden Werte von $\bar{v} \approx 80$ nm/s bis $\bar{v} \approx 2600$ nm/s gefunden. Es muss dabei beachtet werden, dass es sich stets um den Beginn einer Kinesinbewegung nach ATP-Zugabe handelt, die im Allgemeinen noch weit entfernt ist von einer Art „Geschwindigkeit im Gleichgewicht“. Es ist auch nicht auszuschließen, dass durch den nur einmaligen Spülvorgang noch eine von Probe zu Probe unterschiedliche Restkonzentration AMP-PNP in der Flusskammer vorhanden ist, die die Geschwindigkeit herabsetzen kann. Üblicherweise werden Kinesingeschwindigkeiten aus Messungen an sogenannten Gliding

¹ Es muss noch angemerkt werden, dass das zugrunde liegende Modell nur eine grobe Näherung ist. Zum einen wird die Länge der Kinesinverbindung zwischen Mikrotubulus und Polystyrolkugeln ignoriert. Laut Wang et. al. [82] und Hirokawa et. al. [83] beträgt sie etwa 25 nm. Zum anderen ist die Vorstellung, dass sich das Partikel frei auf der Oberfläche des Mikrotubulus bewegen kann, frei konstruiert und entspricht keinem wirklich vorhandenen Mechanismus. Dennoch zeigt diese Art der Abschätzung gute Übereinstimmungen mit Messungen des maximalen Partikelversatzes [13].

Assays gewonnen, in denen unter Beteiligung vieler Kinesinmoleküle, die an einer Deckgläschenoberfläche haften, ein Mikrotubulus bewegt wird, dessen Geschwindigkeit bestimmt werden kann [84]. Durch die Mittelung über die Bewegung vieler Motorproteine und über Zeiträume von mehreren Sekunden, werden Unregelmäßigkeiten der Geschwindigkeiten einzelner Kinesinmoleküle, wie sie in unseren Messungen zu beobachten sind, eliminiert.

Teil IV

ZUSAMMENFASSUNG

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Arbeit wurde die neuartige Methode der „differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung“ vorgestellt. Die Interferenz des Streulichts eines Testpartikels mit dem eines in der Objektebene fixierten Referenzpartikels wird genutzt, um Bewegungen der beiden Partikel relativ zueinander mit hoher Präzision zu messen. Die Interferenzsignale werden mit zwei Avalanche-Photodioden gemessen, deren Bandbreite durch das Zusammenspiel mit den nachgeschalteten Transimpedanzverstärkern auf 20 kHz begrenzt ist, was einer Zeitauflösung von 50 μs entspricht (Abschnitt 5.2). Die Ortsauflösung des Messinstruments wurde bei dieser Bandbreite und bei einer Intensität des beleuchtenden Laserstrahls von 20 kW/cm^2 in der Objektebene zu 0,9 nm bestimmt. Der Drift des Objektstischs des Mikroskop, der zuvor für diesen Aufbau mit typischen Werten um 150 nm/min ermittelt wurde, wird durch das differentielle Messverfahren effektiv aus den Messwerten eliminiert, sodass der Drift in einer einminütigen Messreihe der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung lediglich 0,4 nm beträgt. Außerdem wurde gezeigt, dass Schwankungen der Laserleistung durch eine geeignete Auswertung der beiden Messkanäle effektiv aus den rekonstruierten Partikelpositionen entfernt werden (Abschnitt 5.3).

Der in dieser Arbeit vorgestellte experimentelle Aufbau ist relativ einfach, da die Korrektur des Mikroskopdrifts keine besondere mechanische Stabilisierung des Aufbaus erfordert, abgesehen von der kompakten und stabilen Bauweise des Interferometeraufsatzes. Die Drifteliminierung ist der differentiellen Methode inhärent, sodass auf aufwendige Maßnahmen, wie eine thermische Isolierung des gesamten Aufbaus oder eine aktive Stabilisierung des Objektstischs durch eine Regelung mit Piezoelementen, verzichtet werden kann. Die Messwerterfassung mit nur zwei APD fügt sich in eine Reihe von Lokalisierungsmethoden ein, die mit wenigen Detektionskanälen hohe Orts- und Zeitauflösungen erreichen und dabei ohne kostenintensive Hochgeschwindigkeitskameras auskommen [6, 7, 13].

Die Leistungsfähigkeit und Praxistauglichkeit der Methode wurde durch die Messung der Bewegung des Motorproteins Kinesin an Mikrotubuli entlang demonstriert 8.1. Als Marker wurden Polystyrolkugeln mit einem Durchmesser von 0,5 μm verwendet, die durch ihre gute Lichtstreuung ein ausreichend starkes Signal ermöglichen, sodass gleichzeitig eine hohe Orts-

und Zeitauflösung erzielt werden kann. Die typischen 8 nm großen Schritte konnten deutlich sichtbar gemacht werden. Üblicherweise werden für solche Messungen optische Pinzetten verwendet, um die Kügelchen festzuhalten und deren thermische Bewegung zu unterdrücken, wodurch überhaupt erst die nötige Ortsauflösung erzielbar ist. Die hier gezeigten Messungen wurden jedoch ohne die Verwendung externer Kräfte durchgeführt. Nach meinem Kenntnisstand wurde bisher erst einmal in der Fachliteratur von Capello et. al. berichtet, dass die Auflösung einzelner Kinesinschritte bei hoher ATP-Konzentration – was wegen der schnellen Schrittfolge eine hohe Zeitauflösung erfordert – ohne eine optische Pinzette gelungen ist [85]. Durch eine Untersuchung der spektralen Leistungsdichten der aus den aufgenommenen Messreihen rekonstruierten Partikelpositionen konnte gezeigt werden, dass die Polystyrolkügelchen in einigen Messreihen durch Haften an der Oberfläche des Deckgläschens in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkt waren (Abschnitt 8.3). Mit der hier beschriebenen Präparation der Proben zeigten etwa 20 % der Messreihen eine spektrale Leistungsdichte, die auf ein solches Haften schließen lassen. Eine Optimierung der Probenpräparation im Hinblick auf dieses Haftverhalten könnte die Reproduzierbarkeit von Messungen mit einzeln aufgelösten Kinesinschritten weiter verbessern.

Potential für eine Erweiterung des vorhandenen Messaufbaus liegt in der Quadratur des Interferenzsignals und dem Übergang auf vier Detektionskanäle, die die Interferenzsignale mit einem Phasenabstand von jeweils 90° messen (siehe Abschnitt 4.3 und Abschnitt 4.4). Hierdurch wird eine eindeutige Bestimmung der Bewegungsrichtung der Probe möglich und die Uneindeutigkeit eines Vorzeichenwechsels bei den Phasenwerten $\Phi = 0$ und $\Phi = \pi$ des Interferogramms entfällt. Auch die Reichweite der Partikelbewegung von derzeit 200 nm würde ausgedehnt, da durch die vierkanalige Auswertung die Verzerrung der Phasenrekonstruktion umgangen werden kann. Die Reichweite ist dann lediglich dadurch begrenzt, dass die Modulation der Stromsignale durch die Entstehung von Interferenzstreifen mit zunehmender zurückgelegter Distanz abnimmt und sich ab einem gewissen Wert nicht mehr ausreichend vom thermischen Rauschen der Detektoren abhebt.

Dank der Drifteliminierung der differentiellen interferometrischen Partikelverfolgung ist eine sehr gute Langzeitstabilität der Messwerte gewährleistet. Diese Eigenschaft macht die Methode auch für Prozesse interessant, die auf längeren Zeitskalen ablaufen, wie etwa minimale Formänderungen fester Körper im Subnanometerbereich.

ANHANG



ANSATZ EINES MOBILITÄTS-ASSAYS

Die folgende Anleitung stellt ein „Kochrezept“ zur Herstellung der verschiedenen Ansätze dar, die bei der Probenpräparation nach Abschnitt 7.1 nacheinander durch die Flusskammer gespült werden.

ZUTATEN

Die einzelnen Komponenten, aus denen die verschiedenen Ansätze zusammengestellt werden, sind als Aliquots in Eppendorfgefäßen in der Arbeitsgruppe Klopfenstein im Dritten Physikalischen Institut vorhanden. Die folgende Tabelle listet die verwendeten Komponenten mit der Beschriftung auf den Eppendorfgefäßen und dem jeweiligen Inhalt auf.

Beschriftung der Eppendorfgefäße	Inhalt
AMP-PNP	AMP-PNP
ATP	ATP
Beads	Polystyrolkugeln
BRB-80	BRB-80 (Puffer)
C	Casein
C40	C40-Catalase
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
GOX	Glucoseoxidase
His	Anti-HIS ₆ -Tag-Antikörper
M	MgCl ₂
Nkin	Kinesin Nk433His
Tx	Taxol
Z	Glucose

LÖSUNGEN ANSETZEN

Die folgenden Ansätze sollten in der Reihenfolge hergestellt werden, in der sie aufgelistet sind, da sie zum Teil wieder als Komponenten für nachfolgende Ansätze dienen.

BRB-80-Tx:	10 µl Tx auf 990 µl BRB-80
Antibleach:	40 µl BRB-80-Tx, je 1 µl AMP-PNP, M, DDT, C40, GOX, Z
bzw.	120 µl BRB-80-Tx, je 2,5 µl AMP-PNP, M, DDT, C40, GOX, Z
Motor-Verdünnung:	Verdünnungsreihe ansetzen, je- weils 0,5 ml-Eppendorfgefäß mit 9 µl Antibleach vorlegen, 1 µl Nkin in 9 µl Antibleach verdün- nen und dann davon wieder 1:10- Verdünnung herstellen. Bis 1:10 ⁴ , davon doppelte Menge.
Motor-Ansatz:	9 µl Antibleach 4 µl Motor-Verdünnung 4 µl Beads 4 µl His
bzw.	27 µl Antibleach 12 µl Motor-Verdünnung 12 µl Beads 12 µl His
	-> auf Eis 10 min inkubieren.
Casein-Mix:	18 µl BRB-80-Tx, 2 µl C
bzw.	54 µl BRB-80-Tx, 6 µl C

ATP-Ansatz: 20 μ l BRB-80-Tx,
je 0,5 μ l ATP, M, DDT, C40, GOX,
Z

bzw. 60 μ l BRB-80-Tx,
je 1,5 μ l ATP, M, DDT, C40, GOX,
Z

FLUSSKAMMERPRÄPARATION

10 μ l Goldpartikelkolloid werden zentral auf ein mit DETA beschichtetes Deckgläschen gegeben und nach 20 s mit Druckluft weggeblasen. Anschließend wird die Flusskammer zusammengesetzt und nacheinander mit folgenden Ansätzen gespült, wobei der ATP-Ansatz erst dann hinzugegeben wird, wenn sich die Flusskammer bereits im Mikroskop befindet und das Interferometer justiert ist:

2 μ l Mikrotubulipräparat in 18 μ l
BRB-80-Tx (1:10)
20 μ l Casein-Mix
20 μ l Motor-Ansatz (2 min inkubieren)
20 μ l Antibleach
20 μ l ATP-Ansatz (im Mikroskop)

LISTE DER VERWENDETEN SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

a_1	Amplitude des Stromsignals 1
a_2	Amplitude des Stromsignals 2
a_p	Pixelseitenlänge
A_1	Intensitätsamplitude 1
A_2	Intensitätsamplitude 2
APD	Avalanche-Photodiode
APD1	Avalanche-Photodiode 1
APD2	Avalanche-Photodiode 2
α	Winkel zwischen den optischen Achsen des beleuchtenden Laserstrahls und des Mikroskops
b	Hintergrundstromsignal
b_1	Hintergrundstromsignal 1
b_2	Hintergrundstromsignal 2
B_1	Hintergrundintensität 1
B_2	Hintergrundintensität 2
BS	Strahlteiler
C	Kapazität der APD
$\chi(t)$	Dimensionsloser Koeffizient der zeitlichen Laserleistungsschwankung
DIK	Differentialinterferenzkontrast
$d\Phi$	Änderung der Interferenzphase
ds	Änderung des Partikelabstands
ds'	Änderung des virtuellen Partikelabstands
δ	Abstand eines Fluoreszenzmoleküls vom Myosin-V-Zentrum
$\Delta\hat{s}$	Ortsauflösung
Δt	Zeitauflösung
f	Brennweite
f_0	Grenzfrequenz des Transimpedanzverstärkers
HBE	Hintere Brennebene
k	Wellenzahl
L1	Konvexlinse 1
L2	Konvexlinse 2
λ_0	Vakuumwellenlänge
λ_x	Abstand zwischen zwei Wellenfronten in x-Richtung
m	Masse
M	Vergrößerung des Mikroskops
M1	Spiegel 1
M2	Spiegel 2

M3	Spiegel 3
n	Brechungsindex
N	Photonenzahl
NA	Numerische Apertur
p_x	Impulskomponente in x -Richtung
P	Position des Testpartikels
P'	Position des virtuellen Bilds des Testpartikels
P_0	Strahlungsleistung des beleuchtenden Laserstrahls
PH1	Lochblende 1
PH2	Lochblende 2
PSF	Punktspreizfunktion
Φ	Interferenzphase
$\hat{\Phi}$	Rekonstruierte Interferenzphase
Φ_0	Startphase des homogenen Interferogramms
QPD	Quadrantenphotodiode
R	Position des Referenzpartikels
R'	Position des virtuellen Bilds des Referenzpartikels
R_1	Ohmscher Widerstand im Transimpedanzverstärker
ρ	Radius des kreisförmigen Interferogramms
s	Partikelabstand in x -Richtung
s'	Virtueller Partikelabstand in x' -Richtung
\hat{s}	Rekonstruierter Partikelabstand in x -Richtung
s_0	Partikelabstand in x -Richtung am Anfang einer Messung
S_1	Stromsignal 1
S_2	Stromsignal 2
σ	Standardabweichung einer der PSF angepassten Gaußfunktion
τ	Messdauer
θ	Halber Öffnungswinkel des Mikroskopobjektivs
θ'	Halber Öffnungswinkel des Lichtstrahls ab dem virtuellen Bild
v	Geschwindigkeit
x	Koordinate in der Objektebene
x'	Koordinate in der virtuellen Bildebene
X	Koordinate in der Interferenzebene
y	Koordinate in der Objektebene
y'	Koordinate in der virtuellen Bildebene
Y	Koordinate in der Interferenzebene
z'	Koordinate senkrecht zur virtuellen Bildebene
z'_0	Abstand zwischen der virtuellen Bildebene und der Interferenzebene

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. Kamimura. Direct measurement of nanometric displacement under an optical microscope. *Appl. Opt.*, 26(16):3425–3427, 1987.
- [2] W. Denk and W. W. Webb. Optical measurement of picometer displacements of transparent microscopic objects. *Appl. Opt.*, 29(16):2382–2391, 1990.
- [3] R. M. Simmons, J. T. Finer, S. Chu, and J. A. Spudich. Quantitative measurements of force and displacement using an optical trap. *Biophys. J.*, 70(4):1813, 1996.
- [4] A. Yildiz, J. N. Forkey, S. A. McKinney, T. Ha, Y. E. Goldman, and P. R. Selvin. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628):2061–2065, 2003.
- [5] J. Gelles, B. J. Schnapp, and M. P. Sheetz. Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*, 331(6155):450–453, 1988.
- [6] M. Nishiyama, E. Muto, Y. Inoue, T. Yanagida, and H. Higuchi. Substeps within the 8-nm step of the ATPase cycle of single kinesin molecules. *Nat. Cell Biol.*, 3(4):425–428, 2001.
- [7] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365:721, 1993.
- [8] C. M. Coppin, J. T. Finer, J. A. Spudich, and R. D. Vale. Detection of sub-8-nm movements of kinesin by high-resolution optical-trap microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(5):1913–1917, 1996.
- [9] H. Higuchi, E. Muto, Y. Inoue, and T. Yanagida. Kinetics of force generation by single kinesin molecules activated by laser photolysis of caged ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9):4395–4400, 1997.
- [10] E. A. Abbondanzieri, W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick, and S. M. Block. Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase. *Nature*, 438(7067):460–465, 2005.
- [11] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.*, 82(5):2775–2783, 2002.

- [12] V. Jacobsen, P. Stoller, C. Brunner, V. Vogel, and V. Sandoghdar. Interferometric optical detection and tracking of very small gold nanoparticles at a water-glass interface. *Opt. Express*, 14(1):405–414, 2006.
- [13] M. W. Allersma, F. Gittes, M.J. deCastro, R.J. Stewart, and C.F. Schmidt. Two-dimensional tracking of ncd motility by back focal plane interferometry. *Biophys. J.*, 74:1074–1085, 1998.
- [14] O. Otto, F. Czerwinski, J. L. Gornall, G. Stober, L. B. Oddershede, R. Seidel, and U. F. Keyser. Real-time particle tracking at 10,000 fps using optical fiber illumination. *Opt. Express*, 18(22):22722–22733, 2010.
- [15] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.*, 24(4):156–159, 1970.
- [16] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.*, 11(5):288–290, 1986.
- [17] K. Svoboda and S. M. Block. Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 23:247–285, 1994.
- [18] M. Mahamdeh and E. Schäffer. Optical tweezers with millikelvin precision of temperature-controlled objectives and base-pair resolution. *Opt. Express*, 17(19):17190–17199, 2009.
- [19] A. R. Carter, G. M. King, T. A. Ulrich, W. Halsey, D. Alchenberger, and T. T. Perkins. Stabilization of an optical microscope to 0.1 nm in three dimensions. *Appl. Opt.*, 46(3):421–427, 2007.
- [20] G. B. Airy. On the diffraction of an object-glass with circular aperture. *Trans. Camb. Phil. Soc.*, 5:283, 1835.
- [21] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- [22] S. W. Hell and J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, 1994.
- [23] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, and S. W. Hell. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(15):8206–8210, 2000.
- [24] W. Heisenberg. Über den anschaulichen Inhalt der quantentheoretischen Kinematik und Mechanik. *Zeitschrift für Physik*, 43(3):172–198, 1927.

- [25] W. Heisenberg. *The Physical Principles of Quantum Mechanics*. U. Chicago Press, 1930.
- [26] R. H. Dicke and J. P. Wittke. *Introduction to Quantum Mechanics*. Addison-Wesley, 1960.
- [27] C. M. Caves, K. S. Thorne, R. W. P. Drever, V. D. Sandberg, and M. Zimmermann. On the measurement of a weak classical force coupled to a quantum-mechanical oscillator. i. issues of principle. *Rev. Mod. Phys.*, 52(2):341, 1980.
- [28] C. M. Caves. Quantum-mechanical noise in an interferometer. *Phys. Rev. D*, 23(8):1693, 1981.
- [29] R. W. P. Drever, J. Hough, W. A. Edelstein, J. R. Pugh, and W. Martin. On gravitational radiation detectors using optical sensing techniques. In *Gravitazione Sperimentale, Proceedings of the International Meeting of Experimental Gravitation*, pages 365–369, 1977.
- [30] M. K. Cheezum, W. F. Walker, and W. H. Guilford. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys. J.*, 81(4):2378, 2001.
- [31] N. Bobroff. Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Rev. Sci. Instrum.*, 57(6):1152–1157, 1986.
- [32] W. Hua, J. Chung, and J. Gelles. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 295(5556):844–848, 2002.
- [33] A. D. Mehta. Myosin learns to walk. *J. Cell Sci.*, 114(11):1981–1998, 2001.
- [34] J. N. Forkey, M. E. Quinlan, M. A. Shaw, J. E. T. Corrie, and Y. E. Goldman. Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. *Nature*, 422(6930):399–404, 2003.
- [35] E. M. De La Cruz, A. L. Wells, S. S. Rosenfeld, E. M. Ostap, and H. L. Sweeney. The kinetic mechanism of myosin V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pages 13726–13731, 1999.
- [36] S. W. Hell. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828):1153–1158, 2007.
- [37] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793):1642–1645, 2006.

- [38] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.*, 91(11):4258, 2006.
- [39] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3(10):793–796, 2006.
- [40] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada, and T. Yanagida. Sub-piconewton force fluctuations of actomyosin in vitro. *Nature*, 352:301–306, 1991.
- [41] J. T. Finer, R. M. Simmons, J. A. Spudich, et al. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368(6467):113–119, 1994.
- [42] J. E. Molloy, J. E. Burns, J. Kendrick-Jones, R. T. Tregear, and D. C. S. White. Movement and force produced by a single myosin head. *Nature*, 378(6553):209–212, 1995.
- [43] H. Kojima, E. Muto, H. Higuchi, and T. Yanagida. Mechanics of single kinesin molecules measured by optical trapping nanometry. *Biophys. J.*, 73(4):2012–2022, 1997.
- [44] K. Visscher, S. P. Gross, and S. M. Block. Construction of multiple-beam optical traps with nanometer-resolution position sensing. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 2(4):1066–1076, 1996.
- [45] F. Gittes and C. F. Schmidt. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Opt. Lett.*, 23(1):7–9, 1998.
- [46] D. Müller, D. R. Klopfenstein, and R. G. Ulbrich. Differential interferometric particle tracking on the subnanometer-and submillisecond-scale. *Opt. Express*, 21(6):7362–7372, 2013.
- [47] L. Zehnder. Ein neuer Interferenzrefraktor. *Zeitschrift für Instrumentenkunde*, 11:275–285, 1891.
- [48] L. Mach. Über einen Interferenzrefraktor. *Zeitschrift für Instrumentenkunde*, 12:89–93, 1892.
- [49] M. Stipčević. Active quenching circuit for single-photon detection with geiger mode avalanche photodiodes. *Appl. Opt.*, 48(9):1705–1714, 2009.
- [50] E. Hecht. *Optik*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, 2005.
- [51] H. Nobach. *Optische Messtechnik*. Edition Winterwork, 2012.
- [52] E. Hering, K. Bressler, and J. Gutekunst. *Elektronik für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. Springer, 2005.

- [53] H. Nyquist. Certain topics in telegraph transmission theory. *Trans. AIEE*, 47(2):617–644, 1928.
- [54] C. E. Shannon. Communication in the presence of noise. *Proceedings of the IRE*, 37(1):10–21, 1949.
- [55] Solid State Division Hamamatsu Photonics K.K. *Characteristics and use of Si APD (Avalanche Photodiodes)*. 2004. http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/SSD/Characteristics_and_use_of_SI_APD.pdf (Stand: 05.02.2013).
- [56] <http://www.proteinatlas.org> (Stand: 25.04.2013).
- [57] C. L. Rieder and A. Khodjakov. Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. *Science*, 300(5616):91, 2003.
- [58] J. L. Rosenbaum and G. B. Witman. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(11):813–825, 2002.
- [59] A. Desai and T. J. Mitchison. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13(1):83–117, 1997.
- [60] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail. Plant antitumor agents. vi. isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, 93(9):2325–2327, 1971.
- [61] Y. H. Song and E. Mandelkow. Recombinant kinesin motor domain binds to β -tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(5):1671–1675, 1993.
- [62] M. Kikkawa, T. Ishikawa, T. Nakata, T. Wakabayashi, and N. Hirokawa. Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.*, 127(6):1965–1971, 1994.
- [63] J. Löwe, H. Li, K. H. Downing, and E. Nogales. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 313(5):1045–1057, 2001.
- [64] R. D. Vale. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 112(4):467–480, 2003.
- [65] R. D. Vale, T. S. Reese, and M. P. Sheetz. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell*, 42(1):39–50, 1985.
- [66] D. Huszar, M. E. Theoclitou, J. Skolnik, and R. Herbst. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Met. Rev.*, 28(1–2): 197–208, 2009.

- [67] M. Kikkawa, E. P. Sablin, Y. Okada, H. Yajima, R. J. Fletterick, and N. Hirokawa. Switch-based mechanism of kinesin motors. *Nature*, 411 (6836):439–445, 2001.
- [68] R. H. Wade and F. Kozielski. Structural links to kinesin directionality and movement. *Nature Struct. Biol.*, 7(6):456–460, 2000.
- [69] M. Yun, X. Zhang, C. G. Park, H. W. Park, and S. A. Endow. A structural pathway for activation of the kinesin motor ATPase. *EMBO J.*, 20(11):2611–2618, 2001.
- [70] A. Yildiz, M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658):676–678, 2004.
- [71] R. D. Vale, T. Funatsu, D. W. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, and T. Yanagida. Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature*, 380(6573):451, 1996.
- [72] R. D. Vale and R. J. Fletterick. The design plan of kinesin motors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13(1):745–777, 1997.
- [73] F. J. Kull, E. P. Sablin, R. Lau, R. J. Fletterick, and R. D. Vale. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, 380(6574):550, 1996.
- [74] R. D. Vale and R. A. Milligan. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288(5463):88–95, 2000.
- [75] W. Hua, E. C. Young, M. L. Fleming, and J. Gelles. Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis. *Nature*, 388(6640):390–393, 1997.
- [76] M. J. Schnitzer and S. M. Block. Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step. *Nature*, 388(6640):386–390, 1997.
- [77] A. J. Hunt, F. Gittes, and J. Howard. The force exerted by a single kinesin molecule against a viscous load. *Biophys. J.*, 67:766, 1994.
- [78] K. Svoboda and S. M. Block. Force and velocity measured for single kinesin molecules. *Cell*, 77:773, 1994.
- [79] E. Meyhöfer and J. Howard. The force generated by a single kinesin molecule against an elastic load. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(2):574–578, 1995.
- [80] C. M. Coppin, D. W. Pierce, L. Hsu, and R. D. Vale. The load dependence of kinesin's mechanical cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(16):8539–8544, 1997.

- [81] H. M. Zhou, I. Brust-Mascher, and J. M. Scholey. Direct visualization of the movement of the monomeric axonal transport motor UNC-104 along neuronal processes in living *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 21(11):3749–3755, 2001.
- [82] Z. Wang, S. Khan, and M. P. Sheetz. Single cytoplasmic dynein molecule movements: Characterization and comparison with kinesin. *Biophys. J.*, 69:2011–2023, 1995.
- [83] N. Hirokawa, K. K. Pfister, H. Yorifuji, M. C. Wagner, S. T. Brady, and G. S. Bloom. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. *Cell*, 56(5):867–878, 1989.
- [84] G. Woehlke, A. K. Ruby, C. L. Hart, B. Ly, N. Hom-Booher, and R. D. Vale. Microtubule interaction site of the kinesin motor. *Cell*, 90(2): 207–216, 1997.
- [85] G. Cappello, M. Badoual, A. Ott, J. Prost, and L. Busoni. Kinesin motion in the absence of external forces characterized by interference total internal reflection microscopy. *Phys. Rev. E*, 68(2):021907, 2003.

DANKSAGUNG

Ich möchte all denjenigen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit in direkter oder indirekter Weise beigetragen haben:

- *Zuerst gilt Herrn Prof. Dr. Rainer G. Ulbrich der Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit und die Zeit, die er immer gern für Diskussionen und zur Weitergabe seines Wissens, sowohl theoretischer als auch praktischer Art, zur Verfügung gestellt hat.*
- *Danke auch an Prof. Dr. Tim Salditt für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.*
- *Ein herzliches Danke an Dr. Dieter Klopfenstein für die schöne Zusammenarbeit im letzten Abschnitt meiner Promotion und das Bereitstellen des biochemischen Know-hows und des entsprechenden Equipments.*
- *Danke an Dr. Thomas Hotz für die vielen interessanten Diskussionen, die den mathematisch-statistischen Teil dieser Arbeit beleuchtet haben.*
- *Des Weiteren danke ich Markus Haller, Lars Liebermeister und Julian Amani für die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und im Büro.*
- *Danke an die Leute aus der Feinmechanik- und der Elektronik-Werkstatt. Sie waren an der Lösung so mancher praktischer Probleme beteiligt.*
- *Danke an Markus Haller und Christoph Neuser für das Korrekturlesen dieser Arbeit.*
- *Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern für den Rückhalt und die Unterstützung, nicht nur während der Promotionszeit.*
- *Danke Andrea. Ich liebe Dich.*
- *Zu guter Letzt, und doch zuallererst, danke ich dem Schöpfer des Universums, dem Licht dieser Welt, durch den und in dem alles ist.*

LEBENS LAUF

Dennis Müller

geboren am 5. Oktober 1982 in Salzgitter
Staatsangehörigkeit: deutsch

1989 - 1993	Grundschule Woltwiesche
1993 - 1995	Orientierungsstufe Lengede
1995 - 2002	Gymnasium Groß Ilsede
Abschluss	Abitur
08/2002 - 05/2003	Zivildienst bei der Lebenshilfe für Behinderte Salzgitter
10/2003 - 09/2005	Grundstudium der Physik an der TU Braunschweig
10/2005 - 10/2008	Hauptstudium der Physik an der Georg-August-Universität Göttingen
Abschluss	Diplom
01/2009 - 06-2013	Promotion am IV. Physikalischen Institut, Georg-August-Universität Göttingen